

Prosjektet:

Mørke flekker i laksefilet

Kunnskapsstatus og tiltak for å begrense omfanget

Turid Mørkøre, Nofima



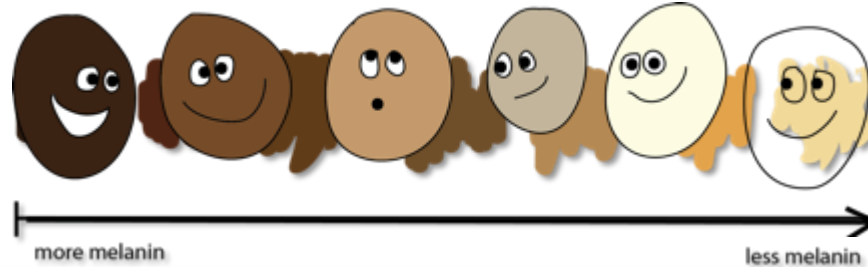
«Melaninflekker»



Melanisering av den mørke muskelen under skinnet



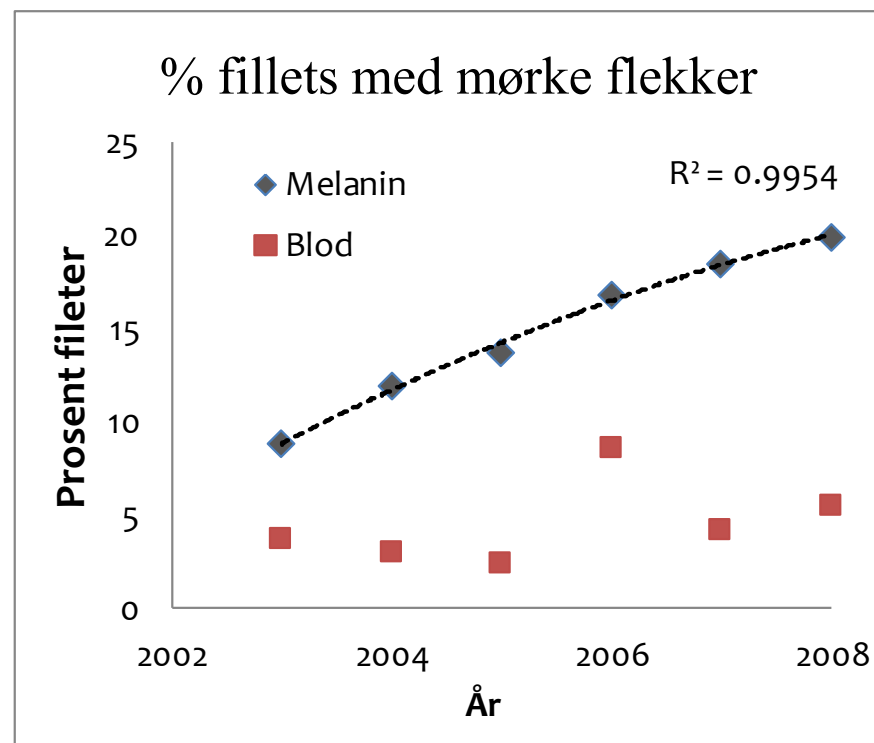
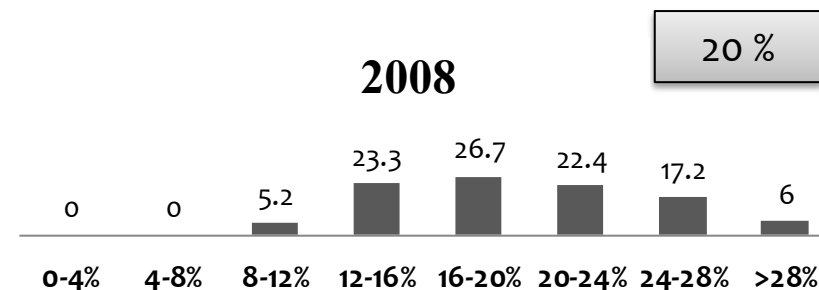
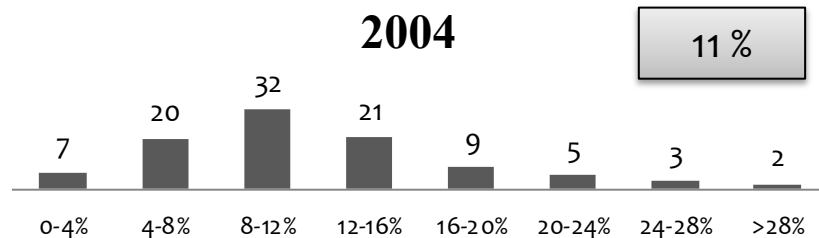
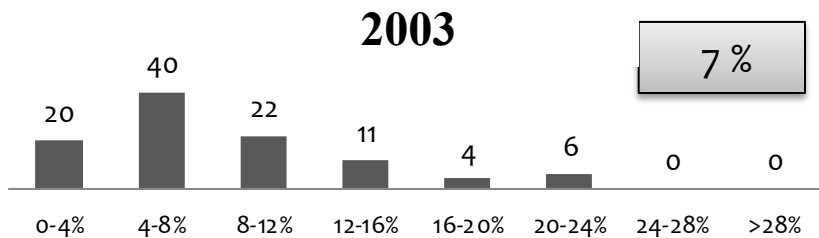
Pigmenter



Hemosiderin Brunt jernholdig pigment.
Dannes når røde blodceller brytes ned

Fileter med mørke flekker (%) ved et norsk røykere 2003-2008

Registreringer av totalt total 1 million fileter



Regnbueørret 2006 – 2008 = 3.7% (0 – 6%)

Hva skjedde i perioden 2003 - 2008

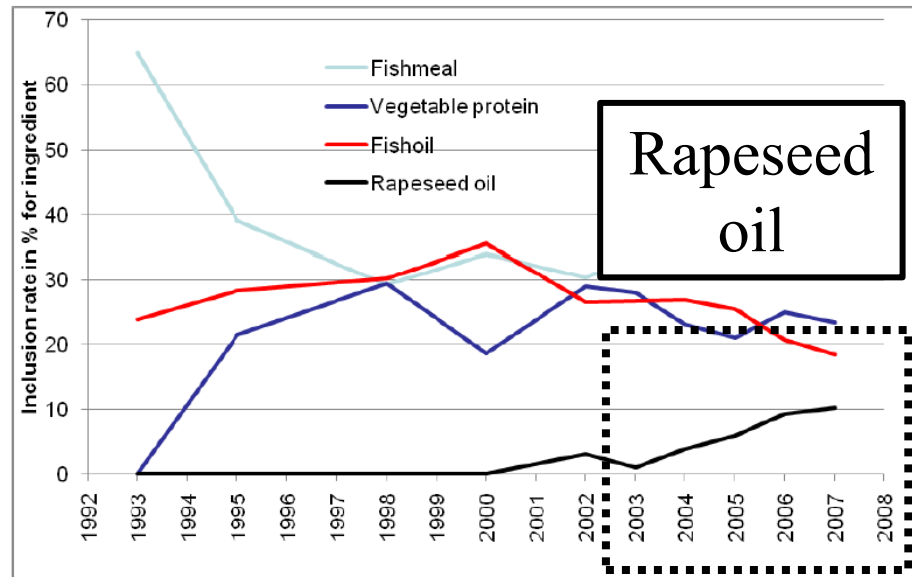
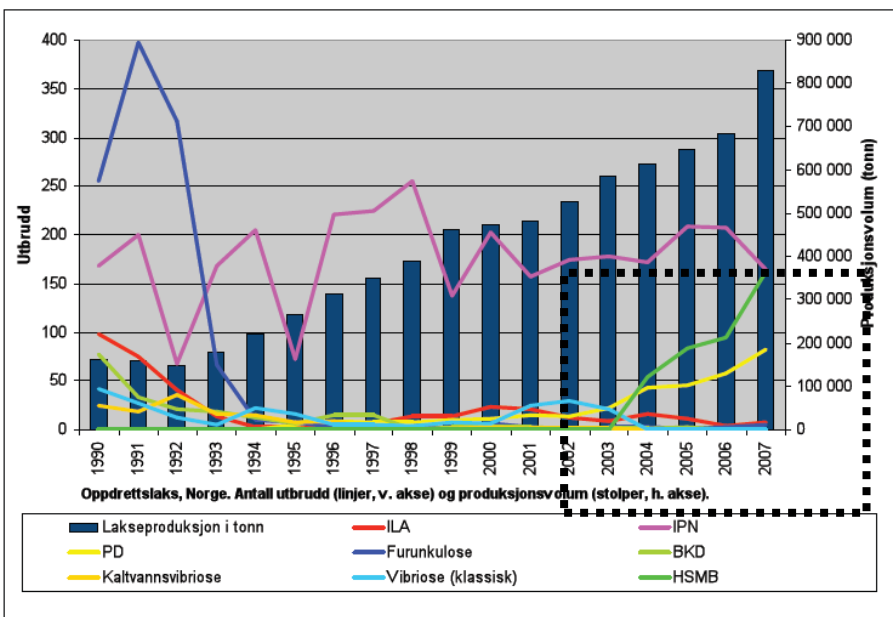
FAKTA

Utvikling laksesykdommer siden 1990



HSMB
PD

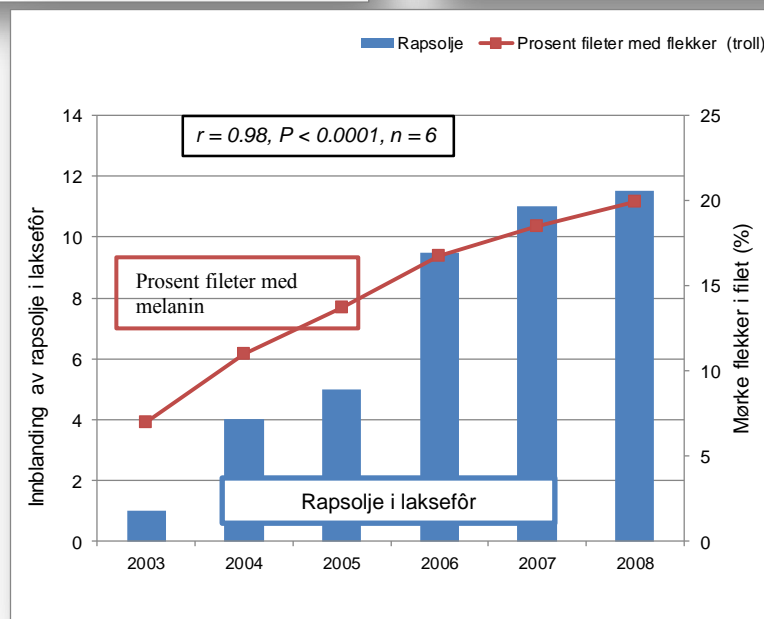
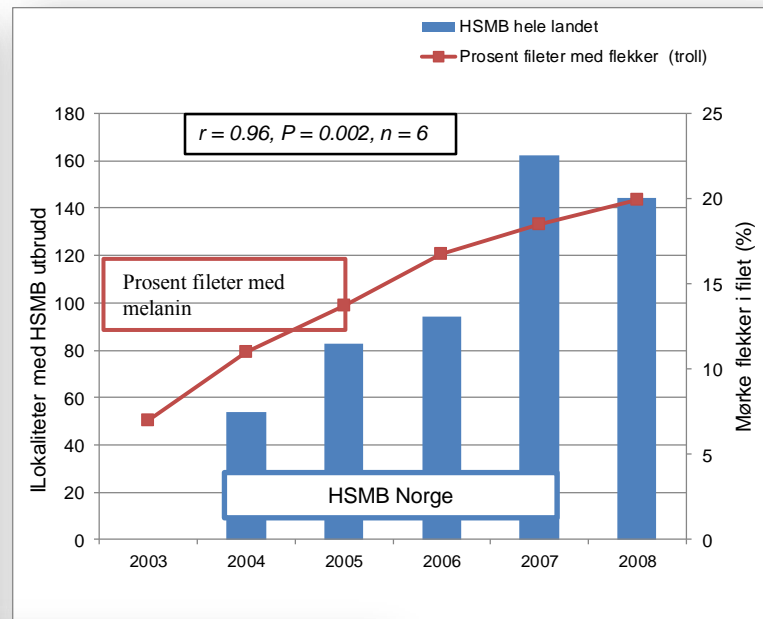
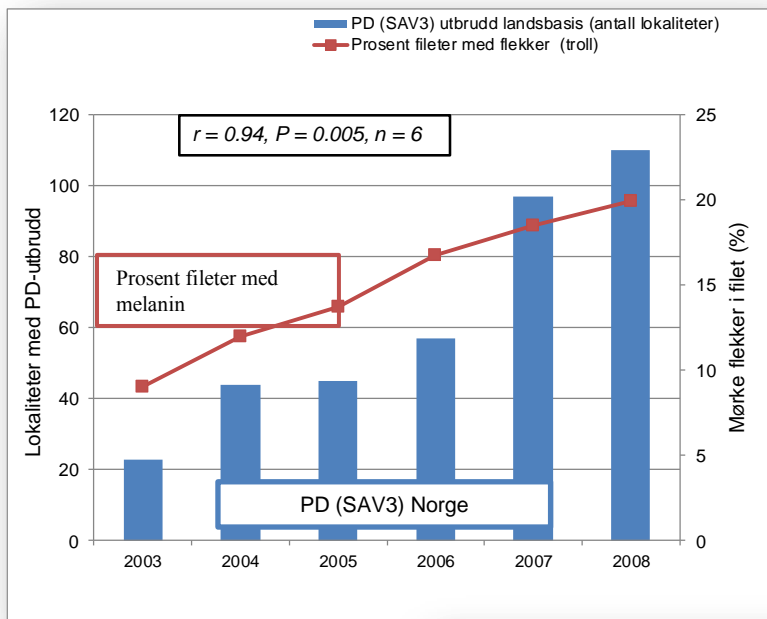
Sykdomsutbrudd er en del av naturen og rammer alle arter. Med intensiv produksjon øker ofte antall sykdomsutbrudd. Om norsk akvakultur ennå er en ung næring, har bekjempelse av smittsomme sykdommer vist en positiv utvikling.



Figur 1.16. Inklusjon av ulike ingredienser i typisk laksefôr i Europa (Kilde: Skretting)

Vaccines developed during the period – no relationship with dark spots





HSMB ble oppdaget første gang i Norge i 1999, og er i dag en av de hyppigst forekommende diagnosene i norsk oppdrettsnæring, med store tap.



marineharvest



Mørke flekker i laksefilet

-Årsaker til forekomst og forebyggende tiltak

2012-2015



FISKERI- OG HAVBRUKSNÆRINGENS
FORSKNINGSFOND



BRØDRENE KARLSEN AS



Prosjektet

Registreringer &
statistikk

Vaksine & helse

MELANIN

FLEKKER

Fôr & drift

Stress & skader

Workshop

DARK SPOTS IN SALMON FILLETS

November 5th 2013, 09:30 – 14:30

BEST WESTERN Oslo Airport Hotel, Gardermoen

Ingen påmeldingsavgift, lunsj og mellom-måltid dekket av arrangørene

SCHEDULED LECTURES

Welcome. Erling Olaf Koppang, Norwegian School of Veterinary Science

Extracutaneous pigmentary system

Ronald Roberts, Editor of Journal of Fish Diseases

He is among the world's most knowledgeable within the field of fish pathology

Melanin production in salmon / Melanindannelse i oppdrettsleaks.

Erling Olaf Koppang, Norwegian School of Veterinary Science

Overview from years of research, including the new PhD: "Studies of extracutaneous pathological pigmentation - black spots - in Atlantic salmon" by H.A.S.Fagerland

Histologic manifestations of melanized salmon tissue/ Histologiske manifestasjoner av melanisert vev.

Agnar Kvellestad: Norwegian School of Veterinary Science

Including brand new results from our melanin project/ Inkluderer rykende ferske resultater fra vårt nye melaninprosjekt

Quantitative genetics of vaccine-induced side effects in salmon/ Grad av bivirkninger ved vaksinerer er arvelig betinget

Bjarne Gjerde, Nofima

Selective breeding for long-term reduction of melanin deposition in salmon filets/ Kan avl bidra til å redusere problemet med melanindeponering på sikt

Dark spots in salmon filets - statistics and status on causalities / Melaninflekker i laksefilet - Statistikk og status på årsakssammenhenger

Turid Mørkøre, Nofima

Statistics based on registrations at processing plants; Has the problem with dark fillet spots increased? Is there a geographical variations? Has the problem with melanin deposition in the dorsal fillet part increased?

Relationship between melanin deposition in various tissues: organs, peritoneum, fillet/ Melanisering av organer, bukkinne og filet – hva er sammenhengen

Thomas Larsson, Nofima

To include in the discussion, Recognition, "Black spots" in salmon filets

- * Farming industry /Oppdrettsindustri
- * Vaccine producers / Vaksineprodusenter
- * Fiskehelsetjeneste /



Workshop

DARK SPOTS IN SALMON FILLETS

Current knowledge and future direction of research

October 16th 2014, 09:30 – 14:30

Clarion Hotel, Oslo Airport Gardermoen

SCHEDULED LECTURES

Welcome

Turid Mørkøre, senior scientist, Nofima

Results and overview of R&D activities on dark fillet spots at Marine Harvest.

Øyvind Oaland, DVM. Director Global R&D and Technical. Marine Harvest ASA

Short presentations

Research activities on dark spots in salmon filets.

Svein Alexandersen Sales Manager Norway. PHARMAQ AS

Research activities on dark spots in salmon filets.

Niels Petter Måseide, Customer manager MSD Animal Health

Some case studies of fillet quality issues in Scotland.

Marian McLoughlin MVB PhD MRCVS. Fish Vet Group

Lunch

Evolution of dark spots in salmon filets and histological characterization.

Erling Olaf Koppang Professor/ Agnar S. Kvellestad University lecturer BASAM, Norwegian University of Life Sciences

Connective tissue characterisation of dark stained spots in salmon filets

Helena M. Moreno Conde, senior scientist Departamento de Productos. Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN-CSIC)

Updated statistics on the occurrence of dark spots and new insights from gene expression analyses.

Thomas Larsson researcher and Aleksai Krasnov, senior scientist Nofima

Current knowledge and future direction of research on dark stained spots in salmon filets

Discussion / summing up





Effekt av fôr, avl, vaksine, stress og skade på utvikling av mørke flekker

Sammendrag av resultater og nye utfordringer

Turid Mørkøre
Nofima

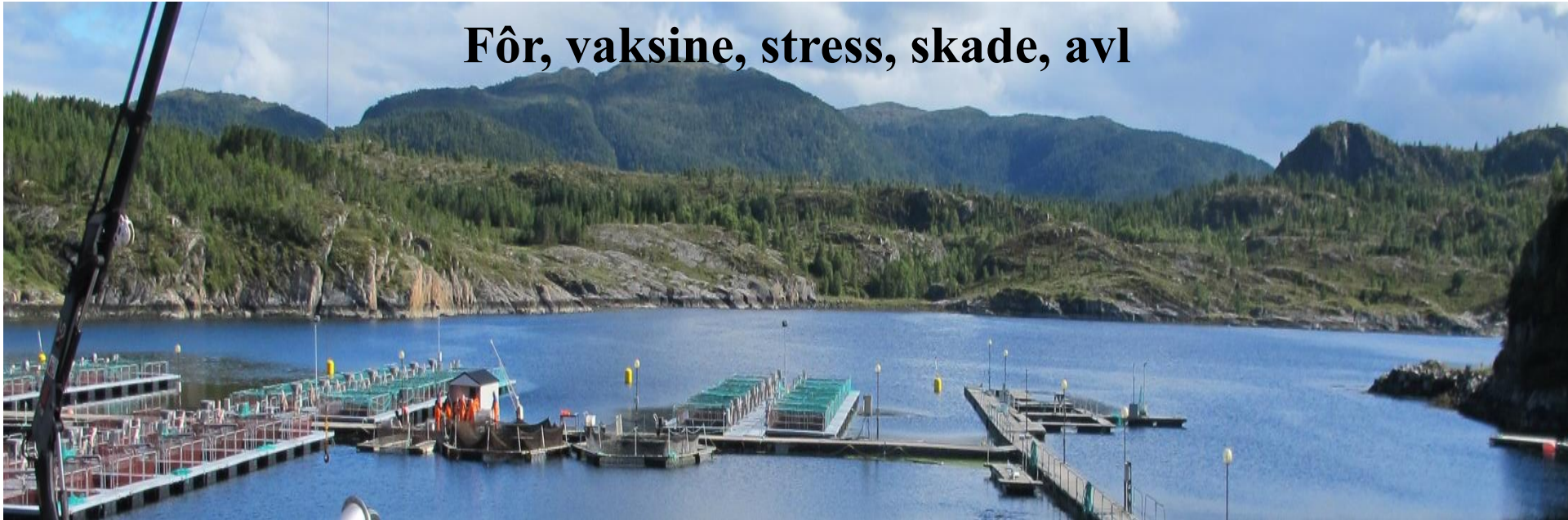


Småskalaforsøkene 1+ & 0+ laks

Averøy perioden 2013 – 2015

Fisken ble også analysert i ferskvannsfasen, Sunndalsøra

Fôr, vaksine, stress, skade, avl



Uttak av fisk til analyse i

sjø Nofima:

05.2013

09.2013

12.2013

01.2014

02.2014

03.2014

06.2014

08.2014

12.2015

01.2015

02.2015

03.2015



Uttak av fisk til analyse i sjø

NMBU (NVH):

05.2013

09.2013

03.2014

06.2014

08.2014

12.2015

03.2015

Melanin organer: Vesentlig høyere i vaksinert laks

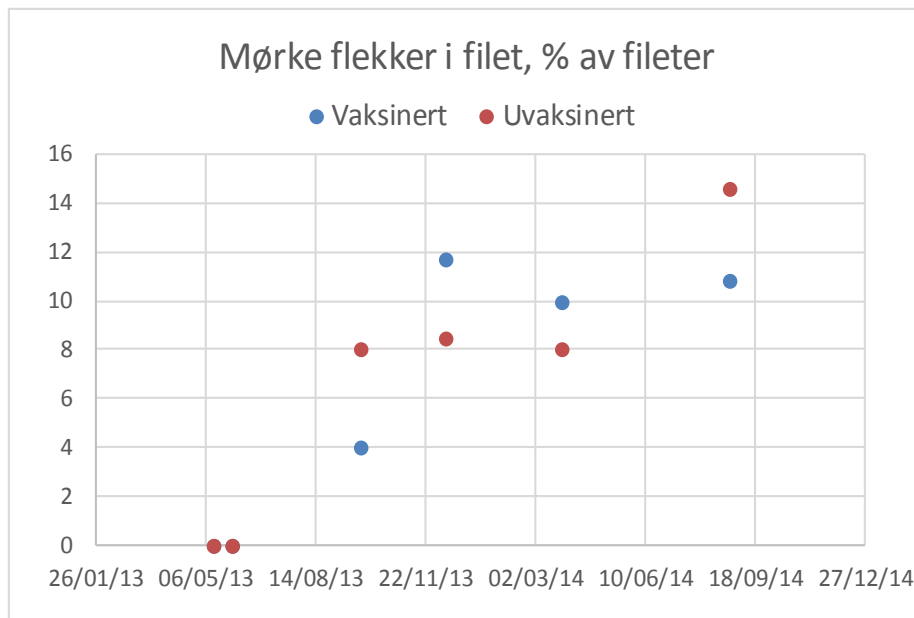
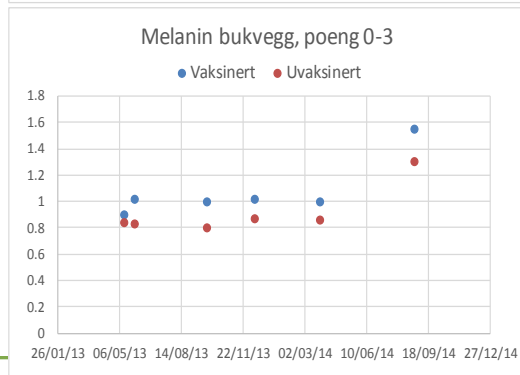
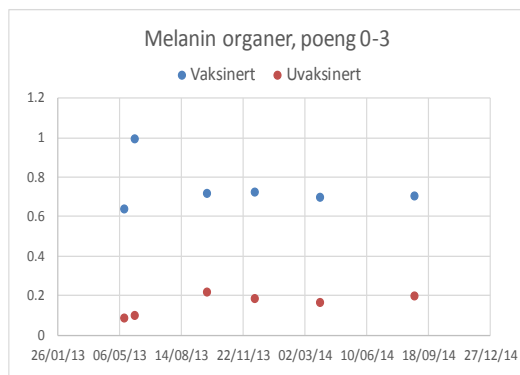
Stabilt fra vaksinerings til slakt

Melanin i bukkinne: Noe/minimalt høyere i vaksinert laks

Relativt stabilt fra vaksinerings til slakt

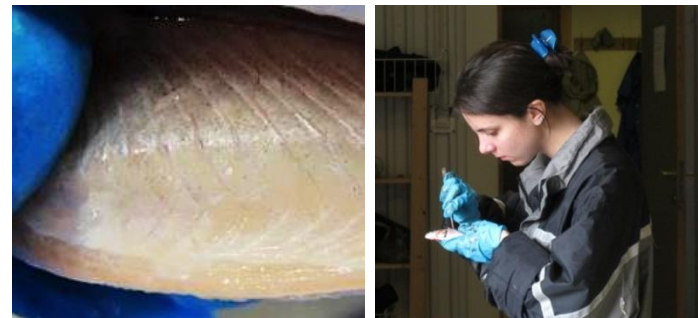
Melanin i filet: Ikke systematisk forskjell mellom vaksinert og vaksinert laks

Observerert 4 mån etter utsett, økende frem til slakt



Mørkpigmentering bukvegg

- Registrert før vaksinerings



Mørkpigmentering organer

- Registrert etter vaksinerings



Mørkpigmentering filet

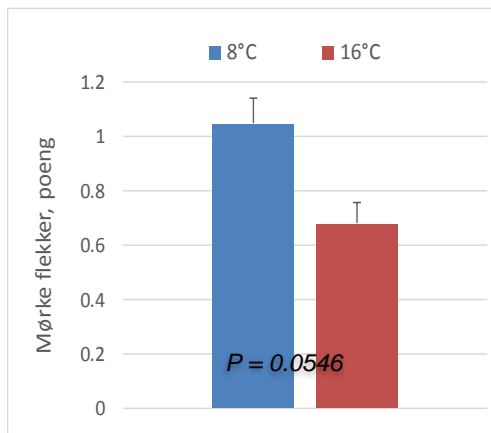
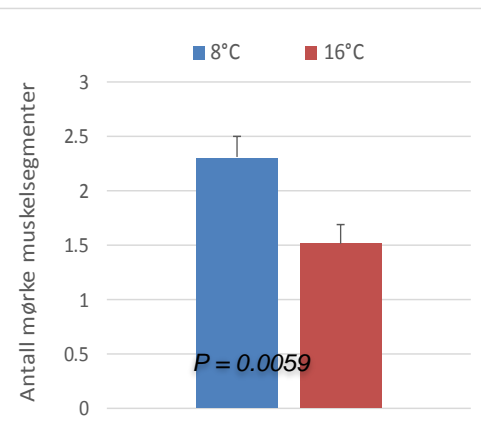
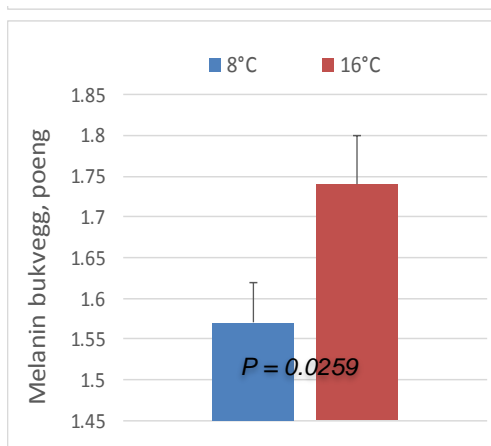
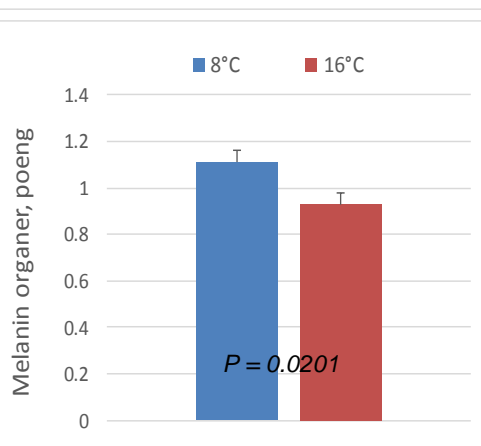
- Registrert i sjø
- *Ca ½ kg 6%, 1 kg 10%, men veldig små flekker*



Laks holdt ved 8°C vs. 16°C

Vekt ved utsett 70g vs 100g

Temperatur ferskvann
fra 4/7 – 26/9 2014



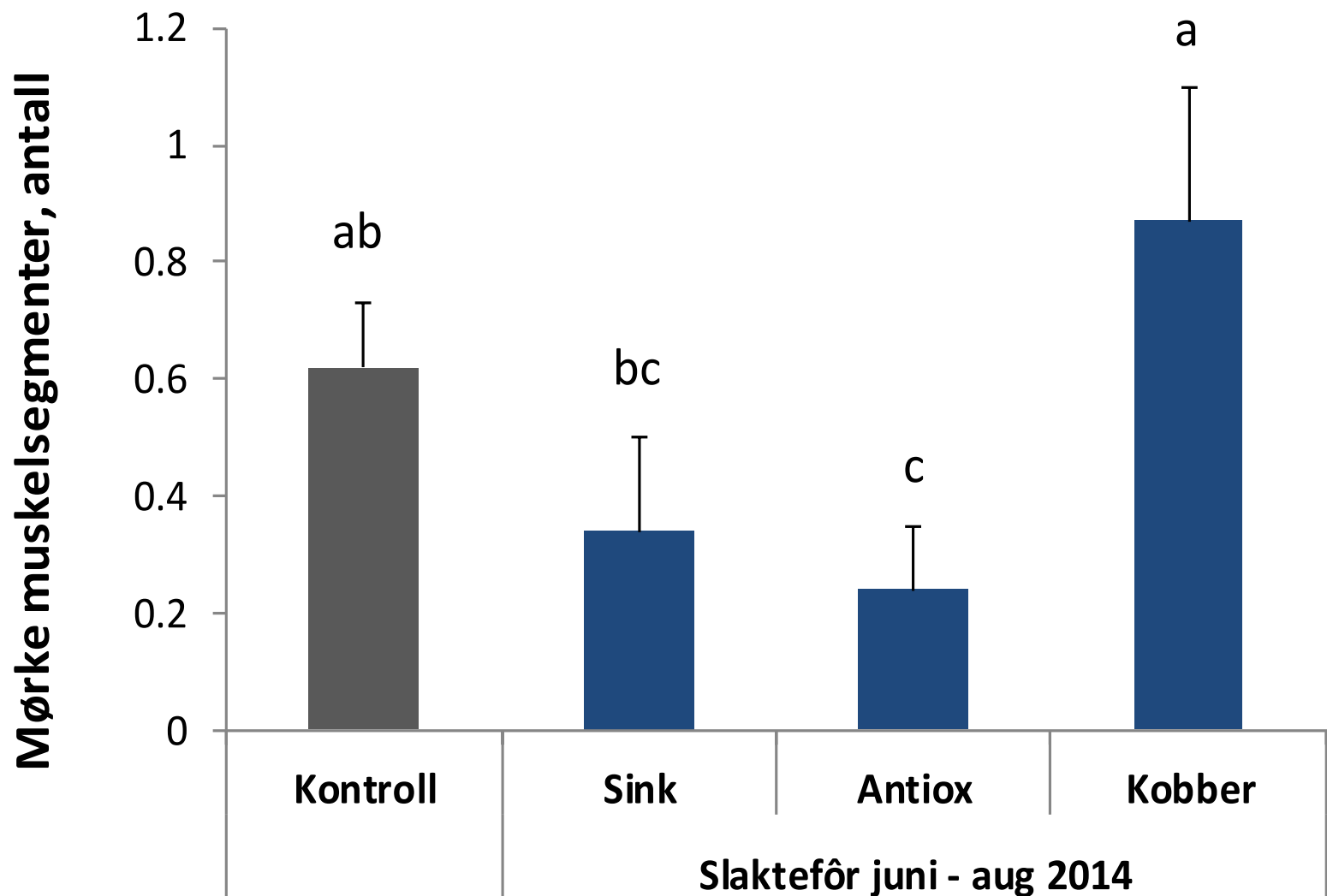
1 kg tyngre (3,6 vs 4,7kg)

Melanin organer
- høyere score

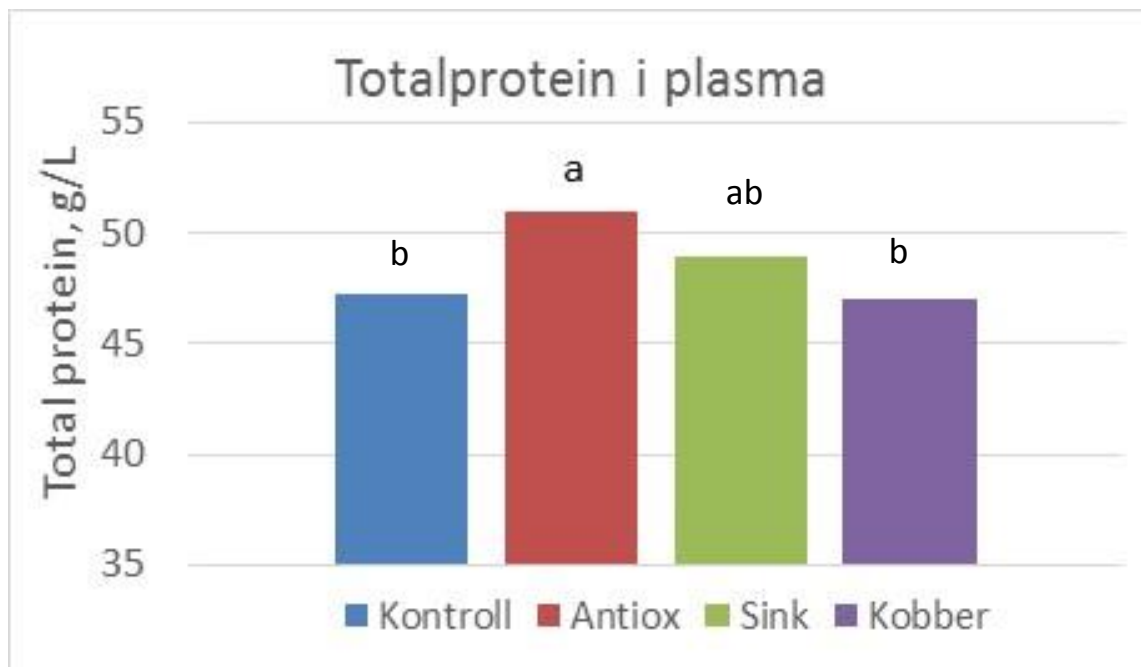
Melanin bukvegg
- lavere score

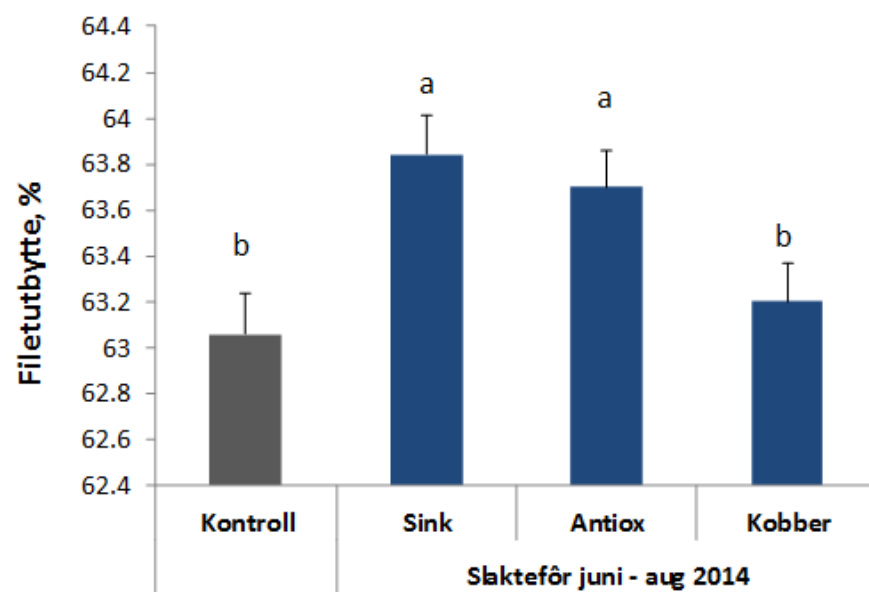
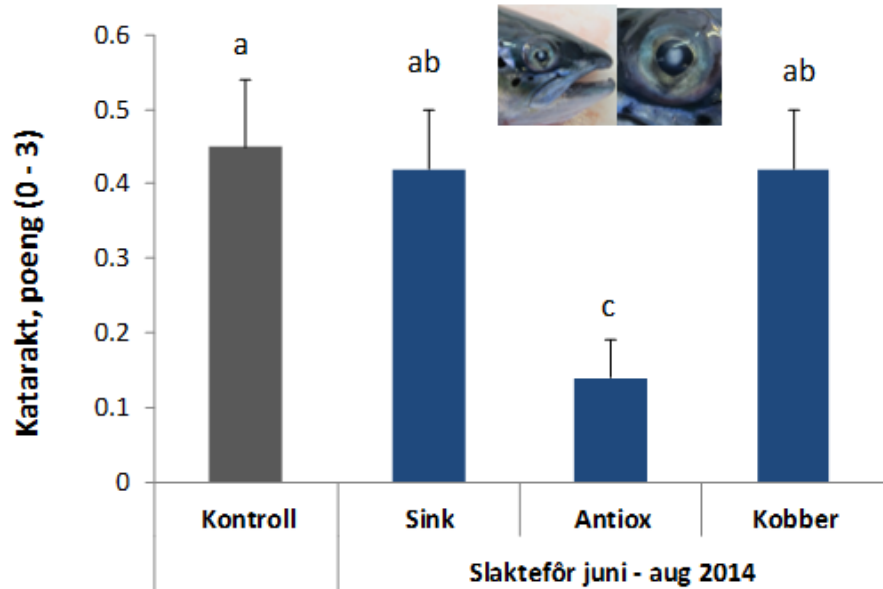
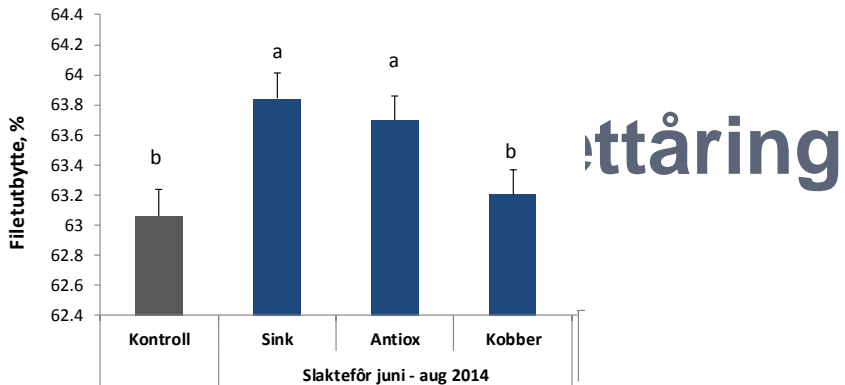
Melanin filet
- høyere score

Slaktefôr juni - august, ettåring

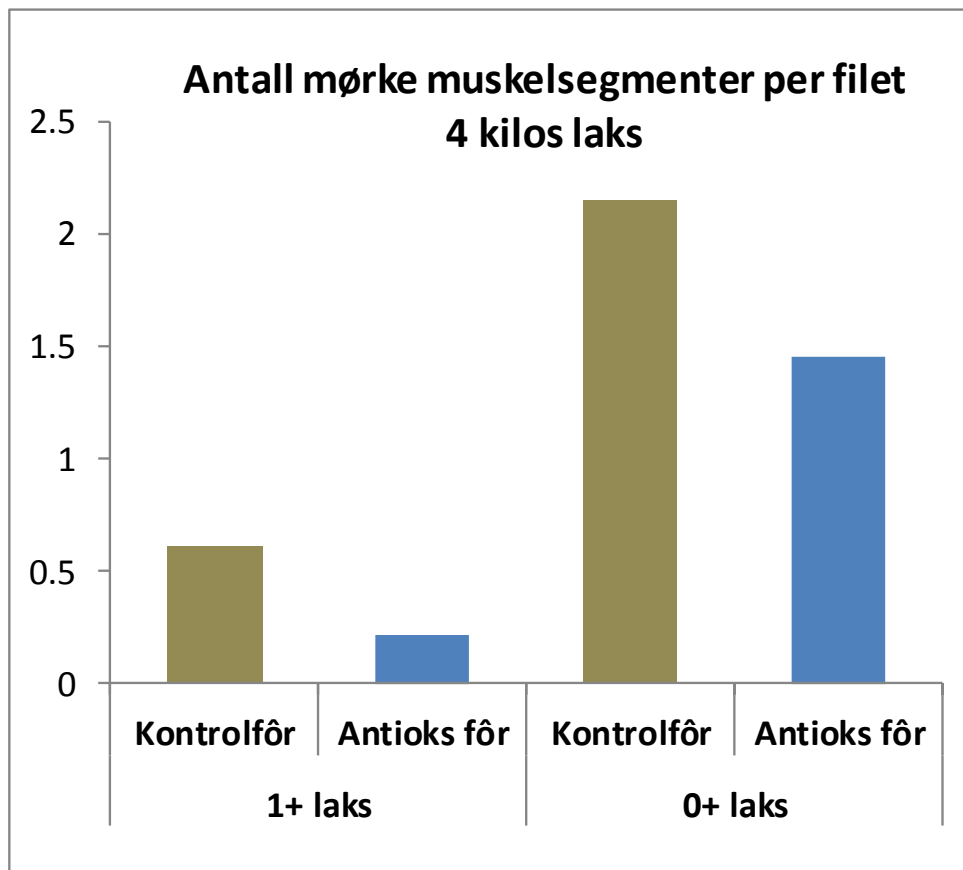


Slaktefôr, ettåring





Mørke muskelsegmenter



Betydelig mer flekker i 0+laks enn 1+laks

0+laksen hadde flere «helseplager» i oppdrettsperioden

Tilsetning av antioksidanter i fôret ser ikke ut til å hindre utvikling av mørke flekker, men redusere omfanget

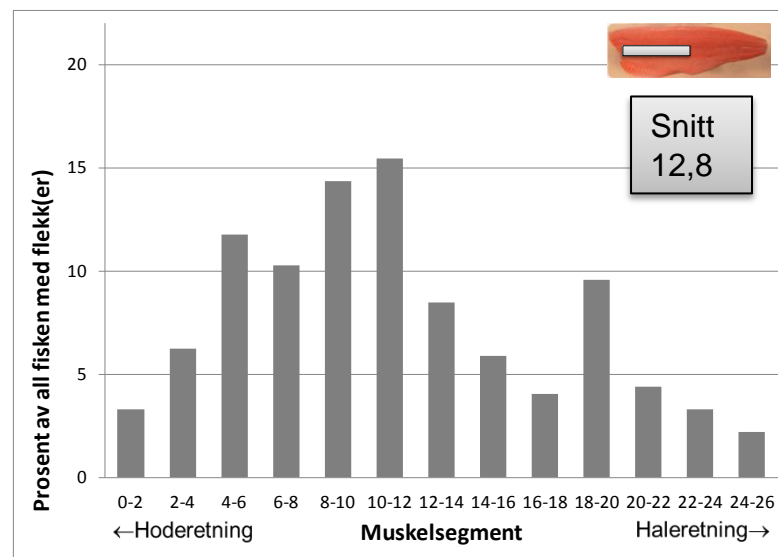
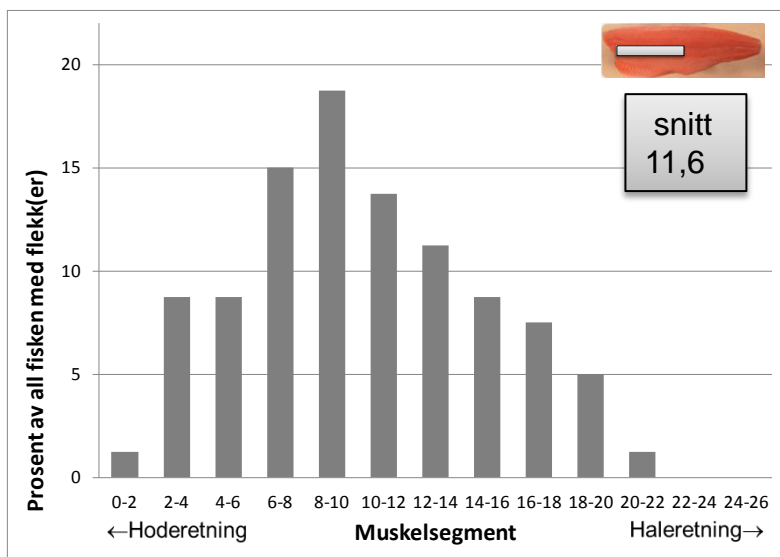
Det er interessant at effekten er så tydelig etter kun 2 måneders fôring før slakt

Spørsmål: Optimalt nivå av antioksidanter i ulike faser er et annet viktig spørsmål

Muskelsegment der flekken starter

De fleste flekkene starter ved segment 11 – 13. For nullårringen var det en høyere frekvens av flekker i bakre delen av bukområdet (topp ved segment 18-20)

Laksen kom fra samme smoltanlegg (Sunndalsøra) og gikk på samme lokalitet i sjø (Averøy)



Ettårring slaktet aug 2014

80 laks av 590 med mørkpigmentert muskel

Nullårring slaktet mars 2015

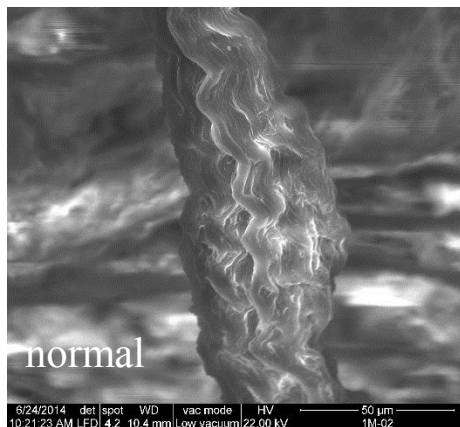
210 laks av 570 med mørkpigmentert muskel, evt arrvev etter vevsskade

Hvor starter betennelsen / melanisering

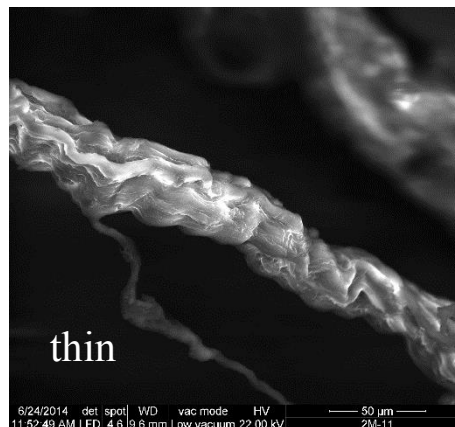


Bindevev fra mørke flekker (50µm)

Score 1



Score 2



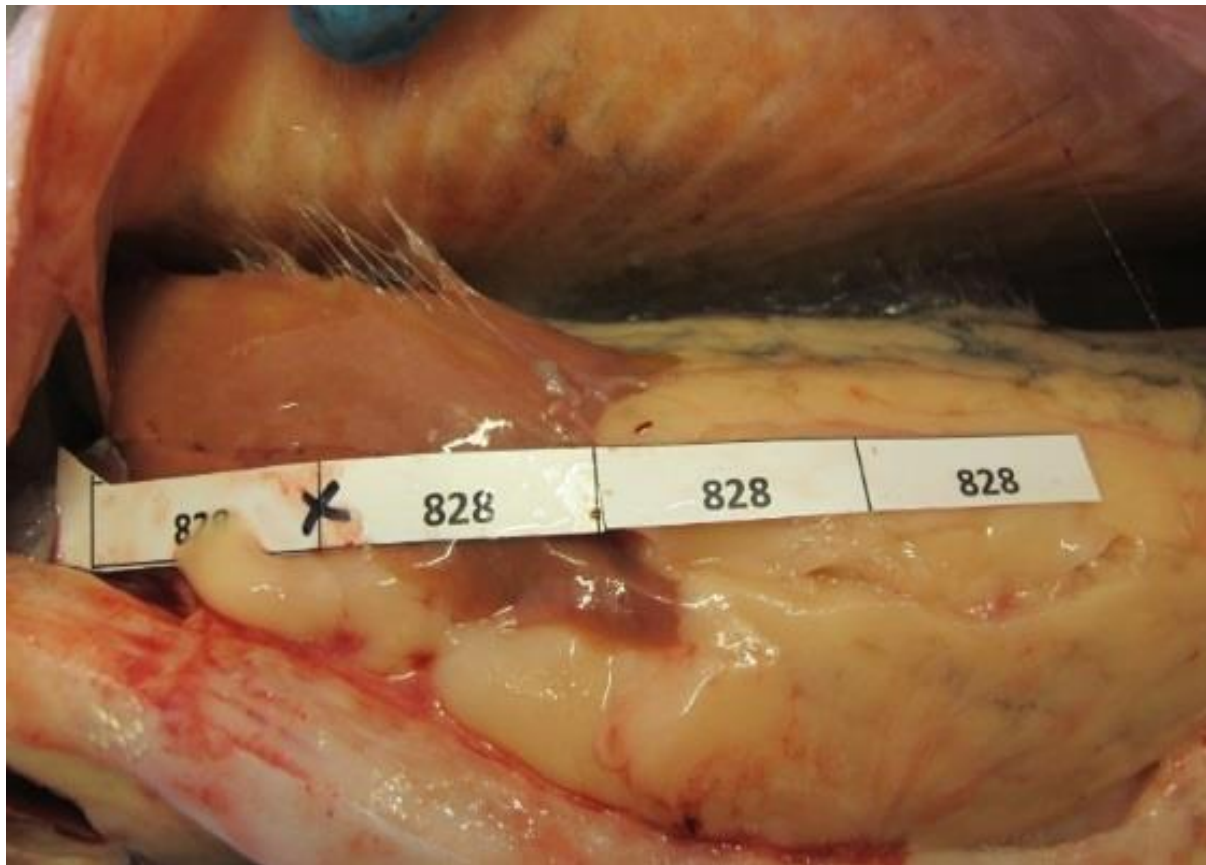
Score 4



Kollagentrådene i bindevevet er tynne og i sterkt pigmenterte flekker er bindevevet «ødelagt». Ser ut som en stor «floke»

Hva er tidsaspektet mht sårheling for laksemuskel?
Er det mulig å fastslå tidspunktet for skaden utfra bindevevsprofilen?

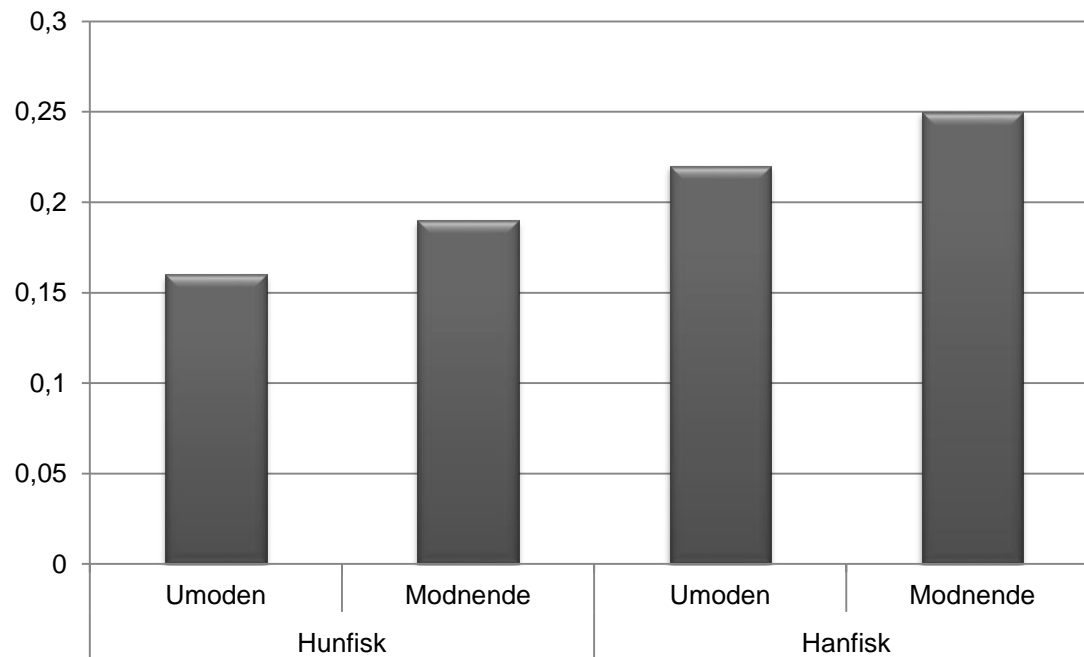
Mykotoksinet DON



Undersøkt 100 familier, 20 laks per familie

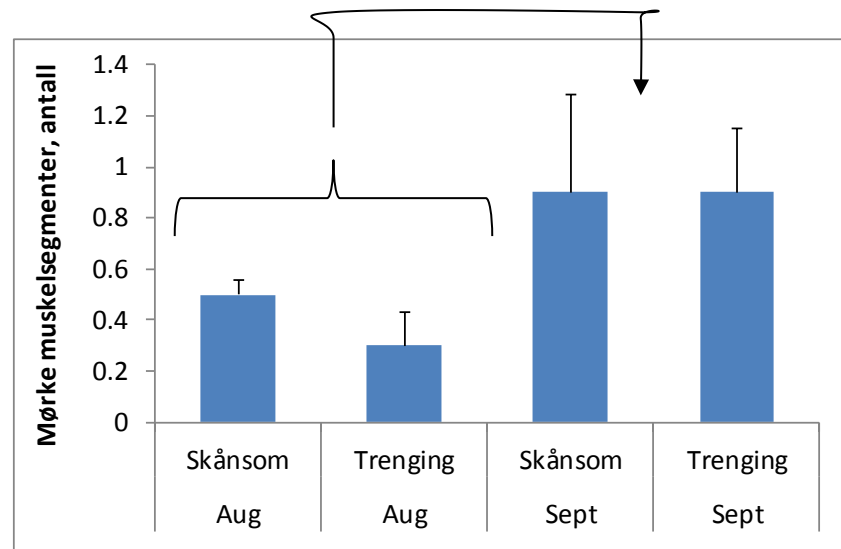
All fisken ble filetert og begge filetsider ble evaluert i hht FHF melanin standard

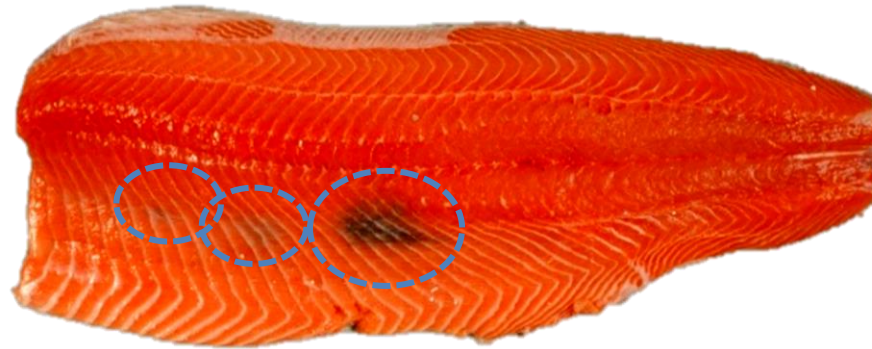
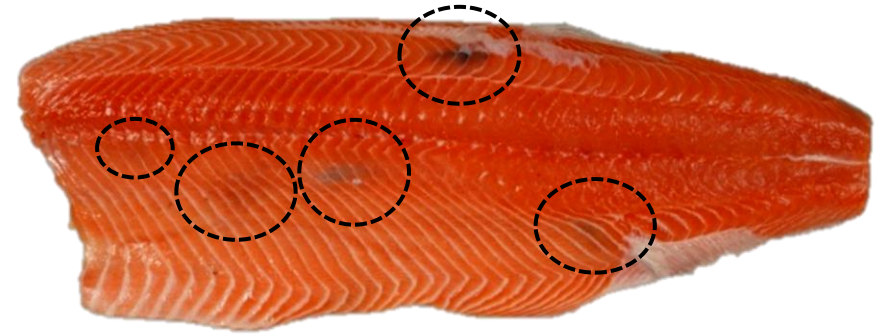
Arvbarheten var svært lav



Fysiske skader og stress

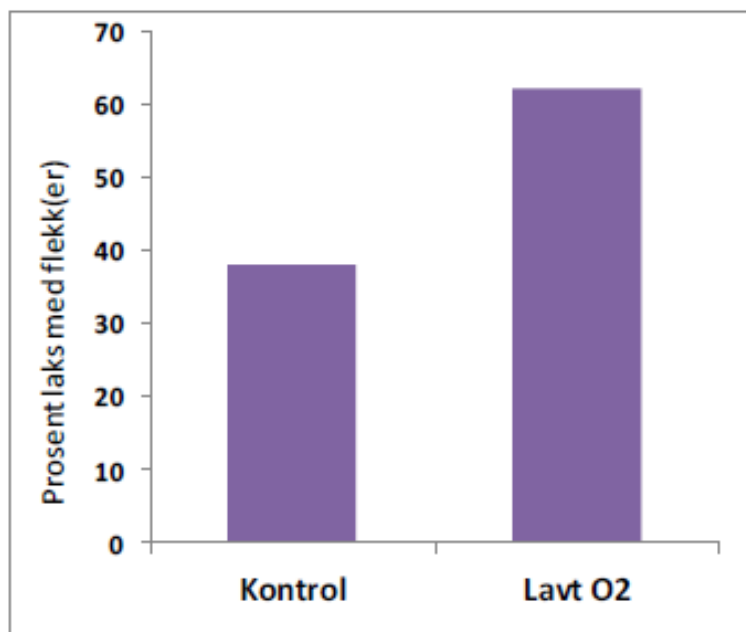
- Ytre slagskader kan gi indre blødninger
- Stor sannsynlighet for at klem og slagskader kan gi økt melanisering
- Har ikke sett økt forekomst etter trening





Prosentandel laks med mørkpigmentert muskel og arrvev

To måneder før slakt ble laks eksponert for sjøvann med lavt oksygenivå



Generelt: Lavt oksygenivå fremmer infeksjon og hemmer sårheling - bl.a. epitelisering (Vit E fremmer).

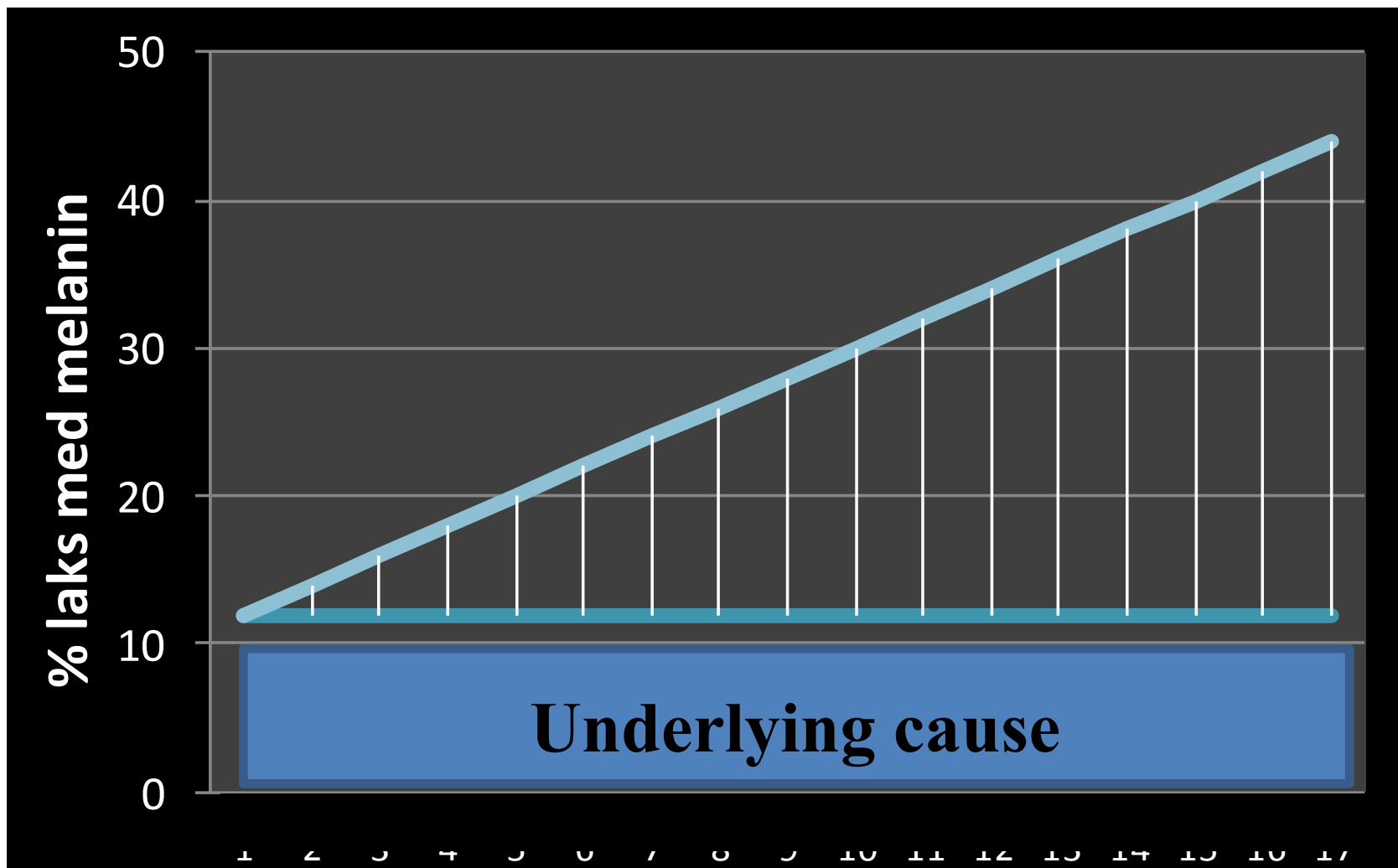
Lavt O2 kan føre til at sår under heling sprekker opp

Helingsprosesser i laksemuskel er lite kjent

Generelt kan det ta ca. 3 uker å "lukke" et sår, men da er sårflaten skjør (rosa skjørt arr).

Lavt O2 eller hard handtering kan føre til at sårflaten sprekker som kan gi ny betennelse osv





Ingen effekt

Slaktemetode	Elektrisk bedøvelse <u>kan</u> gi blodflekker men ikke melanin
Genetisk bakgrunn / avl	Èn stor studie <i>Bør etterprøves (nye beregninger)</i>
Fiskestørrelse ved slakt	Ingen systematisk forskjell
Vaksinering	Ingen forskjell mellom vaksinert og uvaksinert laks

Kanskje

Avlusing	Tendens til at gjentatte avlusinger øker forekomsten
Transportavstand	Tendens til at lang transportavstand er negativt.
Sjøtemperatur	Enkelte tilfeller sett økt melanisering etter brå temperaturøkning (I praktisk oppdrett ikke mulig å isolere temperatureffekt)
Tid i ventemerde	Noen ganger sett økt melanisering etter lang oppholdstid
Sykdom	Risikoen for utvikling av store flekker øker etter PD. HSMB? CMS?

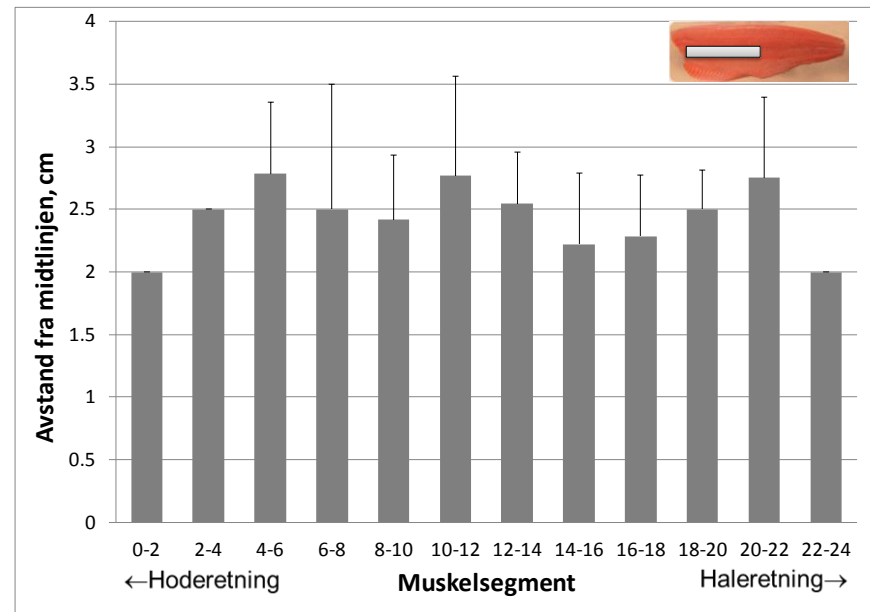
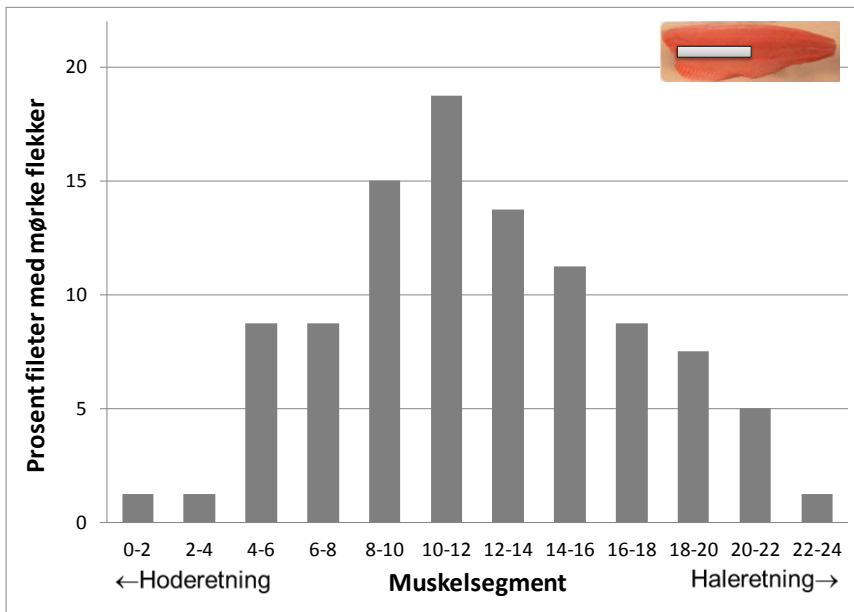
Ja

Fôr	Antioksidander reduserte forekomsten <i>- Bør undersøkes i storskala</i> <i>- Effekt av andre komponenter som påvirker melaninsyntese og som hemmer betennelse bør undersøkes</i>
Kvalitetsklasse	Produksjonsfisk høyere forekomst Kjønsmoden/modnende fisk høyere forekomst <i>- Kritisk grense mht. gonadeutvikling</i> <i>- Kjønshormoner</i> <i>- Utsortering</i>
Fysiske skader	Indre blødninger kan utvikle seg til mørke flekker. Langtidseffekt <i>- Kan håndtering av laks i ferskvann gi langtidseffekter i form av melanindeponering</i>
Smolt	Betydelig forskjell mellom smoltprodusenter 0+ laks hadde mer melanin enn 1+ Stor 0+ ved overføring i sjø hadde mindre melanin enn liten 0+ (100g vs. 70g) <i>- Har stor smolt generelt mindre melanin/ kritisk grense?</i> <i>- Fiskestørrelse ved vaksinerings?</i>
Vaksinering	Høyere ved maskinvaksinering <i>- Optimalisere vaksineringsen. F.eks. type maskin, stikkpunkt, trykk</i>
Vannkvalitet	Lavt oksygen økte forekomsten <i>- Kritiske vannparametere (evt kombinasjonseffekter Oksygennivå, temperatur, tetthet). Hva med avlusing/ avlusingmetoder?</i>
Økologisk produksjon	Generelt lavere <i>- Hvorfor (fôr, tetthet, avlusing)</i>

Hva kjennetegner dette området

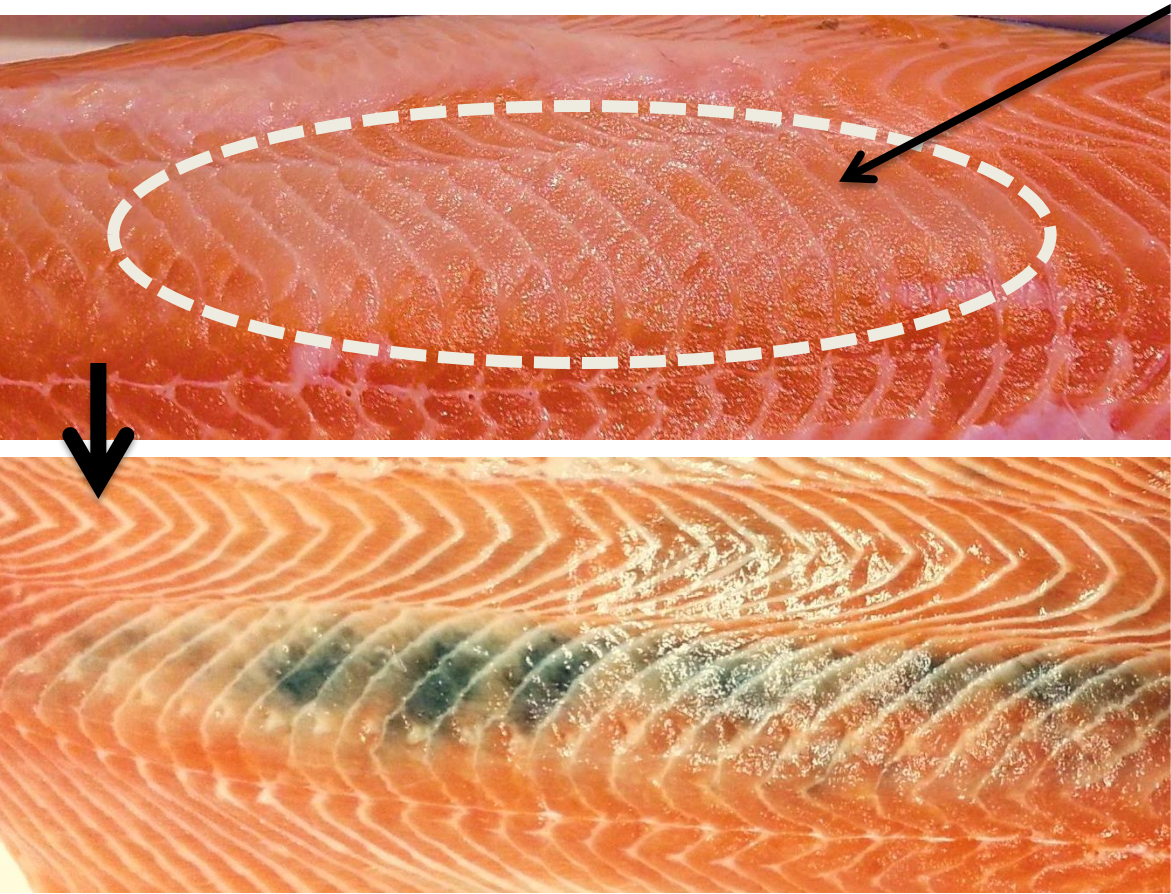
Type pigmenter

Stimulere til dannelse for å følge utvikling



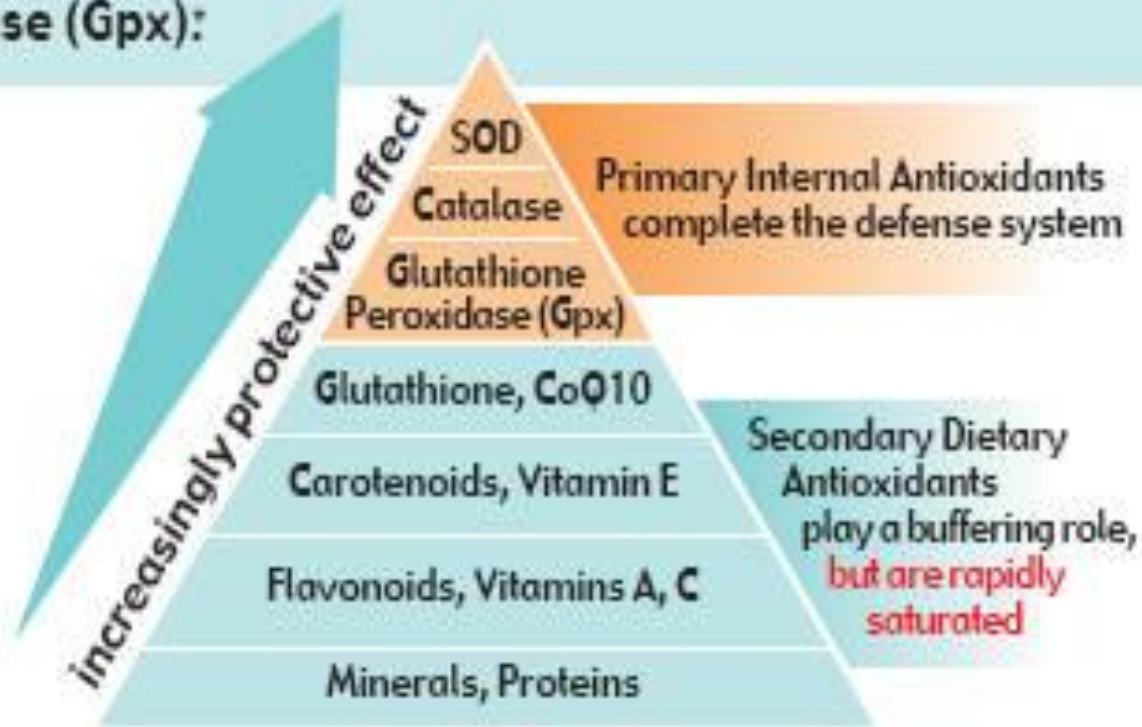
HOT SPOT: segment 8 -14

**Inflammatory condition, dorsal muscle
- no pathogens detected**

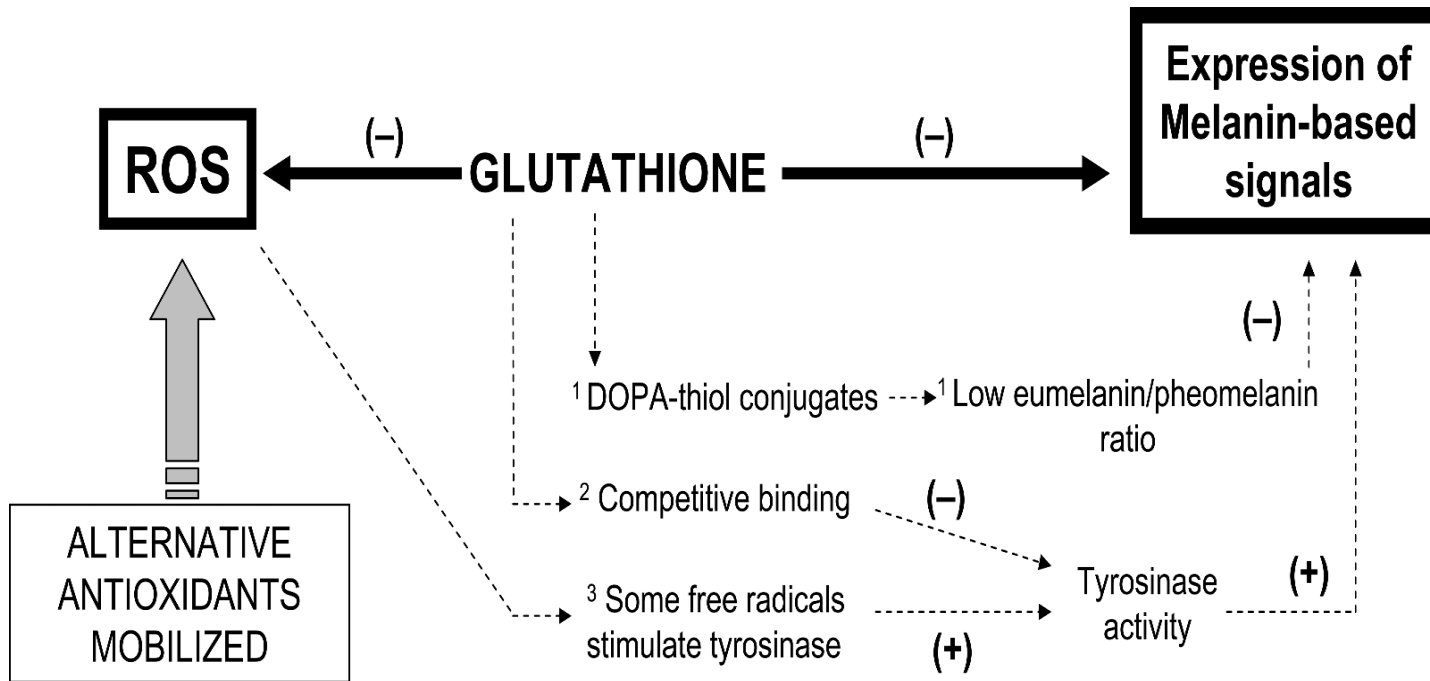


**Increasing frequency coinciding with abru
Similar conditions seen after PD outbreak**

GliSODin activates the most powerful antioxidants known, the body's own internal antioxidant defense system, including Superoxide Dismutase (SOD), Catalase and Glutathione Peroxidase (Gpx):



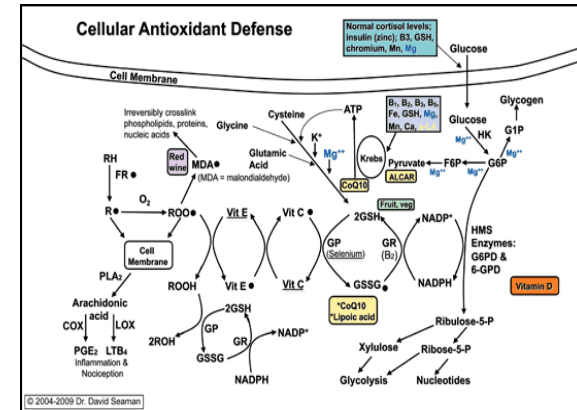
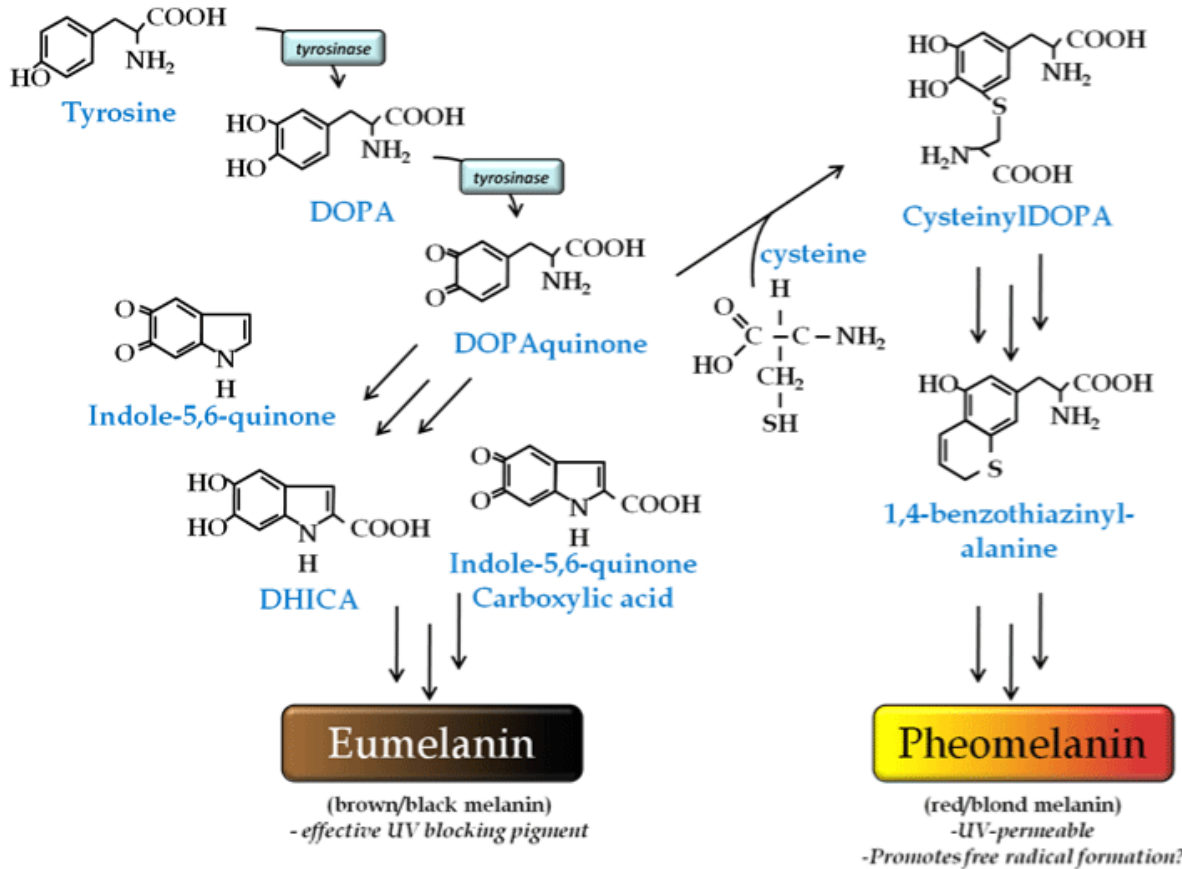
Lavt nivå av visse antioksidanter stimulerer til melaninproduksjon



Lavt nivå av spesifikke intracellulære antioksidanter (for eksempel glutathion) stimulerer melaninproduksjon (Galvan og Alonso-Alvarez 2008). Glutathion er beskrevet av en gruppe enzymer som beskytter mot oksidasjon, for eksempel av fett (harskning). Oksidativt stress oppstår når det ikke finnes tilstrekkelig antioksidanter til å nøytralisere de frie radikalenes skadelige virkning

Viktig å kjenne syntesen av melanin for å kunne sette inn tiltak som kan bremse melaninproduksjon

Melanin er i utgangspunktet «bra», men kan også under visse omstendigheter være skadelig for cellene



Nedbrytning av ødelagte mitokondrier fører til opphopning av lipofuscin.

Lipofuscin kan benyttes som markør for tidligere oksidativt stress og ødelagte mitokondrier

Melanin koblet til fettmetabolismen

- fokus innen humant

Hindawi Publishing Corporation
BioMed Research International
Volume 2014, Article ID 695797, 9 pages
<http://dx.doi.org/10.1155/2014/695797>

Research Article

Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Prevents the Melanogenesis in Murine B16/F10 Melanoma Cells

Jiun-Han Chen,¹ Junn-Liang Chang,^{2,3} Pei-Ru Chen,³ Yun-Ju Chuang,³ Shih-Tsai Shwu-Fen Pan,⁴ Tzer-Bin Lin,⁵ Kang-Hua Chen,⁶ and Mei-Jung Chen³

¹ Department of Medical Laboratory Science and Biotechnology, College of Medical Technology, Nursing and Wellbeing Yuanpei University, No. 306 Yuan-Pei Street, Hsinchu 30015, Taiwan

² Department of Pathology & Laboratory Medicine, Taoyuan Armed Forces General Hospital, Taoyuan 32551, Taiwan

³ Department of Biomedical Engineering, School of Health, Ming Chuan University, No. 5 De-Ming Road,

Vi kan sjekke evnen til fettceller å produsere melanin i cellemodeller og om ulike fettkilder i føret har innvirkning ved å isolere fettceller fra laks som har fått ulike fettkilder i føret (pågående FHF prosjekt v BRuyter)

The FASEB Journal • Research Communication

Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue

Manpreet Randhawa,* Tom Huff,¹ Julio C. Valencia,² Zobair Younossi,⁵ Vikas Chandhoke,* Vincent J. Hearing,² and Ancha Baranova*^{3,5,1}

*Molecular and Microbiology Department and Center for the Study of Genomics in Liver Diseases and ¹Shared Instrumentation Research Facility, College of Science, George Mason University, Manassas, Virginia, USA; ²Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; and ³Center for Liver Diseases, INOVA Fairfax Hospital, Fairfax, Virginia, USA

ABSTRACT Melanin is a common pigment in animals. In humans, melanin is produced in melanocytes, in retinal pigment epithelium (RPE) cells, in the inner ear, and in the central nervous system. Previously, we noted that human adipose tissue expresses several melanogenesis-related genes. In the current study, we confirmed the expression of melanogenesis-related mRNAs and proteins in human adipose tissue using real-time polymerase chain reaction and immunohistochemical staining. *TYR* mRNA signals were also detected by *in situ* hybridization in visceral adipocytes. The presence of melanin in human adipose tissue was revealed both by Fontana-Masson staining and by permanganate degradation of melanin coupled with liquid chromatography/ultraviolet/mass spectrometry determination of the pyrrole-2,3,5-tricarboxylic acid (PTCA) derivative of melanin. We also compared melanogenic activities in adipose tissues and in other human tissues using the L-[U-¹⁴C] tyrosine assay. A marked heterogeneity in the melanogenic activities of individual adipose tissue extracts was noted. We hypothesize that the ectopic synthesis of melanin in obese adipose may serve as a compensatory mechanism that uses its anti-inflammatory and its oxidative damage-absorbing properties. In conclusion, our study demonstrates for the first time that the melanin biosynthesis pathway is functional in adipose tissue.—Randhawa, M., Huff, T., Valencia, J. C., Younossi, Z., Chandhoke, V., Hearing, V. J., Baranova, A. Evidence for the ectopic synthesis of melanin in human adipose tissue. *FASEB J.* 23, 835–843 (2009)

Key Words: obesity • metabolic syndrome • inflammation • α -MSH • pigmentation

MELANIN IS A COMMON PIGMENT in animals. In humans, melanin is present in two major forms, eumelanin and pheomelanin (1). Both forms of melanins are produced in melanocytes that are derived from the neural crest and in retinal pigment epithelium (RPE) cells that originate from the optic cup (2, 3). In melanocytes and in the RPE, melanin is produced and stored in specialized lysosome-related organelles called melanosomes.

In melanocytes, these organelles are transported out into the dendritic processes before being transferred to keratinocytes, where melanin protects the skin from UV-induced DNA damage. This is a major biological function of melanin in humans, along with its role as a powerful antioxidant capable of scavenging reactive oxygen species (ROS), such as singlet oxygen, hydroxyl radicals, and superoxide anions (4, 5). The pathway for melanin biosynthesis includes a number of melanocyte-specific proteins. The key role in this biosynthetic pathway is played by tyrosinase (TYR), a multifunctional copper-containing glycoenzyme.

In addition to melanocytes and RPE cells, the production of melanin occurs in other locations of the body, such as the inner ear and the central nervous system, particularly in the substantia nigra and in the locus coeruleus, where it normally accumulates with age and possibly plays a role in the pathogenesis of Parkinson disease (6). Among nonmammalian vertebrates, the biosynthesis of the melanin has been found in pigmented macrophages of the spleen and the liver of amphibians (7) and in some pathogenic microorganisms, where its production correlates with an increased virulence (8).

In our previous study of visceral adipose tissue of morbidly obese patients, we detected a statistically significant overexpression of melanogenic genes encoding tyrosinase related protein 1 (TYRP1), dopachrome tautomerase (DCT/TYRP2), melanosome transport protein RAB27a, and Melan-A (MLANA) (9). Those findings prompted us to hypothesize that the melanin biosynthesis pathway is functional in adipose tissue. Our current study demonstrates for the first time that the biosynthesis of the melanin, indeed, takes place in visceral adipose tissue of morbidly obese subjects and may have some physiologically relevant functions.

¹ Correspondence: Molecular Biology and Microbiology, David King Hall, MSN 3E1, George Mason University, Fairfax, VA, 22030, USA. E-mail: abaranow@gmu.edu
doi: 10.1096/fj.08-116327

Takk !