



Norges miljø- og
biovitenskapelige
universitet

Faglig sluttrapport

FHF 901586

HELSMOLT

Varige effekter av forbedret hjertehelse hos laksesmolt

Ida Beitnes Johansen, Faggruppe for fysiologi og biokjemi, Institutt for prekliniske fag og patologi, Veterinærhøgskolen, NMBU.

Harriet Romstad, Aqua kompetanse AS

Alf Seljenes Dalum, Patogen

Michael Frisk og Simona Kavaliauskiene, Institutt for eksperimentell medisinsk forskning, Ullevål Universitetssykehus.

Rapport levert 13.04.2023

Prosjektet er finansiert av Fiskeri – og havbruksnæringens forskningsfinansiering – FHF

Liste over forkortelser

ANP – atrial natriuretic peptide

AP – arbeidspakke

BNP – B-type natriuretic peptide

CSI – cardiosomatic index (hjertevekt relativt til kroppsvekt)

DC – dorsocranial (dorsokranial)

LDVA – left dorsal ventricular apex (venstre dorsale ventrikulære apex)

LL – Left lateral (venstre laterale)

MRI – magnetic resonance imaging

NKA – Natrium/kalium – ATPase

OT – outflow tract

RL – Right lateral (høyre laterale)

RVM – relative ventricular mass (ventrikkelvekt relativt til kroppsvekt)

T3- Tyreoideahormonet trijodtyronin

T4 – Tyreoideahormonet tyroksin

VD – ventrodorsal (ventrodorsale)

1. Sammendrag

1.1 Sammendrag (norsk)

Økende dødelighet av laks sent i tilvekstfasen i sjø representerer et alvorlig velferdsproblem og medfører årlige økonomiske tap anslått til over 15 milliarder norske kroner. Hjertelidelser og sirkulasjonsforstyrrelser blir stadig oftere observert i forbindelse med dødelighet etter stressende intervensjoner (f.eks. ikke-medikamentell avlusing) og det er bred enighet om at hjertesykdom generelt er et økende problem i norsk lakseoppdrett. Det rapporteres stadig om varierende grader av avvikende hjerteform og oppdrettslaks har generelt mindre og rundere hjerter enn villaks. I dette prosjektet viser vi eksperimentelt at fisk som er produsert intensivt på høye temperaturer og under kontinuerlig lys har mer avvikende hjertemorfologi enn fisk som er produsert langsomt på lavere temperaturer og under mer naturlige lysforhold. Disse funnene støttes av feltdata som viser at intensivt produsert smolt utvikler avvikende hjertemorfologi senere i livet sammenliknet med mer langsomt produsert smolt. Videre viser vi i den eksperimentelle studien at avvikende hjertemorfologi i intensivt produsert fisk er forbundet med symptomer på sykdom og redusert hjertefunksjon senere i livet. Mer presist ser vi en remodelering av hjertevevet som peker på overbelastning, forhøyet uttrykk av sykdomsmarkører og en akselerert forstivning av ventrikkel og bulbus i intensivt produsert fisk som ser ut til å bidra til utvikling av hjertesvikt etter et år i sjø i denne gruppen. Samlet sett tyder disse funnene på at en mer langsom smoltproduksjon kan redusere graden av morfologiske avvik på hjertet, bidra til bedre hjertefunksjon og kanskje også redusere hjerte-relatert dødelighet sent i livet. Utover denne nye kunnskapen om årsaker til og konsekvenser av avvikende hjertemorfologi hos oppdrettslaks har vi utviklet nye standardiserte metoder for vurdering av hjertemorfologi hos laks. For det første har vi utarbeidet ny nomenklatur for viktige referansepunkter på det pyramidale fiskehjertet. Denne nomenklaturen bruker vi 1) for å standardisere og enklere beskrive eksisterende og nye kvantitative mål på hjertemorfologi og 2) i utviklingen av et kvalitativt scoringssystem som inkluderer de vanligste fenotypiske trekkene observert på hjertene hos norsk oppdrettslaks. Mange av disse trekkene representerer avvik fra det ville laksehjertet. Disse metodene kan benyttes i forskning og av oppdrettsnæringen og vil lette det videre arbeidet med å forstå hjertesykdom hos oppdrettslaks.

1.2 English Summary

Increasing mortality of Atlantic salmon late in the grow-out phase at sea represents a serious welfare problem and results in annual economic losses estimated at over 15 billion Norwegian kroner. Heart disease and circulatory failure are increasingly observed in connection with mortality after stressful interventions (e.g. mechanical delousing) and there is broad agreement that heart disease is generally an increasing problem in Norwegian salmon farming. Reports continue to indicate varying degrees of abnormal heart shape and farmed salmon generally have smaller and rounder hearts than wild salmon. In this project, we demonstrate experimentally that fish produced intensively at high temperatures and under continuous light have more abnormal heart morphology than fish produced slowly at lower temperatures and under more natural light conditions. These findings are supported by field data showing that intensively produced smolt develop abnormal heart morphology later in life compared to more slowly produced smolt. Furthermore, we show in the experimental study that abnormal heart morphology in intensively produced fish is associated with symptoms of heart disease and reduced cardiac function later in life. More specifically, we observe a remodeling of the heart tissue that points to overload, elevated expression of disease markers, and an accelerated stiffening of the ventricle and bulbus in intensively produced fish that appears to contribute to the development of heart failure after a year at sea in this group. Taken together, these findings suggest that a slower smolt production can reduce the degree of morphological deviations in the heart, contribute to better heart function, and perhaps also reduce heart-related mortality later in life. In addition to this new knowledge about the causes and consequences of abnormal heart morphology in farmed salmon, we have developed new standardized methods for assessing heart morphology in salmon. First, we have developed new nomenclature for important reference points on the pyramidal fish heart. We use this nomenclature 1) to standardize and more easily describe existing and new quantitative measures of heart morphology and 2) in the development of a qualitative scoring system that includes the most common phenotypic traits observed on the hearts of Norwegian farmed salmon. Many of these traits represent deviations from the wild salmon heart. These methods can be used in research and by the aquaculture industry and will facilitate further work to understand heart disease in farmed salmon.

2. Innledning

2.1 Bakgrunn for prosjektet

Bakgrunnen for prosjektet er økende dødelighet av laks i tilvekstfasen i oppdrett før slakt. Slik dødelighet representerer et alvorlig velferdsproblem i norsk oppdrettsnæring og medfører dessuten årlige økonomiske tap anslått til over 15 milliarder norske kroner [1]. Plutselig stressrelatert dødelighet av stor fisk rett før slakt er spesielt problematisk med tanke på den betydelige investeringen som allerede er lagt ned i denne fisken. Hjertelidelser og sirkulasjonsforstyrrelser blir stadig oftere observert i forbindelse med økt dødelighet etter stressende intervensjoner (f.eks. ikke-medikamentell avlusing)[2]. Det er også ut over dette bred enighet om at hjertesykdom er et økende problem i norsk lakseoppdrett. Det rapporteres stadig om varierende grader av avvikende hjerteform og oppdrettslaks har generelt mindre og rundere hjerter enn villaks. Andre klassiske avvik på oppdrettshjertet inkluderer feilstilling av bulbus arteriosus og asymmetriske ventrikler [2-4]. Gjennom arbeid med sykdomsoppklaring og rutinemessige helsekontroller i settefisk- og matfiskanlegg har fiskehelsepersonell i Aqua Kompetanse A/S, som er viktige samarbeidspartnere på dette prosjektet, de siste årene registrert ulike morfologiske avvik i hjertet som vi ikke finner beskrevet i litteraturen.

Årsaken til disse hjertelidelsene er ukjent, men det har blitt foreslått at intensiv drift i settefiskfasen kan være en av årsakene [2]. Foreløpig forskning tyder også på at dagens smoltproduksjon ikke tillater tilstrekkelig re-modellering og vekst av laksehjertet [5]. Smolt som produseres i konvensjonelle settefiskanlegg (der lys og temperatur manipuleres) opplever for eksempel ikke en like stor økning i relativ hjertevekst som villaks. Oppdrettssmoltens hjerte har også en metabolisme som skiller seg vesentlig fra villaksens. Forskjellene i hjertevekst og metabolisme skyldes høyst sannsynlig den langt raskere kroppsveksten hos oppdrettssmolt [5]. Oppdrettssmolt får en annen diett enn villaksen og lys og temperatur manipuleres for å fremme rask kroppsvekst. Ved unaturlig rask kroppsvekst kan det være at hjertet rett og slett ikke er stort nok til å betjene en relativt sett for stor kropp samtidig som det må håndtere økt belastning ved overgang til saltvann. Hvis dette er tilfellet, vil hjertet overbelastes allerede rett etter utsett i sjø. Som kjent er overbelastning av hjertet vanligste årsak til hjertesykdom hos mennesker [6].

Vår utgangshypotese er at slik tidlig overbelastning i den kritiske overgangen mellom ferskvann og sjø reflekterer i økende grad av patologisk utvikling senere i livet. Med andre ord, tidlig problematikk disponerer for tidlig død. Dette prosjektet vil teste effekten av redusert tilveksthastighet i settefiskfasen som et enkelt tiltak for å forhindre denne typen utvikling.

Prosjektet er således utformet for å teste et «proof of concept», enkelt sagt at en mer naturlig balanse mellom kroppsvekst og hjertets utvikling tidlig i livet (altså i settefisk-fasen) forplanter seg videre i utviklingen og gir tydelig forbedret hjerte-helse hos voksen fisk. Omvendt antas at utilstrekkelig utvikling av hjertet i forhold til kropp hos settefisk og smolt programmerer en utvikling mot hjertelidelser og mortalitet, spesielt under akutt stress. I dette prosjektet testes denne hypotesen ved at grupper av fisk produseres ved lavere temperatur (7°C vs. 14°C), hvilket gir lavere tilvekstrate og lavere ad libitum forinntak, og dermed forventes å forlenge settefiskfasen med ca. 6 mnd. Andre strategier for å øke relativ hjertestørrelse er kjent (for eksempel «trening» av smolt med økt vanngjennomstrømming) men slike tiltak skaper ofte stor individvariasjon pga ulik posisjonering. Tilvekstrate kontrollert ved temperatur er således det tiltak som denne prosjektgruppen vurderer at enklest vil kunne implementeres i praktisk produksjon.

Det har blitt vist i tidligere studier at en tregere smoltproduksjon kan være gunstig fordi det gir god kompensatorisk kroppsvekst i sjø. Så vidt vi vet, har ingen har sett på effekter av treg smoltproduksjon på hjertets fysiologi, re-modellering og funksjon. **Når vi vet hvor viktig rolle hjertet spiller hos en smolt, spesielt for overgangen til saltvann, er det vesentlig å undersøke om en mer naturlig smoltutvikling også gir en mer adaptiv re-modellering av hjertet i denne fasen som gjør at fisken bedre håndterer overgang til sjø og får bedre hjertehelse senere i livet.**

2.2 Prosjektets omfang og organisering

Start-tidspunkt: 01.08.2019

Slutt-tidspunkt: 31.03.2023

Total økonomisk ramme: 10 115 000

Prosjektleder

Ida Beitnes Johansen, NMBU Veterinærhøgskolen

Prosjektgruppe

Ole Folkedal, Havforskningsinstituttet

Harriet Romstad, Aqua kompetanse A/S

Alf Seljenes Dalum, Patogen

Erik Höglund, NIVA

Marco Vindas, NMBU Veterinærhøgskolen

Øyvind Øverli, NMBU Veterinærhøgskolen

Øvrige prosjektdeltakere rekruttert underveis i prosjektet

Michael Frisk, Institutt for eksperimentell medisinsk forskning, Ullevål universitetssykehus

Simona Kavaliauskiene, Institutt for eksperimentell medisinsk forskning, Ullevål universitetssykehus

Referansegruppe

Marit Holmvåg Hansen, Cermaq Group AS – settefiskkoordinator

Anne Tjessem, Grieg Seafood Finmark AS – fiskehelsebiolog

Øyvind Kileng (historisk tilknytning) – Ellingsen Seafood AS - settefiskansvarlig

3. Problemstilling og formål

Hovedmålet med prosjektet er å undersøke om en langsom, mer naturlig smoltutvikling gir en mer adaptiv re-modellering av laksehjertet som gjør at fisken bedre håndterer overgang til sjø og får bedre hjertehelse senere i livet.

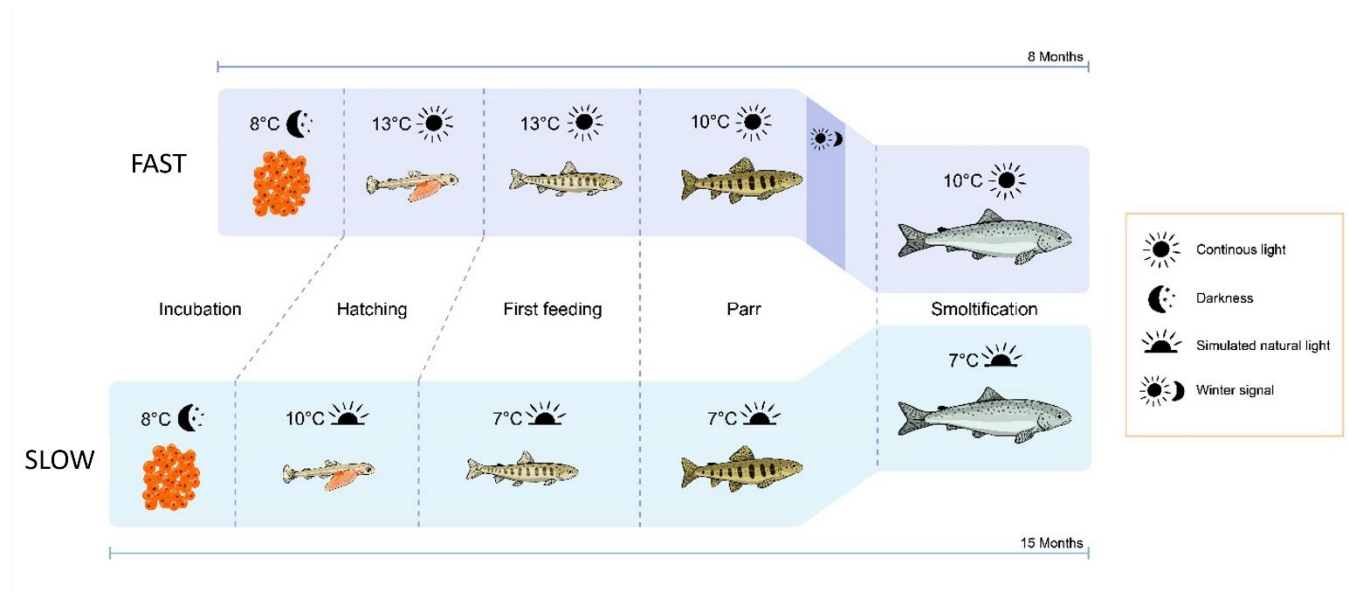
Delmålene i prosjektet er å:

1. Undersøke effekter av langsom, mer naturlig smoltutvikling på laksehjertets fysiologi, morfologi og funksjon.
2. Undersøke effekter av redusert tilveksthastighet i settefiskfasen på hjertehelse og overlevelse i sjø.
3. Sammenlikne hjertets morfologi og funksjon i laks produsert i settefiskanlegg som opererer med konvensjonell versus langsom smoltifisering.

4. Prosjektgjennomføring

4.1 Arbeidspakke 1

Formålet med arbeidspakke 1 (AP1) var å produsere to eksperimentelle grupper med smolt. En gruppe ble produsert intensivt med tilvekstrate, temperatur ($\sim 13^{\circ}\text{C}$) og lys-styring som tilsvarer normal konvensjonell settefisk-produksjon (rask smolt), og en gruppe ble produsert langsomt med naturlig lys-syklus og temperatur ($4\text{--}7^{\circ}\text{C}$) tilpasset lavere tilvekstrate (langsom smolt). Se figur 1 for skjematisk representasjon av det eksperimentelle designet. Gruppene skulle følges gjennom hele produksjonssyklus. Tilvekst ble overvåket som en del av denne AP. Som referanse til dette materialet fanget vi 44 ville laksesmolt ved hjelp av smoltfeller i Sognelva og ved Rygene kraftstasjon i Nidelva i samarbeid med NIVA.



Figur 1. Skjematisk representasjon av eksperimentelt design og tidslinje for produksjon av rask (fast) og langsom (slow) smolt.

4.2 Arbeidspakke 2

Formålet med AP 2 var å overvåke fysiologiske parametere hos rask og langsom smolt fra AP1. I forbindelse med smoltifisering skjer en rekke fysiologiske endringer hos laksen som har som hensikt å gjøre den klar for et liv i sjø. For eksempel øker produksjon og utskillelse av «smolthormoner» som f.eks. kortisol og tyreoidhormoner som er involvert i remodellering av osmoregulatoriske organer. Denne remodelleringen innebærer blant annet reorganisering av celletyper med tilhørende ionepumper (Natrium/kalium ATPaser) i gjellene for å tolerere vann med økt salinitet. I forbindelse med smoltifisering ser man derfor gjerne en økning i saltvanns-ATPaser samtidig som man ser en

nedgang i ferskvanns-ATPase. Mangelfull remodellering av gjellene og andre osmoregulatoriske organer kan medføre manglende evne til osmoregulering og osmotisk sjokk. En indikasjon på dette kan man få ved å måle enkeltioner i plasma, som f.eks. plasmaklorid som bør ligge mellom 130-140 mmol/L. For å undersøke om en smoltgruppene våre var godt smoltifisert målte vi i denne AP derfor plasmaklorid etter en sjøvannstest. Vi målte også konsentrasjoner av smolthormonene kortisol og tyreoidhormoner i plasma for å sammenlikne endokrin regulering i smoltgruppene. Utover planlagte aktiviteter i prosjektet, har vi gjort respirometri og svømmerespirometri på fiskegruppene i samarbeid med Malthe Hvas ved HI Matre. Her har vi målt standard og max metabolsk rate og aerobic scope hos enkeltfisk og de samme parameterne samt svømmekapasitet hos grupper av fisk.

4.3 Arbeidspakke 3

Formålet med AP3 var å vurdere morfologisk og fysiologisk remodellering av hjertet, hjertehelse samt hjertefunksjon i rask og langsom smolt fra AP1. Hos laks, som hos andre vertebrater, bestemmes hjertefunksjon i stor grad av hjertets størrelse og sammensetning, men også av hjertets morfologi (fasong). I denne arbeidspakken har vi derfor målt relativ hjerte (CSI) – og ventrikelvekt (RVM) samt vevssammensetning i ventrikkelen (vha. histologi og MRI). Lakseventrikkelen er bygget opp av to forskjellige typer vev; et indre spongiøst vev og et kraftgenererende ytre kompakt vev. Tykkelsen på dette ytre kompakte vevet reflekterer belastningen på hjertet og kan påvirke hjertets pumpekapasitet. Vekst av det kompakte vevet kan imidlertid være enten adaptivt eller patologisk avhengig av om den økte belastningen på hjertet er fysiologisk eller patologisk. For å skille fysiologisk og patologisk hjertevekst, har vi undersøkt transkriptomet i hjertet (ved RNA-sekvensering). For å vurdere hjertefasong har vi benyttet to metoder: En kvantitativ metode som er videreutviklet fra eksisterende metoder samt en kvalitativ metode som er utarbeidet i dette prosjektet. Metodene er beskrevet under 5.4 AP4 Sammenstilling av hjertedeformiteter hos norsk oppdrettslaks.

Hjertefunksjon er overvåket gjennom store deler av forsøket (i ferskvanns- og sjøvannsfasen), primært ved hjelp av ekkokardiografi, men også på enkelte tidspunkter ved hjelp av direkte måling av blodstrøm gjennom hjertet (in vivo) og hjerterateloggere.

4.4 Arbeidspakke 4

Formålet med AP4 var å utvikle en fullstendig kartlegging/referansedatabase over morfologiske og patologiske avvik som forekommer hos oppdrettslaks i Norge. Kunnskap om laksehjertets normale morfologi og de mest forekommende avvikene er helt nødvendig kunnskap som må inngå i enhver sykdomsutredning med mistanke om sirkulasjonsforstyrrelse/sirkulasjonssvikt. Vi opplever at mange

synes at vurdering av hjertestørrelse, hjertevekt og morfologi kan være vanskelig pga. manglende referansemateriale og kunnskap om hvor stor praktisk betydning de ulike gradene av avvik har. **For å kunne karakterisere graden av morfologi og patologi i hjertene fra AP1, var det derfor nødvendig med en fullstendig kartlegging/referansedatabase over morfologiske og patologiske avvik som forekommer.**

I denne AP har vi derfor laget et støtteverktøy for vurdering av morfologiske avvik i hjertet hos atlantisk laks. Verktøyet er basert på felt-materiale innhentet av hele prosjektgruppa, men primært Aqua kompetanse som leder denne AP. Verktøyet består av en kvalitativ metode for vurdering av hjertemorfologi og inkluderer de vanligste morfologiske avvikene hos norsk oppdrettslaks, inkludert en stor andel avvik som ikke tidligere er beskrevet i litteraturen. Felt-materialet innhentet for dette formålet er dessuten benyttet for å knytte smoltproduksjonsprotokoll (f.eks. vårsolt vs. høstsolt) til kvantitative og kvalitative mål på hjertemorfologi.

5. Resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 AP1 Eksperimentell smoltproduksjon

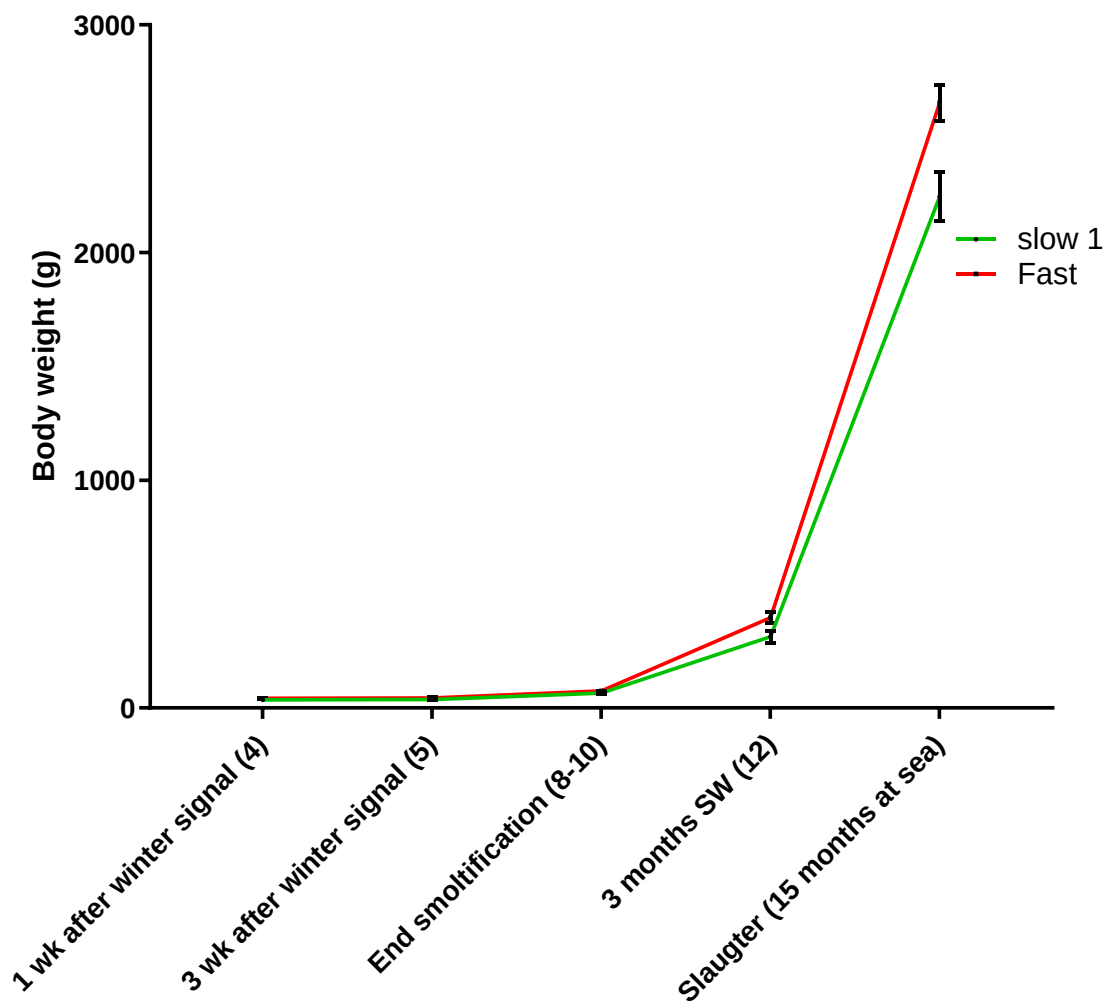
Tilvekst

Tilvekstrate er ikke gjort på enkeltindivider da fisken ikke var individmerket, men vi har sammenliknet kroppslengde, kroppsvekt og kondisjonsfaktor på gruppenivå. Smoltgruppene ble startet på ulike tidspunkt i henhold til protokollen, men det var ikke signifikante forskjeller mellom gruppene ved endt smoltifisering og utsett i sjø. Se tabell 1 for oversikt over kroppsvekt – og lengde i ferskvannsfasen.

Tabell 1. Gjennomsnittlig $\pm$ SEM kroppsvekt (W; i g) og lengde (L; i cm) gjennom ferskvannsfasen for Atlantisk laks produsert raskt eller langsomt.

Behandling	Startforing	VIntersignal	Start smoltifisering	Slutt smoltifisering
Rask	2 ± 0.1 W	43.7 ± 2.5 W	56.3 ± 2.4 W	74.4 ± 2.2 W
	6.6 ± 0.1 L	14.9 ± 0.3 L	16.1 ± 0.2 L	18.7 ± 0.2 L
Langsom	1.3 ± 0.1 W	37.1 ± 2.3 W	50.7 ± 3 W	65.7 ± 2.5 W
	4.9 ± 0.1 L	14.1 ± 0.3 L	15.6 ± 0.3 L	17.8 ± 0.2 L

Etter ferskvannsfasen ble fisken flyttet til Havforskningsinstituttets forskningsstasjon på Austevoll. Her ble tilvekst registrert i løpet av de første 12 mnd. Kort tid etter utsett, ble fisken imidlertid smittet med amøbisk gjellesykdom, noe som førte til svært stor dødelighet i begge grupper (omkring 50%) i løpet av de første tre månedene i sjø. I sjøanlegget ble fisken fordelt i 6 merder (3 per gruppe) og dødeligheten varierte noe fra merd til merd (29, 62 og 63 % for de tre merdene med treg smolt og 20, 31 og 48 % for de tre merdene med rask smolt). Det var ingen signifikante forskjeller i dødelighet mellom gruppene, dog en tendens til høyere dødelighet av treg smolt. Det var noe høyere antall treg enn rask smolt (390 vs. 275) i hver merd, men det er uklart om høyere tetthet av fisk kan ha bidratt til denne tendensen. Fisken ble behandlet for gjellesykdommen, men det er sannsynlig å anta at denne sykdommen har gjort fisken svakere og svært høy dødelighet ble registrert gjennom sjøfasen. Resultater fra sjøfasen må derfor ses i sammenheng med dette sykdomsbildet. Etter de første tre første månedene i sjø, var det ingen signifikant forskjell i gjennomsnittsvekt mellom gruppene, men etter ett år i sjø, var kroppsvekten signifikant høyere i rask enn i langsom smolt. Kroppsvekt fra en uke etter vintersignal i ferskvann til etter et år i sjø er illustrert i figur 2.

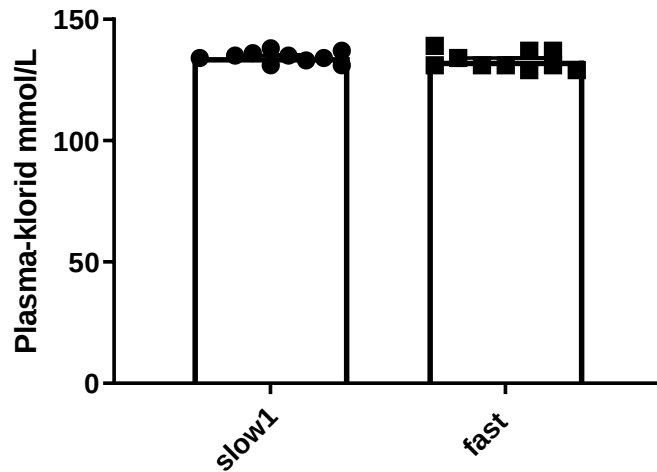


Figur 2. Kroppsvekt hos Atlantisk laks produsert langsomt (slow) eller raskt (fast) i settefiskfasen.

5.2 AP2 Fysiologiske parametere hos rask og langsom smolt

Plasma-klorid

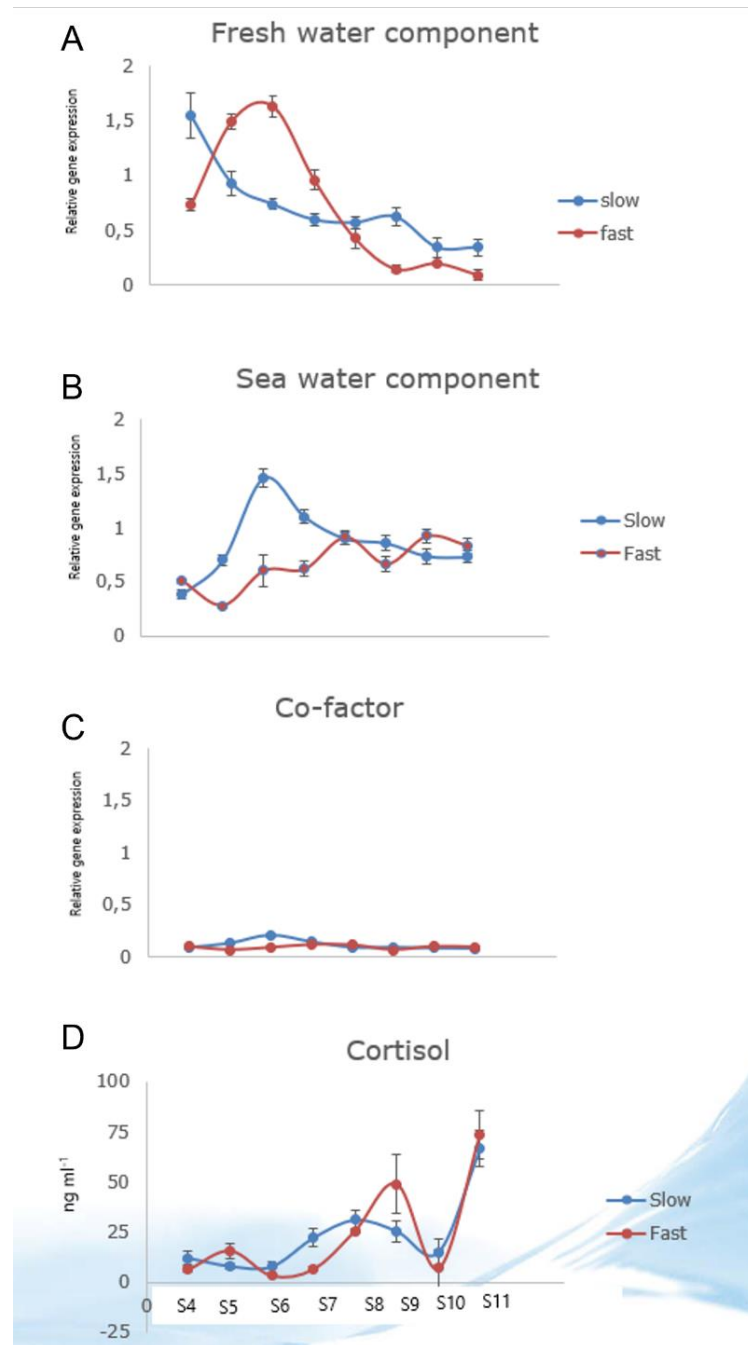
Plasmaklorid ble målt i smoltgruppene etter en sjøvannstest for å vurdere smoltstatus. Begge gruppene lå innenfor referanseområdet, noe som indikerte god smoltstatus på begge grupper (se figur 3).



Figur 3. Plasma-klorid etter sjøvannstest hos langsom (slow) og rask (fast) smolt.

NKA isoformer

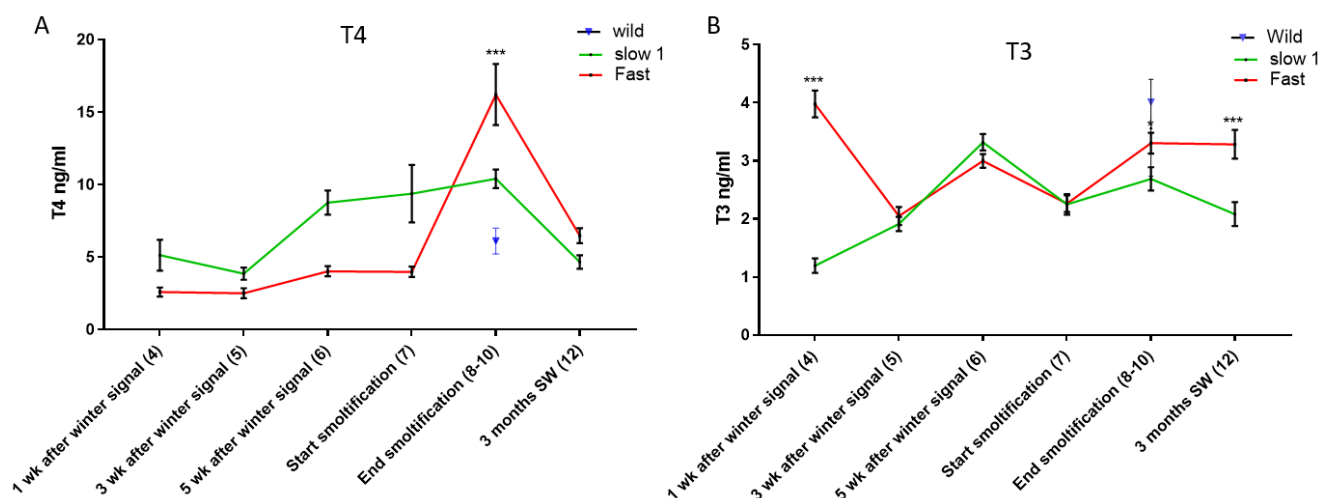
NKA ferskvanns – og saltvannsisoformer ble målt på mRNA i gjeller fra langsom og rask smolt i løpet av ferskvannsperioden (se figur 4A og 4B). Genuttrykk av ATPasene tyder på en mulig desmoltifisering av rask smolt, men uttrykket av ATPaser ser ut til å utjevnes før utsett i sjø (s10).



Figur 4. Ferskvanns – og saltvanns-ATPaser (A og B) og co-faktor og plasma kortisol C og D) under ferskvannsfasen hos langsom (blå) og rask (rød) smolt. Sampling (S) 4 = 1 uke etter vintersignal, S5 = 3 uker etter vintersignal, S6 = antatt start smoltifisering, S7 = antatt midt i smoltifisering, S8-10 = Slutt smoltifisering og S11 = 24 timer i saltvann (av et utvalg fisk i innendørs tanker).

Smolthormoner

Konsentrasjoner av kortisol (Figur 4D) og tyreoideahormonene (T3 og T4, Figur 5) ble målt i plasma i løpet av ferskvannsfasen. Disse resultatene der hormonene er tidlig oppregulert i rask smolt støtter hypotesen om tidlig smoltifisering etterfulgt av desmoltifisering i denne gruppen.



Figur 5. Tyreoideahormonene A) T4 og B) T3 i langsom (slow) og rask (fast) fra 1 uke etter begynnelse av vintersignal og frem til 3 mnd. i sjø. Konsentrasjoner av T3 og T4 fra vill laksesmolt (wild) fanget i smoltfeller på vei ut i sjø er indikert i blått på figuren.

5.3 AP3 Hjertermorfologi – og funksjon

Hjertets størrelse, fasong, komposisjon og funksjon ble vurdert i løpet av hele produksjonssyklus. I lys av tidligere studier, hadde vi en forventning om at den langsomme smolten ville få relativt større hjerter enn den raske smolten. Vi spekulerte deretter i at et lite hjerte i forhold til kroppsstørrelse ville kunne overbelaste hjertet ved overgang til sjø og føre til hjertesykdom hos rask smolt senere i livet. Våre data støtter ikke denne prediksjonen, men tyder imidlertid på at rask tilvekst i ferskvann er forbundet med avvikende hjertermorfologi etter denne fasen, overbelastning på hjertet og redusert hjertefunksjon senere i livet.

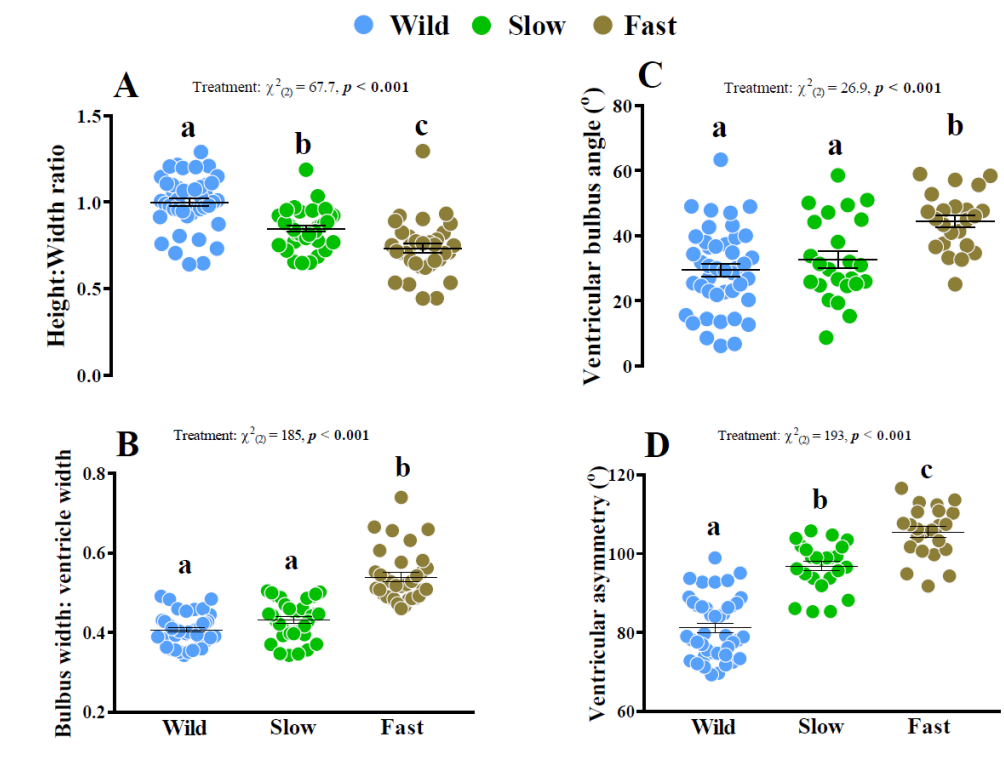
Hjertestørrelse i ferskvann

Det var en signifikant effekt av behandling på CSI ($\chi^2(1) = 172$, $p < 0,001$) mellom grupper ved slutten av smoltifiseringsperioden. Villfisk hadde en signifikant høyere CSI ($0,22 \pm 0,005$ g) sammenlignet med både langsom ($0,14 \pm 0,003$ g) og rask ($0,17 \pm 0,003$ g; $p < 0,001$, for begge) smolt, og langsom smolt hadde signifikant lavere CSI enn rask smolt ($p < 0,001$). Videre fant vi ved slutten av smoltifiseringsperioden en signifikant behandlingseffekt på relativ ventrikkelmasse (RVM; $\chi^2(1) = 159$, $p < 0,001$) mellom gruppene. Nærmere bestemt hadde villfisk en signifikant høyere RVM ($0,16 \pm 0,006$) sammenlignet med både langsom ($0,08 \pm 0,003$) og rask ($0,09 \pm 0,003$; $p < 0,001$, for begge) uten signifikante forskjeller mellom rask og sakte smolt. Høyere CSI, men ikke RVM i rask smolt, indikerer at andre deler av hjertet enn ventrikkelen er forstørret i denne gruppen. Som vist under

(6B) hadde den raske smoltgruppen riktig nok større bulbuser enn den langsomme gruppa, noe som kan forklare høyere relativ hjertevekt.

Langsom smolt utvikler hjerter som liker mer på villakshjerter i ferskvannsfasen

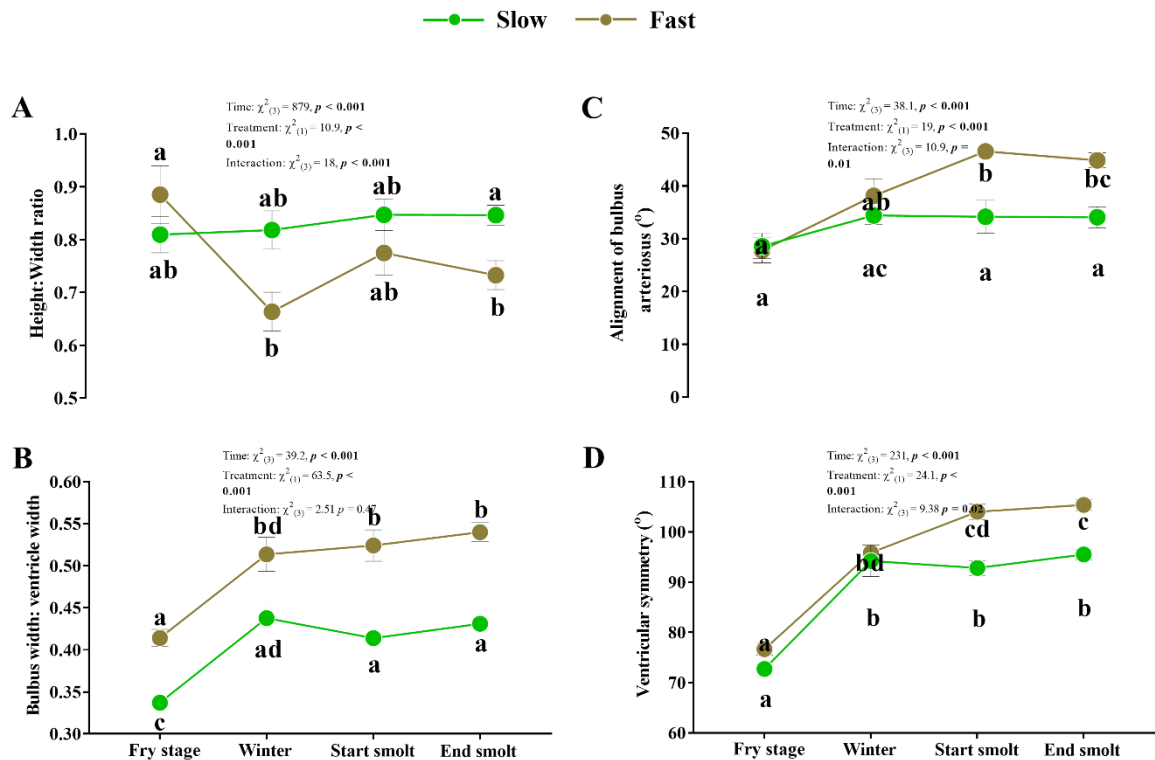
Klassiske morfologiske avvik som rundhet av ventrikkel og feilstilling av bulbus ble undersøkt sammen med nye kvantitative mål for ventrikkelsymmetri og relativ bulbusstørrelse i rask, treg og vill smolt (se figur 6). Etter endt smoltifisering var høyde:bredde-ratio forskjellig mellom alle tre gruppene (figur 6A). Dette målet indikerte at den langsomme smolten hadde mer avlange og smale ventrikler enn den raske smolten, som hadde rundere, kortere ventrikler. Høyde:bredde-ratio var også høyere i vill laksesmolt enn i de to andre gruppene. Når det gjelder plassering av bulbus på ventrikkelen, indikerer vinkelen mellom ventrikkel – og bulbusaksen (alignment of bulbus arteriosus) at den raske smolten har mer feilstilte bulbuser enn den ville og trege smolten (figur 6B). Relativ bulbusstørrelse (bulbus width:ventricle width) var også høyere i den raske smolten sammenliknet med den ville og trege smolten. For målet på ventrikkelsymmetri (ventricular symmetry) ser vi også at den langsomme smolten har en ventrikkelsymmetri som minner mer om villsmoltens, mens den raske smolten har mer asymmetriske ventrikler (figur 6D). Samlet sett tyder dette på at en langsom smoltproduksjonsprotokoll gir en hjertemorfologi som minner mer om villakshjertets morfologi.



Figur 6. Hjertemorfologi etter endt smoltifisering.

Morfologiske avvik på hjertet utvikles tidlig i ferskvannsfasen

For å kunne undersøke når morfologiske avvik på hjertet oppstår i ferskvannsfasen, sammenliknet vi også kvantitative mål på hjertemorfologi hos rask og langsom smolt gjennom hele ferskvannssperioden (se figur 7).



Figur 7. Hjertemorfologi over tid i ferskvannsfasen.

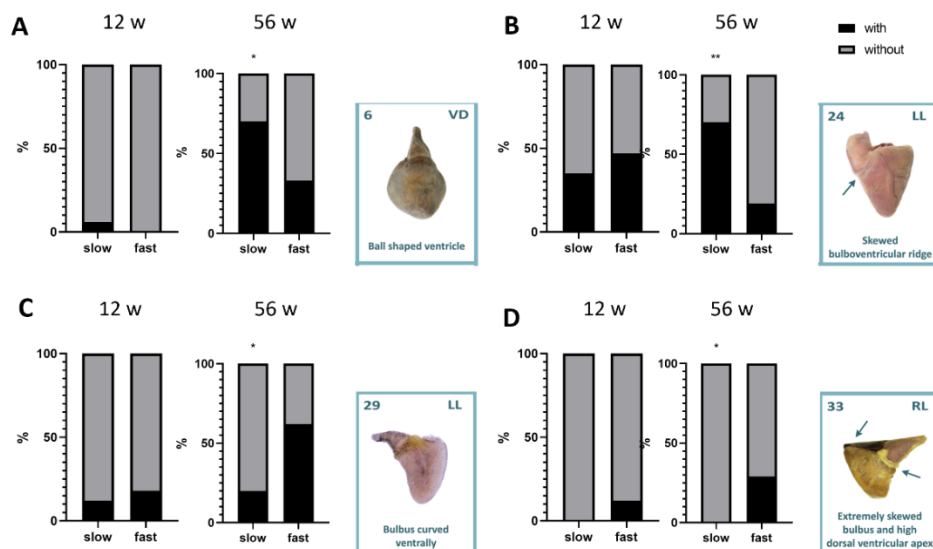
Denne sammenlikningen viser at forskjeller i enkelte morfologiske trekk mellom de to gruppene oppstår på ulike tidspunkter i løpet av ferskvannsfasen. Ratio mellom ventrikkelenes høyde og bredde (Height:width ratio) indikerer for eksempel at den raske smolten utvikler kortere og rundere ventrikler enn den langsomme smolten før introduksjon av vintersignal og vedvarer fram til utsett i sjø (figur 7A). Forskjellen i skjevhet på bulbus (alignment of bulbus arteriosus) oppstår imidlertid ikke før ved starten av smoltifisering, men vedvarer også ut ferskvannsfasen fram til utsett i sjø (figur 7B). Når det gjelder forskjellen i relativ bulbusstørrelse oppstår denne allerede på yngelstadiet og vedvarer også ut ferskvannsfasen (figur 7C). Utvikling av mer asymmetriske ventrikler (ventricular symmetry) ser ut til å sammenfalle med feilstilling av bulbus da forskjellen mellom de to gruppene oppstår ved starten av smoltifisering.

Samlet sett viser disse resultatene helt tydelig at miljøforhold tidlig i livet påvirker den morfologiske utviklingen av hjertet. Det er imidlertid fremdeles uklart hvorfor og hvordan dette skjer. Det er flere

miljøforhold som kan spille inn her og det er vanskelig å isolere effekter av for eksempel fotoperiode og temperatur da begge disse forholdene var forskjellig mellom gruppene. Rask smolt som ble produsert på forhøyet temperatur og under kontinuerlig lys (bortsett fra vintersignalet) hadde også naturlig nok høyere tilvekstrate enn den langsomme smolten, noe som vil kunne påvirke den morfologiske utviklingen av hjertet. Rask og treg tilvekstrate vil kunne påvirke belastningsgraden på hjertet i ulik grad og i ulik hastighet, noe som vil kunne påvirke den morfologiske utviklingen forskjellig. I hvilken grad og på hvilken måte tilvekstrate påvirker den morfologiske utviklingen av hjertet er imidlertid ukjent. Når det gjelder fotoperiode og temperatur kan det tenkes at disse miljøfaktorene kan påvirke hjertet direkte eller indirekte via f.eks. endokrin signalering.

Temperaturendringer er for eksempel direkte forbundet med enkelte former for remodellering av hjertet hos laksefisk (f.eks. hjertevekst ved kuldeadaptasjon) og lys og temperatur er viktige miljøstimuli for regulering av hormonsekresjon fra hypofysen. Flere av hormonene som reguleres fra hypofysen (kortisol, veksthormon og tyreoidhormoner) har dessuten direkte effekt på hjertet, selv om det er ukjent hvordan de påvirker vekst og morfologi hos laksefisk. **Ytterligere forskning er nødvendig for å forstå hvilke miljøfaktorer som i størst grad påvirker den morfologiske utviklingen av hjertet og på hvilke tidspunkter hjertet er mest påvirkelig for disse miljøfaktorene.**

I løpet av sjøfasen forsvant flere av de kvantitative morfologiske forskjellene mellom den raske og langsomme smolten og etter ett år (56 uker) i sjø indikerte de eneste kvantitative målene som fremdeles var forskjellig mellom gruppene større bulbuser og mer asymmetriske ventrikler i rask smolt (data ikke vist). Kvalitativ vurdering av hjertemorfologi (se 5.4 AP4 Sammenstilling av hjertedeformiteter hos norsk oppdrettslaks, figur 22) viser imidlertid at det er signifikante forskjeller mellom flere morfologiske trekk på dette tidspunktet. For eksempel har en større andel av den langsomme smolten kuleformede ventrikler (figur 8A) og skjevstilt bulbus (8B), mens en større andel av den raske smolten har bøyd bulbus (8C) og ekstremt skjevstilt bulbus (8D) på dette tidspunktet.

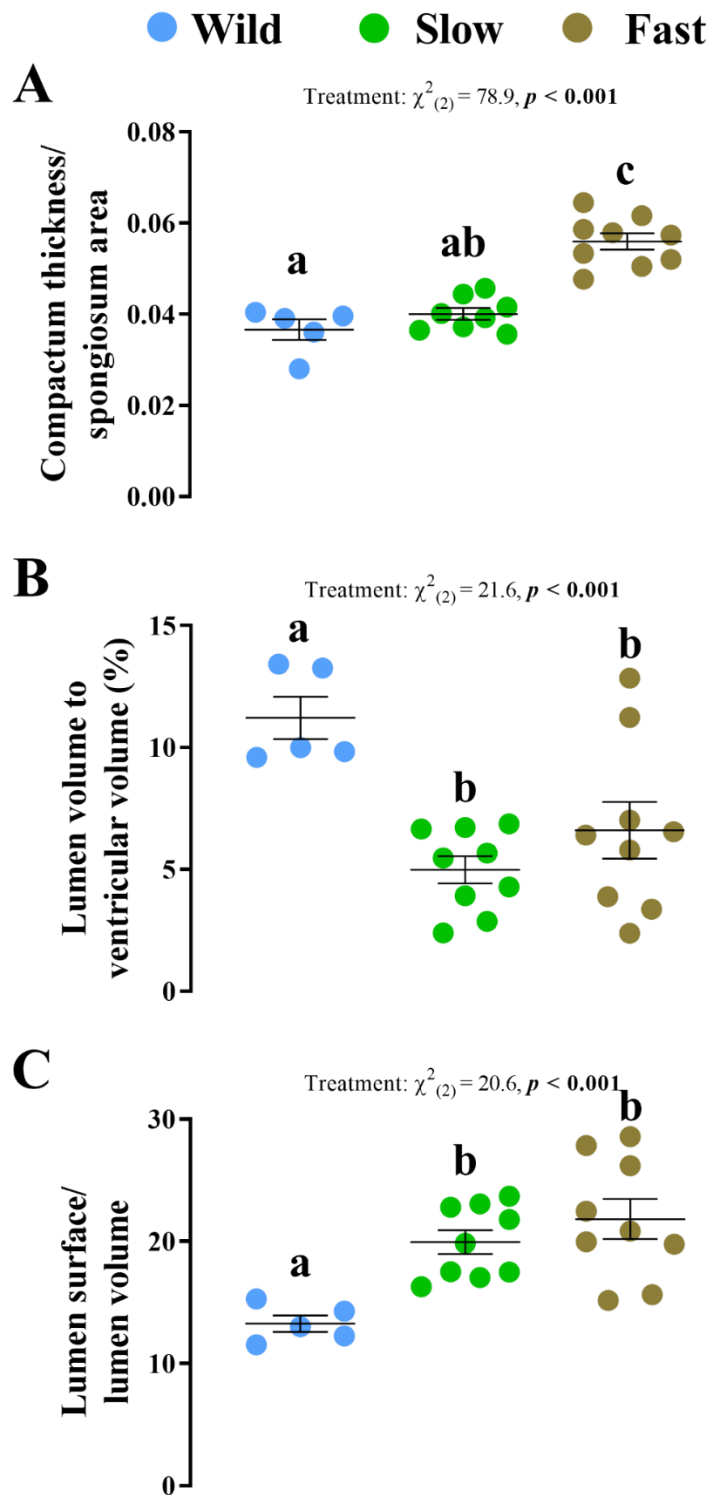


Figur 8. Kvalitative fenotypiske trekk registrert i langsom (slow) og rask (fast) smolt etter 12 og 56 uker (w) i sjø.

Remodellering av hjertet

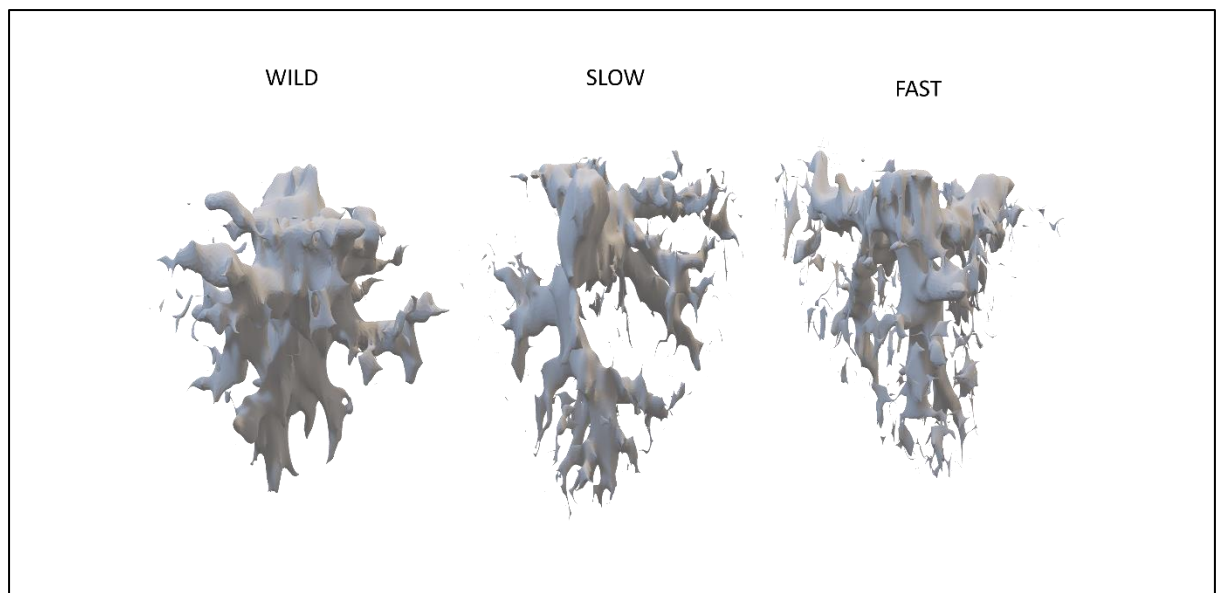
Etter endt smoltifisering i ferskvann, er vevssammensetningen i hjertet undersøkt ved MRI. Når man skanner hjerter vha MRI, kan man innhente informasjon om hjertets sammensetning som ikke er mulig ved for eksempel histologi fordi man kan analysere 3D-skanninger av intakte hjerter der man kan måle volum av forskjellige strukturer på hjertet. Laksehjertet består som kjent av to typer hjertevev. I dette prosjektet har vi analysert sammensetningen av de to typene hjertevev i ventrikkelen, volum av hjertelumen og forgrening av det spongiøse vevet (se Figur 9). Analysene viser at den raske smolten har et tykkere lag kompaktum sammenliknet med langsom og vill laksesmolt (Figur 9A). Et tykkere lag kompaktum kan enten indikere en fysiologisk adaptasjon til miljøendringer som krever mer av hjertet. Ved overgang fra ferskvann til saltvann ser man for eksempel at det kompakte hjertevevet vokser hos vill laksefisk for å svare på økt belastning på hjertet [7]. Et tykkere lag kompaktum kan imidlertid også være patologisk og indikere overbelastning av hjertet [8]. For å skille mellom fysiologisk og patologisk vekst av det kompakte vevet, kan det være nyttig å undersøke uttrykket av stressmarkører/sykdomsmarkører i hjertet. Dette er også gjort i dette prosjektet og resultatene fra dette er beskrevet under. Fra MRI-analysene fant vi også at vill laksesmolt har en betydelig større lumen i ventrikkelen sammenliknet med rask og langsom smolt (Figur 9B). **Et lavere lumenvolum i de eksperimentelle gruppene er en svært interessant observasjon da det åpenbart vil innebære en redusert pumpekapasitet fordi det reduserer hjertets kapasitet til å fylle seg med blod. Denne observasjonen er fullstendig ny og blir svært interessant å undersøke videre.** Få studier på hjertefunksjon er gjort på vill laksefisk og begrenser seg gjerne til forsøksfisk eller oppdrettsfisk som har levd sedate liv i innendørs tanker eller

i merder i sjø. En fellesnevner for disse studiene er for eksempel at det observeres at laksefisk har overaskende høy ejeksjonsfraksjon (80-100%) (EF, fraksjon av blodvolum i lumen som pumpes ut i hver kontraksjonssyklus) sammenliknet med gnagere og mennesker (50-70%). Hos pattedyr ser man typisk at ikke hele blodvolumet pumpes ut i systolen, men at man har et restvolum etter endt systole. Hos laksefisk pumpes imidlertid nær sagt alt blodvolumet ut av ventrikkelen i løpet av systolen [9]. **Det vi spekulerer i nå, er om fisk som holdes i innendørs tanker med lavt aktivitetsnivå og relativt høyt forinntak sammenliknet med vill laksefisk, utvikler lavere lumen volum i ventrikkelen som innebærer at ejeksjonsfraksjonen blir svært høy. Det vil være svært interessant å gå videre med disse funnene for å forstå årsaken til denne utviklingen og ikke minst hvilke konsekvenser det har for hjertefunksjon hos oppdrettsfisken.** Villaksen vi har undersøkt har også lavere lumenoverflate i forhold til lumen volum sammenliknet med rask og langsom smolt (figur 9C). Det er ennå uklart hva disse fenotypiske forskjellene innebærer rent fysiologisk, men en lavere lumenoverflate i forhold til lumen volum indikerer mindre grad av forgrening av det spongiøse vevet hos vill laksesmolt.



Figur 9. Hjerterekomposisjon. Forhold mellom kompakt og spongiøst vev (A), lumenvolum i prosent av ventrikkelvolum (B) og lumenoverflate i forhold til lumenvolum (C) i vill (wild), langsom (slow) og rask (fast) smolt etter endt smoltifisering.

Visuell inspeksjon av lumen i de tre gruppene, støtter også denne tolkningen (se Figur 10).



Figur 10. Forgrening av spongiosum. Visuell representasjon av forgrening av spongiøst vev i vill (wild), langsom (slow) og rask (fast) smolt.

Økt forgrening av det spongiøse vevet vil åpenbart kunne påvirke blodstrømmen gjennom hjertet da det vil innebære økt friksjon og muligens skape mer turbulens, men ytterligere undersøkelser er nødvendig for å forstå årsakene til og konsekvensene av dette.

Molekylære indikatorer på hjertesykdom

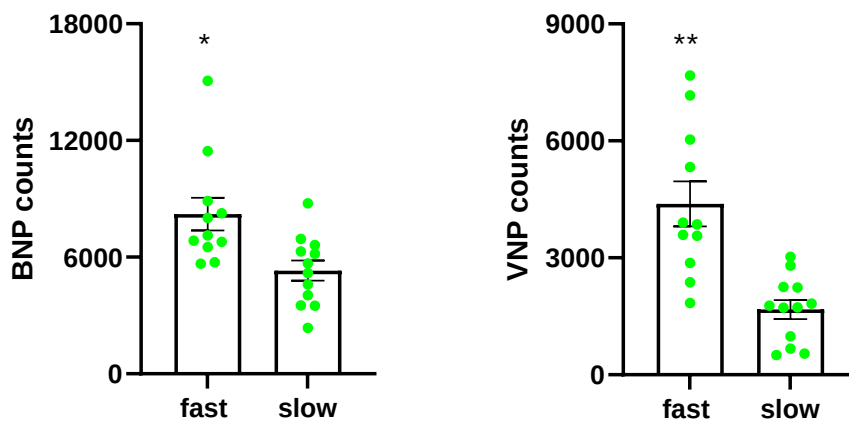
I et forsøk på å forstå molekulære mekanismer bak utviklingen av avvikende hjertemorfologi og hvilke konsekvenser det har for hjertet, har vi undersøkt transkriptomet i rask og langsom smolt ved RNA-sekvensering.

Flere molekulære markører er tidligere benyttet for å påvise hjertesykdom hos laksefisk. Blant dem finner vi natriuretiske peptider, hvis økte uttrykk indikerer at hjertet er stresset og som derfor brukes som hjertesykdomsmarkører i humanmedisin.

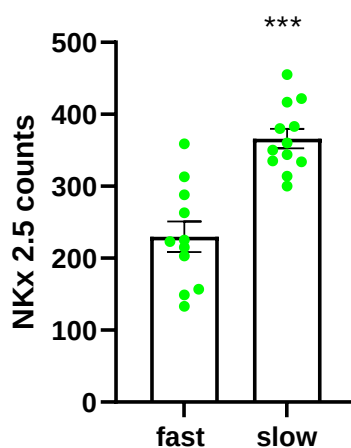
Da vi undersøkte uttrykket av kjente hjertesykdomsmarkører fant vi at uttrykket av de natriuretiske peptidene B-type natriuretisk peptid (BNP) og ventrikulært natriuretisk peptid (VNP) var økt i hjertene hos den raske smolten (se Figur 11). Et økt uttrykk av disse genene tyder på en patologisk belastning av det raske smolthjertet og at et tykkere lag kompaktum i denne gruppa (Figur 9A) sannsynligvis skyldes overbelastning av hjertet.

Interessant nok fant vi også på gennivå forskjellig uttrykk av et gen som er avgjørende for utviklingen av pattedyrhjertet (se figur 12). NKx 2.5 er en transkripsjonsfaktor som fungerer som en slags nøkkelregulator for uttrykket av en rekke hjerte-spesifikke gener og genet er nødvendig for normal utvikling av hjertet. Mutasjoner i dette genet, som nedsetter funksjonen til proteinet genet koder

for, er forbundet med hjertedeforviteter. Det er derfor interessant at uttrykket av dette genet var lavere i hjertene den raske smolten som også var mer deformerte.

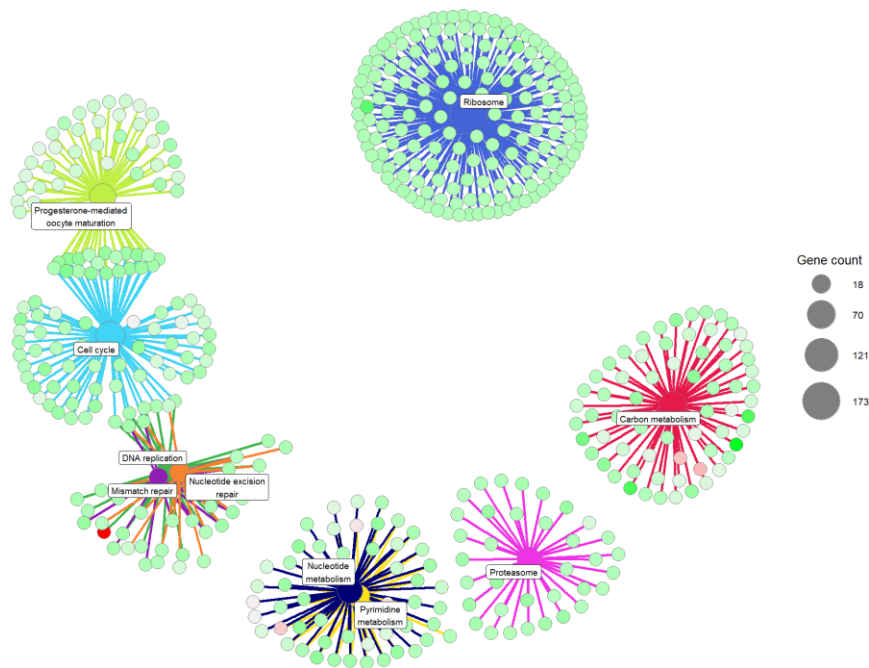


Figur 11. Stressmarkører i hjertet. Uttrykket av B-type natriuretisk peptid (BNP) og ventrikulært natriuretisk peptid (VNP) i rask (fast) og langsom (slow) smolt etter endt smoltifisering.



Figur 12. Gen som regulerer utviklingen av hjertet. Uttrykket av NKx2.5 i rask (fast) og langsom (slow) smolt etter endt smoltifisering.

Den bioinformatiske sammenlikningen av transkriptomet i langsom og rask smolt er for omfattende til å inkludere i denne rapporten. Kort fortalt ser vi ikke helt uventet store forskjeller i transkriptomet til langsom og rask smolt. Eksempelvis viser en analyse av gruppering av gener (KEGG pathways) at gener og signalveier involvert i f.eks. cellesyklus og metabolisme er økt i den raske smolten sammenliknet med den langsomme smolten (se figur 13).

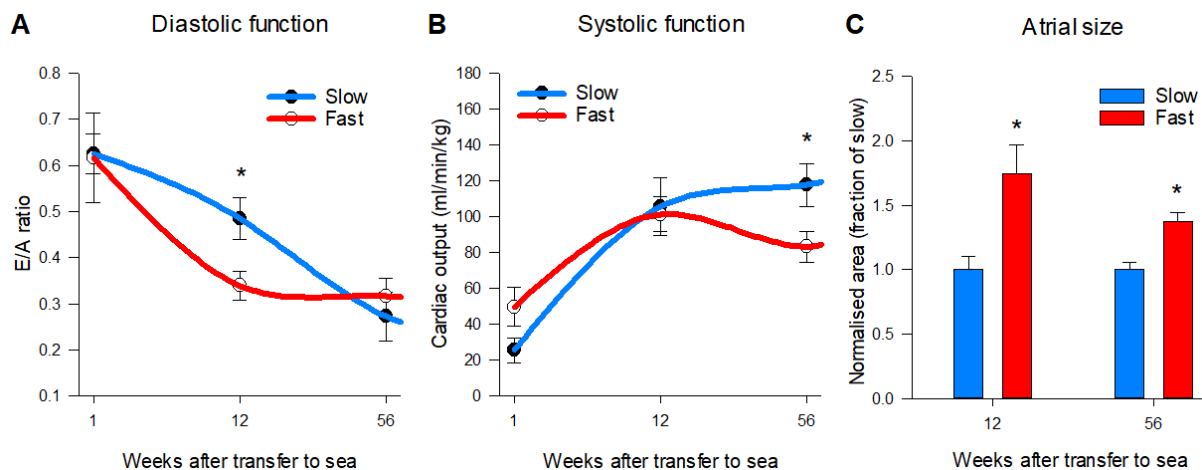


Figur 13. KEGG pathways beriket i rask sammenliknet med langsom laksesmolt.

Hjertefunksjon gjennom livssyklus

De funksjonelle konsekvensene av de observerte morfologiske forskjellene på hjertene hos rask og langsom smolt ble undersøkt etter utsett i sjø ved hjelp av et VividIQ ultralydsystem.

Mål for diastolisk (E/A-forhold) og systolisk (minuttvolum) funksjon og hjertedimensjoner, ofte brukt i en klinisk setting, ble vurdert som beskrevet i Becker et al., (https://scholar.google.com/citations?view_op=view_citation&hl=no&user=ZUPYVMcAAAAJ&sortby=pubdate&citation_for_view=ZUPYVMcAAAAJ:vV6vV6tmYwMC). Diastolisk funksjon beskriver hvor godt ventrikkelen slapper av og brukes ofte som et mål på hjertestivhet. Som forventet sank E/A-ratio med aldring i begge gruppene (Fig. 14 A). Imidlertid så det ut til at den raske smolten viste akselerert forstivning 12 uker etter sjøutsett. Etter 56 uker så begge gruppene ut til å ha samme grad av hjerte-(dys)funksjon, men på dette tidspunktet var minuttvolum (systolisk funksjon) redusert hos rask fisk (Fig. 14 B), noe som tyder på tidlig oppstått hjertesvikt. Endrede hjertedimensjoner, og spesielt økt atrieareal, er kjennetegn på patologisk remodellering hos både mennesker og pattedyr. For å fastslå om lignende mønstre eksisterer hos laks og for å ytterligere støtte funnene om hjertefunksjon, ble relativt atrieareal målt (Fig. 14 C). Både etter 12 og 56 uker til sjøs var atriestørrelsen markant økt hos rask fisk.



Figur 14. Hjertefunksjon. *In vivo* hjertefunksjon ble vurdert med ekkokardiografi fra én til 56 uker etter sjøutsett. A, E/A-forhold ble brukt for å estimere diastolisk funksjon i langsom (slow) og rask (fast) fisk. Resultatene indikerer at diastolisk funksjon var dårligere i rask sammenliknet med langsom fisk etter 12 uker på sjøen. I samsvar med dette begynte den systoliske funksjonen (minuttvolum) å avta etter 56 uker til sjøs i den raske gruppen (B). For å fastslå om disse observasjonene skyldtes patologisk feiltilpasning, ble diastolisk atrieareal også målt 12 og 56 uker etter sjøoverføring (C). Faktisk var atrie-dilatasjon tydelig på begge tidspunktene, noe som ytterligere indikerer patologisk hjertedysfunksjon raskt.

Samlet indikerer dataene fra ultralyd at intensive smoltprotokoller fører til akselerert hjeratealdring og for tidlig hjertesvikt. Men hvorfor? Det er flere morfologiske forskjeller mellom gruppene som kan bidra til dette, men den mest vedvarende morfologiske forskjellen mellom de to gruppene var relativ bulbusstørrelse (se figur 6B og 7B). Vi lurte derfor på om de større bulbusene som ble observert i rask smolt var stivere, og dermed medførte større arbeidsbelastning på hjertet.

For å undersøke dette, ble bulbus compliance (endring i volum for en gitt endring i trykk) analysert som beskrevet tidligere [10]. Ved hvilende fysiologiske trykk var bulbus compliance hos hurtigvoksne individer signifikant lavere sammenliknet med bulbuser fra saktevoksende fisk etter 12 og 56 uker til sjøs (figur 15). Dette indikerer at bulbus hos hurtigvoksne individer er mindre elastisk. Basert på compliance kan blodvolumet som kan akkumuleres i bulbus innenfor et fysiologisk trykkrekkevidde kvantifiseres (compliance multiplisert med økning i trykk). Etter 12 uker i sjøvann var bulbuser fra hurtigvoksne individer kun i stand til å akkumulere ~50 % av blodvolumet akkumulert av saktevoksende individer i et trykkområde fra 20 til 40 mmHg (langsom gruppe: $0,94 \pm 0,25$ ml/g, rask gruppe: $0,49 \pm 0,16$ ml/g). Lignende resultater ble oppnådd etter 56 uker til sjøs i trykkområdet 20-40 mmHg: Sakte = $0,66 \pm 0,29$ ml/g, Rask = $0,34 \pm 0,07$ ml/g. Kanskje viktigere så vi at når det akkumulerte volumet ble justert til kroppsvekt i stedet for bulbusvekt (for å estimere den systemiske funksjonelle kapasiteten til bulbus), ble det akkumulerte volumet mellom 20-40 mmHg fortsatt betydelig redusert med 37,7 % i den raske gruppen. Dermed er relativt større bulbuser stive og kan samle

mindre blod enn mindre mer elastiske bulbuser.

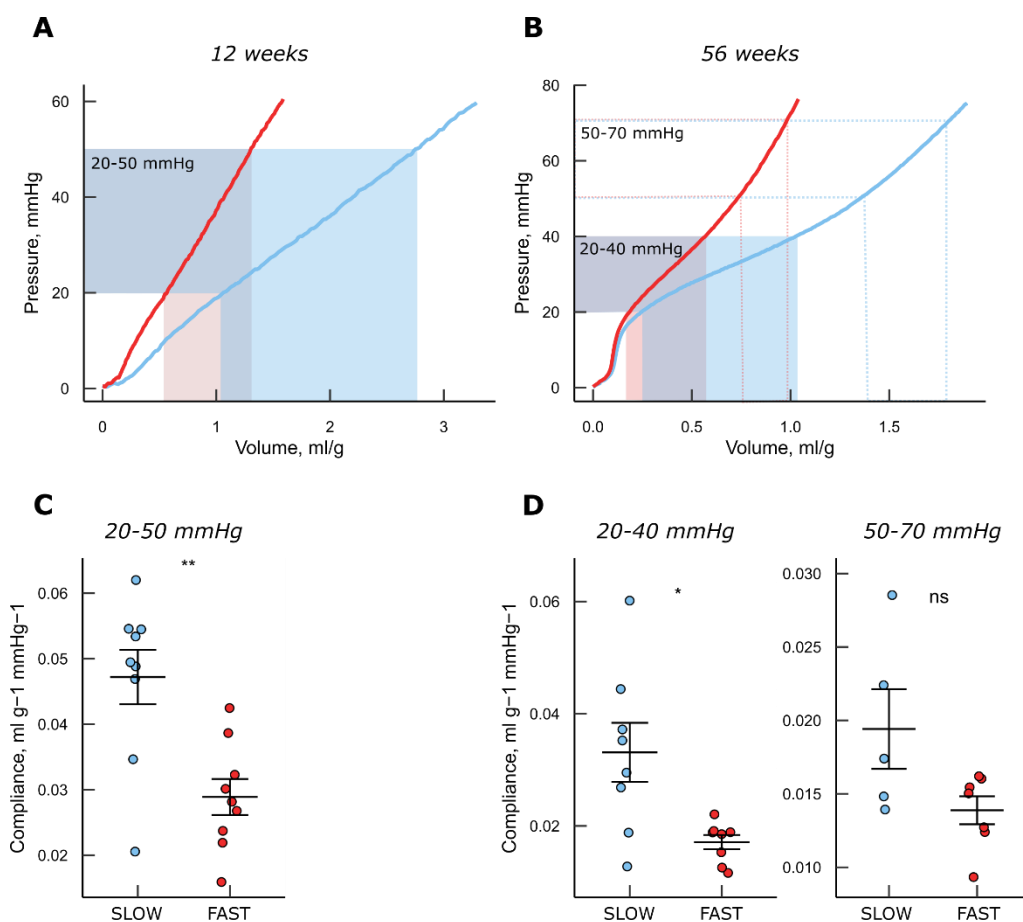


Fig. 15 **Bulbus-compliance**. Bulbus volum-trykklurver ble registrert *ex vivo*, og bulbus compliance ble beregnet som en endring i volum for en gitt endring i trykk standardisert til bulbusmassen. For de små bulbuserne (12 uker etter overføring til sjø) ble compliance målt ved trykkområdet 20-50 mmHg (forventet normalt fysiologisk område; A, C), mens for de større bulbuserne (56 uker i sjøen) ble compliance målt ved to trykkområder: 20-40 mmHg (hviletrykket) og 50-70 mmHg (stress/treningstrykk; B,D).

Til støtte for dette viste ultralydmålinger av maksimal trykkgradient i bulbus (outflow tract, OT) et økt trykk hos raske individer etter 1 og 12 uker til sjøs (fig. 16), noe som indikerer at hjertet må jobbe mot en høyere trykkgradient hos raske individer. Forskjellen i trykkgradient forsvant etter 56 uker til sjøs. Sannsynligvis er dette på grunn av lavere hjertevolum hos den raske gruppa på dette tidspunktet.

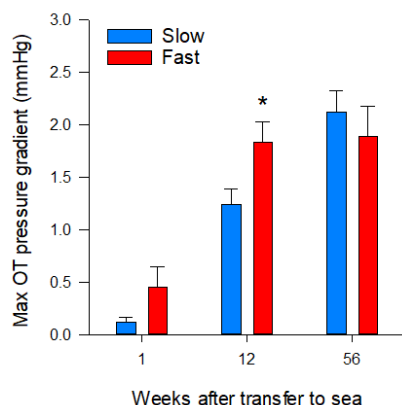


Fig. 16 Maksimal utstrømningsgradient. Den maksimale (max) gradienten for bulbus (OT) er et mål på hvor høyt trykk hjertet jobber mot. En tendens ($P=0,1$) til høyere trykkgradient var tydelig hos rask fisk etter 1 uke til sjøs. Etter 12 uker kunne en større (statistisk signifikant) forskjell observeres. Etter 56 uker til sjøs viste langsom fisk en trykkgradient tilsvarende den raske.

Oppsummert indikerer resultatene våre sterkt at intense, raske smoltprotokoller fører til store og stive bulbuser. Dette fører igjen til at hjertet arbeider mot en større trykkgradient, noe som resulterer i akselerert hjertealdring og for tidlig hjertesvikt.

5.4 AP4 Sammenstilling av hjertedeformiteter hos norsk oppdrettslaks

Sammenstilling av hjertedeformiteter og metoder for å måle dem

Sammenlignet med landdyr fremstår formen på fiskehjertet som en relativt morfologisk plastisk struktur. Dette er tydelig mellom ulike fiskearter, hvor sedate arter har en betydelig forskjell i hjertemorfologi sammenlignet med mer atletiske arter. Men forskjellen sees også innad i fiskearter, og det er en felles forståelse i oppdrettsnæringen om at hjertemorfologi hos oppdrettede arter kan avvike dels betydelig fra den som sees hos tilsvarende villfisk. Dette gjelder også for atlantisk laks, og kunnskap om laksehjertets normale morfologi og de vanligste avvikene er nødvendig kunnskap som bør inngå i enhver sykdomsutredning med mistanke om sirkulasjonsforstyrrelse/sirkulasjonssvikt og akutt død. Bakgrunnen for dette prosjektet var mangel på tilgjengelig kunnskap om de morfologiske avvikene i hjertet som forekommer i den norske oppdrettspopulasjonen av atlantisk laks. Dette har ført til at fiskehelsepersonell har hatt begrensede muligheter for å identifisere og registrere morfologiske avvik på en standardisert og systematisk måte. Følgene av dette er at vi har hatt en manglende overvåking av forekomsten av hjertedeformiteter og at dette problemet i lang tid har gått «under radaren». Mangel på referansemateriale har vært et problem både for det praktiske fiskehelsearbeidet, men også for forskning og prosjektbasert arbeid. Formålet med denne arbeidspakken har vært å lage en referansedatabase med oversikt over de hyppigst forekommende morfologiske avvikene for a) dette prosjektet og b) fiskehelsepersonell i felt. Videre ble det raskt klart at det mangler en standardisert nomenklatur for et normalt, pyramidalt fiskehjerte. Vi startet derfor med å utvikle en detaljert nomenklatur av de viktigste anatomiske strukturene på hjertet. Videre identifiserte vi en manglende kunnskap om villaksens hjertemorfologi i løpet av livet. Denne

kunnskapen er nødvendig for å kunne vurdere avvik på hjertemorfologi hos laks på alle livsstadier, fra yngelstadiet til kjønnsmodne fisk. Resultatet fra arbeidspakken er delt inn i fire deler:

5.4.1. Detaljert nomenklatur av de viktigste anatomiske strukturene i et pyramidalt fiskehjerter, og utvikling av hjertemorfologi hos vill-laks gjennom livsløpet

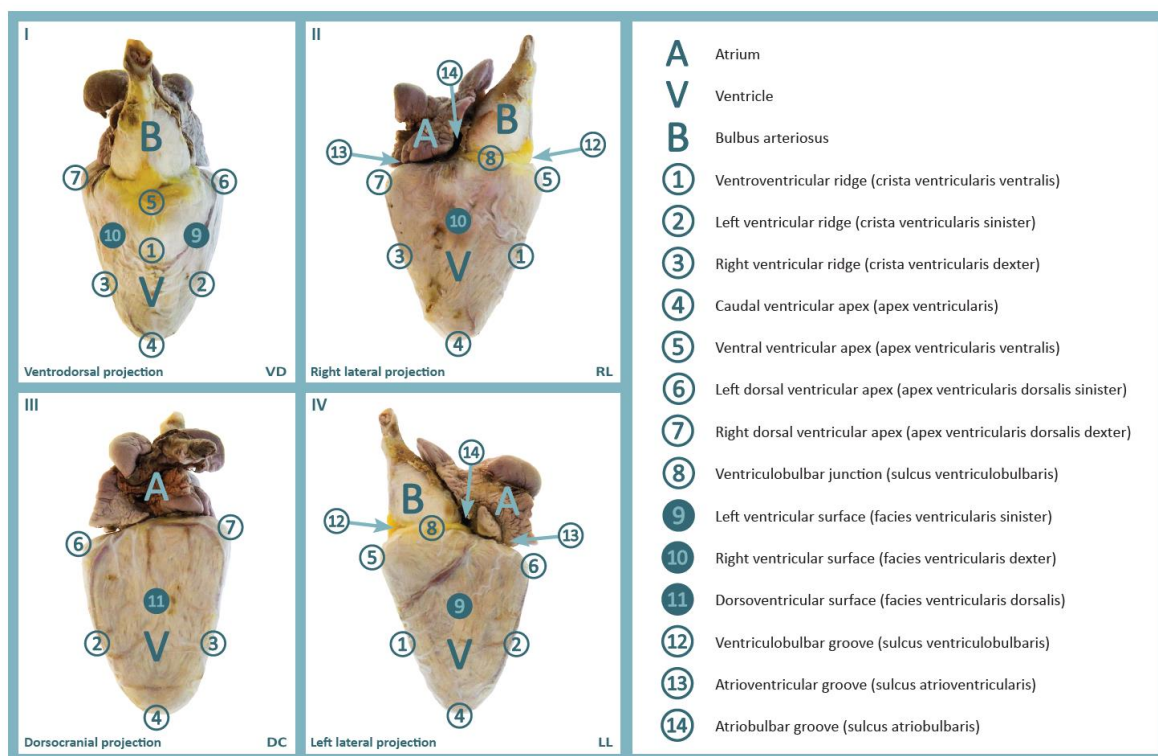
5.4.2. Kvantitativ morfometrisk metode for vurdering av laksehjerter

5.4.3. Kvalitativ morfologisk metode for vurdering av laksehjerter

5.4.4. Semikvantitativ morfologisk metode for vurdering av laksehjerter

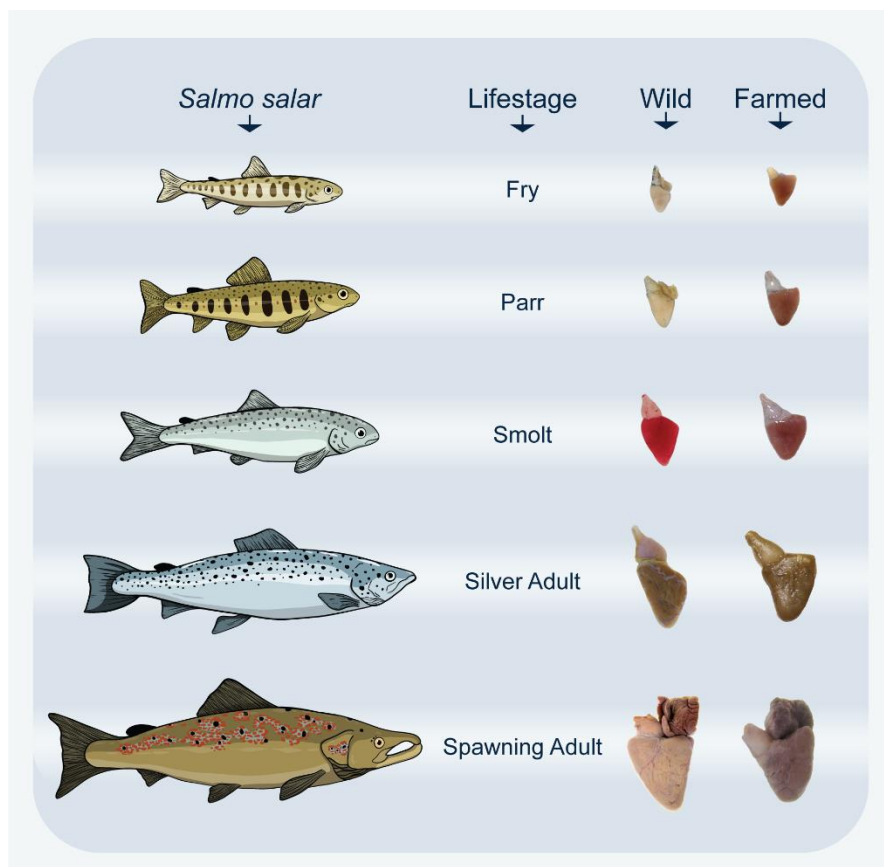
5.4.1. Detaljert nomenklatur av de viktigste anatomiske strukturene i et pyramidalt fiskehjerter, og utvikling av hjertemorfologi hos vill-laks gjennom livsløpet

I denne AP har vi laget støtteverktøy for vurdering av morfologiske avvik i hjertet hos atlantisk laks. I løpet av arbeidet med å utvikle disse verktøyene opplevde vi at beskrivelser av avvik på hjertet var utfordrende uten en detaljert nomenklatur av normale anatomiske strukturer på hjertet. Til nå har denne nomenklaturen bestått av navn på hjertets hovedkamre, overganger mellom kamrene og enkelte punkter på ventrikkelen. Vi startet derfor med å utvikle en detaljert nomenklatur av de viktigste anatomiske strukturene på hjertet (se figur 17). Nomenklatur baserte seg på terminologi benyttet på pattedyr samt standardisert angivelse av plan og retninger [11]. I dette arbeidet ble laks benyttet som modell, men vi mener at denne nomenklaturen vil ha overføringsverdi til alle fiskearter med pyramidalt formet fiskehjerter. Dette forslaget vil bli publisert i fagfellevurdert tidsskrift.



Figur 17. Nomenklatur av hjertet hos atlantisk laks. I – Hjertet i ventrodorsale projeksjon, II – Hjertet i høyre laterale projeksjon, III – Hjertet i dorsokraniale projeksjon, IV – Hjertet i venstre laterale projeksjon.

En annen utfordring vi støtte på i dette arbeidet, var manglende kunnskap om villaksens hjertemorfologi i løpet av livet. Denne kunnskapen er nødvendig for å kunne vurdere avvik på hjertemorfologi hos laks på alle livsstadier, fra yngelstadiet til kjønnsmodne fisk. Vi innhentet derfor materiale fra villaks i de forskjellige livsstadier for å kunne sammenlikne med oppdrettslaks på de samme tidspunktene i livssyklus (se figur 18).



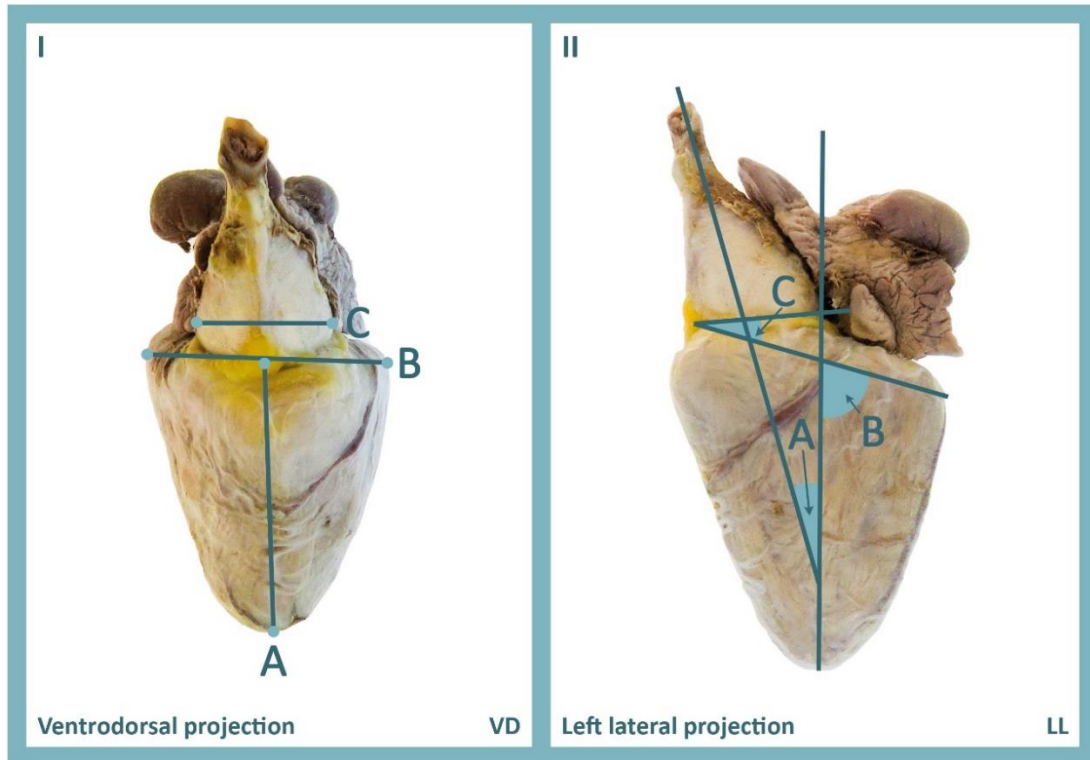
Figur 18. Illustrasjon av den morfologiske utviklingen av hjertet hos villaks og oppdrettslaks.

5.4.2 Kvantitativ morfometrisk metode for vurdering av laksehjerter

Flere kvantitative mål av hjertemorfologi hos laksefisk er tidligere beskrevet i litteraturen. I tillegg har vi i løpet av dette prosjektet utviklet noen nye kvantitative mål for i større grad å kunne beskrive variasjonen i hjertemorfologi (se figur 22). Metodebeskrivelsen vår er også basert på nomenklaturen utviklet i prosjektet (figur 17) noe som gjør den enklere å følge og mer standardisert. Beskrivelsen av metoden er her gjengitt i tabell 2 på engelsk i henhold til nomenklaturen.

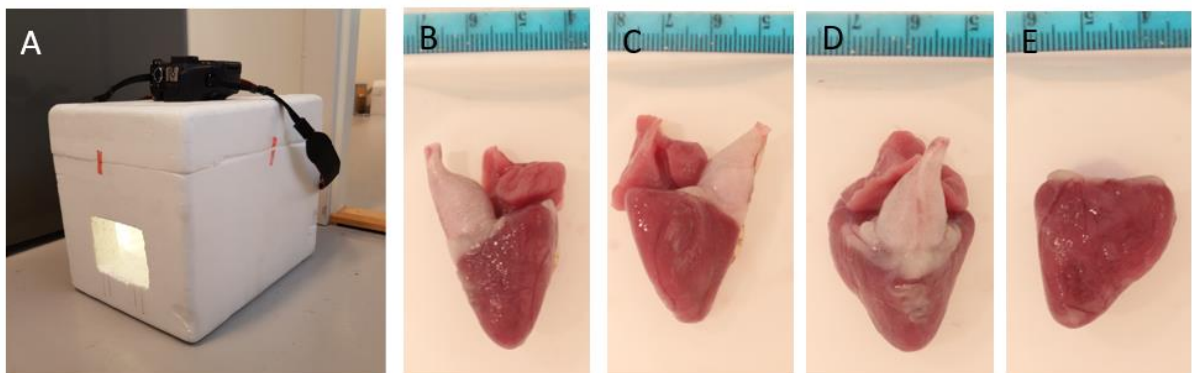
Tabell 2. Beskrivelse av kvalitativ metode for morfologisk vurdering av hjertemorfologi.

Quantitative measurement	Description
Ventricular height : width ratio Figure 19, I, A : B	In VD projection, the ventricular height as obtained by measuring a line from the caudal ventricle apex to the ventriculobulbar groove according to Frisk et al. 2020. The ventricular width was obtained by measuring a line from the right dorsal ventricle apex to the left dorsal ventricle apex. The ratio was calculated by dividing ventricular height on ventricular width.
Bulbus width : ventricular width ratio Figure 19, I, C : B	In VD projection, the bulbus width was obtained by measuring the bulbus on its widest width. The ventricular width was obtained by measuring a line from the right dorsal ventricle apex to the left dorsal ventricle apex. The ratio was calculated by dividing bulbus width by ventricular width.
Alignment of bulbus arteriosus Figure 19, II, A	The angle "alignment of bulbus arteriosus" was first developed and described by Poppe et al. (2003). In LL projection, the angle is obtained by drawing a line from the caudal ventricular apex to the atriobulbar groove. Then a line following the midsection of the bulbus to the lines cross. Angle A was then measured.
Ventricular symmetry (Figure 19, II, B)	In LL projection, the angle "ventricular symmetry" is obtained by drawing a line from the caudal ventricular apex to the atriobulbar groove. Then a line from the ventriculobulbar groove to the left dorsal ventricular apex (LDVA, Figure) was drawn. Of note, although LDVA is relatively easy to locate in wild salmon, this apex may be less distinct in farmed salmon hearts and more difficult to locate. The area surrounding LDVA is often more rounded (instead of pointed) in farmed salmon and LDVA should then be positioned in the mid part of this rounded area. Angle B was then measured.
Bulbus alignment (Figure 19, II, C)	In LL projection, the angle "bulbus alignment" is obtained by drawing a line from the ventriculobulbar groove to the left dorsal ventricular apex. Then a line from the ventriculobulbar groove to the atriobulbar groove following the junction between the ventricle and bulbus. Angle C was then measured.

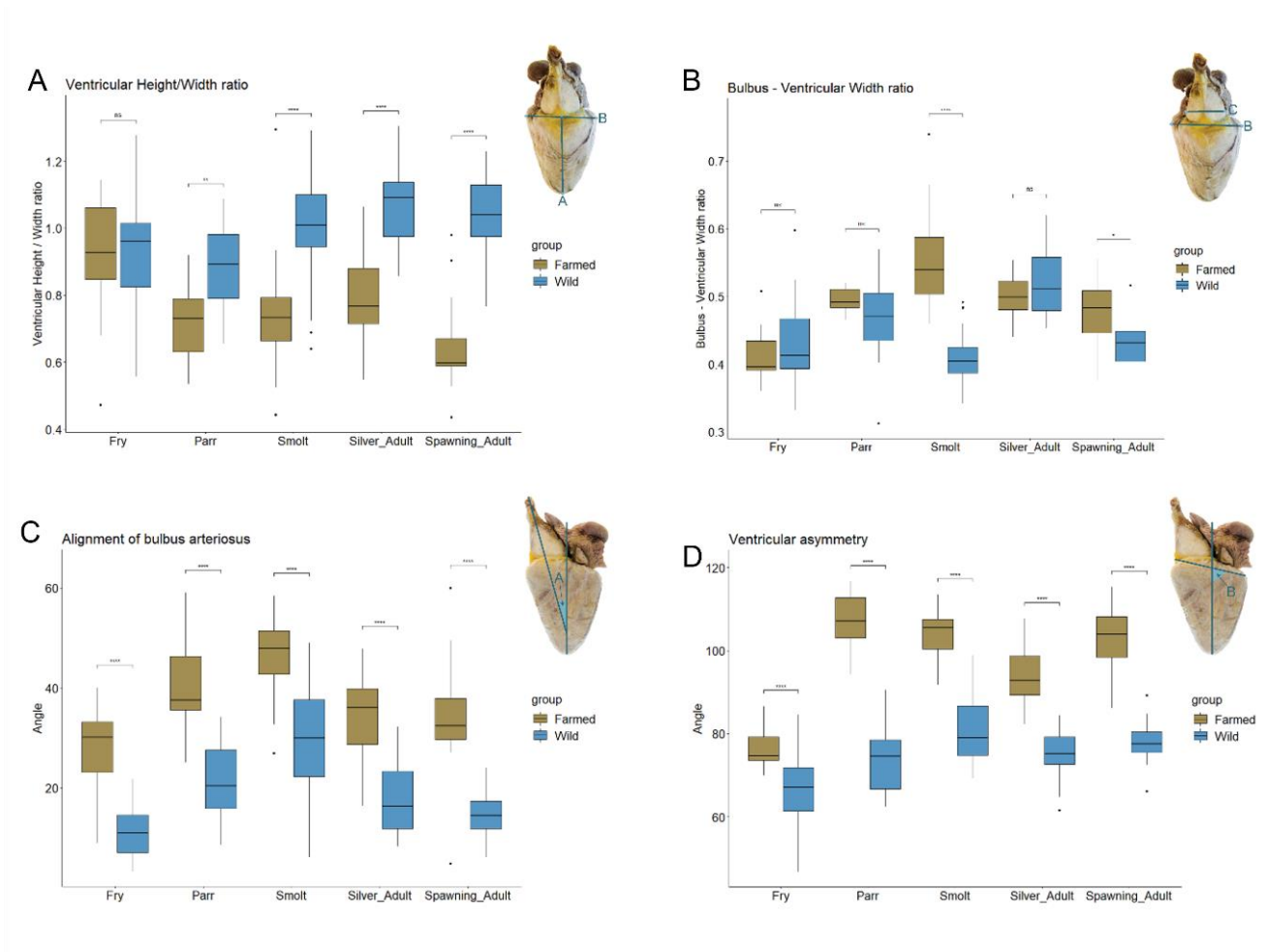


Figur 19. Kvantitative morfologiske mål av hjertet hos atlantisk laks. I- mål fra ventrodorsale projeksjon, II -mål fra venstre laterale projeksjon.

Den kvantitative metoden har vi i tillegg til å vurdere hjertemorfologi i AP3 og på feltmateriale i AP4, brukt til å sammenlikne hjertemorfologi hos villaks og oppdrettslaks gjennom livssyklus (se figur 21).



Figur 20. Oppsett og ulike orientering av hjerter under fotografering. A) Feltoppsett for fotografering av hjerter. Lyssetting i fotoboks (modifisert isopor-boks) sikret lik lyssetting. B) Lateral projeksjon, venstre. Hjertet er avbildet slik det vil framstå sett fra fiskens venstre side. C) Lateral projeksjon, høyre. Hjertet er avbildet slik det vil framstå sett fra fiskens høyre side. D) Ventrodorsal projeksjon. Hjertet er avbildet slik det vil framstå sett fra fiskens underside. E) Caudovertral projeksjon. Hjertet er avbildet slik det vil framstå sett fra fiskens «bakside, skrått ovenfra»



Figur 21. Grafisk fremstilling av morfometriske parametere målt hos oppdrettslaks (brun) og vill-laks (blå).

Som vist i figur 21 finner vi store forskjeller i de kvantitative morfologiske målene mellom villaks og oppdrettslaks stort sett gjennom hele livssyklus (Arntzen Engdal et al. in prep). Som vist tidligere (Poppe et al. 2003), har oppdrettslaksen generelt rundere ventrikler enn villaksen sent i livet som indikert ved lavere ventricular height:width ratio (figur 21A). I dette prosjektet ser vi at denne forskjellen oppstår allerede hos parr og at det ser ut som om forskjellene blir større i løpet av livet. Der oppdrettslaksen ser ut til å få rundere ventrikler jo eldre de blir, får villaksen om noe litt mer avlange ventrikler. I og med at en mer pyramideformet avlang ventrikkle er forbundet med bedre hjertereytelse enn en avrundet ventrikkle, er det sannsynlig at denne utviklingen skyldes vesentlige forskjeller i fysisk aktivitet mellom de to gruppene. Relativ bulbusstørrelse (figur 21B) er et kvantitativt mål utviklet i dette prosjektet. Hos smolt og kjønnsmoden fisk er relativ bulbusstørrelse større hos oppdrettslaks sammenliknet med villaks. Interessant nok viser vi i AP 3 at rask smoltproduksjon er forbundet med forstørrede bulbuser som også er mindre elastiske. Dette vil sannsynligvis øke belastningen på hjertet og kan være en årsak til utvikling av hjertesykdom hos oppdrettslaks. Når det gjelder plasseringen av bulbus på ventrikkelen (figur 21C) støtter våre data tidligere funn som viser at oppdrettslaksen har en mer skjevstilt bulbus enn villaksen. Vi viser

ytterligere at denne forskjellen oppstår allerede på yngelstadiet og vedvarer hele livet.

Ventrikkelsymmetri målt i venstre laterale projeksjon er også et nytt kvantitativt mål utviklet i dette prosjektet. Våre funn viser tydelig at oppdrettslaksen har en helt annen symmetri enn villakshjertet og at denne forskjellen eksisterer fra yngelstadiet til kjønnsmoden laks (figur 21D). Mer presist ser vi en ekstensjon av et område på ventrikkelen som gir en forhøyning av «left dorsal ventricular apex» (LDVA) hos oppdrettslaksen. Det er foreløpig uklart hvorfor denne remodelleringen av ventrikkelen oppstår og hvilke konsekvenser det har for hjertets funksjon. Det kan imidlertid være at LDVA bidrar i utpumping av blod sammen med kaudale ventrikulære apex og at remodelleringen representerer en kompensatorisk remodellering nødvendig for å opprettholde et adekvat slagvolum og minuttvolum.

Selv om disse funnene kombinert gir en indikasjon på laksehjertets utvikling over tid i de to gruppene og kommer til å forenkle vurderingen av avvikende hjertemorfologi hos oppdrettslaks i forskjellige faser av livssyklus, må sammenlikningen mellom gruppene behandles med noe forsiktighet. For det første er sammenlikningen på enkelte livsstadier basert på et relativt lavt antall individer fra et begrenset geografisk område i Norge. For det andre er ikke fisken i de to gruppene nødvendigvis størrelses-matchet selv om de befinner seg i samme livsstadium.

Det som imidlertid bekreftes i denne sammenlikningen av villaks og oppdrettslaks er brukbarheten av den kvantitative metoden når man, som i AP 3, sammenlikner ganske distinkte grupper av laks som er vokst opp under forskjellige miljøforhold. Disse vurderingene støttes av konklusjonene etter at den kvantitative metoden ble brukt til å sammenlikne hjertemorfologi i ulike grupper av laks samlet inn fra oppdrettslaks og vill-laks i Midt-Norge.

5.4.2-1 Bruk av den kvantitative metoden på materiale innsamlet av Aqua Kompetanse fra oppdrettslaks og villaks i Midt-Norge

Hjerter er samlet fra matfisklokaliteter og settefisklokaliteter i Produksjonsområde 7 samt fra tilbakevandrende vill laks fanget med kilenot i Namsenfjorden. Prøvene er tatt ut ved anledning i tilknytning til helsekontroller og behandlingsoppfølging på lokalitetene. I settefiskanleggene er uttakene gjort i løpet av smoltifiseringsperioden. På anleggene i sjø er uttakene gjort gjennom hele produksjonsperioden fra utsett til slakt med en overvekt i siste del av produksjonsperioden. Prøvene stammer fra både svimere, død og levende fisk. Dødsårsak er ikke angitt da det i dette materialet er fokusert på å sammenlikne de tre gruppene vårmolt, høstmolt og villfisk.

Kategoriene høst og vårmolt i dette feltmaterialet sammenfaller til en viss grad med «fast» og «slow» gruppene i den eksperimentelle delen av prosjektet. Kriteriet for å bli kategorisert som høstmolt i dette materialet er at alder ved utsett i sjø er mindre enn 10 mnd. Kriteriet for å bli

kategorisert som vårmolt er alder på 10 mnd. eller mer ved utsett i sjø. Alder ved utsett for høstmolten varierte fra 6,5 mnd. og opp til 10 mnd. mens alder ved utsett for vårmolten varierte fra 10 mnd. til 17 mnd. Pga lang produksjonsperiode i settefiskfasen ble to av de eldste smoltgruppene kategorisert som vårmolt i sjøfasen selv om de ble satt i sjø om høsten.

Tabell 3. Oversikt over innsamlet materiale og utførte morfometriske målinger. Tall representerer antall fisk de forskjellige målene er utført på:

Fase	Smoltproduksjon	Ventricle height: ventricle width	Bulbus width: ventricle width	Alignment of bulbus arteriosus	Ventricular symmetry
Settefisk	Rask/Høst	59	59	56	59
Settefisk	Treg/Vår	271	271	266	270
Sjø	Rask/Høst	391	390	337	383
Sjø	Treg/Vår	112	112	108	111
Sjø	vill	44	40	31	41

Det er en svakhet i materialet at det er blitt en forholdsvis stor antallsforskjell i de ulike gruppene og at det er ulik fordeling mellom vårfisk og høstfisk i settefisk og på sjø. Det er en overvekt av vårfisk fra settefiskanlegg og en overvekt av høstfisk på sjø. Det kan også skape noe støy at prøveuttakene er gjort på forskjellige tidspunkt i smoltifiseringsperioden i de ulike settefiskanleggene.

Når vi gjør sammenlikninger høstsmolt, vårmolt og villaks finner vi imidlertid igjen flere av funnene fra tidligere arbeidspakker i prosjektet. Under sammenstilles de viktigste funnene

Ventricular height : width ratio

I den eksperimentelle delen av prosjektet ble det funnet at rask smolt hadde lavere ventricular height : width ratio sammenliknet med den trege smolten i settefiskfasen.

Vi fant ikke forskjeller i vårt materiale for dette målet mellom høstfisk og vårfisk. Det var imidlertid en tydelig indikasjon på at oppdrettslaksen utviklet rundere hjerter (lavere ventrikkel høyde :bredde ratio) i løpet av produksjonstiden fram til slakt. Dette ser vi ved at ventricular height : width ratio var lavere i matfiskanleggene sammenliknet med settefiskanleggene. Det var signifikant forskjell mellom oppdrettslaks og villaks for dette målet.

Bulbus width : ventricular width

I den eksperimentelle delen ble det funnet at bredden på bulbus relativt til bredden på ventrikkelen var større for den raske smolten sammenliknet med den trege smolten. Vi gjør de samme funnene av større bulbuser hos høstsmolten sammenliknet med vårsmolten i settefiskfasen. I sjøfasen finner vi ikke igjen de samme forskjellene.

Alignment of bulbus arteriosus

Denne vinkelen er lavere for den trege smolten sammenliknet med den raske i den eksperimentelle delen. Vi finner den samme forskjellen mellom høst og vårfisk i settefiskanleggene. På sjø har imidlertid gruppene «byttet om» slik at vårsmolten har noe høyere vinkel enn høstsmolten. Dette kan være et resultat av at vi har usikre data for høstsmolt i settefiskfasen (liten N) og vårsmolt på sjø (liten N). Det er signifikant forskjell mellom oppdrettslaks og villaks der villaksen har mye mindre vinkel enn oppdrettslaksen.

Ventricular symmetry

Både i smoltperioden og på sjø er denne vinkelen mindre i den trege gruppen sammenliknet med den raske i den eksperimentelle delen. Dette sammenfaller med resultatene i feltmaterialet der vårsmolten har en mindre vinkel sammenliknet med høstsmolten. Vi ser også at vinkelen er høyere i sjøfasen i begge grupper sammenliknet med ferskvannsfasen. Villaksen har signifikant mindre vinkel sammenliknet med oppdrettslaks.

Med unntak av høyde:bredde ratio fant vi de samme forskjellene i settefiskfasen mellom høstsmolt og vårsmolt i feltmateriale fra Midt-Norge som mellom henholdsvis rask og treg smolt i det eksperimentelle forsøket i arbeidspakke 1. Når det gjelder sammenlikningene mellom villaks og oppdrettslaks er de sammenfallende med funnene i tidligere arbeidspakker. Det er også en klar trend i dette materialet at de morfologiske trekkene hos både vårsmolt og høstsmolt «forverrer» seg i løpet av produksjonsperioden i den forstand at forskjellene mellom oppdrettslaks og villaks blir større.

Selv om vi finner igjen de samme forskjellene i feltmaterialet som i det eksperimentelle materialet er ikke forskjellene like tydelige. Det er som forventet da den gjennomsnittlige forskjellen i produksjonsperioden i ferskvannsfasen mellom høstsmolt og vårsmolt er mindre enn i det eksperimentelle materialet. Vi gjorde derfor en sammenlikning mellom den tregeste vårsmolten (16 mnd. ved utsett i sjø) med den raskeste høstsmolten (6,5 mnd. ved utsett i sjø). Da ble funnene fra datamaterialet i arbeidspakke 1 reproduisert med signifikante forskjeller.

Det fungerte generelt godt å utføre de morfometriske målingene i henhold til beskrivelsen (Tabell 2). Erfaringsvis ser vi at det kan oppstå utfordringer dersom det er stor morfologisk variasjon i bulbus og aorta. Hvis bulbus har krumming til høyre/venstre eller aorta har en s-form er det ikke alltid entydig hvor aksen gjennom bulbus skal trekkes. Med ytterligere beskrivelse av protokollen kan det lages retningslinjer som sikrer standardisering også i disse tilfellene. I tilfeller med ekstreme morfologiske avvik vil den kvalitative/semikvantitative metoden være mer egnet enn den kvantitative. I dette materialet har vi derfor utelatt fiskegrupper med svært høy forekomst av avvikende morfologi.

Basert på arbeidet med dette materialet vurderer vi metoden som godt egnet for å fange opp bestemte morfologiske trekk. Den er også egnet for sammenlikning av grupper eller overvåking av morfologiske trekk over tid. Den kvantitative metoden er også en metode som vil være mindre påvirket av subjektive vurderinger sammenliknet med de andre metodene.

Vi vil se på mulighetene for å komplettere og supplementere datasettet for å få et endra bedre materiale samt utvikle denne metoden for å beskrive hjertemorfologi.

5.4.3 Kvalitativ morfologisk metode for vurdering av laksehjerter

Basert på innhentet materiale i dette og andre pågående prosjekter har vi utviklet en kvalitativ metode for vurdering av hjertemorfologi hos laks. Metoden består av et scoringssystem der fenotypiske trekk registreres som tilstede (1) eller fraværende (0). Dette fordi den kvantitative metoden ikke fanger opp all variasjonen i hjertemorfologi observert hos norsk oppdrettslaks. Scoringssystemet inkluderer 38 morfologiske trekk (se figur 22) som er vurdert relativt frekvente i

materialet metoden er basert på og etter flere års erfaring med undersøkelser av hjertet i forbindelse med fiskehelsekontroller (Aqua kompetanse).

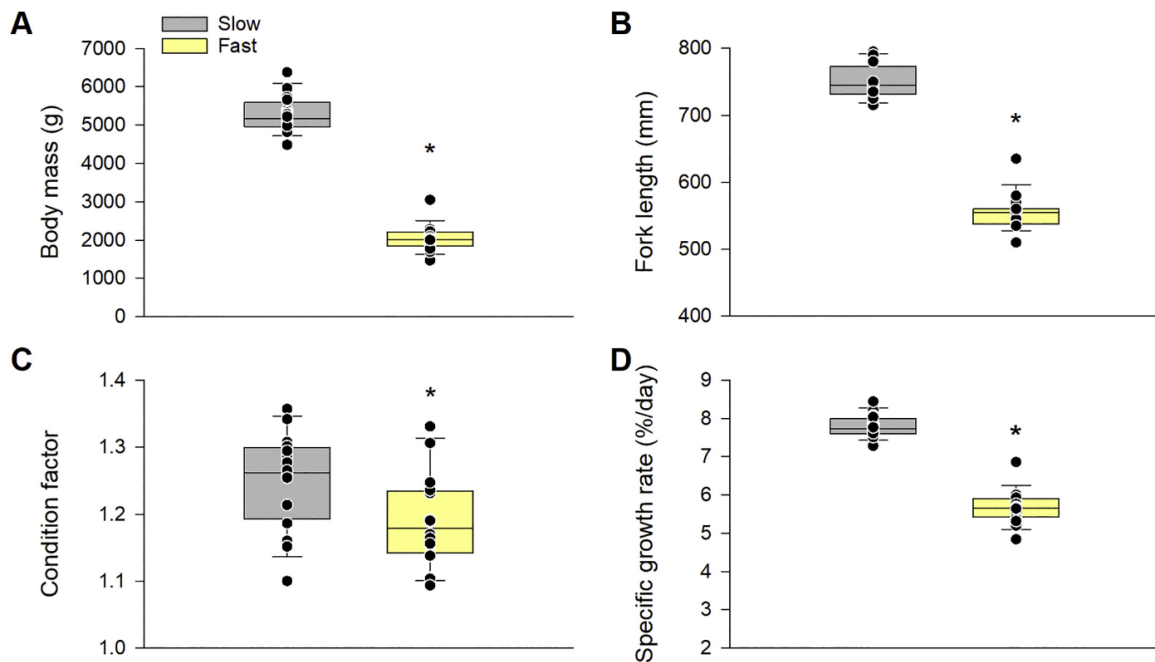


Figur 22. Kvalitativ metode. Scoringssystem for kvalitativ vurdering av hjertet med 38 vanlig forekommende fenotypiske trekk på hjertet observert hos norsk oppdrettslaks.

5.4.3-1 Hjertedeformiteter knyttet til produksjonsforhold basert på feltmateriale

Initialt i prosjektet ble hjertemorfologi hos raskt og saktevoksende smolt undersøkt i en kommersiell setting på en lokalitet. Resultatene fra dette arbeidet ble publisert i 2020 (Frisk et al. 2020). Dette arbeidet ble gjort i samarbeid med Ellingsen seafood og fisk ble prøvetatt fra lokaliteten Korsnes (Ellingsen seafood AS, 8°19'53.3"N 14°56'53.6"E). Den raskt - og saktevoksende smolten ble produsert på samme settefiskanlegg (Silver Seed, Mølnerodden, 68°00'32.3"N 13°10'03.2"E), men med ved hjelp av forskjellige smoltproduksjonsprotokoller. Den trege ble produsert på (gjennomsnitt $\pm$ SD) 7,9 $\pm$ 3,2 °C over en periode på 17,7 måneder. Den raske gruppa ble produsert på (gjennomsnitt $\pm$ SD) 12,5 $\pm$ 1,8 °C over en periode på 11 måneder. Fisken ble satt ut på sjø høsten 2018 og prøvetatt omtrent ett år etter sjøutsett (oktober 2019).

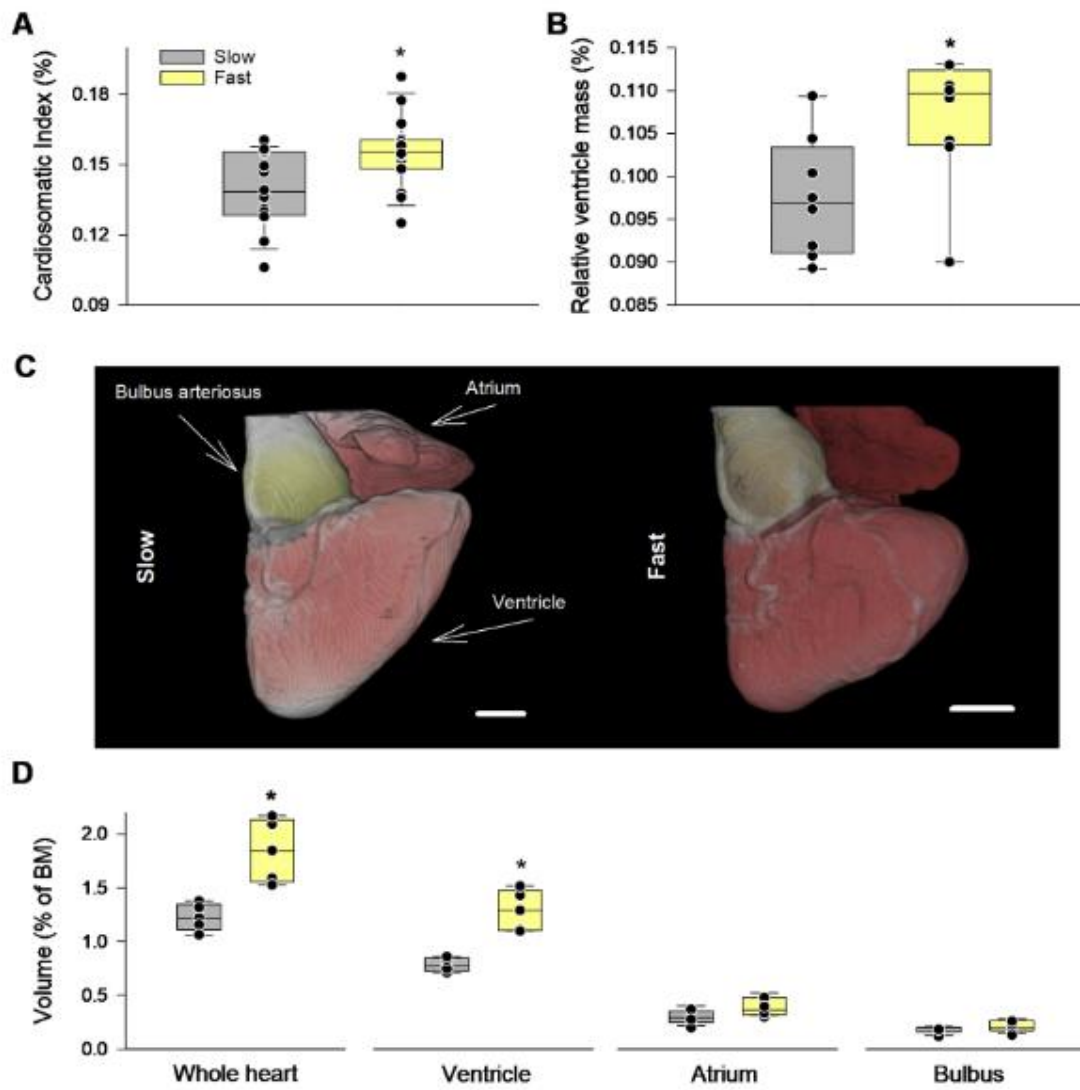
Etter ett år i sjø, så vi store forskjeller mellom de to fiskegruppene både i forhold til tilvekst, men også på hjertemorfologi. Kroppsmasse, gaffellengde og kondisjonsfaktor var alle redusert etter omtrent ett år i sjø hos voksen laks oppdrettet med en rask smoltproduksjonsprotokoll sammenlignet med en langsom protokoll (se figur 23). Tilsvarende var spesifikk tilveksthastighet lavere hos hurtigprodusert smolt (figur 23D)



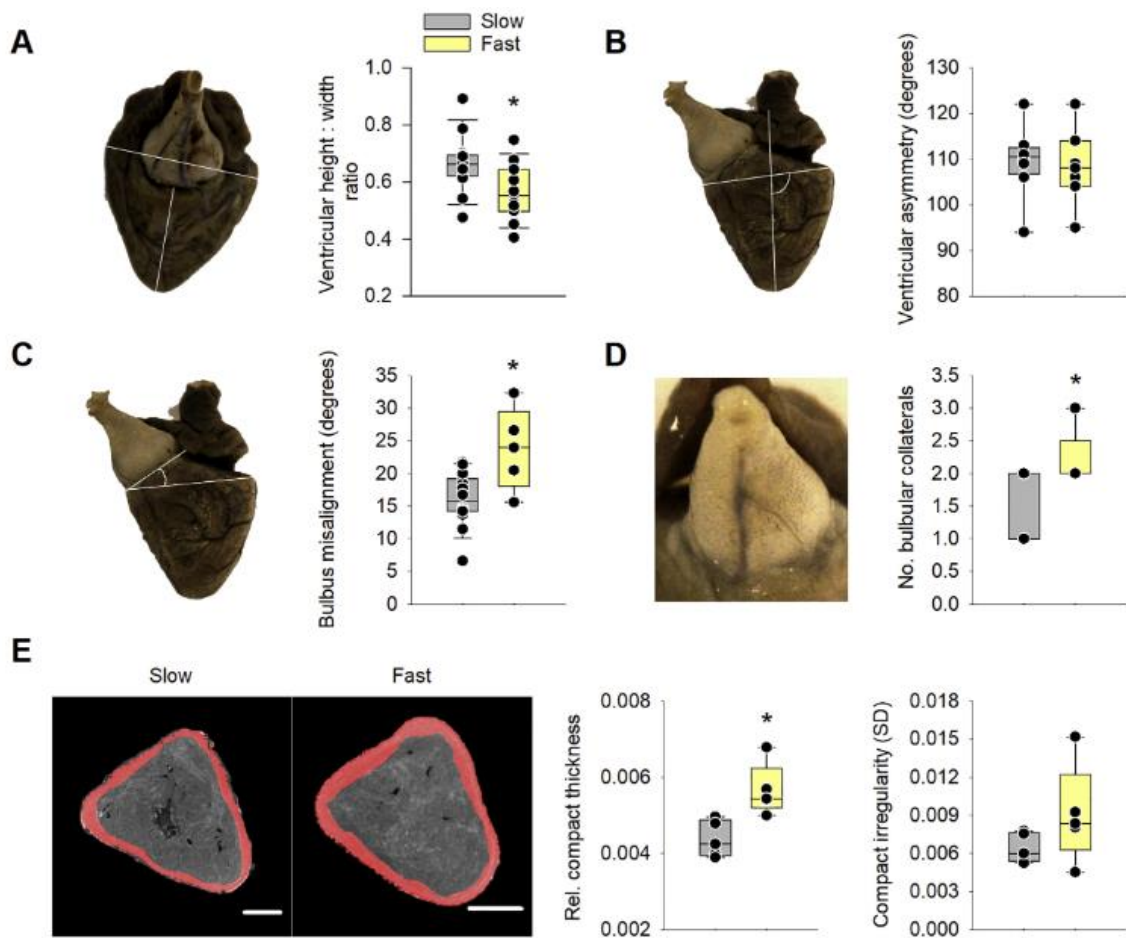
Figur 23. Tilvekst av raskt – og tregtvoksende smolt i felt. Rask smoltproduksjon er forbundet med lavere vekst i havet.

Den raske gruppa hadde også større hjerter enn den trege gruppa (figur 24), indikert ved høyere relativ hjertevekt (CSI, fig. 24 A) og relativ ventrikkelmasse (RVM, fig. 24 B). Fra MRI-skanninger fant vi at den raske smolten også hadde større hjerte – og ventrikkelvolum relativt til kroppsmasse (fig. 24 D).

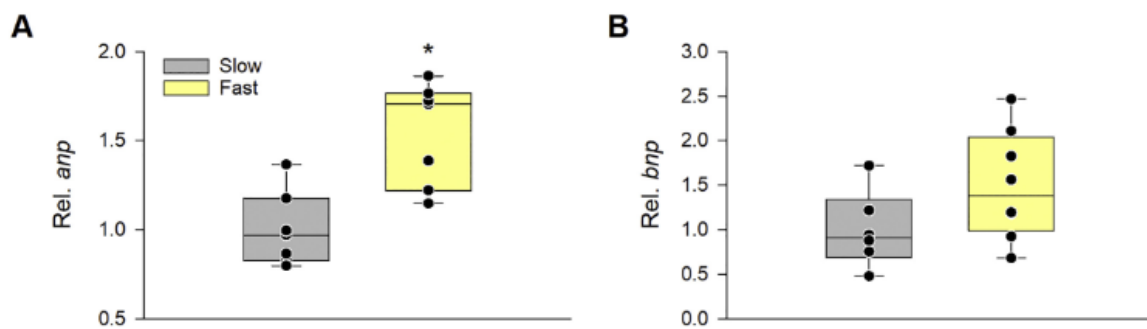
Vevskomposisjon og hjertemorfologi ble også undersøkt i den raskt og tregtvoksende laksen hos Ellingsen seafood (se fig. 25). Der fant vi at den raske gruppa hadde rundere og kortere ventrikler (fig. 25 A), mer feilstilte bulbuser (fig. 25 C) og flere forgreininger av hovedkoronararterien på bulbus (fig. 25 D). De hadde også et tykkere lag kompaktum sammenliknet med den treige gruppa (fig 25 E). Sett sammen med et høyere genuttrykk av sykdomsmarkører (natriuretiske peptider, se fig. 26) tyder dette på økt belastning av hjertet i den raske gruppa.



Figur 24 Hjertestørrelse hos tregt – og rasktvoksende smolt i felt.



Figur 25. Hjerterkomposisjon – og morfologi hos treigt – og rasktvoksende smolt i felt.



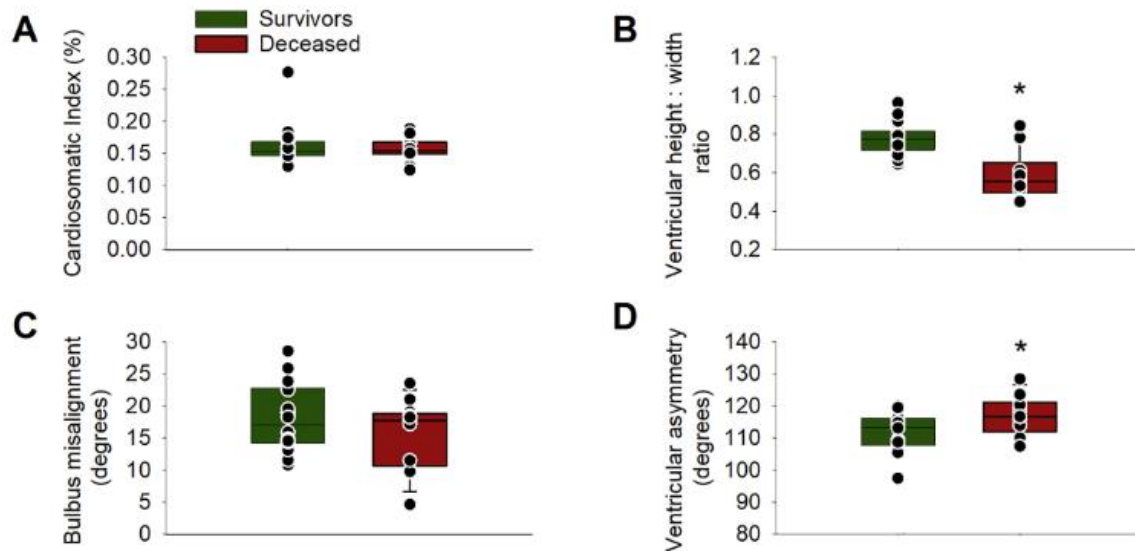
Figur 26. Stressmarkører i hjertet. Hjertesykdomsmarkører hos rask (fast) og treigt (slow) smolt etter et år i sjø.

Resultatene fra studien i felt støtter opp under resultatene fra den eksperimentelle studien i prosjektet som indikerer at rask tilvekst i ferskvannsfasen er forbundet med utvikling av avvikende hjertemorfologi og hjertesykdom i sjø.

5.4.3-1 Hjertedeformiteter knyttet til dødelighet basert på feltmateriale

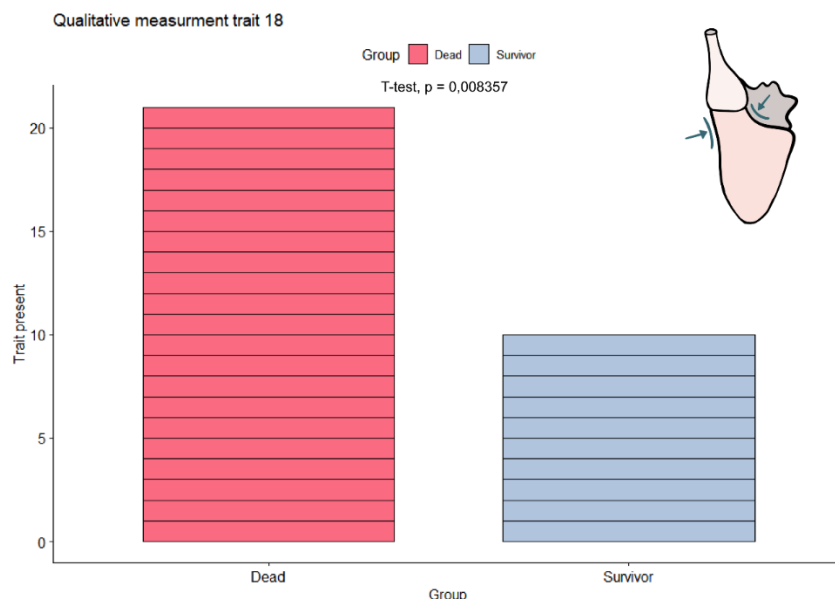
For å kunne knytte hjertedeformiteter til dødelighet i felt, vurderte vi hjertemorfologi både kvantitativt og kvalitativt hos fisk som enten overlevde eller døde etter mekanisk avlusning ved tre forskjellige avlusningsepisoder. Når vi brukte den kvantitative metoden fant vi ingen forskjeller i

hjertermorfologi mellom overlevende og dødfisk hvis vi slo sammen alle avlusningsepisodene. Hvis vi derimot så på avlusningsepisodene isolert fant vi derimot at en lav ventrikulær høyde:bredde ratio var forbundet med dødelighet (se fig.27 B). Dødfisken hadde også mer asymmetriske hjerter (se fig. 27 C).



Figur 27. Kvantitative hjertemål forbundet med dødelighet etter avlusning.

Det var ønskelig i prosjektet å identifisere hjertemorfologi forbundet med dødelighet på generell basis, så den kvalitative metoden ble brukt på det samme materialet for å undersøke om noen av de kvalitative avvikene var forbundet med dødelighet på tvers av lokaliteter og avlusningsepisoder. Ett kvalitativt mål (fig. 28, nr. 18 i fig. 22) der vi ser en innsnevring av ventrikkelen ved ventriculobulbare junction var overrepresentert hos dødfisken på alle lokaliteter og ser ut til å representere en morfologi som gjør fisken mer sårbar for stressende håndtering. Metoden ble testet på et begrenset materiale og vi håper at vi i fremtiden vil kunne identifisere flere morfologiske trekk forbundet med dødelighet. I så fall kan det tenkes at den kvalitative metoden for vurdering av hjertemorfologi vil kunne brukes i risikovurdering før mekanisk avlusning.



Figur 28. Kvalitativt avvik forbundet med dødelighet etter mekanisk avlusning i felt.

5.4.4. Semikvantitativ morfologisk metode for vurdering av laksehjerter

Selv om dette ikke var en del av prosjektbeskrivelsen, ønsket vi å videreutvikle den kvalitative beskrivelsen av pyramidale hjerter til en semikvantitativ modell. Fordelen med et slik system vil kunne være en lettere vurdering av kumulative avvik til en samlet score, samt at det vil gjøre det lettere å vurdere utvikling i hjertehelsen over tid. Totalt ble det identifisert en scorebar kategori for atrium, 11 scorebare kategorier for ventrikkell, seks scorebare kategorier for bulbus arteriosus, og en scorebar kategori for koronarkar; se figur 29. Videre ble det vurdert som mulig å score på tre ulike nivåer; normalt (score 0), mild til moderat grad av avvik (score 1), og rikelig til uttalt grad av avvik (score 2). En mer gradert manuell scoring ble vurdert som vanskelig og lite reproducerbar. Den totale makroskopiske hjertescoren ble fremstilt som summen av hver enkelt score.

A)

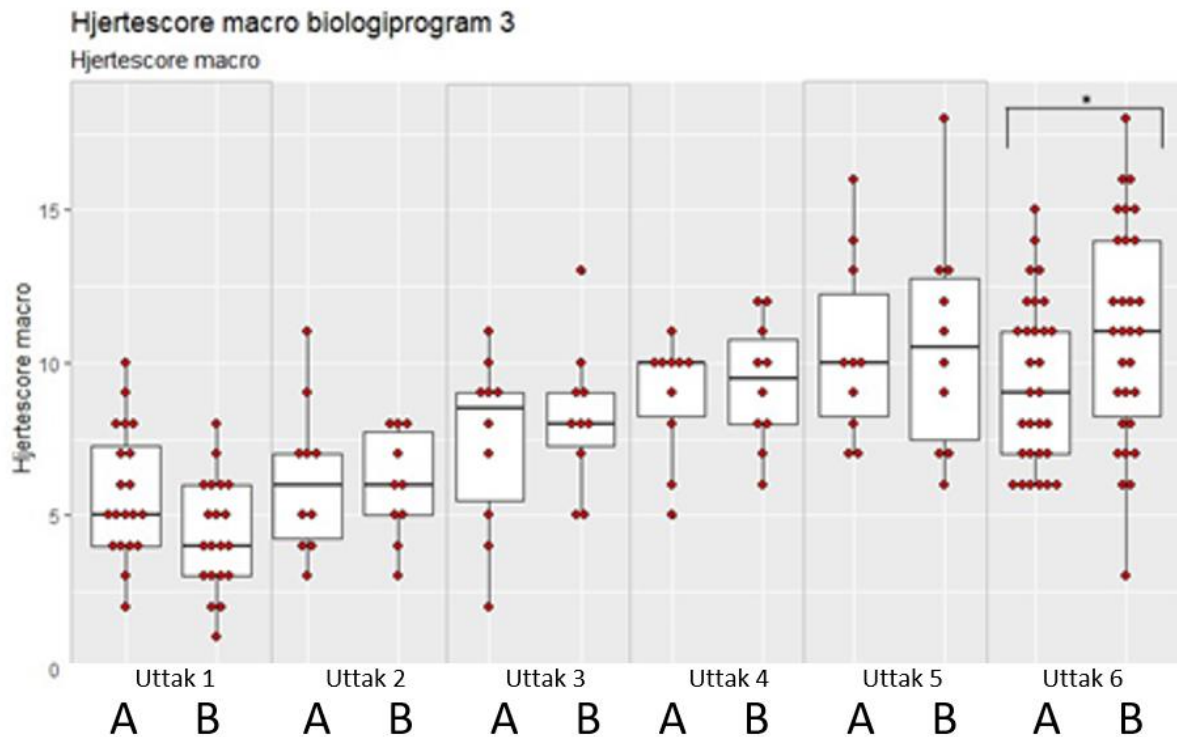
Vurdering atrium	Vurdering ventrikkell	Vurdering bulbus arteriosus	Vurdering koronarkar
Forstørret atrium / dilatasjon	Høy høyre «skulder» / lav venstre «skulder» ventrikkell	Utposning bulbus	Avvik koronarkar
	Kort lengdeakse ventrikkell	Innsnevring bulbus	
	Kort høydeakse ventrikkell	Felstilt bulbus	
	Avrundet ventrikkell	Skeiv akse/ bøyt bulbus	
	Innsøkk venstre side ventrikkell	Fettavleiringer bulbus	
	Innsøkk høyre side ventrikkell	Hypoplasi bulbus	
	Innsøkk dorsalflate		
	Buet ventralrygg ventrikkell		
	Fettavleiringer ventrikkell		
	Melanisering ventrikkell		
	Fibrose ventrikkell		

B)

A	Utposning bulbus arteriosus	B	Innsnevring bulbus	C	Skeiv akse/ bøyt bulbus	D	Kort lengdeakse ventrikkell
Normal		Normal		Normal		Normal	
Grad 2		Grad 2		Grad 2		Grad 2	
E	Avrundet ventrikkell	F	Fibrose ventrikkell	G	Høy «høyre skulder»	H	Fettavleiring ventrikkell
Normal		Normal		Normal		Normal	
Grad 2		Grad 2		Grad 2		Grad 2	

Figur 29: Semikvantitativ scoringsmodell for avvikende hjertemorfologi. A) Scorebare kategorier delt inn etter hjerteavdeling. B) Eksempler på hjerter som ble vurdert som normale (grønn) samt rikelig til uttalt avvikende (rød; tilsvarende score 2) for utvalgte kategorier.

Som et ledd i overvåkningen av fiskehelsen i et biologiprogram for en utviklingskonsesjon ble hjertehelsen vurdert. En sammenfatning av utvikling av hjertehelse vurdert med den semikvantitative modellen er gjengitt under som et eksempel på hvordan denne metoden er tenkt benyttet (figur 30).



Figur 30: Eksempel på overvåkning av makroskopisk hjertefasong ved hjelp av semikvantitativ scoringsmodell for avvikende hjertemorfolog i biologiprogram 3: A- semilukket merdssystem, B- kontrollmerd med luseskjørt, hvert punkt tilsvarer en fisk. Fra figuren sees en gradvis økende score ut i produksjonssyklusen med økende størrelse på fisk. I de fem første uttakene sees ingen avvik mellom A og B, mens ved siste uttak sees det en statistisk signifikant høyere score for B (Kruskal-Wallis test ($p > 0,05$), Dunn's multiple pairwise-comparisons). Merk også økende individuell spredning med økende størrelse på fisk.

Hjertene undersøkt og scoret i biologiprogrammet ble vurdert av en person gjennom hele prosjektet. Optimalt sett bør en slik scoringsmodell undersøkes av to eller flere som undersøker samme hjerter flere ganger hver seg (hvor «inter-rater» og «intra-rater» variasjon bestemmes). Det ble ikke tid nok i prosjektet til å gjennomføre en slik statistisk validering av modellen. På et utvalg av hjerter ble imidlertid modellen benyttet av to ulike personer på samme hjerter, og det var tydelig at scoringene kunne variere betydelig mellom de to personene. Dette indikerer at bruk av denne modellen krever en viss grad av trening, og for sammenligning av fiskegrupper kan det være en fordel at scoringene gjennomføres av samme person. Likevel tror vi at en slik modell kan være viktig for vurdering av hjertehelse over tid, og vi mener at maskinlæring vil være optimalt for en bedre kvantitativ oppløsning og mer konsistent evaluering. Vi håper derfor at arbeidet med denne

semikvantitative modellen kan fortsette slik at dette kan bli et verktøy for bruk i felt. Videre håper vi at denne modellen kan fungere som et utgangspunkt for utvikling av maskinlæringsalgoritmer.

Oppsummering AP4

Prosjektet har bidratt med å utvikle en standardisert anatomisk nomenklatur for et pyramidalt fiskehjerte (5.4.1). Dette vil være viktig for videre karakterisering av både normale og avvikende hjerter.

Det har vært høyt prioritert å utvikle et verktøy til bruk i det daglige fiskehelsearbeidet som er enkelt og praktisk i bruk og som gjør det mulig å gjøre standardiserte registreringer. Til denne brukes vil vi tro at den kvalitative metodikken (5.4.3) er best egnet. Målet var å utvikle en operasjonell modell for vurdering av ulike typer avvik. Ønsket var et verktøy som kunne klassifisere de ulike typene avvik i hjertemorfologi på en systematisk måte. Vår hypotese er at enkelte typer avvik er mer disponerende for nedsatt prestasjon og dødelighet enn andre. Det utelukkes heller ikke at noen av de morfologiske trekkene som vi klassifiserte som avvik, ikke utgjør noen funksjonell betydning. Et viktig arbeid i kommende tid vil derfor være å sammenligne hjertemorfologi med produksjonsdata for å avdekke dette forholdet. Vi mener at dette vil være viktig i videre arbeid med hjertehelse, hvor funn av ulike typer avvik kan relateres til produksjonsforhold, og hvor disse avvikene optimalt sett kan benyttes i avlsarbeid og helsevurdering (for eksempel ved vurdering av ulike driftsbetingelser). Oppfølgende fiskehelsearbeid og eventuelle prosjekter vil kunne avdekke betydningen av de ulike avvikene.

Den viktigste bruken av den kvantitative metodikken (5.4.2) har i dette prosjektet vært å sammenlikne forskjeller mellom fiskegrupper. Vi ser at mange av avvikene ikke fanges opp av de kvantitative målingene, men for noen bestemte avvik er den godt egnet. Dette er også en metode som vil være mindre påvirket av subjektive vurderinger sammenliknet med de andre metodene. Vi vurderte metoden som best egnet for forskningsformål og mer detaljert overvåkning av hjertehelse.

Den semikvantitative metoden (5.4.4) er den mest detaljerte metoden. Ved å følge fiskegrupper over tid klarte vi å vise en gradvis økende grad av avvik med økende størrelse på fisk innad i fiskegruppen. Denne vil kunne danne et grunnlag for den kvalitative metoden og være et godt egnet verktøy til bruk i forskning og mer detaljert overvåkning av hjertehelse. Den semikvantitative metoden er også bygget på et system som gjør det enkelt å ta inn nye morfologiske avvik som måtte oppstå. Det var imidlertid klart at scoringsmodellen var betydelig preget av subjektiv vurdering, og i gjennomførte pilotforsøk var forskjell i vurdering mellom observatører høy. Modellen trenger derfor ytterligere forbedring og statistisk testing. Vi mener derfor at denne modellen krever trening for å

gjennomføre, og at den, slik den eksisterer nå, ikke er egnet for rutinemessig bruk i felt uten tilstrekkelig trening.

6. Hovedfunn

- Produksjonsforhold i ferskvannsfasen bidrar til utvikling av kjente morfologiske avvik på oppdrettshjertet. Rask smoltproduksjonsprotokoll der fisken går på høyere temperaturer er forbundet med flere morfologiske avvik på hjertet. Motsatt ser vi at en mer langsom smoltproduksjonsprotokoll der fisken går på lavere temperaturer er forbundet med færre morfologiske avvik og at laksen får hjerter som likner mer på villakshjertet.
- Intensiv smoltproduksjonsprotokoll og avvikende hjertemorfologi er forbundet med akselerert avstivning av hjertet og symptomer på hjertesvikt senere i livet. Det er derfor stor grunn til å tro at rask smoltproduksjon bidrar til hjertesykdom hos norsk oppdrettslaks og at dette bidrar til dødelighet hos laks som nærmer seg slakt.
- Vi har utarbeidet ny nomenklatur for viktige referansepunkter på det pyramidale fiskehjertet. Denne nomenklaturen bruker vi 1) for å standardisere og enklere beskrive eksisterende og nye kvantitative mål på hjertemorfologi og 2) i utviklingen av et kvalitativt scoringssystem som inkluderer de vanligste morfologiske avvikene observert på hjertene hos norsk oppdrettslaks.
- Disse metodene kan benyttes i forskning og av oppdrettsnæringen og vil lette det videre arbeidet med å forstå hjertesykdom hos oppdrettslaks.

7. Referanser

1. Grefsrud ES, Glover K, Grøsvik BE, Husa V, Karlsen Ø, Kristiansen TS, et al. Risikorapport norsk fiskeoppdrett 2018. 2018.
2. Poppe T, Sverdrup A, Kongtorp RT, Krogdahl A, Storset A, Bæverfjord G, et al. Rapport om hjertelidelser hos laks og regnbueørret. 2014.
3. Poppe TT, Johansen R, Gunnes G, Torud B. Heart morphology in wild and farmed Atlantic salmon *Salmo salar* and rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ. 2003;57(1-2):103-8. Epub 2004/01/23. doi: 10.3354/dao057103. PubMed PMID: 14735927.
4. Poppe TT, Johansen R, Torud B. Cardiac abnormality with associated hernia in farmed rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Dis Aquat Organ. 2002;50(2):153-5. Epub 2002/08/16. doi: 10.3354/dao050153. PubMed PMID: 12180706.
5. Leonard JB, McCormick SD. Metabolic enzyme activity during smolting in stream-and hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 2001;58(8):1585-93.
6. Braunwald, E. Heart disease Vol. 3 (WB Saunders Co, 1988).
7. Brijs J, Grans A, Ekstrom A, Olsson C, Axelsson M, Sandblom E. Cardiorespiratory upregulation during seawater acclimation in rainbow trout: effects on gastrointestinal perfusion and postprandial responses. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2016;310(9):R858-R65.
8. Michael Frisk, Maren Høyland, Lili Zhang, Marco Antonio Vindas, Øyvind Øverli, Ida Beitnes Johansen, Intensive smolt production is associated with deviating cardiac morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), Aquaculture, Volume 529, 2020, 735615.
9. Craig E. Franklin, Peter S. Davie; Dimensional Analysis of The Ventricle of an in Situ Perfused Trout Heart Using Echocardiography. J Exp Biol 1 May 1992; 166 (1): 47–60
10. Keen, Adam N., et al. "Compliance of the fish outflow tract is altered by thermal acclimation through connective tissue remodelling." *Journal of the Royal Society Interface* 18.184 (2021): 20210492.
11. Oskar Schaller, «Illustrated Veterinary Anatomical Nomenclature», Ferdinand Enke Verlag Stuttgart 1992

8. Leveranser

Prosjektet er presentert på følgende konferanser, både som invitert og påmeldt foredrag:

- **HAVBRUK (digital konferanse), 09.06.20**, «Hjertesykdom og stressrelatert dødelighet hos laks».
- **AquaNor 25.08.2021**, «Laks som vokser langsomt på settefiskstadiet får bedre hjertehelse senere i livet», påmeldt.
- **Tekmar 01.12.2021** «Hjertesukk som hjertehelse 2: gir laksehjerter oss en tankevekker?», invitert.
- **NCE Aquaculture webinar 01.01.2022**, «Laks som vokser langsomt på settefiskstadiet får bedre hjertehelse senere i livet», invitert.
- **Årssamling sjømat Norge Havbruk Nord, 10.02.2022**, «For mye laks tåler ikke lusebehandling – kan hjertehelse ha betydning?», invitert.
- **Akvaseminar NMBU - Bærekraftig havbruk - 06.04.2022**, « [Årsaker til og konsekvenser av avvikende hjertemorfologi hos laks - YouTube](#) », invitert.
- **Frisk fisk, 30.05.2022**, «Langsom smoltproduksjon reduserer morfologiske avvik på laksehjertet», påmeldt.
- **Europhysiology, 20.09.22**, «Cardiac morphological remodeling by environmental factors in Atlantic salmon», invitert.
- **HAVBRUK, 20.10.2022**, «Ekkokardiografi som metode for ikke-invasiv undersøkelse av laksehjertets morfologi og funksjon», påmeldt.
- **Aquagen seminar, 17.11.2022**, «Cardiac health in Atlantic salmon», invitert.

Populærvitenskapelig artikler knyttet til prosjektet og omtale av prosjektet i media:

- Prosjektbakgrunn, hypoteser, og løsningsforslag omtalt i forskning.no, kyst.no, ilaks.no.
- Prosjekt omtalt i iLaks og fiskeribladet.no 24.09.19. «Forskere skal finne ut om intensiv smoltproduksjon er årsaken til hjerteproblemer hos laks» og på IntraFish 24.09.2019 «Har en teori om hvorfor mer laks dør av hjerteproblemer». En pressemelding ble dessuten sendt etter publisering av første fagartikkel som ble omtalt av iLaks.no 24.06.2020 under tittelen «Ny studie: Langsom produksjon av laksesmolt fører til større og friskere laks».
- Populærvitenskapelig artikkel fra prosjektet også publisert i Aftenposten viten 03.03.2021 under tittelen «Hver vår forvandles laksen fra en gretten einstøing til en ekte gladlaks. Slik setter lyset i gang prosessen».

Arrangementer knyttet til prosjektet:

Ved oppstart av prosjektet (28.11.2019) arrangerte prosjektleder i samarbeid med FHF og prosjektledere på to andre prosjekter finansiert ved samme utlysning en workshop kalt «seminar om robust smolt og smoltifisering» der næringsaktører og forskere innen fagfeltet ble invitert.

Vitenskapelig publikasjoner:

Frisk, M., Høyland, M., Zhang, L., Vindas, M., Øverli, Ø., Johansen, I.B., 2020. Intensive smolt production is associated with deviating cardiac morphology in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, 735615.