



N I F E S
NASJONALT INSTITUTT
FOR ERNÆRINGS- OG
SJØMATFORSKNING

Rapport 2017

Faglig sluttrapport, FHF prosjekt 901049

Er plantesteroler knyttet til utvikling av fettlever og eventuelt redusert robusthet hos planteoljefôret laks ved høy og lav vanntemperatur?

N.H. Sissener og T.-K. Østbye (Nofima)

Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES)

31.07.2017



Er plantesteroler knyttet til utvikling av fettlever og eventuelt redusert robusthet hos planteoljefôret laks ved høy og lav vanntemperatur?
(SterolTemp, #901049)

1. Sammendrag

1. 1. Norsk sammendrag

Økende bruk av plantebaserte fôringredienser til Atlantisk laks i oppdrett har ført til økende nivåer av plantesteroler (fytoesteroler) i fôret, samtidig som kolesterol har gått ned. Det har blitt satt spørsmålsteget ved hvordan dette kan påvirke vekst, helse og fettmetabolisme i en karnivor fisk som fra naturens side er vant til en diett med høyt kolesterolinnhold, og hvorvidt fytoesteroler kan være involvert i fettakkumuleringen i lever som ofte har vært observert i laks fôret med høy innblanding av vegetabilsk olje.

Dette prosjektet har benyttet både *in vitro* og *in vivo* forsøk for å besvare dette spørsmålet. Ulike typer og konsentrasjoner av steroler ble tilsatt i et *in vitro* forsøk med leverceller fra laks, der genuttrykk og akkumulering av fett ble målt. Fytoesterolene påvirket ikke mengde fett som ble akkumulert i cellene, og selv om brassicasterol påvirket noen gener relatert til fettmetabolisme, støttet ikke disse resultatene at fytoesteroler forårsaker akkumulering av fett i lever. Et celleforsøk med fettceller fra laks ble gjennomført for å undersøke om fytoesteroler kan føre til økt lipolyse i fettvev. Resultatene viste imidlertid at fytoesteroler medfører redusert sekresjon av enkelte lipider fra fettceller og reduksjon i genuttrykk av noen få lipidrelaterte gener. For å undersøke om fytoesteroler kan hemme transporten av fett ut fra lever ble det også gjennomført celleforsøk med leverceller isolert fra laks fôret med tre ulike nivåer av fytoesteroler og ved to ulike temperaturer. Hverken analyse av lipidsekresjon fra levercellene eller genuttrykk indikerte at fytoesterolnivå i fôret reduserte transport ut fra leverceller.

Et fôringsforsøk med 9 diettgrupper med ulike tilsetninger av fytoesteroler og kolesterol ble gjennomført på to temperaturer (6 and 12°C). Fisken vokste fra en startvekt på ~250 g til en sluttvekt på ~900 g. Totalt sett ga fytoesteroler og/eller kolesterol i området som ble testet (1353-3147 mg kg⁻¹ fytoesteroler, 867-3153 mg kg⁻¹ kolesterol og fytoesterol : kolesterol ratio 0.7-3.2) få effekter på fiskens vekst, fettmetabolisme og helse. Hovedhypotesen om at fytoesterol : kolesterol ratio påvirker fettakkumulering i lever, ser ikke ut til å stemme. Imidlertid hadde kolesterol i fôret en moderat positiv effekt på pigmentering ved begge temperaturer, mens tørrstoff i filet og leverindeks også økte med økende kolesterol i fôret på 12°C. Kolesterol i

fôret hadde også en liten påvirkning på fettsyresammensetning i polare lipider i lever, antakelig mediert av LXR. Retensjon av kolesterol viste en tydelig sammenheng med kolesterol i fôret, og fisk gitt nivåer $<1000 \text{ mg kg}^{-1}$ hadde høy *de novo* kolesterolproduksjon. På tross av dette økte kolesterol i både lever, plasma, galle, muskel, fettvev og helfisk med økende kolesterol i fôret ved 12°C , og i plasma, galle og helfisk ved 6°C . Sterolinnholdet i laksens vev hadde generelt sammenheng med kolesterolinnhold i fôret og fytosterol : kolesterol ratio i fôret, men ikke med fytosterol innhold i fôret i seg selv. Campesterol og brassicasterol så ut til å være de to fytosterolene med høyest absorpsjon i tarmen hos laks. Campesterol hadde også høy utskillelse i galle, mens dette ikke var tilfelle for brassicasterol som akkumulerte i vev og spesielt i fettvev, og i tillegg hadde dobbelt så høy retensjon ved 12°C sammenlignet med 6°C . Campesterol hadde den nest høyeste retensjonen i fisken, men uten noen temperaturforskjell, mens det var svært lav retensjon av andre fytosteroler. Mens retensjon av brassicasterol gikk ned med økende innhold av fytosteroler i fôret, gikk retensjonen av campesterol ned med økende kolesterol i fôret, noe som indikerer forskjeller i opptaksmekanismene for disse to.

Vi kan konkludere med at økende nivåer av fytosteroler i fôret hadde lite effekter på fisken, inkludert ingen effekt på fettakkumulering i lever og ingen tilsynelatende effekter på fiskehelse eller robusthet. Disse resultatene bidrar til en økt fleksibilitet i valg av fôrråvarer.

1.2 English summary

The increasing use of plant-based ingredients in aquafeeds for Atlantic salmon has led to increasing feed concentrations of plant sterols (phytosterols) combined with decreasing concentrations of cholesterol. Questions have been raised regarding how this may affect performance, health and lipid metabolism in a carnivorous fish species adapted to a high cholesterol diet in nature, and whether phytosterols could be involved in the liver lipid accumulation commonly observed in salmon fed diets with high content of vegetable oils.

The current project used both *in vitro* and *in vivo* trials to address this question. In an *in vitro* trial with Atlantic salmon hepatocytes, different types and concentrations of sterols were added to the cell media, and gene expression as well as lipid accumulation was assessed. The phytosterols did not affect the amount of lipid accumulated in the cells, and although brassicasterol affected some genes related to lipid metabolism, these results did not support liver lipid accumulation caused by phytosterols. An *in vitro* trial with salmon fat cells was done to examine if phytosterols induce increased lipolysis in adipose tissue. The results showed that

phytosterols reduced the secretion of lipids from fat cells and reduced the gene expression of a few lipid related genes. Further, a cell trial with liver cells isolated from salmon fed increasing level of phytosterols at two different temperatures was put up to investigate if phytosterols inhibit the transport of fat from the liver. Analysis of secreted lipids and gene expression could not confirm that phytosterols reduce the transport of lipids from liver cells.

A feeding trial with 9 diet groups with varying additions of phytosterols and cholesterol was conducted at two temperatures (6 and 12°C). Fish grew from an initial weight of ~250 g to a final weight of ~900 g. Overall, the addition of phytosterols and/or cholesterol within the range tested (1353-3147 mg kg⁻¹ phytosterols, 867-3153 mg kg⁻¹ cholesterol and phytosterol : cholesterol ratios of 0.7-3.2) exhibited few effects on fish performance, lipid metabolism and health. The main hypothesis regarding phytosterols or phytosterol : cholesterol ratio affecting liver lipid accumulation appears to be false. However, dietary cholesterol did increase muscle pigmentation at both temperatures, while fillet dry matter and hepatosomatic index were also increased by dietary cholesterol at 12°C. Dietary cholesterol also had some minor effects on the fatty acid composition of liver polar lipids, probably mediated by LXR. Cholesterol retention values were clearly dependent on dietary cholesterol, and showed that fish fed cholesterol levels <1000 mg kg⁻¹ feed produced considerable quantities of cholesterol *de novo*. Despite this production, cholesterol content increased with increasing dietary cholesterol in liver, plasma, bile, muscle, adipose tissue and whole fish at 12°C, and in plasma, bile and whole fish at 6°C. The tissue sterol composition generally depended on the dietary cholesterol content and on the dietary phytosterol: cholesterol ratio, but not on the dietary phytosterol content in itself. Campesterol and brassicasterol appear to be the phytosterols with the highest intestinal absorption in Atlantic salmon, but while there is a high biliary excretion of campesterol, this is not the case for brassicasterol, which accumulates in tissues and particularly in adipose tissue, with 2-fold higher retention at 12°C compared to 6°C. Campesterol has the second highest retention in the fish, but with no difference between the two temperatures, while there was very low retention of other phytosterols. While brassicasterol retention decreases with increasing dietary phytosterols, campesterol retention decreases with increasing dietary cholesterol, indicating differences in the uptake mechanisms for these two sterols.

In conclusion, few effects of increasing dietary levels of phytosterols were seen, including no effects on liver lipid accumulation and no apparent effects on fish health and robustness. The current results contributes to greater flexibility on the choice of feed raw materials.

2. Innledning

2.1 Faglig bakgrunn for at prosjektet ble igangsatt:

En tilbakevendende negativ effekt av å bytte ut fiskeolje med planteoljer er økt fettlagring i lever og mer fett i blod. NIFES har gjennomført flere prosjekt de siste 10 årene der vi ser at denne endringen i fettlagring og blodlipider skjer med økt mengde plantesteroler (fytosteroler) og redusert kolesterolmengde i fôret, men disse endringene har samvariert med nedgang i mettet fett. Rapsolje er planteoljen med høyest innhold av fytosteroler som er vanlig å bruke i laksefôr per i dag, men denne oljen er også lav i mettet fett og inneholder kun spormengder av kolesterol. Lave konsentrasjoner av EPA og DHA i fôret har også vist seg å kunne forsterke effekten på lipidlagring i lever. For å vite hvilke oljer som egner seg i fiskefôr må vi ha kunnskap om hvilke av disse komponentene i oljene som er årsak til økt fettlagring i lever.

Tidligere forsøk har vist at temperatur kan ha en signifikant effekt på lipidlagring i leveren hos Atlanterhavslaks. En har sett en større fettlagring i lever ved lave temperaturer (5-6°C) enn ved høyere temperaturer (12°C) i fisk under ellers like forhold og gitt samme fôr. Dette tyder på at temperatur har mye å si for fettmetabolismen, og rollen til temperatur på lipidlagring i lever bør utredes videre.

Fytosteroler senker opptaket av kolesterol fra tarmen hos pattedyr, og kan også påvirke lipidmetabolisme ved å fungere som en kolesterol-etterligner. *In vitro* forsøk med humane leverceller har vist at høye nivåer av fytosteroler i leveren gir en nedgang i kolesterolsyntesen og en oppjustert kolesterolutskillelse. Resultater kan tyde på at det er slik hos laks også, og det er behov for å forstå hvordan fytosterol og kolesterol i fôret regulerer laksens sterolmetabolisme.

2.2. Prosjektets omfang:

Prosjektet ble startet opp i 2015, og avsluttes i juli 2017, med en total bevilgning på 7 054 000 kr fra FHF i denne perioden. Prosjektet har inkludert flere celleforsøk, både ved NIFES og Nofima, samt et stort fôringsforsøk på Skretting ARC sin forsøksstasjon på Lerang.

2.3. Prosjektorganisering

Prosjektet har vært ledet og organisert av NIFES (Dr. Nini H. Sissener), med forskerkompetanse fra NIFES (Dr. Nina Liland, Dr. Elisabeth Holen, Dr. Bente Torstensen), Nofima (Dr. Tone-Kari Østbye og Prof. Bente Ruyter) og Skretting ARC (Dr. Grethe Rosenlund og Dr. Ingunn Stubhaug). Teknikere ved alle institusjonene bidro med respektive analyser og praktisk hjelp.

Styringsgruppen for prosjektet har bestått av: Tor-Eirik Homme (Grieg Seafood), Tommy Hansen (Nordlaks), Harald Sveier (Lerøy) og fagsjef FHF Merete Bjørgan Schrøder/ Kristian Prytz.

3. Problemstilling og formål

Kunnskap om laksens praktiske ernæringsbehov er essensielt for å kunne utvikle fôr til laks med ikke-marine råvarer, som ofte er lave på lipidkomponenter som EPA og DHA, mettet fett og kolesterol. Konsentrasjonen av fytosteroler er høy i rapsolje og dette kan påvirke det praktiske ernæringsbehovet for kolesterol. Prosjektet vil avdekke en eventuell kritisk øvre grense for fytosteroler i fôret til laks (innenfor de nivåene man kan oppnå i praktiske fôr), og om denne påvirkes av vanntemperatur eller av å tilsette mer kolesterol i fôret. Ved å knytte fettlagring i lever til laksens robusthet vil en kunne bestemme om en eventuell økning i leverfett er et problem for laksen, eller om dette representerer en naturlig og ikke-skadelig endring i fettlagring.

Mål for prosjektet:

- 1) Bestemme trygge nivå av fytosteroler i planteoljebaserte fôr som ikke gir fettlever og økt fett i blod hos laks ved kald (6°C) og varm (12°C) vanntemperatur.
- 2) Bestemme betydningen av mengde fytosteroler, kolesterol og deres innbyrdes ratio i planteoljebaserte fôr for utvikling av fettlever hos laks ved kald (6°C) og varm (12°C) vanntemperatur.
- 3) Studere potensielle reguleringsmekanismer involvert i plantesterolers effekt på fettakkumulering i lever hos laks ut fra *in vitro* studier med native adipocytter og leverceller fra fôringsforsøket.
- 4) Bestemme trygge fettnivå i lever (og korresponderende blodfett) hos laks, som ikke reduserer laksens robusthet, vurdert ut fra *in vitro* studier på hodenyreceller fra fisk fra fôringsforsøket med steroler.

4. Prosjektgjennomføring

4.1 *In vitro* studier med celler fra laks:

Et *in vitro* eksperiment med primære leverceller fra laks ble gjennomført på NIFES for å studere hvilke mekanismer i cellen som påvirkes av høy/lav kolesterol og evt ulike typer fytosteroler. I forkant ble det kjørt et pilotforsøk for å teste ut ulike eksponeringstider og metoden for å måle fett i cellene. Leverceller fra laks ble eksponert for kolesterol og fytosteroler (både fytosterolmiks i 5 konsentrasjoner fra 100-400uM, fytosterolmiks + kolesterol (ratio 1:1 og 2:1, 200uM) og individuelle fytosteroler; sitosterol, stigmasterol og brassicasterol, 200uM). I tillegg ble det kjørt positiv kontroll (tilsatt EtOH i samme konsentrasjon som ble brukt for å løse sterolene) og negativ kontroll (uten EtOH). Markørgener for fettomsetning (forbrenning, syntese, lagring og eksport) ble målt (srebp2, lxr, rxr, ppar-g, acat2, plin3, plin2, cyp7a1, pnpla2, dgat2, abcg5), i tillegg til kvantifisering av fettdråper i levercellene. Eksponeringsnivåene av fytosteroler tok utgangspunkt i realistiske levernivå vi tidligere har analysert i laks.

Et *in vitro* cellestudium med fettceller (adipocytter) fra laks ble gjennomført på Nofima for å undersøke om fytosteroler kan føre til økt lipolyse fra fettvev og dermed bidra til økt akkumulering av fett i lever. Pre-adipocytter ble isolert fra innvolls fett til laks ihht metode beskrevet av Vegusdal et al. (2003) og Todorovic et al. (2008) og differensierte til modne fettceller i kultur. Dyrkingsmediet ble så anrikt med 100 µM fytosterolmiks eller brassicasterol (type og dose ble valgt ut i fra levercelleforsøket på NIFES og et pilotforsøk med fettceller), i tillegg til en radioaktiv markør (^{14}C -18:1n-9). For å studere lipolysekapasitet ble det tilsatt glukagon (som simulerer fasting). Det ble analysert for genuttrykk i fettcellene samt for radioaktivt merkede lipider (TAG, MAG/DAG, FFA, PL) i både celler og i medium. Uttrykk av gener relatert til opptak, transport, oksidasjon og syntese av fett, ble målt.

Leverceller fra fisk fra fôringsforsøket (se neste punkt) ble benyttet for å studere effekten av fytosterol på lipidsekresjon i leverceller. Målet var å undersøke om fytosterol kan føre til hemming av transporten av fett ut fra lever (reduert VLDL sekresjon) og dermed representere en mekanisme som bidrar til økt fettakkumulering i leverceller til laks. Leverceller ble isolert fra laks fôret på økende nivåer av fytosteroler i fôret (1399, 2181 og 2876 mg/kg fôr, og konstant innhold av kolesterol), og dyrket i medium tilsatt radioaktiv markør (^{14}C -18:1n-9) i ca 48 timer. Det ble analysert for radioaktivt merkede lipider (TAG, DAG, FFA, PL) både i cellene og medium i tillegg til uttrykk av gener involvert i opptak, transport, oksidasjon og syntese av fett.

Radioaktivt merkede lipider i cellemediet er et mål på VLDL transport fra levercellene. Forsøket ble utført i henhold til protokoll beskrevet av Kjær et al. 2008. Det ble også målt fytosterolnivå i cellene.

Isolering av hodenyreceller ble gjort fra fisken i fôringsforsøket (to fôringsgrupper; høy og lav fytosterol), og stimulert med LPS for å trigge (bakteriell stimulering) inflammasjon/immunrespons. Inflammasjonsmarkører ble målt med qPCR (genuttrykk). Ved hjelp av denne metoden kan en vurdere om diettene har gitt en endring i fiskens inflammatoriske respons på patogener.

4.2 Fôringsforsøk med Atlantisk laks:

Et fôringsforsøk med laksesmolt (250 g) gitt fôr med ulike innhold av fytosteroler og kolesterol ved to sjøvannstemperaturer (12°C og 6°C) ble gjennomført i kar ved Skretting ARC, Lerang forsøksstasjon. Forsøksdesignet (Tabell 1) hadde som mål å:

- 1) Undersøke hvilken mengde fytosterol i fôr til laks (økende mengde fytosterol fra 0, 500, 1000, 1500 og 2000 mg/kg tilsatt i et planteoljebasert fôr) som er trygg med tanke på utvikling av fettlever.
- 2) Undersøke om fettutviklingen i lever av et vanlig forekommende høyt innhold av fytosterol (2000 mg/kg) i fôret kan elimineres ved økte tilsetninger av kolesterol (0, 1000, 3000 mg/kg).
- 3) Undersøke om en innbyrdes ratio (fytosterol/kolesterol) i fôret (fra 0.5 til 3.0) eller lik ratio (1.0) ved tre nivå fytosterolnivåer (1000, 2000 og 3000 mg/kg) har betydning for uønsket fettleverutvikling.

Tabell 1. Forsøksdesign og målnivåer for steroler i de 9 eksperimentelle fôrene.

Diet	Phyt added, mg kg ⁻¹	Chol added, mg kg ⁻¹	Theoretical Phyt in diet	Theoretical Chol in diet	Theoretical Phyt: Chol
0/0	0	0	1000	1000	1.0
0/1000	0	1000	1000	2000	0.5
500/0	500	0	1500	1000	1.5
1000/0	1000	0	2000	1000	2.0
1000/1000	1000	1000	2000	2000	1.0
1000/3000	1000	3000	2000	4000	0.5
1500/0	1500	0	2500	1000	2.5
2000/0	2000	0	3000	1000	3.0
2000/2000	2000	2000	3000	3000	1.0

Føringsforsøket baserte seg på et planteoljebasert basisfôr, der de flerumettede fettsyrene EPA, DHA, 18:3n-3 og 18:2n-6 vil ikke være variabler i designet. Basisdietten er en lav fiskemel- og fiskeolje diett, og målnivåer for fôret var ca 15 % mettet fett, 10 % 18:3 n-3 og 5 % EPA + DHA av totalfett i fôret på 30 % fett. Innholdet av mettet fett og 18:3n-3 standardiseres ved hjelp av palmoelin og linolje som har vært brukt i tidligere studier. Fôrene vil ha mengde mettet fett som i et dagens kommersielt fôr med mye rapsolje. EPA og DHA innholdet holdes lavt men over antatt minimumsbehov, grunnet tidligere observasjoner av økt risiko for lipidlagring ved lave nivåer av EPA og DHA, samt for å kunne holde kolesterolmengden nede. Fytosterol- og kolesterolinnholdet justeres til ønskede nivåer ved å tilsette rent kolesterol eller en fytosterolblanding. De høye konsentrasjonene av kolesterol er som i en høy fiskemel-fiskeolje diett. De fem fytosterolnivåene (1000, 1500, 2000, 2500 og 3000 mg/kg) med lav kolesterol (1000 mg/kg) simulerer rapsoljedieter med høye konsentrasjoner av fytosteroler og dieter med mer marine oljer i det laveste fytosterolnivået. Fôrene er gitt navn etter steroltilsetningen, f.eks diett 0/1000 har ingen tilsatt fytosterol og 1000 mg/kg tilsatt kolesterol.

Føringsforsøket ble kjørt parallelt på to temperaturer, med triplikate kar på 12°C (27 x 1m kar totalt) og duplikate kar på 6°C (18 x 1m kar totalt). Fisken ved de to temperaturene ble fôret ulik lengde for å oppnå samme sluttvekt, henholdsvis 16 og 24 uker ved 12°C og 6°C. Prøveuttak ble foretatt ved start, midtveis (8 og 12 uker) og ved slutt (16 og 24 uker), hvor fisken veies, undersøkes, blodprøvetas, dissekeres og prøvetas for organer relevant for fettomsetningen. Vekst, fôrutnyttelse og fettlagring i helfisk og i ulike organer (organvekter og kroppsindeks, fettinnhold, fettklasser) ble registrert, inkludert tarm, visceral fett, lever og muskel for å følge endringer i fettinnhold mellom fettlagringsorganene. Tilsvarende analyserte vi status av fytosteroler i de ulike vev og galle. Galle er essensiell for fettfordøyelsen og ekskresjon av fettløselige forbindelser som kolesterol, fytosteroler og gallesalter. Prøver direkte fra galleblæren sikret at forbindelsene er direkte utskilt via lever og vil gi informasjon om omsetningen av disse, spesielt om fytosterolenes eventuelle omsetning gjennom enterohepatisk sirkulasjon (variasjon i galleinnhold vil bli relatert til gallens osmolalitet). Noen av prøvene i forsøket ble tatt både 24 timer og 48 timer etter endt fôring for å undersøke om fytosterolene/vanntemperatur forårsaker forsinkelser i lipidopptak og transport i blodet. Blodlipider (TAG og kolesterol) ble analysert med kliniske analyser. Fettsyresammensetning i røde blodceller og av polare og nøytrale lipider i lever ble analysert, i tillegg til astaxanthin i muskel og plasma. Genuttrykk ble målt i lever av viktige markørproteiner i lipid- og sterolmetabolismen som kan relateres til fettakkumulering og i tarm av viktige transportører involvert i sterolopptak og transport. Kliniske plasmaanalyser av enzymene ASAT og ALAT er klassiske markører som indikerer vevsskade i leveren. Vitamin E (inkludert «plante»- tokoferolene) og TBARS (oksidasjonsstatus) ble

analysert for å undersøke om fisken har nok antioksidant beskyttelse av fett, og avklare om oksidasjon er knyttet til problemstillingen rundt fettakkumulering og helse.

Underveis i prosjektet ble det, i samråd med styringsgruppen og FHF, gjort noen endringer i hvilke analyser som skulle gjennomføres på prøver fra fôringsforsøket i forhold til opprinnelig prosjektplan. Analysene som er beskrevet over er de analysene som ble gjennomført.

5. Oppnådde resultater, diskusjon og konklusjon

5.1 Resultater

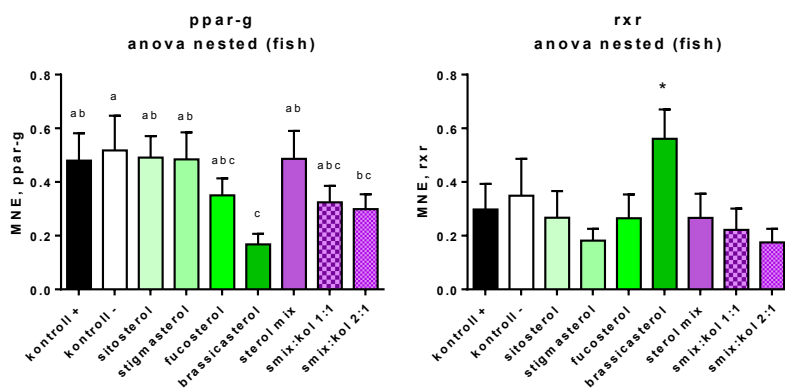
WP 1.1 Celleforsøk med primære leverceller fra Atlantisk laks, NIFES:

Sterolsammensetningen i den kommersielle fytosterolmiksen (CardioAid Plant Sterols, ADM, IL, USA) som ble brukt både i celleforsøk og fôringsforsøk i dette prosjektet, ble analysert (Tabell 2). Resultatene tydet på at disse fytosterolene var ekstrahert hovedsakelig fra soyaolje, med et lite innslag av rapsolje (basert på det lave innholdet av brassicasterol i denne miksen).

Tabell 2. Analysert sterolsammensetning i fytosterolmiksen som ble brukt både i celleforsøkene i WP1.1. og WP1.2, samt I fôringsforsøket i WP2.

Sterol	% of total sterols
Cholesterol	0.3
Brassicasterol	1.6
Campesterol	25.8
Campestanol	0.6
Stigmasterol	21.2
β -sitosterol	47.5
Sitostanol	2.2
Stigmasta-dienol	0.5
Stigmast-enol	0.3
Δ -7-avenasterol	0.1
Sum total	100.0

I forsøket med primære leverceller fra laks tilsatte økende konsentrasjoner av fytosterolmiksen og ulike fytosteroler, var det mye individuelle variasjoner i genuttrykk, men noen statistisk signifikante forskjeller ble sett. Cellene behandlet med brassicasterol (sterolet som er typisk for rapsolje) skilte seg ut i genuttrykk fra de andre gruppene (Figur 1). Blant annet var uttrykket av *rxr* i brassicasterolgruppen var signifikant høyere enn alle de andre behandlingsgruppene. RXR er et protein som fungerer som en kofaktor og transkripsjonsfaktor sammen med LXR, og er ansvarlige for å aktivere mange gener i lipidmetabolismen, spesielt gener som regulerer utskillelse av kolesterol. Uttrykk av *lxr* var ikke forskjellig mellom behandlingene. *ppary* er en transkripsjonsfaktor involvert i mange metabolske veier i lipidmetabolismen, og er spesielt viktig for opptak og produksjon av fett i fettceller, og denne var signifikant lavere uttrykt i brassicasterol gruppen enn i de fleste andre behandlinger. Det blir imidlertid vanskelig å knytte dette opp mot at fytosteroler gir fettakkumulering i lever, da en effekt på *ppary* motsatt vei ville vært forventet utfra tidligere resultater angående fettlever hos mennesker og mus.



Figur 1. Genuttrykk i leverceller utsatt for ulike behandlinger.

Regresjonsdesignet (økende konsentrasjon av fytosterolmiksen tilsatt) ga ingen signifikante forskjeller, noe som indikerer at en økende mengde steroler ikke gir noen ekstra effekt på cellene i genuttrykk. Der var en svak tendens (ikke signifikant) til at behandling med 200 uM steroler hadde den største effekten på genuttrykket.

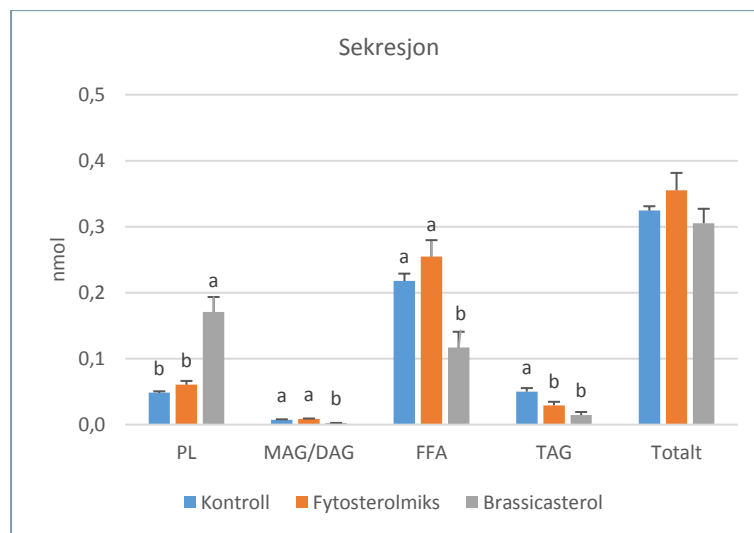
Det var ingen tydelige forskjeller mellom gruppene verken i areal av cellene dekket av fettdråper eller i antall dråper. Imidlertid var det en liten effekt på størrelsen av fettdråpene, som var signifikant større i cellene behandlet med sitosterol i forhold til fucosterol og den ene kontrollgruppa. Dette ble også støttet av redusert genuttrykk av *plin2* i sitosterol-gruppa, som koder for et protein som befinner seg på utsiden av lipiddråpene (større dråper uten at det er mer totalt fett = mindre overflate på dråpene).

Imidlertid var det ingen korrelasjon mellom størrelse på lipiddråpene og *plin2*-uttrykk i cellene fra samme individfisk.

Hovedkonklusjonen fra celleforsøket er at fytosterolene hadde lite effekter på fettlagring i levercellene, men brassicasterol påvirket uttrykk av noen gener relatert til lipidmetabolisme.

WP 1.2 Celleforsøk med primære fettceller fra Atlantisk laks, Nofima:

Dyrking av fettceller i vekstmedium med fytosteroler resulterte i lavere sekresjon av ^{14}C -TAG sammenliknet med kontrollgruppen. I tillegg viste cellene som ble dyrket i vekstmedium med brassicasterol lavere sekresjon av FFA i forhold til kontroll gruppen og cellene som ble dyrket med fytosterolmiks. Det var ingen forskjell i totalt nivå av sekrete ^{14}C -lipider mellom de tre gruppene. (Figur 2). Det var få og små forskjeller i uttrykk av lipid relaterte gener mellom cellene dyrket med og uten fytosteroler i vekstmediet (data ikke vist).

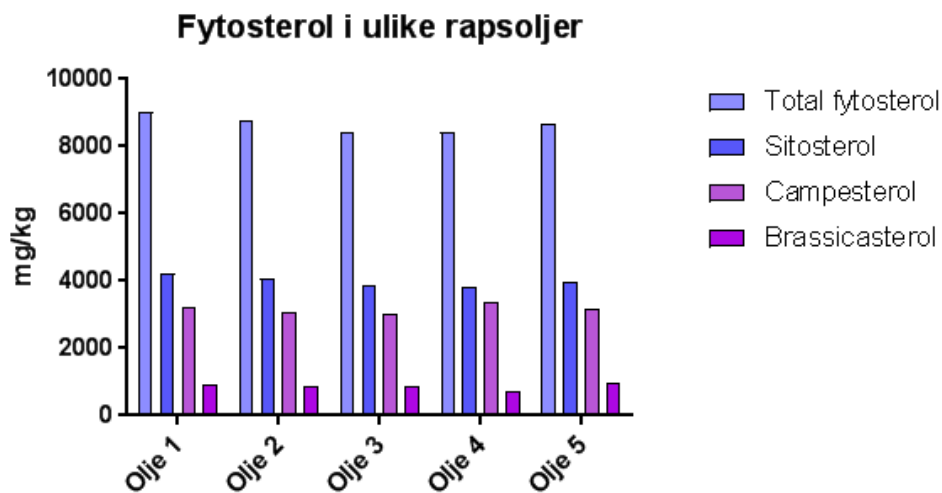


Figur 2. ^{14}C -merkede fosfolipider (PL), mono-, di- og triglyserider (MAG, DAG, TAG) og frie fettsyrer (FFA) sekret fra fettcellene ut i vekstmedium.

WP 2. Fôringsforsøk med Atlantisk laks, Lerang forsøksstasjon:

Vi analyserte fytosteroler i 5 ulike rapsoljer, med mål om å finne en med spesielt lave nivåer av fytosteroler, som kunne brukes i basalfôret for å oppnå det ønskede fytosterolnivået på ~1000mg/kg. Det viste seg imidlertid at både total fytosterol og fytosterolsammensetningen var svært lik på de oljene vi analyserte (Figur 3), dermed ble det bestemt at vi skulle bruke noe olivenolje (da denne har

en relativt lik fettsyresammensetning som rapsolje med mye 18:1n-9) i basalfôret for å holde fytosterolnivået nede.



Figur 3. Analysert sterolsammensetning av 5 ulike rapsoljer fra ulike produsenter/geografiske områder, kjøpt gjennom Skretting ARC's kontakter.

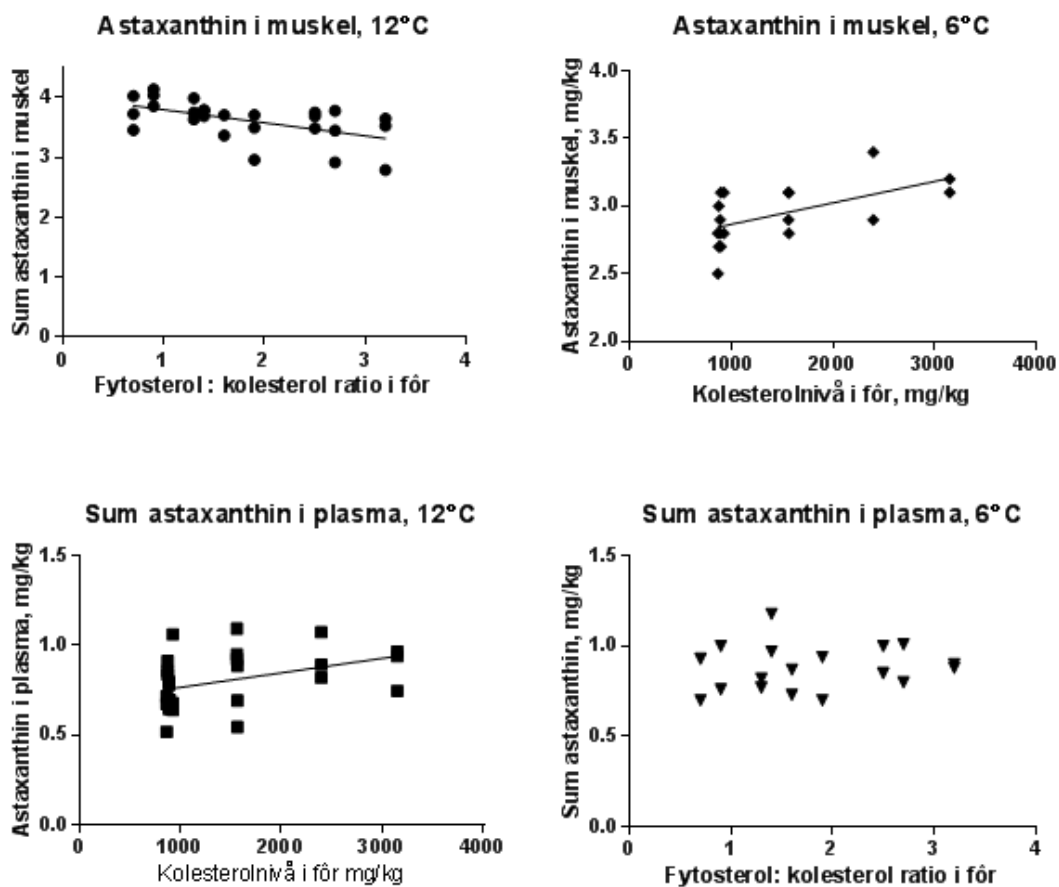
Analyse av fôrene produsert til fôringsforsøket viste at alle 9 fôrene hadde svært lik sammensetning av hovednæringsstoffer og lik fettsyreprofil med EPA + DHA på ~4 % av totalfettsyrer. Det viste seg at kolesterolnivået i basalfôret var noe lavere enn forventet (877mg/kg), mens fytosterolnivået var noe høyere (1399 mg/kg), men tilsetningene var korrekte. Fytosterol : kolesterolratioen på de 9 fôrene lå fra 0,7 til 3,2. Selv om det var noe avvik fra målverdiene, konkluderte vi med at forsøksdesignet var godt ivaretatt med disse fôrene.

For alle parametere som ble målt i fôringsforsøket, så vi på regresjon både i forhold til fytosterolnivå i fôret, kolesterolnivå i fôret og fytosterol : kolesterol ratio.

Sterolnivåene i fôrene (nivå av fytosterol, kolesterol eller fytosterol : kolesterol ratio) påvirket ikke fiskens vektøkning, sluttvekt, kondisjonsfaktor eller utnyttelsen av fôret, verken på 12 eller 6°C. Fisken i forsøket vokste godt, med en gjennomsnittlig relative growth index (RGI) på 106 % ved 12°C og 82 % ved 6°C. Viscera-somatisk indeks var ikke påvirket av steroler i fôrene, mens heptosomatisk indeks (relativ levervekt) økte med økende kolesterol i fôret på sluttuttaket ved 12°C. Imidlertid kunne kolesterolnivået kun forklare 16 % av den totale variasjonen i levervekter, og ingen slik sammenheng ble sett på sluttuttaket ved 6°C, eller på mellomuttakene ved begge temperaturene. Det var heller

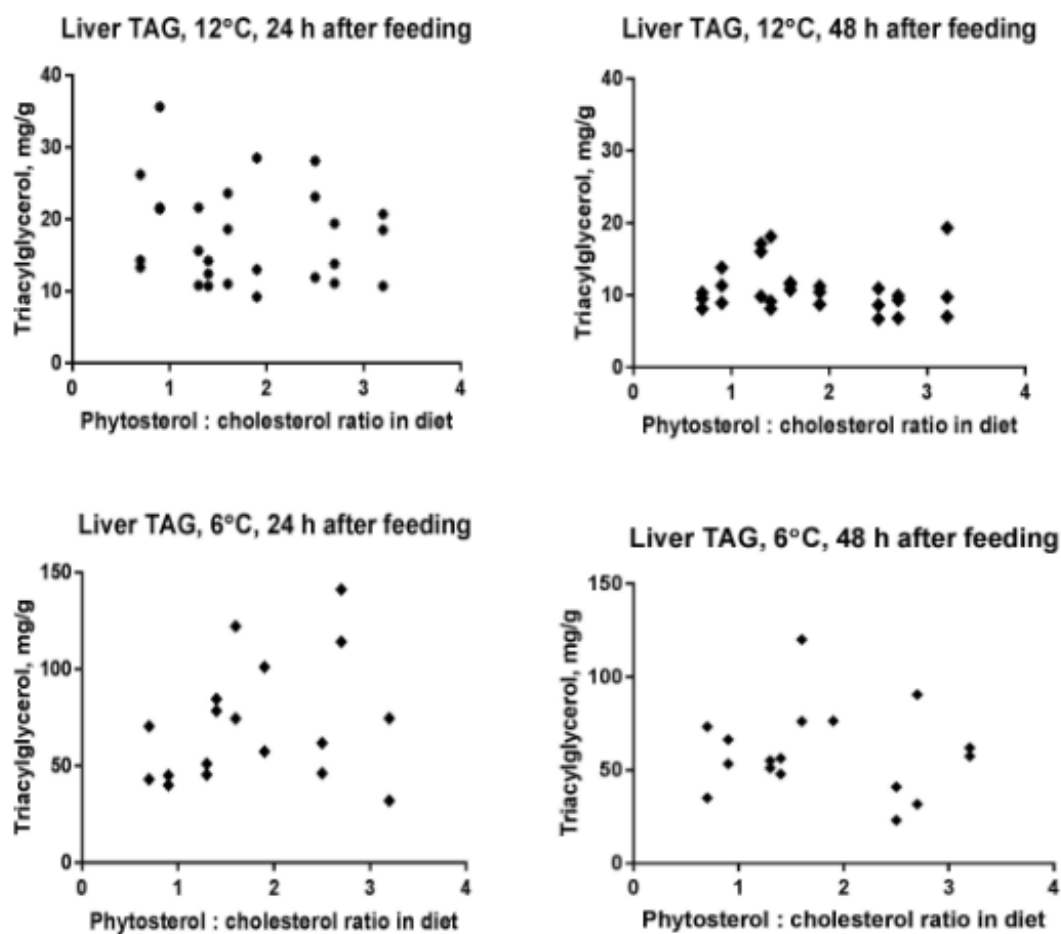
ingen forskjeller i sammensetningen (fett, protein, aske, tørrstoff) av helfisk og filet, med unntak av økende tørrstoff i filet med økende kolesterolnivå i fôret ved 12°C.

Astaxanthin i filet korrelerte med fytosterol : kolesterol ratioen i fôret ved 12°C (Figur 4), mens det også var en noe svakere sammenheng med kolesterol alene, men ikke med fytosteroler alene. Ved 6°C korrelerte astaxanthin i filet med kolesterol i fôret, men verken til fytosterol : kolesterol ratio eller til fytosteroler alene. Astaxanthinkonsentrasjon i plasma korrelerte til fytosterol : kolesterol ratio ved 12°C, med en svakere korrelasjon til kolesterol alene, mens det ikke var noen sammenheng mellom plasmadataene og sterolnivåene i fôr ved 6°C. Ingen av vitamin E formene som ble analysert i helfisk ble påvirket av sterolinnhold i fôrene, og TBARS i muskel ble heller ikke påvirket av sterolnivå i fôrene.



Figur 4. Astaxanthin i filet og plasma fra Atlantisk laks som har spist fôr med ulike sterolnivåer. Hvert datapunkt representerer ett kar, med samleprøver av 6 fisk (plasma og filet, 12°C) eller individuelle prøver fra 6 (plasma, 6°C) eller 12-16 fisk (filet, 6°C) analysert. Linjene viser signifikante lineære regresjoner.

Mengde fett i lever på midtuttaket på begge temperaturer hadde ingen sammenheng med sterolnivåene i fôrene. Dette var også tilfelle på sluttuttaket på begge temperaturer, både 24 og 48 timer etter siste fôring (Figur 5). TAG i lever var mye høyere ved 6 enn ved 12°C. Nivåene gikk ned fra 24 til 48 etter fôring på begge temperaturene. Steroler i fôret hadde heller ingen innvirkning på fettsyresammensetningen i nøytrale lipider i leveren. Derimot korrelerte økende kolesterol i fôret tydelig med redusert DHA og økt EPA i polart fett i lever ved begge temperaturer, men effekten på disse fettsyrene var tallmessig liten. Dette samsvarer med resultater fra pattedyr, som viser at kolesterol har en hemmende effekt på $\Delta 6$ -desaturase enzymaktivitet, og dermed reduserer omdannelse fra EPA til DHA.



Figur 5. Triacylglycerol (TAG) i lever fra Atlantisk laks fôret med økende fytosterol : kolesterol ratio ved 12 eller 6°C, med prøver tatt 24 og 48 timer etter siste fôring. Hvert datapunkt representerer ett kar, med samleprøver av lever fra 6 individfisk. Legg merke til bruk av ulik skala på 12 og 6°C, på grunn av det mye høyere fettnivået i lever ved 6°C.

Fettakkumulering i midttarm ble ikke påvirket av sterolene i fôret, verken på 6 eller 12°C. Dette var også tilfelle for fosfolipider og TAG i plasma, både 24 og 48 timer etter fôring, for konsentrasjoner av plasmaenzymene ALAT og ASAT, og hematokrit og hemoglobin.

Sterolene i fôret hadde lite effekter på genuttrykk i lever, inkludert ingen signifikante effekter på *srebp2*, *dhcr7*, *ppary*, *ppara*, *cyp7a1*, *fas*, *cpt1* og *vtg* ved 12°C og på *lxr*, *srebp1*, *srebp2*, *dhcr7*, *ppary*, *ppara*, *cyp7a1*, *cpt1* og *il1β* ved 6°C. *Tnfa* var for lavt uttrykt til å bli kvantifisert ved begge temperaturene, mens *il1β* var for lav ved 12°C og *vtg* var for lav ved 6°C. Ved 12°C var både *rxr* og *lxr* signifikant lavere uttrykt i fôrgruppe 0/0 sammenlignet med gruppe 0/1000 og 2000/0, mens 2000/2000 var midt imellom. Ved 6°C var det redusert uttrykk av *rxr* i gruppe 2000/0 sammenlignet med gruppene 0/1000 og 2000/0, mens *fas* var høyere uttrykt i gruppe 2000/0 sammenlignet med gruppe 2000/2000. I isolerte hodenyreceller var det ingen forskjeller i genuttrykk mellom de to fôrgruppene testet (0/0 and 2000/0), verken i basalt uttrykk eller i oppreguleringen i respons til LPS eksponering (data ikke vist). LPS hadde ingen effekt på uttrykket av *CD36*, mens *CD38* ble 7-ganger oppregulert (sd 4.2), *cox2* 700-ganger (sd 1056), *il1β* 56-ganger (sd 54), *il6* 441-ganger (sd 484) og *tnfa* 188-ganger oppregulert (sd 132). Dette viser at modellen fungerte (LPS induerte inflammasjon/ immunrespons i cellene), men hvilket fôr fisken hadde fått i forkant hadde ingen betydning for hvor sterk denne inflammasjonen ble. Dermed gir disse resultatene ingen indikasjoner på at fytosterolnivå i fôret påvirker fiskens robusthet ift. bakterieinfeksjoner.

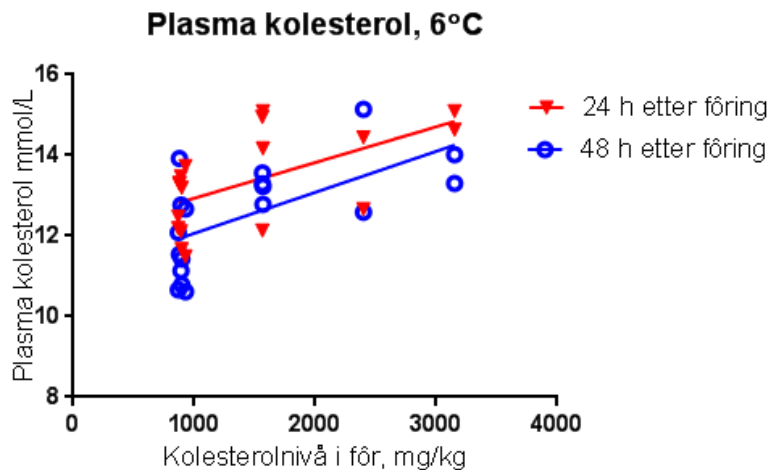
Når det gjelder genuttrykk i midttarm for de fire diettgruppene 0/0, 0/1000, 2000/0, 2000/2000 var det ingen signifikante forskjeller verken i *ACAT2*, *NCP1L1*, *ABCG5* eller *ABCA1*, som alle har viktige roller i opptak eller videre transport ut fra tarm av sterolene.

Sterolnivåer og sammensetning varierte mellom ulike vev (Tabell 3). Fytosteroler utgjorde 2.0 – 3.1 % av totale steroler i lever og muskel, 5.0 - 6.6 % i midttarm og fettvev, og 36.7 – 46.5 % i galle. Det var noen temperaturforskjeller, som for eksempel at både kolesterol og fytosteroler var høyere i lever ved 6°C, mens nivåene i helfisk ikke var forskjellige. I de fleste vev var det imidlertid kun sammensetningen av fytosterolene som var ulik på de to temperaturene, og det var spesielt brassicasterol som skilte seg ut med å utgjøre en høyere andel av fytosterolene i alle vev på 12°C.

Tabell 3. Sterolnivåer og sammensetning i ulike vev hos Atlantisk laks, inkludert totale nivåer av kolesterol og fytosterol (mg kg^{-1}), fytosteroler i % av totalsteroler og fytosterolsammensetning i % av totale fytosteroler. Alle diettgruppene er kombinert, og dataene er gjennomsnittsverdier med standardavvik i parentes. Stigmasta-dienol, stigmast-enol og d-7-avenasterol er ikke tatt med i tabellen som da de ikke ble detektert i alle vev og nivåene generelt var svært lave, men disse er inkludert i “sum fytosteroler”.

	Midttarm	Lever	Galle	Muskel	Fettvev	Helfisk
<i>Atlantisk laks holdt ved 12°C:</i>						
Kol, mg/kg	3045 (161)	3048 (130)	197 (20)	698 (36)	1609 (119)	1217 (63)
Sum fyto, mg/kg	163 (34)	63.5 (15.8)	115 (26)	22.3 (5.8)	84.4 (8.5)	46.5 (12.2)
% fyto av totale steroler	5.1 (1.0)	2.0 (0.5)	36.7 (7.0)	3.1 (0.8)	5.0 (0.6)	3.7 (1.0)
<i>Individuelle fytosteroler i % av totale fytosteroler, 12°C:</i>						
Brassicasterol, %	8.0 (2.1)	13.1 (4.4)	1.8 (0.5)	30.6 (7.3)	56.6 (6.8)	29.3 (3.9)
Campesterol, %	56.9 (4.9)	57.0 (7.3)	68.1 (1.8)	38.6 (6.3)	21.6 (4.6)	38.6 (6.8)
Campestanol, %	0.8 (0.2)	0.8 (0.7)	n.d.	3.1 (1.8)	0.6 (0.3)	0.7 (0.7)
Stigmasterol, %	1.9 (0.9)	2.2 (1.3)	0.4 (0.1)	5.1 (3.0)	5.9 (2.2)	2.7 (0.9)
Sitosterol, %	26.7 (4.7)	21.7 (7.2)	21.9 (1.2)	12.6 (6.6)	9.3 (2.2)	25.6 (8.8)
Sitostanol, %	3.7 (0.6)	4.9 (1.2)	5.6 (0.7)	5.3 (1.4)	5.8 (1.2)	3.0 (0.8)
<i>Atlantisk laks holdt ved 6°C:</i>						
Kol, mg/kg	3025 (278)	4319 (762)	186 (22)	742 (33)	1267 (133)	1255 (67)
Sum fyto, mg/kg	182.0 (33)	107.6 (26.7)	163 (37)	20.6 (3.9)	90.4 (38.4)	43.1 (6.2)
% fyto av totale steroler	5.7 (1.2)	2.5 (0.6)	46.5 (7.7)	2.7 (0.5)	6.6 (2.3)	3.3 (0.5)
<i>Individuelle fytosteroler i % av totale fytosteroler, 6°C:</i>						
Brassicasterol, %	5.9 (1.2)	8.5 (1.7)	1.3 (0.4)	17.9 (3.6)	36.4 (9.9)	19.5 (3.0)
Campesterol, %	59.8 (3.1)	53.0 (7.6)	69.2 (3.9)	45.7 (5.7)	24.3 (6.3)	44.9 (4.6)
Campestanol, %	0.7 (0.2)	1.4 (0.5)	0.2 (0.2)	2.6 (1.6)	1.4 (0.6)	1.1 (0.4)
Stigmasterol, %	1.9 (0.8)	3.1 (0.9)	0.5 (0.3)	4.2 (1.3)	2.2 (0.6)	3.3 (0.9)
Sitosterol, %	27.7 (2.2)	26.4 (6.4)	22.2 (2.9)	23.5 (4.4)	25.2 (10.8)	25.9 (3.7)
Sitostanol, %	2.4 (1.0)	4.7 (2.2)	4.5 (0.6)	5.3 (1.6)	7.1 (1.3)	5.1 (0.9)

Plasmakolesterol korrelerte positivt til kolesterol i fôret på begge temperaturene, både 24 og 48 timer etter siste fôring (Figur 6). Det var også signifikante negative korrelasjoner til fytosterol : kolesterol ratioen. Ved 6°C var denne korrelasjonen like sterk som for kolesterol etter 24 timer, men sterkere etter 48 timer ($R^2=0.48$), mens korrelasjonen til ratioen var svakere enn til kolesterol alene ved 12°C.

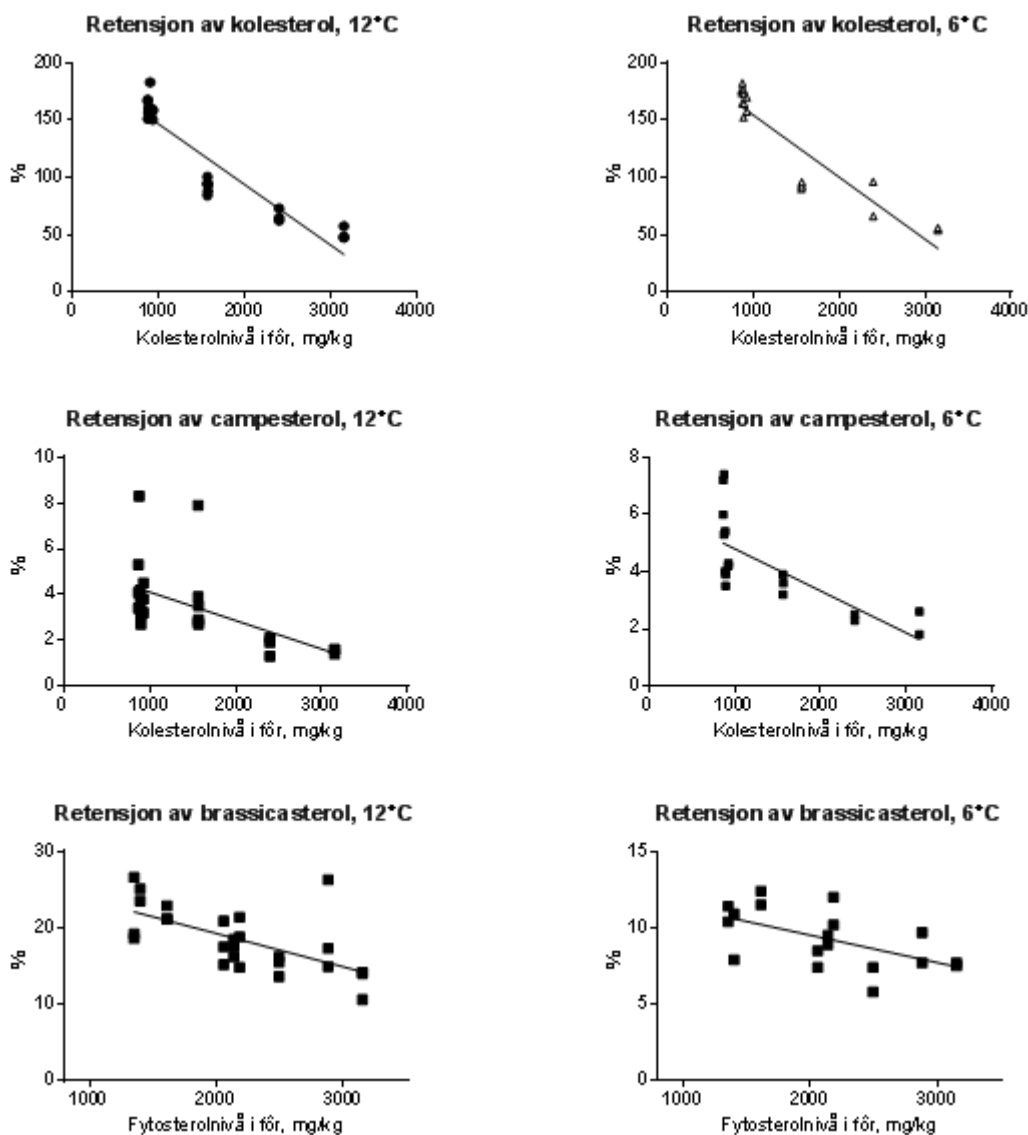


Figur 6. Plasma kolesterol i Atlantisk laks gitt ulike nivåer av kolesterol i fôret på 6°C, 24 og 48 timer etter fôring. Tilsvarende mønster ble sett på 12°C. Hvert datapunkt representerer ett kar, basert på analyse av en samleprøve laget fra 6 individfisk.

Generelt så vi at kolesterol i vev korrelerte positivt med kolesterolnivå i fôret (med unntak av i tarmen) på 12°C, mens på 6°C var det kun signifikant korrelasjon for galle og helfisk. I noen tilfeller var det også en negative korrelasjon til ratioen i fôret, men denne var aldri like sterk som korrelasjonen til kolesterol alene. Campesterolnivå i vev korrelerte generelt negativt til kolesterol i fôret og positivt til fytosterol : kolesterol ratioen, og det varierte hvilken av disse korrelasjonene som var sterkest. Siden campesterol var det fytosterolet det var mest av i de fleste vev, var det generelt også signifikant korrelasjon for totale fytosteroler tilsvarende som for campesterol alene. Verken kolesterol i vev, campesterol eller totale fytosteroler i vev, korrelerte til fytosteroler i fôret alene, kun til kolesterolnivå eller ratioen. Vevsnivåer av andre fytosteroler korrelerte i mye mindre grad til sterolnivåene i fôret.

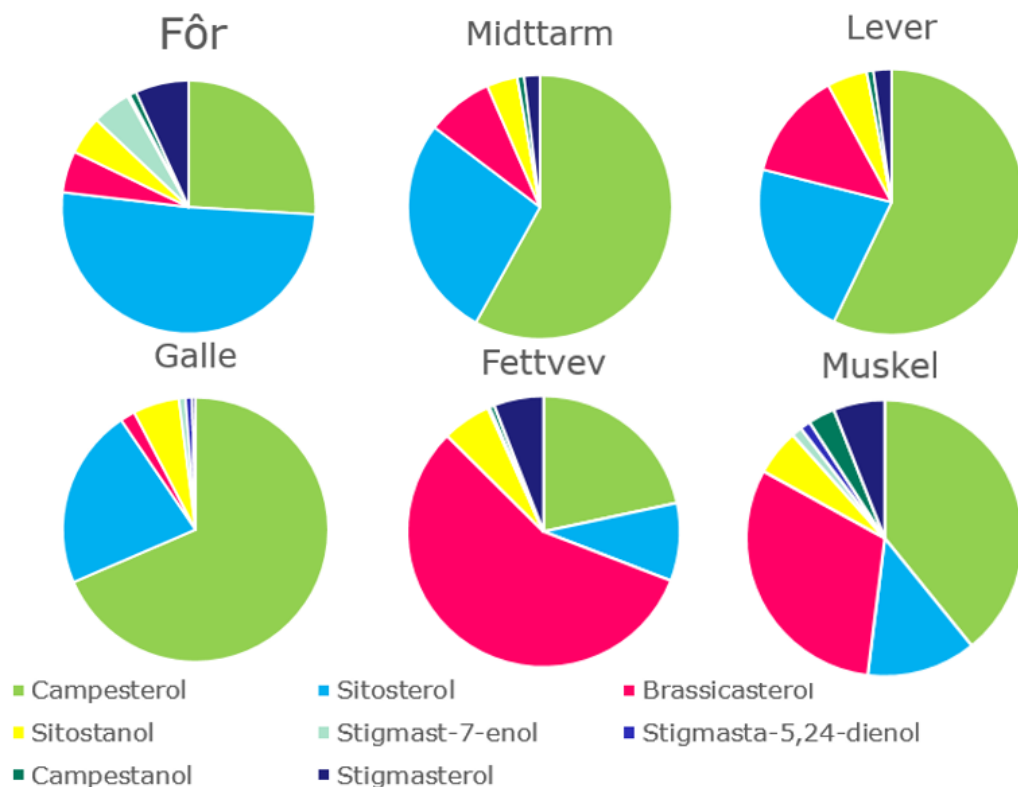
Retensjonen av kolesterol var tydelig påvirket av kolesterolnivå i fôret (Figur 7), og gikk ned etter hvert som nivået i fôret økte. Alle de fem gruppene som fikk fôrene uten tilsatt kolesterol (dvs inneholdt $< 1000 \text{ mg kg}^{-1}$ kolesterol), hadde retensjonsverdier for kolesterol $>150 \%$ ved begge temperaturer. På den andre siden hadde gruppene som fikk tilsatt kolesterol ($>1500 \text{ mg}$

kolesterol kg^{-1} fôr) alle retensjonsverdier under 100 % ved begge temperaturer. Retensjonen av campesterol korrelerte negativt både med kolesterol- og fytosterolnivå i fôret, men kolesterol kunne forklare mer av variasjonen i retensjonsverdiene på begge temperaturer. Retensjonen av brassicasterol korrelerte negativt med fytosterolnivå i fôret ved begge temperaturer (Figur 7). Det var stor forskjell på retensjonsnivåene mellom de ulike fytosterolene, i rekkefølgen brassicasterol > campesterol > sitostanol > sitosterol. Retensjonsverdiene var generelt svært like ved de ulike temperaturene, med unntak av brassicasterol, som hadde dobbelt så høy retensjon ved 12°C. Fytosterol : kolesterol ratioen kunne ikke forklare mer av variasjonen enn kolesterol eller fytosterol alene for retensjonsdataene.



Figur 7. Sterolretensjon (helfisk) i Atlantisk laks gjennom hele fôringsforsøket, relatert til sterolinnhold i fôrene. Hvert datapunkt representerer ett kar, basert på analyse av en samleprøve laget fra 6 individfisk.

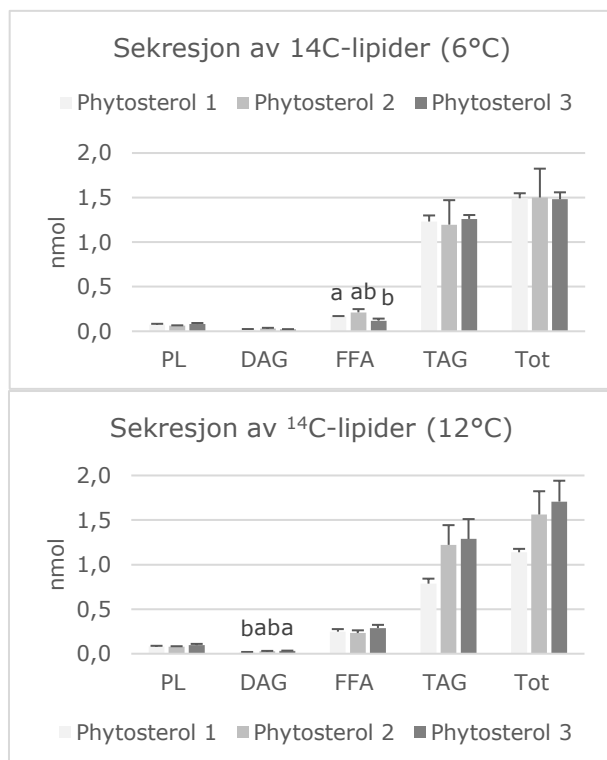
Analyser av fytosteroler i ulike vev i fisken viste tydelig at det er individuelle forskjeller mellom de ulike fytosterolene ift opptak, utskillelse og lagring. Sitosterol så f.eks ut til å bli tatt opp i tarm i mindre grad enn de andre (høye nivåer i fôr ift vev), og mens både sitosterol, campesterol og sitostanol ble utskilt i galle, skjedde dette i svært liten grad med brassicasterol, som heller ble akkumulert i muskel og spesielt i fettvev (Figur 8). Det viste seg også at mengden fytosterol som ble retinert i fisken, ikke kom an på nivå av fytosteroler i fôret, men fytosterol : kolesterol ratioen i fôret, slik at man ved økende fytosterolnivå i vev vil kunne motvirke enn økning i vev ved å tilsette kolesterol slik at ratioen ikke øker.



Figur 8. Fytosterolprofil (individuelle fytosteroler i % av total fytosterol) i fôr og ulike vev i fisken holdt på 12°C.

WP2.2 Leverceller fra fôringsforsøket, Nofima:

Leverceller ble isolert fra laks fôret på økende nivåer av fytosteroler i fôret (1399, 2181 og 2876 mg/kg fôr, og konstant innhold av kolesterol), her kalt Fytosterol 1, Fytosterol 2 og Fytosterol 3. Leverceller fra de ulike fôringsgruppene hadde økende innhold av totale fytosteroler med økende nivå i diettene. Det var få forskjeller i sekresjon av lipider mellom leverceller knyttet til fôringsforsøket ved hhv 6 og 12 grader. Sekresjon av ^{14}C -FFA fra fytosterol 1 gruppen var høyere fra enn Fytosterol 2 gruppen i leverceller knyttet til fôringsforsøket ved 6 grader. Det var ingen signifikante forskjeller i sekresjon av ^{14}C -PL, ^{14}C -TAG eller ^{14}C -DAG mellom de ulike gruppene. Levercelleforsøket knyttet til fôringsforsøket ved 12 grader viste høyere sekresjon av ^{14}C -DAG i Fytosterol 3 gruppen sammenliknet med Fytosterol 1, men ellers ingen signifikante forskjeller i sekresjon av lipider (Figur 9). Det var imidlertid tendens til høyere sekresjon av ^{14}C -TAG med de høyeste dosene fytosteroler i fôret.



Figur 9. Fordeling av ^{14}C -merkede fosfolipider (PL), mono-, di- og triacylglycerider (MAG, DAG, TAG) og frie fettsyrer (FFA) sekret fra leverceller. Leverceller ble isolert fra

laks fôret med tre ulike nivåer av fytosteroler i dietten (1399, 2181 og 2876 mg/kg fôr). Fôringsforsøket ble utført ved hhv 6 og 12 grader.

Det var få og små forskjeller i genuttrykk av lipidrelaterte gener mellom de ulike gruppene (data ikke vist). Fytosterol 2 gruppen viste noe høyere genuttrykk av *aco* (involvert i β -oksidasjon), og *srebp2* (transkripsjonsfaktor for fettrelaterte gener) enn Fytosterol 1 ved 6 grader, og høyere genuttrykk av *apoal* (hovedbestanddel av HDL) enn de andre gruppene ved 12 grader.

5.2 Diskusjon, konklusjoner og nytteverdi:

Hovedfokuset i dette prosjektet var på potensielle effekter av fytosteroler på fettakkumulering i lever hos laks, og å isolere effekten av fytosterolene fra effekten av fettsyresammensetning, da disse har samvariert i tidligere studier. Hypotesen om fettakkumulering ble grundig testet, både *in vitro* og *in vivo*, inkludert både ulike fytosterolnivåer og fytosterol : kolesterol ratio, på ulike temperaturer *in vivo* og effekten av individuelle fytosteroler ble studert *in vitro*. Det var godt samsvar mellom resultatene, som tydelig viste at fytosteroler eller fytosterol : kolesterol ratio ikke fører til fettakkumulering i lever hos laks. Dermed kan man i videre arbeid fokusere på andre potensielle faktorer som reduksjon i mettet fett og/eller omega-3 fettsyrene EPA og DHA som mulige årsaker til effektene man har sett av vegetabilsk olje på fettmetabolisme og fettakkumulering i lever i tidligere forsøk. Celleforsøk med leverceller kan kun fortelle noe om direkte effekter av fytosterolene i lever, ikke av eventuelle indirekte effekter av redusert kolesterolopptak i tarm med påfølgende endringer i sterol- og fettmetabolisme i lever. En stor fordel med celleforsøk er at vi kan benytte individuelle fytosteroler, og dermed skille effektene av disse fra hverandre. I dette prosjektet var det godt samsvar mellom resultater fra de ulike celleforsøkene, og mellom celleforsøk og fôringsforsøk.

Generelt sett var det svært lite effekter å se av fytosterolene i fôret, og ingen effekter på helseparametre som ble undersøkt. Kolesterolnivå i fôret så ut til å ha større betydning for fisken enn fytosterolnivå (påvirket både pigmentering, tørrstoff i filet og leverindex), og selv om vekst ikke var påvirket, var det tydelig at fisken hadde en stor egenproduksjon av kolesterol i de fôringsgruppene som ikke fikk tilsetning i fôret (under 1000 mg kolesterol/ kg fôr). Fôrovervåkningen fra NIFES viser at dagens kommersielle fôr ligger ned mot dette kolesterolnivået.

Resultatene på astaxanthin er av stor interesse for næringen, da redusert pigmentering på tross av økende tilsetning av astaxanthin i fôret har vært en stor utfordring de siste årene. Her ser det ut til at det hovedsakelig er kolesterolnivået i fôret (og til en viss grad ratioen) som er avgjørende for effekten, ikke fytosterolnivået, slik at dette kan motvirkes med å tilsette mer kolesterol i fôret. Imidlertid bør det bemerkes at effekten tallmessig var ganske liten, slik at det er usannsynlig at dette alene kan forklare problemene man har hatt i næringa de siste årene, men redusert kolesterolnivå i kommersielle fôr kan ha vært en medvirkende faktor.

Liten variasjon i fytosterolnivå mellom de ulike kommersielle rapsoljer er gode nyheter for fôrprodusenter/oppdrettere i forhold til forutsigbarhet av nivåer i fôrene, da fytosterolnivå i oljene som blir brukt ikke er noe som analyseres rutinemessig. Forskjellene mellom individuelle fytosteroler i opptak og utskillelse, og spesielt brassicasterol er interessante, da denne fytosterolen er spesifikk for raps blant planteoljene (utgjør ca. 10 % av totale fytosteroler i raps, men finnes også i en del alger og bløtdyr, som kan ha relevans om nye fôringredienser tas i bruk), og raps utgjør ca. 70 % av oljen i vekstfôr til laks per i dag.

Å avklare effekten av endringer i spesifikke fôrkomponenter for fiskens vekst og helse er et viktig grunnlag for en bærekraftig og lønnsom sjømatnæring. Økt kunnskap om dette vil gi økt fleksibilitet i valg av fôrråvarer, som er nødvendig for videre vekst i oppdrettsnæringen.

6. Leveranser

Presentasjoner på konferanser og dialogmøter:

Sissener, N.H. Nytt prosjekt: SterolTemp. FHF-dialogmøte, Hotal Park Inn, Oslo Airport Gardermoen, 21. januar 2015.

Sissener, N.H. Er plantesteroler knyttet til utvikling av fettlever og eventuelt redusert robusthet hos planteoljefôret laks? FHF's fiskehelseseminar, Clarion Hotel, Flesland, Bergen 1.-2. september 2015.

Nina S. Liland Michel van Spankeren, Nathaniel Sibinga, Øyvind Reinshol, Bente Torstensen, Nini Sissener, Øystein Sæle, Erik-Jan Lock (2016) Insekter som kilde til steroler for Atlanterhavslaks, HAVBRUK 2016, Bodø.

Nina S. Liland Samspill med fytosteroler og andre næringsstoff. Fett for Fiskehelse-dialogmøte, Nifes, Bergen, 19.mai, 2016.

Nini H. Sissener. Effekter av fytosteroler på fettlever, vekst, kroppssammensetning og pigmentering i laks. Dialogmøte, FHF, Park Inn hotell, Gardermoen, 29. Nov 2016.

Nini H. Sissener. Opptak, lagring og omsetning av fytosteroler i laks. Dialogmøte, FHF, Park Inn hotell, Gardermoen, 29. Nov 2016.

Nina S. Liland & Nini H. Sissener. Effekter av ulike fytosteroler på fettmetabolisme i leverceller fra laks. Dialogmøte, FHF, Park Inn hotell, Gardermoen, 29. Nov 2016.

Tone-Kari Østbye. Hvordan påvirker fytosteroler opptak og sekresjon av fett i leverceller og fettceller? Dialogmøte, FHF, Park Inn hotell, Gardermoen, 29. Nov 2016.

Nini Sissener, Tone-Kari K. Østbye, Grethe Rosenlund, Bente E. Torstensen, Bente Ruyter, Nina S. Liland. Får laksen økt fettlever av plantesteroler? Frisk fisk, 1.-2. Februar 2017, Scandic Ørnen, Bergen.

Nini H. Sissener, Ingunn Stubhaug, Nina S. Liland, Grethe Rosenlund. Gir plantesteroler økt fettdeponering hos laks i oppdrett? Det 13. Norske Ernæringsseminar, 30.-31.mai 2017, Soria Moria, Oslo.

Vitenskapelige publikasjoner:

Nina S. Liland, Karin Pittman, Bente E. Torstensen, Nini H. Sissener. Phytosterols cause small changes in lipid storage and affect markers of lipid metabolism in Atlantic salmon hepatocytes. Submitted to Lipids

N. H. Sissener, N.S. Liland, E. Holen, I. Stubhaug, B. E. Torstensen, Grethe Rosenlund. Phytosterols are not involved in the development of fatty liver in plant oil fed Atlantic salmon (*Salmo salar*) at high or low water temperature, submitted to Aquaculture.

N.H. Sissener, G. Rosenlund, I. Stubhaug, N.S. Liland. Tissue sterol composition in Atlantic salmon depends on the dietary cholesterol content and on the dietary phytosterol: cholesterol ratio, but not on the dietary phytosterol content. Manus sendt til FHF 30.juni, sendes inn til vitenskapelig journal i løpet av august.

T.-K. Østbye et al, in prep. Effects of phytosterols on lipid metabolism of Atlantic salmon hepatocytes and adipocytes.