

Rapport 17/2019 • Utgitt mai 2019

Ernæringens betydning for skinn-, tarm- og gjellehelse hos laks

Faglig sluttrapport

Gerd Marit Berge, Elisabeth Ytteborg, Tone-Kari Østbye, Henrik Sundh, Ida Rud, Lene Sveen, Grete Bæverfjord, Christian Karlsen, Aleksei Krasnov, Jonas Øgaard, Kristina Sundell, Mona Pedersen, Bente Halvorsen og Bente Ruyter





Nofima er et næringsrettet forskningsinstitutt som driver forskning og utvikling for akvakulturnæringen, fiskerinæringen og matindustrien.

Nofima har om lag 350 ansatte.

Hovedkontoret er i Tromsø, og forskningsvirksomheten foregår på fem ulike steder: Ås, Stavanger, Bergen, Sunndalsøra og Tromsø

Hovedkontor Tromsø:

Muninbakken 9–13
Postboks 6122 Langnes
NO-9291 Tromsø

Ås:

Osloveien 1
Postboks 210
NO-1431 ÅS

Stavanger:

Måltidets hus, Richard Johnsensgate 4
Postboks 8034
NO-4068 Stavanger

Bergen:

Kjerreidviken 16
Postboks 1425 Oasen
NO-5844 Bergen

Sunndalsøra:

Sjølsengvegen 22
NO-6600 Sunndalsøra

Alta:

Kunnskapsparken, Markedsgata 3
NO-9510 Alta

Felles kontaktinformasjon:

Tlf: 02140

E-post: post@nofima.no

Internett: www.nofima.no

Foretaksnr.:

NO 989 278 835 MVA

Rapport

Tittel: Ernæringens betydning for skinn-, tarm-, og gjellehelse hos laks	ISBN: 978-82-8296-596-5 (pdf) ISSN 1890-579X
Title: Importance of nutrition for skin, intestine and gill health in Atlantic salmon	Rapportnr.: 17/2019
Forfatter(e)/Prosjektleder: Gerd Marit Berge, Elisabeth Ytteborg, Tone-Kari Østbye, Henrik Sundh (Göteborgs Universitet), Ida Rud, Lene Sveen, Grete Bæverfjord, Christian Karlsen, Aleksei Krasnov, Jonas Øgaard (OUS), Kristina Sundell (Göteborgs Universitet), Mona Pedersen, Bente Halvorsen (OUS) og Bente Ruyter	Tilgjengelighet: Åpen Dato: 24.05.2019
Avdeling: Ernæring og førteteknologi	Ant. sider og vedlegg: 97
Oppdragsgiver: Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfinansiering (FHF)	Oppdragsgivers ref.: FHF 901265
Stikkord: omega-3, fettsyrer, Zn, sink, laks, RAS	Prosjektnr.: 11650
Sammendrag/anbefalinger: Prosjekts hovedmål var å skaffe kunnskap om hvordan ulike nivåer av sink (Zn) og EPA+DHA i dietten påvirker sammensetning, funksjon og robusthet til barrierevev hos laks. Forsøk med laks føret 3 ulike nivåer av Zn og omega-3 i dietten fra parr til postsmolt-størrelse, viste at nivået av omega-3-fettsyrer i dietten påvirker opptaket av Zn i tarmen og Zn-nivået i helkropp. Zn-nivået i føret påvirker på sin side sammensetningen av membranfosfolipidene, noe som igjen vil være av betydning for funksjonen til transportproteiner i tarmen. Histologiske analyser av skinnkvalitet viste at lave nivåer av både omega-3 og Zn ga dårligere skinnkvalitet enn høyere nivåer. omega-3 og Zn hadde effekter på ulike lag i skinnet, der omega-3 påvirket mest de dypere lagene i skinnet, påvirket Zn mest det ytre laget. Både lave doser omega-3 og Zn i føret ga i tillegg dårligere sårhelingsvev. Lavt nivå av omega-3 i føret førte til endret funksjon og sammensetning av tarmmembranen, inkludert reduksjon i aktiv ionetransport og endret kapasitet til osmoregulering. Ulike nivåer av både Zn og omega-3 førte til endret uttrykk av et stort antall gener i gjeller, endringer knyttet til en rekke funksjoner som vevsorganisering, metabolisme, signaloverføring m.m., men betydningen av disse endringene for fysiologisk funksjon er ikke kjent. Gjeller fra alle diettgrupper hadde normal morfologi. Våre observasjoner tyder på at samspillet mellom nivåene av omega-3 (EPA+DHA) og Zn i dietten påvirker en rekke funksjoner i barrierevev. Omega-3 er en begrenset ressurs, og bruken av Zn i føret er regulert. Derfor er det viktig å sikre effektivt opptak og utnyttelse av disse næringsstoffene i laksen. Samspillseffekten mellom Zn og omega-3 og deres helseeffekt bør være et viktig fokus for videre studier.	
English summary/recommendation: The aim of this project was to study effects of varying levels of zinc and omega-3 fatty acids on barrier tissues in Atlantic salmon, from parr in freshwater to post-smolt. Both nutrients affected composition of lipids, and also function, of barrier tissues.	

Forord

Ideen til dette prosjektet ble utformet med bakgrunn i tidligere resultater som tydet på at sub-optimale nivåer av essensielle fettsyrer og mineraler i fôret til laksen kan være av betydning for helse og funksjon til barrierevev. En styringsgruppe for prosjektet ble utnevnt, og endelig prosjektbeskrivelse ble utarbeidet etter innspill fra styringsgruppa. Prosjektet, med en totalramme på ca. 10,8 mill. NOK, er fullfinansiert av FHF. FHF står som oppdragsgiver for prosjektet.

Innhold

1	Sammendrag (både på norsk og engelsk)	1
2	Innledning	2
2.1	Faglig bakgrunn for prosjektet	2
2.2	Ernæring og skinnhelse	2
2.3	Ernæring og tarmhelse	3
2.4	Ernæring og gjellehelse	4
2.5	Prosjektets omfang	5
2.6	Prosjektorganisering	5
3	Problemstilling og formål	7
3.1	Hovedmål	7
3.2	Prosjektets effektmål	7
4	Prosjektgjennomføring	9
4.1	Prøver fra kommersielle anlegg med ulike produksjonsstrategi	9
4.2	Bestemme tilgjengelighet av sink fra ulike kilder	10
4.3	Fôrforsøk i RAS-anlegg, med ulike nivåer av EPA+DHA og sink i fôr	11
4.4	Prøver fra hovedforsøket	15
4.5	Funksjonsanalyse av tarmvev	15
4.6	Sårhelingsforsøk	15
4.7	Mikrobiota	15
4.8	Smittetest	16
4.9	Beregninger og analyser	17
4.9.1	Beregning av fordøyelighet, vekst og organindekser	17
4.9.2	Kjemiske analyser	17
4.9.3	Fett og fettsyrer, fettklasser, PL	17
4.9.4	Analyse av LPS i plasma	18
4.9.5	Genuttrykk	18
4.9.6	Morfologiske analyser og velferdsscore	18
4.9.7	Statistikk	19
5	Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon	21
5.1	Data fra kommersielle anlegg	21
5.1.1	Fettsyrer	22
5.1.2	Sink	24
5.1.3	Røntgenundersøkelse	24
5.2	Tilgjengelighet av Zn	26
5.3	Hovedforsøk: Fra parr til postsmolt i RAS	27
5.3.1	Vekst, organindekser og velferdsscore	27
5.3.2	Sink i helkropp og barrierevev	29
5.3.3	Fettsyresammensetning av ulike membranfosfolipider i skinn, tarm og gjeller	32
5.3.4	Røntgenundersøkelser	43
5.3.5	Histologisk undersøkelse av tarm og gjeller	45
5.3.6	Histologisk undersøkelse av skinn	49
5.3.7	Mikroarray, analyser av barrierevev	51
5.4	Funksjonsanalyse av barrierevev i Ussing-kammer	76

5.4.1	Tarm.....	76
5.4.2	Skinn	80
5.5	Sårheling	82
5.6	Mikrobiota	85
5.7	Smittetest	87
5.8	Oppsummering av resultater fra prosjektet.....	89
6	Hovedfunn	92
7	Referanser	93
8	Leveranser	96

1 Sammendrag (både på norsk og engelsk)

Dette prosjektet hadde som hovedmål å skaffe kunnskap om hvordan sink (Zn) og omega-3-fettsyrene EPA og DHA påvirker funksjon og robusthet i barrierevevene skinn, tarm og gjeller hos laks i RAS. Hovedforsøket ble utført med laks fra parr til postsmolt, med fôr som inneholdt 3 nivåer av sink og 3 nivåer av omega-3 (EPA+DHA).

Resultatene viste at både omega-3 og Zn hadde effekt på sammensetning og funksjon i barrierevev. Redusert innhold av EPA+DHA ga redusert innhold av disse fettsyrene i fosfolipider i skinn, tarm og gjeller. Økt innhold av Zn i fôr førte til endret fordeling av fosfolipider i barrierevevene, med en økning av PE og PC og reduksjon i PS og PI, noe som er potensielt viktig for funksjonen til vevene.

Skinnkvalitet vurdert gjennom histologiske undersøkelser viste at de laveste nivåene av både omega-3 og Zn ga dårligere skinnkvalitet enn de høyeste nivåene. Omega-3 hadde mest effekt i dypere lag av skinnen, mens Zn påvirket mest ytre lag. Det laveste nivået av omega-3 ga dårligere sårhelingssevne.

Det høyeste nivået av omega-3 ga økt innhold av Zn i helkropp og tarmvev. Funksjonstest av tarmvev viste at reduksjon i omega-3 i fôr førte til dårligere barrierefunksjon med forstyrrelser i osmoregulering og redusert aktiv ionetransport. Det var tendenser til morfologisk forskjellig signatur på uttrykket av CD3 innen de ulike diettgruppene, noe som kan indikere at det er en immunologisk funksjonsendring i tarmvevet. Høyst innhold av Zn og lavest innhold av EPA+DHA så ut til å øke T-celle-antall.

Basert på alle observasjoner ser vi et mønster som tyder på et viktig samspill mellom omega-3 (EPA+DHA) og Zn. For alle tre barrierevev ser vi at nivå av Zn i fôr har en tydelig effekt på fettmetabolisme, og effekten på fordeling av fosfolipidklasser er sannsynligvis essensielt for barrierefunksjon i vevene. Nivå av omega-3 i fôr ser også ut til å ha en effekt på utnyttelsen av Zn.

English summary/recommendation:

The aim of this project was to study effects of varying levels of zinc and omega-3 fatty acids on barrier tissues in Atlantic salmon, from parr in freshwater to post-smolt. Both nutrients affected composition of lipids, and also function, of barrier tissues.

2 Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for prosjektet

Laks i oppdrett utsettes for en rekke ytre stressfaktorer. Både miljømessige, mekaniske og smittsomme faktorer kan føre til redusert overlevelse i sjø. Det er anslått at 10 til 20 % av all oppdrettslaks i Norge blir borte fra sjøsetting til slakting, og at sårskader utgjør en stor del av dette tapet (Aunsmo et al., 2008). Vi ser også en utvikling der stadig mer lakseoppdrett foregår i resirkuleringssystemer, der fisken eksponeres for et helt annet vannmiljø enn i gjennomstrømningssystemer. Vannkvaliteten vil kanskje være mer stabil og forutsigbar, men det vil også være større/andre utfordringer i forbindelse med for eksempel økt tetthet, forandret mikrobiota, opphoping av partikler og endret vannkjemi (som for eksempel N-forbindelser, CO₂, mineraler og hormoner).

For å opprettholde god fiskehelse og god fiskevelferd under varierende og ofte utfordrende miljøforhold, er det viktig at alle vev som utgjør fiskens barrierer mot ytre miljø, fungerer optimalt. Barrierevevene gjeller, tarm og skinn er i direkte kontakt med det varierende ytre miljøet, inkludert infeksiose organismer, og det er helt essensielt at alle disse vevene er robuste, intakte, og kan opprettholde normal funksjon og helse under varierende miljøpåvirkning. På tross av dette er det relativt begrenset kunnskap om hvordan endringene i sammensetningen av kommersielle fôr i siste tiår påvirker funksjonen til barrierevevene. Planter som raps og soya har erstattet de marine kildene i laksefôr i stor grad. Redusert andel av marine ingredienser i fiskefôr har ført til en reduksjon i de sunne fettsyrene omega-3-fettsyrene EPA og DHA. Omega-3 fettsyrer er helt sentrale for en rekke biologiske funksjoner i kroppen, som for eksempel cellenes oppbygging, avlesing av arvematerialet og regulering av betennelsesreaksjoner. Planteingredienser inneholder også vitaminer og mineraler. Men laksen klarer ikke å ta opp vitaminene og mineralene fra planter like effektivt som de gjør fra marine kilder. I tillegg er det noen av planteingrediensene som har lavere nivå av vitaminer og mineraler enn marine kilder. Det er dermed å forvente at endringene i fôrsammensetningen, både når det gjelder fettsyrene EPA og DHA og mineralet sink (Zn) vil kunne påvirke fiskens helse og robusthet. Både dyremodellstudier og humane cellekulturstudier har vist en mulig sammenheng mellom omega-3-fettsyrer, Zn-transportørnivåer og fri Zn i celler. I dette prosjektet undersøkes derfor også effekten av mulig samspill mellom nivåer av omega-3-fettsyrer og Zn i dietten.

Prosjektet har som hovedmål å undersøke hvordan endringer i sammensetningen av fôret, med ulike nivå av omega-3-fettsyrer og sink (Zn), påvirker sammensetning og funksjon i de ytre barrierevevene hos laks i RAS.

2.2 Ernæring og skinnhelse

Tidligere studier (FHF-prosjekt 900957 «Langtidseffekter av lave nivåer av omega-3-fettsyrer i fôret») har vist at skinnen til laks i mindre grad er prioritert for deponering av EPA og DHA enn for eksempel hjerte, lever og hjerne, ved mangel på EPA og DHA i fôret (Bou m.fl., 2017 a,b; Ruyter m.fl., 2016). Ved essensiell fettsyremangel blir EPA og DHA i skinnets membranlipider i stor grad erstattet med de pro-inflammatoriske fettsyrene arakidonsyre (ARA, 20:4n-6,) og dihomogamma-linolensyre (DGLA, 20:3n-6). Skinnen utgjør en første forsvarslinje mot stressfaktorer i miljøet og gir kjemisk og fysisk beskyttelse. Det ytterste laget av epidermis hos fisk består av kubiske epitelceller og mukusceller. Keratocytter er en celletype i fiskens hud som har ekstremt rask mobilitet og som kan lukke et overflatesår i huden

hos fisk med et nytt beskyttende celleglag i løpet av timer etter skadeforløp (Bullock et al., 1978). Skadede områder som trenger fornyelse av celler vil så begynne på en lengre reparasjonsprosess. Lipidsammensetningen av keratocyttermembranen vil sannsynligvis påvirke hudens barrierefunksjon.

I tillegg til omega-3-nivået, kan sink-nivå i fôr ha en effekt på skinnkvalitet og sårhelingsprosesser hos laks. Det er vist hos laks at andelen mukusceller øker i dermis ved økt tillegg av sink i fôret (Jensen et al., 2015). Det er viktig å undersøke om atlantisk laks, og særlig skinnet til fisken, på samme måte som det er kjent fra andre dyr, har en positiv immunstimulerende effekt av sink. Det antas at sink kan ha en viktig funksjon i det medfødte immunforsvaret (antibakterielle mekanismer i nøytrofile celler og makrofager). Mer presis kunnskap om økte nivåer av sink gjennom fôrtilskudd kan redusere mottakelighet for bakterieinfeksjoner hos atlantisk laks vil kunne bidra til en mer effektiv forebygging mot infeksjonssykdommer. Nivået av sink i kommersielt fiskefôr er redusert de senere årene uten at effektene av dette har vært undersøkt ytterligere.

Dette prosjektet har derfor som mål å øke kunnskapen om hvordan ulike nivåer av EPA, DHA og Zn i fôret påvirker sammensetning, morfologi og sårhelingskapasitet i skinnet til laksen.

2.3 Ernæring og tarmhelse

Tarmkanalen har en stor overflate mot omgivelsene og god funksjon av tarmvev er essensielt for absorpsjon av næringsstoffer og god fôrutnyttelse. Foreløpig vet man relativt lite om den funksjonelle betydningen av lavt nivå av omega-3-fettsyrer for tarmhelse i laksefisk, men en tidlig studie viste at essensiell fettsyremangel kan føre til lavere mineralopptak (Na^+) i ørrettarm (Nonnotte m.fl., 1987). I en nyere studie med laks ble det observert at lave nivåer av EPA og DHA i fôret ($\leq 1\%$ EPA + DHA i fôret) gjennom hele livsløpet førte til reduksjon av de antiinflammatoriske fettsyrene EPA og DHA i tarmens fosfolipider og økning av de pro-inflammatoriske fettsyrene 18:2n-6 og 20:4n-6 og økt hypervaskularisering og inflammasjon i midttarm (Ruyter m.fl., 2016, Bou m.fl., 2017 a,b). Det ble observert lipopolysakkarid (LPS) i plasma, noe som kan indikere skader på midttarm og lekkasje av LPS fra tarmmikrobiota til blodbanen. Dataene kan tyde på at EPA- og DHA-nivået i fôr til laks kan ha betydning for barrierefunksjonen i laksens tarm. Studien viste også at nivået av omega-3-fettsyrene EPA og DHA i fôret kan påvirke diversiteten av mikrobiota. Det dokumenteres stadig flere sammenhenger mellom diettsammensetning, tarmflora og human helse, men det er begrenset kunnskap om årsak og virkning. Hos fisk forstår man ennå lite av interaksjonen mellom fettsyresammensetning i fôr, tarmflora og fiskehelse.

Både for lite og for mye Zn i kroppen kan ha katastrofale negative konsekvenser for integriteten til en rekke cellulære biokjemiske og biologiske systemer, noe som gjør det viktig for kroppen å inneha mekanismer som regulerer opptak, utskillelse og distribusjon av Zn. Spesialiserte intermembranproteiner og Zn-transportørproteiner i mage-tarmkanalen er her viktige [Krebs m.fl. 2000, Kambe m.fl. 2004].

Det er begrenset kunnskap om hvordan sinkmangel i fôret påvirker laksens tarmhelse. I gris er det funnet at både mangel og overskudd av Zn fører til redusert tarmhelse. Høy dose av Zn i fôret bedret tilveksten, men forårsaket økt akkumulering av Zn i både fæces og midttarm og forårsaket morfologiske skader på tarmvevet (Zhau et al., 2017). Zn-mangel svekket sekresjonen av enzymer fra bukspyttkjertel og reduserte fordøyeligheten av næringsstoff i tarm (Brugger m.fl., 2016).

Det er videre begrenset kunnskap om et mulig samspill mellom sinkmangel og sub-optimale nivåer av EPA og DHA i dietten til laks. I pattedyr er det bl.a. vist at DHA kan påvirke cellulære Zn nivåer gjennom å endre uttrykket av Zn-transportør proteiner (DeMel and Suphioglu, 2014). Det er også vist at effektiviteten av omega-3-metabolismen kan være en egnet biomarkør for sinkstatus i pattedyr (Reed et al., 2014). Sink spiller en avgjørende rolle som en kofaktor for $\Delta 6$ -desaturase enzymet. Desaturaser har både et behov for Zn og en relativt lav bindingskonstant, og dermed er deres aktivitet ganske følsom for et tidlig stadium av sinkmangel. Zn mangel vil dermed kunne føre til redusert kapasitet for omdanning av 18:3n-3 til EPA og DHA. Hvorvidt det finnes et slik samspill mellom sink og omega-3-metabolisme i laks, er ukjent.

I kylling er det vist at sinkmangel også kan forårsake betydelige taksonomiske endringer og reduserer totale artsrikdom og mangfold av mikrobiota i tarmen (Reed et al., 2015), noe som tyder på at det er viktig med kunnskap om hvordan sink påvirker mikrobiota hos laks.

Dette prosjektet har derfor som mål å øke kunnskapen om hvordan ulike nivåer av EPA, DHA og Zn i fôret påvirker lipidsammensetning, barrierefunksjonen til midttarm og baktarm, morfologi og tarmhelse.

2.4 Ernæring og gjellehelse

Gjellene har stor overflate som kommer i kontakt med vann, fôrrester og andre avfallsstoffer og mikrobiota i vannet. Epitelet på sekundærlamellene i gjellene er sårbart, og er gjerne den strukturen som først skades ved forurensninger i vann, eller andre sub-optimale miljøbetingelser. I prosjektet «Behov for essensielle fettsyrer hos laks» (NFR 1992-1994), hvor laksen fikk lave nivåer av både EPA, DHA og 18:3 n-3 i fôret, ble det observert svulne gjelleepitelceller hos lakseunger, og ved ekstrem mangel på disse fettsyrene i fôret ble gjellelamellene sterkt misdannet. Resultatene viste tydelig at gjellene er følsomme for mangel på omega-3-fettsyrer, og responsen var doseavhengig. I en studie av Bell et al (1992) viste man at fettsyresammensetningen i gjellenes fosfolipider i laks i stor grad ble påvirket av n-3- og n-6-fettsyrer i fôret.

Sink absorberes fra vann og fôr, via gjeller og tarm, og gjellene er også viktig for ekskresjon av sink. Sink er en viktig katalysator for et enzym (carbonic anhydrase) som er involvert i å produsere CO₂. God membranfunksjon er en forutsetning for en effektiv gassutveksling, og for en effektiv metabolisme. En studie viste at membranfosfolipidenes sammensetning er av betydning for gjellenes barrierefunksjon i karpe (Zhao et al., 2016). Cholin i fôret påvirket gjellenes antibakterielle egenskaper og relative genuttrykk av en rekke inflammatoriske markører. En annen studie viste at den positive effekten av fosfolipider på gjellehelse er forbundet med forbedring av immunitet, antioksidantstatus og membranbarrieren «tight junction» (unngå lekkasje av bakterier) i fiskens gjeller. Det er rimelig å anta at laksens gjeller, som de andre barrierevevene skinn og tarm, ikke vil være av de mest konserverte vevene når det gjelder nivåer av EPA og DHA i cellenes membranfosfolipider. Dersom man som for de andre vevene finner en dramatisk økning i n-6-fettsyrer når n-3-fettsyrer reduseres, så kan dette også ha betydning for gjellenes antibakterielle egenskaper.

Dette prosjektet har derfor som mål å øke kunnskapen om hvordan ulike nivåer av EPA, DHA og Zn i fôret påvirker lipidsammensetning, morfologi og genuttrykk relatert til funksjon og helse i gjeller.

2.5 Prosjektets omfang

Prosjektet startet i 2016 og ble avsluttet i 2019. Prosjektet omfattet, i tillegg til hovedforsøket, også to pilotforsøk som hadde til hensikt å undersøke status på Zn og fettsyresammensetningen hos laks i kommersielle anlegg, og å undersøke fordøyelighet av organisk og uorganisk Zn;

- 1) Innsamling og analyse av hel fisk og barrierevev fra laks fra 5 kommersielle anlegg.
- 2) Bestemme tilgjengelighet (fordøyelighet) av sink fra to forskjellige sink-kilder, som bakgrunn for valg av Zn-kilde i hovedforsøket.
- 3) Hovedforsøk i RAS, der det ble utført omfattende analyser av prøvematerialet.

Prosjektet har hatt et totalbudsjett på 10,81 mill. NOK, og er i sin helhet finansiert av FHF.

2.6 Prosjektorganisering

Prosjektet, som er ledet av Nofima, har vært et samarbeid mellom 3 partnere; Nofima, Göteborgs universitet (GU) og Oslo Universitetssykehus (OUS). Prosjektet har hatt en styringsgruppe utnevnt av FHF. Både prosjektgruppe og styringsgruppe har hatt noe utskiftning av medlemmer i løpet av prosjektperioden, på grunn av overgang til nye arbeidsgivere.

Ved avslutning av prosjektet besto prosjektgruppen av:

Nofima:

Gerd Marit Berge (prosjektleder) – kompetanse innen fiskeernæring og -biologi.

Bente Ruyter – kompetanse innen fiskeernæring, lipidmetabolisme og essensielt fettsyrebehov.

Tone-Kari Østbye – kompetanse innen lipidmetabolisme og molekylærbiologi.

Elisabeth Ytteborg – kompetanse innen fiskehelse, spesielt skinnhelse, histologiske metoder, molekylærbiologi.

Grete Bæverfjord - kompetanse innen patologi, histologiske undersøkelser, deformiteter.

Lene Sveen - kompetanse innen fiskehelse, sårheling.

Christian Karlsen - kompetanse innen fiskehelse, mikrobiologi, mikrobiota.

Ida Rud - kompetanse innen mikrobiologi, mikrobiota.

Mona Pedersen - kompetanse innen bindevevsanalyser, histologi.

I tillegg har flere Nofima-ansatte bidratt i stor grad med analysearbeid:

Vibeke Høst, Målfrid Tofteberg Bjerke, Marianne Helen Selander Hansen, og Ingunn Berget.

Göteborgs Universitet:

Henrik Sundh – kompetanse innen analyser av barrierefunksjon i midttarm og baktarm.

Kristina Sundell - kompetanse innen analyser av barrierefunksjon i midttarm og baktarm.

Oslo Universitetssykehus (OUS):

Arne Yndestad - kompetanse innen histologiske undersøkelser og immunmerking tarm.

Bente Halvorsen- - kompetanse innen histologiske undersøkelser og immunmerking tarm.

Jonas Øgaard- - kompetanse innen histologiske undersøkelser og immunmerking tarm.

Ved avslutning av prosjektet besto styringsgruppen av:

Arne Schei (Lerøy)

Karl Ottem (Cermaq)

Ragna Heggebø (Marine Harvest)

3 Problemstilling og formål

3.1 Hovedmål

Studere om nivåene av n-3-fettsyrene dokosaheksaensyre (DHA), eikosapentaensyre (EPA) i samspill med endret sink (Zn)-nivå i fôr påvirker funksjon og robusthet av skinn, tarm og gjeller hos laks ved postsmoltproduksjon i resirkuleringsanlegg (RAS).

Delmål:

1. Analysere prøver av barrierevevene skinn, tarm og gjeller, og helkropp fra storsmolt fra ulike kommersielle oppdrettsanlegg for å beskrive status på mineral- og fetttsyresammensetning av vevene.
2. Undersøke hvordan endringer i fôrsammensetning påvirker skinnet til laks
 - a. Vevsmorfologi, lipidklassesammensetning av membranlipider og mineralnivå
 - b. Skjelltap, betydning av bindevevsendringer
 - c. Sårheling
 - d. Betennelsesrisiko
3. Undersøke hvordan endringer i fôrsammensetning påvirker tarmen til laks
 - e. Vevsmorfologi, akkumulering av fettdråper og lipidklassesammensetning av membranlipider
 - f. Funksjonsanalyse av barrierefunksjonen i tarm (lekkasje/permeabilitet)
 - g. Betennelsesrisiko (metabolsk induisert inflammasjon, metaflammation)
 - h. Sammensetning av microbiota i faeces
4. Undersøke hvordan endringer i fôrsammensetning påvirker gjellene til laks
 - i. Vevsmorfologi, inkludert akkumulering av fettdråper og lipidklassesammensetning av membranlipider
 - j. Gjellefunksjon

3.2 Prosjektets effektmål

Laks i oppdrett utsettes for en rekke ytre stressfaktorer, både miljømessige, mekaniske og smittsomme faktorer, som kan føre til redusert overlevelse i sjø. Vi ser også en utvikling der stadig mer lakseoppdrett foregår i resirkuleringssystemer (RAS), der fisken eksponeres for et helt annet vannmiljø enn i gjennomstrømningssystemer. Vannkvaliteten vil kanskje være mer stabil og forutsigbar i RAS, men det vil også være andre utfordringer. For å opprettholde god fiskehelse og god fiskevelferd er det viktig at alle vev som utgjør fiskens barrierer mot ytre miljø, gjeller, tarm og skinn, fungerer optimalt.

Resultater fra prosjektet forventes å gi ny kunnskap som kan bidra til å forbedre barrierevevenes funksjon og helse, vil dermed kunne bidra til bedre fiskevelferd og økt overlevelse, og mindre svinn etter utsett i sjø, noe som er et viktig mål for næringen. Derfor er hovedmålet i dette prosjektet å forstå hvordan endringer i sammensetning av fôr kan påvirke funksjonen til de tre ytre barrierevevene gjeller, skinn og tarm.

Leveranser i prosjektet

Statusrapporter til FHF er levert etter oppsatte frister. Referater etter møter med styringsgruppen er levert til FHF etter hvert møte. Den faglige sluttrapporten inneholder alle resultater framkommet i prosjektet. Videre leveranser omfatter presentasjon av resultater fra prosjektet i nasjonale og internasjonale møter, i nyhetsoppslag, og i vitenskapelige artikler. En detaljert oversikt over leveranser er gitt i Kapittel 8 i denne rapporten.

4 Prosjektgjennomføring

Første del av prosjektet inkluderte innsamling av materiale fra kommersielle anlegg, for å få et bilde av situasjonen i praktisk oppdrett, andre del inkluderte kontrollerte forsøk med omfattende analyser basert på materiale fra hovedforsøket. Arbeidet ble organisert i følgende arbeidspakker:

AP1: Materiale fra kommersielle anlegg

AP2: Kontrollerte fôringsforsøk, fordøyelsesforsøk med Zn-kilder, og hovedforsøk i RAS-anlegg

AP3: Analyser av prøver fra AP2, inkludert arbeid med Ussing-kammer

AP4: Mikrobiota, prøver fra AP2

AP5: Sårhelingsforsøk, fisk fra AP2

Fisk fra to diettgrupper fra AP2 ble overdratt til et annet prosjekt og brukt i smitteforsøk i samarbeid med CtrlAqua.

På grunn av utviklingen mot mer produksjon av smolt i resirkuleringsanlegg, var det et uttalt ønske fra styringsgruppa at hovedforsøket i prosjektet skulle gjennomføres i et RAS-anlegg. Innsamling av materiale fra kommersielle anlegg var også et ønske fra styringsgruppa, og omfattet både RAS- og gjennomstrømningsanlegg, samt et anlegg med gjenbruk av vann. Det ble også valgt anlegg som brukte fôr fra forskjellige produsenter. Forskjellige fôr, forskjellig type anlegg, og i tillegg andre forskjeller i driftsopplegg, f.eks. forskjellig størrelse ved utsett i sjø og salinitet, gjorde at resultatene ikke kunne sammenlignes direkte. Materialet ga likevel en oversikt over situasjonen i et representativt utvalg av kommersielle anlegg som produserer laks for utsett i sjø.

4.1 Prøver fra kommersielle anlegg med ulike produksjonsstrategi

For å skaffe et kunnskapsgrunnlag for å vurdere resultater fra fôringsforsøk i prosjektet, samlet vi inn prøver av fisk fra kommersielle anlegg i Midt- og Nord-Norge, med forskjellige produksjonsregimer og forskjellig fôr. Personell fra Nofima har reist rundt til totalt 5 anlegg, og tatt prøver av hel fisk og barrierevev (skinn, tarm og gjeller) for å analysere disse for fettsyrer og sink. Anlegg og aktuelle fiskegrupper er i hovedsak valgt ut i samarbeid med styringsgruppa i prosjektet (Tabell 1). Prøvene er tatt 1-2 uker før fiskegruppene skulle settes i sjø. Data om produksjonsmetoder, fôrtype og miljø er registrert for hver gruppe, så langt det har latt seg gjøre.

På hvert anlegg ble det tatt vevsprøver av 10 fisk, 40 fisk ble samlet for å ta røntgenundersøkelse. Individvekter ble registrert for all fisk. Analyser av barrierevevene er gjort dels på samleprøver og dels på enkeltindivider. På grunn av et uhell på laben mistet vi en stor del av prøvene som skulle analyseres for sink.

Tabell 1 Basisdata fra anlegg som deltok i undersøkelsen.

Anlegg	Dato uttak	Fiskevekt	System	Salinitet	Fôrleverandør
A	05.04.2016	242 g	RAS		1
B	11.04.2016	335 g	FT (flow-through)	12 ‰	1
C	11.05.2016	238 g	FT (flow-through)		1 og spesialfôr
D	24.02.2017	166 g	RAS	fersk	2
E	30.03.2017	832 g	Gjenbruk av vann	33 ‰	3

4.2 Bestemme tilgjengelighet av sink fra ulike kilder

Det ble utført et enkelt fordøyelsesforsøk for å bestemme tilgjengelighet av sink fra en organisk og en uorganisk kilde. Laks med en gjennomsnittsvekt på 210 gram ble fordelt i 6 kar, 1m² med 60 cm vanddybde, og biomasse i hvert kar var ca. 16 kg ved oppstart. Forsøket ble utført i sjøvann med en vanntemperatur på $13 \pm 0,5$ °C, samme temperatur som var planlagt brukt i hovedforsøket. Fisken ble gitt forsøksfôr i 28 dager før stryking av gjødselprøver.

To forsøksfôr ble gitt til tre kar hver. Fôrene var identiske bortsett fra sinkkilde; organisk kilde var Bioplex Zn 15 % (Alletch) og uorganisk kilde var sinksulfat (Vilomix). Sammensetning av fôr er vist i Tabell 2. Fôr og gjødselprøver ble analysert for sink og yttrium, for beregning av tilgjengelighet (fordøyelighet) av sink.

Tabell 2 Sammensetning av fôr (g/100g) for å bestemme tilgjengelighet av Zn.

	Diett A	Diett B
	Sinksulfat	Organisk Zn
Fiskemel	16,66	16,62
Hvete	8,00	8,00
Hvetegluten	14,00	14,00
Soya proteinkonsentrat	18,00	18,00
Maisgluten	10,00	10,00
Hestebønner	6,00	6,00
Fiskeolje	10,00	10,00
Rapsolje	11,00	11,00
Soyalecithin	0,50	0,50
L-lysin	1,50	1,50
DL-metionin	0,20	0,20
Betafine	0,50	0,50
Vitamin-mix	2,00	2,00
Mononatriumfosfat	1,00	1,00
Carphyll pink	0,05	0,05
Yttrium oksyd	0,01	0,01
Mineralmiks	0,59	
Mineralmiks uten sink		0,56
Organisk sink (Bioplex 15%)		0,08

4.3 Fôringsforsøk i RAS-anlegg, med ulike nivåer av EPA+DHA og sink i fôr

Forsøket ble utført ved Nofimas resirkuleringsanlegg på Sunndalsøra. Forsøket omfattet en periode i ferskvann og en periode i saltvann. I ferskvannsperioden (Del 1) ble lakseparr (60g) holdt på kort lysdag de første 6 ukene og deretter på fullt lys fram til ferdig smolt (100g). Deretter ble fisken holdt i sjøvann (Del 2) fram til avslutning av forsøket (300g). I Del 1 ble fisken holdt i sylindriske kar med konformet bunn, vannvolum 500 liter. Ferskt grunnvann ble brukt som vannkilde for RAS-systemet. Ved overføring til sjøvann ble fisken flyttet til større, åttekantede kar med flat bunn, vannvolum 3000 liter, og med sjøvann pumpet fra 30 meters dyp som vannkilde for RAS-systemet.

Vannkvalitetsmålinger ble registrert i forsøkskar og i RAS-systemer. Oksygen og temperatur ble målt i forsøkskar og RAS-system. I RAS-systemet ble også pH, ammonium og nitrat målt. På grunn av at sink var en forsøksfaktor og at fisk har evne til å ta opp sink også gjennom gjellene, ble innhold av sink i vann analysert regelmessig gjennom førsøket (Figur 1). Dersom sink ble akkumulert i vann over tid, i en resirkuleringssituasjon, ville det kunne påvirke tolking av resultatene i forsøket. Parametere målt i de to RAS-systemene er vist i Tabell 3.

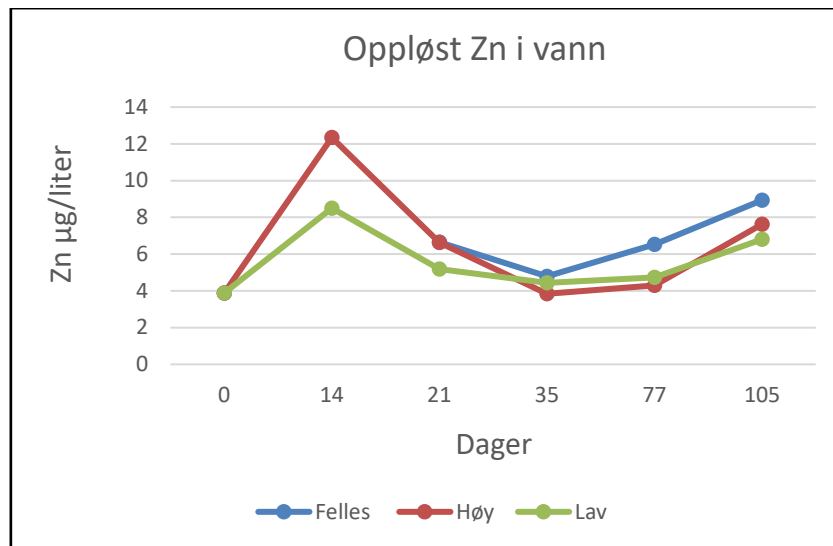
Fram til forsøksstart ble all forsøksfisk gitt et kommersielt fôr. Det ble produsert totalt fem forsøksfôr. Tre fôr var planlagt med forskjellige nivåer av EPA+DHA; Lav (0,5 % av fôr, marginal mangel), Middels (1%, marginal mangel), og Høy (2 %, tilstrekkelig) (Sissener m.fl., 2016; Bou m.fl., 2017 a,b;). Alle disse fôrene hadde også «middels» nivå (200 mg pr kg) av sink (Zn). Videre var det planlagt to fôr med middels nivå av EPA+DHA, men med enten Høyt (300 mg pr kg) eller Lavt (100 mg pr kg) nivå av Zn. Det er tillatt å tilsette 200 mg Zn pr kilo fiskefôr i Norge, men i dagens EU-regelverk er øvre grense på 180mg. Tabell 4 viser sammensetning og kjemiske analyser av alle forsøksfôr, Tabell 5 viser fettsyresammensetning.

All forsøksfisk ble bulkveid og antall registret ved start, overføring til sjøvann, og ved avslutning. Død fisk ble registrert daglig. Tilvekst ble beregnet (SGR, % vektøkning pr dag) basert på gjennomsnittsvekter ved hvert tidspunkt.

Det ble gjort omfattende prøveuttak i forbindelse med overføring til sjøvann, og ved avslutning av forsøket. For all prøvefisk (5 pr kar) ble det registrert vekt, lengde og velferdsscore, og det ble utført røntgenanalyser. Det ble tatt ut blodprøver, og prøver av alle tre barrierevev til ulike histologiske og biokjemiske analyser. I tillegg ble 5 fisk pr kar frosset inn for helkroppsanalyser.

Tabell 3 Vannparametere i ferskvann og saltvann, målt i RAS-systemene.

	RAS1 Ferskvann	RAS2 Saltvann
Temperatur, °C	12,1 ± 0,6	13,0 ± 0,9
pH	7,2 ± 0,05	7,7 ± 0,08
NH ₄ -N, mg L ⁻¹	0,02 ± 0,03	0,16 ± 0,15
NO ₂ -N, mg L ⁻¹	0,01 ± 0,00	0,09 ± 0,06



Figur 1 Innhold av oppløst sink i vann, µg/liter. Prøver tatt fra utløp i kar med Høy eller Lav sink i fôret, eller tatt fra Felles pumpeump for vann inn i alle kar. Fisk ble overført fra ferskvann til saltvann på dag 64.

Tabell 4 Sammensetning av forsøksfôr.

	Lav EPA+DHA	Høy EPA+DHA	Middels EPA+DHA	Middels EPA+DHA	Middels EPA+DHA
	Middels Zn	Middels Zn	Middels Zn	Lav Zn	Høy Zn
g pr 100 gram					
Fiskemel	16,00	16,00	16,00	16,00	16,00
Hvete	7,10	7,10	7,10	7,10	7,10
Hvetegluten	14,40	14,40	14,40	14,40	14,40
Soya proteinkonsentrat	19,00	19,00	19,00	19,00	19,00
Maisgluten	10,00	10,00	10,00	10,00	10,00
Hestebønner	4,00	4,00	4,00	4,00	4,00
Oljeblanding	20,40	20,40	20,40	20,40	20,40
Soya lecitin	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
Vitamin mix	2,00	2,00	2,00	2,00	2,00
Mononatriumfosfat	2,50	2,50	2,50	2,50	2,50
Carophyll pink, 10% Ax	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Yttrium oksyd	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01
L-lysin	1,40	1,40	1,40	1,40	1,40
Mineral mix uten sink	0,555	0,555	0,555	0,555	0,555
Organisk sink	0,087	0,087	0,087	0,02	0,153
Threonin	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
Betafine	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
DL-methionin	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Kjemisk innhold, g pr 100					
Tørrstoff	94,0	94,4	94,3	94,0	93,8
Total lipid	26,77	26,66	26,76	26,20	27,03
Råprotein (N*6,25)	45,1	45,5	45,3	45,2	44,8
Aske	6,9	6,9	6,9	6,9	6,9
Energi, MJ pr kg	23,0	23,0	23,0	22,9	22,9
Zink, mg pr kg	265	263	258	125	373

Tabell 5 Innhold av fettsyrer analysert i forsøksfôr.

	Lav EPA+DHA	Høy EPA+DHA	Middels EPA+DHA	Middels EPA+DHA	Middels EPA+DHA
	Middels Zn	Middels Zn	Middels Zn	Lav Zn	Høy Zn
g pr 100 gram					
C 14:0	0,14	0,66	0,30	0,31	0,31
C 16:0	1,35	1,81	1,48	1,51	1,42
C 18:0	0,36	0,31	0,34	0,34	0,32
C 20:0	0,09	0,06	0,08	0,08	0,09
C 22:0	0,05	0,04	0,05	0,05	0,05
C 24:0	0,02	0,03	0,02	0,02	0,03
Sum SFA	2,04	2,96	2,32	2,35	2,27
C 16:1 n-7	0,14	0,50	0,26	0,26	0,26
C 18:1 n-9	8,54	4,95	7,40	7,31	7,61
C 18:1 n-7	0,54	0,41	0,51	0,50	0,51
C 20:1 n-9	0,40	1,18	0,66	0,66	0,66
C 22:1 n-7	0,01	0,06	0,03	0,03	0,03
C 22:1 n-11	0,30	1,59	0,73	0,73	0,72
C 24:1 n-9	0,02	0,00	0,02	0,01	0,00
Sum MUFA	9,99	8,82	9,67	9,57	9,87
C 18:2 n-6	4,23	2,71	3,65	3,77	3,37
C 18:3 n-3	1,40	0,85	1,24	1,21	1,30
C 20:4 n-3	0,02	0,08	0,04	0,04	0,04
C 20:2 n-6	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
C 20:4 n-6	0,01	0,03	0,02	0,02	0,02
C 20:5 n-3	0,26	0,90	0,48	0,48	0,46
C 22:5 n-3	0,04	0,09	0,06	0,06	0,06
C 22:6 n-3	0,24	0,86	0,45	0,45	0,44
Sum PUFA	6,24	5,57	5,96	6,07	5,72
Sum EPA+DHA	0,50	1,76	0,92	0,93	0,90
Sum n-3	1,97	2,79	2,26	2,24	2,30
Sum n-6	4,26	2,77	3,69	3,80	3,40
n3/n6 ratio	0,46	1,01	0,61	0,59	0,67

¹ Sum SFA omfatter også C15:0, C17:0

² Sum MUFA omfatter også C14:1n-5, C16:1n-9, C16:1n-5, C17:1n-7, C20:1n-11

³ Sum PUFA omfatter også C16:3n-4

4.4 Prøver fra hovedforsøket

Det ble gjennomført tre prøveuttak; startuttak (mai 2017), midtuttak (august 2017) og sluttuttak (oktober 2017). Ved startuttaket ble det frosset ned helkropp (tre samleprøver av 5 fisk per samleprøve) til analyse av fettsyrer og mineraler. Fem fisk pr kar ble tatt ut til omfattende registreringer ved midt- og sluttuttaket; velferdsscore, vekt og lengde, og hjerte- og levervekt. Leverprøver ble frosset for å kunne gjøre analyser seinere om ønskelig. På de samme fiskene ble det også tatt blodprøver for analyse av serum og røde blodceller (RBC), og det ble tatt ut prøver av alle tre barrierevev for kjemiske analyser, genuttrykk, og histologiske analyser. Fem andre fisk fra hvert kar ble tatt ut for helkroppsanalyser. Røntgenbilder av ryggrad ble tatt av alle 10 prøvefisk fra hvert kar. Tidspunkt for midtuttak var 5 dager etter overføring til saltvann. Dette tidspunktet ble valgt for å fange opp effekter av fôring i ferskvannperioden, og hvordan dette hadde påvirket fiskens robusthet før overføring til saltvann. De første dagene etter overføring utgjør en stor belastning for fisken og utfordrer barrierevevene.

4.5 Funksjonsanalyse av tarmvev

Prøver av tarmvev for funksjonsanalyser i Ussing-kammer ble tatt ut like før overføring til sjøvann, mens fisken fortsatt gikk i ferskvann. Det ble også tatt ut prøver ved avslutning av hovedforsøket, etter ca 10 uker i saltvann. Det ble tatt prøver bare fra serien med ulike nivåer av EPA+DHA i fôr. Vev fra både midttarm og baktarm ble undersøkt, og i tillegg ble det tatt prøver av skinn. Det ble brukt et oppsett med Ussing-kammer, som beskrevet av Sundell et al. (2003), med modifikasjoner (Sundell og Sundh, 2012). Undersøkelse av aminosyretransport ble gjort som beskrevet av Vidakovic et al. (2014).

4.6 Sårhelingsforsøk

Ved avslutning av hovedforsøket, ble totalt 30 fisk fra hver fôrgruppe påført standardiserte sår med en 5 mm punktbiopsi-nål (totalt 150 fisk), før de ble satt tilbake i samlekar for hvert fôr, samme kartype, vann og fôr som tidligere.

Sårhelingsprosessen ble fulgt gjennom 4 uker med prøveuttak etter 1, 2 og 4 uker. For hvert uttak ble sårene fotografert med speilreflekskamera (Nikon) i stativ for å standardisere avstanden til bildet. En tommestokk ble lagt ved siden av fisken som referanse. Prøver til histologiske analyser ble lagt på formalin, prøver for transkripsjons-analyser ble lagt på RNA later.

4.7 Mikrobiota

Det ble tatt ut prøver av fôr, tarminnhold og tarmmukosa ved de to uttakene i hovedforsøket. Fisk fra første hoveduttak hadde meget lite tarminnhold. For videre prioritering av de best egnede prøver til videre analyser, ble derfor alle samlede faecesprøver fra baktarm scoret i forhold til konsistens og mengde, fra 1 (mye og fast faeces) til 5 (ingen faeces). Totalt tre faecesprøver med best konsistensscore fra hver av de 15 tankene (5 dietter*3) ble valgt for videre analyser, likeså korresponderende mukusprøve fra samme individ. Faecesprøver fra første uttak ble gitt konsistensscore på 4-5, mens prøver fra det andre uttaket lå høyere med score på 2-3.

Bakterielt DNA fra fôr og tarm ble isolert med DNeasy PowerSoil htp 96 DNA isoleringskitt (Qiagen, tidligere MoBio). Fire til fem fôrpelletts ble benyttet per fôrprøve. Faecesprøvene ble tint i forkant av

isoleringen og ca 30 mg ble benyttet til isolering. Mukusprøvene var lagret i sprit og ble ristet godt (Vortex) før pelletering av bakterieceller til videre DNA isolering. Isoleringen viste at det var meget begrenset med bakterielt DNA i faecesprøvene fra det første uttaket med lite tarminnhold, likeså i alle mukusprøvene. Høy andel bakterielt DNA ble påvist i alle fôrprøvene (ca 10x høyere konsentrasjon enn i faecesprøvene). Videre mikrobiotaanalyser med dybdesequensering ble derfor utført på fôrprøver (fra begge uttakene, totalt 10), tarmfaeces (andre uttaket, totalt 38 prøver tilstrekkelig med DNA) og 2 mukusprøver (lite DNA, men ble inkludert som test, dog ikke inkludert videre i rapporten pga. få sekvenser).

Mikrobiotaanalysene baserte seg på protokoll fra Caparaso et al. (2010a), amplikonsequensering av bakterienes 16S rRNA gen (variabelt område 4). Forarbeid før dybdesequensering innebar triplikate PCR'er med barkodede primere, gelelektroforese, rensing av PCR produktene (AMPure XP Agencourt, kvantifisering (Picogreen, Invitrogen) og tillaging av en ekvivalent samleprøve, rensing, samt kvantifisering. Sekvenseringen ble utført på Miseq (Illumina) med "paired ends" (2X150 bp). Dataprosesseringen ble gjort med programmet Quantitative Insight Into Microbial Ecology (QIIME) versjon 1.9.1 (Caparaso et al., 2010b) og totalt 12.4 millioner sekvenser ble sekvensert. 7.8 millioner sekvenser ble taksonomisk bestemt i Operational Taxonomic Units (OTU'er) etter kvalitetsfiltrering ($q > 30$) og chimera-filtrering, hvor taksonomi var basert på mer enn 97 % sekvenslikhet med OTU'er i Greengenes database (gg_13_8) eller *de novo*. Totalt 5508 unike OTU'er ble detektert. En høy andel av sekvensene (ca 70 %) viste treff mot OTU'er tilknyttet Chloroplast og mitochondria, som er eukaryote celler som også innehar 16S rRNA genet. Disse ble filtrert vekk, likeså OTU'er som var tilstede i lav mengde (< 0.01 %). Dette resulterte i 208 unike OTU'er basert på 2.2 millioner sekvenser som ble benyttet til videre analyser, som alfa diversitet (innen prøver), beta diversitet (mellom prøver) og taksonomisk bestemmelse.

4.8 Smittetest

Fisk fra to grupper i hovedforsøket (Høy Zn og Lav Zn) ble brukt i en smittetest utført i samarbeid med CtrIAQUA SFI (prosjekt 237856/O30) og Nofima (Grunnbevilgning NFR 194050/F40). Fisken ble sultet i 2 dager før overflytting, for å unngå stress og dårlig miljø under transport til VESO Viken. Ved inntak der ble fisken akklimatisert med fôring i 2 uker etter påbegynt appetitt. Diettene med Høy Zn og Lav Zn ble brukt gjennom smitteforsøket. I smitteperioden på ca. 3 uker ble det fôret etter appetitt. Snittvekt ble tatt kort tid etter fisken ble flyttet til smitteavdelingen. Fisken ble randomisert og fordelt mellom seks kar, 3 kar pr diett, og badesmittet med *M. viscosa* (2.4×10^6 cfu ml⁻¹), i henhold til VESO Viken standardprotokoll. Fisken ble prøvetatt før smitte, 4 dager etter smitte (terminering av to tanker) og 5 uker etter smitte (terminering av resterende tanker). Det ble tatt prøver (organpakke) til histologi, genekspresjon og bakteriologi. Vekt og lengde ble dokumentert. Dødelighet ble registrert daglig. Prøvetatt eller terminert fisk ble scoret for sår (0 = ingen lesjoner, 1 = milde lesjoner, 2 = alvorlige lesjoner, 3 = død).

4.9 Beregninger og analyser

4.9.1 Beregning av fordøyelighet, vekst og organindekser

Tilgjengelighet (fordøyelighet) av sink (forsøk beskrevet i 4.2):

$$\text{ADC(Zn)} = 100 - 100 \left(\frac{\%Y \text{ i diett} \times \% \text{ Zn i faeces}}{\%Y \text{ i faeces} \times \% \text{ Zn i diett}} \right)$$

Spesifikk vekstrate, % pr dag: $\text{SGR} = (\ln W_2 - \ln W_1)(t)^{-1} \times 100$

W_1 er W_2 er gjennomsnittsvekt (g) ved start og slutt, og t er antall dager i forsøk.

HSI (leverindeks): $\text{levervekt} / \text{rundvekt} \times 100 \%$

CSI (hjerteindeks): $\text{hjertevekt} / \text{rundvekt} \times 100 \%$

Kondisjonsfaktor (K-faktor): $\text{vekt} / (\text{lengde})^3 \times 100$

Kontraksjonsraten i sårhelingsprosessen ble beregnet fra bildene. Lengde og høyde på sårene ble målt og ratioen (mellom 0-2) beregnet. En lav ratio beskrev et mindre kontrahert sår i forhold til sår med en høyere ratio.

4.9.2 Kjemiske analyser

Standardanalyser brukt i fôr og helfisk (Fordøyelses- og Hovedforsøk), faeces (Fordøyelsesforsøk).

Tørrestoff: tørkes i 3 timer ved 104 °C, avkjøles i 30 minutter i eksikator. Våte prøver (faeces) frysetørkes først ved -80 °C i minimum 2 døgn.

Aske: forasking ved 550 °C i 5 timer, avkjøles i eksikator.

Nitrogen: Tecator Kjeltac Auto 8400, råprotein bereget som $N \times 6,25$.

Energi: bombekalorimetri, Parr 6300 Oxygen Bomb Calorimeter.

Zn, Y: forasket prøve oppsluttes før ICP-analyse.

4.9.3 Fett og fettsyrer, fettklasser, PL

Fettsyrer: Prøver fra uttak 5 dager etter overføring til sjøvann ble analysert for totalfett, og for fettsyrer i totale fosfolipider i de tre barrierevevene og i røde blodceller ble $n6/n3$ -ratio ble beregnet. Prøver fra siste uttak, etter 10 uker i saltvann, ble analysert for fettsyresammensetning i ulike lipidklasser.

Fett ble ekstrahert fra RBC, skinn og tarm og gjeller etter en metode beskrevet av Folch m.fl., 1957. Deretter ble fettsyrene i ekstraktet trans-forestret til fettsyre metyl estere (FAME) etter en metode beskrevet av Mason og Waller (1964). Fettsyresammensetning ble bestemt ved bruk av Hewlett Packard 6890 gass kromatograf (GC) utstyrt med en ID-BP×70 kolonne (SGE, Melbourne, Australia; 60 m × 0.25 mm i.d., 0.25 µm film) med helium som bæregass. Temperaturprogram; 50°C i 1.2min, 50°C til 170°C med 4°C/min, til 200°C med 0.5°C/min, og til 300°C med 10°C/min. FAME ble detektert ved hjelp av en flammeionisasjons-detektor (FID) og fettsyresammensetning verifisert ved hjelp av standard 68D (Nu-Check Prep Inc). 23:0 ble benyttet som intern standard.

For separering av ulike lipidklasser, ble Folch-ekstraktet (tilsatt BHT (0.7 mg/l) dampet inn under nitrogengass og re-oppløst i kloroform. Frie fettsyrer (FFA), fosfolipider (PL), triacylglyseroler (TAG) ble separert ved hjelp av tynnskiktskromatografi (TLC) med mobilfase: petroleumeter:dietyl eter:eddiksyre (113:20:2 v/v/v). De ulike lipidklassene ble visualisert ved å dyppe platen i en kobber-

løsning. Flekkene som korresponderte til henholdsvis FFA, PL og TAG ble identifisert ved sammenligning med kjente standarder ved hjelp av en Bioscan AR-2000 imaging scanner (Bioscan Inc., Washington, DC, USA). De ulike lipidklassene ble så skrapet ut, ekstrahert og FAME produsert og fettsyrer i PL ble bestemt i henhold til metoden beskrevet over. De ulike PL klassene ble separert i henhold til prosedyre.

4.9.4 Analyse av LPS i plasma

Lipopolysakkarider (LPS) ble målt i samleprøver av plasma fra fisk innen hvert kar. Samleprøvene ble laget ved å slå sammen like mengder plasma fra fisk som hadde gått i samme kar. LPS ble analysert i plasma i henhold til analyseprotokoll til analysekit ELISA Cat. No. KT-32191 fra Kamiya Biomedical Company.

4.9.5 Genuttrykk

Totalt RNA ble isolert i henhold til produsentens protokoll (Invitrogen). Genomisk DNA ble eliminert ved behandling av RNA med PureLink DNase1 (ThermoFisher, MA, USA). RNA-konsentrasjonen ble målt med et NanoDrop® ND-1000 spektrofotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA). Integriteten av RNA ble evaluert ved hjelp av Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Kvantitativ PCR

cDNA ble syntetisert fra RNA ved bruk av et TaqMan® Reverse Transcription Reagents kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) i henhold til produsentens protokoll. Kvantitativ PCR ble utført i et QuantStudio5-instrument (ThermoFisher, MA, USA). Relative uttrykk av mRNA ble beregnet ved $\Delta\Delta CT$ -metoden ved bruk av etif3 som referanseggen (Livak et al., 2001).

Microarray analyse

Nofimas 44 k mikroarray Salgeno inneholder oligonukleotidprober til alle identifiserte gener av atlantisk laks. Nofimas bioinformatikk pipeline STARS ble brukt til databehandling. Differensiell forskjell i uttrykk av gener (DEG) ble valgt med lave strengthetskriterier som vanligvis brukes på fôringsforsøk: $\log_2$ -ekspressjonsforhold > | 0,6 | (1,5 ganger) og $p < 0,05$.

4.9.6 Morfologiske analyser og velferdsscore

Røntgen:

Analyse ble utført på 50 fisk fra hvert av de kommersielle anleggene som var med i undersøkelsen, og 10 fisk pr kar, 30 fisk per diett, fra begge uttakstidspunkt i hovedforsøket. Fisken ble røntgenfotografert i et semi-digitalt oppsett, med digital optimalisering og lagring av bildene. Ved avlesning ble det lagt på å registrere spesifikke misdannelser i ryggraden så vel som eventuelle mer uspesifikke avvik fra det normale.

Histologi (skinn, midttarm og gjeller):

Skinprøver ble snittet og orientert i cranial-caudal retning, dekalifisert og støpt inn i paraffinblokker (Histowax). Snitt på 5 μm ble brukt til følgende histologiske analyser: HE (generell histologi) og AB/PAS (mukusceller) farging, Picro Sirius (bindevev) og MMP zymografi (enzymaktivitet). Prøvene ble evaluert med Leica og Zeiss mikroskop og software. Snittene ble evaluert og scoret ut fra et scoringssystem utviklet av Nofima. Systemet inkluderer måling av epidermis, dermis og fettlag, telling av mukusceller og en totalvurdering av morfologien.

Histologiske snitt fra gjeller og midttarm ble undersøkt i et Nikon Optiphot lysmikroskop. Snittene ble evaluert med tanke på å finne avvik fra det normale. Bedømmelsen av tarm hadde vekt på vakuolisering av tarmslimhinna. Variasjon i vakuolisering av tarmepitelcellene ble scoret etter en skala fra 0 til 5, der 0 var normal (ingen vakuolisering) og 5 mest avvikende (gjennomgående vakuolisering, svullent epitel).

Utvikling av AI-assisterte histologianalyser i tarm:

HE-prøver fra tarm ble scannet (Carl Zeiss Axioscan) og dannet grunnlag for utvikling av en digital, automatisk analysemetode basert på kunstig intelligens, for deteksjon av vakuolisert tarmepitel og slimcelletelling.

Immunohistologi i tarm:

For CD3-farging (T-celler) ble 5µm-snitt ble kokt 20 minutter i trykkoker med 20mM citratbuffer (pH 6.0) tilsatt 1 % Tween-20. Snittene ble blokket 30 minutter i 0.5% BSA løsning med 0.1 % Tween-20. Videre ble snittene inkubert i 1:100 fortykning (i blokk) av DAKO CD3 antistoff, klon F7.2.38, 1 time i romtemperatur. Vectorlabs ImmPress HRP-konjugert sekundært antistoff og ImmPact DAB-substrat ble benyttet til deteksjon, og Vectorlabs Hematoxylin QS ble benyttet til kontrastfarging. Imellom alle steg ble prøvene vasket 2x med PBS. Prøvene ble scannet som over, de digitale prøvene evaluert og til sist scoret på en skala fra 0-10, etter hvor mange positivt fargede celler som ble estimert per 10 villi.

Velferdsscore:

Fem fisk fra hvert kar ble vurdert etter et system for scoring av velferdsparametere slik det er beskrevet i Noble et al. (2018). Skinnskader inkluderte både aktive og helede sår og skjelltap, og finnesår/slitasje både nye og helede skader. Alle parameter ble vurdert etter en skala fra 0 til 3. Resultater er oppgitt som frekvens (%) av fisk med ulike typer sår/skader, sum av aktive og helede skader.

4.9.7 Statistikk

Data ble statistisk behandlet, med enveis ANOVA der alle 5 fôr var inkludert. Deretter ble det, der det var aktuelt, gjort enveis ANOVA for hver «serie» separat; en serie med tre nivåer av EPA og DHA i fôr og en serie med tre nivåer av Zn i fôr. Midterste nivå i begge serier var samme fôr. Der individobservasjoner er brukt, er disse inkludert ved å bruke en hierarkisk modell med individobservasjoner innen kar. Alle tabeller viser oversikt over alle 5 dietter, og p-verdi for ANOVA som inkluderer alle dietter. Der p-verdi for «serier» er oppgitt, blir dette spesifisert. Rangering av behandlinger er gjort med Duncan's multiple range test.

Elektriske parametere fra tester i Ussing-kammer ble analysert med to-veis ANOVA, der effekt av omega-3-nivå og av salinitet (fersk/salt), og samspill mellom de to, er bestemt. Normalitet og variasjon ble analysert med Shapiro-Wilk test og Spearman's test. Alle analyser ble utført med GraphPad Prism version 8.0.2 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com.

For beregning av real time qPCR resultatene brukte vi REST som beskrevet i Pfaffel et al., 2001.

Ikke-parametriske test (Kruskall-Wallis) ble brukt for data som ikke er normalfordelt, som kontraksjonsrate for sår. Ved signifikant test ble det gjennomført parvise tester for å bestemme hvilke behandlinger som var forskjellig fra hverandre.

Statistiske analyser av data fra analyser av mikrobiota ble utført i QIIME eller MATLAB, som multivariate analyser som Principal Component Analyse, ASCA (Smilde et al 2005) og 50:50 MANOVA (Langsrud, 2002). Det bør spesifiseres at påvisning av bakteriene kun er relative (%) i forhold til total mikrobiota, og ikke forteller noe om absolutte bakterietall.

5 Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Data fra kommersielle anlegg

Fôrprøver fra forskjellige produsenter, tatt ut ved de aktuelle anleggene. Anlegg A, B og C brukte samme fôrtype, men bare det ene anlegget hadde mulighet til å levere fôrprøve. Fôrprøvene ble analysert for totalfett og fettsyreprofil (Tabell 6), og vi fant noe variasjon. Fôr 1 og 2 ble brukt til fisk på 200-400 gram, mens Fôr 3 ble brukt til fisk som var større (800-900 gram), noe som tilsier forskjellig innhold av fett. De tre kommersielle fôrene hadde alle et innhold av EPA + DHA som utgjorde ca 11 % av totale fettsyrer og 25 til 28 gram EPA + DHA per kg fôr, noe som betyr at behovet for disse fettsyrene i dietten til laksen er godt dekket når disse fôrene benyttes.

Tabell 6 Innhold av totalfett og fettsyreprofil (% av alle fettsyrer) i kommersielle fôr.

Fôr Anlegg	Fôr-1 A, B, C	Fôr-2 D	Fôr-3 E
Fett %	25,37	26,78	30,07
C14t0	3,85	3,24	3,41
C16t0	11,39	10,79	11,07
C18t0	2,27	2,03	3,14
SFA	18,37	17,08	19,86
C16t1n7	3,78	3,10	2,92
C18t1n9	30,22	32,88	31,11
C18t1n7	2,98	2,80	2,69
C20t1n11	1,36	1,16	1,34
C20t1n9	4,37	3,92	3,41
C22t1n11	5,63	4,64	4,26
MUFA	50,78	50,93	48,00
C18t2n6	10,54	12,47	13,21
C18t3n3	4,58	5,31	4,67
C20t5n3	5,31	4,79	5,44
C22t5n3	0,69	0,57	0,50
C22t6n3	5,88	5,71	5,04
PUFA	28,93	30,68	30,43
EPA+DHA, % av fa	11,19	10,50	10,48
EPA+DHA, g/100g, est.	2,6	2,5	2,8
sumn3	17,12	17,27	16,59
sumn6	11,55	13,41	13,83

5.1.1 Fettsyrer

Tabellene 7 - 10 viser fiskevekt, fettnivå og EPA og DHA i prosent av totale fettsyrer i gjeller, skinn, tarm og helkropp. Data er vist med informasjon om fôrtype og produksjonsform, og oppgitt som gjennomsnitt av 3 analyserte samleprøver pr anlegg (n=3), med standard feil. Siden de undersøkte anleggene hvor prøvefisk kom fra, var forskjellige med hensyn til både fiskestørrelse, produksjonsform og fôrtype, er analyseresultatene ikke direkte sammenlignbare og dermed ikke statistisk bearbeidet. Det ble ikke observert noe tydelig mønster i innhold av EPA+DHA i barrierevevene eller i hel fisk når data var gruppert etter fôrtype. Mer interessant var det, at ved gruppering etter driftsform (RAS vs. Gjennomstrømming) så det ut til å være en trend at nivå av EPA var lavere i barrierevev fra fisk som hadde gått i RAS-anlegg (Figur 2), spesielt tydelig for gjeller. Det bør undersøkes nærmere i mer målrettede forsøk om laksen har ulikt behov for EPA i RAS anlegg sammenlignet med FT. Det var ingen forskjeller mellom anlegg i innhold av arakidonsyre (ARA) i de forskjellige vevene. Innhold av ARA var generelt høyere i gjeller enn i skinn og tarmvev.

Tabell 7 Fett og fettsyrer (% av fettsyrer) i gjellevev (fiskevekt er oppgitt).

Gjeller					
Anlegg	Anlegg A	Anlegg B	Anlegg C	Anlegg D	Anlegg E
Produksjon	RAS	FT	FT	RAS	Gjenbr.
Fôr	Fôr 1	Fôr 1	Fôr 1	Fôr 2	Fôr 2
Fiskevekt	234±14	354±37	257±20	216±7	824±43
Folch %	3,3±0,3	2,8±0,2	2,1±0,2	2,9±0,1	2,1±0,1
C20:4n-6	4,1±0,2	4,6±0,02	4,5±0,2	3,4±0,1	4,0±0,2
C20:5n-3	5,4±0,1	7,0±0,3	7,0±0,2	4,8±0,1	7,5±0,2
C22:6n-3	20,4±0,3	20,9±0,3	21,6±0,4	20,4±0,4	20,4±0,4
EPA+DHA	25,8±0,3	27,9±0,3	28,6±0,5	25,2±0,5	27,9±0,5

Tabell 8 Fett og fettsyrer (% av fettsyrer) i midttarm (fiskevekt er oppgitt).

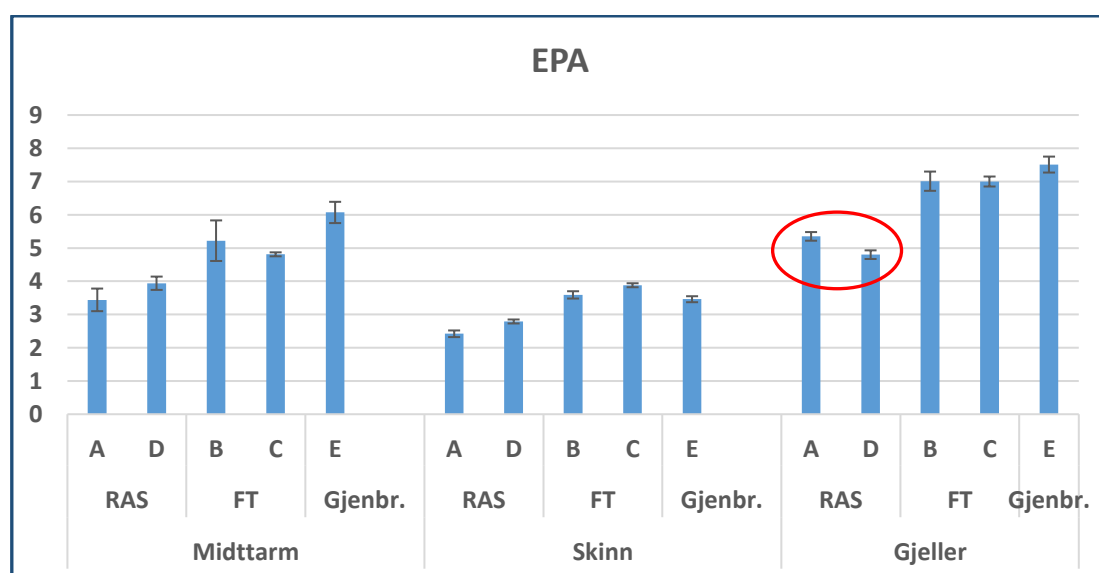
Gjeller					
Anlegg	Anlegg A	Anlegg B	Anlegg C	Anlegg D	Anlegg E
Produksjon	RAS	FT	FT	RAS	Gjenbr.
Fôr	Fôr 1	Fôr 1	Fôr 1	Fôr 2	Fôr 2
Fiskevekt	234±14	354±37	257±20	216±7	824±43
Folch %	4,8±1,1	4,7±0,2	5,4±0,2	3,8±0,6	5,1±0,4
C20:4n-6	1,6±0,3	1,5±0,1	1,2±0,04	1,6±0,1	1,4±0,1
C20:5n-3	3,4±0,3	5,2±0,6	4,8±0,1	3,9±0,2	6,1±0,3
C22:6n-3	18,1±2,6	16,9±1,1	16,1±0,6	22,6±1,4	16,2±1,2
EPA+DHA	21,5±3,0	22,1±1,7	20,9±0,5	26,5±1,5	22,3±1,4

Tabell 9 Fett og fettsyrer (% av fettsyrer) i skinn (fiskevekt er oppgitt).

Gjeller					
Anlegg	Anlegg A	Anlegg B	Anlegg C	Anlegg D	Anlegg E
Produksjon	RAS	FT	FT	RAS	Gjenbr.
Fôr	Fôr 1	Fôr 1	Fôr 1	Fôr 2	Fôr 2
Fiskevekt	234±14	354±37	257±20	216±7	824±43
Folch %	13,7±0,7	15,7±0,6	12,4±0,6	20,5±0,9	24,8±1,1
C20:4n-6	0,5±0,04	0,5±0,04	0,7±0,03	0,5±0,01	0,4±0,03
C20:5n-3	2,4±0,1	3,6±0,1	3,9±0,1	2,8±0,1	3,5±0,1
C22:6n-3	6,3±0,1	7,7±0,1	9,0±0,1	9,0±0,1	5,8±0,1
EPA+DHA	8,7±0,2	11,3±0,0	12,9±0,1	11,8±0,1	9,2±0,1

Tabell 10 Fett og fettsyrer (% av fettsyrer) i hel fisk (fiskevekt er oppgitt).

Gjeller					
Anlegg	Anlegg A	Anlegg B	Anlegg C	Anlegg D	Anlegg E
Produksjon	RAS	FT	FT	RAS	Gjenbr.
Fôr	Fôr 1	Fôr 1	Fôr 1	Fôr 2	Fôr 2
Fiskevekt	242±3	332±2	236±1	167±0,5	838±8
Folch %	11,9±0,3	12,5±0,3	9,5±0,1	13,8±0,4	16,0±0,2
C20:4n-6	0,4±0,01	0,6±0,1	0,5±0,01	0,4±0,01	0,4±0,01
C20:5n-3	2,3±0,1	3,7±0,1	4,0±0,1	2,9±0,1	3,7±0,0
C22:6n-3	7,3±0,1	8,8±0,1	10,5±0,1	10,1±0,1	6,9±0,1
EPA+DHA	9,6±0,2	12,5±0,1	14,5±0,1	13,1±0,1	10,6±0,1



Figur 2 Innhold av EPA (% av alle fettsyrer) i ulike vev i fisk fra ulike anlegg gruppert etter produksjonsform (n=3).

5.1.2 Sink

Tabell 11 viser relativt store forskjeller i Zn-nivå i helkropp i fisk fra tre anlegg som har brukt samme fôrtype. Det er kjent at fisken fra anlegg C-FT hadde vokst relativt sakte og sannsynligvis med høyere fôrfaktor, noe som gir større mulighet for å deponere Zn sammenlignet med anlegg B-FT. Sammenlignes fisk fra to produksjonsformer, anlegg A-RAS med anlegg B-FT, ser man relativt stor forskjell i innhold av Zn i helkropp i laks fra disse to anleggene, med adskillig høyere Zn-nivå i fisken fra RAS enn i FT, henholdsvis 43,6 og 28,4 mg/kg. Det er altfor lite data til å kunne si noe om hvorvidt dette har sammenheng med driftsform, men det er kjent at Zn fra fôr kan akkumulere i vannet i et RAS-anlegg, og man vet at laks kan absorbere Zn fra vannet. Dermed er det et logisk grunnlag for en potensiell forskjell i innhold av Zn i helkropp til fisk fra RAS og gjennomstrømmingsanlegg (FT) som tabellen under indikerer. Dette bør undersøkes nærmere i kontrollerte forsøk.

Tabell 11 Innhold av sink (mg/kg) i hel fisk (n=3).

Anlegg	Hel fisk		
	A	B	C
Produksjon	RAS	FT	FT
Fiskevekt	242±3	332±3	236±1
Sink, mg/kg	43,6±3,5	28,4±0,9	37,8±0,3

5.1.3 Røntgenundersøkelse

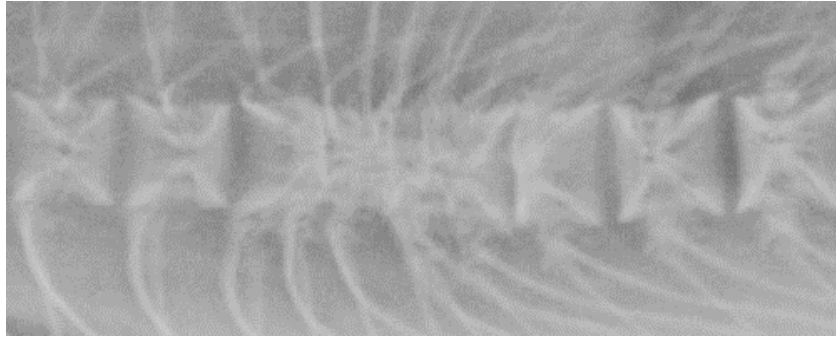
Røntgenundersøkelsen viste et tydelig, men moderat innslag av feil i ryggraden hos fisk fra alle de fem anleggene (Tabell 12). De fleste feilene som ble registrert var fusjoner (sammenvoksinger), og var små (2-4 unormale virvler, Figur 3). To fisk fra anlegg D hadde større fusjoner (hhv. 7 og 11 unormale virvler, Figur 4). Tre fisk fra tre ulike anlegg hadde avvik som kan knyttes til nedsatt mineralisering, i form av høytetthetsvirvler (Figur 5) eller komprimerte/smale virvler (Figur 6). De feilene som ble observert var typiske for funn i fisk på dette utviklingsstadiet fra kommersiell produksjon.

Tabell 12 Oversikt over fisk med registrerte feil i ryggvirvlene fra de fem anleggene.

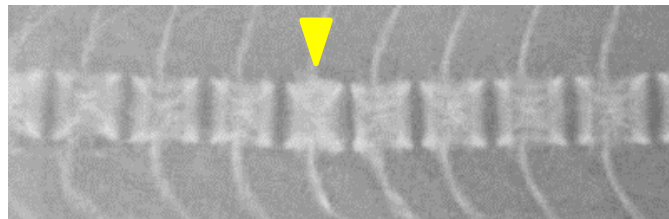
	Anlegg A RAS	Anlegg B FT	Anlegg C FT	Anlegg D RAS	Anlegg E Gjenbruk
Fusjoner (%)	8	10	6	6	2
Nedsatt mineralisering (%)	2	0	2	0	2



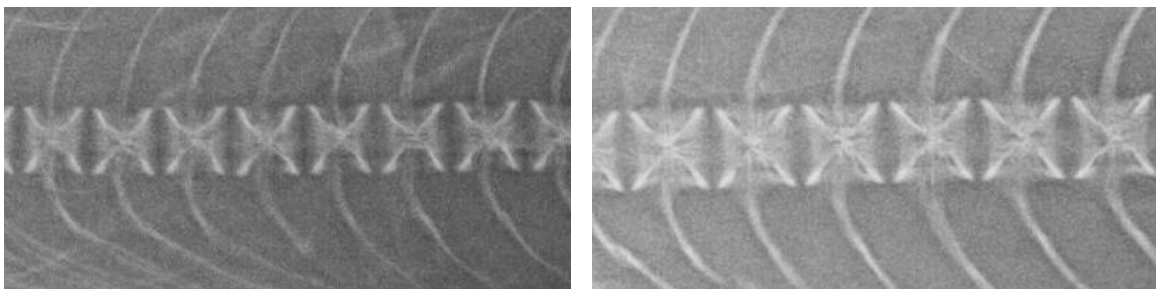
Figur 3 Fusjon i ryggraden hos fisk fra anlegg C. To virvler er i ferd med å vokse sammen.



Figur 4 Fusjon i ryggraden hos fisk fra anlegg D. Hos denne fisken er det til sammen 8 unormale virvler.

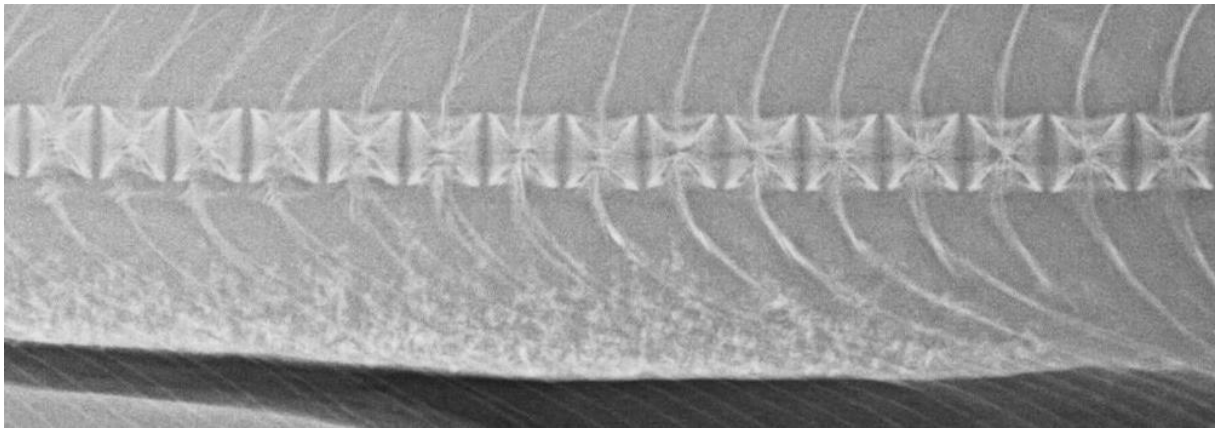


Figur 5 Fisk fra anlegg C med høytetthetsvirvel (pilspiss), som indikerer nedsatt mineralisering. Virvelen har høyere røntgentetthet, og framstår som kvitere enn nabovirvlene på røntgenbildet.



Figur 6 Fisk fra anlegg E med tydelige tegn til nedsatt mineralisering. Virvlene er smale, og mellomrommet mellom virvlene er litt for stort. Hos dette individet var hele ryggraden slik.

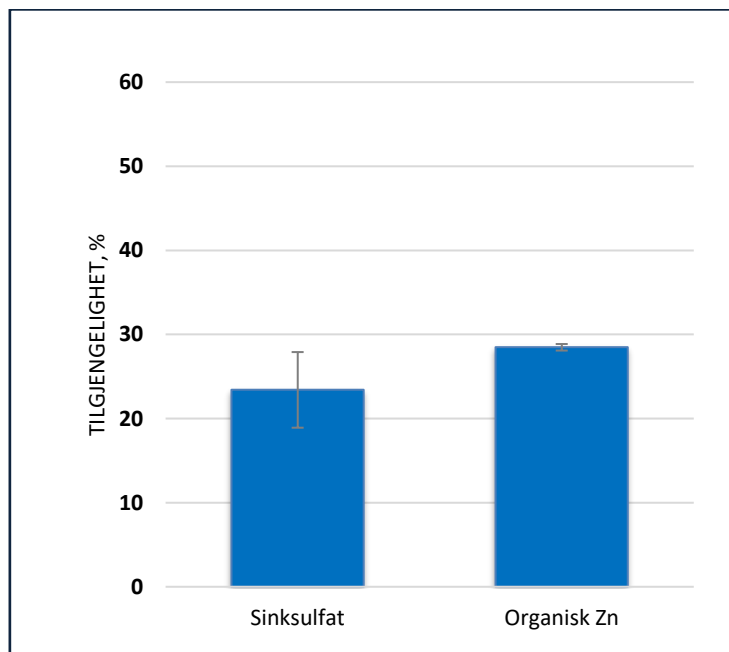
I tillegg til feil i ryggrad ble det registrert nefrokalsinose (mineralavleiring i nyre) i fisk fra to anlegg (Figur 7). I det ene anlegget ble nefrokalsinose registrert hos en fisk, i det andre hos 28 av 40 fisk (70 %).



Figur 7 Nefrokalsinose, slik det observeres på røntgen.

5.2 Tilgjengelighet av Zn

Tilgjengelighet (fordøyelighet) av sink ble bestemt til 23,4 % ($\pm 4,5$ s.e.m.) i fôr med sinksulfat fra standard mineralblanding, og til 28,5 % ($\pm 0,4$ s.e.m.) i fôr med den organiske kilden som ble testet. Resultatene er vist i Figur 8. På grunn av den store variasjonen i målt tilgjengelighet av sinksulfat i dette forsøket, ble ikke forskjellen signifikant mellom de to kildene. Siden den kilden for organisk sink som ble testet i dette forsøket både hadde høyest gjennomsnittsverdi for tilgjengelighet, og lavest variasjon, ble det bestemt å velge denne som sinkkilde i hovedforsøket i prosjektet.



Figur 8 Tilgjengelighet av sink i fôr med to forskjellige sinkkilder.

5.3 Hovedforsøk: Fra parr til postsmolt i RAS

I ferskvannsfasen var det lav dødelighet med kun to døde fisk registrert gjennom hele forsøksperioden fram til overføring til sjøvann. I sjøvannsfasen varierte dødeligheten mye mellom kar innen hver behandling, og det var dermed ingen signifikante forskjeller. Gjennomsnittlig dødelighet totalt i sjøvannsperioden var på 2,1 %.

Før overføring av fisk til sjøvann ble det utført standard salttester. Videre ble det målt nivåer av mineraler i serum like etter overføring til sjøvann, og ved avslutning av forsøket. Det var ingen forskjeller mellom gruppene (Tabell 13). Det kan ofte være størst utfordring å regulere innhold av Mg i blod, men data indikerer at alle forsøksgrupper hadde god osmoregulering ($Mg < 1,2 \text{ mmol L}^{-1}$).

Tabell 13 Innhold av mineraler i serum etter 5 dager og etter 68 dager i saltvann (snitt $\pm$ s.e.m., $n=3$).

	Lav EPA+DHA Middels Zn	Høy EPA+DHA Middels Zn	Middels EPA+DHA Middels Zn	Middels EPA+DHA Lav Zn	Middels EPA+DHA Høy Zn	Enveis ANOVA p-verdi
<i>5 d etter overføring</i>						
Cl, mmol L ⁻¹	138,7 $\pm$ 0,6	137,9 $\pm$ 0,8	139,4 $\pm$ 0,83	138,1 $\pm$ 0,4	138,3 $\pm$ 0,8	0,96
K mmol L ⁻¹	3,2 $\pm$ 0,4	3,3 $\pm$ 0,2	3,1 $\pm$ 0,1	3,5 $\pm$ 0,2	3,5 $\pm$ 0,2	0,97
Na, mmol L ⁻¹	157,9 $\pm$ 0,7	157,8 $\pm$ 0,6	157,9 $\pm$ 0,4	157,6 $\pm$ 0,5	157,1 $\pm$ 0,6	0,97
Mg, mmol L ⁻¹	0,70 $\pm$ 0,02	0,70 $\pm$ 0,04	0,67 $\pm$ 0,03	0,69 $\pm$ 0,03	0,68 $\pm$ 0,03	0,96
<i>68 d etter overføring</i>						
Cl, mmol L ⁻¹	131,7 $\pm$ 0,5	131,4 $\pm$ 0,6	134,3 $\pm$ 1,0	134,4 $\pm$ 0,8	132,9 $\pm$ 0,9	0,25
K mmol L ⁻¹	1,5 $\pm$ 0,2	1,5 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	1,6 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,2	0,91
Na, mmol L ⁻¹	160,4 $\pm$ 0,6	161,0 $\pm$ 0,8	161,4 $\pm$ 0,8	162,7 $\pm$ 0,7	162,1 $\pm$ 0,8	0,49
Mg, mmol L ⁻¹	1,0 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,1	0,75

5.3.1 Vekst, organindekser og velfersscore

Fisk som hadde fått dietten med lavest innhold av EPA og DHA, hadde lavest sluttvekt og lavest tilvekst (Tabell 14). I tabellen er p-verdier gitt for enveis ANOVA av alle 5 diettgrupper. Ved å gjøre statistisk analyse av de to seriene separat, fant vi signifikant økning i vekt ved å øke innhold av EPA+DHA, mens nivå av Zn ikke hadde effekt på tilvekst. Tilsvarende resultater ble funnet for vekstrate (SGR).

Tabell 14 Vekt og spesifikk vekstrate (SGR) fra start (0), overføring til saltvann (1) og avslutning (2) av fôringsforsøk (snitt $\pm$ s.e.m., n=3).

	Lav EPA+DHA Middels Zn	Høy EPA+DHA Middels Zn	Middels EPA+DHA Middels Zn	Middels EPA+DHA Lav Zn	Middels EPA+DHA Høy Zn	Enveis ANOVA p-verdi
Vekt 0	60,6 $\pm$ 0,1	60,8 $\pm$ 0,4	59,9 $\pm$ 0,09	60,5 $\pm$ 0,6	59,9 $\pm$ 0,2	0,27
Vekt 1	102 $\pm$ 3	108 $\pm$ 2	105 $\pm$ 2	104 $\pm$ 1	100 $\pm$ 1	0,13
Vekt 2	257 $\pm$ 12 ^b	295 $\pm$ 4 ^a	264 $\pm$ 15 ^b	299 $\pm$ 3 ^a	287 $\pm$ 4 ^{ab}	0,03
SGR1	0,78 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,02	0,84 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,01	0,14
SGR2	1,46 $\pm$ 0,10	1,61 $\pm$ 0,06	1,47 $\pm$ 0,07	1,68 $\pm$ 0,03	1,66 $\pm$ 0,01	0,09
SGR total	1,11 $\pm$ 0,04 ^b	1,22 $\pm$ 0,02 ^a	1,20 $\pm$ 0,02 ^{ab}	1,23 $\pm$ 0,01 ^a	1,21 $\pm$ 0,01 ^a	0,05

Vekt, lengde, Kondisjonsfaktor, organvekter og -indekser ble registrert for all prøvefisk ved to tidspunkt (Tabell 15). Det ble ikke observert noen forskjeller mellom diettgrupper, bortsett fra lengde målt etter 5 dager i sjøvann. Målinger etter 5 dager i saltvann er et resultat av fôring i ferskvann, derfor kan resultatene tyde på at man får økende lengdevest i ferskvann med økende nivå av EPA+DHA i fôr.

Tabell 15 Slaktedata fra all prøvefisk, 5 dager og 68 dager etter overføring til sjøvann.

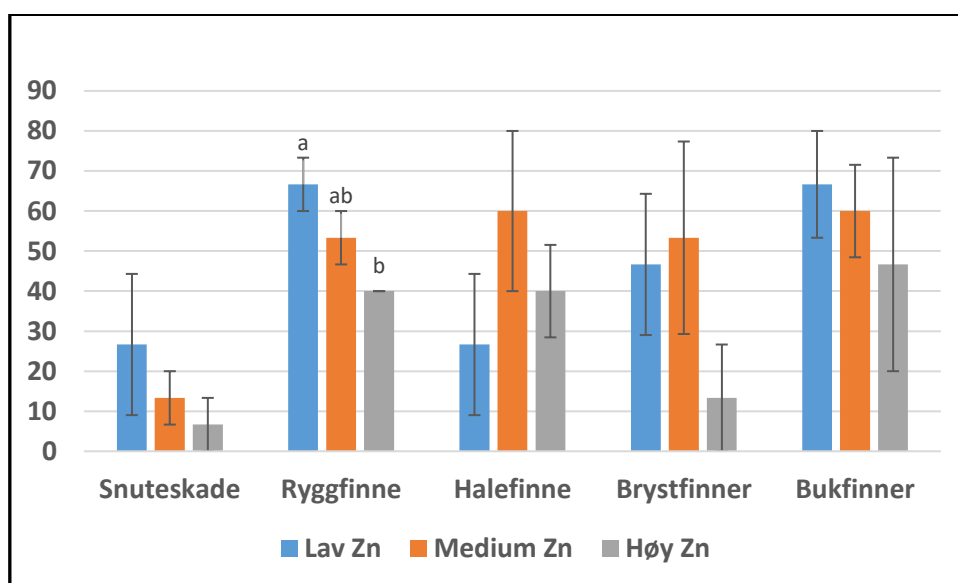
	Lav EPA+DHA Middels Zn	Høy EPA+DHA Middels Zn	Middels EPA+DHA Middels Zn	Middels EPA+DHA Lav Zn	Middels EPA+DHA Høy Zn	Enveis ANOVA p-verdi
<i>5 d etter overføring</i>						
Vekt, g	112,2 $\pm$ 7,9	114,5 $\pm$ 4,3	106,7 $\pm$ 3,6	101,2 $\pm$ 4,3	102,9 $\pm$ 4,8	0,45
Lengde, cm	20,8 $\pm$ 0,3 ^b	21,6 $\pm$ 0,2 ^a	21,1 $\pm$ 0,2 ^{ab}	20,6 $\pm$ 0,3 ^b	20,8 $\pm$ 0,3 ^b	0,05
Levervekt, g	0,83 $\pm$ 0,05	0,89 $\pm$ 0,04	0,81 $\pm$ 0,03	0,79 $\pm$ 0,05	0,83 $\pm$ 0,06	0,35
Hjertevekt, g	0,12 $\pm$ 0,01	0,12 $\pm$ 0,004	0,11 $\pm$ 0,004	0,11 $\pm$ 0,004	0,11 $\pm$ 0,01	0,64
HSI*	0,75 $\pm$ 0,03	0,78 $\pm$ 0,02	0,76 $\pm$ 0,02	0,78 $\pm$ 0,02	0,81 $\pm$ 0,04	0,77
CSI*	0,11 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,003	0,1 $\pm$ 0,003	0,11 $\pm$ 0,002	0,11 $\pm$ 0,003	0,91
K-faktor	1,24 $\pm$ 0,08	1,13 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,01	1,15 $\pm$ 0,01	1,13 $\pm$ 0,01	0,18
<i>68 d etter overføring</i>						
Vekt, g	297,5 $\pm$ 11,0	323,1 $\pm$ 12,5	292,9 $\pm$ 15,8	292,5 $\pm$ 18,7	288,7 $\pm$ 12,3	0,26
Lengde, cm	28,4 $\pm$ 0,3	29,5 $\pm$ 0,4	28,4 $\pm$ 0,5	28,2 $\pm$ 0,5	28,1 $\pm$ 0,4	0,20
Levervekt, g	5,55 $\pm$ 0,30	5,26 $\pm$ 0,15	5,15 $\pm$ 0,24	5,07 $\pm$ 0,36	4,78 $\pm$ 0,19	0,22
Hjertevekt, g	0,33 $\pm$ 0,03	0,41 $\pm$ 0,02	0,32 $\pm$ 0,02	0,36 $\pm$ 0,02	0,33 $\pm$ 0,01	0,12
HSI*	1,88 $\pm$ 0,09	1,65 $\pm$ 0,06	1,81 $\pm$ 0,11	1,75 $\pm$ 0,08	1,68 $\pm$ 0,07	0,54
CSI*	0,11 $\pm$ 0,01	0,13 $\pm$ 0,01	0,11 $\pm$ 0,004	0,12 $\pm$ 0,004	0,12 $\pm$ 0,003	0,52
K-faktor	1,29 $\pm$ 0,01	1,26 $\pm$ 0,02	1,26 $\pm$ 0,02	1,27 $\pm$ 0,02	1,29 $\pm$ 0,03	0,84

*HSI: hepatosomatisk indeks, leverindeks; CSI: cardiosomatisk indeks, hjerteindeks

Resultater fra velferdsscore var vanskelig å tolke, siden variasjonen viste seg å være stor. Vi undersøkte 5 fisk fra hvert kar, dvs. 15 fisk pr behandling, noe som gjorde at hver enkelt fisk hadde veldig stor

innvirkning på resultatene. Når resultatene fra første uttak 5 dager etter overføring til saltvann ble oppsummert, var det ingen tydelige effekter av diett. Det ble funnet høy forekomst av skader på brystfinner (80-100 %), og omkring 50 % av fisken hadde bemerkning på skinnskader (skjelltap, sår). Det var også varierende grad av skader på ryggfinne, halefinne og bukfinner.

Ved avslutning av forsøket fant vi at alle fisker fra alle 5 diettgrupper (100 %) hadde en eller annen bemerkning til skinn, enten sår, legede sår eller skjelltap. Snuteskader var minst hyppig, med frekvenser fra 5-25 %. Skade på ryggfinne lå omkring 50 %, og det var også varierende forekomst av skade på halefinne, brystfinner og bukfinner. Det så ut til å være en trend i Zn-serien (Figur 9), at høyere nivå av Zn i fôr ga lavere forekomst av snute- og finneskader, med unntak av skade på halefinne, men dette var signifikant bare for ryggfinne. For omega-3-serien var det ingen systematiske forskjeller mellom gruppene.



Figur 9 Velferdsscore, forekomst av ulike ytre sår og skader, 68 dager etter overføring til sjøvann.

Måling av LPS i plasma viste ingen signifikante forskjeller mellom behandlinger (Tabell 16). Variasjonen var stor i alle grupper.

Tabell 16 LPS (pg/ml) i plasma etter 68 dager i saltvann (snitt $\pm$ s.e.m., n=3).

	Lav EPA+DHA Middels Zn	Høy EPA+DHA Middels Zn	Middels EPA+DHA Middels Zn	Middels EPA+DHA Lav Zn	Middels EPA+DHA Høy Zn	Enveis ANOVA p-verdi
LPS (68 d)	4,23 $\pm$ 0,40	3,12 $\pm$ 0,45	3,93 $\pm$ 0,75	3,38 $\pm$ 0,52	4,27 $\pm$ 0,30	0,44

5.3.2 Sink i helkropp og barrierevev

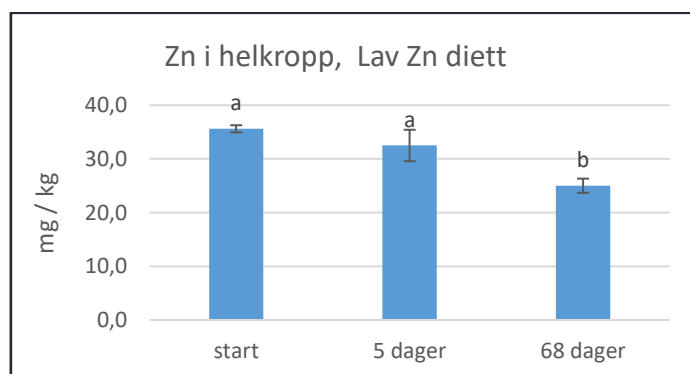
Innhold av Zn i helkropp ble målt ved start, 5 dager etter overføring til saltvann, og ved avslutning (68 dager). Prøvene ble også analysert for tørrstoff og aske. Ved start av forsøket var innholdet av Zn 35,6 mg/kg, innhold av tørrstoff og aske var henholdsvis 29,9 % og 1,9 %. Resultater fra de to prøvetidspunktene er vist i Tabell 17.

Ved avslutning var innhold av Zn signifikant forskjellig i de ulike diettgruppene. Høy Zn-dietten fører til høyest innhold av Zn i helfisk, og Lav Zn dietten gir lavest innhold. Dietten med lav Zn førte til gradvis redusert innhold av Zn i helkropp over tid (Figur 10), og ved avslutning var innholdet på et nivå som indikerer mangel. Høy Zn dietten ga et stabilt nivå av Zn i helfisk over tid.

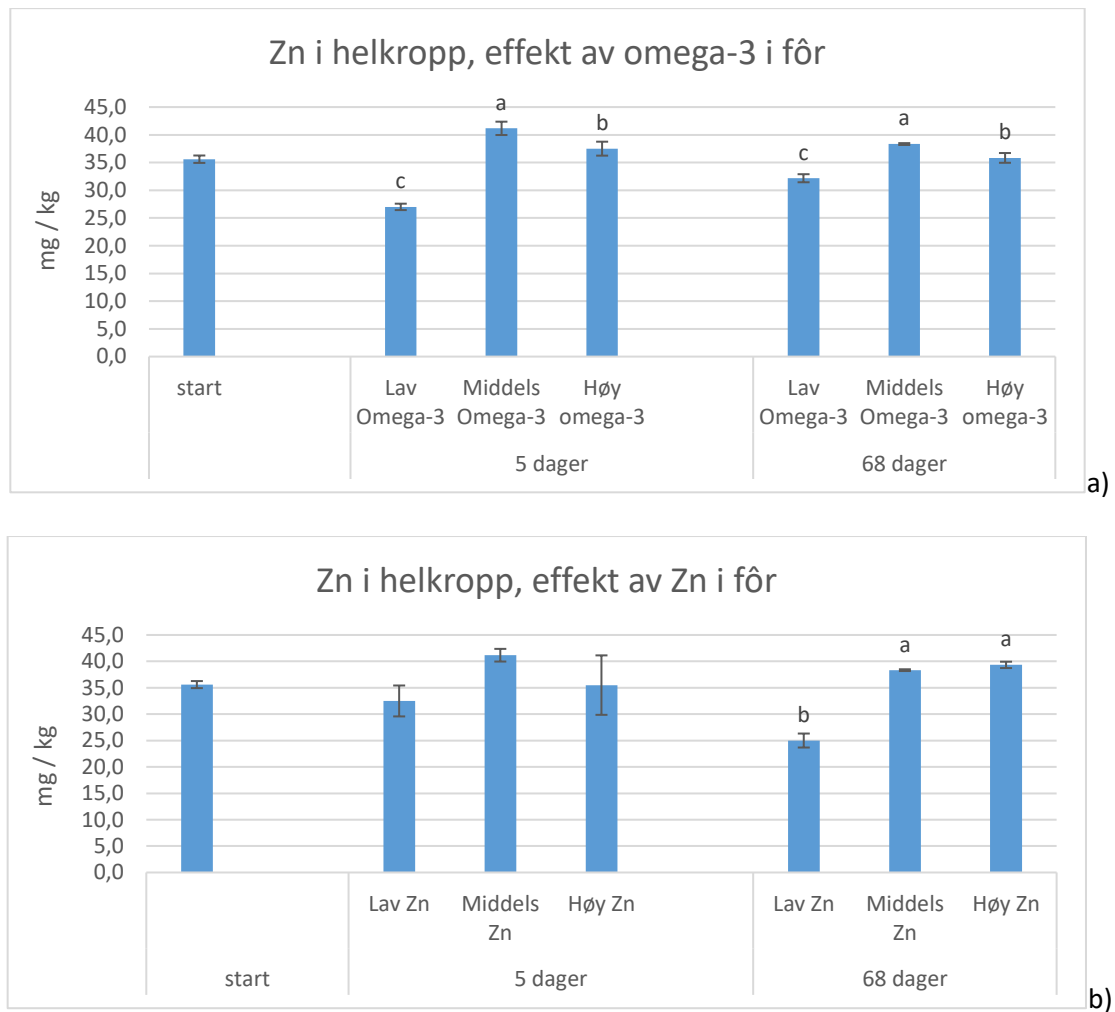
Data er også analysert for hver serie separat som vist i Figur 11. Lav omega-3 gir lavest innhold av Zn i hel fisk med samme innhold av Zn i fôr. Effekt av Zn i fôr er entydig etter 68 dager, med redusert innhold i helfisk med lav Zn i fôret.

Tabell 17 Analyser av helfisk; tørrstoff (%), aske (%) og Zn (mg/kg). Enveis ANOVA med alle 5 dietter inkludert i analysen (n=3). Data oppgitt som gjennomsnitt ± s.e.m.

	Lav EPA+DHA	Høy EPA+DHA	Middels EPA+DHA	Middels EPA+DHA	Middels EPA+DHA	ANOVA
	Middels Zn	Middels Zn	Middels Zn	Lav Zn	Høy Zn	p-verdi
5 dager						
Tørrstoff	28,2 ± 0,6	28,5 ± 0,1	28,6 ± 0,2	28,1 ± 0,3	27,7 ± 0,3	0,43
Aske	2,2 ± 0,1	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1	1,9 ± 0,2	1,9 ± 0,1	0,26
Zn	27,0 ± 0,6	37,5 ± 1,3	41,2 ± 1,2	32,5 ± 3,0	35,5 ± 5,6	0,06
68 dager						
Tørrstoff	25,7 ± 0,3	26,4 ± 0,7	25,2 ± 0,7	26,0 ± 0,5	26,1 ± 0,1	0,53
Aske	1,9 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,2 ± 0,1	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,52
Zn	32,2 ± 0,7 c	35,8 ± 0,9 b	38,3 ± 0,2 ab	25,0 ± 1,3 d	39,3 ± 0,6 a	<,0001

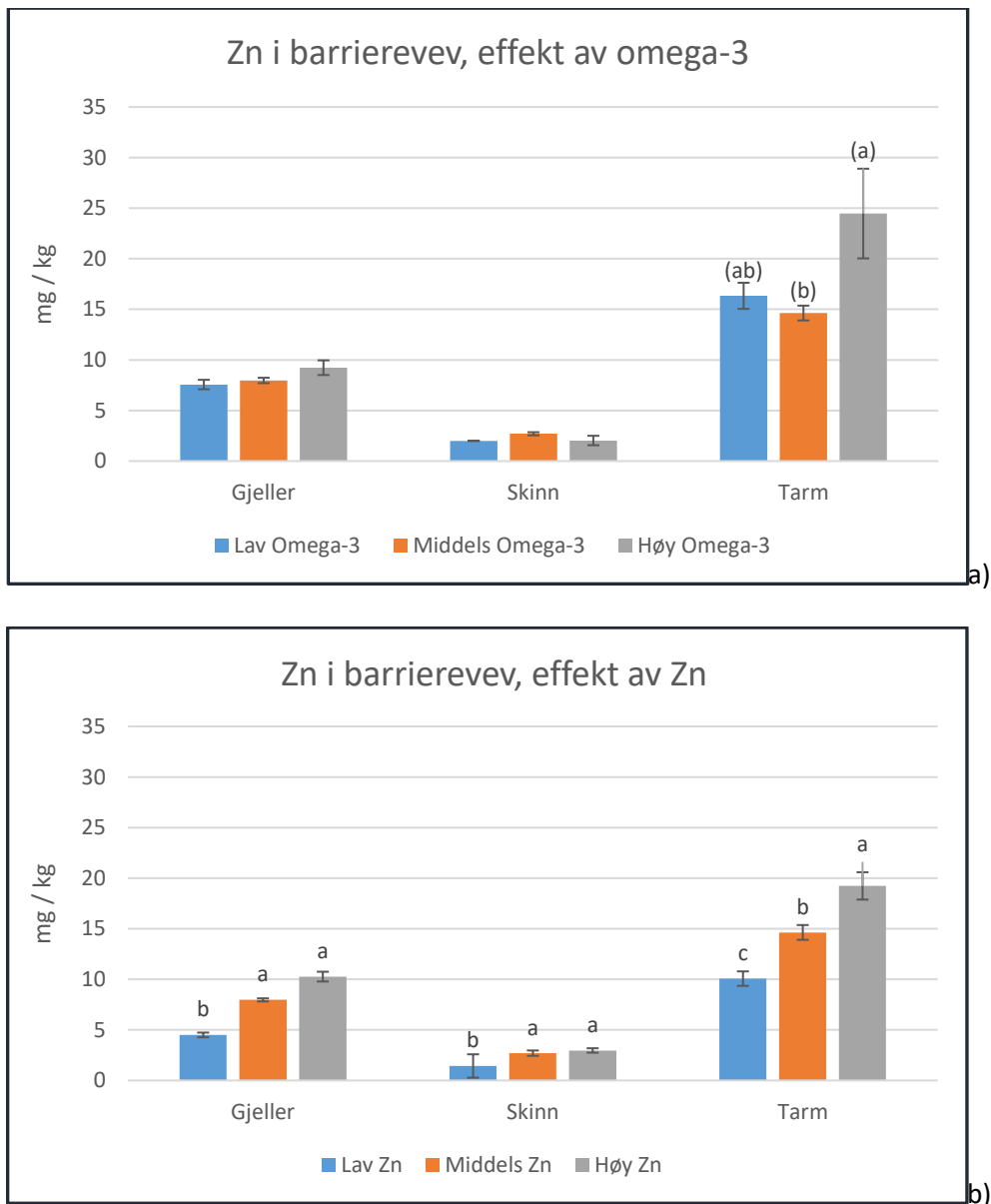


Figur 10 Innhold av Zn i helkropp i fisk fra start, etter 5 dager i saltvann og ved avslutning (68 dager).



Figur 11 Effekt av ulike nivåer av a) Omega-3 og b) Zn i fôr på nivå av Zn i hel fisk ved ulike tidspunkt.

Prøver av gjeller, tarm og skinn ble analysert for Zn ved avslutning av forsøket (dag 68). Figur 12 viser data analysert for hver diettserie. Omega-3 hadde ingen effekt på innhold av Zn i gjeller og skinn, men i midttarm var det en tydelig tendens ($p=0,09$) til høyere innhold av Zn i tarmvevet i gruppen med høy omega-3 i dietten. Dette kan tolkes som at høyt innhold av omega-3 bidrar til bedre absorpsjon av Zn. Innhold av Zn i dietten påvirker innhold av Zn i både gjeller, skinn og tarm. Innhold av Zn er lavest i skinn, og høyest i tarm



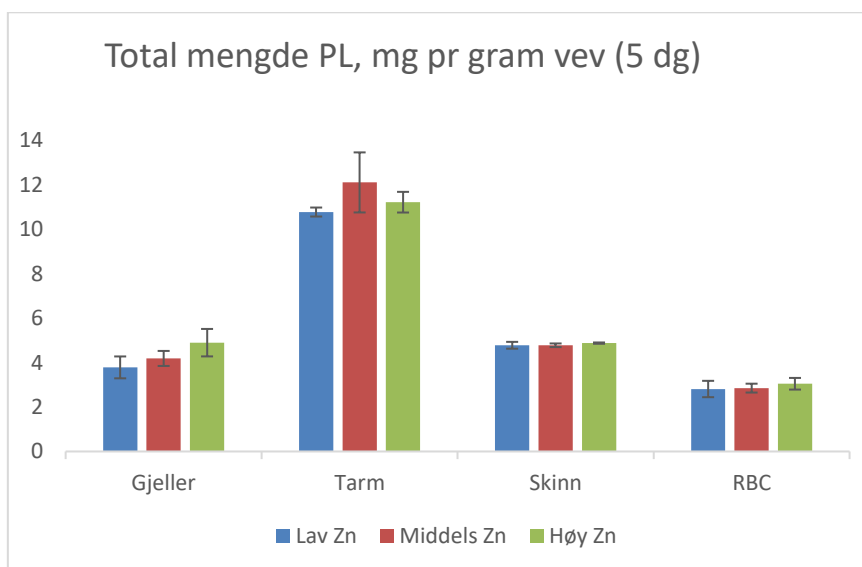
Figur 12 Effekt av ulike nivåer av a) Omega-3 og b) Zn i fôr på nivå av Zn i gjeller, skinn og midttarm ved avslutning av forsøk etter 68 dager.

5.3.3 Fettsyresammensetning av ulike membranfosfolipider i skinn, tarm og gjeller

Kroppens behov for fettsyrer og Zn i dietten avhenger av både mengde og biotilgjengelighet. Utilstrekkelig inntak av disse næringsstoffene kan påvirke både sammensetning og funksjon til fosfolipidene i cellemembraner i alle levende organismer. I menneske er det vist at mangel på essensielle fettsyrer og noen metaller kan bidra til en rekke helseutfordringer som kan være irreversible, spesielt dersom mangelen er tilstede i ung alder (Oversiktsartikkel av DeMel m.fl. 2014). Fosfolipider bidrar til cellemembraners fysisk-kjemiske egenskaper og påvirker dermed både struktur og funksjon til membranbundne proteiner, reseptorer, ionekanaler. Fosfolipider påvirker også celfunksjonen ved å bidra med forløpere til signalmolekyler som eikosanoider. Det er vist at både endringer i nivået av Zn i dietten og endret fettsyresammensetning kan påvirke de ulike

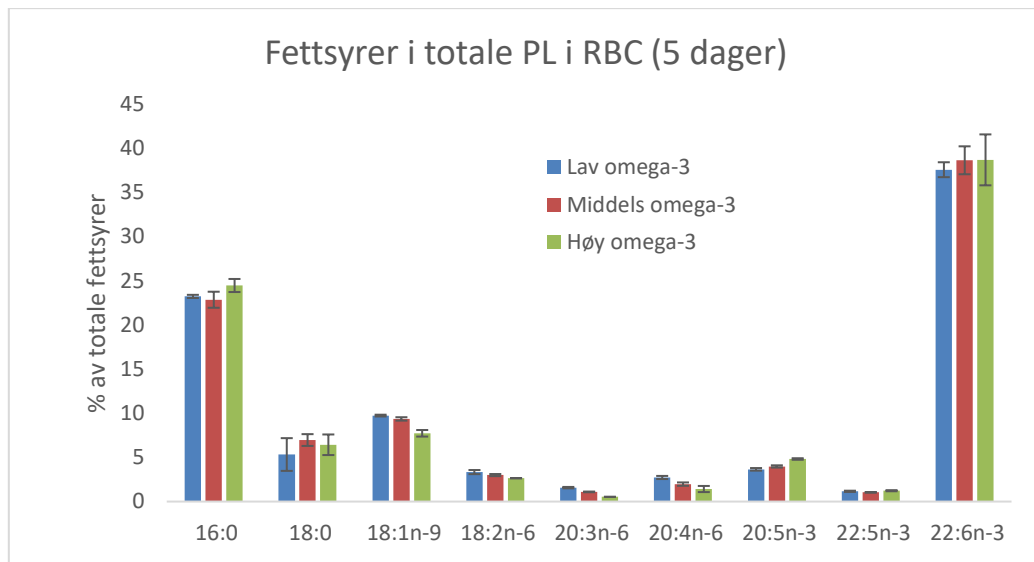
fosfolipidklassenes sammensetning og mønster, noe som kan ha betydning for barrierevevenes funksjon og helse.

Analyse av totale fosfolipider og fettsyresammensetning i fosfolipider i gjeller, tarm, skinn og røde blodceller til fisk 5 dager etter overføring til saltvann er vist i figurene 13 og 14. Det var ingen signifikante dietteffekter i total mengde fosfolipider i de undersøkte vevene etter 5 dager, men i Zn-serien ble det observert trend til økende innhold av fosfolipider med økende innhold av Zn i dietten, spesielt for gjeller (Figur 13). Det var ingen tydelige dietteffekter av økende nivå av EPA og DHA på total mengde PL i vevene (ikke vist).

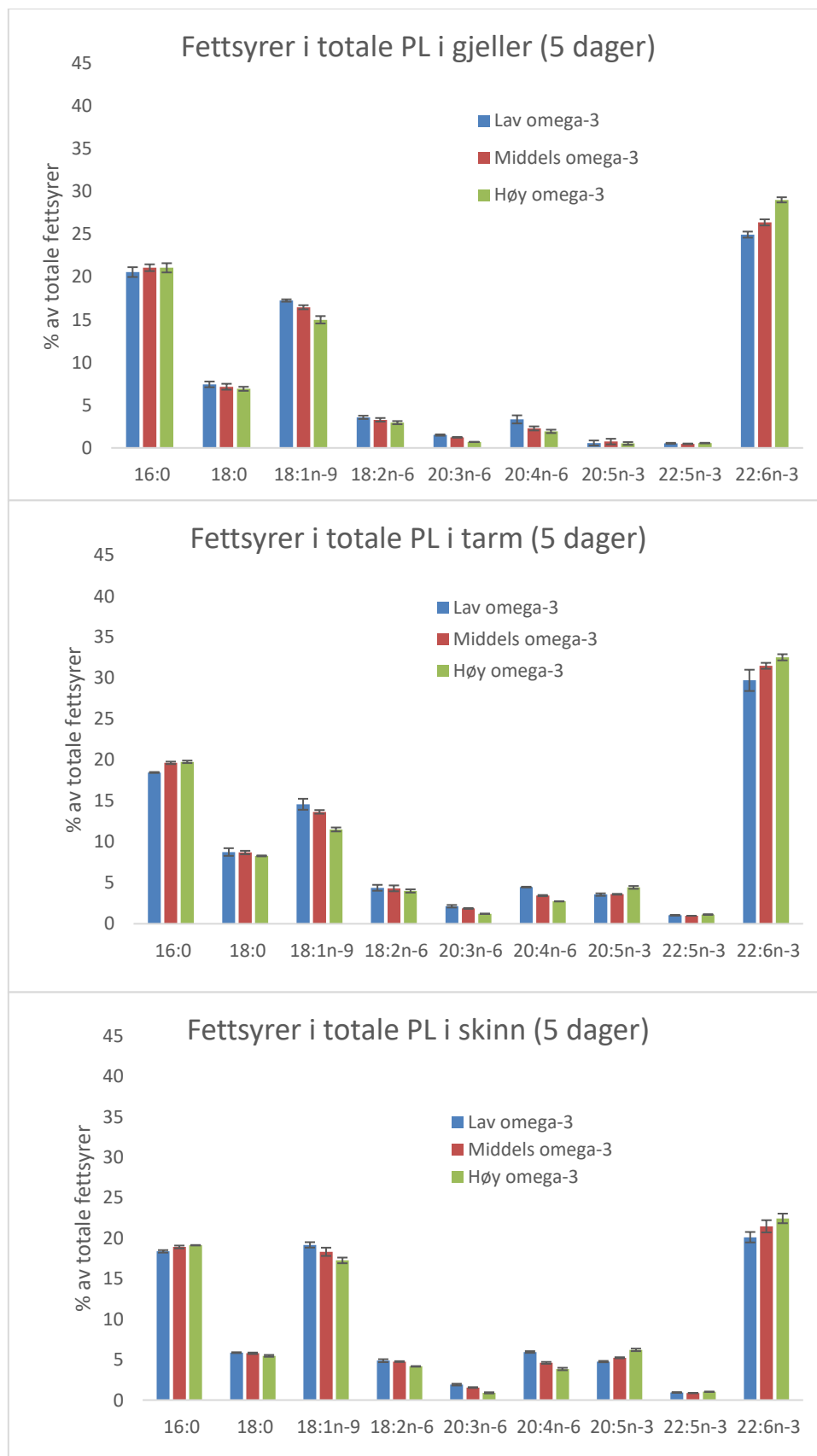


Figur 13 Total mengde fosfolipider i forskjellige vev (mg/g) i fisk gitt dietter med ulike nivåer av Zn.

Figur 14 viser hvordan fettsyresammensetningen av total fosfolipider i røde blodceller, gjeller, tarm og skinn påvirkes av 3 ulike nivåer av EPA og DHA i dietten 5 dager etter overføring til sjø. Responsen er relativt lik i de ulike vevene og viser at EPA og DHA øker med økende nivå av disse i dietten mens n-6 fettsyrene 18:2n-6, 20:3n-6 og 20:4n-6 reduseres.



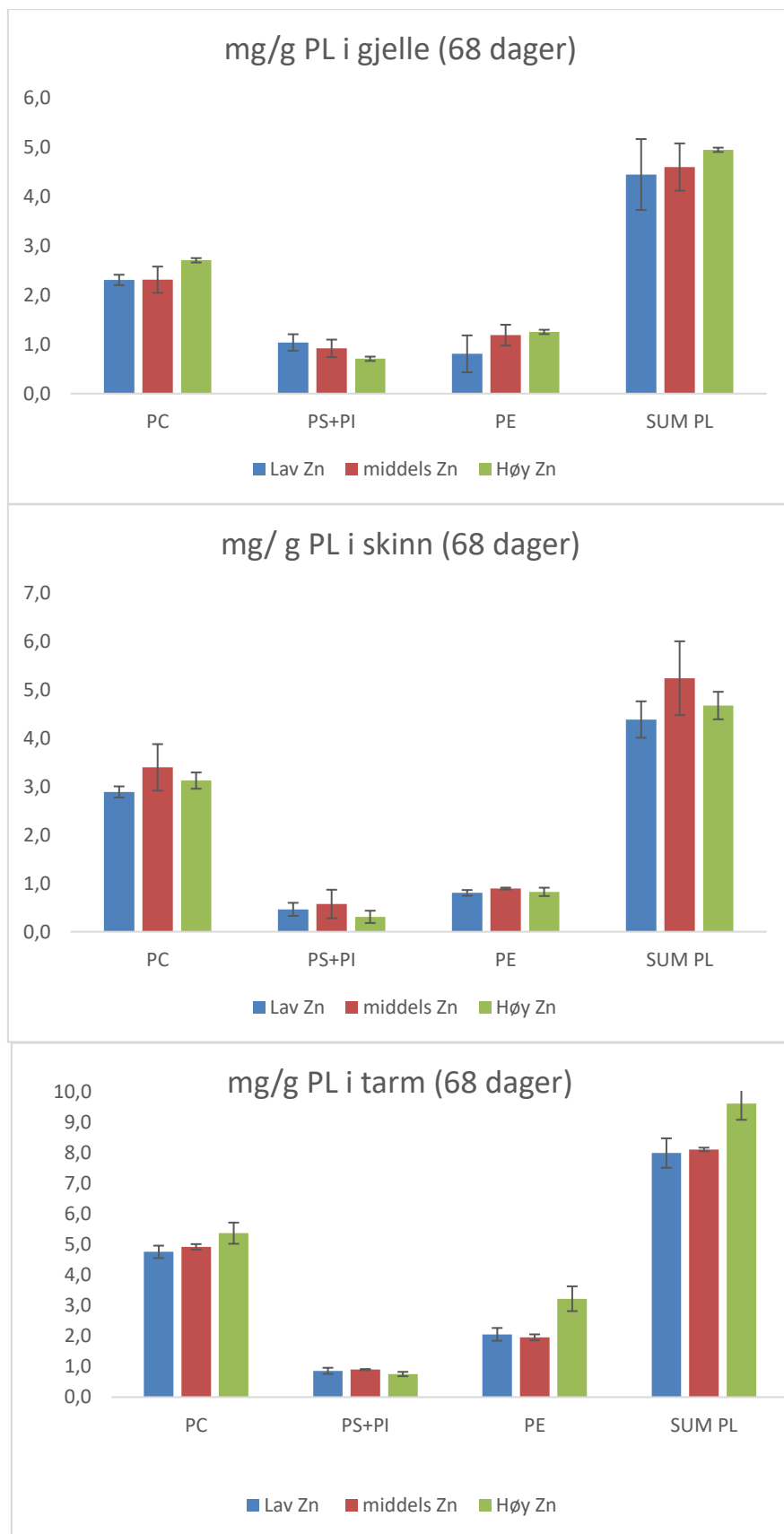
(figur fortsetter neste side)



Figur 14 Fettsyresammensetning av totale fosfolipider i forskjellige vev til fisk gitt dietter med ulike nivåer av EPA og DHA.

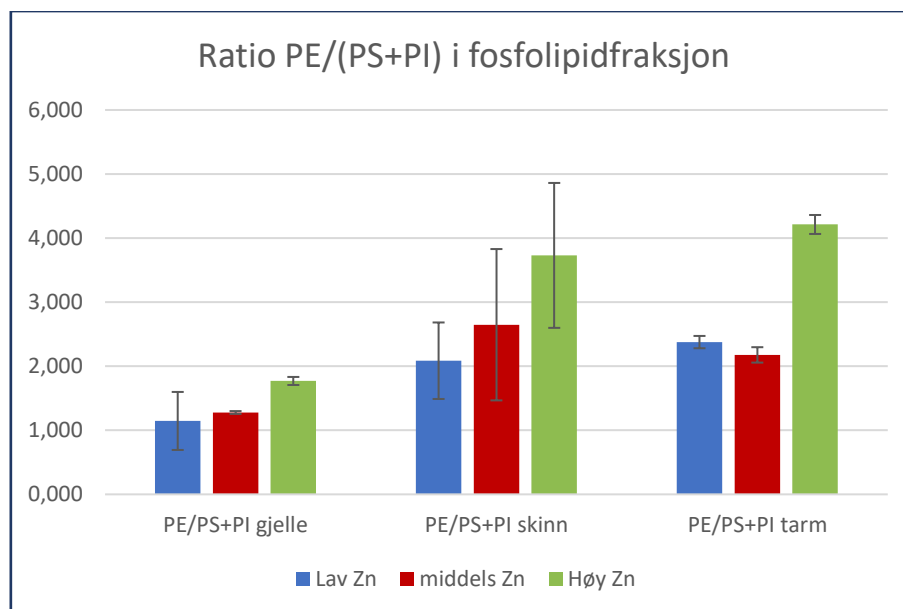
Figur 15 viser total mengde av fosfolipidene PC, PS+PI, PE og sum PL i forskjellige vev (mg/g) i fisk gitt dietter med ulike nivåer av Zn ved avslutning av forsøket, 68 dager etter overføring til saltvann. Dataene tyder på at økende Zn-nivå i dietten fører til endringer i PL klassene med økning i PE og PC, og reduksjon i PI + PS med økende nivå av Zn i dietten. Dette er spesielt tydelig i gjeller og skinn.

Disse funnene er i overensstemmelse med hva som er funnet i andre arter hvor det er vist at mangel på Zn fører til redusert nivå av PE og økt nivå av PI i encellede gjær modellsystem og redusert PC i pattedyrmodeller PC (Cornatzer m.fl. 1984). PE er vanligvis det fosfolipidet det finnes mest av (ca. 20 % til 45 % av totalfosfolipid avhengig av vevstype) etter PC. Både PC og PE er nøkkelkomponenter i cellemembraner, og forholdet mellom de to lipidklassene kan være viktig for mange cellulære barrierefunksjoner. I gjær, som er en mye benyttet modellorganisme for studier av regulering av fosfolipidsyntese i eukaryote organismer er det vist at syntesen av fosfolipider er regulert av Zn. Celler som mangler Zn inneholder økte nivåer av PI og reduserte nivåer av PE (Carman, 2006), som er i overensstemmelse med våre funn i laksens barrierevev. Studiene med gjær viser til at regulering av fosfolipidsyntesen er en viktig mekanisme hvor celler tilpasses stresset forårsaket av Zn-mangel. Fosfolipider er essensielle for vekst og metabolisme ved at de er helt sentrale i membranassosierte funksjoner som signaloverføring og transport av molekyler over membranen og videre sentrale for forankring og funksjon til membranproteiner.



Figur 15 Total mengde av fosfolipidene PC, PS+PI, PE og sum PL i forskjellige vev (mg/g) i fisk gitt dietter med ulike nivåer av Zn.

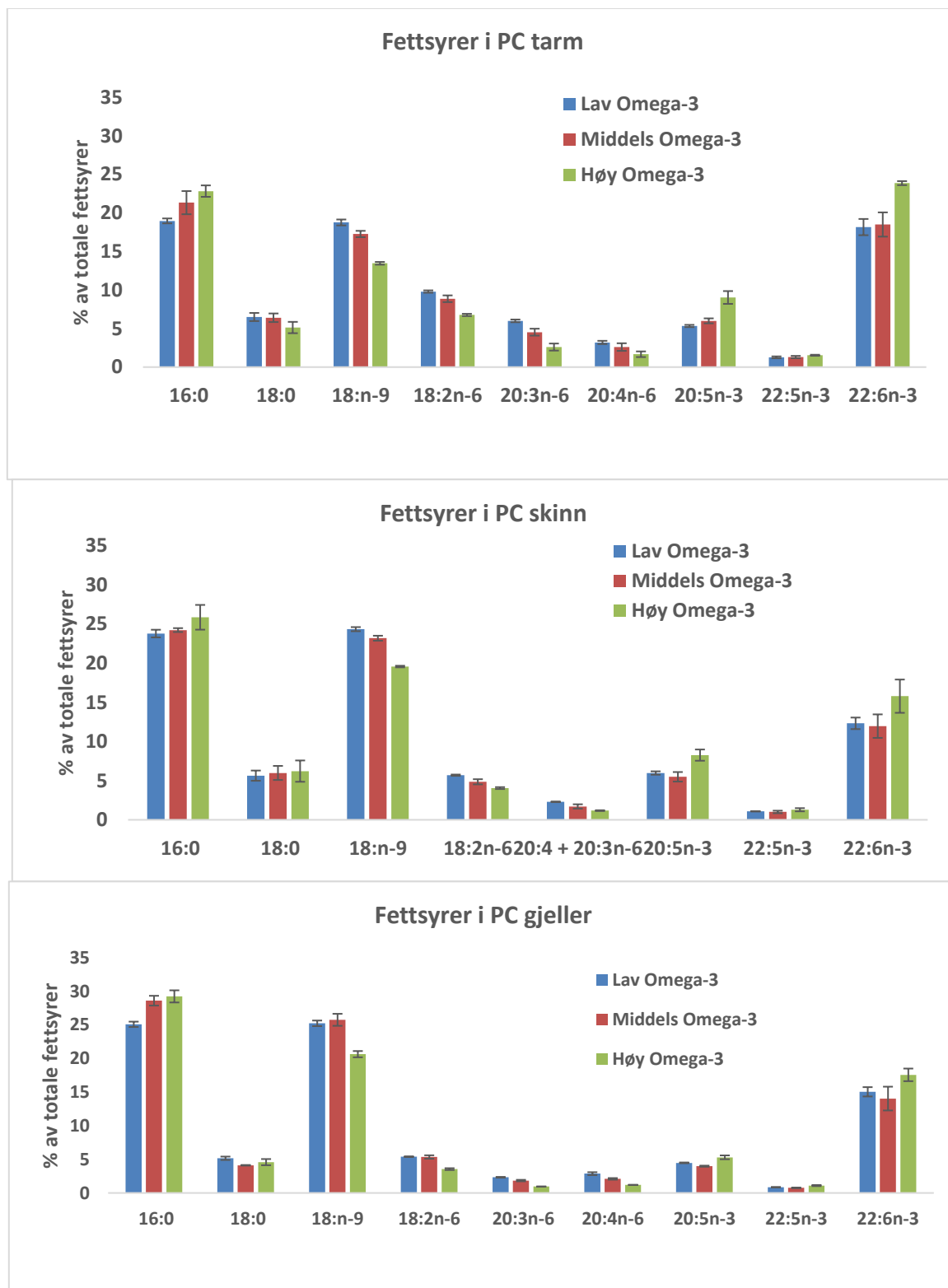
Det er vist i *S. cerevisiae* at aktivitet av enzymer i fosfolipidsyntesen er regulert ved en rekke stressbetingelser. Figur 16 viser ratioen av PE/(PS+PI) i fosfolipidfraksjonen i gjeller, tarm og skinn til laks foret med de tre nivåene av Zn, og i alle vevene øker nivået at PE relativt til PI + PS i samsvar med responsen vist i gjær (Carman, 2006).



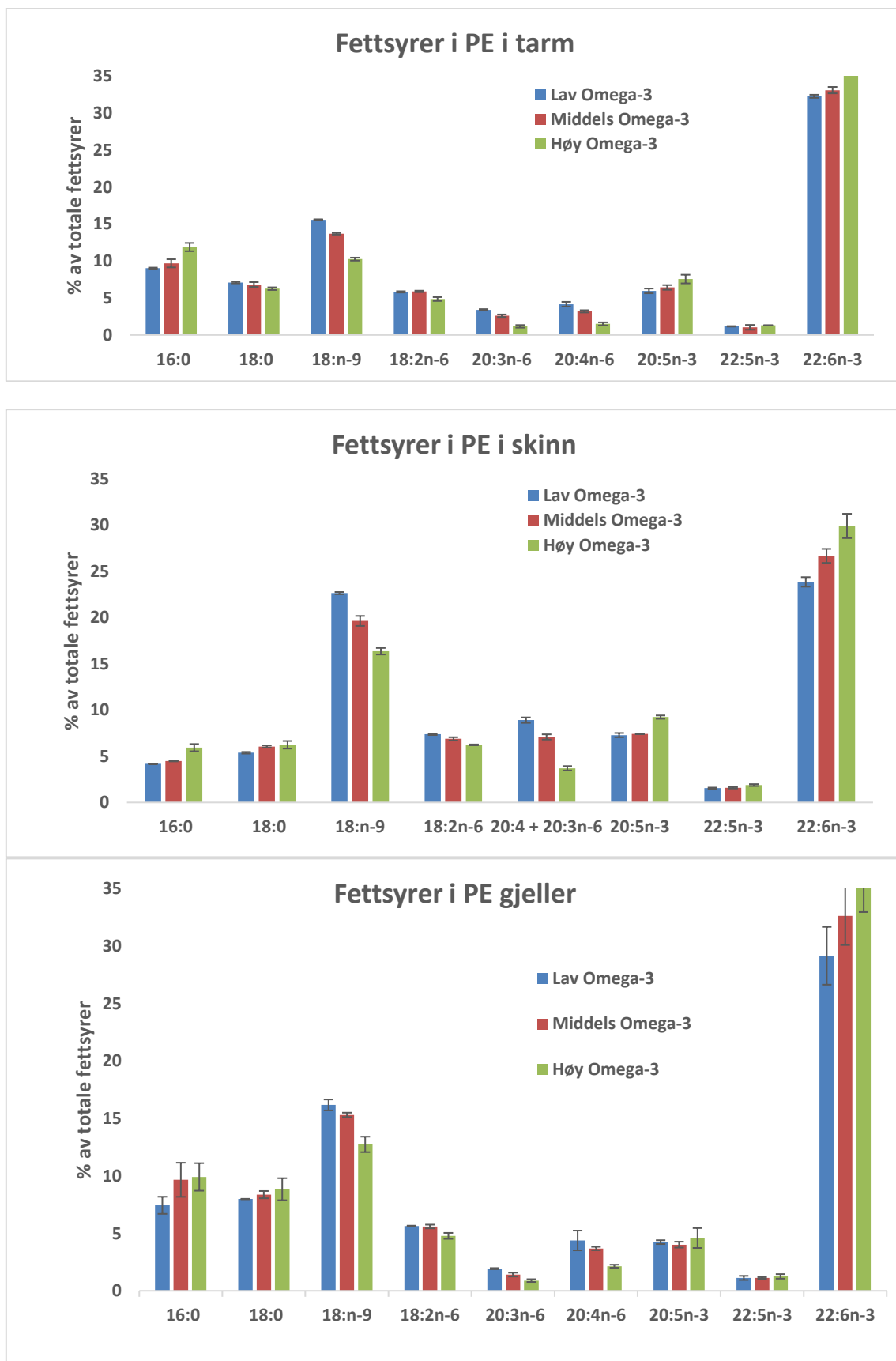
Figur 16 Ratio PE/PSI i gjelle, skinn og tarm til laks gitt dietter med ulike nivåer av Zn.

Figurene 17-19 viser at de ulike fosfolipidklassene har forskjellig fettsyremønster som er relativt likt i alle vev. Fettsyresammensetningen av PC i tarm, skinn og gjeller kjennetegnes ved et høyt nivå av fettsyrene 16:0 og 18:1n-9 og 22:6n-3, PE i de samme vevene kjennetegnes med et høyt nivå av 18:1n-9 og 22:6n-3. PS og PI kjennetegnes ved et høyt nivå av 22:6n-3, 16:0, 18:0 og 18:1n-9.

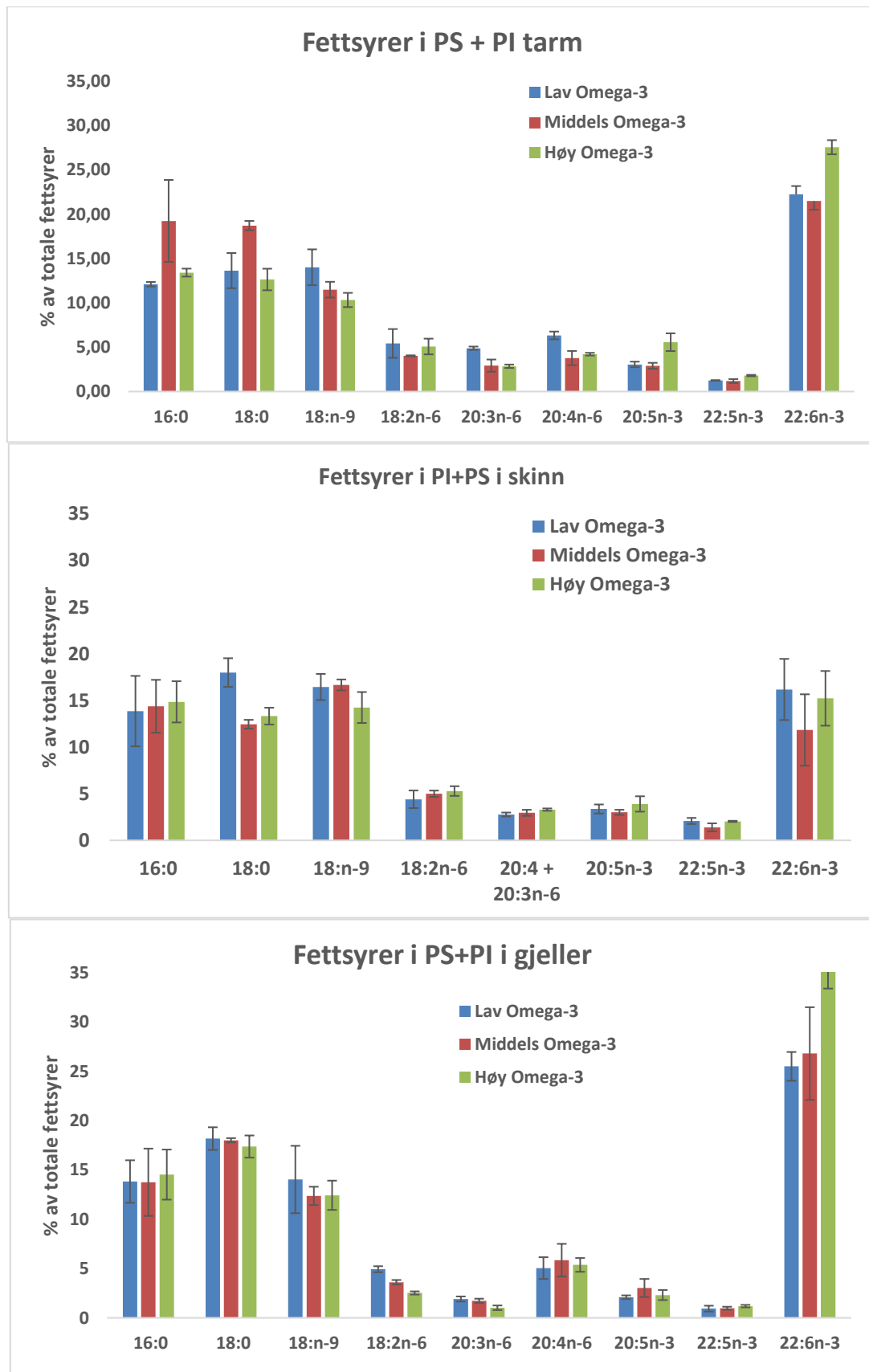
Når nivåene av EPA og DHA reduseres i føret så ser man en reduksjon av disse fettsyrene i alle fosfolipidklassene i gjeller, tarm og skinn, samtidig som man finner en økning av de pro-inflammatoriske n-6 fettsyrene 20:3n-6 og 20:4n-6. Figur 20 Viser EPA/ARA (20:5n-3/20:4n-6) ratio i de ulike membranfosfolipidene i tarm, skinn og gjeller, og videre hvordan dette forholdstallet påvirkes spesielt med reduserte ratioer i PC og PE med reduksjon av EPA+DHA i dietten, en endring som kan føre til økt betennelsesrisiko.



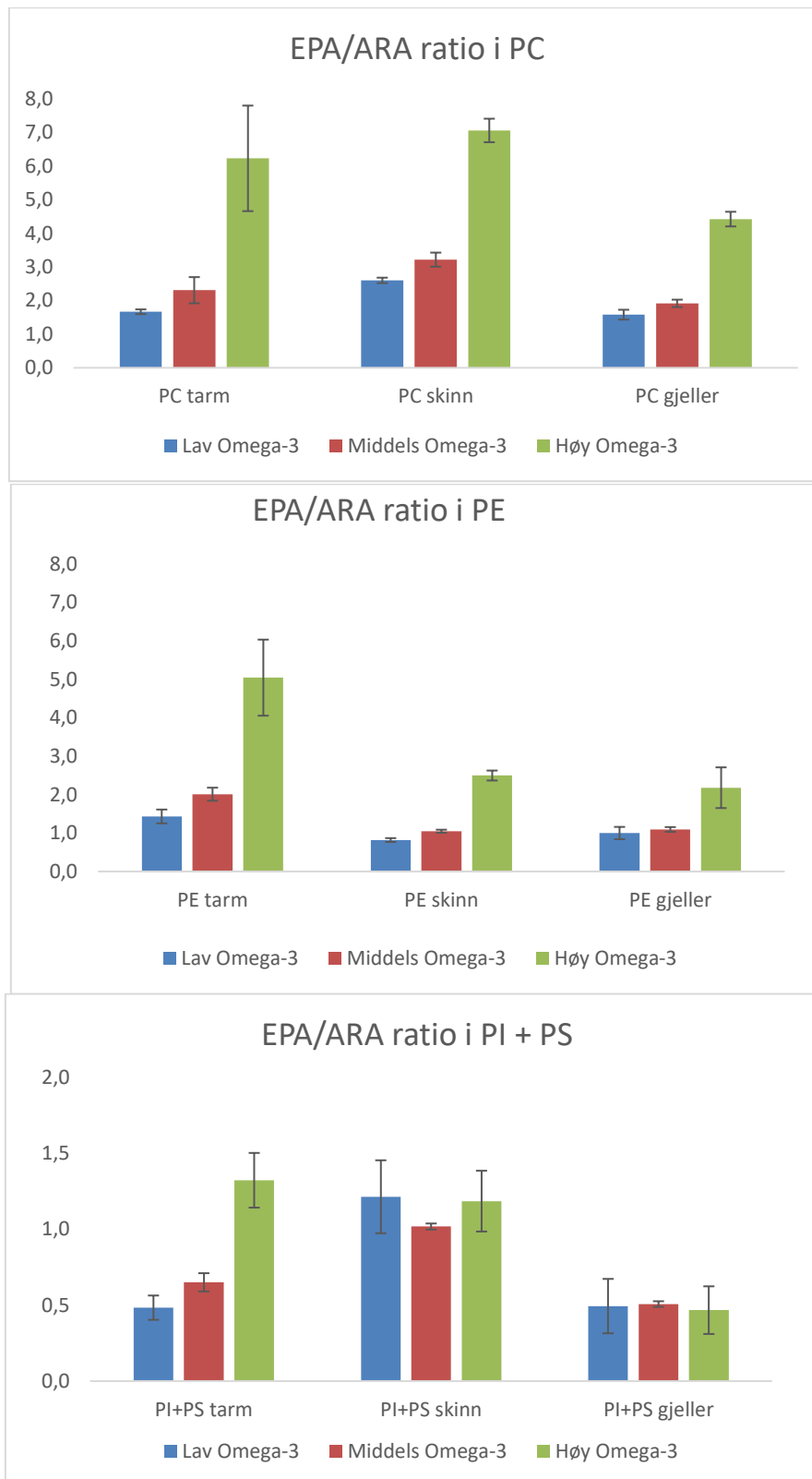
Figur 17 Viser hvordan fettsyrene 16:0, 18:0 og 18:1n-9, 18:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3 og 22:6n-3 fordeler seg i membranfosfolipidet PC, i tarm, skinn og gjeller og videre hvordan disse fettsyrene påvirkes av fettsyresammensetningen av diettene lav, medium og høy EPA + DHA, 68 dager etter overføring til saltvann.



Figur 18 Viser hvordan fettsyrene 16:0, 18:0 og 18:1n-9, 18:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3 og 22:6n-3 fordeler seg i membranfosfolipidet PE, i tarm, skinn og gjeller og videre hvordan disse fettsyrene påvirkes av fettsyresammensetningen av diettene lav, medium og høy EPA + DHA (68 dager).



Figur 19 Viser hvordan fettsyrene 16:0, 18:0 og 18:1n-9, 18:2n-6, 20:3n-6, 20:4n-3, 20:5n-3 og 22:6n-3 fordeles seg i membranfosfolipidene PS+PI, i tarm, skinn og gjeller og videre hvordan disse fettsyrene påvirkes av fettsyresammensetningen av diettene lav, medium og høy EPA + DHA (68 dager).



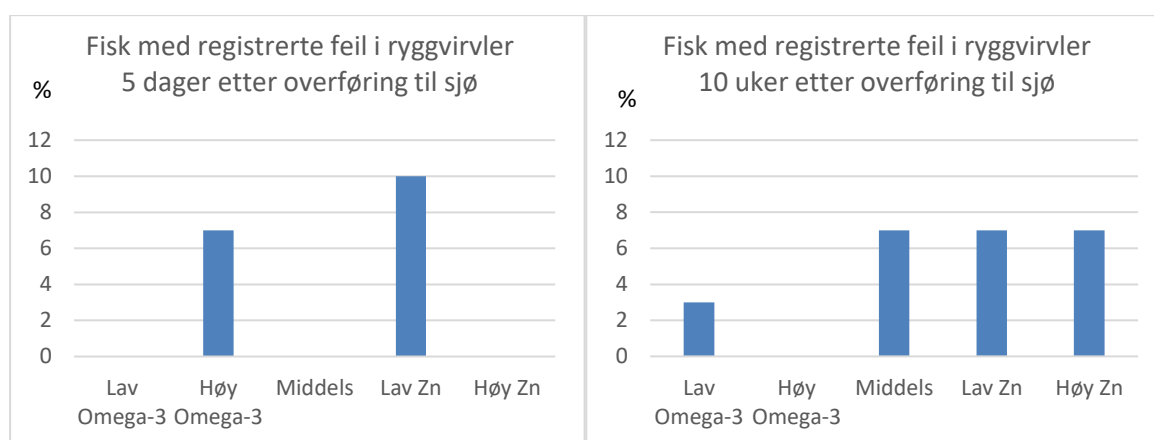
Figur 20 Viser EPA/ARA ratio i forskjellige membranfosfolipider i tarm, skinn og gjeller, og videre hvordan dette forholdstallet påvirkes av diettene lav, medium og høy EPA + DHA (68 dager).

5.3.4 Røntgenundersøkelser

Fisk til røntgenundersøkelse ble tatt ut på to tidspunkt, 5 dager etter overføring til sjøvann og etter 10 uker i sjøvann. Ved hvert uttak ble det tatt røntgenbilde av 10 fisk pr kar, dvs. til sammen 30 fisk pr fôr og 150 fisk pr uttak. 5 av de 10 fiskene pr kar var de samme individene som det ble tatt vevsprøver av, og 5 ble etterpå brukt til helkroppsanalyser.

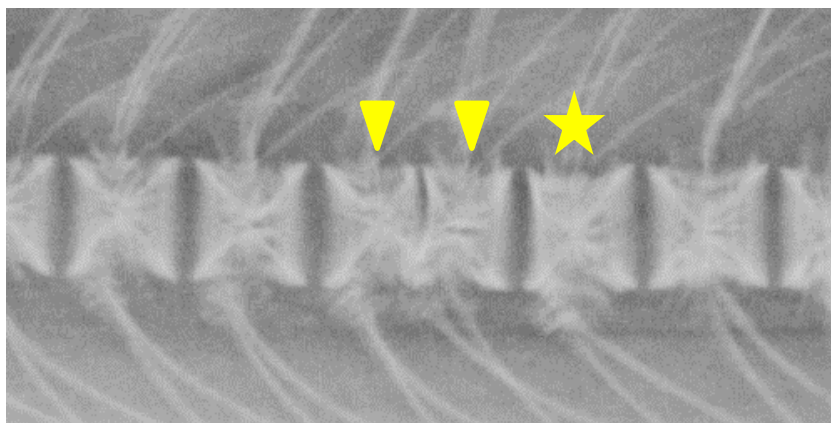
Det var et lavt innslag av feil i ryggrad og skjelett hos fiskegruppa sett under ett. Det ble registrert virvelfeil hos 4 % av fisken, og feilene var små. I første uttak (5 dager etter overføring til sjø) ble det registrert feil hos 4 av 150 fisk (2,7 %). I andre uttak (10 uker i sjøvann) ble det registrert feil hos 7 fisk av 150 (4,7 %). Det var ingen systematisk variasjon i forekomsten av feil i forhold til fôrgruppe.

Feilene fordelte seg på fôrene slik (Figur 21):

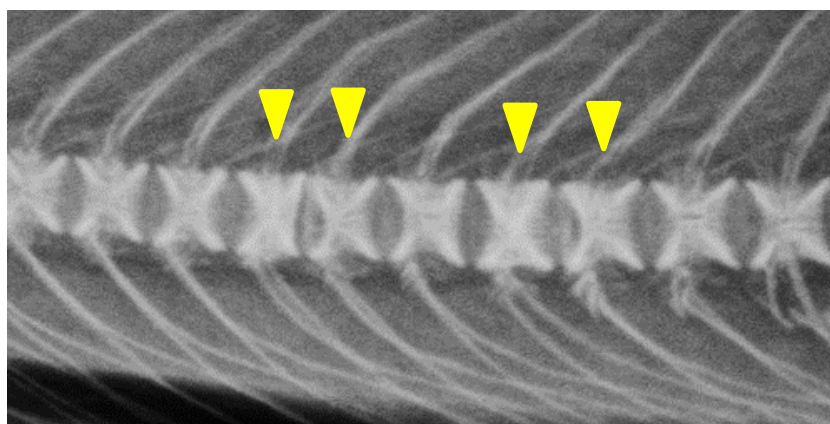


Figur 21 Oversikt over andel (%) fisk med registrerte feil i ryggvirvlene i de to uttakene. N=30 pr fôr pr uttak.

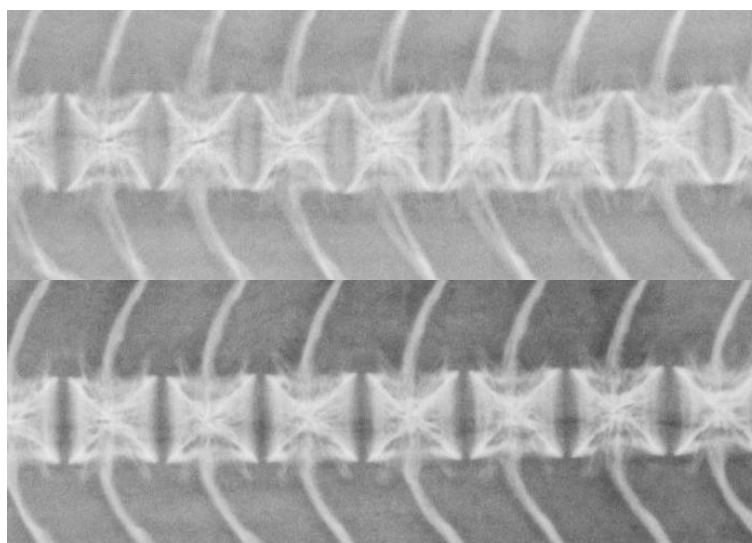
De feilene som ble observert var, med to unntak, fusjoner (sammenvoksinger) der grupper på 2 og 3 virvler var helt eller delvis sammenvokst (Figur 22). Hos noen fisk var det flere slike lesjoner. Dette er den vanligste typen av virvelfeil hos laks, og når feilene er såpass få og små som i denne fiskegruppa er de å regne som en uspesifikk reaksjon som vanskelig kan knyttes til en bestemt årsak. Hos en fisk fra første uttak var det to grupper med til sammen 4 høytetthetsvirvler (Figur 23), en type feil som knyttes til nedsatt mineralisering. Denne fisken tilhørte gruppa med lav Zn. Hos en fisk fra andre uttak var det en gruppe på 8 virvler i området rundt gattet som var tydelig for smale (Figur 24). Denne fisken tilhørte gruppa med høy Zn.



Figur 22 Fusjon under utvikling i ryggraden hos fisk fra uttak 10 uker etter overføring til sjø. To virvler (pilesvisser) er i ferd med å vokse sammen. En tredje virvel (stjerne) har begynnende asymmetri som er et tegn på at denne virvelen med tida villa ha vokst sammen med de to andre.



Figur 23 Høytetthetsvirvler i ryggraden hos fisk fra uttak 5 dager etter overføring til sjø i fisk fra lav Zn-gruppe (merket med pilspisser). Høytetthetsvirvler indikerer nedsatt mineralisering av ryggvirvlene hos dette individet.



Figur 24 Fisk med smale virvler (øverst) i området rundt gattet fra høy Zn-gruppe, sammenliknet med normal fisk fra samme gruppe (nederst).

5.3.5 Histologisk undersøkelse av tarm og gjeller

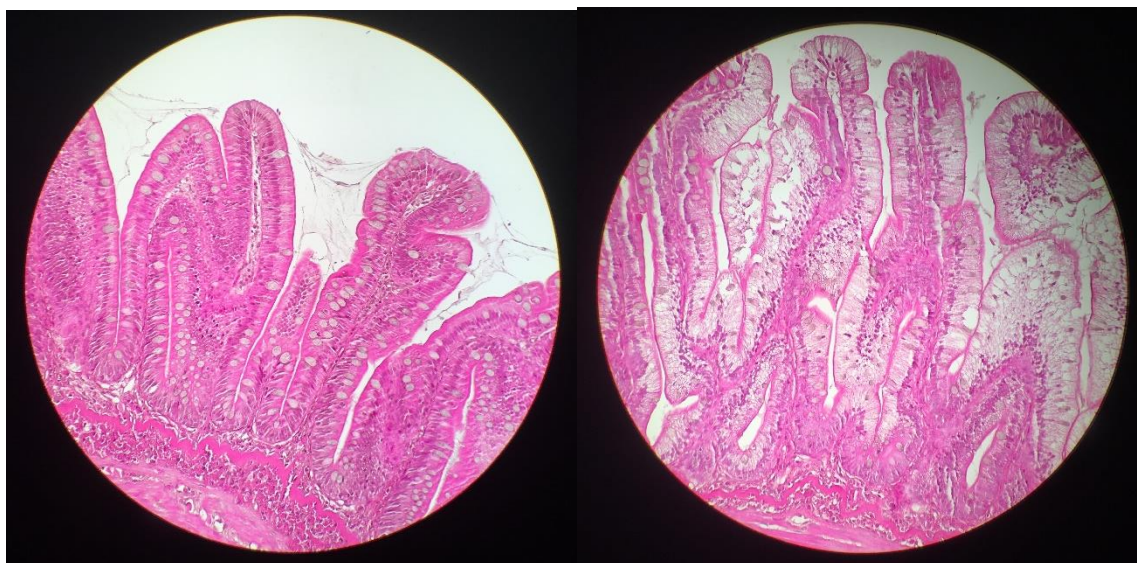
Lysmikroskopi

Evaluerer av HE-fargede snitt fra midttarm fra første uttak (5 dager etter overføring til sjøvatn) viste normale tarmar i alle fôrgrupper (Figur 25). Det ble ikke observert avvik som ble klassifisert som patologiske.



Figur 25 Histologi av tarmvegg, midttarm 5 dager etter overføring til sjøvatn. Bildet viser normale tarmfolder og tarmslimhinne.

Tilsvarende evaluering av tarm fra andre uttak (10 uker i sjø) viste stor variasjon av morfologi i tarmslimhinna. Variasjonen var knyttet til vakuolisering av tarmepitelcellene. Forekomsten av vakuoler ble scoret på en skala fra 0 til 5, der 0 var ingen vakuolisering og 5 var gjennomgående vakuolisering av hele tarmepitelet (Figur 26).



Figur 26 Histologi av tarmvegg, midttarm 10 uker etter overføring til sjø. Bildet viser normale tarmfolder og tarmslimhinne til venstre (score 0) og tarmslimhinne som er fylt av klare vakuoler til høyre (score 4).

Variasjonen i vakuolisering var stor, og det var like stor variasjon innen fôrgruppe som mellom grupper (Tabell 18). Statistisk analyse viste ingen signifikante forskjeller mellom fôrgrupper. Det var tilsynelatende godt samsvar mellom score gitt ved lysmikroskopi og resultater av tilsvarende analyser ved hjelp av AI (se under).

Tabell 18 Vakuolisering av tarmepitelceller i midttarm 10 uker etter overføring til sjø. Gjennomsnitt score $\pm$ standardavvik. Score 0 – ingen vakuolisering, score 5 – gjennomgående vakuolisering av hele tarmepitelet.

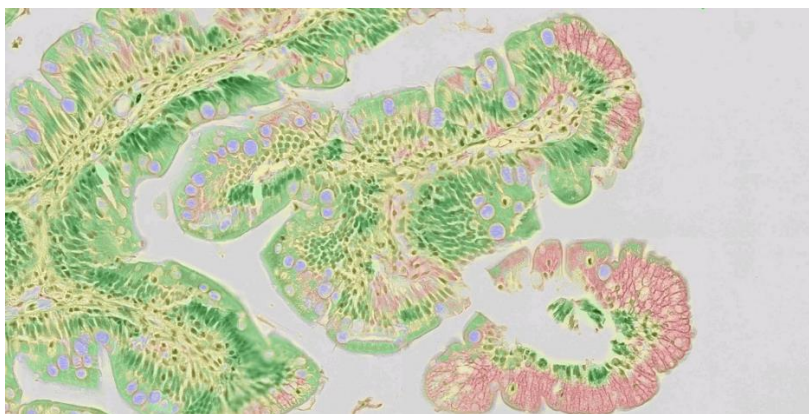
EPA+DHA	Score, vakuolisering
Lav	1,6 $\pm$ 1,5
Middels	2,2 $\pm$ 1,9
Høy	2,8 $\pm$ 1,5

Zn	Score, vakuolisering
Lav	2,3 $\pm$ 1,9
Middels	1,9 $\pm$ 1,7
Høy	3 $\pm$ 1,9

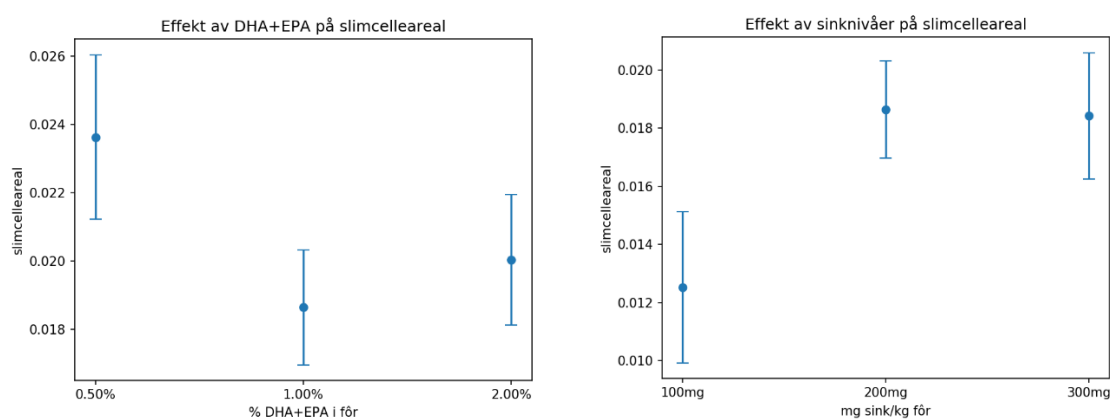
AI-metoder

Datasettet fra de HE-fargede snittene dannet grunnlaget for å utvikle en kunstig intelligens-modell (AI=artificial intelligence) for automatisert evaluering av vakuolisering i tarmepitel og evaluering av slimcelleforekomst i tarmen (Figur 27). Metoden tar i bruk en flerstegsmodell (VggNet + SegNet) som tillater effektiv læring med minimal brukerinteraksjon, samtidig som det er foretatt flere tilpasninger som gjør deteksjonen mer kontekstsensitiv enn konvensjonelle AI-modeller i samme klasse. Det har blitt dannet et godt grunnlag for å videreutvikle denne teknologien for å detektere andre morfologiske karakterer fra HE-snitt som samarbeidspartnere ved OUS kommer til å fortsette arbeidet med.

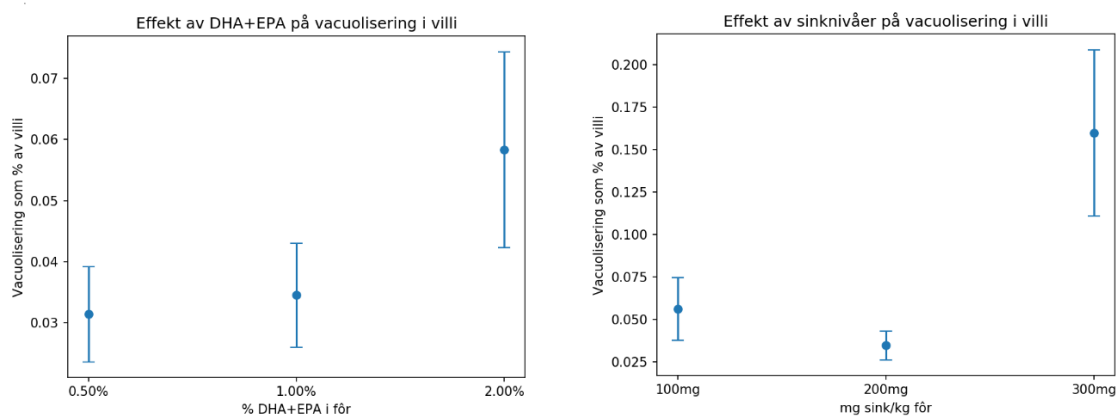
Arbeidet som er gjort i denne omgang tillater nå automatisert scoring av vakuolisering i tarmepitel og telling av slimceller uten å måtte foreta noen form for spesialfarging av vevet (kun HE-farging), og krever kun få sekunder på å analysere hver prøve. Data fra slimcelledeteksjon ved bruk av den nyutviklede modellen reflekterer funn som er gjort med konvensjonell metode, og viser sterke tendenser til at lavt DHA+EPA øker mengde slimceller mens lavt sinknivå reduserer mengde slimceller i tarmepitelet (Figur 28). Det er ytterlige tendenser til at høyere verdier av både sink og DHA+EPA øker grad av vakuolisering i tarmepitelet (Figur 29).



Figur 27 Farget tarmvev, viser sannsynlighet for at en detektert struktur er slimcelle (blå), vakuolisert epitel (rosa), villus medulla (gul) og cortes (grønn).



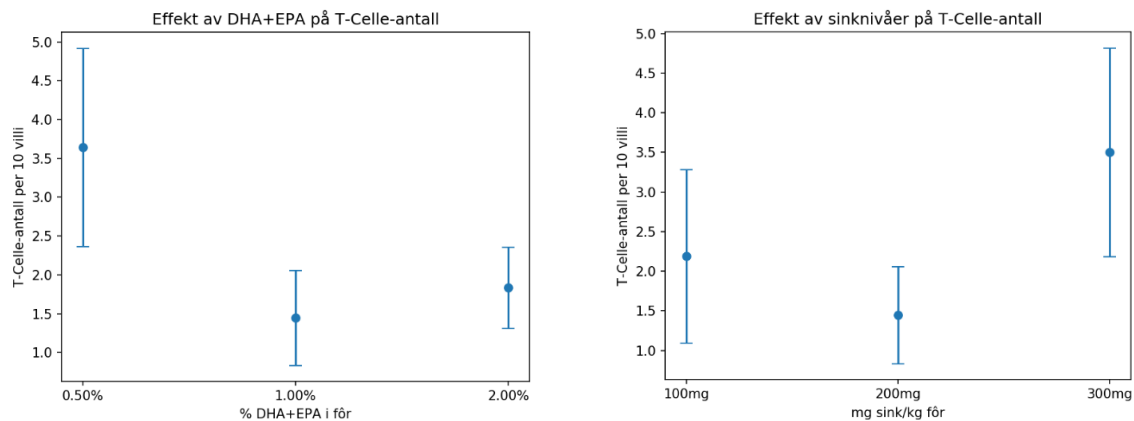
Figur 28 Effekt av omega-3 og Zn i fôr på slimcelleareal i tarm (n=9).



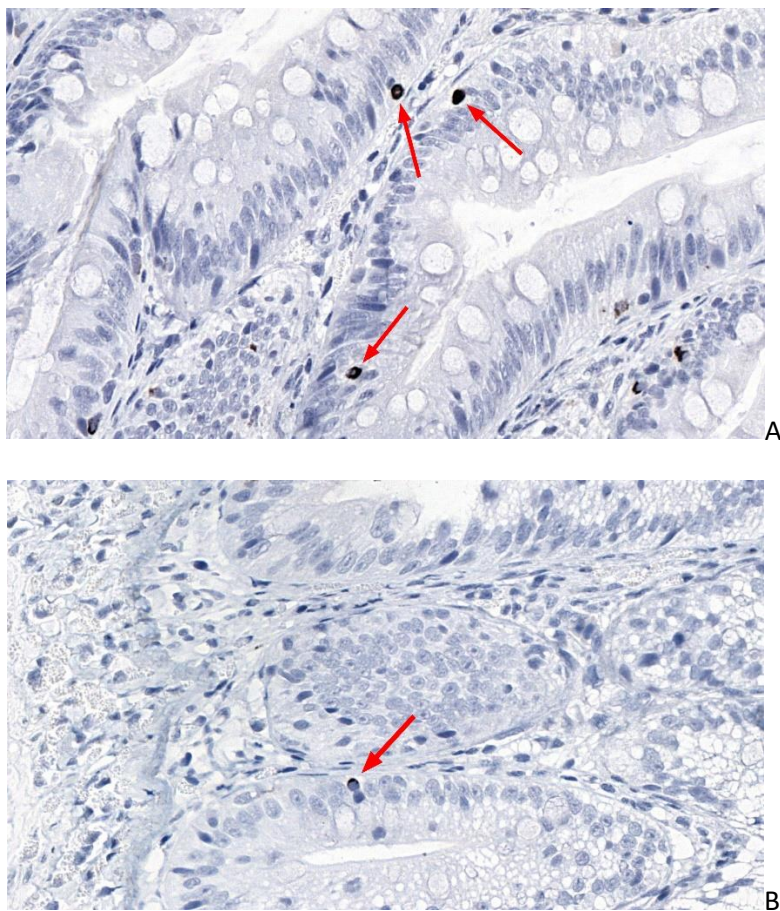
Figur 29 Effekt av omega-3 og Zn i fôr på vakuolisering i tarmvilli (n=9).

T-Celler

Til tross for at det finnes store forskjeller innad i gruppene, er det tendenser i dataene (Figur 30). De som har sterkt uttrykk (10+) har en morfologisk forskjellig signatur på uttrykket av CD3 som kan indikere at det er en immunologisk funksjonsendring i vevet på disse prøvene (Figur 31). Høyt nivå av sink og lavt av DHA+EPA ser ut til å øke T-celle-antall, men dette bør sjekkes mot annen metrikk, særlig vedrørende prøver med ekstremt høye verdier på bakgrunn av de morfologisk forskjellige uttrykkene.



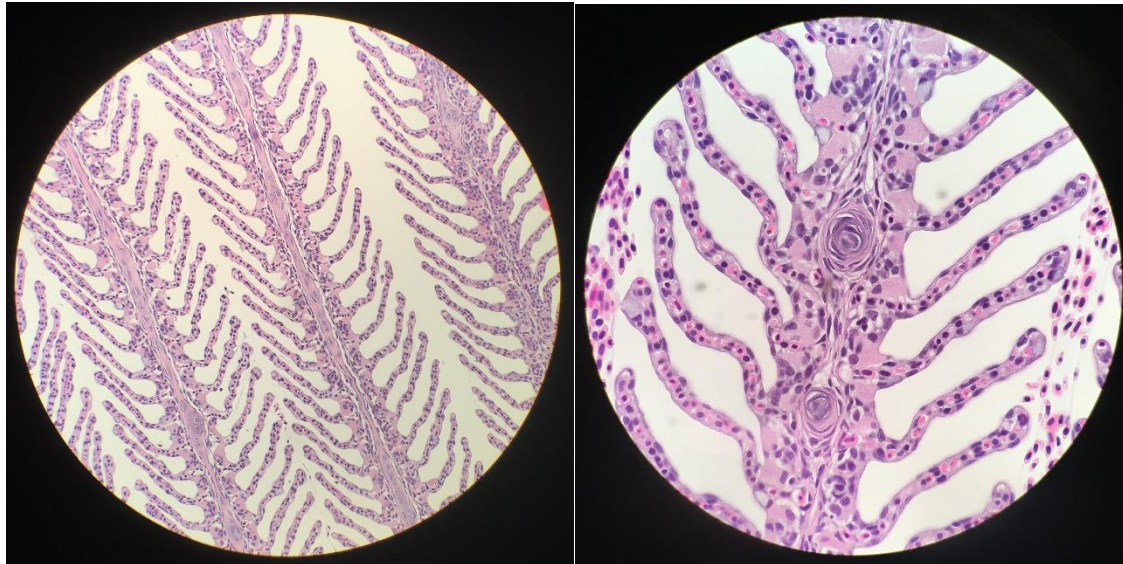
Figur 30 Effekt av omega-3 og Zn i fôr på antall T-celler (CD3) pr 10 villi i tarm (n=9).



Figur 31 Tarmvilli med ulikt uttrykk av CD3, A) sterkt uttrykk og B) svakere uttrykk.

Histologi av gjeller

Evaluering av gjellesnitt i lysmikroskop fra prøveuttak 10 uker etter overføring til sjøvann viste ingen spesielle avvik som kunne knyttes til førbehandling. Det var en del små, uspesifikke uregelmessigheter i gjellevevet, som forventet, men gjellene ble bedømt som normale (Figur 32).

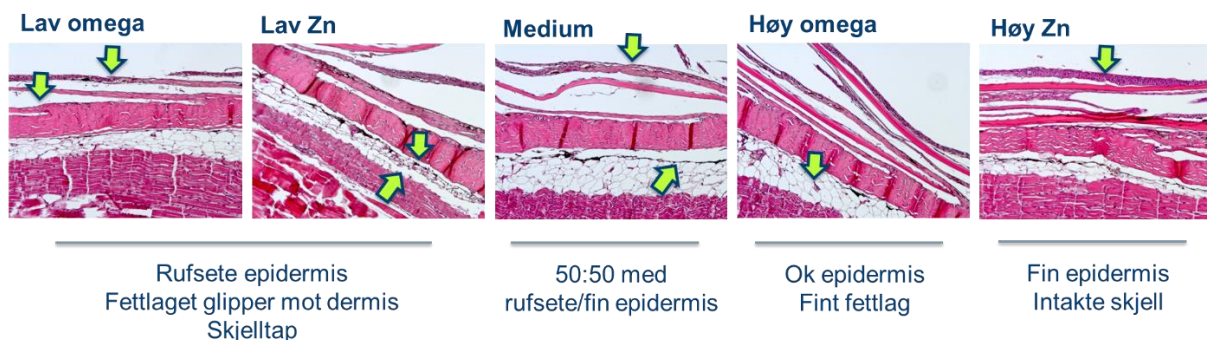


Figur 32 Histologi av gjelleev. Normale gjeller i liten (til venstre) og stor (til høyre) forstørrelse.

5.3.6 Histologisk undersøkelse av skinn

Skinnp prøver ble evaluert på to uttak fra hovedforsøket: 5 dager etter overføring til sjøvann og etter 68 dager i sjøvann. Farging med HE (Figur 33), for generell morfologi og Picro Sirius farging for kollagenmengde og kollagenstruktur ble utført.

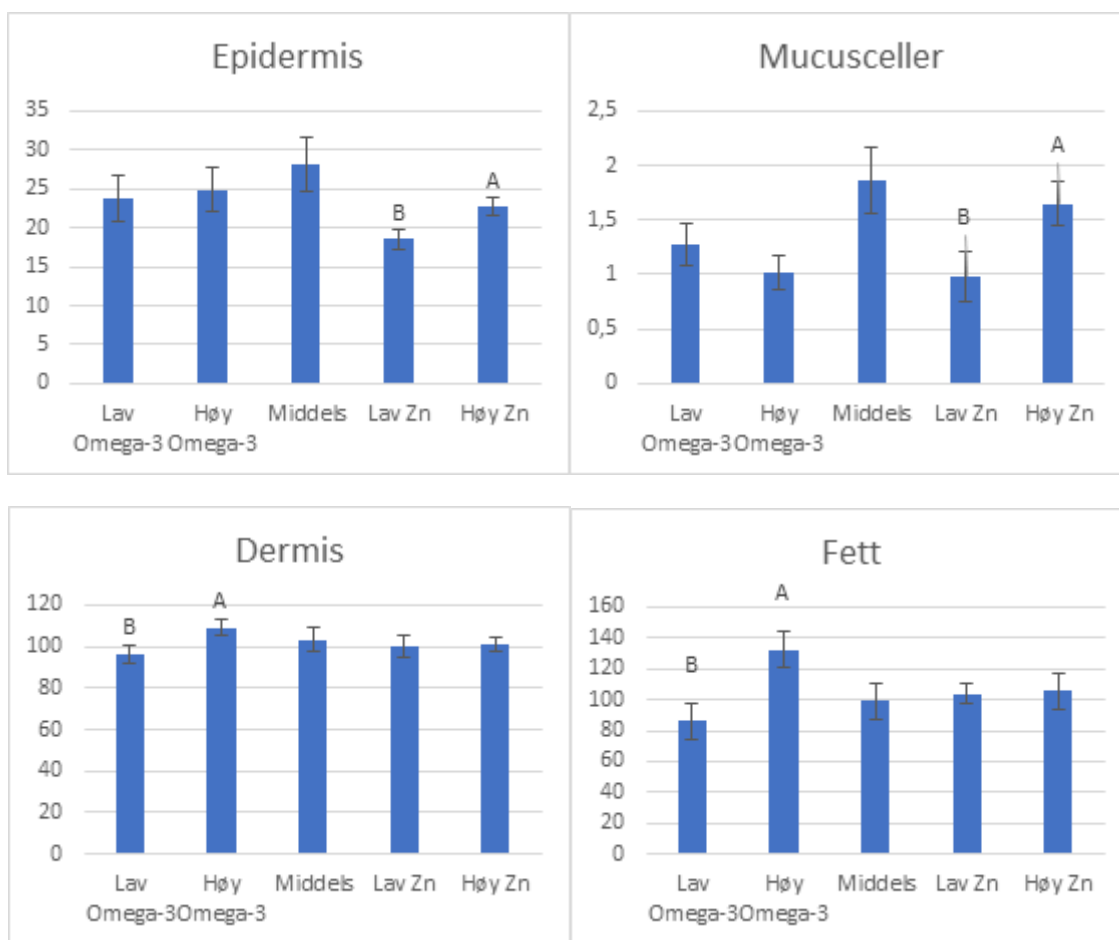
Hovedfunnene våre ble gjort i prøvene som ble tatt 5 dager etter overføring til sjøvann. Overføring til sjøvann er en stor påkjenning for fisken, noe alle skinnprøvene bar preg av. Etter undersøkelse av prøvene var det derimot klart at fisk gitt Lav omega3-diett og Lav Zn-diett taklet overføringen dårligere enn fisk som var føret med diettene Høy omega-3 og Høy Zn (Figur 33). I prøver fra fisk som hadde fått Medium-dietten var halvparten av prøvene tilsvarende de fra diettgruppene Høy omega-3 og Høy Zn, den andre halvparten hadde en fenotype mer lik fisk fra diettgruppene Lav omega-3 og Lav Zn. Forskjellene var blant annet at fisk fra Lav omega-3 og Lav Zn hadde et rufsete ytre cellelag i epidermis, mer løst bindevev og manglet en større andel skjell.



Figur 33 Histologiske snitt fra hver av de fem gruppene, farget med HE.

Vi målte tykkelse på epidermis, dermis, og fett, og telte antall mukusceller i prøvene. Målinger fra prøvene ble testet parvis, og vi fant at Høy Zn-dietten ga signifikant tykkere epidermis og flere mukusceller enn Lav Zn, og at fisk som hadde fått Høy omega-3 hadde et tykkere dermis og fettlag enn Lav omega-3 (Fig. 34). Fisk fra Middels-dietten hadde høyere variasjon, spesielt for epidermis-tykkelse og antall mukusceller, noe som stemmer med de histologiske observasjonene, og var derfor ikke signifikant forskjellig fra noen av de andre diettene.

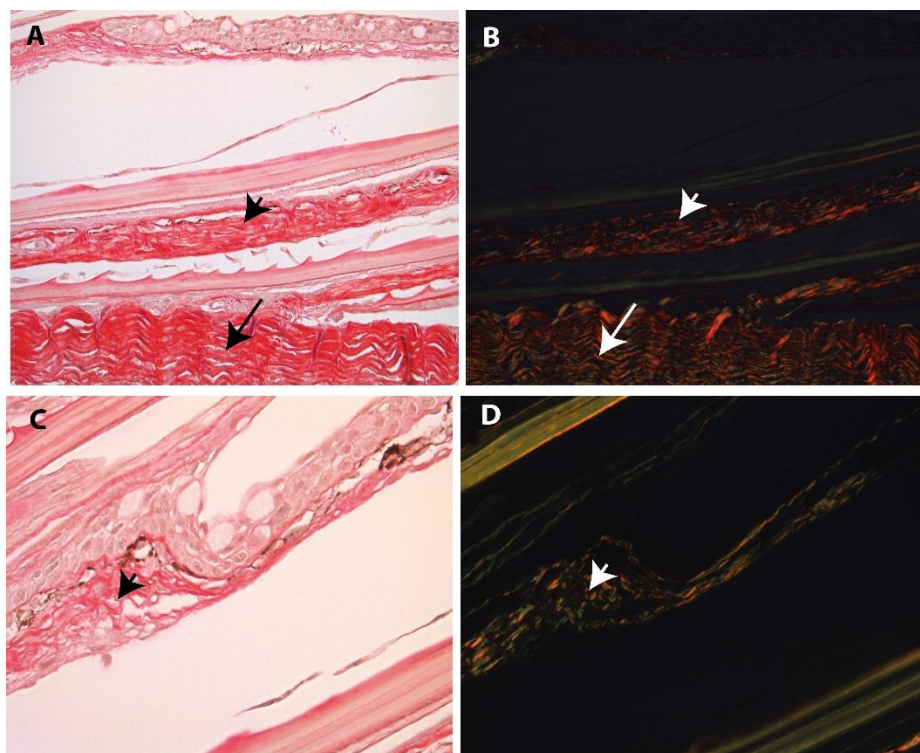
I figurene er det merket av hvor vi fant signifikante forskjeller mellom Høy Zn og Lav Zn, og mellom Høy omega-3 og Lav omega-3. Sink ser ut til å ha størst effekt på det ytterste skinnlaget, mens omega-3 virker mer på de dypere lagene.



Figur 34 Målingene av de ulike lagene i skinnen, epidermis, dermis, mukusceller og fettlag viste at det var signifikante forskjeller mellom fisk fra de ulike diettgruppene.

Etter 10 uker på sjø vann var forskjellene ikke lenger så tydelige. Histologisk var prøvene fra fisk som var føret med Lav omega-3 og Lav Zn noe dårligere enn de andre diettene, men målingene viste ingen signifikante forskjeller.

Farging med Picro Sirius for total mengde kollagen viser kollagen i dermis, under epitelcellelaget og under skjellaget (Figur 35). Picro Sirius med polarisert lys ble også utført for å studere organisering av kollagen-fibriller. Den strukturelle organiseringen av kollagen i skinnlaget var lik i alle diettgrupper.



Figur 35 Eksempelbilde av Picro Sirius farging uten (A, C) og med polarisert lys (B, D) av skinnprøve etter 10 uker i sjøvann. Kollagenrikt område med tydelig rødfarge er observert i dermis (pil, figur A) og bindevevsområde under skjell (pilhode, figur A). Tette, strukturelle kollagenfibre er klart tydelige i dermis (pil, figur B), mens en mer uorganisert fibrill organisering kan sees i bindevevsområdet nærliggende skjell (pilhode, figur B) og epitelcellelaget (pilhode, figur D). Den strukturelle organiseringen av kollagen er lik i alle diettgrupper.

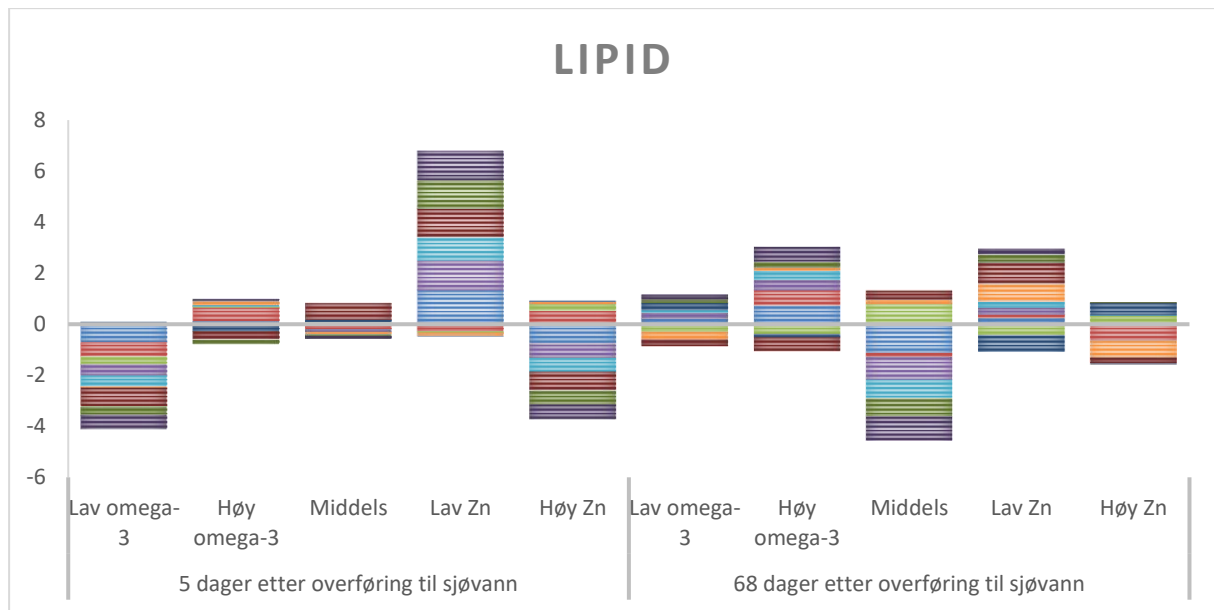
5.3.7 Mikroarray, analyser av barrierevev

Gjeller

Dietten induerte endringer i genuttrykk av 380 ulike gener i gjellevev med funksjoner knyttet til blant annet myofiber, cytoskjelett, ekstracellulær matriks, vevsdifferensiering, vekstfaktor, immunrespons, lipidmetabolisme, jernmetabolisme, transport, signalering, nerver, transkripsjon, RNA, og proteaser.

Både omega-3 og sink påvirket uttrykk av flere lipidrelaterte gener (Figur 36 a og b). Sammenliknet med de andre gruppene ved 5 dager etter sjøvannsoverføring hadde fisk føret med Lav Zn høyere uttrykk av *ldlr* (binder LDL), *plcb3* (DAG syntese fra PL), *pik3ca* (fosforylering av PL) og *apoa4* (chylomicron og VLDL sekresjon og katabolisme). Ved økende sink i dietten ble uttrykk av disse genene nedregulert.

Økende nivå av omega-3 i føret ga motsatt effekt på uttrykk av enkelte gener sammenliknet med økende mengde sink i føret. Ved 5 dager etter sjøvannsoverføring ble blant annet *ldlr*, *apoa4*, *pik3ca* og *sphk2* (fosforylering av fosfolipider), *sptlc2* (sfingolipid biosyntese), og *plcb3* (fosfolipase) oppregulert med økende omega-3, mens økende sink induerte nedregulering. Genuttrykksmønsteret ved 68 dager etter sjøvannsoverføring var noe annerledes enn ved 5 dager. Fisk føret med Middels nivå av begge næringsstoffer viste lavere uttrykk av flere lipid relaterte gener enn de andre gruppene.

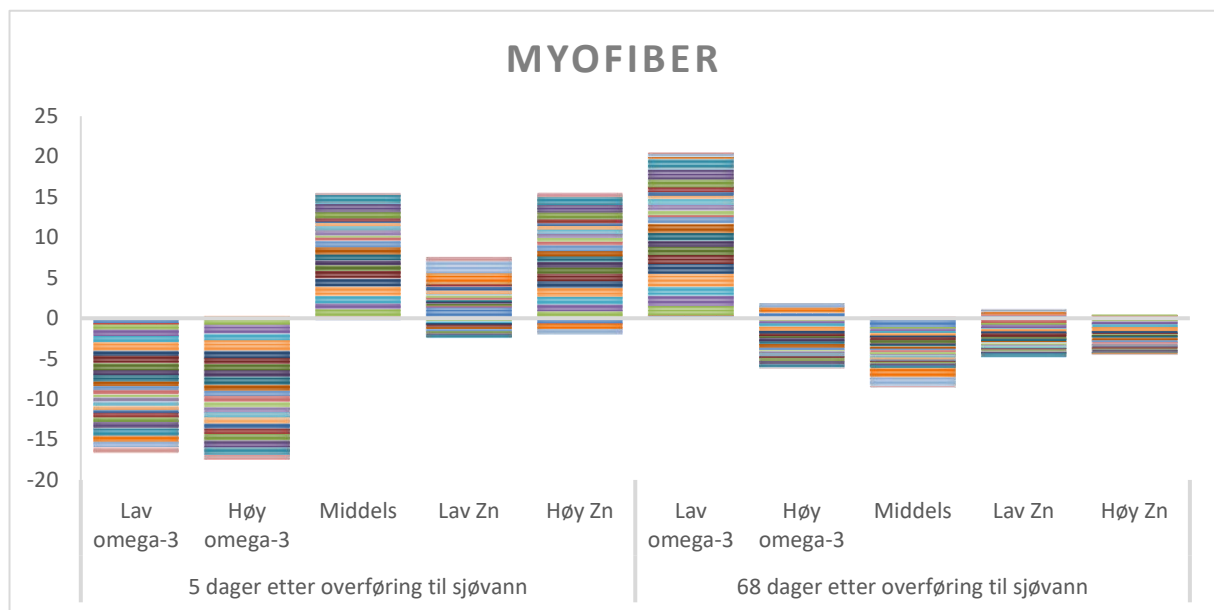


Figur 36a Ekspresjonsmønster av gener relatert til lipid metabolisme i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Lipid	5 dager etter overføring til sjøvann					68 dager etter overføring til sjøvann				
	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn
Low-density lipoprotein receptor-related protein 1	-0.71	0.12	0.02	1.32	-0.76	0.21	0.72	-1.13	0.24	-0.05
Sphingosine kinase 2	-0.56	0.53	-0.20	-0.29	0.52	-0.01	0.61	-0.14	0.14	-0.59
Serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 2a	-0.31	0.04	0.04	-0.05	0.27	-0.29	-0.40	0.72	-0.43	0.33
Phospholipase C, beta 3 (phosphatidylinositol-specific)	-0.43	-0.05	-0.11	1.12	-0.57	0.24	0.39	-0.91	0.28	-0.01
Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase cat	-0.43	0.06	0.01	0.90	-0.54	0.10	0.37	-0.71	0.22	0.02
carboxylesterase 5A, X1	-0.05	0.16	-0.07	-0.13	0.09	-0.31	0.12	0.16	0.72	-0.67
Apolipoprotein A-I binding protein	0.09	-0.23	0.10	0.00	0.05	0.29	-0.13	0.01	-0.65	0.48
Fatty acid binding protein 10a, liver basic	-0.72	-0.32	0.64	1.12	-0.72	-0.24	-0.54	0.34	0.83	-0.20
phospholipase D1-like	-0.33	-0.15	-0.08	1.12	-0.55	0.14	0.22	-0.72	0.33	0.04
apolipoprotein A-IV-like	-0.55	0.07	-0.11	1.16	-0.57	0.18	0.59	-0.94	0.22	-0.04

Figur 36b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til lipid metabolisme i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Endringer i uttrykk av gener for myofiber, cytoskjelett, ekstracellulær matriks, og vevs differensiering tyder på reorganisering av gjellevevet etter overføring til sjøvann. Både sink og omega-3 ser ut til å påvirke vevsstrukturen i gjellefilamenter. Det var stor forskjell mellom diettgruppene i uttrykk av 26 ulike gener relatert til myofiber, inkludert gener som koder for myosiner, troponiner, og tropomyosiner 5 dager etter overføring til sjøvann (Figur 37 a og b). Lav og Høy omega-3-gruppene hadde lavere uttrykk av disse genene sammenliknet med Middels, Høy og Lav Zn-gruppene. Det var mindre forskjell mellom gruppene 68 dager etter overføring til sjøvann, med unntak av Lav omega-3-gruppen, som hadde høyere genuttrykk av myofiber-relaterte gener enn de andre gruppene.

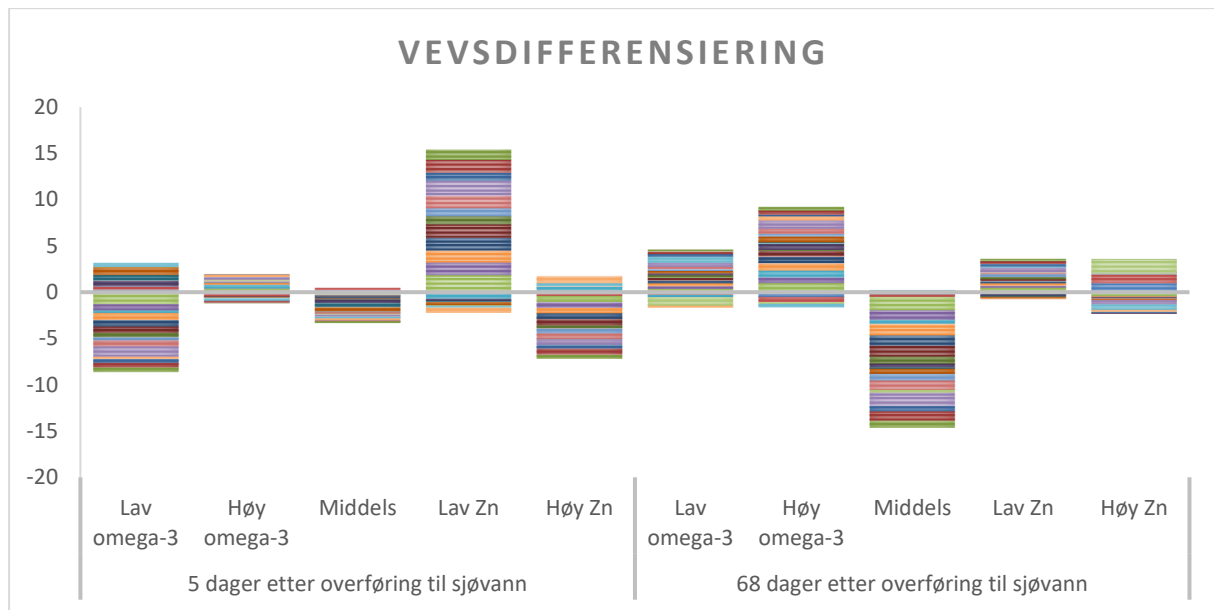


Figur 37a Ekspresjonsmønster av gener relatert til myofiber i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Myofiber	5 dager etter overføring til sjøvann					68 dager etter overføring til sjøvann				
	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn
fast skeletal myosin heavy chain	-0.62	0.04	-0.05	1.28	-0.66	0.27	0.60	-1.11	0.31	-0.07
Troponin C, skeletal muscle	-0.18	0.08	0.21	-0.09	-0.02	0.08	0.04	0.13	-0.60	0.36
Myosin light polypeptide 4	-0.66	-0.83	0.91	-0.28	0.86	1.17	-0.38	-0.23	-0.22	-0.33
Troponin I, skeletal, slow a	-0.72	-1.10	0.73	0.21	0.88	1.27	-0.24	-0.24	-0.41	-0.37
troponin T, slow skeletal muscle-like, X1	-0.79	-0.83	0.92	-0.23	0.92	1.12	-0.41	-0.24	-0.14	-0.34
Myosin, heavy chain b	-1.03	-1.26	1.13	0.10	1.07	1.59	-0.53	-0.32	-0.27	-0.47
Myosin, light chain 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	-0.68	-0.93	1.00	-0.24	0.86	1.22	-0.38	-0.27	-0.27	-0.30
Myosin, heavy chain b	-0.90	-0.73	0.96	-0.27	0.94	1.13	-0.31	-0.35	-0.39	-0.08
Alpha-tropomyosin	-0.90	-0.79	0.71	0.23	0.75	1.03	-0.20	-0.38	-0.23	-0.21
Troponin C type 1a (slow)	-0.60	-0.80	0.56	0.18	0.66	0.70	-0.44	-0.18	-0.05	-0.04
Myosin-binding protein C, slow-type	-0.77	-0.97	0.76	0.26	0.72	1.00	-0.35	-0.20	-0.24	-0.21
Troponin T2d, cardiac	-0.56	-0.71	0.87	-0.25	0.66	1.13	-0.41	-0.27	-0.15	-0.31
Troponin T2d, cardiac	-0.53	-0.68	0.81	-0.29	0.68	0.81	-0.28	-0.21	-0.09	-0.22
Myosin, heavy chain b	-0.50	-0.73	0.41	0.32	0.49	0.27	-0.01	-0.20	0.16	-0.22
fast skeletal myosin heavy chain	-0.34	-0.65	0.25	0.26	0.48	0.53	-0.17	-0.26	-0.23	0.12
Myosin-binding protein C, slow-type	-0.54	-0.66	0.64	0.04	0.52	0.72	-0.27	-0.17	-0.17	-0.11
fast skeletal myosin heavy chain	-0.53	-0.60	0.50	0.13	0.50	0.73	-0.18	-0.27	-0.27	-0.01
Myosin, heavy chain b	-0.52	-0.76	0.42	0.42	0.44	0.40	-0.07	-0.25	0.04	-0.12
fast skeletal myosin heavy chain	-0.36	-0.64	0.17	0.49	0.34	0.44	-0.13	-0.14	-0.03	-0.15
Nebulette	-0.56	-0.63	0.41	0.26	0.51	0.60	-0.19	-0.10	-0.14	-0.18
Troponin T2d, cardiac	-0.54	-0.78	0.77	-0.27	0.82	0.96	-0.38	-0.19	-0.23	-0.15
Myosin, heavy chain b	-0.75	-0.94	0.96	-0.19	0.92	1.25	-0.42	-0.30	-0.24	-0.29
Myosin, heavy chain b	-0.99	-0.86	1.14	-0.31	1.02	1.26	-0.37	-0.32	-0.45	-0.12
Myocyte enhancer factor 2cb	-0.72	0.09	-0.08	1.41	-0.71	0.27	0.62	-1.15	0.30	-0.11
myogenic factor 5	-0.69	-0.04	-0.14	1.50	-0.63	0.37	0.48	-1.06	0.24	-0.03
Alpha-tropomyosin	-0.60	-0.54	0.18	0.51	0.45	0.15	-0.11	-0.07	0.03	0.00

Figur 37b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til myofiber i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Sink og omega-3 i føret påvirket flere gener (i alt 21 gener) knyttet til differensiering og utvikling av gjellevevet (Figur 38 a og b). Lav Zn hadde høyere uttrykk av flere gener som *c-fos*, *znf271*, *tri55*, *pax6*, *deltac*, *pax3a*, *onecut1*, *hoxc12* og *evx1* sammenliknet med de andre diettgruppene 5 dager etter sjøvannsoverføring. Ved økende innhold av sink i dietten, ble uttrykket av disse genene redusert. Denne responsen kan skyldes en kompensatorisk effekt pga. lavt sink i dietten. Trenden ved 5 dager etter sjøvann ser man ikke ved 68 dager. Sammenliknet med de andre gruppene ved samme tidspunkt viste Høy omega-3 oppregulering av flere gener involvert i vevsdifferensiering, slik som *tri55*, *pax6*, *pax3*, *onecut1* og *evx1*, og kan indikere en positiv effekt av omega-3 på vevsutvikling.

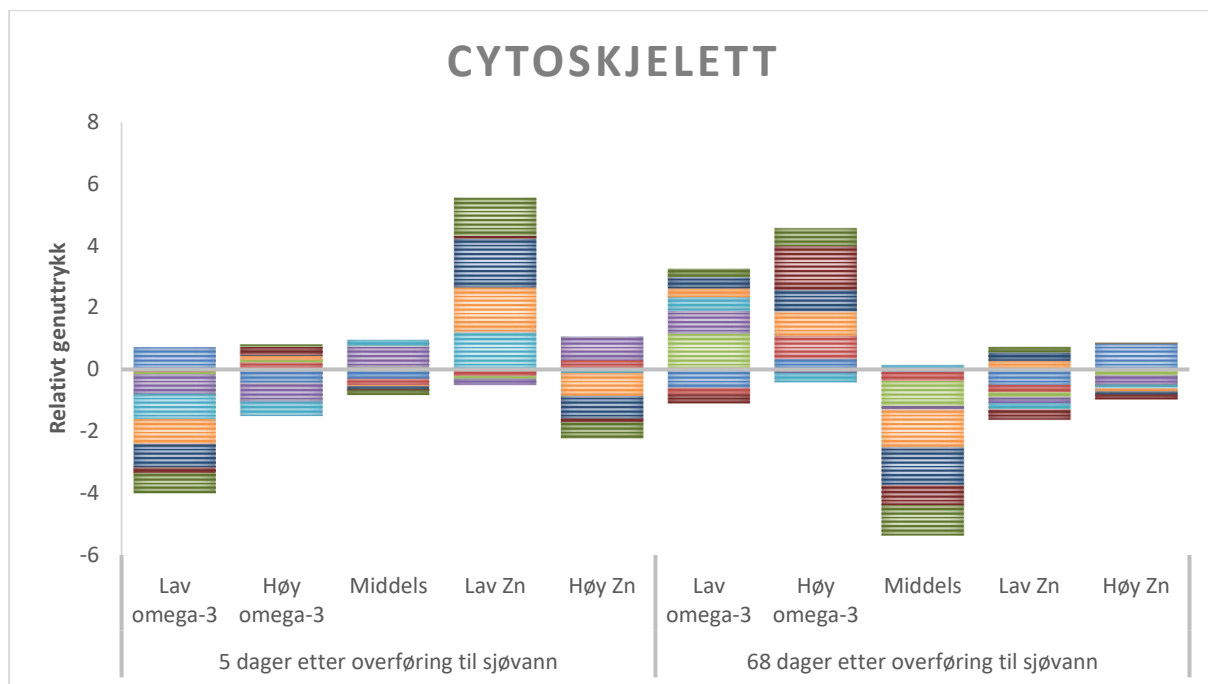


Figur 38a Ekspresjonsmønster av gener relatert til vevsdifferensiering i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Vevsdifferensiering	5 dager etter overføring til sjøvann					68 dager etter overføring til sjøvann				
	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn
myelin and lymphocyte protein-like	0.30	-0.25	0.21	-0.06	-0.19	-0.16	-0.53	-0.25	-0.02	0.96
myelin and lymphocyte protein-like	0.28	-0.26	0.23	-0.02	-0.22	-0.15	-0.54	-0.25	-0.01	0.94
Proto-oncogene c-Fos	1.30	0.39	-0.29	1.82	-0.67	0.39	1.02	-1.47	0.52	-0.46
zinc finger protein 271-like	-0.69	0.04	-0.10	1.32	-0.62	0.29	0.61	-1.07	0.19	-0.02
gastrula zinc finger protein 5-1-like	-0.29	0.39	-0.04	-0.66	0.60	-0.25	0.73	-0.40	-0.13	0.05
Tripartite motif-containing protein 55, X1	-0.77	0.17	-0.05	1.26	-0.62	0.30	0.76	-1.25	0.26	-0.06
paired box protein Pax-6-like, X1	-0.69	0.09	-0.16	1.38	-0.62	0.27	0.69	-1.13	0.21	-0.04
DeltaC	-0.69	0.04	-0.12	1.44	-0.67	0.27	0.64	-1.15	0.21	0.03
filamin A-interacting protein 1-like	-0.46	-0.01	-0.05	0.87	-0.34	0.31	0.14	-0.77	0.24	0.09
Aggrecan a	0.68	0.00	-0.41	-0.25	-0.02	0.22	0.60	-0.41	-0.27	-0.14
Similar to vertebrate discoidin domain receptor family, membe	0.61	-0.05	-0.44	-0.12	0.00	0.00	0.22	-0.15	-0.10	0.03
Aggrecan a	0.83	-0.05	-0.48	-0.33	0.03	0.24	0.61	-0.53	-0.19	-0.13
Paired box gene 3a	-0.36	0.07	-0.07	0.87	-0.51	0.17	0.28	-0.75	0.29	0.02
zinc finger protein 271-like, X1	-0.64	0.04	-0.14	1.36	-0.62	0.27	0.54	-1.01	0.21	-0.01
Homeobox protein Hox-A5	0.03	0.10	-0.11	-0.03	0.00	-0.92	-0.21	-0.30	0.00	1.42
One cut domain, family member 1	-1.10	0.28	-0.22	1.63	-0.58	0.46	0.90	-1.41	0.53	-0.48
NK2 transcription factor related 3	0.40	-0.36	-0.18	-0.21	0.34	0.62	-0.36	0.21	0.14	-0.62
homeobox protein HMX1-like	-0.25	0.28	-0.18	-0.53	0.68	-0.21	0.46	0.00	-0.05	-0.19
One cut domain, family member 1	-0.42	0.03	-0.05	0.82	-0.43	0.30	0.18	-0.58	0.25	-0.15
Homeobox protein Hox-C12	-0.50	-0.16	-0.10	1.40	-0.64	0.27	0.43	-1.00	0.31	-0.02
Even-skipped homeobox 1	-0.44	-0.03	-0.13	1.05	-0.44	0.18	0.35	-0.75	0.21	0.01

Figur 38b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til vevsdifferensiering i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Ved 5 dager etter sjøvannsoverføring hadde Lav Zn høyest uttrykk av flere gener som *desb*, *mast2* og *cryba1* relatert til cytoskjelett sammenliknet med de andre gruppene (figur 39 a og b). Ved økende innhold av sink i dietten ble uttrykket av disse genene redusert, samtidig med at genuttrykket av *acta1a* og *capz*, viktig for aktinfilament organisering, ble oppregulert. Den høyeste dosen omega-3 (Høy omega-3), ser ut å gi en positiv effekt på cytoskjelettrelaterte gener ved 68 dager etter sjøvannsoverføring med økt uttrykk av *rcsd1* (actin filament binding), *cryba1* og *krt1* sammenliknet med de andre gruppene.

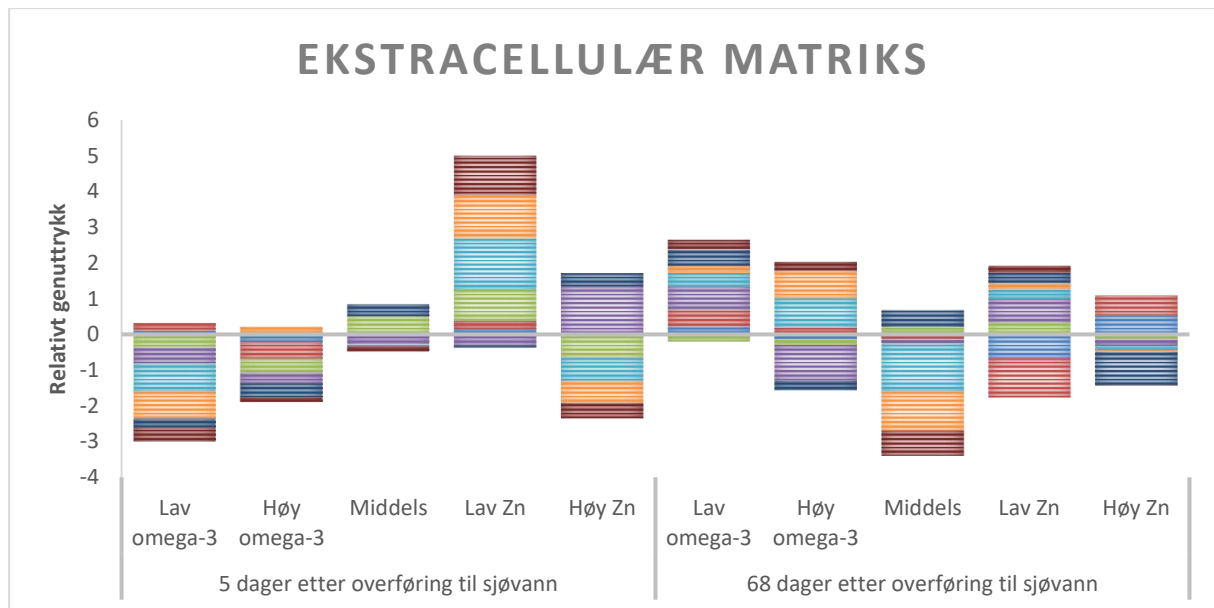


Figur 39a Ekspresjonsmønster av gener relatert til cytoskjelett i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Cytoskjelett	5 dager etter overføring til sjøvann					68 dager etter overføring til sjøvann				
	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn
tetraspanin-3-like, X1	0.72	-0.44	-0.30	0.00	0.03	-0.60	0.35	-0.08	-0.50	0.84
capZ-interacting protein-like	-0.09	0.23	-0.20	-0.21	0.27	-0.22	0.74	-0.28	-0.24	0.00
Microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containi	-0.06	0.08	0.06	-0.08	0.00	1.16	-0.03	-0.81	-0.15	-0.18
Actin, alpha 1a, skeletal muscle	-0.64	-0.60	0.69	-0.20	0.75	0.74	-0.10	-0.11	-0.20	-0.32
Desmin b	-0.81	-0.47	0.19	1.20	-0.12	0.45	-0.30	0.14	-0.19	-0.10
Crystallin, beta A1, like 2	-0.81	0.14	-0.05	1.46	-0.74	0.28	0.78	-1.23	0.28	-0.11
Crystallin, beta A1, like 2	-0.76	0.02	-0.10	1.57	-0.73	0.36	0.70	-1.23	0.27	-0.11
keratin, type I cytoskeletal 18-like, X1	-0.19	0.26	-0.03	0.09	-0.13	-0.28	1.42	-0.65	-0.33	-0.16
Microtubule associated serine/threonine kinase 2	-0.64	0.06	-0.14	1.23	-0.51	0.25	0.56	-0.99	0.17	0.00

Figur 39b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til cytoskjelett i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Sink i dietten påvirket gener knyttet til ekstracellulær matriks med liknende ekspresjonsmønster i de ulike gruppene som for vevsdifferensiering og cytoskjelett relaterte gener (Figur 40 a og b). I forhold til de andre gruppene hadde Lav Zn gruppen høyt uttrykk av *col23a1*, *fbg*, og *spon2b* 5 dager etter sjøvannsoverføring, mens økende sink nivå i dietten ga reduksjon i uttrykk av disse genene. Sammenliknet med Middels og Høy omega-3, viste fisk fra Lav omega-3-gruppen ved 5 dager etter sjøvannsoverføring lavere uttrykk av *col23a1* og *col7a1*, som er viktig komponenter av ekstracellulær matriks.

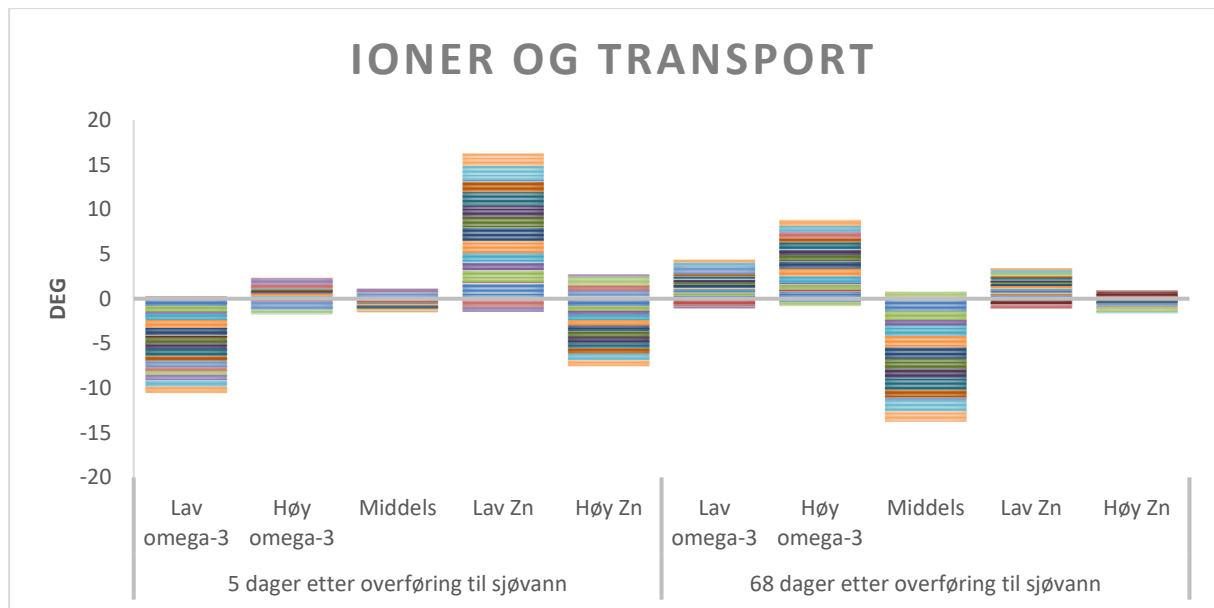


Figur 40a Ekspresjonsmønster av gener relatert til ekstracellulær matriks i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log₂-ekspresjonsratio.

Ekstracellulær matriks	5 dager etter overføring til sjøvann					68 dager etter overføring til sjøvann				
	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn
serine-aspartate repeat-containing protein F-like, X1	0.11	-0.23	0.01	0.15	-0.04	0.23	-0.13	0.05	-0.67	0.53
Fibronectin type III domain-containing protein	0.22	-0.45	0.02	0.23	-0.01	0.47	0.20	-0.14	-1.10	0.57
fibrinogen beta chain-like	-0.36	-0.39	0.48	0.88	-0.60	-0.20	-0.17	0.16	0.34	-0.14
collagen alpha-1(VII) chain-like, X6	-0.45	-0.30	-0.29	-0.31	1.35	0.66	-1.00	-0.13	0.65	-0.18
Collagen alpha-1(XXII) chain	-0.78	0.04	-0.05	1.44	-0.65	0.38	0.82	-1.33	0.25	-0.12
collagen alpha-1(XXIII) chain-like, X1	-0.76	0.17	0.00	1.21	-0.61	0.19	0.75	-1.10	0.20	-0.04
Mucin-5B	-0.24	-0.40	0.33	-0.06	0.36	0.46	-0.27	0.48	0.29	-0.85
Spondin 2b, extracellular matrix protein	-0.39	-0.13	-0.15	1.10	-0.43	0.27	0.25	-0.70	0.18	0.00

Figur 40b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til ekstracellulær matriks i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Ulikt nivå av sink og omega-3 i dietten ga en tydelig effekt på uttrykk av flere gener relatert til transport av ioner og andre forbindelser (i alt 14 gener) 5 dager etter sjøvannsoverføring (Figur 41 a og b). Lav Zn viste økt uttrykk av gener som *slc11a2* (metall-transport), *slc12a* (kalium/klorid transport), *slc13a3* (natriumdicarboxylate transport), *slc14a2* (urea transport), *catsper* (kalsium transport) og *kcnb1* (kalium transport), sammenliknet med de andre gruppene. Til sammenlikning viste både Lav omega-3 og Høy Zn redusert uttrykk av mange av de samme genene. Ved 68 dager etter sjøvannsoverføring viste Høy omega-3-gruppen økt uttrykk av transportrelaterte gener mens Middels-gruppen hadde redusert genuttrykk i forhold til de andre gruppene.

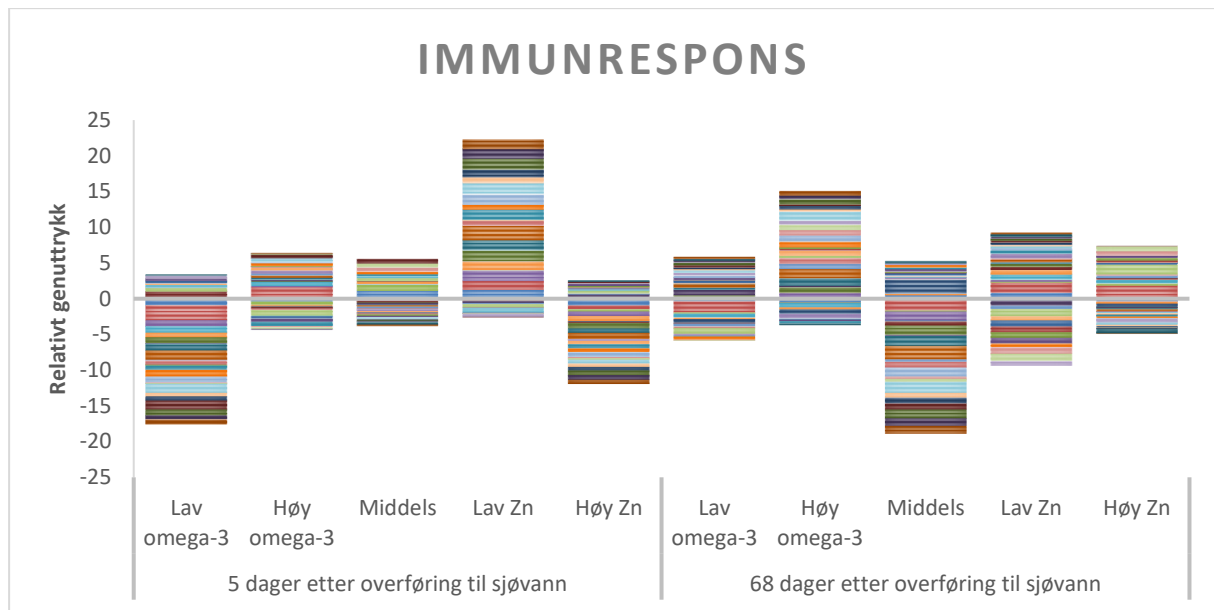


Figur 41a Ekspresjonsmønster av gener relatert til ioner og transport i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Ioner og transport	5 dager etter overføring til sjøvann					68 dager etter overføring til sjøvann				
	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn	Lav omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Zn	Høy Zn
sodium/potassium/calcium exchanger 3-like , X1	-0.39	0.45	0.14	-0.77	0.57	-0.09	0.64	-0.01	-0.41	-0.12
Zinc transporter ZIP4	-0.44	-0.41	-0.10	-0.04	0.99	0.02	-0.38	0.59	0.36	-0.59
Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1	-0.62	0.67	0.22	-0.49	0.23	-0.17	0.16	-0.01	-0.04	0.07
cation channel, sperm associated 3, X1	-0.70	-0.03	-0.09	1.56	-0.73	0.35	0.61	-1.21	0.30	-0.05
Potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily 2	-0.68	0.03	-0.08	1.39	-0.66	0.30	0.64	-1.17	0.19	0.04
Solute carrier family 13 member 3	-0.81	0.10	-0.19	1.69	-0.80	0.38	0.80	-1.41	0.33	-0.09
major facilitator superfamily domain containing 1	0.24	-0.29	-0.26	0.15	0.17	-0.66	0.23	0.04	0.14	0.26
Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily,b-1	-0.67	0.04	-0.10	1.32	-0.60	0.29	0.54	-1.00	0.17	0.00
Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), 2	-0.25	-0.07	-0.08	0.82	-0.43	0.19	0.22	-0.62	0.23	-0.03
Solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 4	-0.67	0.18	-0.06	1.13	-0.59	0.24	0.73	-1.14	0.25	-0.08
solute carrier family 12 member 5-like, X1	-0.87	0.24	-0.11	1.35	-0.61	0.10	0.87	-1.29	0.31	0.01
solute carrier family 12 member 5-like, X1	-0.85	0.08	-0.08	1.49	-0.64	0.34	0.81	-1.27	0.26	-0.14
Urea transporter 2	-0.21	0.22	0.07	-0.14	0.06	-0.12	0.05	0.15	-0.62	0.55
urea transporter 2-like, X1	-0.70	0.14	0.00	1.22	-0.67	0.29	0.66	-1.18	0.18	0.04

Figur 41b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til ioner og transport i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Totalt 23 ulike gener involvert i immunrespons ble påvirket av sink og omega-3 i dietten i gjellevevet (Figur 42). Ved 5 dager etter sjøvannsoverføring skilte Lav Zn-diett-gruppen seg ut med økt genuttrykk av immunrelaterte gener sammenliknet med de andre gruppene, og kan tyde på at denne gruppen er mindre robust enn de andre gruppene.



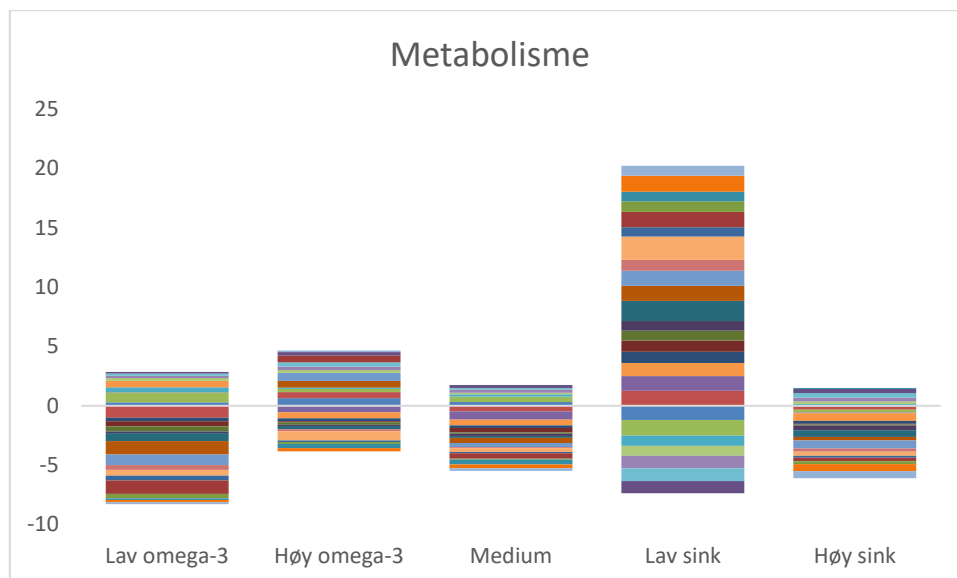
Figur 42 Ekspresjonsmønster av gener relatert til immunrespons i gjeller 5 og 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspressionsratio.

Tarm

Tarmprøver fra både 5 og 68 dager etter sjøvannoverføring ble undersøkt med transkriptomanalyse. Prøvene fra de to tidspunktene ble ikke analysert samtidig, og er derfor presentert hver for seg.

Genuttrykksanalyse av tarmen 5 dager etter overføring til sjøvann viste endring i ca. 290 ulike gener involvert i prosesser som immunrespons, cytoskjelett, vevsdifferensiering, ekstracellulær matriks, metabolisme, transport, signalering, DNA, RNA og proteinsyntese. Lav Zn-gruppen skilte seg fra de andre diettgruppene med oppregulering av et flertall av genene i disse funksjonelle gruppene. Resultatene tyder på høy dynamikk tarmen i denne gruppen rett etter sjøvannsoverføring.

Lav Zn-gruppen hadde høyere genuttrykk av flere gener knyttet til metabolisme av lipid, karbohydrat og protein enn de andre gruppene (Figur 43 a og b). Totalt 25 ulike gener var differensielt uttrykt, og inkluderer gener involvert i glykolysen (*pkm*, pyrovat kinase) og elektrontransportkjeden (gener som koder for ulike cytochrome enheter).

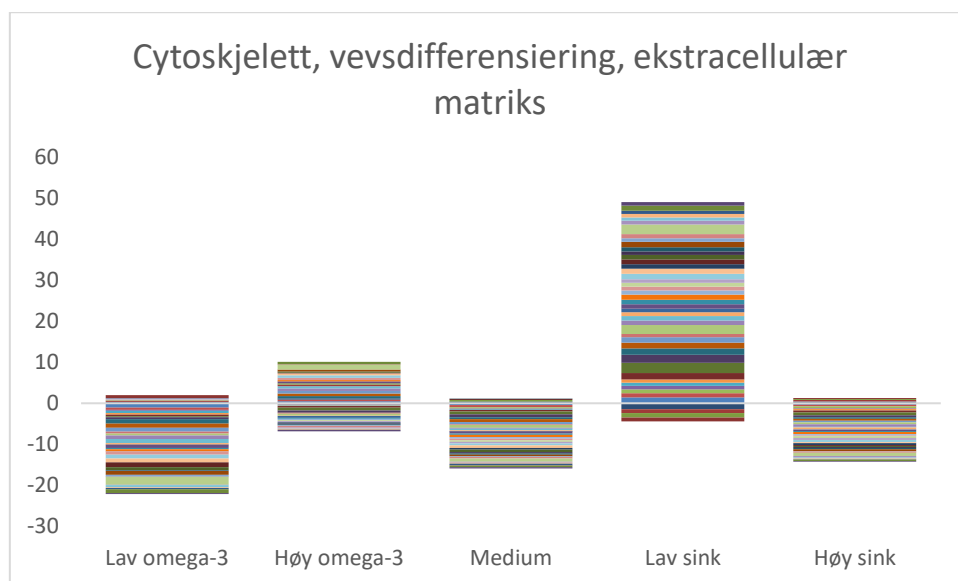


Figur 43a Ekspresjonsmønster av gener relatert til metabolisme i tarm 5 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
histamine N-methyltransferase	0.28	0.65	0.31	-1.19	-0.05
Methionine adenosyltransferase II, alpha b	-1.02	0.51	-0.46	1.26	-0.29
b(0,+)-type amino acid transporter 1-like (LOC106592844)	0.84	0.26	0.48	-1.33	-0.24
protein S100-A1-like	0.04	-0.54	-0.69	1.25	-0.05
ORAI calcium release-activated calcium modulator 1b	0.40	0.11	0.19	-0.85	0.16
serotransferrin-1-like	0.54	-0.51	-0.49	1.10	-0.65
Heme oxygenase 2	-0.29	-0.24	-0.24	0.94	-0.23
Phosphate cytidyltransferase 1, choline, alpha b	-0.43	-0.10	-0.37	0.96	-0.06
Phosphatidylcholine:ceramide cholinephosphotransfe	-0.43	-0.20	-0.11	0.83	-0.09
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG1	-0.13	-0.11	-0.18	0.80	-0.38
cytochrome b-c1 complex subunit 6, mitochondrial-like	-0.69	-0.28	-0.15	1.70	-0.57
Pyruvate kinase, muscle, b	-1.12	0.57	-0.45	1.29	-0.30
cytochrome c iso-1/iso-2-like	-0.90	0.66	-0.33	1.27	-0.69
Pyruvate kinase muscle isozyme	-0.40	-0.16	-0.09	0.90	-0.25
Mitochondrial folate transporter/carrier	0.23	0.26	0.14	-0.85	0.21
Protein ETHE1, mitochondrial	0.19	0.28	0.25	-1.05	0.33
Cytochrome b	0.20	0.35	0.15	-1.06	0.36
Guanosine monophosphate reductase	-0.50	-0.79	-0.33	1.97	-0.35
Uridine-cytidine kinase 2a	-0.40	-0.12	-0.10	0.79	-0.17
Pyruvate kinase, muscle, b	-1.12	0.57	-0.45	1.29	-0.30
Pyruvate kinase muscle isozyme	-0.40	-0.16	-0.09	0.90	-0.25
Phosphoglycerate mutase 1a	0.13	0.30	0.24	-1.03	0.35
Methionine sulfoxide reductase B1a	-0.13	-0.35	-0.41	0.81	0.09
UDP-glucuronosyltransferase 2A2-like	-0.18	-0.26	-0.32	1.36	-0.60
UDP-glucuronosyltransferase-like	-0.16	0.14	-0.22	0.83	-0.59

Figur 43b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til metabolisme 5 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Sammenliknet med de andre gruppene hadde Lav Zn-gruppen høyere genuttrykk av flere gener relatert til cytoskjelett, vevsdifferensiering og ekstracellulær matriks (Figur 44 a og b). Blant annet var gener som koder for ulike collagener, *tri55* og *vegfr-3* oppregulert i Lav Zn i forhold til de andre gruppene.

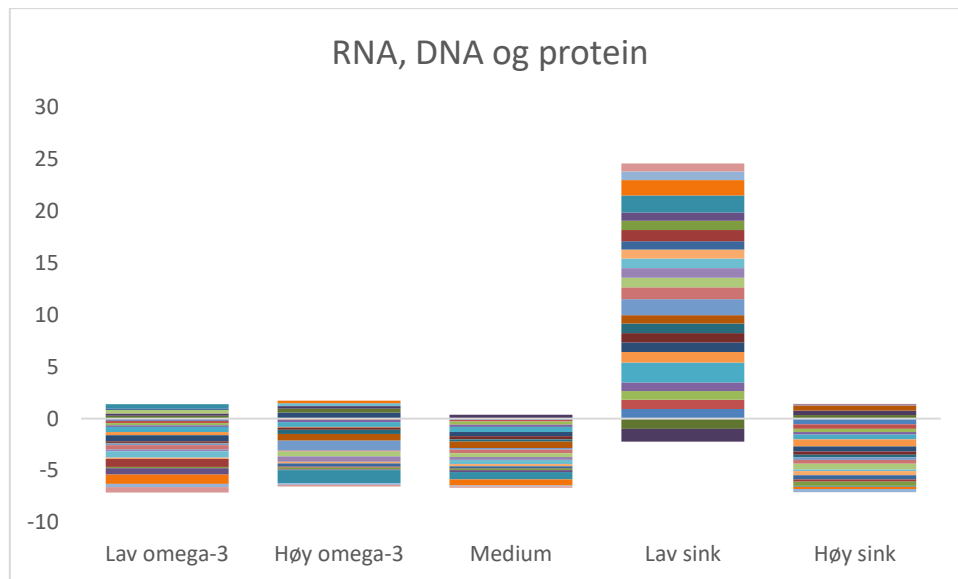


Figur 44a Ekspresjonsmønster av gener relatert til cytoskjelett, vevsdifferensiering og ekstracellulær matriks i tarm 5 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
Coiled-coil domain-containing protein 11	-1.07	0.50	-0.46	<u>1.42</u>	-0.38
Crystallin, beta A1, like 2	-0.49	0.36	-0.51	<u>1.01</u>	-0.36
Ezrin a	0.05	-0.25	-0.30	<u>0.97</u>	-0.47
Actin-related protein 3	-0.31	-0.16	-0.17	<u>0.82</u>	-0.18
Novel protein similar to vertebrate spectrin_beta_non-erythrocytic 1	-0.51	-0.19	-0.17	<u>0.81</u>	0.05
Protein kinase C, iota	-0.41	-0.04	0.05	<u>0.80</u>	-0.40
Septin 7b	0.33	0.34	0.39	<u>-1.43</u>	0.37
keratin-associated protein 10-11-like	-0.38	-0.40	-0.40	<u>1.58</u>	-0.40
gap junction Cx32.2 protein-like	-0.23	-0.72	-0.70	<u>2.42</u>	-0.77
Paxillin	-0.44	-0.50	-0.66	<u>2.00</u>	-0.40
leishmanolysin homolog (LOC106596463)	-1.12	0.56	-0.52	<u>1.51</u>	-0.44
Cldn10l2 protein	-0.97	0.65	-0.68	<u>1.44</u>	-0.44
receptor-type tyrosine-protein phosphatase mu-like	-0.93	0.56	-0.54	<u>1.28</u>	-0.37
Coiled-coil domain containing 80	-0.50	-0.24	-0.13	<u>0.81</u>	0.05
Frizzled homolog 9b	-0.44	-0.51	-0.74	<u>2.19</u>	-0.50
Protein intuned	-0.91	0.69	-0.27	<u>1.10</u>	-0.61
Tripartite motif-containing protein 55	-0.99	0.50	-0.39	<u>1.07</u>	-0.20
Neurocan b	-0.38	-0.03	-0.09	<u>0.95</u>	-0.44
Protein patched homolog 1	-0.03	-0.51	-0.15	<u>0.80</u>	-0.11
Nuclear factor 1 X-type	0.28	0.38	-0.03	<u>-0.98</u>	0.35
Protein odd-skipped-related 1	0.09	0.37	0.41	<u>-1.10</u>	0.23
Homer protein homolog 3	-0.75	0.41	-0.50	<u>1.16</u>	-0.31
Endothelial monocyte-activating polypeptide 2	-0.29	-0.24	-0.25	<u>1.03</u>	-0.24
multimerin-2-like	-0.54	0.31	-0.54	<u>1.29</u>	-0.52
Syndecan 2	-0.02	-0.33	-0.38	<u>0.99</u>	-0.27
Fras1 related extracellular matrix protein 2b	-0.80	0.60	-0.42	<u>0.97</u>	-0.21
ictacalcin-like	0.16	-0.20	-0.42	<u>0.89</u>	-0.43
hyaluronidase PH-20-like	0.27	-0.27	-0.37	<u>0.84</u>	-0.48
collagen alpha-1(XXIII) chain-like (LOC106602916), X1	-0.93	0.62	-0.44	<u>1.34</u>	-0.58
Collagen alpha-1	-0.91	0.48	-0.66	<u>1.26</u>	-0.17
Collagen_type IV_alpha 5 (Alport syndrome) - Ident 38	0.06	-0.31	-0.41	<u>1.13</u>	-0.47
Collagen alpha-3(VI) chain	<u>-1.23</u>	0.11	0.30	<u>1.11</u>	-0.28
proline-rich receptor-like protein kinase PERK9	-0.64	0.31	-0.60	<u>1.12</u>	-0.19
Spondin 2b, extracellular matrix protein	-0.07	-0.18	-0.33	<u>0.81</u>	-0.24
growth hormone secretagogue receptor 1	-0.21	-0.24	-0.30	<u>1.08</u>	-0.33
Ecto-NOX disulfide-thiol exchanger 1	-0.93	0.48	-0.40	<u>1.33</u>	-0.47
Phosphatidylcholine:ceramide cholinephosphotransfe	-0.43	-0.20	-0.11	<u>0.83</u>	-0.09
Syndecan 2	-0.02	-0.33	-0.38	<u>0.99</u>	-0.27
vascular endothelial growth factor receptor 3-like	-1.98	1.29	-0.83	<u>2.32</u>	-0.80
proheparin-binding EGF-like growth factor	-0.04	-0.28	-0.23	<u>0.94</u>	-0.39
angiopoietin-4-like	-0.53	-0.05	0.00	<u>0.83</u>	-0.25
Connective tissue growth factor	-0.16	-0.27	-0.24	<u>0.82</u>	-0.14
EPS8-like 1, isoform CRA_d; Epidermal growth facto	-0.34	-0.09	-0.32	<u>0.82</u>	-0.07
Fibroblast growth factor 12	0.75	0.04	-0.12	<u>-0.87</u>	0.20
Growth factor independent protein 1B, Gfi-1b	-0.91	0.53	-0.41	<u>1.23</u>	-0.45
bridging integrator 2-like	-0.25	-0.28	-0.26	<u>0.89</u>	-0.10

Figur 44b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til metabolisme 5 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Lav Zn hadde også høyere genuttrykk av flere gener knyttet til DNA, RNA og proteinsyntese enn de andre gruppene, og er vist i Figur 45 a og b.

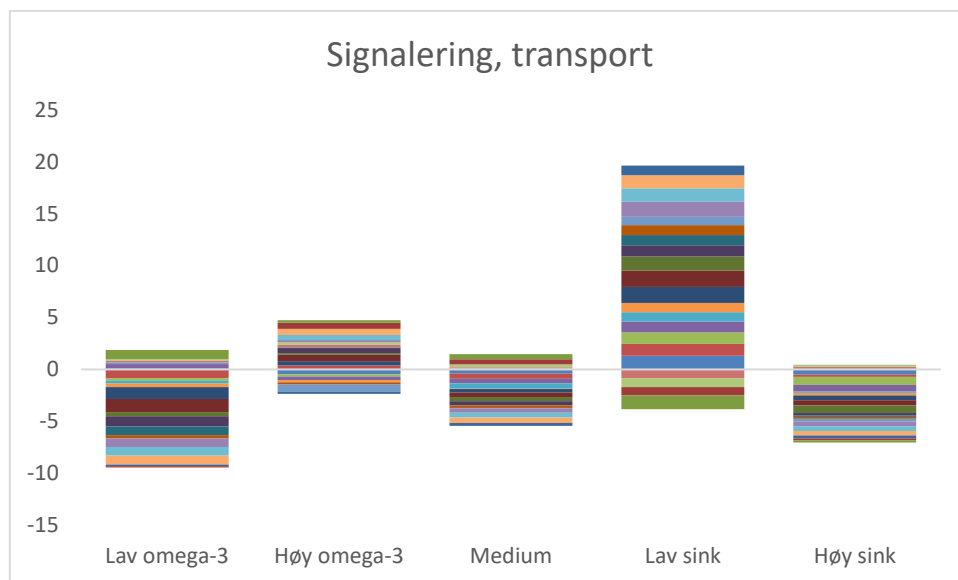


Figur 45a Ekspresjonsmønster av gener relatert til DNA, RNA og protein syntese i tarm 5 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
High mobility group protein B3	-0.21	-0.03	-0.13	<u>0.91</u>	-0.55
H3 histone, family 3A	-0.22	-0.08	-0.16	<u>0.91</u>	-0.44
Enhancer of zeste homolog 2	-0.21	-0.01	-0.30	<u>0.82</u>	-0.30
Kinesin family member 23	-0.17	-0.23	-0.21	<u>0.85</u>	-0.25
SKI family transcriptional corepressor 1b	-0.48	-0.45	-0.50	<u>1.90</u>	-0.48
activating transcription factor 7-interacting protein 1-like	-0.30	-0.05	0.00	<u>1.01</u>	-0.65
TATA box binding protein	-0.60	0.59	-0.41	<u>0.95</u>	-0.52
transcriptional activator GLI3-like	-0.14	-0.22	-0.25	<u>0.89</u>	-0.29
Nuclear factor 1 X-type	0.28	0.38	-0.03	<u>-0.98</u>	0.35
DNA-directed RNA polymerase II subunit RPB11-a	0.23	0.23	0.36	<u>-1.25</u>	0.43
Transcription factor 12	-0.04	-0.41	-0.21	<u>0.92</u>	-0.25
Endonuclease III-like protein 1	-0.03	-0.64	-0.62	<u>0.79</u>	0.49
Saccin	-0.16	<u>-0.97</u>	-0.17	<u>1.55</u>	-0.25
DnaJ	-0.39	-0.09	-0.32	<u>1.15</u>	-0.36
protein-glutamine gamma-glutamyltransferase 2-like (LOC106583691),	0.34	-0.45	-0.37	<u>0.91</u>	-0.56
Vesicle-associated membrane protein 1	-0.19	-0.54	-0.27	<u>0.95</u>	0.06
WASP homolog-associated protein with actin, membranes and microtu	-0.63	0.29	-0.41	<u>0.91</u>	-0.17
Carboxylesterase 5A	-0.12	-0.13	-0.23	<u>0.87</u>	-0.39
ADP-ribosylation factor-like 8Bb	0.13	-0.33	-0.21	<u>0.80</u>	-0.39
60S ribosomal protein L5-like	-0.78	-0.08	0.00	<u>1.09</u>	-0.22
40S ribosomal protein S17-like	-0.13	-0.17	-0.17	<u>0.88</u>	-0.41
60S ribosomal protein L5-like	-0.60	-0.08	-0.17	<u>0.80</u>	0.05
mediator complex subunit 10	0.41	-1.26	-0.72	<u>1.65</u>	-0.08
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RN	-0.91	0.26	-0.59	<u>1.47</u>	-0.23
5-3 exoribonuclease 2	-0.31	-0.15	-0.07	<u>0.82</u>	-0.29
CCR4-NOT transcription complex subunit 3	-0.52	-0.15	-0.14	<u>0.79</u>	0.02

Figur 45b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til DNA, RNA og protein syntese 5 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Lavt nivå av sink i dietten påvirket mange gener innen signalering og transport 5 dager etter sjøvannsoverføring sammenliknet med de andre diettgruppene (Figur 46 a og b). Flere gener involvert i ionetransport (som *slc12a* og gener som koder for Na⁺/K⁺ATPase) var oppregulert i Lav Zn i forhold til de andre gruppene. Ionekanalene er viktig under sjøvannsoverføring for regulering av ioner.

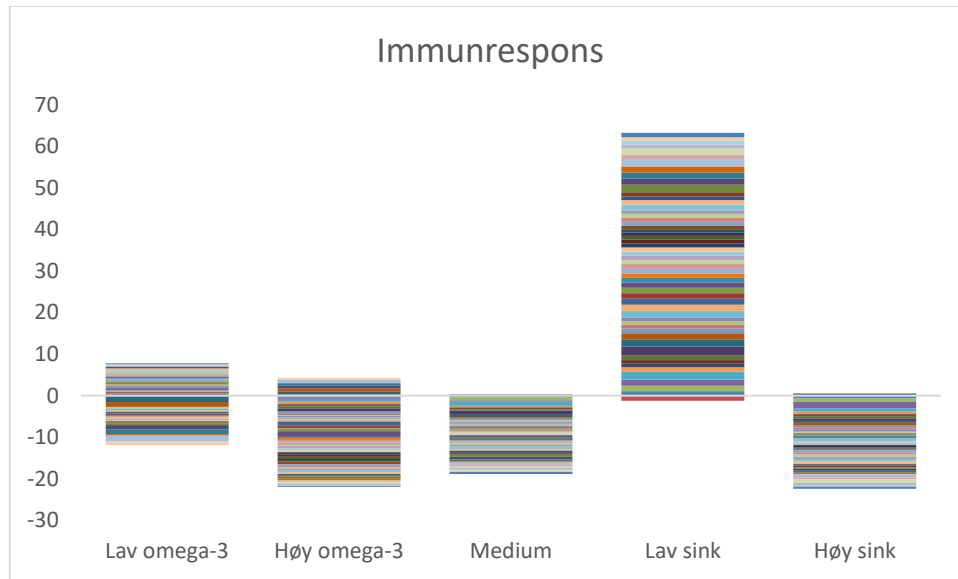


Figur 46a Ekspresjonsmønster av gener relatert til signalering og transport i tarm 5 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspressionsratio.

	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
Olfactomedin-4	0.10	-0.49	-0.41	<u>1.32</u>	-0.50
DDB1- and CUL4-associated factor 5	-0.85	0.40	-0.48	<u>1.14</u>	-0.22
Rho GTPase activating protein 15	-0.22	-0.19	0.09	<u>1.11</u>	-0.79
GTPase IMAP family member 7	0.40	-0.36	-0.46	<u>1.04</u>	-0.63
RAB5A, member RAS oncogene family, b	-0.28	0.00	-0.50	<u>0.90</u>	-0.12
DENN domain-containing protein 4B	-0.34	-0.22	-0.04	<u>0.87</u>	-0.27
Tau-tubulin kinase 2	-1.14	0.38	-0.36	<u>1.56</u>	-0.44
Tau-tubulin kinase 2	<u>-1.27</u>	0.62	-0.41	<u>1.55</u>	-0.49
active breakpoint cluster region-related protein-like	-0.39	0.17	-0.39	<u>1.38</u>	-0.76
Tripartite motif-containing protein 55	-0.99	0.50	-0.39	<u>1.07</u>	-0.20
SH2 domain-containing adapter protein E-like	<u>-0.83</u>	0.04	-0.03	<u>0.99</u>	-0.17
Adenylate cyclase type 9	-0.32	-0.20	-0.25	<u>0.97</u>	-0.19
Serine/threonine-protein kinase SMG1	0.16	-0.67	-0.02	<u>0.80</u>	-0.28
GRB2-associated and regulator of MAPK protein-like	0.21	0.26	0.11	<u>-0.84</u>	0.27
Breast cancer anti-estrogen resistance 3, isoform	0.16	0.25	0.29	<u>-0.88</u>	0.18
Solute carrier family 12	-0.82	0.21	-0.43	<u>1.48</u>	-0.43
solute carrier family 12 member 5-like	-0.84	0.50	-0.49	<u>1.26</u>	-0.44
solute carrier family 12 member 5-like	-0.88	0.59	-0.52	<u>1.24</u>	-0.43
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	-0.15	-0.23	-0.26	<u>0.93</u>	-0.29
Aquaporin 8b	-0.12	0.58	0.50	<u>-0.80</u>	-0.17
b(0,+)-type amino acid transporter 1-like	0.84	0.26	0.48	<u>-1.33</u>	-0.24
biogenesis of lysosome-related organelles complex 1 subunit 6-like (LC	-0.10	-0.25	-0.13	<u>1.08</u>	-0.59
Potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, beta mem	-0.54	0.18	-0.32	<u>0.95</u>	-0.27
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-2	-0.15	-0.23	-0.26	<u>0.93</u>	-0.29
sodium/potassium/calcium exchanger 3-like	0.71	0.37	-0.27	<u>-0.94</u>	0.13

Figur 46b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til signalering og transport 5 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Lav Zn-gruppen viste oppregulering av 55 ulike gener involvert i immunrespons, både medfødt og adaptiv immunitet (Figur 47 a og b). Den største gruppen av gener er involvert i antiviral respons, og er vanligvis dempet under smoltifisering og etter sjøvannsoverføring (Johansson et al., 2016).



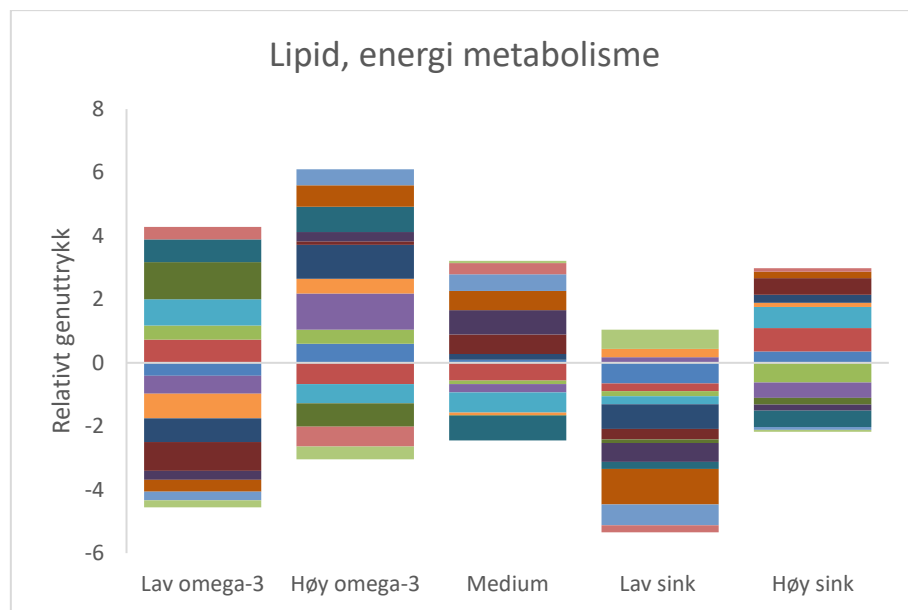
Figur 47a Ekspresjonsmønster av gener relatert til immunrespons i tarm 5 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Immun	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
Serotransferrin-1-like	0.54	-0.51	-0.49	1.10	-0.65
Amyloid beta	0.43	0.34	0.28	1.23	0.19
nuclear GTPase SLIP-GC-like	0.24	-0.11	-0.62	1.27	-0.78
CD83 antigen-like	0.83	-0.40	-0.36	1.51	1.58
C-C motif chemokine 20-like	0.40	-0.46	-0.99	1.91	-0.87
interleukin 8	0.41	-0.57	-0.37	1.10	-0.57
Chemokine (C-X-C motif) ligand 14	-0.18	-0.22	-0.19	0.82	-0.23
C5a anaphylatoxin chemotactic receptor [C5a-R]	-0.02	-0.27	-0.26	0.83	-0.28
interleukin 8	0.41	-0.57	-0.37	1.10	-0.57
Interleukin-12 receptor beta-2 chain	-0.03	-0.76	-0.94	2.14	-0.56
interleukin-10 receptor subunit beta-like	-1.32	0.58	-0.59	1.76	-0.44
Cytokine receptor-like factor 1b	-1.17	0.79	-0.39	1.48	-0.71
granulocyte colony-stimulating factor receptor	0.12	-0.50	-0.36	1.14	-0.40
Tumor necrosis factor alpha-induced protein 3	-0.12	-0.32	-0.09	0.89	-0.36
zonadhesin-like	-0.28	-0.17	-0.26	0.80	-0.10
Leukotriene B4 receptor 1	0.26	-0.40	-0.29	0.86	-0.42
Ubiquitin-protein ligase HERC6	-0.47	-0.48	-0.41	1.67	-0.31
Very large inducible GTPase 1-2	-0.37	-0.49	-0.42	1.49	-0.20
ISG15-like	-0.39	-1.05	-0.28	1.48	0.22
Ubiquitin-protein ligase HERC6	-0.36	-0.60	-0.24	1.33	-0.12
Very large inducible GTPase 1-2	0.14	-0.69	-0.27	1.25	-0.43
Similar to hect domain and RLD3	0.04	1.35	0.03	1.25	0.03
Receptor transporting protein 3 (rtp3)	-0.20	-0.27	-0.06	1.14	-0.61
E3 ubiquitin-protein ligase	-0.15	-0.67	-0.24	1.13	-0.07
P2Y purinoceptor 8-like	0.33	-0.44	-0.22	1.09	-0.76
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5-2	-0.29	-0.54	-0.17	1.09	-0.07
Gig2-1	-0.22	-0.29	-0.26	1.07	-0.29
thymidylate kinase (LOC100136513)	-0.27	-0.60	-0.17	1.06	-0.02
Interferon-induced protein 44-1	0.01	-0.44	-0.08	0.95	-0.44
Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5-2	-0.29	-0.49	-0.17	0.94	0.01
VHSV-induced protein-1	0.09	-0.55	-0.27	0.94	-0.21
interferon regulatory factor 7	0.12	-0.48	-0.20	0.93	-0.37
Radical S-adenosyl methionine domain-containing protein 2; Viperin	-0.27	-0.61	-0.10	0.91	0.07
GLI family zinc finger 3	-0.09	-0.22	-0.22	0.82	-0.29
Interferon-induced GTP-binding protein Mx	0.08	-0.39	-0.28	0.81	-0.23
VHSV-inducible protein-3	-0.12	-0.57	0.00	0.80	-0.10
Immunoglobulin superfamily member 6 precursor	0.44	-0.46	-0.35	1.01	-0.63
immunoglobulin superfamily member 6-like	0.29	-0.38	-0.38	0.98	-0.51
IgH BV31P	0.46	-0.34	-0.50	0.95	-0.57
Ig light chain	0.19	-0.29	-0.41	0.85	-0.44
C-type lectin domain family 4 member E-like	0.26	-0.45	-0.57	1.38	-0.61
CD209 antigen-like protein C	0.47	-0.51	-0.43	1.08	-0.62
C-type lectin domain family 4 member E-like	0.41	-0.35	-0.50	0.84	-0.40
C type lectin receptor C	0.09	-0.28	-0.26	0.82	-0.37
Paxillin	-0.44	-0.50	-0.66	2.00	-0.40
DNA cross-link repair 1C	-1.07	0.70	-0.63	1.50	-0.51
protein artemis-like	-1.13	0.59	-0.44	1.42	-0.44
laccase (multicopper oxidoreductase) domain containing 1 (lacc1)	-0.40	-0.38	-0.34	1.51	-0.38
toll-like receptor 12	-1.34	0.89	-0.63	1.73	-0.66
toll-like leucine-rich repeat [Salmo salar] Toll-like receptor 5	0.20	-0.29	-0.40	1.03	-0.54
regulator of G-protein signaling 21-like	0.22	-0.56	-0.26	1.50	-0.90
Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11, b	0.09	-0.39	-0.28	0.98	-0.40
Suppressor of cytokine signaling 3b	-0.19	-0.13	-0.26	0.89	-0.32
modified T cell receptor alpha	-0.79	0.43	-0.40	0.85	-0.08
tumor necrosis factor alpha-2 precursor	0.21	-0.22	-0.52	1.11	-0.59

Figur 47b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til immunrespons 5 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Relativt få gener, totalt 117, var ulikt uttrykt som et resultat av sink og omega-3 innhold i dietten ved 68 dager etter sjøvannsoverføring. De ulike gruppene viste også et annet ekspresjonsmønster enn det som ble observert i tarm rett etter sjøvannsoverføring ved 5 dager.

Ulike nivåer av omega-3 og sink i fôret påvirket uttrykket av gener knyttet til lipid- og energimetabolisme (Figur 48 a og b). Høy omega-3 viste økt genuttrykk av blant annet *elvol1* (kjedeforlenger fettsyrer), *acss2* (lipid syntese, energi), *scd* (lager dobbeltbinding i fettsyrer) og *ldlr2* (binder og transporterer LDL) sammenliknet med de fleste andre gruppene. I forhold til de andre gruppene hadde Lav Zn redusert genuttrykk av mange av de samme lipid/energirelaterte genene.

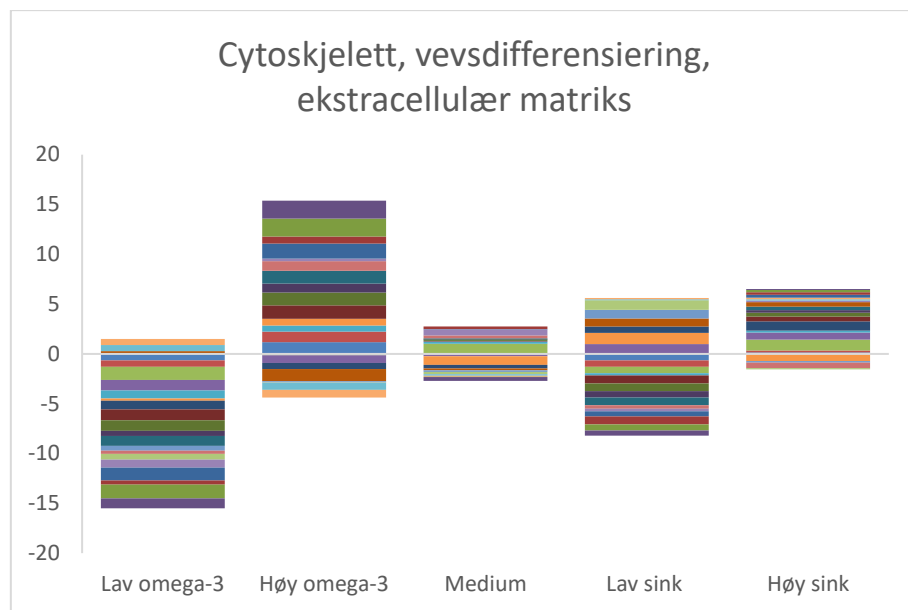


Figur 48a Ekspresjonsmønster av gener relatert til lipid og energi metabolisme i tarm 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspressionsratio.

Lipid og energimetabolisme	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
Elongation of very long chain fatty acids protein 1	-0.41	0.61	0.10	-0.65	0.36
Aldehyde dehydrogenase	0.74	-0.67	-0.56	-0.24	0.74
Acetyl-coenzyme A synthetase 2-like, mitochondrial precursor	0.44	0.44	-0.10	-0.16	-0.62
Acyl-CoA desaturase	-0.56	1.13	-0.27	0.18	-0.48
Aldehyde dehydrogenase	0.83	-0.60	-0.63	-0.26	0.67
Low-density lipoprotein receptor-related protein 2	-0.78	0.47	-0.07	0.26	0.12
Fatty aldehyde dehydrogenase	-0.74	1.08	0.18	-0.78	0.26
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2, mitochondrial precursor	-0.91	0.10	0.61	-0.33	0.52
Ubiquitin	1.17	-0.74	-0.03	-0.11	-0.21
retinol-binding protein 2	-0.28	0.29	0.77	-0.60	-0.19
Creatine kinase, mitochondrial 1	0.72	0.79	-0.78	-0.22	-0.52
checkpoint kinase 2	-0.38	0.68	0.60	-1.11	0.20
Thioredoxin	-0.28	0.50	0.53	-0.66	-0.09
UDP glucuronosyltransferase 1 family polypeptide b7 short isoform	0.39	-0.62	0.35	-0.22	0.11
Diphosphomevalonate decarboxylase	-0.22	-0.40	0.07	0.61	-0.06

Figur 48b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til lipid og energi i tarm 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Totalt 22 gener som koder for proteiner knyttet til cytoskjelettet, vevs differensiering, og ekstracellulær matriks viste differensiell regulering som respons på ulikt nivå av omega-3 fettsyrer og sink i føret (Figur 49 a og b). Fisk fra Lav omega-3 og Lav Zn-gruppene viste nedregulering av flere gener som *des*, *tri55*, *gmp*, *npnt*, og *tekt4*, mens Høy omega-3 hadde høyere genuttrykk av flere av de samme genene.

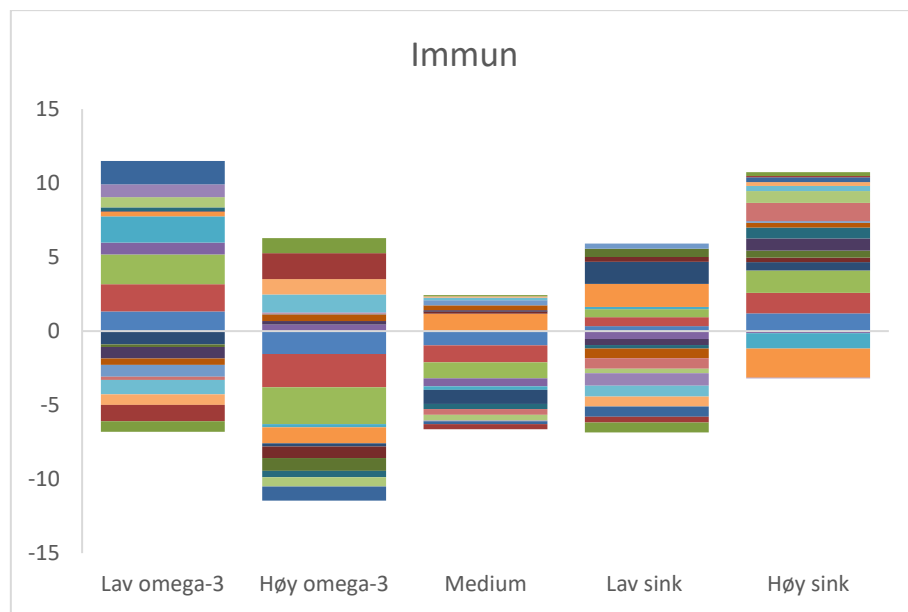


Figur 49a Ekspresjonsmønster av gener relatert til cytoskjelett, vevsdifferensiering og ekstracellulær matriks i tarm 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Cytoskjelett, vevsdifferensiering, ekstracellulær matriks	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
Tektin-4	-0.65	1.17	-0.02	<u>-0.64</u>	0.15
Rho guanine nucleotide exchange factor 18	-0.65	1.05	0.06	<u>-0.65</u>	0.18
desmin	-1.30	-0.14	<u>0.97</u>	-0.65	<u>1.11</u>
Novel protein similar to vertebrate spectrin_beta_non-erythrocytic 1	-1.09	-0.76	-0.22	<u>0.98</u>	0.70
Fascin	-0.80	<u>0.63</u>	0.20	-0.23	0.21
Phosphatase and actin regulator 3	-0.20	<u>0.67</u>	<u>-0.87</u>	<u>1.14</u>	-0.73
Sterile alpha motif domain-containing protein 9-	<u>-0.87</u>	-0.61	-0.36	0.63	<u>0.93</u>
Glucocorticoid receptor	-1.09	1.34	0.08	<u>-0.79</u>	0.46
Tripartite motif-containing protein 55	-1.06	1.30	0.16	<u>-0.79</u>	0.39
Lim homeobox protein 3	-0.54	0.91	0.01	<u>-0.65</u>	0.27
homeobox protein HoxC8ba	-1.00	1.29	0.10	<u>-0.75</u>	0.36
Fibronectin 1b - Ident 28	0.27	<u>-1.25</u>	-0.19	0.80	0.44
Fibronectin 1b - Ident 28	-0.46	-0.12	-0.15	<u>0.89</u>	-0.16
Fibronectin	-0.33	<u>0.95</u>	0.28	-0.35	-0.54
Fibronectin 1b - Ident 28	-0.59	-0.02	-0.23	<u>0.96</u>	-0.12
Col6a2 protein - Ident 96	-0.78	0.26	<u>0.62</u>	-0.25	0.16
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 precursor	0.62	<u>-0.71</u>	-0.14	0.09	0.14
Procollagen C-endopeptidase enhancer 1 precursor	0.61	<u>-0.76</u>	-0.11	0.11	0.15
GMP Giant mucus protein	-1.29	<u>1.49</u>	0.04	-0.52	0.28
Epsilon-sarcoglycan precursor	-0.43	0.72	0.25	<u>-0.79</u>	0.26
Nephronectin variant 2	-1.37	<u>1.79</u>	-0.04	-0.62	0.23
Sialin	-1.00	<u>1.80</u>	-0.38	-0.53	0.11

Figur 49b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til cytoskjelett, vevsdifferensiering og ekstracellulær matriks i tarm 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

I tarmvevet var det 21 ulike immune relaterte gener som ble påvirket av nivå av omega-3 og sink i fôret 68 dager etter sjøvannsoverføring (Figur 50 a og b), men det var imidlertid liten forskjell mellom gruppene.



Figur 50a Ekspresjonsmønster av gener relatert til immun respons i tarm 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

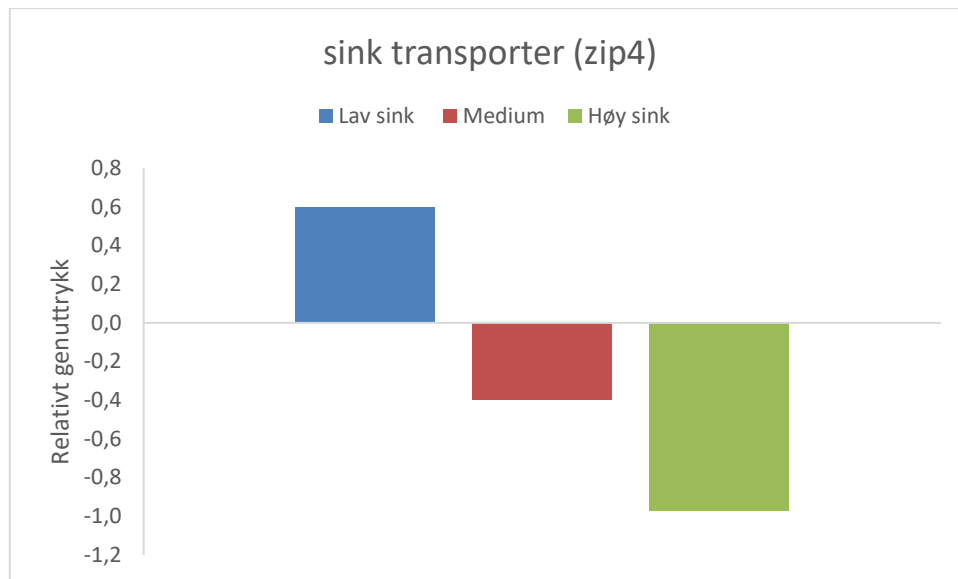
Immue respons

Serum amyloid A
 Serum amyloid A5
 Serum amyloid A-5 protein
 Antimicrobial peptide 2 (LEAP2)
 H-2 class I histocompatibility antigen, L-D alpha chain precursor
 MHC class I heavy chain precursor
 MHC class I [Salmo salar] MHC class I
 C-C motif chemokine 19 precursor
 C-C motif chemokine 19 precursor
 C-C motif chemokine 13 precursor
 precerebellin-like protein
 acute phase serum amyloid A (IFN-induced 44)
 52 kDa Ro protein-4
 IFN-induced 44
 Fish-egg lectin
 Lectin precursor
 Growth factor independent 1.1
 Drebrin-like protein
 G0/G1 switch protein 2
 T cell receptor alpha
 Drebrin-like protein

Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
1.32	-1.55	-0.97	0.34	1.19
1.85	-2.24	-1.13	0.60	1.39
2.02	-2.50	-1.08	0.55	1.52
0.80	0.44	-0.55	-0.54	-0.15
1.75	-0.20	-0.23	0.15	-1.03
0.31	-1.10	1.18	1.56	-1.96
-0.90	-0.21	-0.95	1.49	0.57
0.04	-0.77	0.13	0.31	0.30
-0.17	-0.88	0.00	0.57	0.48
-0.76	0.25	0.10	-0.40	0.82
0.27	-0.42	-0.35	-0.24	0.75
-0.45	0.46	0.33	-0.65	0.32
-0.80	0.01	0.34	0.35	0.10
-0.20	0.06	-0.38	-0.72	1.25
0.69	-0.62	-0.40	-0.29	0.79
0.87	0.06	-0.05	-0.85	-0.04
-0.99	1.22	0.17	-0.73	0.34
-0.71	1.03	0.09	-0.67	0.27
1.57	-0.95	-0.18	-0.70	0.32
-1.10	1.76	-0.36	-0.39	0.09
-0.71	1.03	0.09	-0.67	0.27

Figur 50b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til immun respons i tarm 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Sinktransporteren *zip4* viste dose-respons på nivå av sink i dietten (Figur 51). Lavt sinknivå i dietten ga økt genuttrykk sammenliknet med høyt sinknivå.

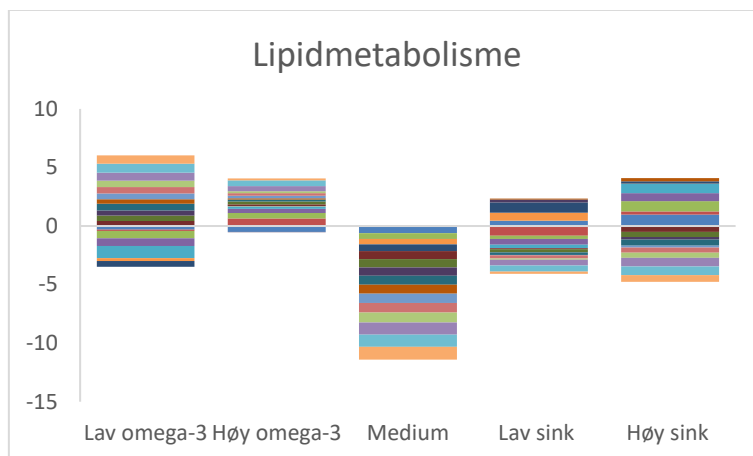


Figur 51 Sinktransporteren *zip4* viste doserespons på sink nivå i dietten i tarm 68 dager etter overføring til sjøvann.

Skinn

Totalt ble 360 ulike gener differensielt uttrykt i skinn som resultat av ulike nivåer av omega-3 og sink i dietten 68 dager etter sjøvannsoverføring. De ulike diettene ga samme ekspresjonsmønster for flere grupper av gener, slik som for gener relatert til lipidmetabolisme, karbohydratmetabolisme, mitokondrie og energimetabolisme, cytoskjelett, vevsdifferensiering og ekstracellulær matriks, og DNA, RNA og proteinsyntese. Tydeligst er en reduksjon i genuttrykk av disse gruppene med gener i fisk fra Middels-gruppen sammenliknet med de andre diettene, mens Lav omega-3 og Høy Zn ga en oppregulering (Figur 52a).

Totalt 19 ulike lipidrelaterte gener var differensielt uttrykt i skinn som respons på innhold av omega-3 og sink i dietten (Figur 52b). Sammenliknet med de andre gruppene hadde Lav omega-3 økt uttrykk av gener involvert i fettforbrenning (som *acadvl*, *hadha* og *acaa2*) og PL syntese (*agpat4*). Høy omega-3 hadde oppregulert genuttrykk av transport proteiner (som *apoe*, *apob*) og proteiner involvert i DAG syntese (*mogat*). I forhold til de andre gruppene hadde middels lavere genuttrykk av de fleste lipidrelaterte genene.

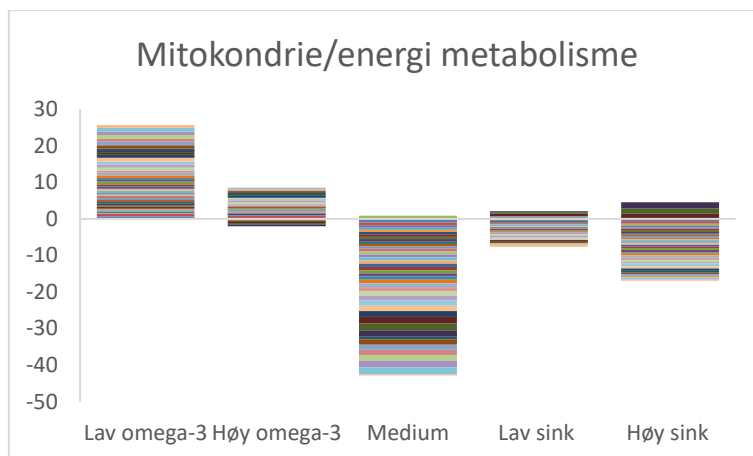


Figur 52a Ekspresjonsmønster av gener relatert til lipidmetabolisme i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Lipid metabolisme	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
Monoacylglycerol O-acyltransferase 2	-0.32	-0.50	-0.61	0.46	0.97
apolipoprotein E	-0.11	0.65	0.02	-0.83	0.27
apolipoprotein B	-0.60	0.46	-0.48	-0.26	0.89
Apolipoprotein B-100	-0.67	0.36	-0.01	-0.51	0.67
apolipoprotein A-I-1	-1.04	0.23	0.04	-0.30	0.82
Fatty acid-binding protein, brain	-0.23	0.00	-0.47	0.68	0.02
Fatty acid-binding protein, brain	-0.51	0.02	-0.57	0.88	0.18
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase_ very long chain	0.44	0.11	-0.69	-0.07	-0.49
Long-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.45	0.25	-0.70	-0.28	-0.45
1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase delta	0.44	-0.04	-0.71	0.25	-0.21
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor	0.59	0.16	-0.77	-0.21	-0.52
Endothelial lipase precursor	0.38	0.13	-0.78	0.07	0.27
Probable isovaleryl-CoA dehydrogenase	0.47	0.21	-0.78	-0.03	-0.17
Apolipoprotein O precursor	0.55	0.21	-0.81	-0.29	-0.42
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	0.56	0.16	-0.86	-0.12	-0.45
2-acylglycerol O-acyltransferase 1	0.67	0.46	-1.04	-0.47	-0.73
Long-chain-fatty-acid--CoA ligase ACSBG1	0.77	0.47	-1.05	-0.51	-0.74
Peroxisomal proliferator-activated receptor A-interacting complex 285 kDa-2	-0.31	0.19	0.65	-0.38	0.10
Epidermal retinol dehydrogenase 2	0.69	0.16	-1.08	-0.21	-0.58

Figur 52b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til lipidmetabolisme i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Ulikt nivå av omega-3 og sink i fôret påvirket uttrykket av 46 ulike gener relatert til mitokondrier og energimetabolisme (Figur 53a og b), som for eksempel gener for proteiner involvert i elektrontransportkjeden og ATP syntese. Sammenliknet med de andre gruppene hadde Lav omega-3 oppregulert uttrykk av de fleste av genene, mens Middels-gruppen viste nedregulering. I forhold til de andre gruppene hadde Høy Zn nedregulert flere av genene relatert til mitokondrier og energimetabolisme.



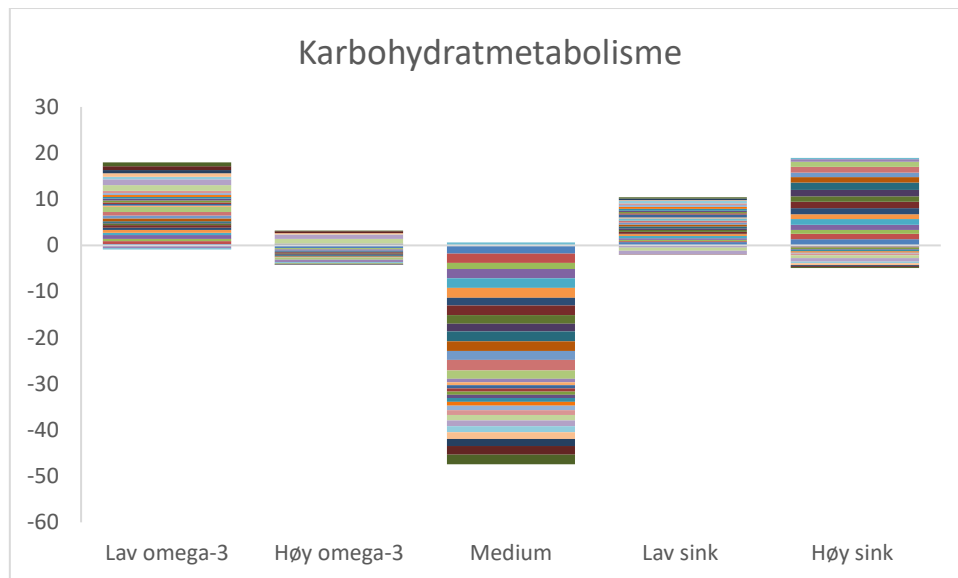
Figur 53a Ekspresjonsmønster av gener relatert til mitokondrie og energimetabolisme i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Mitokondrie	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
Cytochrome c	0.71	0.11	-0.93	-0.06	-0.65
Creatine kinase, mitochondrial 1	0.72	0.77	-0.80	-0.05	-0.64
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2, mitochondrial precursor	0.14	-0.43	0.82	0.17	-0.60
Cytochrome b-c1 complex subunit 8	0.38	0.17	-0.61	-0.25	-0.45
Mitochondrial 28S ribosomal protein S36	0.38	0.04	-0.61	-0.12	-0.13
NADP-dependent malic enzyme, mitochondrial precursor	0.38	-0.01	-0.62	0.04	-0.14
Dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase)	0.15	0.27	-0.63	-0.27	-0.22
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor	0.46	0.09	-0.64	-0.24	-0.39
ATP synthase H+ transporting mitochondrial F1 complex alpha subunit 1	0.41	-0.04	-0.64	-0.06	-0.35
Malate dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.41	0.03	-0.65	-0.13	-0.39
ATP synthase H+ transporting mitochondrial F1 complex alpha subunit 1	0.50	-0.01	-0.65	-0.02	-0.34
Glycine amidinotransferase, mitochondrial	0.54	-0.08	-0.66	-0.09	-0.38
pyruvate kinase	0.49	0.04	-0.66	0.30	-0.30
Trifunctional enzyme subunit alpha, mitochondrial precursor	0.59	0.16	-0.77	-0.21	-0.52
Succinyl-CoA ligase subunit alpha, mitochondrial precursor	0.35	0.02	-0.79	0.19	-0.34
Isocitrate dehydrogenase 2-2 (NADP+), mitochondrial	0.49	0.15	-0.83	-0.09	-0.24
Cytochrome c oxidase subunit 4 isoform 2, mitochondrial precursor	0.63	0.32	-0.85	-0.40	-0.57
Aspartate aminotransferase, mitochondrial precursor	0.50	0.15	-0.86	-0.27	-0.42
NADP transhydrogenase, mitochondrial precursor	0.62	0.06	-0.86	-0.16	-0.50
3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial	0.56	0.16	-0.86	-0.12	-0.45
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial precursor	0.83	0.31	-0.87	-0.19	-0.51
solute carrier family 25 member 3	0.60	0.38	-0.83	-0.39	-0.55
Isocitrate dehydrogenase, mitochondrial precursor	0.36	-0.02	-0.91	-0.16	-0.32
NADP transhydrogenase, mitochondrial precursor	0.71	0.30	-0.99	-0.30	-0.59
NADP transhydrogenase, mitochondrial precursor	0.66	0.25	-1.03	-0.26	-0.63
Phosphate carrier protein, mitochondrial precursor	0.62	0.25	-1.16	-0.33	-0.57
Cytochrome c oxidase subunit 5B, mitochondrial precursor	0.77	0.53	-1.18	-0.34	-0.61
creatine kinase-3	0.90	0.52	-1.34	-0.60	-0.41
Putative protein M5551 homolog, mitochondrial	0.84	0.29	-1.37	-0.33	-0.75
CDGSH iron sulfur domain-containing protein 1	0.97	0.35	-1.51	-0.29	-0.61
Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1	0.99	0.55	-1.56	-0.28	-0.49
enolase 3-1	0.33	-0.59	-1.78	0.68	1.36
creatine kinase-2	0.25	-0.35	-1.85	0.43	1.52
creatine kinase-1	0.27	-0.48	-1.80	0.31	1.20
Creatine kinase, mitochondrial 1	0.72	0.77	-0.80	-0.05	-0.64
creatine kinase-3	0.90	0.52	-1.34	-0.60	-0.41
sarcomeric mitochondrial creatine kinase	0.94	0.14	-1.32	-0.10	-0.49
creatine kinase-1	0.77	0.13	-1.33	-0.01	-0.28
creatine kinase-3	1.06	0.25	-1.59	-0.20	-0.44
Creatine kinase_muscle	0.96	0.15	-1.83	-0.13	-0.21
creatine kinase-1	1.03	0.22	-1.96	-0.11	-0.16
Superoxide dismutase, mitochondrial precursor	0.14	0.06	-0.68	-0.30	-0.09
thioredoxin interacting protein	0.62	0.33	-0.81	0.22	-0.38
thioredoxin interacting protein	0.66	0.36	-0.95	0.03	-0.30
CDGSH iron sulfur domain-containing protein 1	0.97	0.35	-1.51	-0.29	-0.61
Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor type 2	0.73	0.07	-0.24	-0.36	-0.19

Figur 53b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til mitokondrie og energi metabolisme i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Det var stor effekt av ulikt nivå av omega-3 og sink i fôret på uttrykk av gener involvert i karbohydratmetabolisme (Figur 54 a og b). Totalt 33 ulike gener var differensielt uttrykt. Både Lav omega-3 og Høy Zn ga oppregulering av flere gener involvert i glykolysen slik som *gpi*, *pk*, *pgam2* og

gapdh sammenliknet med de andre gruppene, mens Middels viste nedregulering av de aller fleste genene koblet til karbohydratmetabolismen.

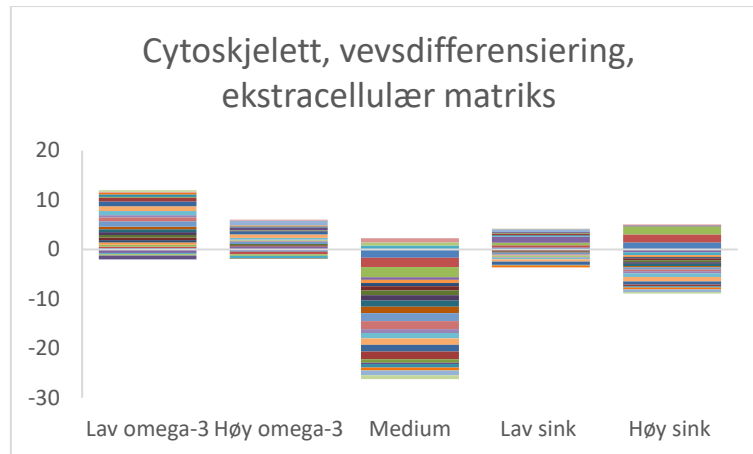


Figur 54a Ekspresjonsmønster av gener relatert til karbohydratmetabolisme i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Karbohydrat metabolisme	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
enolase 3-1	0.33	-0.59	-1.78	0.68	<u>1.36</u>
Glucose-6-phosphate isomerase	0.59	0.06	-2.03	0.22	<u>1.16</u>
6-phosphofructokinase	0.45	-0.31	-1.31	0.33	<u>0.83</u>
pyruvate kinase	0.84	-0.23	-1.99	0.30	<u>1.08</u>
enolase 3-2	0.49	-0.15	-2.11	0.52	<u>1.25</u>
phosphoglycerate mutase 2-1 (muscle)	0.66	0.07	-2.14	0.36	<u>1.04</u>
glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	0.47	-0.23	-1.66	0.11	<u>1.31</u>
Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase	0.54	-0.26	-2.09	0.38	<u>1.43</u>
enolase 3-2	0.37	-0.15	-1.83	0.45	<u>1.15</u>
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	0.16	-0.21	-1.69	0.35	<u>1.39</u>
AF360980_1 glyceraldehyde phosphate dehydrogenase Glyceraldehyde phosph	0.34	-0.22	-2.13	0.43	<u>1.59</u>
aldolase a, fructose-bisphosphate 2	0.58	-0.10	-2.07	0.41	<u>1.18</u>
glycerol-3-phosphate dehydrogenase	0.68	-0.09	-2.00	0.40	<u>1.01</u>
phosphoglycerate mutase 2-1 (muscle)	0.76	-0.10	-2.26	0.40	<u>1.20</u>
6-phosphofructokinase type C	1.09	-0.45	-1.82	0.05	<u>1.14</u>
alpha amylase	-0.61	-0.55	-0.74	-0.44	0.54
Glucosylceramidase precursor	-0.29	-0.27	0.65	0.48	0.31
muscle glycogen phosphorylase	0.30	-0.03	-0.62	0.17	-0.15
phosphoglycerate kinase 1	0.29	0.06	-0.68	0.66	-0.11
muscle glycogen phosphorylase	0.38	0.07	-0.70	0.23	-0.21
Triosephosphate isomerase	0.42	-0.13	-0.71	0.34	-0.34
muscle glycogen phosphorylase	0.39	-0.03	-0.72	0.21	-0.16
Triosephosphate isomerase	0.38	0.09	-0.80	0.46	-0.33
phosphoglucomutase 1	0.39	-0.02	-0.87	0.42	-0.25
phosphoglucomutase 1	0.41	-0.02	-0.96	0.39	-0.25
phosphoglycerate mutase 2-2 (muscle)	0.47	0.06	-1.01	0.34	-0.30
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.25	0.99	-1.21	-0.74	-0.65
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1.30	0.93	-1.24	-0.72	-0.80
Triosephosphate isomerase	0.49	0.04	-1.28	0.57	-0.34
fructose-1,6-bisphosphatase	0.78	0.28	-1.46	0.14	-0.37
muscle glycogen phosphorylase	0.74	-0.02	-1.56	0.37	-0.26
fructose-1,6-bisphosphatase	0.80	0.41	-1.89	-0.06	-0.21
muscle glycogen phosphorylase	0.82	0.14	-2.06	0.28	-0.19

Figur 54b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til karbohydratmetabolisme i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Totalt 26 ulike gener relatert til cytoskjelett, vevsdifferensiering og ekstracellulær matriks var differensielt uttrykt i skinn ved 68 dager etter sjøvannsoverføring som resultat av ulikt nivå av omega-3 og sink i fôret (Figur 55a og b). Sammenliknet med de andre gruppene viste Lav omega-3 oppregulering av gener som *ttn*, *acta*, *vim* og *plin2*, mens Medium viste nedregulering av de fleste av denne typen gener.

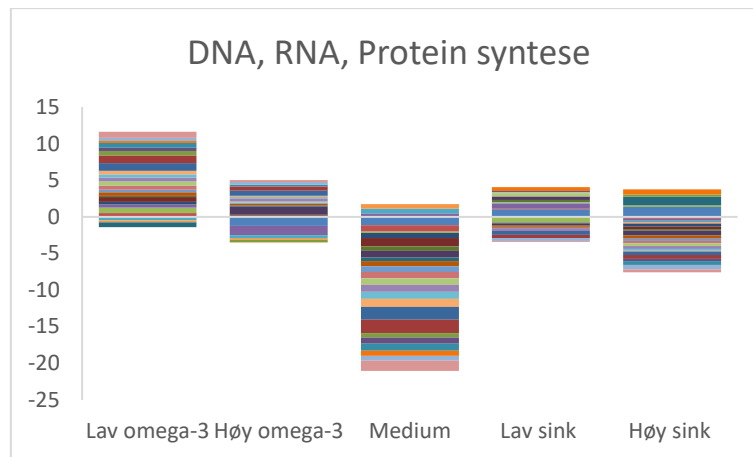


Figur 55a Ekspresjonsmønster av gener relatert til cytoskjelett, vevsdifferensiering og ekstracellulær matriks i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

Cytoskjelett, vevsdifferensiering, ekstracellulær matriks	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
actin	0.29	-0.42	-1.70	0.41	1.41
actin	0.32	-0.53	-1.88	0.43	1.66
brain protein 16	0.38	-0.31	-2.04	0.53	1.44
Phosphatase and actin regulator 3	-0.73	0.65	-0.53	1.21	-0.60
Vimentin	-0.19	-0.45	0.81	0.20	-0.52
cofilin 2	0.43	0.03	-0.61	-0.01	-0.42
Titin	0.50	-0.04	-0.68	-0.10	-0.25
actin	0.49	0.19	-0.82	-0.33	-0.42
Beta-taxilin-like	0.51	0.23	-0.98	-0.14	-0.40
actin	0.60	0.02	-1.13	-0.07	-0.30
enigma LIM domain protein-like	0.61	-0.01	-1.20	0.17	-0.45
Kelch repeat and BTB domain-containing protein 10	0.51	-0.01	-1.29	0.00	-0.28
desmin	1.07	0.48	-1.60	-0.40	-0.46
LIM-domain binding factor 3a	0.80	0.17	-1.67	-0.16	-0.33
SET and MYND domain containing 1b	0.45	0.08	-0.76	-0.12	-0.45
Blood vessel epicardial substance [BVES]	0.81	0.32	-1.09	-0.29	-0.69
Adipophilin	0.97	0.68	-1.30	-0.47	-0.92
Pancreatic progenitor cell differentiation and proliferation factor	1.01	0.65	-1.37	-0.61	-0.62
Notch ligand	0.73	0.08	-1.61	0.22	-0.34
Homeobox protein MOX-1	0.14	0.11	-0.70	0.13	0.09
Sid4	-0.76	0.62	-0.25	0.23	0.17
collagen Type XI Alpha2	0.50	0.16	-0.67	-0.18	-0.22
Filamin A-interacting protein 1-like	0.37	0.19	-0.64	-0.35	-0.40
Sialin	-0.04	1.00	-0.94	0.54	-0.56
Alpha-N-acetylgalactosaminidase	0.16	0.19	0.84	0.06	0.21
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	0.34	-0.05	-0.76	0.02	-0.33

Figur 55b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til cytoskjelett og vevsdifferensiering, ekstracellulær matriks i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulete gener er vist i rødfarger og nedregulete i grønnfarger.

Gener involvert i DNA, RNA og protein syntese, totalt 26 ulike gener, viste også stor effekt av ulike nivåer omega-3 og sink i dietten (Figur 56 a og b). Sammenliknet med de andre gruppene så Lav omega-3 ut til å stimulere uttrykk av gener involvert i syntesen av DNA, RNA og protein, mens Medium hadde tydelig nedregulering av de fleste genene i denne gruppen av gener.

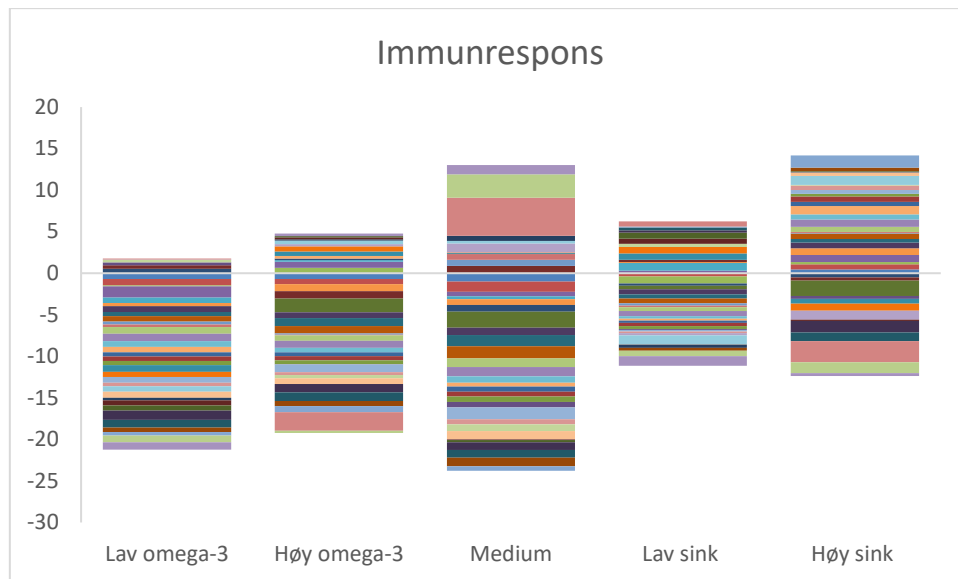


Figur 56a Ekspresjonsmønster av gener relatert til DNA, RNA og proteinsyntese i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

DNA, RNA, Protein syntese	Lav omega-3	Høy omega-3	Medium	Lav sink	Høy sink
ribosomal protein L6	-0.02	-1.25	-1.15	1.06	1.35
ribosomal protein L3-like	0.52	0.06	-0.87	0.09	-0.26
Nucleolar protein 5	0.73	0.01	-0.18	-0.77	0.21
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	0.46	-1.26	0.47	0.61	-0.28
RNA 3-terminal phosphate cyclase-like protein	-0.46	-0.37	0.65	0.16	-0.19
RNA 3-terminal phosphate cyclase-like protein	-0.25	-0.23	0.62	0.08	-0.18
RNA-binding protein 20	0.35	0.09	-0.67	-0.13	-0.40
Poly(A) binding protein_ cytoplasmic 4 (Inducible form)	0.66	0.18	-1.15	-0.26	-0.36
adenosine monophosphate deaminase 1	0.17	0.02	-0.63	0.29	-0.20
Ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 2	0.02	1.07	-0.92	0.50	-0.67
Catechol-O-methyltransferase domain-containing protein 1	-0.69	0.13	-0.48	-0.12	1.17
non-metastatic cells 1 protein	0.46	0.25	-0.69	-0.22	-0.41
GMP reductase	0.35	0.12	-0.79	-0.05	-0.33
Probable C->U-editing enzyme APOBEC-2	0.53	0.02	-0.87	0.02	-0.28
Adenylosuccinate synthetase isozyme 1	0.61	0.14	-0.82	0.42	-0.40
AMP deaminase 3	0.50	0.42	-0.96	-0.39	-0.42
adenylosuccinate synthase like 2	0.48	0.19	-0.97	0.07	-0.25
Adenylate kinase	0.44	0.16	-1.08	0.05	-0.07
Nicotinamide riboside kinase 2	1.09	0.71	-1.77	-0.50	-0.52
Nicotinamide riboside kinase 2	1.04	0.56	-1.80	-0.46	-0.52
Leydig cell tumor 10 kDa protein	0.58	-0.34	-0.63	0.07	0.32
SET and MYND domain containing 1b	0.46	0.04	-0.81	0.11	-0.32
Kelch repeat and BTB domain-containing protein 12	0.66	0.26	-1.00	0.01	-0.50
BCL-6 corepressor	0.26	-0.02	-0.67	0.54	0.70
Remodeling and spacing factor 1	0.43	0.34	-0.69	-0.38	-0.63
Kelch-like protein 13	0.84	0.24	-1.37	-0.15	-0.37

Figur 56b Differensiell ekspresjon av gener (DEG) relatert til DNA, RNA og proteinsyntese i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Signifikant oppregulerte gener er vist i rødfarger og nedregulerte i grønnfarger.

Et stort antall gener knyttet til immunrespons ble påvirket av ulike nivåer av omega-3 og sink i dietten (Figur 57). Lav omega-3 viste i hovedsak nedregulering av denne gruppen gener, mens de andre gruppene viste både opp- og nedregulering, slik at det er vanskelig å trekke en konklusjon basert på funnene.



Figur 57 Ekspresjonsmønster av gener relatert til immunrespons i skinn 68 dager etter overføring til sjøvann. Stolpene viser log2-ekspresjonsratio.

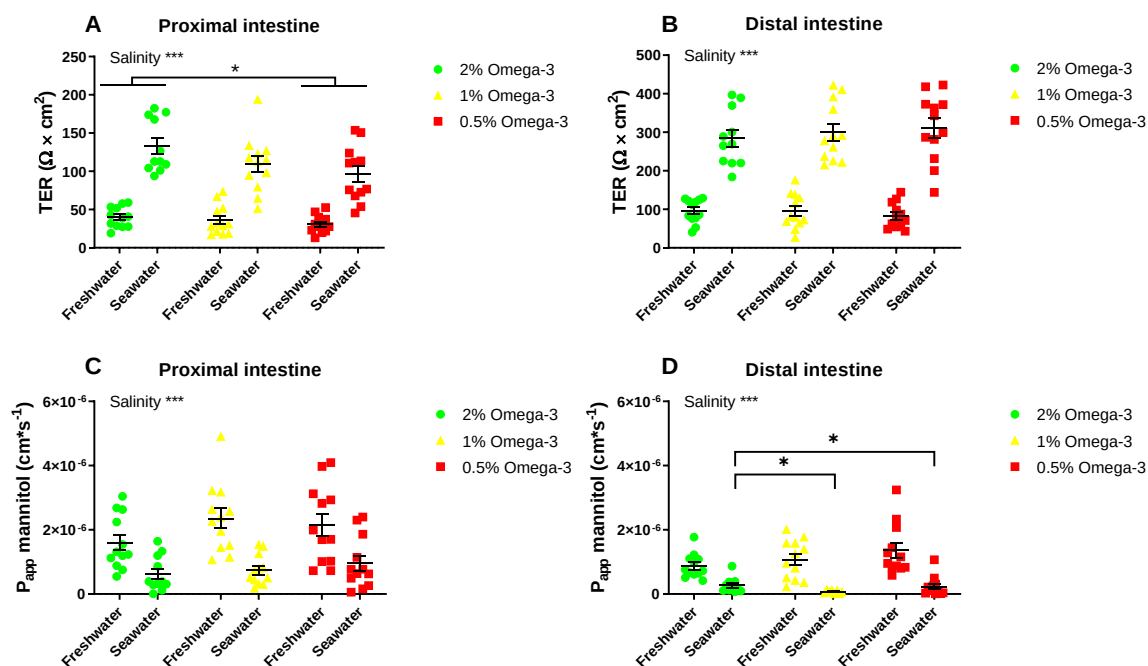
5.4 Funksjonsanalyse av barrierevev i Ussing-kammer

Det ble tatt ut fisk fra de tre diettgruppene Lav omega-3, Middels, og Høy omega-3, ved to tidspunkter, for å undersøke tarmfunksjon ved hjelp av Ussing-kammer. Det første uttaket skjedde mens fisken ennå gikk i ferskvann, like før overføring til sjøvann, for å undersøke hvordan tarmfunksjonen var idet fisken var klar for å flyttes til saltvann. Neste uttak var ved avslutning av forsøket, for å undersøke tarmfunksjon etter at fisken var tilvent saltvann over en relativt lang periode. Tarmvev fra både midttarm og baktarm ble undersøkt for effekter av diett og salinitet, og samspill mellom disse. Det ble også tatt ut prøver av skinn for å gjøre noen tester med skinn i Ussing-kammer.

5.4.1 Tarm

Barrierefunksjon måles som elektrisk motstand over vevet (TER = Transepithelial Resistance). Høy motstand (TER) betyr god barrierefunksjon, mens redusert TER betyr redusert barrierefunksjon. I midttarm var det signifikante effekter på barrierefunksjon av både diett ($p=0,02$) og salinitet ($p<0,0001$), men det var ikke samspill (Figur 58A). TER var signifikant lavere i fisk gitt fôr med Lav omega-3 sammenlignet med Høy omega-3. Det var også en tendens til redusert TER med Middels omega-3 sammenlignet med Høy omega-3. I baktarm (Figur 58B) var det ikke signifikant effekt av diett, men det var signifikant effekt av salinitet ($p<0,0001$). TER var høyere i saltvann enn i ferskvann.

I midttarm var diffusjonsraten, apparent permeabilitet, (Papp) av mannitol ikke påvirket av omega-3-nivå. Papp ble signifikant redusert etter tilvenning til saltvann i både midttarm og baktarm (Figur 58C og 58D).



Figur 58 Barrierefunksjon (TER) i midttarm og baktarm, målt i ferskvann og saltvann, for fisk fra tre diettgrupper (Lav omega-3, Middels og Høy omega-3).

Transportfunksjon kan måles som elektrisk potensial over vevet (TEP = Transepithelial Electrical Potential) (Figur 59). I midttarm var det signifikant effekt av både diett ($p=0,01$) og salinitet ($p=0,002$), og en tendens til samspill mellom faktorene ($p=0,11$). Det ble målt høyere TEP i Høy omega-3-gruppen enn i Middels og Lav omega-3.

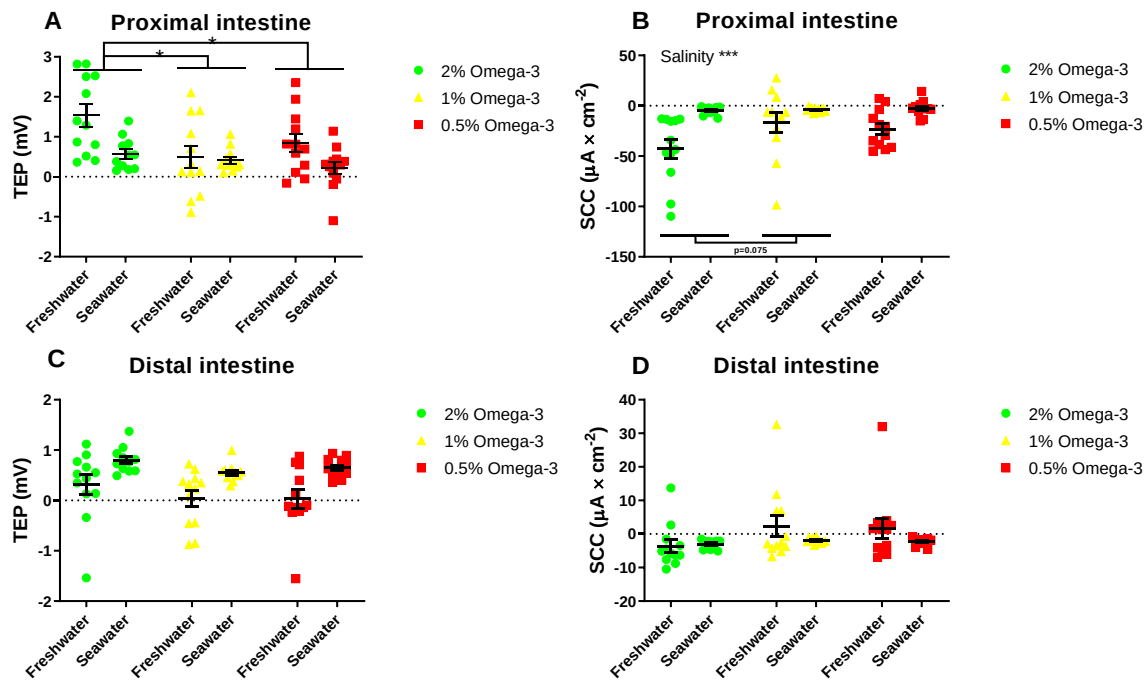
I baktarm var TEP generelt mer positiv i saltvann enn i ferskvann. Videre var det en markert effekt av diett på netto ionefordeling for begge tarmavsnitt. Redusert nivå av omega-3 i fôr så ut til å øke forekomsten av TEP-negativ tarm (Tabell 19).

Tabell 19 Antall tarmprøver som viser serosa positive TEP Verdier i fisk fra ferskvann og saltvann.

	Midttarm			Baktarm		
	Høy omega-3	Middels	Lav Omega-3	Høy omega-3	Middels	Lav Omega-3
Ferskvann	12 av 12	9 av 12	10 av 12	10 av 12	8 av 12	5 av 12
Saltvann	12 av 12	12 av 12	9 av 12	12 av 12	12 av 12	12 av 12

Short-Circuit Current (SCC) sier noe om transport som faktisk utføres. I midttarm var det en tendens til effekt av diett ($p=0,08$), mens det i baktarm ikke var effekt av diett. Tilvenning til saltvann førte til økt SCC (mindre negativ) i midttarm, mens det ikke var noen effekt av salinitet i baktarm

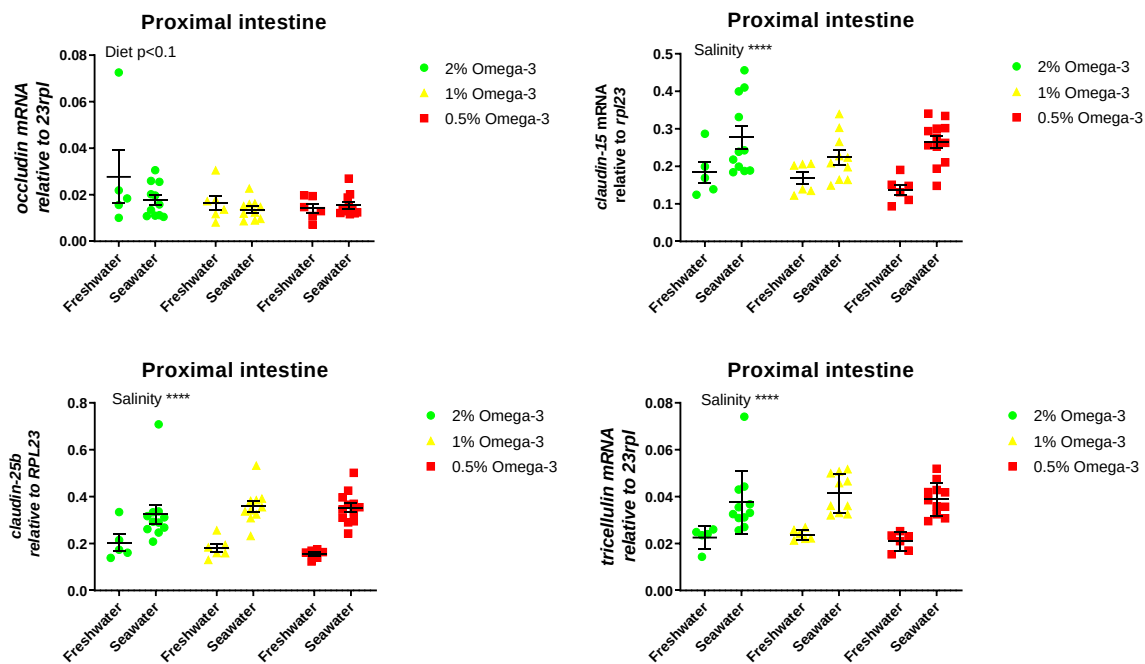
I ferskvann var transport av L-lysin ikke påvirket av diett, men var signifikant høyere i midttarm enn i baktarm.



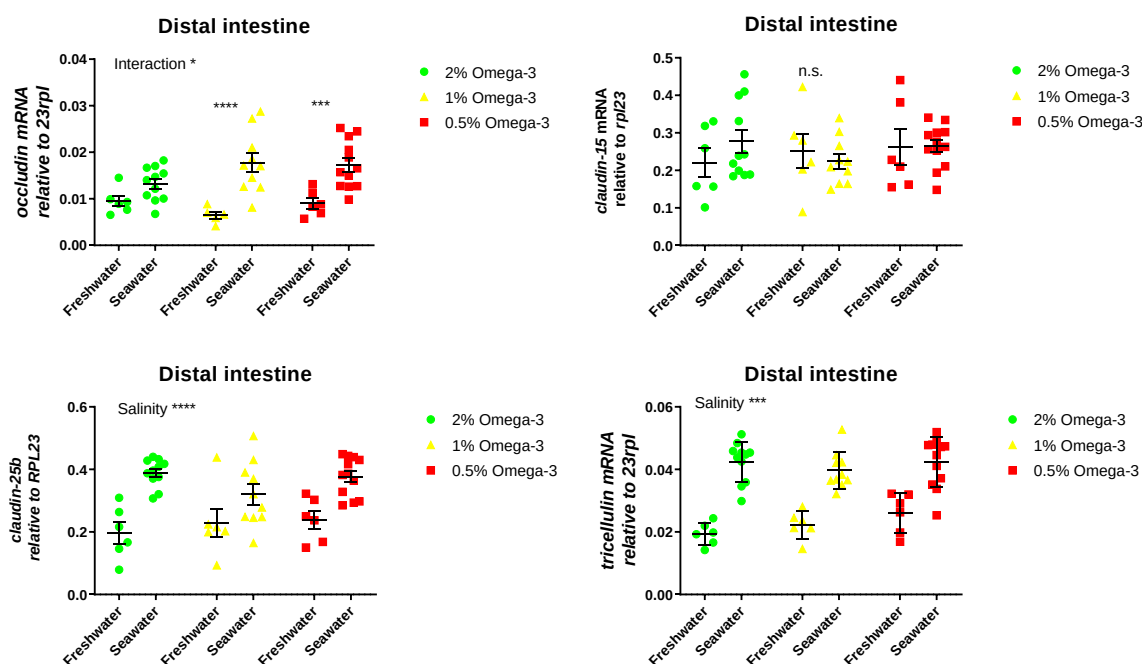
Figur 59 Transportfunksjon (TEP og SCC) i midttarm og baktarm, målt i ferskvann og saltvann, for fisk fra tre diettgrupper (Lav omega-3, Middels og Høy omega-3).

Transkripsjonsnivå av sentrale gener for «Tight junction»-proteiner ble målt i midttarm (Figur 60) og baktarm (Fig 61). Det var en tendens til oppregulering av occludin i Høy omega-3-gruppen i midttarm. De andre «Tight junction»-proteinene, claudin-15 og 25b, og tricellulin, ble signifikant oppregulert etter tilvenning til saltvann.

I baktarm var det en signifikant oppregulering av occludin i Lav- og Middels omega-3-gruppene, men ikke i Høy omega-3. Tricellulin og claudin-25b ble signifikant oppregulert etter tilvenning til saltvann, mens det ikke ble observert noen effekter for claudin-15.

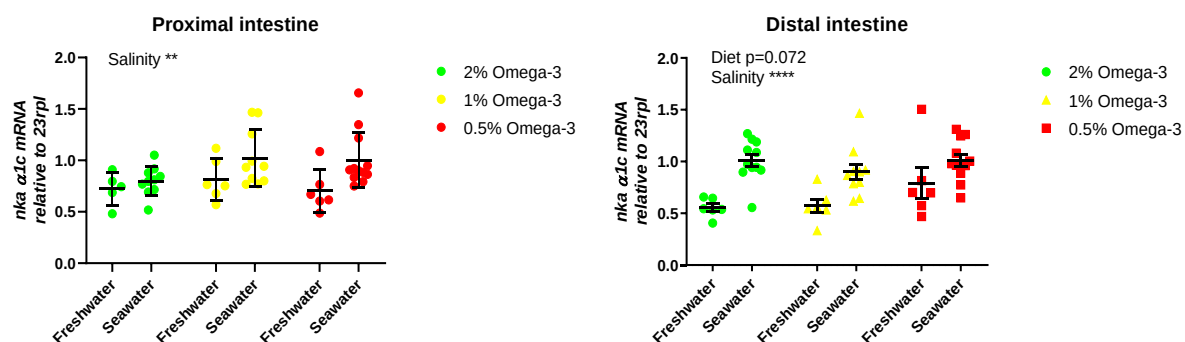


Figur 60 Transkripsjonsnivå for sentrale gener for «Tight junction»-proteiner i midttarm, målt i ferskvann og saltvann, for fisk fra tre diettgrupper (Lav omega-3, Middels og Høy omega-3).



Figur 61 Transkripsjonsnivå for sentrale gener for «Tight junction»-proteiner i baktarm, målt i ferskvann og saltvann, for fisk fra tre diettgrupper (Lav omega-3, Middels og Høy omega-3).

NKA α 1c (Figur 62) ble oppregulert etter tilvenning til sjøvann i både midttarm og baktarm. I baktarm var det en tendens til oppregulering i Lav omega-3-gruppen sammenlignet med Middels omega-3 og Høy omega-3.



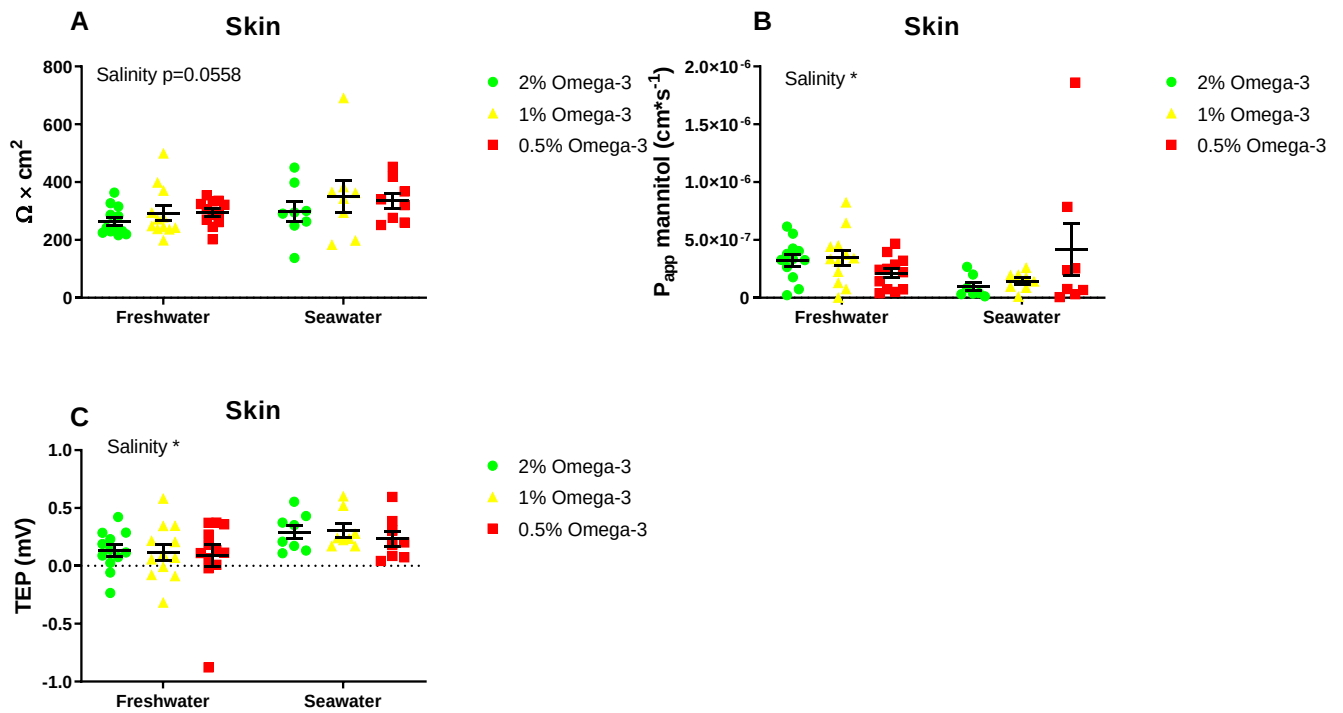
Figur 62 Transkripsjonsnivå for NKA α 1c i midttarm og baktarm, målt i ferskvann og saltvann, for fisk fra tre diettgrupper (Lav omega-3, Middels og Høy omega-3).

Funksjonsanalyse i Ussing-kammer viste en signifikant økning av TER (Transepithelial resistance) i både midttarm og baktarm etter en periode i saltvann, noe som stemmer med tidligere resultater fra lask tilvent saltvann. Denne økningen i TER er en viktig mekanisme for å skape lokalt forhøyet osmolalitet mellom epitelcellene på blodsiden som trekker vann fra lumen til blod, og er dermed avgjørende for at fisken skal kunne erstatte væske som tapes gjennom alle overflater i sjøvann.

Reduksjonen i TER i Lav omega-3 gruppen tyder på at disse fiskene har en forstyrrelse i mekanismen for væskeopptak. På samme måten er reduksjonen i TEP (Transepithelial Electrical Potential), som er et resultat av netto ione-transport, og effekten av «Tight junctions» for å hindre de uttransporterte ionene i å «lekke» tilbake, som vi ser i Lav omega-3-gruppen, klare indikasjoner på forstyrrelse av aktiv ionetransport. Redusert nivå av omega-3 i dietten ga også økt forekomst av total endring i TEP, fra positiv til negativ. Dette indikerer at mekanismer for aktiv transport ble sterkt påvirket i disse fiskene. Forklaring på nedgangen i TER kan være at «Tight Junctions» har fått redusert evne til å opprettholde forskjellen i ionesammensetning mellom tarmlumen og blod. Mekanismen bak nedgangen i TER kan ligge i tendensen til redusert genuttrykk for occludin, et «Tight junction»-protein som er viktig for integriteten av «Tight junctions».

5.4.2 Skinn

I skinn ble det observert en tendens til høyere motstand (TER) i saltvann enn i ferskvann, men det var ikke mulig å se noen effekter av diett, og heller ikke samspill. Diffusjonsrate av ^{14}C -mannitol var lavere etter tilvenning til saltvann, og det var en tendens til effekt av omega-3-nivå. Lav omega-3-gruppen hadde forskjellig respons i saltvann, med høyere diffusjonsrate og større variasjon. Høyere TEP-verdier ble målt i saltvann enn i ferskvann, men ingen effekt av diett (Figur 63).



Figur 63 Barrierefunksjon i skinn, målt i ferskvann og saltvann, for fisk fra tre diettgrupper (Lav omega-3, Middels og Høy omega-3).

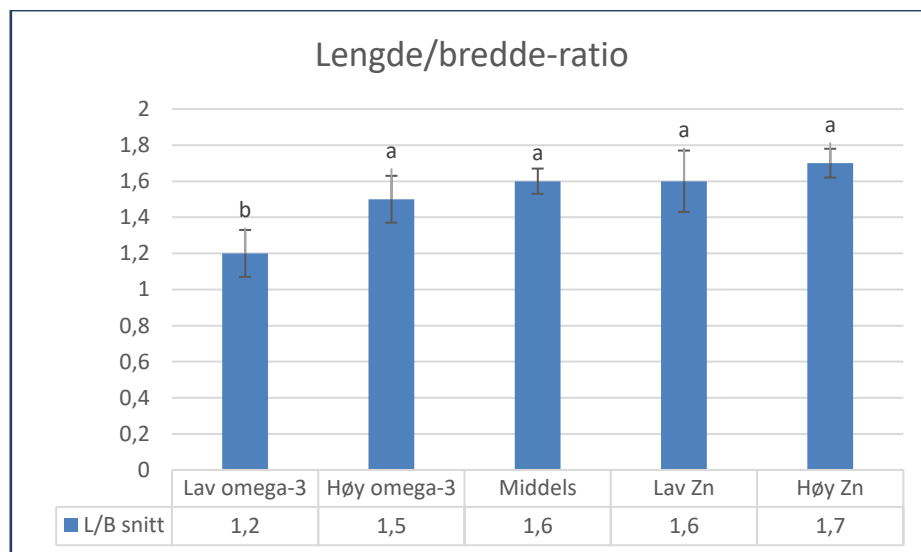
5.5 Sårheling

Fisk fra alle diettgrupper i hovedforsøket ble påført to standardiserte sår (Figur 64) og sårhelingsprosessene ble fulgt over 4 uker. Prøver (N=10), ble tatt en, to og fire uker etter at såret ble påført fisken.



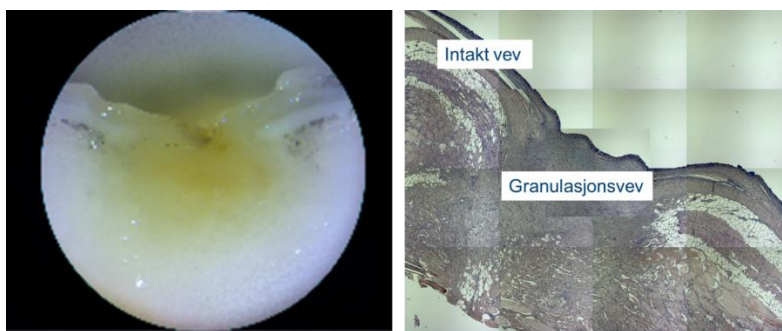
Figur 64 Fisk med sår.

Bildene ble brukt til å måle lengde og bredde på sårene, for å beregne kontraksjonsraten, et mål for hvor raskt sårene trakk seg sammen (Sveen et al., 2018, 2019). Målingene viste at fisk som hadde fått Høy Zn hadde høyest tallverdi for kontraksjonsrate (Figur 65). Fisk fra Lav omega-3 hadde signifikant lavere kontraksjonsrate enn alle de andre diettene.



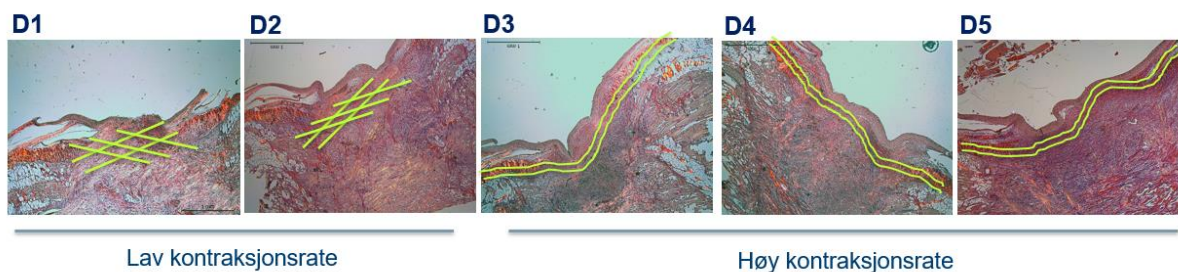
Figur 65 Kontraksjonsrate (lengde/bredde-ratio) i sår fra de ulike diettene.

Begge sårene ble samlet for forskjellige analyser; transkripsjonsanalyser (første sår) og histologiske analyser (andre sår). Prøvene til de histologiske analysene ble evaluert i lupe og støpt inn, snittet og farget for videre evaluering i mikroskop (Figur 66).



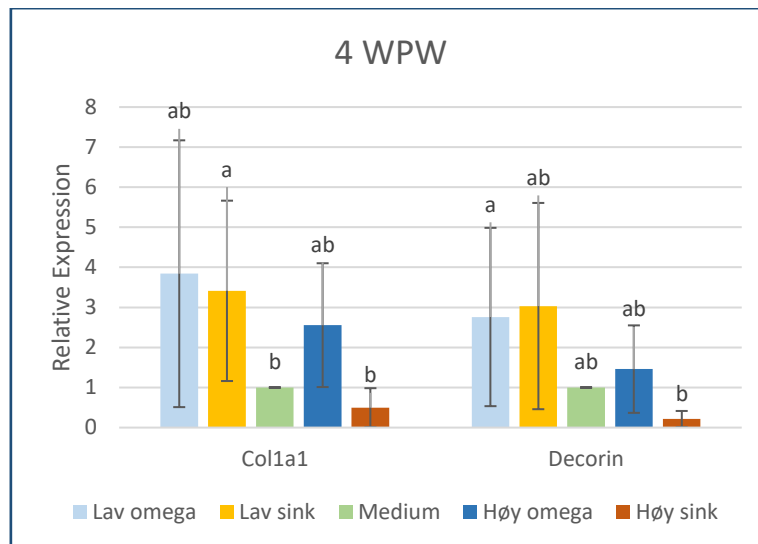
Figur 66 Lupebilde av sår (tv) og AB/PAS farget histologisk snitt (th).

De histologiske analysene av sårene viste at dermis helet ulikt i fisk fra de ulike gruppene. Etter 4 uker hadde prøver av fisk fra Lav omega-3 og Lav Zn fortsatt en uorganisert struktur av kollagenene i granulasjonsvevet, mens dette vevet var mer organisert i fisk fra Høy omega-3 og Høy Zn (Figur 67).



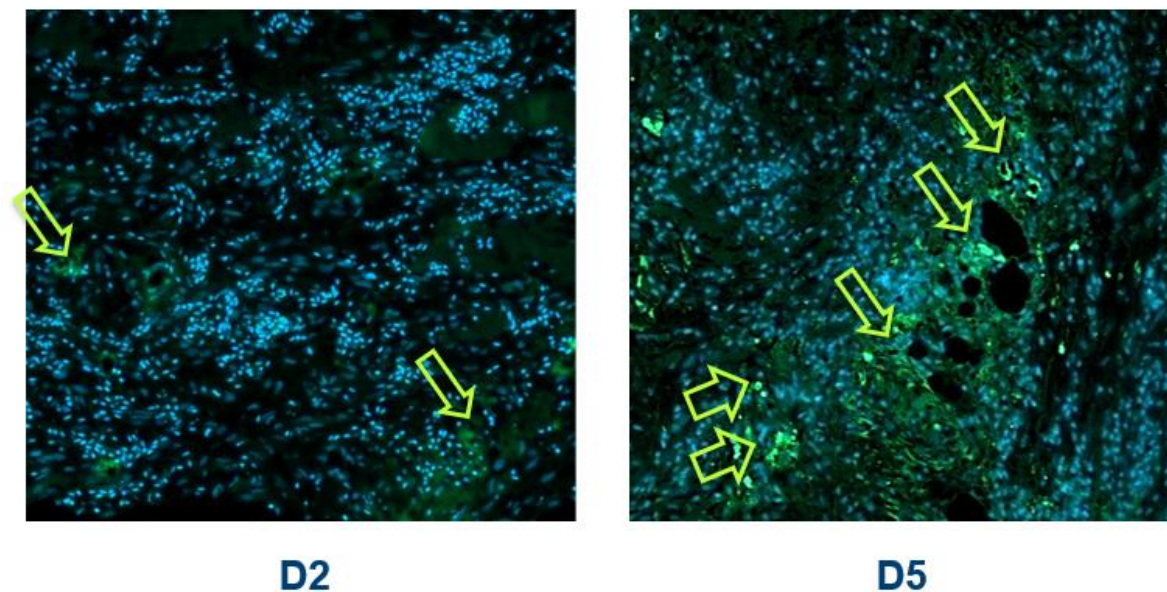
Figur 67 Bilder viser organiseringen av kollagenet i prøver farget med Picro Sirius. Gule streker indikerer strukturen til kollagenfibre i dermis (D1=Lav Omega-3, D2=Lav Zn, D3=Middels, D4=Høy Omega-3, D5=Høy Zn).

Fra analyser av genuttrykk fant vi at collagen1a1 var signifikant oppregulert i Lav Zn sammenlignet med medium gruppen og at decorin var høyt oppregulert i Lav omega-3 gruppen sammenlignet med Høy sink gruppen (Figur 68). I Høy omega-3, Høy Zn og Middels-gruppene var det ingen forskjeller. Det kan tyde på at kollagen og decorin (som er et protein som linker kollagenbuntene) er oppregulert for å kompensere for manglende dannet dermis.



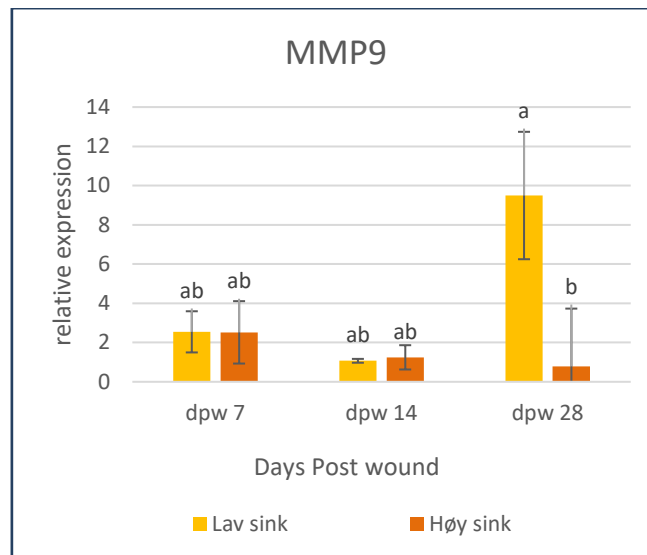
Figur 68 Transkripsjonsanalyse av decorin og collagen 1a1 i sårprøver fra uke 4.

For å evaluere dette nærmere ble snitt av skinnprøver fra fisk gitt diettene med Lav Zn og Høy Zn brukt til å studere aktiviteten til MMP2 og 9, som er to enzymer involvert i opprydding av granulasjonsvev før nydannelse av vev kan initieres. Vi fant at prøver fra fisk som hadde fått mye sink i fôret hadde høyere aktivitet av MMP både i granulasjonsvevet og i sårkantene (Figur 69).



Figur 69 MMP aktivitet i granulasjonsvevet (D2=Lav Zn, D5=Høy Zn). Bildet viser høyere aktivitet av MMP i granulasjonsvev i fisk fra Høy Zn.

Transkripsjonsanalysene viste videre at MMP9 var signifikant oppregulert i Lav Zn-gruppen 4 uker inn i sårhelingen (Figur 70). Dette kan tyde på at lave sinknivåer kan redusere sårhelingen. At MMP9 er så høyt oppregulert i Lav Zn-gruppen kan være en kompensatorisk respons på at sårhelingen henger etter, og kan også forklare hvorfor denne gruppen hadde mindre organiserte kollagenstrukturer sammenlignet med Høy Zn.

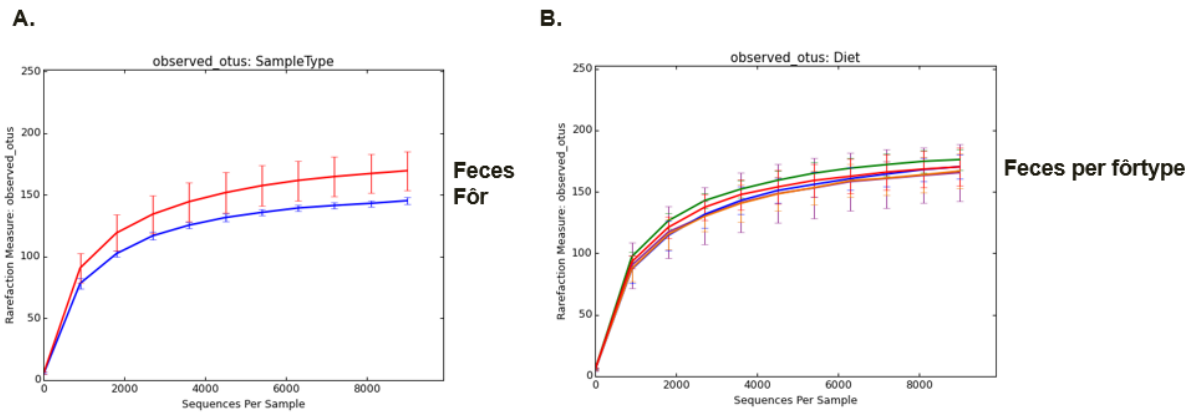


Figur 70 Transkripsjonsanalyse av MMP9 i sårprøver (Lav Zn og Høy Zn) på ulike tidspunkter.

5.6 Mikrobiota

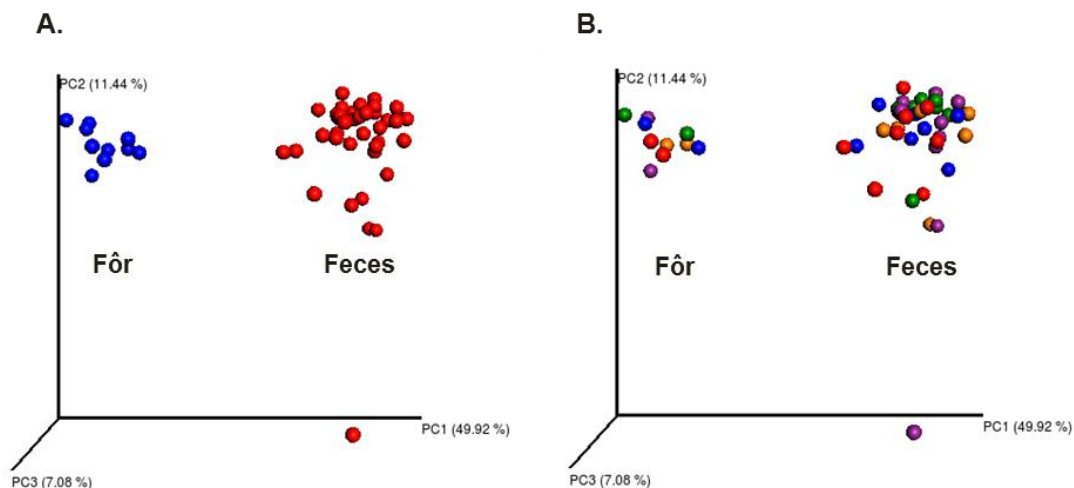
Mikrobiota-analysene ble primært utført på prøver fra baktarm (faeces), men prøver fra de ulike fôrtypene benyttet i hovedforsøket ble også inkludert. Det er ikke vanlig praksis å inkludere analyser av mikrobiota i selve fôret når man utfører fôringsforsøk, og vi vet ikke om noen slike publiserte studier på fisk. Grunnen til at vi ønsket å inkludere fôrprøvene var for å kontrollere at de var negative, da en annen intern upublisert studie har vist bakterielle funn med dybdesekvensering av bakterielt DNA i fôr. Isoleringen av bakterielt DNA fra fôrprøvene i hovedforsøket var ikke negative, de viste derimot et meget høyt DNA-innhold, som videre ble bekreftet som bakterielt med PCR-amplifisering av det bakterielle 16S rRNA- genet. Ved videre fremstilling av resultatene fra mikrobiota-analysene er dermed også fôrprøvene inkludert. Detaljert sekvenseringsinformasjon og dataprosessering av mikrobiota data er inkludert i metodekapittelet (4.7 og 4.9.5.)

Alfa-diversitet (mangfold) innen prøver er her beregnet i form av antall unike OTU'er (taksonomiske enheter) når man randomiserer opp til 8000 sekvenser per prøve (Figur 71). Analysen viser at det er nesten like høy bakteriell diversitet i fôrprøvene som i faecesprøvene (Figur 71A). Høyst og størst variasjon i diversitet kan man observere mellom faecesprøvene, mens det er minimale forskjeller mellom de ulike fôrtypene. Analyse av kun faecesprøver viser at fôrtype har ingen signifikant effekt på variasjonen i alfa-diversitet (Figur 71B).



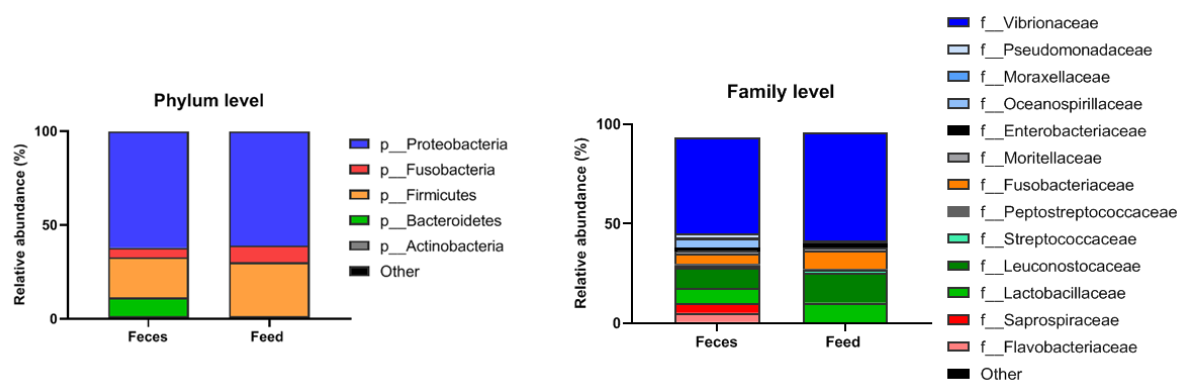
Figur 71 Alfa-diversitet (rarefaction-kurve) med gjennomsnitt av antall unike OTU'er innen A) fæces (rød) og fôrprøvene (blå) og innen B) fæcesprøver i fisk fôret med ulikt fôr (ulike farger).

Beta-diversitet mellom prøver er illustrert i Figur 72, hvor PCA-plottene viser langs PC1 at mikrobiotasammensetningen er signifikant forskjellig mellom fæcesprøver og fôrprøver (Figur 59A). Derimot viser figuren ingen fôreffekt på fæcesprøvene, når prøvene er farget etter hvilken fôrtype fisken har fått (Figur 59B). Likeså er det ingen klar variasjon i mikrobiotasammensetning mellom de ulike fôrprøvene.



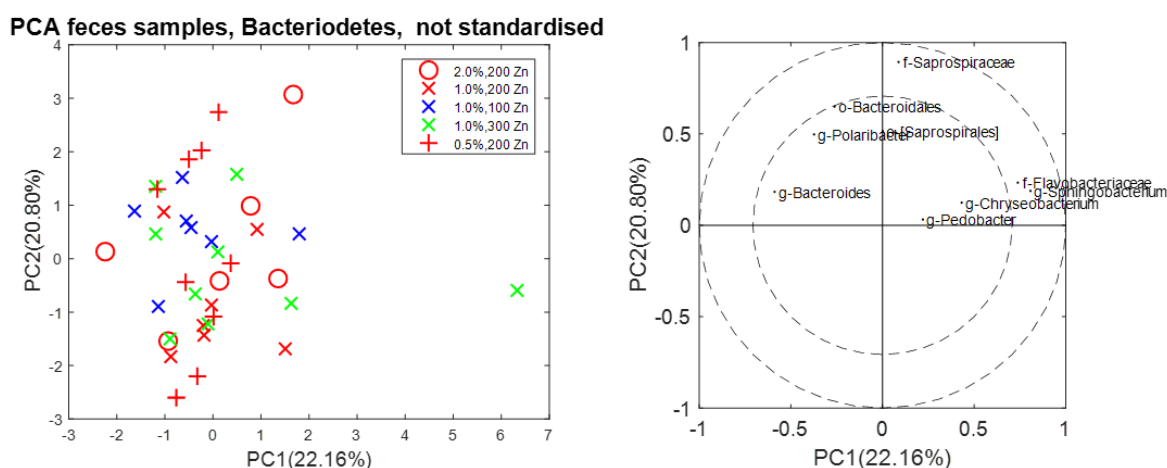
Figur 72 PCA-plott over beta-diversitet (uvektet) mellom fæces og fôrprøver. A) Prøver fargelagt i forhold til prøvetype (fæces vs fôr), B) prøver fargelagt mhp fôrtype.

Taksonomisk bestemmelse av mikrobiota i fæces og fôrprøver viser høy andel av like bakterier mellom de to prøvetypene på både phylum (Figur 73A) og familie-nivå (Figur 73B). Felles er dominans av Proteobacteria og Firmicutes, og tilhørende familier Vibrionaceae og melkesyrebakteriene Leuconostocaceae og Lactobacillaceae. Fusobacteria er også tilstede i begge prøvetypene. Derimot er deteksjon av Bacteroidetes og de tilhørende familiene Saprospiraceae og Flavobacteriaceae spesifikt for fæcesprøvene.



Figur 73 Taksonomisk oversikt over dominerende phyla (A) og familier (B) i fæces vs fôrprøver. Gjennomsnittlig relative mengde (%) per gruppe er inkludert.

Videre analyser på kun Bacteroidetes ble derfor utført for å undersøke om fôrtype hadde en effekt på sammensetningen av de tarmspesifikke bakteriene (kun fæcesprøver). Dette ble utført med ulike multivariate metoder (50:50 MANOVA, ASCA) og med ulike kriterier for filtrering og standardisering, uten å vise signifikant fôreffekt på ulike bakterier innen Bacteroidetes (Figur 74).

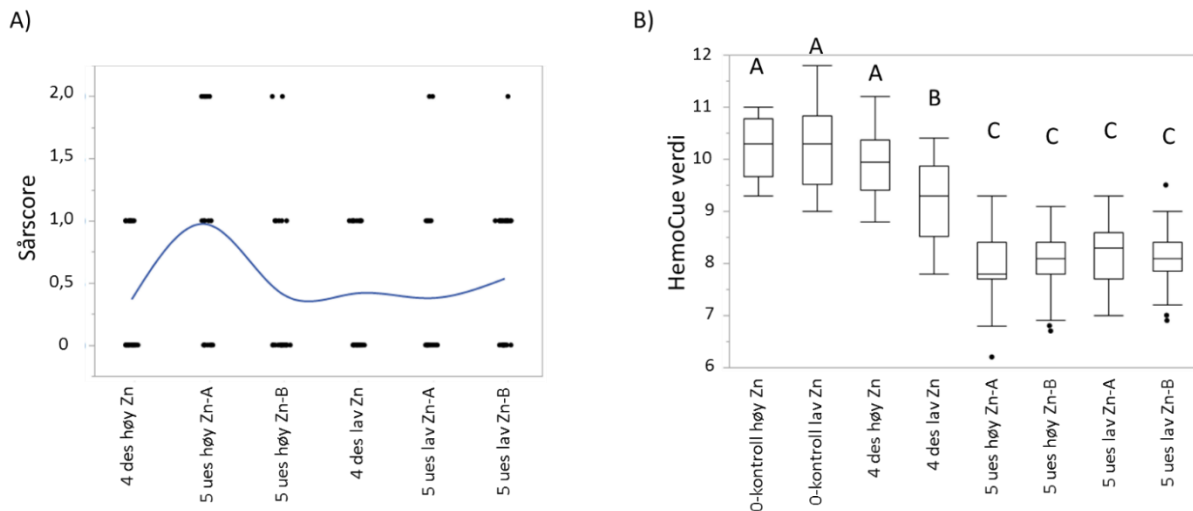


Figur 74 PCA-scoringplott over fæcesprøver per fôrtype (A) og ladningsplott med korresponderende bakterier innen Bacteroidetes.

5.7 Smittetest

Det var ønskelig å oppnå rundt 60% dødelighet, men bare to fisk døde av *M. viscosa*. Smittetesten fungerte derfor ikke etter hensikt. Det var imidlertid sårutvikling i gruppene og bakterien ble reisolert fra fisk ved avslutning av forsøket. Startvekten før smitte var 343,8 g for Høy Zn og 331,2 g for Lav Zn-gruppene. Ved terminering hadde Høy Zn-gruppen en vekt (gjennomsnitt $\pm$ standardavvik) på 403,4 $\pm$ 61 g og kondisjonsfaktor 1,15 $\pm$ 0,08. Lav Zn-gruppen hadde en gjennomsnittsvekt på 389,6 $\pm$ 82 g og kondisjonsfaktor 1,14 $\pm$ 0,08. Det ble ikke funnet forskjeller på vekt eller kondisjonsfaktor mellom gruppene og appetitten ble beskrevet som moderat til god i en skala fra; ingen appetitt / dårlig / moderat / god / veldig god. Kontrollgruppene for begge dietter var fri for sår før smitte. I Figur 75A vises det en økning av sårscoren 4 dager etter smitte. Milde lesjoner, men også alvorlige lesjoner ble

observert ved terminering. Fisk fra ett kar hadde tendens til høyere andel av alvorlige lesjoner ved terminering. Dette er samme gruppe der det også ble isolert *M. viscosa* fra hodenyre. *M. viscosa* er en hemolytisk bakterie. Ved parvis sammenligning av hemoglobinnivå (Figur 75B) i fisken, fant vi forskjeller mellom gruppene (post hoc Tukeys HSD). Redusert nivå av hemoglobin ble funnet i Lav Zn-gruppen etter 4 dager, og et ytterligere redusert nivå ble funnet for begge dietter ved terminering. Vi vet ikke om dette kan relateres til infeksjonsstatus eller andre driftsparametere. Selv om smitteforsøket ikke fungerte etter hensikt og derfor ikke kan skille mellom testgruppene, har det oppstått infeksjon hos enkelte individer med lav dødelighet og med et mindre akutt forløp i sårutvikling.



Figur 75 Scoring av sår (A) og hematokritverdier (B, des= dager etter smitte, ues=uker etter smitte).

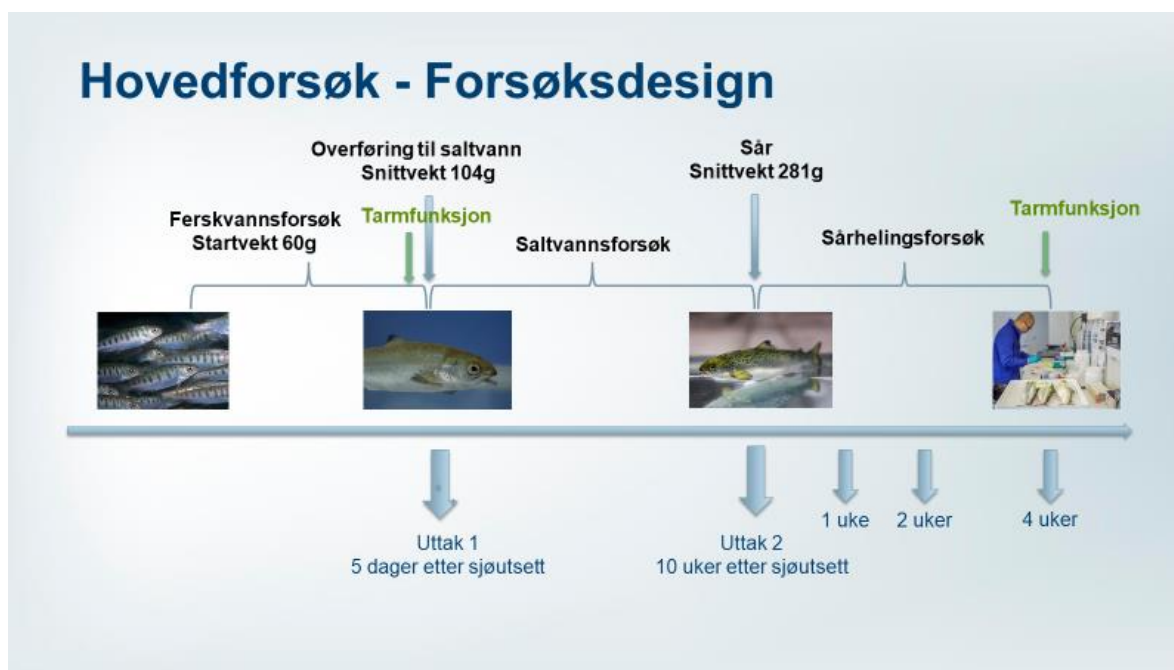
5.8 Oppsummering av resultater fra prosjektet

Zn- og omega-3-nivå i laks fra kommersielle anlegg

Analyse av barrierevevene skinn, tarm og gjeller fra laks i kommersielle anlegg viste en trend til lavere innhold av EPA, spesielt i gjeller, og høyere nivå av Zn i helkropp, fra laks i RAS-anlegg sammenlignet med fisk fra FT-anlegg. Det vil være interessant å undersøke om ulike driftsformer påvirker laksens behov for EPA og Zn. Dette vil være av betydning for utvikling av fôr tilpasset laksens behov i RAS.

Forsøksdesign

Figur 76 gir en oversikt over forsøksdesignet for hovedforsøket som ble gjennomført i RAS. Dette forsøket gir ikke grunnlag for å sammenligne mellom ulike driftsformer. Barrierevevene blir kraftig utfordret ved overføring fra ferskvann til saltvann, og i dette forsøket ble eventuelle føreffeater på sammensetning og funksjon av barrierevev studert både ved overføring og etter lengre tid i saltvann. Sårhelingsforsøket ble gjennomført fra 68 dager etter overføring til saltvann og fulgt i 4 uker. Funksjonsstudier i tarm ble utført like før overføring, og etter 96 dager i saltvann.



Figur 76 Oversikt over fisk, forsøksfaser og prøveuttak fra hovedforsøket i prosjektet.

Vekst og helkroppssammensetning:

I ferskvannsprioden viste forsøksfisken tendens til økende lengdevekst med økende nivå av omega-3 i fôret, og i saltvannsfasen var det høyere tilvekst (vekt) i gruppen fôret det høyeste nivået av omega-3 i fôret. Det var ingen effekt av Zn-nivå i fôret på tilvekst.

Våre data viste at omega-3-nivået i fôret påvirket innholdet av Zn i helkropp til fisken. Lavt omega-3-nivå i fôr førte til redusert innhold av Zn i helkropp både ved overføring til saltvann og ved avslutning av forsøket, noe som tyder på at det er nødvendig med et visst nivå av omega-3 i fôret for at laksen effektivt skal kunne ta opp og utnytte Zn fra fôret. Zn-nivået i i fôret påvirket også Zn-nivå i helkropp.

Laveste nivå av Zn førte til en tydelig reduksjon av Zn-nivået i helkropp over tid. Dette indikerer at 125 mg Zn /kg fôr, som var analysert mengde i dette fôret, fører til Zn-mangel i fisken over tid.

Skinn

Skinn ble påvirket av de ulike diettene, noe som kom ekstra tydelig frem like etter overføring til saltvann. Lave nivåer av begge næringsstoffer førte til dårligere skinnkvalitet, der den ytterste barrieren, epidermis, ble mer påvirket av saltvannseksposeringen sammenlignet med skinn fra fisk som hadde fått høyere doser av disse komponentene i fôret. Vi observerte også en langtidseffekt av Zn i fôr i form av økt slitasjeskade på finner fra fisk fôret med lave doser Zn sammenlignet med de som hadde fått høyere doser Zn. Innholdet av Zn i skinnet ble påvirket av Zn-nivået i fôret, men ikke av omega-3-nivået. Innholdet av Zn i fôret påvirket imidlertid fosfolipidfordelingen i skinnet, med økning i fosfatidylcholine og fosfatidyletanolamine og reduksjon i fosfatidylserine og med økende innhold av Zn i fôr. Fosfatidylcholine og fosfatidyletanolamine er nøkkelkomponenter i cellemembraner, og sannsynligvis essensielle for å opprettholde en god barrierefunksjon. Fettsyreprofil i fosfolipidene er påvirket av omega-3-nivå i fôr, og når EPA+DHA i fôr reduseres, går innholdet av disse fettsyrene ned, mens innholdet av pro-inflammatoriske n-6-fettsyrer øker. Omega-3 og Zn ser fra våre resultater ut til å kunne påvirke ulike deler av skinnet, der omega-3 virker dypere i skinnet gjennom å styrke dermis og fettlaget, mens Zn virker mer mot overflaten og gir tykkere epidermis og flere mukusceller. Ved avslutning av forsøket var flere gener i skinnet relatert til mitokondrier og energimetabolisme, cytoskjelett, vevs differensiering og ekstracellulær matriks påvirket av Zn- og omega-3-nivåene i fôret. De fleste genene var oppregulert ved lave doser omega-3 og nedregulert ved høye Zn-doser, men gener relatert til karbohydratmetabolisme var oppregulert med både lave doser omega-3 og høye doser Zn. Gener for immunrespons ble i hovedsak nedregulert i fisk fôret med Lav omega-3 sammenlignet med prøver fra fisk som hadde fått høye doser Zn. Disse resultatene styrker teorien fra de histologiske funnene med at disse fôrkomponentene har forskjellige virkemekanismer i skinn. I sårhelingsforsøket var det tydelig at lave doser omega-3 ga dårligere evne til sårkontraksjon enn de andre diettene, og at høye doser Zn så ut til å gi høyest kontraksjonsrate. Både lave mengder omega-3 og Zn i fôret førte til mer uorganisert struktur av kollagen i sårhelingsprosessen, noe som ble støttet av transkripsjonsanalysene.

Tarm

Økende Zn nivå i fôret ga økende innhold av Zn i tarmvev. Det var videre en sterk tendens til høyere nivå av Zn i tarmvevet til laks fôret med høyeste nivå av omega-3 i fôret, noe som kan indikere bedret absorpsjon av Zn i denne gruppen. Zn-nivået i fôr påvirket både total mengde fosfolipider i tarmvev, og fordelingen. Økt nivå Zn i fôr førte til økning av PC og PE, og total mengde fosfolipid. Ratio PE/(PS+PI) var tydelig forhøyet i tarm fra fisk fôret med Høy Zn. Fettsyreprofil i fosfolipidene er påvirket av omega-3-nivå i fôr, på samme måte som i skinn. EPA/ARA-ratio i alle fosfolipidklassene er påvirket i tarm, også PS+PI, der det ikke er store endringer i de andre barrierevevene.

Funksjonsanalyse av tarm, ved bruk av Ussing-kammer, viste at det laveste nivået av omega-3 i fôr førte til dårligere barrierefunksjon med forstyrrelser i væskeopptak og osmoregulering. Dette kan knyttes til redusert genuttrykk for occludin, et protein som er viktig for integriteten av «Tight junctions». Funksjonsanalysen viste også redusert aktiv ionetransport ved redusert nivå av omega-3 i fôr. Dette støttes også av observasjonen av mer Zn i tarmvev med Høy omega-3, tolket som bedre opptak av Zn med Høy omega-3, noe som også kan være et resultat av fosfolipididsammensetningen i

cellemembranene. Undersøkelser av mikrobiota fra tarm viste ingen effekt av diett på de tarmspesifikke bakteriefamiliene.

Histologiske undersøkelser av midttarmen viste ingen signifikante effekter mellom diettgrupper i grad av vakuolisering, men det ble observert stor individuell variasjon i vakuolisering innen hver diettgruppe og med en tendens til høyere gjennomsnittsverdier i laks fôret med høyere nivåer av omega-3 i fôret. Dette kan indikere enten høyere opptak av fett i tarmen i denne gruppen og/eller videre redusert transport av fett fra tarmen til andre vev og organer. Det ble derimot ikke påvist signifikante forskjeller i fettnivået i tarmvevet, og kan ikke forklare på hva som forårsaker store individuelle forskjeller i vakuolisering. Til tross for at det finnes store forskjeller innad i gruppene, er det tendenser til morfologisk forskjellig signatur på uttrykket av CD3 innen de ulike diettgruppene, noe som kan indikere at det er en immunologisk funksjonsendring i tarmvevet. Høyt nivå av sink og lavt DHA+EPA i fôret ser ut til å øke T-celle-antall.

Transkripsjonsanalyse av tarm kort og lang tid etter overføring til sjøvann viste stor forskjell i ekspresjonsmønsteret. Ved 5 dager, skilte gruppen fôret med laveste nivået av Zn seg ut fra de andre gruppene ved oppregulering av en rekke gener involvert i både immunrespons, metabolisme, vevdifferensiering, signalering og ionetransport, noe som tydet på høy dynamikk i tarmen.

Lengre tid etter sjøvannsoverføring var mange gener relatert til lipid- og energimetabolisme nedregulert i fisk fôret med Lav Zn og i større grad oppregulert i fisk gitt Høy Zn. Et stort antall gener var også påvirket av omega-3-nivå i fôr. Gener relatert til cytoskjelett, vevsdifferensiering og ekstracellulær matriks var i stor grad nedregulert i fisk fôret med Lav omega-3 og oppregulert i fisk fôret med Høy omega-3. Genuttrykk for Zn-transportør viste tydelig dose-respons med nedregulering med økende Zn-nivå i fôr. Dette kan tolkes til oppregulering som en kompensasjon ved lite Zn i fôret, og nedregulering når tilgangen på Zn øker.

Gjeller

Det er ingen gode funksjonsanalyser for gjeller, men transkripsjonsanalyser tyder på at det er effekter av både Zn og omega-3, og at det er forskjeller mellom kort og lengre tid etter overføring til saltvann. Endringer i uttrykk av gener for myofiber, cytoskjelett, ekstracellulær matriks, og vevsdifferensiering tyder på reorganisering av gjellevevet etter overføring til sjøvann. 5 dager etter overføring til sjøvann viste fisk fra Lav Zn-gruppen høyt uttrykk av gener i flere ulike prosesser som blant annet lipidmetabolisme og immunrespons sammenliknet med de andre gruppene, mens gruppene var mer like ved 68 dager. Dette genuttrykksmønsteret i gjeller likner tarm rett etter sjøvannsoverføring.

Zn-nivå i fôr påvirket både Zn-nivået i gjeller, og fordeling og sammensetning av fosfolipider i gjellevev. Fettsyreprofil i fosfolipidene ble påvirket av omega-3-nivå i fôr, på samme måte som i skinn og tarm med redusert EPA/ARA-ratio med redusert nivå av omega-3 i fôret.

Samspill mellom omega-3 og Zn

Basert på alle observasjoner ser vi et mønster som tyder på et viktig samspill mellom omega-3 (EPA+DHA) og Zn. For alle tre barrierevev ser vi at nivå av Zn i fôr har en tydelig effekt på fettmetabolisme, og effekten på fordeling av fosfolipidklasser er sannsynligvis essensielt for barrierefunksjon i vevene. Nivå av omega-3 i fôr ser ut til å ha en effekt på utnyttelsen av Zn, slik at de to næringsstoffene er gjensidig påvirket av hverandre. Det er likevel et åpent spørsmål om samspill mellom Zn og omega-3 i barrierevev også er knyttet til andre faktorer.

6 Hovedfunn

- Det er samspill mellom omega-3 og Zn økt nivå av Zn i fôr endrer sammensetningen av fosfolipidklasser i cellemembranene i alle barrierevev, og redusert nivå av omega-3 i fôr gir redusert nivå av Zn i helkropp. Det er nødvendig med nok omega-3 for å utnytte Zn i fôr.
- Omega-3 og Zn styrker skinnet på ulike måter, omega-3 styrker de indre lagene mens Zn virker mer på det ytterste laget, og begge bidrar til å styrke sårhelingsveien.
- Reduksjon i omega-3 i fôr gir redusert barrierefunksjon i tarm i form av forstyrrelser i væskeopptak og osmoregulering (TER) og i aktiv ionetransport (TEP).
- Mikrobiota påvist i baktarm overlappet i stor grad med mikrobiota påvist i de ulike fôrtypene. Tarmspesifikke mikrober ble påvist, men de ble ikke påvirket av de ulike diettene.
- Endringer i genuttrykk tyder på omfattende reorganisering av tarm- og gjellevev etter overføring til sjøvann.

7 Referanser

- Aunsmo, A., Bruheim, T., Sandberg, M., Skjerve, E., Romstad, S., Larssen, R.B., 2008. Methods for investigating patterns of mortality and quantifying cause-specific mortality in sea-armed Atlantic salmon *Salmo salar*. *Dis Aquat org*, 81: 99-107.
- Bell, JG, Sargent, JR, Raynard, RS (1992). Effects of increasing dietary linoleic acid on phospholipid fatty acid composition and eicosanoid production in leucocytes and gill cells of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Prostagland. Leucotrien. and Essential Fatty Acids* 45, 197-206.
- Bou, M., Berge, G.M., Bæverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T.-K., Romarheim, O.H., Hatlen, B., Leeuwis, R., Venegas, C., Ruyter, B., 2017. Requirements of n-3 very long-chain PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L): effects of different dietary levels of EPA and DHA on fish performance and tissue composition and integrity. *British Journal of Nutrition* doi:10.1017/S0007114516004396.
- Bou, M., Berge, G.M., Bæverfjord, G., Sigholt, T., Østbye, T.-K., Ruyter, B., 2017. Low levels of very-long-chain n-3 PUFA in Atlantic salmon (*Salmo salar*) diet reduce fish robustness under challenging conditions in sea cages. *Journal of nutritional science*, Vol.6, e32. <https://doi.org/10.1017/jns.2017.28>.
- Brugger D, Windisch WM. Subclinical zinc deficiency impairs pancreatic digestive enzyme activity and digestive capacity of weaned piglets. *Br J Nutr.* 2016 Aug;116(3):425-33. doi: 10.1017/S0007114516002105. Epub 2016 May 27.
- Bullock, A.M., Marks R., Roberts, R.J., 1978. Cell kinetics of teleost fish epidermis epidermal-mitotic activity in relation to wound healing at varying temperature in plaice (*Pleuronectes platessa*). *J. Zoology* 185, 197-204.
- Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, Owens SM, Betley J, Fraser L, Bauer M et al: Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* 2012, 6(8):1621-1624.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI et al: QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010, 7(5):335-336.
- Carman, G.M., 2006 Regulation of phospholipid synthesis by zinc | The FASEB Journal <https://www.fasebj.org/doi/abs/10.1096/fasebj.20.4.A33-b>.
- Cornatzer WE1, Haning JA, Wallwork JC, Sandstead HH. Effect of zinc deficiency on the biosynthesis of phosphatidylcholine in rat microsomes. *Biol Trace Elem Res.* 1984 Oct;6(5):393-401. doi: 10.1007/BF02989256.
- Damitha De Mel and Cenk Suphioglu. Fishy Business: Effect of Omega-3 Fatty Acids on Zinc Transporters and Free Zinc Availability in Human Neuronal Cells. *Nutrients* **2014**, 6, 3245-3258; doi:10.3390/nu6083245.
- Folch, A.C., Leeds, M., Sloane-Stanley, G.M., 1957. A simple method for isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Biol. Chem.* 226, 497-509.
- Jensen LB, Wahli T, McGurk C, Eriksen TB, Obach A, Waagbø R, Handler A, Tafalla C., 2015. Effect of temperature and diet on wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem* 41, 1527-1543, doi:10.1007/s10695-015-0105-2.
- Johansson Lill-Heidi, Timmerhaus, G., Afanasyev, S., Jørgensen S.M., Krasnov, A., 2016. Smoltification and seawater transfer of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) is associated with systemic repression of the immune transcriptome. *Fish and Shellfish immunology* 58, 33-41. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2016.09.026>.

- Kambe, T.; Yamaguchi-Iwai, Y.; Sasaki, R.; Nagao, M. Overview of mammalian zinc transporters. *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, 61, 49–68.
- Krebs, N.F. Overview of zinc absorption and excretion in the human gastrointestinal tract. *J. Nutr.* 2000, 130, 1374S–1377S.
- Langsrud, Ø., 2002. “50–50 multivariate analysis of variance for collinear responses,” *J. R. Stat. Soc. Ser. D*, vol. 51, no. 3, pp. 305–317.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta CT$ method. *methods* 25, 402–408 (2001).
- Mason, M.E., Waller, G.R., 1964. Dimethoxypropane induces trans-esterification of fats and oils in preparation of methylesters for gas chromatographic analysis. *Anal. Chem.* 36, 583.
- Noble, C., Nilsson, J., Stien, L.H., Iversen, M.H., Kolarevic, J., Gismervik, K., 2018. Velferdsindikatorer for oppdrettslaks: Hvordan vurdere og dokumentere fiskevelferd. FHF-rapport, 312 pp. ISBN 978-82-8296-552-1.
- Nonnotte, G., Aubreepelletier, A., Colin, D.A., 1987. Na⁺ transport in perfused intestine and in isolated enterocytes of fresh-water trout deprived of essential fatty acids. *Comp Biochem Physiol A.* 88(3), 431–436.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45–e45.
- Reed S., Qin X., Ran-Ressler R, Brenna JT, Glahn RP, Tako E. (2014). Dietary Zinc Deficiency affects blood linoleic acid: dihomo- γ -linolenic acid (LA:DGLA) ratio; a sensitive physiological marker of zinc status in vivo (*Gallus gallus*). *Nutrients*. 6(3): 1164–80.
- Reed S, Neuman H., Moscovich S., Glahn RP, Koren O., Tako E. (2015). Chronic Zinc Deficiency Alters Chick Gut Microbiota Composition and Function. *Nutrients*. 7(12): 9768–84.
- Ruyter, B., Bou, M., Bæverfjord, G., Østbye, T.-K., Ytrestøyl, T., Bjerke, M., Sigholt, T., Berge, G., 2016. Langgridseffekter av lave omega-3 nivåer i fôr på laksens helse. FHF-prosjekt 900957, Nofima rapport 26/2016, 46 sider.
- Sissener, N., m.fl. 2016. Oppdatering av utredningen «Effekter av endret fetttsyresammensetning i fôr til laks relatert til fiskens helse, velferd og robusthet (Fett for fiskehelse)» FHF-rapport, Nifes og Nofima. 99 sider.
- Smilde, A.K., Jansen, J.J., Hoefsloot, H. C. J., Lamers, R. J. a N., van der Greef, J. and Timmerman, M. E., 2005. “ANOVA-simultaneous component analysis (ASCA): A new tool for analyzing designed metabolomics data,” *Bioinformatics*, vol. 21, no. 13, pp. 3043–3048, Jul. 2005.
- Sundell, K., Jutfelt, F., Agustsson, T., Olsen, R.E., Sandblom, E., Hansen, T., Björnsson, B.T., 2003. Intestinal transport mechanisms and plasma cortisol levels during normal and out-of-season parr-smolt transformation of Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* 222, 265–285. doi:10.1016/S0044-8486(03)00127-3.
- Sundell, K.S., Sundh, H., 2012. Intestinal fluid absorption in anadromous salmonids: importance of tight junctions and aquaporins. *Front. Physiol.* 3, 388. doi:10.3389/fphys.2012.00388
- Sveen L, Timmerhaus G, Krasnov A, Takle H, Stefansson S, Handeland Sigurd, Ytteborg E (2018). High fish density delays wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scientific Reports* 8.
- Sveen L, Timmerhaus G, Krasnov A, Takle H, Handeland S, Ytteborg E. (2019) Wound healing in post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Scientific Reports* 9: 3565.
- Vidakovic, A., Langeland, M., Sundh, H., Sundell, K., Olstorpe, M., Vielma, J., Kiessling, A., Lundh, T., 2015. Evaluation of growth performance and intestinal barrier function in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) fed yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), fungi (*Rhizopus oryzae*) and blue mussel (*Mytilus edulis*). *Aquac. Nutr.* n/a–n/a. doi:10.1111/anu.12344.

- Xin Zhou, Yansen Li, Zhaojian Li, Yun Cao, Fei Wang, Chun Mei Li. Effect of dietary zinc on morphological characteristics and apoptosis related gene expression in the small intestine of Miniature pigs. *Acta Histochemica* 119 (2017) 235–243.
- Zhao HF, Jiang WD, Liu Y, Jiang J, Wu P, Kuang SY, Tang L, Tang WN, Zhang YA, Zhou XQ, Feng L., 2016. Dietary choline regulates antibacterial activity, inflammatory response and barrier function in the gills of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). *Fish Shellfish Immunol.* 2016 May;52:139-50. doi: 10.1016/j.fsi.2016.03.029.

8 Leveranser

Nyhetssaker på nett

<https://nofima.no/nyhet/2016/10/forsker-pa-fiskens-robusthet-i-krevende-oppdrettsmiljo/>
<http://kyst.no/nyheter/forsker-pa-fiskens-robusthet-i-krevende-oppdrettsmiljo/>
<http://ilaks.no/forsker-pa-fiskens-robusthet-i-krevende-oppdrettsmiljo/>
<https://nofima.no/forskning/naringsnytte/sink-og-omega-3-styrker-laksen-skinns/>
<https://www.kyst.no/article/fhf-med-forskningsinnsats-paa-saarutfordringer-i-laksenaeringen/>
<https://www.intrafish.no/nyheter/1690661/sink-og-omega-3-kan-gjore-laksens-skinns-mer-robust>
<https://www.kyst.no/article/sink-og-omega-3-styrker-laksen-skinns/>
<https://www.kyst.no/nyheter/fhf-satsing-pa-bakteriefloraens-betydningen-for-laksens-helse/>
<https://nofima.no/prosjekt/omega-3-barriere/>

på engelsk:

<https://nofima.no/en/nyhet/2016/10/research-on-robustness-of-fish-in-demanding-aquaculture-environment/>

Foredrag og presentasjoner

Gerd Berge m.fl.; Ernæringens betydning for skinn-, tarm- og gjellehelse hos laks. Dialogmøte FHF Bergen 11.12.2017.

Elisabeth Ytteborg m.fl.; Kan vi sjonglere med sink og Ω -3 i føret for å styrke skinnet? Innlegg på Havbruk 2018, 18.-20.april, Oslo.

Gerd Marit Berge*, Elisabeth Ytteborg, Henrik Sundh, Tone-Kari Østbye, Lene Sveen, Kristina Sundell, Aleksei Krasnov, Bente Ruyter, 2018. OMEGA-3 FATTY ACIDS AND ZINC AFFECT ROBUSTNESS AND FUNCTION OF BARRIER TISSUES IN ATLANTIC SALMON *Salmo salar* Aqua2018, WAS, Montpellier, France. 26.-29. August 2018. (Abstract og muntlig innlegg)

Berge m.fl. , 2018. Omega-3 fatty acids and Zinc affect barrier tissues in Atlantic salmon in RAS. Presentasjon på smolt-konferanse Sunndalsøra, 23.-24. Oktober 2018.

Elisabeth Ytteborg m.fl.; Omega 3 og sink - betydning for skinnhelse hos laks. Dialogmøte FHF Gardermoen 17.12.2018.

Østbye, T.K. m.fl. (Innsendt abstract for Lipidforum 2019). Omega-3 fatty acids and zinc affect robustness and function of skin in Atlantic salmon.

Vitenskapelig publisering

Planlagte manuskripter (2) vil bli innsendt til aktuelle journaler innen 1. september 2019. I tillegg vil resultater fra mikrobiota-delen publiseres sammen med andre resultater på samme tema.

Ytteborg m.fl. Zinc and omega 3 strengthen the skin and increase the wound healing capacity in Atlantic salmon (*Salmo salar*).

Sundh m.fl. The impact of dietary omega-3 levels on intestinal barrier and transporting functions of the Atlantic salmon intestine.

Møtereferater

06.10.2016	Referat fra oppstartsmøte, med styringsgruppa
25.01.2017	Referat fra Skype-møte med styringsgruppa
13.06.2018	Referat fra møte med styringsgruppa
26.04.2019	Referat fra Skype-møte med styringsgruppa

