



N I F E S

NASJONALT INSTITUTT
FOR ERNÆRINGS- OG
SJØMATFORSKNING

Rapport
2016

FHF-prosjekt 900959 - Sluttrapport

***Omega-6/omega-3 balanse og mettet fett i fôr til laks:
betydning for fiskehelse og motstandsdyktighet mot
virusmitte***

Rune Waagbø og Sofie C. Remø

**Nasjonalt institutt for ernærings- og
sjømatforskning (NIFES)**
5.9.2016



Faglig sluttrapportering for FHF-prosjekt 900959

«Omega-6/omega-3 balanse og mettet fett i fôr til laks: betydning for fiskehelse og motstandsdyktighet mot virusmitte»

4.9.2016

Utførende prosjektledere: Rune Waagbø og Sofie C. Remø

Medarbeidere:

- NIFES: Sofie C. Remø, Elisabeth Holen, Nini H. Sissener, Monica Sanden, Pedro Araujo, Bente Torstensen, Rune Waagbø
- Nofima: Sven Martin Jørgensen, Gerrit Timmerhaus, Øystein Wessel, Inger Øien Kristiansen, Bente Ruyter
- Skretting ARC: Charles McGurk, Grethe Rosenlund
- Havforskningsinstituttet: Sonal Patel
- VESO Vikan: Audur Thorisdottir

Prosjektet er finansiert av NFR prosjekt #225086 og FHF-prosjekt 900959

1. Sammendrag

Formålet med prosjektet var å øke kunnskap om hvordan fettsyresammensetningen i fôret (herunder omega-6/omega-3 forholdet og mettet fett) påvirker motstandsdyktighet mot virussykdom (pankreas sykdom; PD), ved at fire utvalgte fôringsgrupper av individmerket laks brukes i smitteforsøk. Videre ønsket man å øke kunnskapen om hvordan fettsyresammensetning i fôret påvirker inflammasjons- og immunresponser i isolerte hodenyreceller og erythrocytter, når disse stimuleres med LPS (stimulerer til inflammasjon) og med PRV virus. Prosjektet var en utvidelse av et fôringsforsøk i et prosjekt med mål å finne ut hvordan andre fettsyrer i fôret enn omega-3 fettsyrer (omega-6, énumettete og mettede fettsyrer) eventuelt påvirker omdanningen av linolensyre (ALA, 18:3 n-3; en kortkjedet omega-3 fettsyre fra planter) til de marine omega-3 fettsyrene EPA (20:5 n-3) og DHA (22:6 n-3).

Hovedforsøket viste ingen signifikante forskjeller i vekst og velferd mellom lipidgruppene, men en liten tendens til redusert fôrinntak i gruppen med høyest omega-6/omega-3 ratio. Plantefettsyren 18:2n-6 (LA) i fôret påvirket nivået av de langkjedete fettsyrene arakidonsyre (ARA), EPA og DHA i leverens cellemembraner og i produksjonen av proinflammatoriske eikosanoider (PGE₂). I smitteforsøket med PD var bukspyttkjertelen og hjertevevet hardt affisert fire uker etter i.p. injisert smitte med SAV3 virus, noe som viser at smitteforsøket var vellykket. Etter ni uker var virusmengden sterkt redusert og de patologiske forandringer færre. Muskelen viste regenerering i flere undersøkte fisk. Atlantisk laks gitt fôr med n-6/n-3 ratio over 1.5 viste ikke klar indikasjon på redusert toleranse mot SAV3 infeksjon. Fisk fôret med mettet fett hadde mest n-3 fettsyrer i membranene (grunnforsøket) og viste antydning til redusert sykdom og bedret heling av sykt vev.

Fisken som hadde fått høy andel mettet fett før smitteforsøket hadde færrest patologiske forandringer i pankreas og hjerte etter 9 uker, men det var også flest fisk fra denne gruppen som ikke hadde gjenopptatt fôrinntak og derved mistet vekt i løpet av forsøksperioden. Det var ingen forskjeller i sammensetningen av ARA, EPA og DHA i muskel, noe som kan forklares med at det var nok av både omega-3 og omega-6 fettsyrer i fôret. Hvilken rolle mettet fett betyr for fettomsetningen og motstand mot virussykdom er interessant å følge opp i nye egnede forsøk, inkludert fokus på heling av pankreas med evnen til å fordøye fôr. Det bør gjøres histopatologiske vurderinger av flere fisk fra hver gruppe og uttak fôr å kunne styrke betydningen av både mettet fett og omega-6/omega-3 ratio for sykdomsforløpet i dette forsøket. Det er også muligheter til å gjøre flere analyser av kliniske, ernæringsmessige og molekylære markører for å belyse forskjeller i mottakelighet for smitte og bedring. Man kan også konkludere med at *in vitro* modellen med LPS stimulering av hodenyrecelle fungerte tilfredsstillende. Cellene i kultur viste diettforskjeller. Immuncellene fra laks som ble fôret med n-6 soyadietten, fulgt av MUFA (raps)dietten hadde en generelt høyere transkripsjon av

immunrelaterte gener sammenlignet med SFA (mettet fett) og ekstra soya diettene. Dette gjaldt også fettmetabolisme-relaterte gener som delta 6- og 5-desaturase og CD36. Mettet fett (SFA) og høy n-6 (ekstra soya) diettene var mer ulike de andre diettene i genuttrykk av PPARB1, FAS og BAX. Produksjon av proinflammatoriske eikosanoider (PGE2) målt i cellemidiet viste høyest LPS-stimulering i soyagruppene, mens mettet fettgruppen hadde høyest konsentrasjon av de antiinflammatoriske eikosanoidene (PGE3 og LTB5). For noen av funnene samsvarer dette med utfall fra forsøket og PD- smitteforsøket som ble utført på samme fisk. Rollen til de ulike eikosanoidene i regulering og immunmodulering bør undersøkes nærmere.

Røde blodceller isolert fra fisk i lipidgruppene ble infisert med PRV. Analysen avdekket at forsøksfisken trolig var infisert med PRV fra tidligere, og dette gav utfordringer med tanke på kontrollgruppen. I erytrocyttene som ble tilført PRV *in vitro* var derfor nivåene ved 6 dager etter infeksjon (dpi) tilsvarende de endogent infiserte blodcellene (kontrollgruppene), unntatt for mettet fett (SFA) gruppen som hadde signifikant mer virus. Disse forskjellene vedvarte 12 dpi, men utjevnet seg ved 18 dpi. En koinfeksjon med PRV i smitteforsøket ble verifisert, til tross for lave PRV funn (høye Ct verdier). Utfallet av smitteforsøket var i favør av SFA gruppen og det kan diskuteres om koinfeksjon med PRV påvirket infeksjonen med SAV3 (PD). Forsøket viste at LTB4 (men ikke eller i mindre grad PGE2) produseres og skilles ut av røde blodceller og at nivåene øker med økende virus replikasjon over tid. Høy omega-6 gruppen viste størst differanse i LTB4 nivå etter tilsatt PRV *in vitro* ved 12 dpi. Fettsyresammensetningen i erytrocyttene fra de ulike fôrgruppene viste i grove trekk at soyagruppene hadde høyere nivåer av omega-6 fettsyrene 18:2n-6 og ARA og følgelig lavere nivåer av EPA, sammenlignet med MUFA- og SFA-gruppene.

Oppsummert gav prosjektet svar på at det ikke var dramatiske forskjeller i mottakelighet for virussykdommen PD hos 0.5 kg laks etter lengre tids fôring av fôr med ulike planteoljer, noe som tyder på at høy omega-6/omega-3 ratio på grunn av mye soyaolje i fôret ikke gir redusert motstandsdyktighet mot virusmitte. En tendens til bedret heling etter sykdom og i ulike immunmekanismer i gruppen gitt mettet fett bør følges opp med utvidete analyser av vev fra dette forsøket for å dra nytte av mulige positive utfall av mettet fett.

Summary

The purpose of the present project was to increase knowledge about how the fatty acid composition in the diet (including omega-6/omega-3 ratio and saturated fats) affect resistance to a viral disease (pancreas disease; PD), by using four selected feeding groups of individually tagged salmon in an artificial infection experiment. Further, we aimed to increase knowledge about how the dietary fatty acid composition affect inflammatory and immune responses in isolated head kidney cells and erythrocytes, when these were stimulated with LPS (trigger inflammation) and incubated with PRV virus, respectively. The project was an extension of a feeding trial in a project that aimed to find out how other fatty acids than omega-3 fatty acids in the diet (omega-6, monounsaturated and saturated fatty acids) may affect the conversion of

linolenic acid (ALA, 18:3 n-3 from plants) to the marine omega-3 fatty acids EPA (20:5 n-3) and DHA (22:6 n-3).

The main feeding experiment showed no significant differences in growth and welfare between the lipid feeding groups but a slight tendency towards reduced feed intake was observed in the feeding group with the highest dietary omega-6/omega-3 ratio. The plant fatty acid 18:2n-6 (LA) in the feed affected the level of long chain fatty acids arachidonic acid (ARA), EPA and DHA in liver cell membranes and the production of pro inflammatory eicosanoids (PGE₂). In the infection experiment with PD, pancreatic and cardiac tissues were severely affected four weeks after i.p. injection with SAV3 virus, indicating that the frame of infection in the experiment was successful. After nine weeks, the viral load was greatly reduced and the pathological changes fewer. Muscle showed regeneration in several examined fish. Atlantic salmon fed diets with n-6/n-3 ratio of >1.5 showed no clear indication of reduced tolerance to SAV3 infection. Fish fed with saturated fat had highest level of n-3 fatty acids in membranes (main feeding experiment) and showed tendencies towards reduced illness of PD and improved healing of diseased tissue.

While the fish that had received high percentage of saturated fat before infection experiment had the least pathological changes in the pancreas and heart after 9 weeks, it was also the group with fewest fish that had resumed feeding and therefore had lost weight during the test period. There were no differences in the composition of ARA, EPA and DHA in the muscle, which can be explained by sufficient levels of both omega-3 and omega-6 fatty acids in the feed. The roles of saturated fat in lipid metabolism and resistance to viral diseases are interesting topics to follow up the new suitable experiments, including a focus on healing of the pancreas and the ability to digest feed. It should be done histopathological assessments of more fish from each group and withdrawals in order to strengthen the results that indicate importance of both saturated fat and omega-6/omega-3 ratio for the disease in this experiment. There are also samples available from the experiment for extended analysis of clinical, nutritional and molecular markers, to elucidate differences in susceptibility to infection and recovery. It can also be concluded that the in vitro model of LPS stimulation of the head kidney cell worked successfully. The cells in culture showed dietary differences. Immune cells from salmon fed with n-6 soya diet followed by MUFA (canola) diet had a generally higher transcription of immune-related genes compared to SFA (saturated fat) - and extra soy diets. This also applied to fat metabolism-related genes delta 6- and 5-desaturase and CD36. Saturated fat (SFA) and high n-6 (extra soy) diets were more dissimilar the other dietary groups in gene expressions of PPARB1, FAS and BAX. Production of pro inflammatory eicosanoids (PGE₂) measured in cell medium, showed the highest LPS stimulation in the soy groups, while saturated fat group had the highest concentration of the anti-inflammatory eicosanoids (PGE₃ and LTB₅). Some of the findings corresponded with the outcome of the trial and PD infection experiment that was conducted on the same groups of fish. The role of the various eicosanoids in regulation and immune modulation should be investigated further. Red blood cells isolated from fish lipid groups were infected with PRV. The analysis revealed that the experimental fish probably were infected with PRV from the past, and this challenged

the use of controls. In erythrocytes which were allocated to PRV in vitro, levels by 6 days post infection (dpi) corresponded to the endogenous infected blood cells (control group), except for the saturated fat (SFA) group that had significantly more virus. These differences persisted 12 dpi, but leveled out at 18 dpi. A coinfection with PRV infection experiments were verified, despite low PRV findings (high Ct values). The outcome of the infection experiment was in favor of the SFA group and it is debatable whether coinfection with PRV affected the infection with SAV3 (PD). The experiment showed that LTB4 (but not or to a lesser extent PGE2) was produced and secreted by the red blood cells and that the levels increased with increasing virus replication over time. High omega-6 group showed the greatest difference in LTB4 levels for added PRV in vitro at 12 dpi. Total lipid fatty acid composition of erythrocytes from various lipid groups showed mainly that soy groups had higher levels of omega-6 fatty acids 18:2n-6 and ARA and accordingly lower levels of EPA, as compared with MUFA- and SFA groups.

In summary, the project showed that there were not significant differences in susceptibility to virus disease PD in adult salmon after prolonged feeding of diets with different plant oils, suggesting that a high omega-6/omega-3 ratio, due to much soybean oil in feed, does not reduced resistance to viral infection. A tendency to improved healing after illness and in different immune mechanisms in the group given saturated fats could be followed up by extended analyses of tissues from this trial to further elucidate the possible positive outcomes of saturated fat.

2. Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt

I dagens situasjon med begrenset tilgang på fiskeolje til en økende produksjon av laks, må man redusere innblanding av fiskeolje i fôret. Et lavere innhold av fiskeolje i fôret fører til et redusert innhold av de marine omega-3 fettsyrene EPA og DHA. En økende erstatning av fiskeolje med vegetabilsk olje er vanlig praksis, noe som også medfører endringer i andel mettet og umettet fett og i fettsyresammensetningen i fôret. Fettsyrer har flere sentrale funksjoner i kroppen, som energilager og strukturelle komponenter i membraner, og som forløpere til lokale hormoner (eikosanoider) og intracellulære signaler. Generelt blir fettsyresammensetningen i fôret reflektert i vevene, noe som også gjelder for immuncellene. Siden vegetabiliske oljer ikke inneholder de langkjedete marine omega-3 fettsyrene, og har en høyere andel omega-6 fettsyrer, vil dette påvirke sammensetningen av cellene. Dette kan ha flere konsekvenser for motstandsdyktighet mot smittsomme sykdommer, blant annet ved å påvirke immunrespons eller inflammasjonsprosesser, eller direkte gjennom endringer av immuncellenes funksjon.

Dette prosjektet ble satt i gang for å øke kunnskapen om hvordan endringer i førets fettsammensetning påvirker fiskens helse, med fokus på betydningen av mettet fett og omega-6/omega-3 balanse i føret.

2.2 Prosjektets omfang

Prosjektet baserer seg på en utvidelse av et fôringsforsøk i et prosjekt finansiert av Norges forskningsråd (NFR 225086) ledet av NIFES. Målet med dette forsøket var å finne ut hvordan andre fettsyrer i føret (omega-6, enumettete og mettede fettsyrer) eventuelt påvirker omdanningen fra alfa-linolensyre (ALA, 18:3 n-3; en kortkjedet omega-3 fettsyre fra planter) til de marine omega-3 fettsyrene EPA og DHA. Til dette formålet ble det benyttet et simpleksforsøksdesign, der EPA+DHA var lavt (4.2 -5.2 % av totalt fett) men konstant i alle diettgrupper. Innhold av ALA var også konstant i alle diettene, slik at eventuelle forskjeller kan tilskrives de andre fettsyreklassene. Med dette designet vil det være mulig både å skille ut effekten av de individuelle fettsyreklassene, og eventuelle samspillseffekter mellom dem. Som konsekvens av dette prosjektet ble fôringsforsøket utvidet med én ekstra diett med et høyt innhold av soyaolje. Dette førte til en mer ekstrem n-6/n-3 ratio og vil dermed kunne gi mer innsikt i hvordan en høy n-6/n-3 ratio påvirker sammensetning av vev og eventuelle helseeffekter. Prosjektet oppsummerer kort helserelaterede resultater fra det grunnleggende fôringsforsøket.

Etter om lag 6 måneder fôring ble et smitteforsøk med pankreassykdom (PD) utført ved VESO VIKAN, med laks fra fire av diettgruppene fra det opprinnelige fôringsforsøket (**Del 1**) for å undersøke om fettsyresammensetning i føret påvirker motstandsdyktighet mot virus sykdom. Analyser av vevsprøver fra forsøket kan bidra til å forklare utfallet av smitteforsøket.

Prosjektets **Del 2** inkluderte cellulære studier med hodenyremakrofager og røde blodceller som modeller for å øke kunnskap om hvordan fettsyresammensetning i føret påvirker inflammasjons- og immunrespons i hodenyreceller og erytrocytter når disse cellene stimuleres med henholdsvis LPS (stimulerer bakteriell-liknende inflammasjon) og med PRV virus.

2.3 Prosjektorganisering

Prosjektet har vært organisert og ledet av NIFES (Dr Rune Waagbø), med forskerkompetanse fra NIFES (Dr Sofie C. Remø, Dr Elisabeth Holen, Dr Nini H. Sissener, Dr Monica Sanden og Dr Bente Torstensen), Skretting ARC (Dr Grethe Rosenlund og Dr Charles McGurk), Nofima (Dr Sven Martin Jørgensen, Gerrit Timmerhaus, Øystein Wessel, Inger Øien Kristiansen, Bente Ruyter) og Havforskningsinstituttet (Dr Sonal Patel). Teknikere ved alle institusjonene bidro med respektive analyser og praktisk hjelp.

En prosjekt- og styringsgruppe har ved oppstart og underveis vurdert veivalg og smitte modellen som ble benyttet i forsøket. Status av prosjektet har vært presentert og diskutert på dialog- og fagmøter i regi av FHF/NFR. Flere andre institusjoner har vært involvert i diskusjoner i oppstarten av prosjektet, siden det viste seg praktisk vanskelig å få

gjennomført et PD smitteforsøk med stor laks ut fra tilgjengelige kar- og vannfasiliteter på gitte tidspunkt. Prosjektet inkluderte en vellykket transport av forsøksfisken fra Lerang forsøksstasjon i Rogaland til VESO sin karfasiliteter ved Vikan i Sør-Trøndelag (Jarle Tveiten Transport), hvor smitteforsøket ble gjennomført. Prosjektet har basert seg på utført histopatologi og PCR analyse av virus (SAV3 og PRV) gjennom Dr Sonal Patel ved Havforskningsinstituttet.

Styringsgruppen for prosjektet inkluderer: Eldar Bendiksen, Salmar; Øyvind Oaland, Marine Harvest, Tor-Eirik Homme, Grieg Seafood og FHF fagsjef Merete Bjørgan Schrøder.

3. Problemstilling og formål

Prosjektets resultatmål definert ved start var:

- Bestemme hvilken effekt har omega-3/omega-6 ratio på laksens helse, inkludert hva er som er optimalt forhold og hva som er øvre toleransegrense.
- Øke kunnskap om hvordan fettsyresammensetningen i fôret påvirker motstandsdyktighet mot virusykdom (PD), ved at utvalgte fôringsgrupper av individmerket laks brukes i smitteforsøk.
- Øke kunnskap om hvordan fettsyresammensetning i fôret påvirker inflammasjons- og immunrespons i hodenyreceller/makrofager, når disse stimuleres med LPS (trigget inflammasjon) og med ulike virus.

For næringen vil resultatene fra dette prosjektet bety økt kunnskap om hvordan fettsyresammensetningen i fôret påvirker laksens helse og motstandsdyktighet mot smitte. Dette vil gi økt trygghet i forhold til fett i fôr til laks med hensyn på omega-3 og omega-6 fettsyrer, og hva som er optimalt vindu for mettet fett. Dette vil potensielt gi større fleksibilitet for hvilke alternative fettkilder som kan benyttes i fôret.

Prosjektets gjennomføring har underveis blitt kommunisert til oppdrettsindustrien i form av dialog- og fagmøter og vil i ettertid bli formidlet gjennom vitenskapelige publikasjoner. Det er et stort behov for dokumentasjon av trygg bruk av alternative fettkilder i fôr til oppdrettslaks, og om eventualiteter som disse måtte påføre fiskens robusthet mot sykdom. Prosjektet tok for seg pankreassykdommen PD som er en utbredt viral sykdom i Norge som har stor velferdsmessig betydning for næringen, både for fiskens helse og velferd under og etter sykdommen. Prosjektet er unikt i det at forsøket inkluderer stor laks fra et langtids fôringsforsøk med ulike fettkilder. Prosjektet kombinerer også fôringsforsøk og cellulære studier som kan ha betydning for utvikling og bruk av cellemodeller og robuste markører for å redusere fremtidig bruk av forsøksdyr (3R) til slike formål.

Del 1 - Smitteforsøk

Akvakulturindustrien opplever om lag 20% dødelighet i sjøvannsfase, og en av de viktigste årsakene er pankreassykdom (PD). PD er forårsaket av salmonid alfavirus (SAV) og antallet SAV positive lokaliteter har økt siden 2009. PD utbrudd oppstår vanligvis 5-7 måneder etter sjøvannsoverføring, og den syke fisken viser tegn til unormal svømming, tap av appetitt og dårlig fôrutnyttelse. Sykdommen påvirker flere organ, og medfører først nekroser i pankreas, fulgt av betennelse og nekroser i hjerte og muskel. De kombinerte effektene på dødelighet, tapt tilvekst, dårligere fôrutnytting og redusert kvalitet fører til store økonomiske konsekvenser og representerer en vesentlig velferdsutfordring. Ernæringsstatus før et sykdomsutbrudd kan være med på å påvirke hvordan laksen takler sykdommen, og hvor lang tid det tar før fisken regenererer og gjenopptar appetitt og vekst. Prosjektet inkluderer et smitteforsøk med stor laks som har vært gitt fire eksperimentelle fôr med realistisk sammensetning basert på tre planteoljer i lengre tid før smitte. Innsikt i hvordan førets sammensetning av ulike fettsyrer og mettet fett påvirker laksens motstandsdyktighet mot PD er viktig for å belyse hvor vidt der er trygt å inkludere høye andeler vegetabiliske oljer i fôret for å sikre fremtidig vekst i næringen. Kunnskap om hvordan fettkilder og deres innhold av næringsstoff påvirker fiskens helse vil være viktig for å utvikle gode strategier for å unngå tap i sjøvannsfasen og styrke velferd i kommersiell oppdrett.

Del 2 - In vitro immunmodeller

Andre del av prosjektet omhandler bruk av cellulære modeller for å avdekke om fisken fra fôringsforsøkets fire fettgrupper viser endringer i helse relaterte systemer og responser. Fettet i fôret påvirker vevene ulikt, og også ulikt mellom lagringsfett og membranfett. Den benyttede etablerte modellen med isolerte hodenyreceller vil kunne å avdekke mekanismer for hvordan fett i fôret påvirker cellenes immunrespons, antioksidative forsvar, lipidomsetning og kommunikasjon etter stimulering med lipopolysakkarid (LPS). Dette simulerer en bakteriell stimulering av immuncellene. Uttrykk av utvalgte gener innen disse områdene ble målt med og uten LPS stimulering. I tillegg ble mediet analysert for n-6 og n-3 relaterte eikosanoider ved hjelp av en etablert HPLC-MS analyse.

Det ble også benyttet en modell med virusinfisering av røde blodceller. Det ble nylig vist at HSMB-viruset PRV kan infisere opptil 50 % av erytrocyttene i laks *in vivo* (Finstad et al. 2014), men hvorvidt dette påvirker fiskens evne til oksygentransport, immunrespons og derved fiskens sykdomsklinikk er uvisst. Tilsvarende er det vist at CMS- og ILA-virus infiserer både røde og hvite blodceller tidlig i patogenesen. Kunnskap om hvorvidt erytrocytter isolert fra ulike diett-grupper vil respondere på virus-infeksjon under en *in vitro* infeksjon med PRV og analyse av virus, immunrespons og lipid-inflammatoriske enzymer er således av stor interesse. Det er vist at røde blodceller lar seg infisere i cellekultur, og relevant metodikk er etablert (Finstad et al, under publisering). Blodcellepopulasjonen hos Atlantisk laks er meget dynamisk og endrer seg gjennom livsfasen (feks parr-smolt-transformering) og i respons på ernæring og miljø (feks temperatur). I lys av blodcellers rolle som første replikasjonsorigo for ulike virus samt viktige rolle i immunforsvaret, er det sentralt å etablere kunnskap om hvordan laksens ernæringsstatus vil påvirke disse prosessene. Dette er også et viktig fokus i det pågående FHF-prosjekt 900966. Tidlige studier på parr har vist at erytrocytter har svært ulik sammensetning

av lipider versus leukocytter og plasma, med blant annet 70-75 % fosfolipider bestående av en stor andel n-3 PUFAs (flerumettede fettsyrer), og da spesielt langkjedete fettsyrer som DHA i fosfolipidene fosfatidyletanolamin (PE) og fosfatidylcholin (PC). Leukocytter på sin side hadde høyere nivåer av frie fettsyrer, derav en høy andel n-6 PUFAs. Som følge av at erytrocytter ikke er i stand til å syntetisere egne lipider, men får disse via plasma, betyr dette at diettens sammensetning av fettsyrer vil ha stor påvirkning på erytrocyttenes sammensetning og konsentrasjon av lipider.

4. Prosjektgjennomføring

Prosjektet var en utvidelse av et fôringsforsøk i et prosjekt finansiert av Norges forskningsråd (NFR# 225086) ledet av NIFES. Målet med dette forsøket var å finne ut hvordan andre fettsyrer i fôret (omega-6, énumettet, mettet) eventuelt påvirker omdanningen fra ALA (kortkjedet omega-3 fettsyre fra planter) til EPA og DHA (marint omega-3). Til dette formålet ble det benyttet et simpleks-forsøksdesign med syv dietter, der EPA+DHA er lavt men konstant i alle diettgrupper. Innhold av ALA var også konstant i alle diettene, slik at forskjeller i resultat kan tilskrives de andre fettsyreklassene. Designet gjør det mulig å både skille ut eventuelle effekter av de individuelle fettsyreklassene, og samspillseffekter mellom dem. Fôringsforsøket ble utført ved Skretting ARC, Lerang forsøksstasjon. Mange analyser var planlagt og gjennomført i det pågående NFR prosjektet og resultater av noen av disse er kort oppsummert under.

Dette FHF prosjektet tok sikte på å dra nytte av dette materialet ved å utvide både den eksperimentelle designen og analyser, med fokus på å studere effekten av omega 6/omega 3 ratio og fettsyreklassene på fiskens helse i form av beskyttelse mot virusinfeksjoner.

Følgende utvidelse ble gjennomført:

- En ekstra diett (3 ekstra kar) ble lagt til grunnforsøket ved Lerang forsøksstasjon for å få informasjon om effekt av endret n-6/n-3 ratio i området som ikke allerede var dekket av diettene i forsøket. Denne dietten hadde et høyt innhold av soyaolje, noe som ga en mer ekstrem n-6/n-3 ratio enn i det opprinnelige designet. Denne ekstra gruppen ville kunne gi bedre presisjon for å se på hvilke nivåer helseeffekter oppstår, hvordan de ulike nivåene påvirker sammensetning av filet, og hvorvidt det raskere vil oppstå mangel på EPA/DHA ved lave nivåer når man har en diett med svært høyt innhold av omega-6, og eventuelt på hvilket nivå dette vil forekomme.
- Et smitteforsøk (med SAV3 virus som forårsaker PD) med 4 av diettgruppene ble inkludert med gitte samarbeidspartnere for å se om fettsyresammensetningen i fôret påvirker motstandsdyktighet mot sykdom. Havforskningsinstituttet, Skretting ARC og Nofima samarbeidet om analyser av fisk fra smitteforsøket.
- Utvidelse av arbeidspakken med studier av inflammasjon i hodenyreceller/makrofager, slik at denne også inkluderer den nye diettgruppen med økt omega-6 innhold og også stimulere hodenyrecellene med ulike virus. Dette ble gjort i samarbeid med Nofima.

På grunn av at opprinnelig samarbeidspartner for smitteforsøk måtte trekke seg av praktiske grunner ble en første leveranse i prosjektet definert til å konkretisere hvilke smittefasiliteter som er mulig å bruke og en prosjektbeskrivelse av smitteforsøk skulle godkjennes før denne delen av prosjektet ble satt i gang.

Del 1 - Smitteforsøk

Smitteforsøket ble utført ved VESO VIKAN, Nord-Trøndelag. Individuelle Pit merket laks (Salmobreed Exclusive QTL-PD) fra fire av diettgruppene i fôringsforsøket ble transportert fra Lerang Forskningsstasjon, Rogaland. Det var ingen dødelighet under transporten. Ved VESO VIKAN ble fisken sortert i fire kar og akklimatisert i to uker før smitte. Grunnet begrensninger i plass på grunn av stor eksperimentell fisk og antall fisk tilgjengelig for smitteforsøket ble ti fisk fra hver diettgruppe blandet i hver av fire tanker, hvorav tre kar ble smittet og ett kar holdt som usmittet kontroll samt brukt for analyse av ernæringsstatus. Temperatur (12°C) og salinitet ble overvåket daglig og oksygenivå registrert og justert til >70% i avløp en gang i uken. Under forsøket fikk all fisken samme fôr, spesialprodusert av Skretting ARC, basert på en kommersiell relevant fôrsammensetning med 47% protein, 28% fett og 94% tørrstoff (Tabell 1). Fôret utgjorde senterpunktet i simpleksdesignen fra hovedforsøket hvor alle fettkildene var representert. Fisken ble fôret med automat (1.5% av biomassen) og holdt på konstant lysperiode gjennom hele forsøket. Appetitt ble overvåket under forsøket, men det var ikke praktisk mulig å samle opp fôrspill. All fisk ble veid ved smitte og snittvekt var 1018 (147) g. Status av fettsyresammensetning ble analysert av fire fisk fra hver diettgruppe før smitte. Fisken i tre kar ble smittet med SAV3 (injisert med 0.5 ml smittemateriale, miks av VESO Vikan smittemateriale jnr. 2322 og jnr. 2306), og fisk i den usmittede kontrollen injisert med det samme volumet negativ kontroll medium (fysiologisk saltvann).

Uttak av prøver ble tatt 4 og 9 uker etter smitte. Det var ønskelig å undersøke fordøyelighet med oppsamling av feces med stryking ved uttakene, men det var for få fisk som hadde spist nok til å få ut representative prøver. Det ble gjort en stegvis tilnærming til analyser, der det ble lagt vekt på å verifisere smitte med PCR analyse av SAV3 og å undersøke omfang av patologiske forandringer (histopatologi) i pankreas-, hjerte- og muskelvev (Dr. Sonal Patel, Havforskningsinstituttet), før videre molekylære og biokjemiske analyser. Det ble også utført ekstra PCR analyse av PRV for å undersøke om eventuell koinfeksjon påvirket utfallet av smitteforsøket. Det ble innenfor rammen av prosjektet gjort en patologisk vurdering av 3 fisk per fettgruppe fra 4 ukers uttaket og 6 fisk fra 9 ukers uttaket. Dr. Charles McGurk, Skretting ARC, utførte analyser av utvalgte kliniske markører i plasma (kreatin kinase, CK; C-reaktivt protein, CRP; jernreducerende antioksidant kraft, FRAP, hemoglobin og total protein). Andre utvalgte kliniske markører og ernæringsstatus ved start ble utført ved NIFES.

Det ble tatt ut en rekke vevsprøver fra alle fisk som ble prøvetatt i smitteforsøket i tilfelle interessante funn og i tilfeller der viktige funn bør styrkes med flere analyser. Det er blant annet allerede nå ønskelig å undersøke flere fisk fra hver gruppe histopatologisk for å styrke resultatet i akutt fase (uke 4) og

under bedring (uke 9). Dr. Sven Martin Jørgensen ønsker å undersøke uttrykk av immungener i hjerte hos fisk i regenereringsfasen (uke 9).

Tabell 1. Fettsyresammensetning av de eksperimentelle fôrene brukt i forkant og fellesfôret under smitteforsøket (% av totalt fett) og % fett i fôrene

Diett	LA	ALA	EPA	DHA	EPA+ DHA	SFA	MUF A	sum n-6	sum n-3	sum PUF A	n-6/ n-3	% lipid
MUFA	14,6	9,1	2,4	2,8	5,2	12,7	55,4	15,0	16,4	31,7	0,9	26,5
SFA	11,2	10,2	1,9	2,5	4,4	34,9	37,5	11,5	16,0	27,7	0,7	27,8
n-6	38,2	10,7	1,8	2,3	4,2	17,2	27,9	38,5	16,1	54,8	2,4	26,5
Ekstrem n-6	42,9	5,0	1,9	2,5	4,3	17,8	28,1	43,2	10,6	54,0	4,1	26,9
Smitteforsøk	21,4	9,6	2,0	2,3	4,3	22,3	39,0	21,9	14,8	37,0	1,5	28,2

Det var som forventet ingen dødelighet som følge av smitten med SAV3. De utvalgte analysene vil bidra til å avdekke sykdomsomsfang og mulige mekanismer for eventuelle forskjeller mellom fettgruppene.

Del 2 - In vitro immunmodeller

a) LPS stimulering av hodenyreceller

Hodenyrecellene ble isolert fra de fire fettdiettgruppene knyttet til prosjektet for å studere hvordan fettsyrediettene påvirker laksens immunceller alene og under en inflammasjon. Celler fra hver fisk ble sådd ut i 3 brønner med L-15 medium (kontroll) og 3 brønner med L-15 medium + LPS (lipopolysakkarid). Utvalgte immunmarkører inkluderte gener som blir oppregulert ved en bakterieinfeksjon som her ble simulert ved LPS stimulering. Disse genene koder for proteiner som immuncellene bruker for å kommunisere og aktivere hverandre og derved bekjempe infeksjonen. Det ble også analysert gener som regulerer fettsyremetabolismen og apoptose (celledød). Cellestudien inkluderte analyse av eikosanoider i cellemediet. Dette er signalstoffer som dannes med utgangspunkt i visse langkjedete flerumettede fettsyrer (n-6 fettsyren ARA og n-3 fettsyren EPA) som kan stimulere eller svekke en immunreaksjon (pro- eller antiinflammatoriske eikosanoider).

b) in vitro infeksjon av røde blodceller

Studien innebar isolering og bruk av røde blodceller fra de fire diettgruppene, og disse ble infisert med PRV (piscine reovirus/HSMB) -inokulum. Blodprøver fra kaudal-venen ble tatt fra 4 fisk per 4 fôrgrupper; hjørnediettene A (MUFA), C (SFA), E (n-6) og H (n-6 Høy). Blod ble fortynnet i medium og ulike blodcellefraksjoner separert ved sentrifugering over Percoll, med etterfølgende vask av fraksjonene i medium. Etter fraksjonering og vask av røde blodceller ble en batch ble fryst ned direkte til RNA- og fettsyreanalyser (nullprøver), og de resterende røde cellene ble tilsatt standard vekstmedium (serumfritt) og lagret på is under transport til NVH/Nofima. Der ble cellene tellet, sjekket for vitalitet og deretter sådd ut i 12-brønners plater (2×10^7 celler per brønn i 2 ml L15+ medium) i duplikater pr fisk (N=3) per diettgruppe

(N=4). Fra hver fisk ble det sådd ut celler i dobbelt oppsett, til inokulering med PRV og uinfiserte kontroller. Cellene ble videre inokulert med 100 ul av et uttestet PRV-inokulum (NVH) og inkubert under lett agitering på vippebrett ved 15°C i 6-18 dager før høsting (3 tidspunkt, jfr tidligere og pilotstudier) og analyser. Ved de ulike tidspunkt ble mediet tilsatt indometacin og fryst ned for analyse av eikosanoidene LTB₄ og PGE₂ basert på et kommersielt målesystem (kit). PGE₂ nivåene var under deteksjonsgrensen for metoden og derved ikke analysert videre. LTB₄ nivåene ved 12 dpi var meget lave, av ukjent årsak, og derved ikke tatt med i resultatene. Cellene ble høstet og lysert for analyser av virus-replikasjon (Real Time qPCR assay basert på [1]), samt antistoff-merking for flow-cytometri og immunfluorescence mikroskopi [1].

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

Resultater fra fôringsforsøket med ulik omega-6/omega-3 ratio og mettett fett

Fôringsforsøket som prosjektet tok utgangspunkt i ble gjennomført ved Lerang forsøksstasjon, Skretting ARC, som en del av et NFR prosjekt. Forsøket benyttet et blandingsdesign, med rapsolje, palmeolje og soyaolje som ga henholdsvis høyt innhold av enumettede, mettede og omega-6 fettsyrer. Linfrø- og fiskeolje ble brukt til å balansere diettene til like nivåer av de flerumettede fettsyrene ALA, EPA og DHA. De syv diettene i dette designet hadde en omega-6/omega-3 ratio fra 0.7-2.4. Det var ønskelig å utvide til høyere omega-6/omega-3 ratio for å kunne se på helseeffekter av dette. Dermed ble det inkludert en ekstra fôringsgruppe gjennom dette prosjektet, der linfrøolje ikke ble tilsatt (dvs ALA ble ikke balansert) for å kunne tilsette desto mer soyaolje og øke omega-6/omega-3 ratio'en til 4.1.

Det var ingen signifikante forskjeller i vekst mellom gruppene, men en liten tendens til redusert fôrinntak i gruppen med høyest omega-6/omega-3 ratio. Retensjonsdata viste at høy omega-6 i fôret opp til 43 % av fettsyrene (omega-6/ omega-3 ratio 4.1) ikke hadde noen negativ effekt på retensjon av langkjedete omega-3 fettsyrer. I polart fett i lever, som hovedsakelig representerer cellemembranene, var det imidlertid en tydelig nedgang i EPA med økende omega-6/omega-3 ratio, på tross av likt innhold i fôrene. DHA gikk også ned, mens omega-6 fettsyrene ARA økte. Det var spesielt de to høyeste ratioene (2.4 og 4.1) som skilte seg negativt ut. Vi så tilsvarende mønstre også i røde blodceller og hjerte, dog ikke like store forskjeller som i lever. Nivå i plasma av prostaglandin 2 (PGE₂; en betennelsesfremmende eikosanoid produsert fra ARA) var signifikant høyere i gruppa med omega-6/omega-3 ratio på 4.1 sammenlignet med noen av gruppene med lavere ratio. Denne gruppa var også lavere i signalstoffet 5-HEPE i lever, som er en forløper til eicosanoider produsert fra EPA i polart fett i lever, røde blodceller og hjerte. Hematologi og analyse av plasmamarkører som ALAT, ASAT, glucose og cortisol viste ingen forskjeller mellom diettgruppene. Det var heller ingen relasjon mellom leverfett (analysert både som lipidklasser og histologi) og omega-6/omega-3 ratio.

Del 1 - Smitteforsøk

Fettsyrestatus

Fettsyresammensetning av total lipid i muskelen ved oppstart av forsøket viser at type fett i fôret er reflektert i muskel, med signifikant høyere andel mettede, enumettede og n-6 fettsyrer i fisk gitt de respektive diettene (Tabell 2). Det var ikke signifikante forskjeller i innholdet av ARA, EPA og DHA i muskelen mellom de ulike diettgruppene. Analyser av lever fra fôringsforsøket viser derimot at ARA øker mens EPA og DHA minker i forhold til innholdet av 18:2n-6 i fôret (Sissener et al., 2016). Laks har en egenproduksjon av EPA og DHA som kan økes dersom tilgangen via fôret er marginal. Nivået av EPA og DHA i fôrene brukt før smitteforsøket var 4.5%, og dette er kanskje ikke lavt nok til å øke laksens egenproduksjon. Høyere omega-6/omega-3 ratio i muskel skyldes hovedsakelig den nesten tre ganger høyere konsentrasjonen av 18:2n-6. Det er ønskelig å undersøke fettsyresammensetning i hjerte, som er et viktig organ affisert av SAV, for å kunne si noe om det var forskjell i omega-6/omega-3 ratio og spesielt ARA/EPA ratio, og relatere til uttrykk av inflammasjonsmarkører.

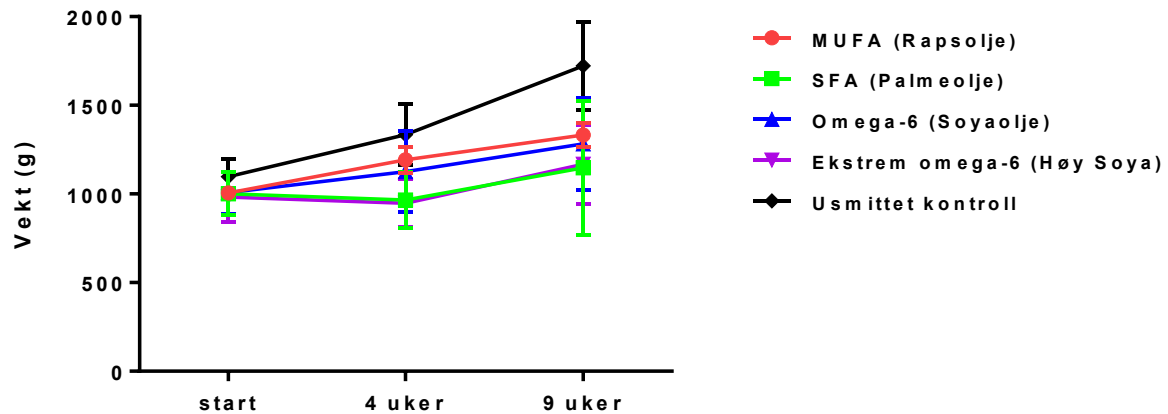
Tabell 2. Fettsyrer i muskelens totallipid ved oppstart av smitteforsøket

Diett	MUFA	SE	SFA	SE	n-6	SE	Ekstre m n-6	SE	One-way ANOVA
16:0	10,4	0,4	c 19,2	0,2	a 12,3	0,4	b 13,8	0,6	b p<0,05
18:1n-9	36,4	1,4	a 30,7	0,7	b 21,2	0,2	c 19,4	1,2	c p<0,01
18:2n-6	12,9	0,2	b 11,2	0,3	b 30,0	1,0	a 30,5	1,7	a p<0,001
ALA	6,0	0,1	b 7,4	0,1	a 7,3	0,1	a 3,6	0,2	c p<0,001
ARA	0,7	0,0	0,8	0,0	0,8	0,1	1,0	0,2	ns
EPA	2,2	0,3	2,2	0,1	1,7	0,1	2,1	0,3	ns
DHA	8,1	1,2	7,6	0,9	6,1	0,6	9,3	2,1	ns
EPA+DHA	10,2	1,5	9,9	1,0	7,9	0,8	11,3	2,4	ns
SFA	15,6	0,4	b 25,5	0,3	a 18,2	0,4	c 19,7	0,6	c p<0,01
MUFA	48,3	1,7	a 38,9	0,9	b 28,1	0,2	c 26,2	1,6	c p<0,01
sum n-6	15,3	0,2	b 13,4	0,4	b 33,9	0,9	a 35,4	1,3	a p<0,001
sum n-3	19,2	1,5	20,3	0,9	17,8	0,6	17,0	2,3	ns
sum PUFA	34,5	1,3	b 33,7	1,1	b 51,7	0,4	a 52,4	1,1	a p<0,001
n-6 / n-3	0,8	0,1	b 0,7	0,0	b 1,9	0,1	a 2,2	0,4	a p<0,01

Vekst

Etter 9 uker i smitteforsøket var gjennomsnittsvekten på den usmittete kontrollen ca 500 gram høyere enn fisken som var smittet (Fig. 1). Det var ingen forskjeller i sluttvekt mellom de 4 diettgruppene som ble smittet, og andelen fisk som hadde vokst siden oppstart av forsøket var høyest i fisken som hadde fått MUFA dietten (89%), mot 78% i Omega-6 dietten, 67% i Ekstrem omega-6 dietten og 38% i SFA dietten. Det var ingen forskjeller i vektøkning mellom

de fiskene som hadde vokst. Vurdering av fiskens fordøyelighet var ikke mulig da fisken ikke hadde spist nok til å få representative fecesprøver.



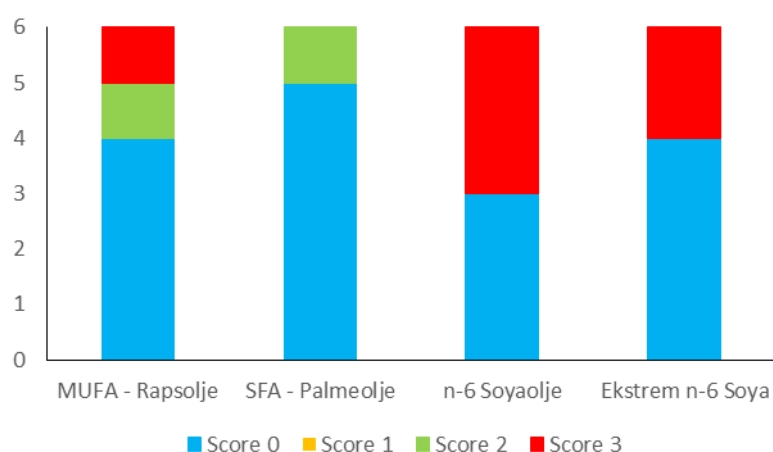
Figur 1. Vektutvikling (snitt og SD) under smitteforsøket. Den usmittede kontrollgruppen består av alle fettgruppene.

Viruspåvisning og histopatologi

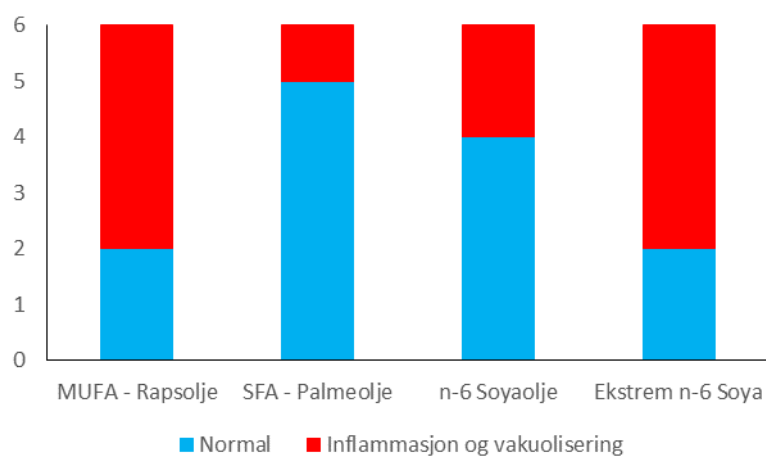
SAV3 ble påvist i all undersøkt smittet fisk etter fire uker (n=9 per gruppe), og det var ingen forskjeller i Ct-verdi mellom diettgruppene [Ct $21,4 \pm 0,7$ (SE), range 16,6-33,6]. Patologiske forandringer ble påvist i pankreas og hjerte hos all smittet fisk (n=3), mens bare en fisk hadde patologi i muskel. Etter 9 uker var det flere fisk i hver gruppe som ikke lenger fikk påvist virus, med flest negative fisk i SFA – palmeolje gruppen (Tabell 3). Pankreas (Fig. 2a) var normal i flere fisk (score 0), med tendens til flere fisk med fungerende pankreas i SFA gruppen (n=6). I hjerte (Fig. 2b) var det tegn på betennelse og vakuolisering i flere fisk, men også en del fisk uten patologiske forandringer i uke 9. Også her var det SFA gruppen som kom best ut. Fisk i alle smittede grupper hadde patologiske forandringer i muskel ved 9 uker (Fig. 3c), og flere av disse viste tegn til regenerering. Det ble også påvist PRV smitte under fôringsforsøket, og fisken hadde fremdeles PRV smitte under SAV smitteforsøket. Det var ingen forskjeller mellom diettgruppene, med gjennomsnittlig Ct verdi på $33,6 \pm 1,6$ (range 31-37) ved 4 uker og $37,4 \pm 1,5$ (range 34-39) ved 9 uker.

Tabell 3. Ct verdier for SAV og antall positive og negative histopatologiske påvisninger i hver gruppe

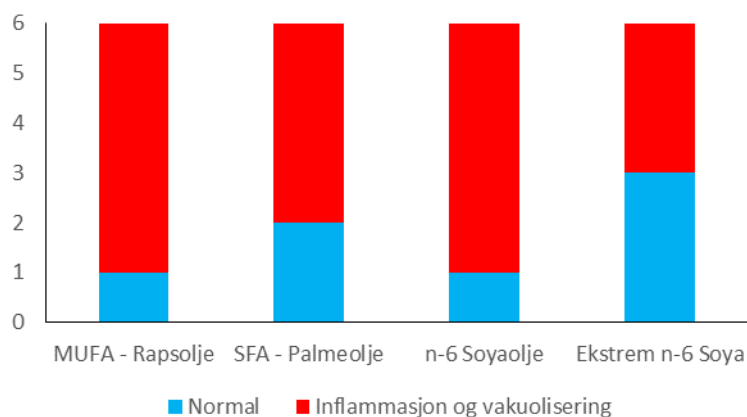
Diett (n=9)	Ct (gj.snitt)	SD	# pos	# neg
MUFA - Rapsolje	33,9	1,9	6	3
SFA - Palmeolje	32,5	2,5	5	4
n-6 - Soyaolje	32,8	1,2	7	2
Ekstrem n-6 - Soya	34,1	1,5	7	2



a) Patologiske forandringer i **pankreas**



b) Patologiske forandringer i **hjerte**



c) Patologiske forandringer i muskel

Figur 2. Patologiske forandringer i ulike vev 9 uker etter smitte ($n=6$) i fisk fra de ulike fettgruppene

Kliniske markører i plasma

Det var ingen forskjeller i konsentrasjonen av markører for celledskade (enzymene ASAT og CK) ved start (Tabell 4a), men med store variasjoner mellom gruppene. Dette kan ha en sammenheng med PRV smitten som ble påvist, og det er derfor ønskelig å undersøke om det var tegn til patologi forårsaket av PRV ved start. Det var heller ingen forskjeller i konsentrasjonen av amylase, glukose, kolesterol, total protein og TAG i plasma før smitte (Tabell 4a), og ingen forskjeller i konsentrasjonen av CK, CRP, FRAP, Hemoglobin eller total protein 4 uker (Tabell 4b) og 9 uker (Tabell 4c) etter smitte. Derimot var det store individuelle forskjeller i hver gruppe, og tendens til forhøyete verdier av markører for celledskade (CK) etter 4 uker (Fig. 3). Det er ønskelig å undersøke om dette kan relateres til omfang av patologi, men da må flere fisk undersøkes for å få nok styrke.

Tabell 4. a) Kliniske markører i plasma ved start av smitteforsøket

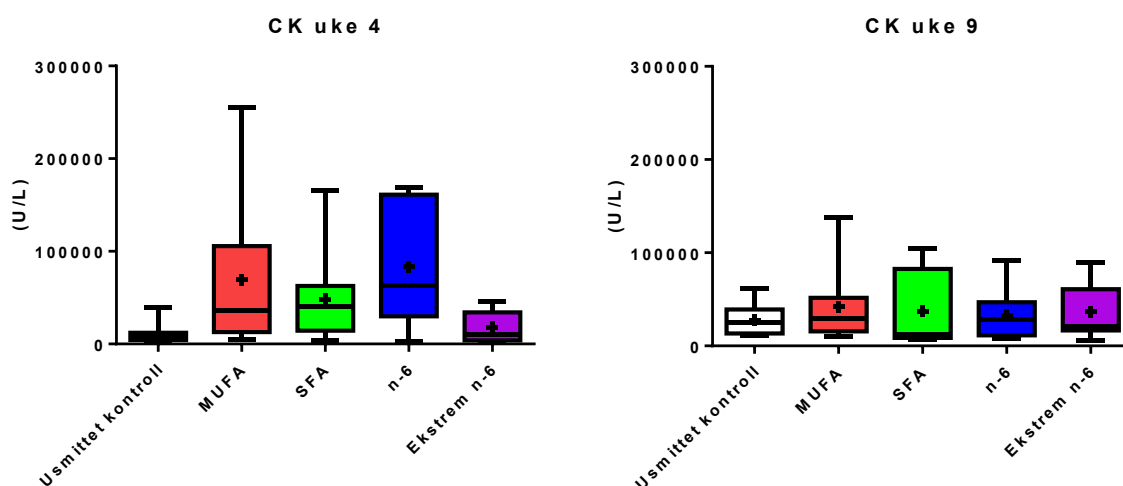
	Gj.snitt	Min	Max	SD
Amylase (Units/L)	353	130	577	112
AST (Units/L)	3 404	699	12 161	3 289
Glukose (mmol/L)	7,5	5,8	10,1	1,3
Kolesterol (mmol/L)	11	7	13	2
Protein, total (g/L)	67	49	76	7
Triglyserider (mmol/L)	2,0	1,1	3,0	0,5
CK (U/L)	42 992	7 478	155 685	47 115
CRP (mg/L)	101	53	142	26
FRAP (μ mol/L)	1 951	1 666	2 458	205
Hemoglobin (g/dL)	0,9	0,4	2,3	0,5

b) Kliniske markører i plasma 4 uker etter smitte

	Usmittet kontroll		MUFA - Rapsolje		SFA - Palmeolje		n-6 - Soyaolje		Ekstrem Soya	n-6 -
	Gj. snitt	SD	Gj. snitt	SD	Gj. snitt	SD	Gj. snitt	SD	Gj. snitt	SD
CK (U/L)	11920	11039	69171	80643	48493	49609	83108	64389	17940	16816
CRP (mg/L)	65	30	49	33	48	29	70	45	71	59
FRAP (µmol/L)	1689	251	1497	627	1608	418	1628	191	1895	969
Hemoglobin (g/dL)	0,29	0,24	0,11	0,10	0,15	0,14	0,19	0,06	0,17	0,19
Protein, total (g/L)	51	7	48	6	44	8	47	5	41	13

c) Kliniske markører i plasma 9 uker etter smitte

	Usmittet kontroll		MUFA - Rapsolje		SFA - Palmeolje		n-6 - Soyaolje		Ekstrem Soya	n-6 -
	Gj. snitt	SD	Gj. snitt	SD	Gj. snitt	SD	Gj. snitt	SD	Gj. snitt	SD
CK (U/L)	27274	15297	41973	39533	37087	40638	33111	26854	36993	28154
CRP (mg/L)	69	30	48	28	38	26	35	26	51	22
FRAP (µmol/L)	1461	77	2005	855	1521	492	1817	734	1799	739
Hemoglobin (g/dL)	0,2	0,2	0,5	1,2	0,2	0,2	0,9	2,2	0,3	0,5
Protein, total (g/L)	48	6	48	6	43	6	47	9	44	5



Figur 3. Konsentrasjonen av enzymet CK (kreatine kinase) i plasma 4 og 9 uker etter smitte

Oppsummering og konklusjon

Fisken i dette forsøket kom fra et fôringsforsøk der den tidligere hadde fått fôr med høyt innhold av vegetabilsk olje, og materialet kan derfor være nyttig i en risikoevaluering av konsekvenser ved å bytte ut fiskeolje med vegetabiliske oljer. Det ser foreløpig ikke ut til at fettkilde påvirker replikasjon av SAV, men tendensene til forskjell i sykdomsforløpet med hensyn til regenerering av vev er interessant å se nærmere på for å undersøke om dette er relatert til fettsyresammensetningen i fôret. Fisken som hadde fått høy andel mettet fett før smitteforsøket hadde færrest patologiske forandringer i pankreas og hjerte etter 9 uker, men det var også flest fisk fra denne gruppen som ikke hadde gjenopptatt fôrinntak og mistet vekt i løpet av forsøksperioden. Av fisken som fikk MUFA var det flere som hadde patologiske forandringer i både hjerte og pankreas enn fisken som fikk SFA dietten, til tross for en nokså lik omega-6/omega-3 ratio, mens det var færre fisk i n-6 og ekstrem n-6 gruppen som hadde normal pankreas etter 9 uker. Det var ingen forskjeller i sammensetningen av ARA, EPA og DHA i muskel, noe som kan forklares med at det var høyt nivå av både EPA, samt ARA og LA i fôret. Hvilken rolle mettet fett betyr for fettomsetningen og motstand mot virussykdom er interessant å følge opp i nye egnede forsøk, inkludert fokus på heling av pankreas og dermed evnen til å fordøye fôr.

Det bør gjøres histopatologiske vurderinger av flere fisk fra hver gruppe og uttak for å kunne styrke betydningen av både mettet fett og omega-6/omega-3 ratio for sykdomsforløpet i dette forsøket.

Ved utbytting av fiskeolje med vegetabiliske oljer, blir også innholdet av naturlig forekommende vitamin E former og karotenoider endret. Vitamin E er blant de mest studerte næringsstoffene med hensyn på økt motstand mot sykdom, og modulering av immunresponser (cellulære og humorale responser) hos fisk i oppdrett. Dette kan også påvirke utfallet etter smitte. Det ville derfor være interessant å undersøke om det var forskjeller i vevskonsentrasjonen av vitamin E former, og om dette kan relateres til utfallet i smitteforsøket.

De aller fleste smitteforsøk med SAV (PD) blir utført på liten fisk, gjerne parr i ferskvann, og dette forsøket representerer derfor en mer realistisk situasjon med smitte av stor laks i sjøvann. Den tapte tilveksten hos den smittede fisken kan sies å utgjøre et produksjonstap på rundt 500 g i løpet av 9 uker. Det ville vært interessant å undersøke mekanismene rundt regenerering av vev og vekstregulering (GH-IGF) aksene i denne fisken, for å danne et bilde av hvordan denne blir påvirket under og etter et sykdomsutbrudd. Det er også mulig å undersøke forskjeller mellom fisk som hadde spist og vokst og fisk som ikke hadde begynt å spise.

Materiale fra dette prosjektet vil inngå i et *post doc*-prosjekt med mål å undersøke hva ernæringsstatus betyr ved PD utbrudd.

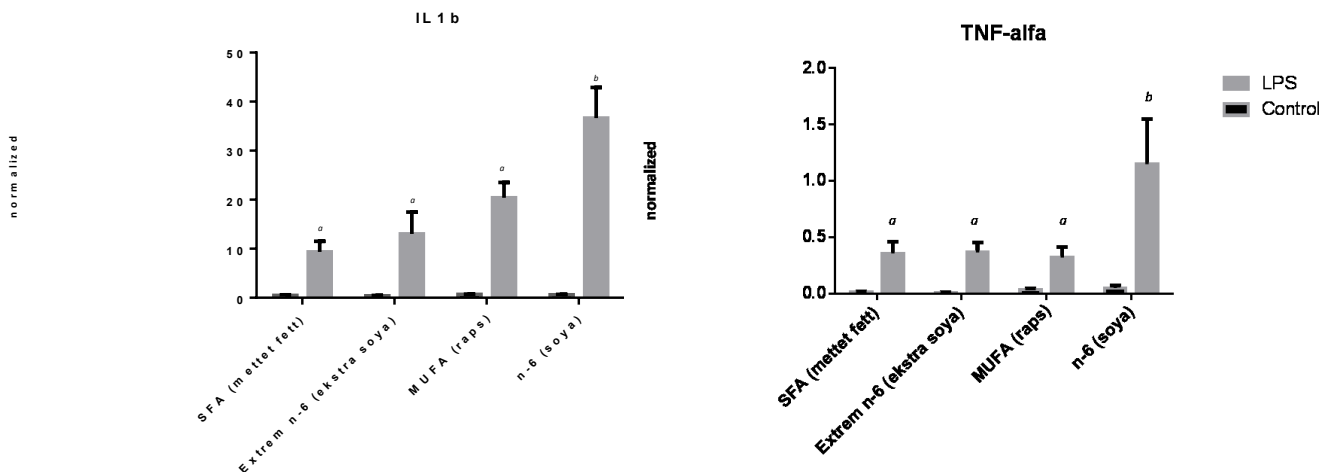
Del 2 - In vitro immunmodeller

A. Respons av hodenyreceller isolert fra laks fra de ulike fettgruppene etter LPS stimulering

Immunceller isolert fra laks gitt fôr med mettet fett, raps og ekstra soyaolje viste en generelt lav transkripsjonsrespons etter LPS stimulering, noe som kan ha en negativ betydning ved en bakterieinfeksjon. Cellene fra laks gitt den balanserte soyadietten skilte seg ut ved at uttrykk av

gener som regulerer fettstremetabolismen, apoptose og immunforsvar var ulikt i forhold til de andre diettene. Den mer rene soyadietten hadde ingen tilsvarende negativ effekt på laksens immunrespons *in vitro*.

Alle gruppene viste oppregulering i uttrykk av immungenene interleukin-1 β (IL-1 β) og tumor nekrose faktor α (TNF- α), Fig. 4. Det var klare diettforskjeller, hvor den balanserte soyagruppen viste signifikant høyst stimulering i forhold til de andre diettene.



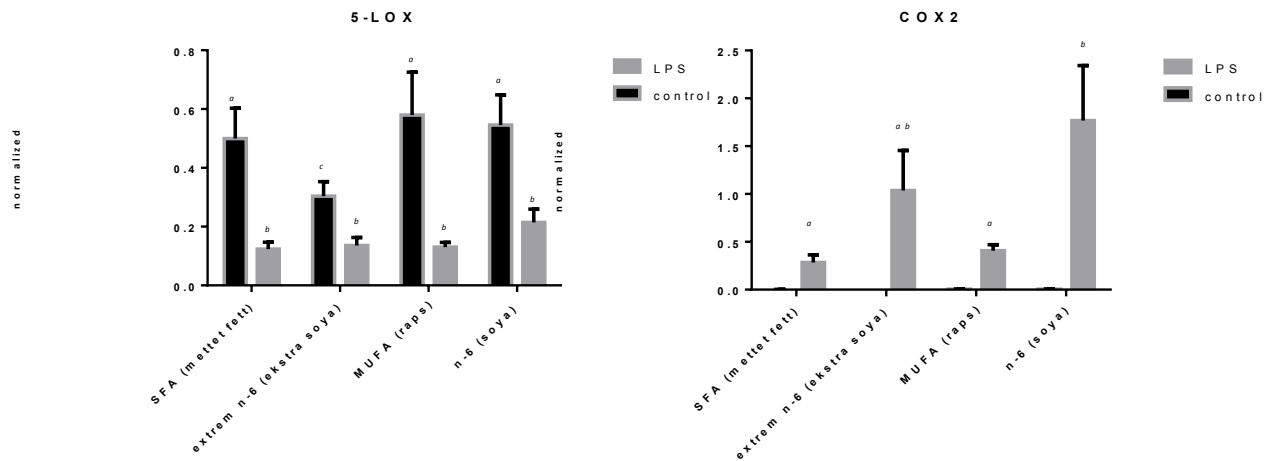
Figur 4. Uttrykk av interleukin-1 β (IL-1 β) og tumor nekrose faktor α (TNF- α) i hodenyreceller med (LPS) og uten (kontroll) stimulering med LPS viste høyt uttrykk etter stimulering for den balanserte n-6 dietten (gj.snitt, SD).

Spiseceller (makrofager/dendritceller) uttrykker CD83 på celleoverflaten. Ved en infeksjon vil man få større aktivitet av disse cellene som tar opp og bryter ned LPS, noe som ble observert med observert oppregulert CD83 i soyagruppene (Tabell 5).

Når det gjelder genmarkører for lipidomsetningen er det i hovedsak n-6 soyagruppen som skiller seg ut. Proteinet CD36 transporterer blant annet fett inn i cellene. Enzymene desaturaser påvirker omdanningen av linolensyre fra planter til de marine omega-3 fettsyrene EPA og DHA. Delta 5- og 6-desaturase (5- og 6des) ble lite påvirket av LPS i de ulike diettene, men LPS induserte oppregulering av 6-desaturase i celler fra rapsdietten. Det ble også funnet diettforskjeller i ekspresjon av peroksisomal proliferator-aktivert reseptor-beta1 (PPAR β) og FAS (fettsyre syntase) genene. Her var det SFA og ekstra høy n-6 diettene som skilte seg ut, med henholdsvis økt og redusert ekspresjon. Tilsvarende ble apoptosefremmende proteinet BAX ble oppregulert av LPS i SFA (mettet fett) og høy n-6 soyadiettene.

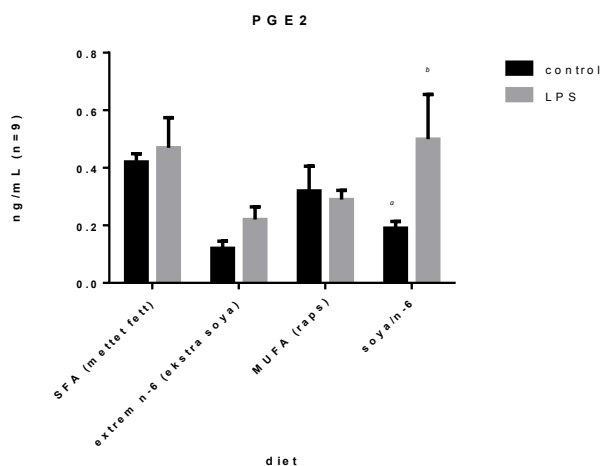
Enzymet COX2 fremmer dannelse av prostaglandiner (PGE), mens enzymet LOX5 danner leukotriener (LTB). Immuncellene har en konstitutiv transkripsjon av LOX som ble nedregulert i alle diettgruppene (Fig. 5). Det konstitutive uttrykket var lavest i ekstra høy soya

gruppen ($p < 0.05$). Begge soyagruppene viste oppregulering av COX2 genet etter LPS stimulering.



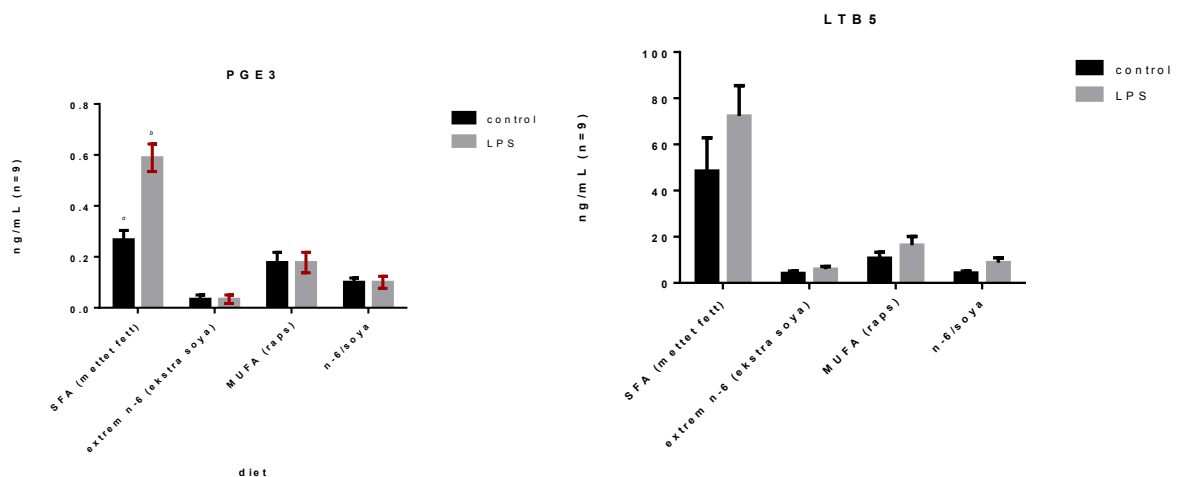
Figur 5. Genuttrykk av enzymer i eikosanoidsyntese, 5-LOX og COX2, i hodenyreceller fra fettgruppene, med (LPS) og uten (kontroll) stimulering med LPS

Supernatanter fra cellekulturene ble analysert for eikosanoider fra omega-6 fettsyren ARA (PGE2 og LTB4) og omega-3 fettsyren EPA (PGE3 og LTB5). Høyere uttrykk av COX2 i soyagruppene samstemte med høyere konsentrasjon av PGE2 som ble målt i medium fra disse cellene (Fig. 6), mens LTB4 ikke viste forskjeller mellom gruppene (ikke vist). Konsentrasjonen av LTB4 var imidlertid i størrelsesorden 100 x høyere enn PGE2.



Figur 6. Analyse av PGE2 i medium (ng/mL) fra hodenyreceller med (LPS) og uten (kontroll) stimulering med LPS viste økt konsentrasjon etter stimulering i den balanserte soya diettgruppen

Analysen av omega-3 avledete eikosanoider i medium fra hodenyreceller med og uten LPS stimulering viste generelt høyere konsentrasjoner i mettetfettgruppen, hvor kun PGE3 viste signifikant økning etter LPS stimulering (Fig. 7). Som for LTB4, var konsentrasjonen av LTB5 i størrelsesorden 100 x høyere enn PGE3. Maksimumkonsentrasjonen av LTB5 var 2-4 x høyere enn LTB4. Generelt sett ansees omega-3 avledete eikosanoider som antiinflammatoriske, uten at man helt kan sette dette inn i sykdomsbildet som ved en virusinflammasjon. De økte konsentrasjoner i mettet fett gruppen kan med forsiktighet settes i sammenheng med reduserte patologiske funn i denne gruppen etter PD smitte. Dette bør undersøkes nærmere.



Figur 7. Analyse av PGE3 og LTB5 i medium (ng/mL) fra hodenyreceller med (LPS) og uten (kontroll) stimulering med LPS viste generelt høye konsentrasjoner i SFA gruppen og signifikant økning i PGE3 etter stimulering

Konklusjon

Tabell 5 under oppsummerer hvordan enkeltgener i hodenyreceller fra fettdiettgruppene ble påvirket av LPS stimulering, som simulerer en bakteriell inflammasjon. Man kan konkludere med at *in vitro* modellen med LPS stimulering av hodenyrecelle fungerer, og at responsen til cellene i kultur ble påvirket av dietten. Immuncellene hos laks som ble føret med n-6 soyadietten, fulgt av MUFA (raps)dietten gav en generelt høyere transkripsjon av immunrelaterte gener sammenlignet med SFA (mettet fett) og ekstra soya diettene. Dette gjaldt også fettmetabolisme-relaterte gener som delta 6- og delta 5-desaturase og CD36. Mettet fett og ekstra soya diettene var mer ulike de andre diettene i genuttrykk av PPARB1, FAS og BAX.

Særlig celler fra den balanserte n-6 soyagruppen (med lavere omega-6/omega-3 ratio), fulgt av MUFA (raps) diettene viste høyere genekspressjon av immunparametre enn SFA (mettet fett) og høy n-6 (ekstra soya) diettene under en inflammasjonsrespons mot LPS. For noen av funnene samsvarer dette med utfall fra føringsforsøket og PD- smitteforsøket som ble utført på samme fisk.

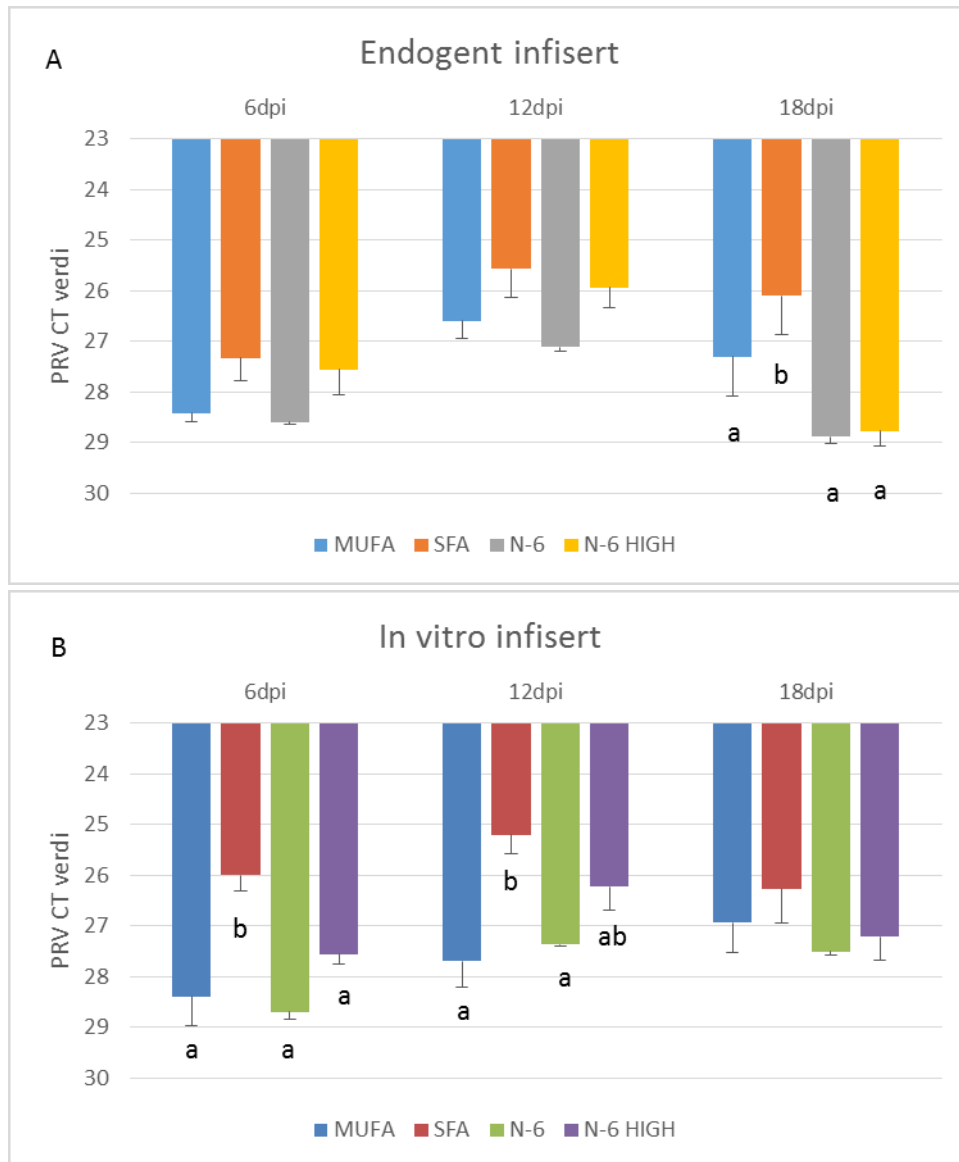
Tabell 5. Tabellen oppsummerer hvordan enkeltgener i hodenyreceller fra diettgruppene ble påvirket av LPS stimulering.

Genmarkør	Mettet fett	Ekstra soya	Raps	Soya
Fettsyremetabolisme				
ACO	↓			
5des				
6des			↓	
Fas				
PPARB1	↑	↑	↑	↑
CD36			↓	
Antioksidasjon				
SOD				
AIF				↓
Signalveier				
BAX	↑	↑		
NFκβ				
P38MAPK	↓	↓	↓	↓
Inflammasjon				
CD83		↑		
IL-1β	↑	↑	↑	↑
TNFα	↑	↑	↑	↑
COX2	↑		↑	↑
PGDS			↓	
PGES				
5-LOX	↓	↓		↓

B. Erytrocyttinfeksjon in vitro

Overlevelsen av de røde blodcellene etter transport og dyrking var god (96-99%), men noe redusert etter 18 dagers infeksjon (93-97%). Tolv dager etter infeksjon ble det kjørt flow-cytometri med PRV antistoff, men viste ingen positiv populasjon, noe som var forventet (Wessel Finstad, pers komm). Immunfluorescens-mikroskopi viste som tidligere en liten fraksjon av celler med mye virus. Her ble det også observert positive farging i de uinfiserte (negative kontrollene) som betyr at forsøksfisken og dermed de negative kontrollene i celleforsøket, var infisert med PRV. Dette ble også verifisert ved qPCR, som viste at blod fra forsøksfisken hadde PRV nivåer med Ct-verdier mellom 25-29 ved 6 dager etter infeksjon, dpi (Fig. 8a), men ingen statistisk forskjell i nivåer mellom førgruppene ved starten av celleforsøket (nullprøver; data ikke vist). Etter inkubering økte PRV i disse 'endogent' infiserte kontrollene mot 12 dpi. Cellene høstet ved 18 dpi hadde meget lavt totalRNA, og følgelig ble kun 25 ng RNA brukt til cDNA syntese mot 100 ng for 6 og 12 dpi. Dette betyr at de faktiske nivåene ved 18 dpi ikke kan sammenlignes med 6 og 12 dpi, kun evt forskjeller mellom førgruppene.

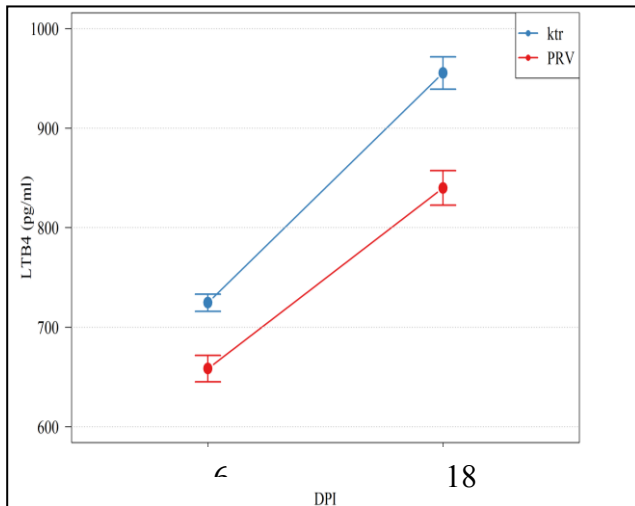
Ved 18 dpi var det signifikant mer virus i SFA gruppen sammenlignet med de øvrige. Ved 6 og 12 dpi var det ingen forskjell i virusmengde mellom fôrgruppene (Fig. 8a). I erytrocyttene som ble tilført PRV *in vitro* var nivåene ved 6 dpi tilsvarende de endogent infiserte, unntatt for SFA gruppen som hadde signifikant mer virus (Fig. 8b). Disse forskjellene vedvarte ved 12 dpi, men utjevnet seg ved 18 dpi etter tilsatt PRV (*in vitro* infeksjon).



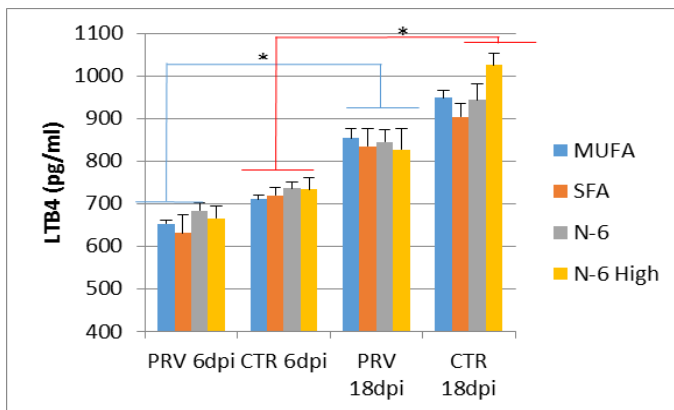
Figur 8. A) PRV RNA mengde (invertert Ct-verdi) i erytrocytter 6-18 dager etter infeksjon (dpi) uten tilsetning av PRV *in vitro*, altså kun 'endogene' nivåer av PRV i blodet fra forsøksfisken. B) PRV RNA mengde i erytrocytter 6-18 dpi etter tilsetning av PRV *in vitro*. Stolpene viser snittverdier ($n=3$) med standardfeil. Statistiske forskjeller mellom grupper ved hvert tidspunkt (parvis *t*-test) er vist med ulike bokstaver. Ct-verdiene for 18 dpi kan ikke sammenlignes med 6+12 dpi pga lavere inputmengde totalRNA i cDNA syntesen (25 versus 100 ng).

Eikosanoidsyntese i erytrocytter

Bakgrunnsinfeksjonen av de negative kontrollene betød at vi manglet uinfiserte kontroller for analysene av eikosanoid-produksjon (PGE2 og LTB4), men vi valgte likevel å utføre analysene med fokus på om det var forskjeller i uttrykk mellom diettene etter *in vitro* infeksjon. Pilotanalyser viste at produksjonen av PGE2 var under deteksjonsgrensen for standardkurven for assayet, og ble forkastet videre. Analyser av LTB4 i cellemidiet 6 og 18 dpi viste økt produksjon over tid for begge behandlingene, og lavere nivåer i cellene som ble infisert *in vitro* sammenlignet med cellene med 'endogent' PRV (Fig 9).

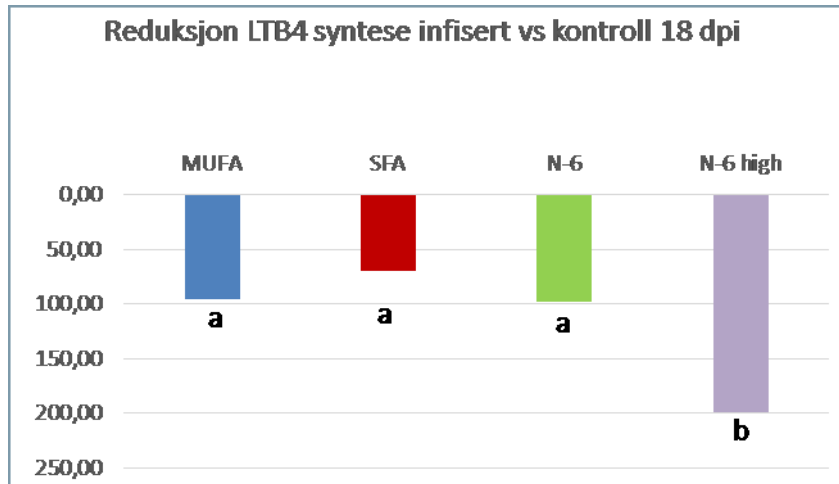


Figur 9. LTB4 (pg/ml) produksjon i erythrocytter infisert med PRV *in vitro* (PRV, rød farge) og erythrocytter 'endogent' infiserte med PRV (ktr, blå farge) ved 6 og 18 dpi.



Figur 10. LTB4 (pg/ml) i medium fra erythrocytter infisert med PRV *in vitro* (PRV) og erythrocytter 'endogent' infiserte med PRV (CTR). Stolper viser snittverdi (n=6) med standardfeil. Det var ingen statistiske forskjeller mellom forgruppene ved de ulike tidspunkt, men mellom tidspunktene for de ulike behandlingene (PRV, CTR), angitt med * (t-test, $p < 0.05$).

Det var ingen forskjell i LTB4 mellom diettene på ethvert tidspunkt (Fig. 10), men Høy n-6 gruppen viste størst differanse i LTB4 nivå etter tilsatt PRV *in vitro* ved 12 dpi (Fig. 11; PRV) sammenlignet med 'bakgrunnsnivåene' (Fig. 10; CTR).



Figur 11. Forskjeller i reduksjon av LTB4 produksjon (pg/ml) ved 18 dpi for de ulike fôrgruppene ved 18 dpi når virus var tilsatt mediet (*in vitro* infeksjon), angitt som differansen mellom erythrocytter infisert med PRV *in vitro* (PRV) og erythrocytter 'endogen' infiserte med PRV (ctr).

Diskusjon

Fettsyresammensetningen i erythrocyttene fra de ulike fôrgruppene viste i grove trekk at n-6 (diett E) og n-6-høy (H) gruppene hadde høyere nivåer av LA og ARA og følgelig lavere nivåer av EPA, sammenlignet med MUFA (A) og SFA (C) gruppene. N-6 Høy gruppen skilte seg fra de øvrige med lavere innhold av alfa-linolensyre og høyest innhold av ARA. Som forventet hadde erythrocyttene høyest innhold av DHA, og nivåene var identiske mellom gruppene. Med dette som utgangspunkt ønsket vi å undersøke om det var forskjeller i erythrocyttenes mottakelighet for PRV infeksjon samt produksjon av de lipid-inflammatoriske signalmolekylene eikosanoidene LTB4 og PGE2 mellom de ulike fôrgruppene. Det faktum at erythrocyttene hadde en bakgrunnsinfeksjon med PRV da vi startet celleforsøket var uheldig, men i etterkant er ikke dette overraskende. De siste to årene har det kommet fram at laks i settefiskanlegg og post-smolt anlegg har svært høy prevalens av PRV, slik at PRV-fri fisk nærmest er umulig å oppdrive. En interessant observasjon var at virusnivåene i både cellene som ble tilført PRV *in vitro* og de som kun ble dyrket videre uten virus var svært like, og økte gradvis med tid. Forholdet i virusnivå mellom diettene synes også å være like mellom behandlingene (altså *in vitro* vs endogen infeksjon). Ved 18 dpi var det betraktelig mindre totalRNA i cellelysat noe som medførte at vi kun brukte 25% totalRNA inn i cDNA syntesen sammenlignet med 6 og 12 dpi. Dette betyr at faktisk virusmengde trolig var høyere (lavere Ct-verdi) ved 18 dpi versus 6 og 12 dpi, og ergo at modellen gir en fin økning i replikasjon av

PRV over tid. På tross av manglende negative kontroller, viste resultatene en høyere virusmengde i SFA dietten (dominerende innhold av palmeolje) ved de første to tidspunktene etter infeksjon *in vitro*. Årsakene til dette er uvisst, men LTB4 nivåene for de ulike fôrgruppene infisert *in vitro* ved 6 dpi synes å korrelere negativt med virusmengde, altså at gruppene med lavere LTB4 produksjon hadde mer virus (ikke signifikant). En tilsvarende tendens gjaldt for de endogent infiserte cellene ved 18 dpi; her hadde erytrocyttene fra SFA dietten signifikant mer virus (Fig. 1A) og lavest LTB4 produksjon (Fig. 3). Med høyere nivå av ARA i N-6-Høy (og N-6) gruppen kunne vi forventet mer substrat for LTB4 syntese og respektivt høyere nivåer, men dette var kun tilfelle for de endogent infiserte cellene ved 18 dpi, og dels ved 6 dpi (Fig. 3). Det er også uvisst hvorvidt ARA nivåene i fosfolipidmembran faktisk var høyere for disse diettene. Mer interessant var tendensen til at PRV tilført via mediet (*in vitro* infiserte behandlinger) synes å gi redusert LTB4 produksjon. Studier har vist at virus kan hemme LTB4 i leukocytter (Atluru et al. 1992). Til sammenlikning ble dette ikke vist for LPS stimulering (bakteriell modell) av hodenyreceller i dette prosjektet. Dataene viste at den faktiske reduksjonen i LTB4 mellom de *in vitro* infiserte og endogent infiserte cellene ved slutt punkt (18 dpi) var mest uttalt (høyere) for n-6-Høy (Fig. 11), på tross av lavere virusmengde og høyere nivå av ARA som substrat. Dette kan bety at også andre mekanismer er viktige for regulering og/eller produksjon av LTB4 under virus infeksjon. Uansett har vi vist at LTB4 produseres og skilles ut av røde blodceller og at nivåene øker med økende virus replikasjon over tid.

Finstad OW, Dahle MK, Lindholm TH, Nyman IB, Lovoll M, Wallace C, Olsen CM, Storset AK, Rimstad E: Piscine orthoreovirus (PRV) infects Atlantic salmon erythrocytes. *Veterinary research* 2014, 45(1):35.

Atluru D, Gudapay S, Xue W, Gurria F, Chengappa MM, McVey DS, Minocha HC, Atluru S: In vitro inhibition of 5-lipoxygenase metabolite, leukotriene B4, in bovine mononuclear cells by bovine viral diarrhoea virus. *Vet Immunol Immunopathol* 1992, 31(1-2): 49-59.

6. Leveranser

Prosjektet har vært presentert med ulike bestanddeler i dialogmøter, prosjektmøter og fagmøter:

- Nini H. Sissener, Rune Waagbø, Elisabeth Holen, Monica Sanden, Olav Breck, Leiv Tvenning, Sofie Remø, Sonal Patel, Øystein Sæle, Sissel Susort, Ingunn Stubhaug, Grethe Rosenlund, Bente E. Torstensen. Hva slags fett skal laksen spise? Dialogmøte FHF Flesland 25.nov 2015.
- Sofie Remø presenterte og diskuterte funn fra smitteforsøket under en PD workshop 24. November, 2015, Bergen
- Nini H. Sissener, Monica Sanden, Bente E. Torstensen, Rune Waagbø, Ingunn Stubhaug, Grethe Rosenlund. Mye omega-6 i fôret reduserer ikke produksjon og lagring av DHA i laks, men påvirker sammensetning av cellemembranene. Fiskeernæringsseminar, Clarion Hotel, Bergen, 5.-6. nov.

- Sissener, N.H. & Waagbø, R. Ikke ett fett for laksens helse. FHF's fiskehelseseminar, Clarion Hotel, Flesland, Bergen 1.-2. september 2015.
- Monica Sanden, Grethe Rosenlund, Bente Torstensen, Rune Waagbø, Nini H Sissener. Lipid metabolism in Atlantic salmon *Salmo salar* L. fed diets with varying content of vegetable oils. Nordic Lipid forum, Reykjavik, Island, 3.-6. Juni 2015.
- Elisabeth Holen, Monica Sanden, Nini Sissener, Grethe Rosenlund, Rune Waagbø. Fettsyreprofilen i laksedietter påvirker genekspressjon i laksens immunceller etter LPS stimulering, Frisk Fisk, Tromsø, 2015.
- N.H. Sissener. Hva skal vi ha mer av i føret når vi har mindre EPA og DHA? FHF-dialogmøte, Hotal Park Inn, Oslo Airport Gardermoen, 21. januar 2015.
- N.H. Sissener, M. Sanden, R.Waagbø, I. Stubhaug, B.E. Torstensen & G. Rosenlund. High dietary 18:2n-6 does not inhibit elongation and desaturation of 18:3n-3 to EPA and DHA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Oral presentation at the XVII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding 6th-10th June 2016, Sun Valley, Idaho
- Sofie C. Remø, Nini H. Sissener, Elisabeth Holen, Sonal Patel, Sven M. Jørgensen, Ingrid U. Fiksdal, Charles McGurk, Grethe Rosenlund, Bente Torstensen and Rune Waagbø. Omega-6/omega-3 balance and saturated fat in diets for Atlantic salmon - effects on fish health and disease resistance. Oral presentation at the XVII International Symposium on Fish Nutrition and Feeding 6th-10th June 2016, Sun Valley, Idaho.

Manuskripter:

N.H. Sissener, M. Sanden, B.E. Torstensen, R. Waagbø, I. Stubhaug, G. Rosenlund. High dietary 18:2n-6 does not inhibit elongation and desaturation of 18:3n-3 to EPA and DHA in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Aquaculture Nutrition (Early View, april 2016)

Det er videre planlagt følgende vitenskapelig artikler med hovedansvarlig:

Nini Sissener et al.: The significance of n-3/n-6 ratio for the health of Atlantic salmon.

Sofie Remø et al.: The effect of dietary fatty acid composition on susceptibility to viral disease in Atlantic salmon

Elisabeth Holen et al.: Inflammation and susceptibility to viral disease in head kidney macrophages of Atlantic salmon fed different fatty acid compositions.

Sven-Martin Jørgensen et al.: Erytrocytt PRV smitte *in vitro* kan evt inkluderes i de øvrige publikasjonene