



UNIVERSITETET I  
NORDLAND

# MASTEROPPGAVE

**Effekten av akutt allostatisk  
belastning på hypothalamus –  
hypofyse - interrenal aksen, og dets  
betydning på dyrevelferden hos  
diploid og triploid atlantisk  
laksesmolt (*Salmo salar* L.)**

**Tone Hatløy**

AK306F MASTER I HAVBRUK  
Fakultet for biovitenskap og akvakultur  
Mai 2015

# INNHOLDSFORTEGNELSE

Forord.....	5
Sammendrag .....	6
Summary .....	7
1. INNLEDNING .....	8
1.1 Dyrevelferd .....	8
1.2 Dyrevelferd og fisk.....	9
1.3 Stress .....	9
1.3.1 Akutt og kronisk stress .....	10
1.3.2 Stressrespons.....	10
1.3.3 Allostase .....	11
1.3.4 Allostatisk belastning og overbelastning.....	11
1.4 Endokrine stressresponser .....	12
1.4.1 Adrenergisk respons.....	12
1.4.2 HPI-akse respons .....	12
1.5 Kontroll av kortisolutskillelsen .....	15
1.5.1 CRH/CRF og den hypothalamiske kontroll av ACTH .....	15
1.5.2 Adrenokortikotropisk hormon ACTH.....	16
1.5.3 Stimulerende faktorer på ACTH utskillelsen .....	17
<b>1.5.4</b> Hemmende faktorer på ACTH .....	17
1.6 Kortisol.....	18
1.6.1 Biosyntese av kortisol.....	18
1.6.2 Transport av plasmakortisol i blodbanen .....	19
1.6.3 Glukokortikoid og mineralokortikoid reseptor.....	19
1.6.4 Negativ tilbakekobling .....	20
1.6.5 Metabolisme og utskillelse av kortisol. ....	20
1.6.6 Kortisol som indikator på stress og dyrevelferd.....	21
1.7 Triploider .....	21
1.7.1 Triploidisering.....	22
1.7.2 Triploid laks .....	22
1.7.3 Triploider og dyrevelferd.....	23
1.8 Problemstilling.....	24
2 MATERIAL OG METODE.....	25
2.1 Godkjenning av bruk av dyr i forsøk.....	25

2.2	Forsøksfisk og forhold .....	25
2.3	Pre-stress .....	26
2.3.1	Forsøksoppsett .....	26
2.3.2	Prøvetak.....	27
2.3.3	Stressor.....	27
2.3.4	Sensitivitets (ACTH)- og negativ tilbakekoblingstest (dexametason).....	27
2.4	Analytiske prosedyrer.....	28
2.4.1	Kortisol.....	28
2.4.2	Osmolalitet .....	28
2.4.3	Klor .....	28
2.4.4	Magnesium .....	29
2.4.5	Laktat og glukose.....	29
2.5	Statistisk analyse .....	29
3	Resultater .....	30
3.1	Primær stressrespons.....	30
3.1.1	Plasmakortisol .....	30
3.2	Sekundære stressresponser .....	31
3.2.1	Glukose .....	31
3.2.2	Laktat .....	32
3.2.3	Plasmaosmolalitet .....	33
3.2.4	Plasmaklorid .....	34
3.2.5	Plasmamagnesium.....	35
3.3	HPI-akseresponsen .....	36
3.3.1	Sensitivitetstest (ACTH) .....	36
3.3.2	Negativ tilbakekoblingstest .....	37
3.4	Sammenhengen mellom primære og sekundære stressresponser .....	38
3.4.1	Kontroll diploid .....	38
3.4.2	Kontroll triploid .....	38
3.4.3	Stress diploid .....	38
3.4.4	Stress triploid.....	38
4	Diskusjon .....	39
4.1	Stress og allostasis hos fisk.....	40
4.2	Modifisering av HPI-akseresponsen .....	42
4.3	Plasmakortisol og sekundære stressresponser .....	44
4.3.1	Plasmaglukose og – laktat .....	44
4.3.2	Effekten på osmoregulering .....	46
4.4	Dyrevelferd og triploid laksesmolt .....	49

5	Konklusjon .....	52
6	Referanser .....	53

## FORORD

Denne oppgaven teller 60 studiepoeng, og er del av en mastergrad i havbruk, ved Fakultetet for biovitenskap og akvakultur ved Universitetet i Nordland.

Først og fremst vil jeg takke min veileder, Martin Haugmo Iversen, som har vært en fantastisk lærer og motivator disse to årene. Jeg er utrolig takknemlig for all din kunnskap, hjelp, tålmodighet, forståelse og støtte. Samtidig vil jeg takke deg for at du hadde troen på meg. Du er et flott menneske.

Vil også takke teknikker Bente Sunde, for god opplæring og hjelp til analyser på laboratoriet, samt Roald Jakobsen og Steinar Johnsen for hjelp under prøvetaking. Videre vil jeg takke Hilde Ribe og alle andre som holder til i styrhuset i Mørkvedbukta, som alltid møtte meg med et smil.

Til slutt vil jeg vise en enorm stor takknemlighet til min kjære familie, mine gode venner og alle de flittige medstudentene på min vei. Uten deres oppmuntring, støtte og hjelp hadde nok ikke dette vært mulig. Jeg er evig takknemlig.

Universitetet i Nordland, Bodø

13.05.2015

Tone Hatløy



## SAMMENDRAG

I den senere tid har konseptet dyrevelferd blitt gitt økende oppmerksomhet. Det å drive oppdrett av fisk under god fiskevelferd er viktige forutsetninger for å oppnå god fiskehelse, lav dødelighet, god kvalitet, godt omdømme, og god lønnsomhet. Kunstig produsert triploid laks, med ett ekstra kromosomsett, er sterile og man har igangsatt produksjonen av denne type laks med den hensikt for å redusere den genetiske trusselen rømt oppdrettslaks representer for den ville norske atlantiske laksen. I oppdrettsnæringa kan fisk oppleve utfordrende situasjoner som kan virke stressende. Stress fører til to primære responser: 1. En adrenergisk respons som fører til økte konsentrasjoner av adrenalin og noradrenalin i blodplasma, og 2. Hypothalamus – hypofyse – interrenal (HPI) akse respons, som fører til økte konsentrasjoner av kortisol i blodplasma. Den fulle biologiske effekten av å ha et ekstra kromosomsett er ikke fullstendig kjent, men en tror at triploider er mer sensitive til sub – optimale miljøforhold. Målet med denne oppgaven var å studere effekten av en akutt allostatisk belastning på HPI - aksen hos diploid og triploid Atlantisk laksesmolt (*Salmo salar* L.). Fem hundre smoltifiserte (0+) Atlantiske laks ble brukt under dette forsøket. Forsøket bestod av fire grupper; kontroll diploid, kontroll triploid, stress diploid og stress triploid. Stressgruppene ble utsatt for 20 minutt trenging og fordelt i ulike kar for prøvetaking etter 0, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 og 72 timer. Både diploid og triploid hadde økte konsentrasjoner av kortisol etter påført stressor, men den triploide laksen viste signifikant høyere verdier sammenlignet med diploid.

Resultatene i denne undersøkelsen indikerer at triploid laksesmolt utsatt for en akutt allostatisk belastning resulterer i en allostatisk overbelastning i grenseland av type 1 og type 2 respons med en midlertidig oversensitivitet til ACTH og et redusert negativt tilbakekoblingssystem, med en midlertidig redusert regulatorisk evne av divalente ioner. Selv om det ikke ble påvist noen negative tertiære stressresponser som redusert vekst eller økt dødelighet i dette forsøket, kan den oversensitive triploide laksen fort ende opp i en allostatisk overbelastning type 2 (kronisk stress) med etterfølgende komprimert dyrevelferd, hvis den utsettes for en kraftigere eller mer langvarig stressor. Den triploide laksen bør derfor håndteres så skånsomt som mulig, med lavest mulig stressbelastning for unngå at dyrevelferden til den ploide laksen blir satt på en alvorlig prøve i kommersiell oppdrettssammenheng.

## SUMMARY

The concept of animal welfare is given a lot of attention the last few years. It is beneficial to practise good fish welfare in aquaculture to achieve good fish health, low mortality, good quality and high profitability. Artificial produced triploid salmon, with an extra pair of chromosomes, is sterile and produced to prevent genetic interactions with wild populations. In aquaculture fish may experience challenging situations that might appear stressful. Stress leads to two endocrine responses: 1. Adrenergic response that leads to increased concentrations of adrenalin and norepinephrine in blood plasma and 2. Hypothalamus – pituitary - interrenal (HPI) – axis response, that leads to increased concentrations of cortisol in blood plasma. The full biological effects of having an extra chromosome set are largely unknown, but triploids is considered more sensitive to sub - optimal environmental conditions.

The goal for this study was to investigate the effect of an acute allostatic load on HPI – axis of diploid and triploid Atlantic salmon smolts (*Salmo salar* L.). Five hundred smoltified (0+) Atlantic salmon were used under the experiment. The experiment consisted of four groups: control diploid, control triploid, stress diploid and stress triploid. The stress groups was exposed for 20 minutes crowding stress, and distributed to different tanks for sampling after 0, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48 and 72 hours. Both diploid and triploid had elevated concentrations of plasmacortisol, but the triploid salmon showed significantly greater values compared to diploids. The results of this study indicate that triploid Atlantic salmon smolts exposed to an acute allostatic load result in an allostatic overload between type 1 and type 2 responses with a temporary oversensitivity to ACTH and a reduced negative feedback system, with a temporary reduced regulatory ability of divalent ions. Although, no negative tertiary stress responses like reduced growth or increased mortality was detected in this experiment, the oversensitive triploid salmon might quickly end up in a allostatic overload type 2 (chronic stress) followed by compressed welfare, if subjected to a stronger or longer lasting stressor. The triploid salmon should therefore be handled as gently as possible, with the lowest stress load possible to prevent that the animal welfare of this ploid salmon is becoming compromised.

# 1. INNLEDNING

## 1.1 Dyrevelferd

I kommersiell oppdrett av fisk handler det om å dyrke frem fisk til markedsstørrelse, med minst mulig innsats, tid og kostnad, ofte på bekostning av dyrets ved og vel. I den senere tid har temaet dyrevelferd gitt økende oppmerksomhet, både hos produsenter og hos forbrukere (Iversen & Eliassen, 2012; Poli et al., 2005). Temaet dyrevelferd er både omfattende, vanskelig og omstridt, og det ser ut for at en felles definisjon er vanskelig å bli enig om. Dette på grunn av ulik bruk av konseptet, av både folk med og uten en vitenskapelig bakgrunn (Evans, 2009; Huntingford & Kadri, 2008; Iversen & Eliassen, 2012). Det er to spørsmål som må besvares før en i det hele tatt kan lage riktige og gode nok retningslinjer som omhandler velferd hos fisk. Dette er 1. Hva er definisjonen på dyrevelferd? og 2. Hvordan måles dyrevelferd? (Ashley, 2007). Det er mange som har prøvd seg på å lage en felles forståelse på hva dyrevelferd egentlig er.

Fraser et al. (1997) prøvde å lage en tilnærming på dyrevelferd ved å identifisere de tre største vitenskapelige filosofier som er blitt brukt for å adressere dyrevelferd. Disse tre var ifølge dem at dyr skulle ha muligheten til å leve et normalt liv (økofysiologi), at de ikke skulle lide (moraletikk) og at dyr bør kunne fungere normalt biologisk og fysiologisk sett. Huntingford og Kadri (2008) foreslo en annen mer praktisk tilnærming som skulle gjøre det mulig å konkludere med at et dyr hadde god velferd om de følgende tre punkter inntraff: 1. Dyret er tilpasset miljøet, med alle sine biologiske system i funksjon, 2. Dyret lever et naturlig liv, med muligheten til å utrykke sin adferd som den ellers ville ha gjort i det fri, og 3. Dyret må ikke utsettes for negative opplevelser som smerte, frykt eller sult, og må ha tilgang til de positive opplevelsene som sosiale interaksjoner. I dag benyttes det en praktisk tilnærming på dyrevelferd basert på arbeidene til Fraser et al. (1997) og Huntingford og Kadri (2008). Mellor og Stafford (2001) foreslo en tilnærming som gjør at en kan skille mellom god og dårlig velferd hos dyr. De mente at man kunne sikre god dyrevelferd om de var fri for de «fem frihetsgrader». De fem frihetsgrader sier at et hvert dyr skal være fri for: 1. Sult og tørst, 2. Skadelige miljøgifter, 3. Sykdom og skade, 4. Adferdsrestriksjoner (inkludert mangel på plass) og 5. Mentallidelse. Dette er tekstbasis i lovform som benyttes i mange land, og i den praktiske reguleringen av dyrevelferd (Huntingford & Kadri, 2008; Mellor & Stafford, 2001; Sandøe & Christiansen, 2007).



## **1.2 Dyrevelferd og fisk**

Det å inkludere fisk under begrepet dyrevelferd, og under de fem frihetsgrader er komplisert og omstridt (Huntingford et al., 2007). Det virker som om folk ofte assosierer dyrevelferd med organismer som har større kapasitet til en form for erkjennelse. Selv med forskjellige synspunkt om at fisk i det hele tatt kan oppleve frykt og smerte (Rose et al., 2014; Sneddon, 2006; Sneddon, 2009), kan man ikke vite hva en fisk måtte føle i gitte situasjoner, og man kan dermed ikke anta at fisk er mindre viktig enn organismer som kanskje har en større kapasitet til selverkjennelse. Havbruksnæringa har vært aktive med å utvikle interne retningslinjer for god praksis (Dykes, 2012; FEAP, 2013). Det å drive innenfor god fiskevelferd er viktig, og gagnar ikke kun fisken, men er også en viktig forutsetning for å oppnå god fiskehelse, lav dødelighet, god kvalitet, godt omdømme og god lønnsomhet (Iversen, 2008; 2009a; b; Iversen & Eliassen, 2012). Juni 2009 trådte dyrevelferdsloven i kraft i Norge (LOV, 2009), og kravene til denne loven er i stor grad regulert gjennom forskrifter. Noe som betyr at det er gitt en rekke bestemmelser om fiskens velferd, både for etablering og for drift av akvakulturanlegg og for slakting av fisk innen kommersiell oppdrett (Mattilsynet, 2012).

## **1.3 Stress**

Det mangler fortsatt en god og felles definisjon på begrepet stress, selv om det er blitt diskutert i årevis blant vitenskapsmenn (Moberg, 1985; Selye, 1950; 1973). Stress kan anses for å være en tilstand som virker forstyrrende på fiskens normale likevekt, kalt homeostase. Forstyrrelsene skyldes indre og/eller ytre stimuli, som defineres som stressorer (Moberg, 1985; Selye, 1950; 1973; Wedemeyer, 1996; Wendelaar Bonga, 2011; Wendelaar Bonga, 1997). I oppdrettsnæringa kan fisk oppleve utfordrende situasjoner som kan virke stressende. Stressorer i akvakultur kan være eksempelvis dårlig vannkjemi, håndtering, transport, vaksineringsprosedyrer, predatorer, sykdom og underernæring, o.l. For at fisken skal kunne opprettholde sin indre likevekt, i kampen mot stressorer, kreves det en rekke motvirkende (adaptive) mekanismer (Iversen, 2013; Iversen & Eliassen, 2014; Schreck, 2010; Wendelaar Bonga, 2011; Wendelaar Bonga, 1997). Disse adaptive mekanismene gjør at fisken skal kunne tilpasse seg og overvinne stressorene, slik at likevekten (homeostasen) blir opprettholdt. Stress kan dermed defineres som en tilstand hvor homeostasen hos en organisme trues eller forstyrres på grunn av en eller flere indre og/eller ytre stimuli, definert som stressorer (Schreck, 2010; Selye, 1950; 1973; Wendelaar Bonga, 1997). Stress er en naturlig tilstand

hos fisk, og øker individets evne til å overleve i ugunstige forhold. Kortidseffekten er derfor positiv. Men all stress har en kostnad, og varer stresset over lengre tid vil dette få konsekvenser for dyrets evne til å fungere normalt (Iversen & Eliassen, 2012).

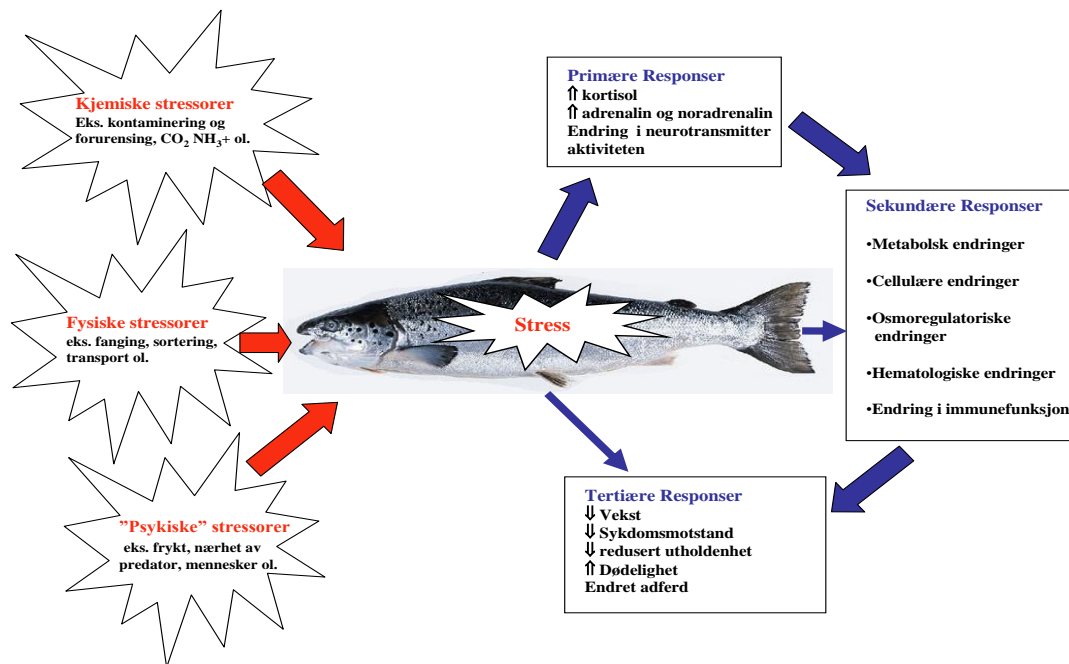
### *1.3.1 Akutt og kronisk stress*

Man deler gjerne begrepet stress inn i akutt stress og kronisk fase. Akutt fase defineres som stress som varer i minutter til timer, mens den kroniske fasen er stress som varer i flere timer, uker eller måneder (Dhabhar & McEwen, 1997). Forskjellene mellom dem er ganske uklare, i og med at det kan være vanskelig å generalisere effekten ulike stressorer har på forskjellige dyr, samt stressorer ofte overlapper hverandre (Wendelaar Bonga, 2011; Wendelaar Bonga, 1997). Men man bruker gjerne denne tilnærmingen (forenklingen), i og med at det kan hjelpe oss til å forstå effektene av stress. Stress er også en individuell opplevelse. Dette fordi at organismer er ulikt utstyrt fra naturens side (genotype), noe som vil si at den fysiologiske tilstanden er ulik og vil derfor medføre en ulik respons til samme stressor (Iversen, 2013). I og med at stressrespons hos fisk er naturlig, er stressresponsen adaptiv. Dette betyr at fisken får hentet seg inn igjen etter en stressor, og opprettholdt homeostasen. En adaptiv stressrespons er ikke skadelig, men øker individets mulighet for å overleve. Strekkes stressresponsen ut over lengre tid, og utenfor de normale grensene kan stressresponsen være maladaptiv, og effekten kan dermed være skadelig for fisken (Pickering & Pottinger, 1989).

### *1.3.2 Stressrespons*

Stressresponsen kan deles inn i primære, sekundære og tertiære responser. En stressrespons starter med en primær respons som inkluderer en økt utskillelse av katekolaminer, som i hovedsak er adrenalin og noradrenalin, samt stimulering av HPI-aksen som resulterer i en økt produksjon av kortikosteroider, som først og fremst er kortisol. Denne neuroendokrine responsen fører så til sekundære og muligens tertiære stressresponser. Sekundære stressresponser skjer som et resultat av de primære responsene og inkluderer metabolske, cellulære, osmoregulatoriske, og hematologiske endringer, samt forandringer i immunfunksjonen, hvor alle endringene relateres til fysiologiske tilpasninger. Tertiære stressresponser fører til nedsatt vekst, sykdomsmotstand, metabolisme, reproduksjon, utholdenhet og svømmeevne, samt økt dødelighet. En tertiær stressrespons kan oppstå ved langvarige stresspåkjenninger og påvirker hele organismen eller populasjonen (Figur 1) (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997). Det er viktig å notere seg at denne klassifiseringen

er noe forenklet i og med at det er omfanget og varigheten av stressoren(e) som bestemmer graden av responsen (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997).



**Figur 1.** Konseptet stress og dets mulige effekter på fisk. Etter Barton (2002) og Iversen (2013).

### 1.3.3 Allotase

Det har lenge vært kjent at organismer streber mot et konstant og balansert indre miljø, også referert som homeostase. Homeostasen stabiliserer essensielle fysiologiske parametere under endrede forhold. Allotase er en tilstand som støtter opp homeostasen, og innebærer at en oppnår stabilitet gjennom endringer (McEwen, 1998; 2005; McEwen & Wingfield, 2003; McEwen & Wingfield, 2010; Schreck, 2010; Sterling, 2012). Hormoner som kortikosteroider, katekolaminer og cytokiner er primære budbringere til allotase (McEwen, 1998; 2005; McEwen & Wingfield, 2003; Sterling, 2012).

### 1.3.4 Allostatisk belastning og overbelastning

Allostatisk tilstand refererer til at aktivitetsnivået til de primære budbringerne endres. Noe som kan resultere i en ubalanse, ved at det enten skiller ut for store eller for små mengder hormoner. Allostatisk tilstand varer i korte perioder så fremst de homeostatiske mekanismene blir holdt under kontroll (McEwen, 1998; 2005; McEwen & Wingfield, 2003; McEwen & Wingfield, 2010; Schreck, 2010; Sterling, 2012). Hvis det er ubalanse i de primære budbringerne i en lengre periode, og homeostasen ikke blir opprettholdt på samme nivå, vil det føre til allostatisk belastning. Allostatisk belastning refererer til en kumulativ påkjenning

av en allostatisk tilstand (McEwen & Wingfield, 2003). Dette har en sammenheng med at hormonene kortikosteroider og katekolaminer som skilles ut under en stressrespons har både essensielle og mulige skadelige effekter. I korte perioder er hormonene essensielle for tilpasning, opprettholdelse av homeostasen og overlevelsen (allostase), men over lengre perioder kan dette være en belastende eller skadelig påkjenning. Allostatisk overbelastning er en tilstand hvor alvorlig sykdom kan inntreffe. Allostatisk overbelastning kan deles i to typer responser, hvor type 1. kan assosieres med akutte stressresponser og er adaptive, mens type 2. assosieres med kroniske stressresponser og er maladaptive (Iversen & Eliassen, 2014; McEwen & Kalia, 2010; McEwen & Wingfield, 2003; Schreck, 2010).

#### **1.4 Endokrine stressresponser**

Stress fører til to endokrine responser: 1. En adrenergisk respons som fører til økte konsentrasjoner av adrenalin og noradrenalin i blodplasma, og 2. Hypothalamus - hypofyse (pituitary) – interrenal (HPI) akse respons, som fører til økte konsentrasjoner av kortisol i blodplasma (Wendelaar Bonga, 2011).

##### *1.4.1 Adrenergisk respons*

Den adrenergiske stressresponsen fører til en øyeblikkelig økning av katekolaminer, hovedsakelig adrenalin og noradrenalin, i blodplasma. Når en fisk blir utsatt for stress settes den fysiologiske stressresponsen i gang av det sentrale nervesystemet (SNS). De synaptiske nervefibrene stimulerer frigjøring av katekolaminer, ut fra kromaffine celler, som i hovedsak er lokalisert i fremre del av nyren. Siden katekolaminer primært er lokalisert i kromaffine celler løses dette hurtigere ut enn utskillelsen av kortisol (Saligaut et al., 1999). Man bruker ikke katekolaminer som indikator på primære stressresponser, i og med at adrenalin og noradrenalin har såpass kort biologisk halveringstid som 10 minutter i fiskeblod (Wendelaar Bonga, 2011).

##### *1.4.2 HPI-akse respons*

Hypothalamus – hypofyse - interrenal (HPI) - aksen er en kaskade av hormoner, med kortisol som det fysiologiske viktige hormonet (Bernier, 2006; Bernier & Peter, 2001; Ellis et al., 2012). HPI-aksen hos beinfisk er sammenlignbar med stressaksen hos pattedyr (hypothalamus – hypofyse – adrenal (HPA) akse), som er et resultat av konvergent evolusjon, noe som innebærer at de har utviklet lignende genetiske eller morfologiske strukturer, på grunn av lignende levested i samme type miljø (Tsalafouta et al., 2014).

Begge aksene er neuroendokrine kretser med et felles opphav, men er ulike i den mikroanatomiske organisasjonen av de cellene som syntetiserer glukokortikoider. Hos pattedyr, fugler og reptiler er disse cellene lokalisert i den adreneriske kjertelen, som er en sammensatt kjertel bestående av celler som syntetiserer steroider anordnet i lag (adrenal cortex) rundt et nettverk av «sinusoidal» blodårer som stammer fra den adenale arterien og katekolamin syntetiserende celler (adrenal medulla). Den adreneriske kjertelen er hos tetrapoder lokalisert ved siden av nyrene. Hos amfibier og beinfisk er cellene som syntetiserer glukokortikoider (interrenale celler) ikke en kjertel, men ligger spredt på overflaten, tett inntil blodkar i fremre del av nyrene (hodenyren) (Backstrøm et al., 2011; Ellis et al., 2012; Tsalafouta et al., 2014).

Tre forskjellige endokrine akser er i hovedsak involvert i regulering og uttrykk av stress, under påvirkning av en stressor. Disse tre aksene er kortikotrofisk-, melanotrofisk- og tyrotrofiske akse, men i denne oppgaven vil det kun fokuseres på den kortikotrofiske akse. En «akse» er en konseptuell tilnærming for å kunne beskrive og modellere hvordan endokrine systemer kontrolleres. En typisk endokrin akse er delt inn i lag av kontrollerende hierarki. Hos pattedyr og beinfisk består det største neuroendokrine reguleringsystemet av hypothalamus, hypofysen og perifere endokrine kjertler eller celler (interrenalt vev), sistnevnte reguleres av sekresjon fra hypofysen (Bernier, 2006; Bernier & Peter, 2001; Ellis et al., 2012; Iversen & Eliassen, 2014). Se Figur 2. for oversikt over HPI-aksens lokalisasjon i beinfisk.

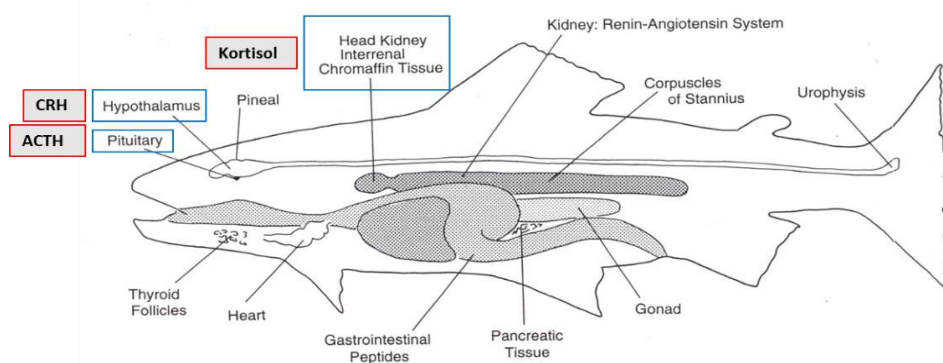
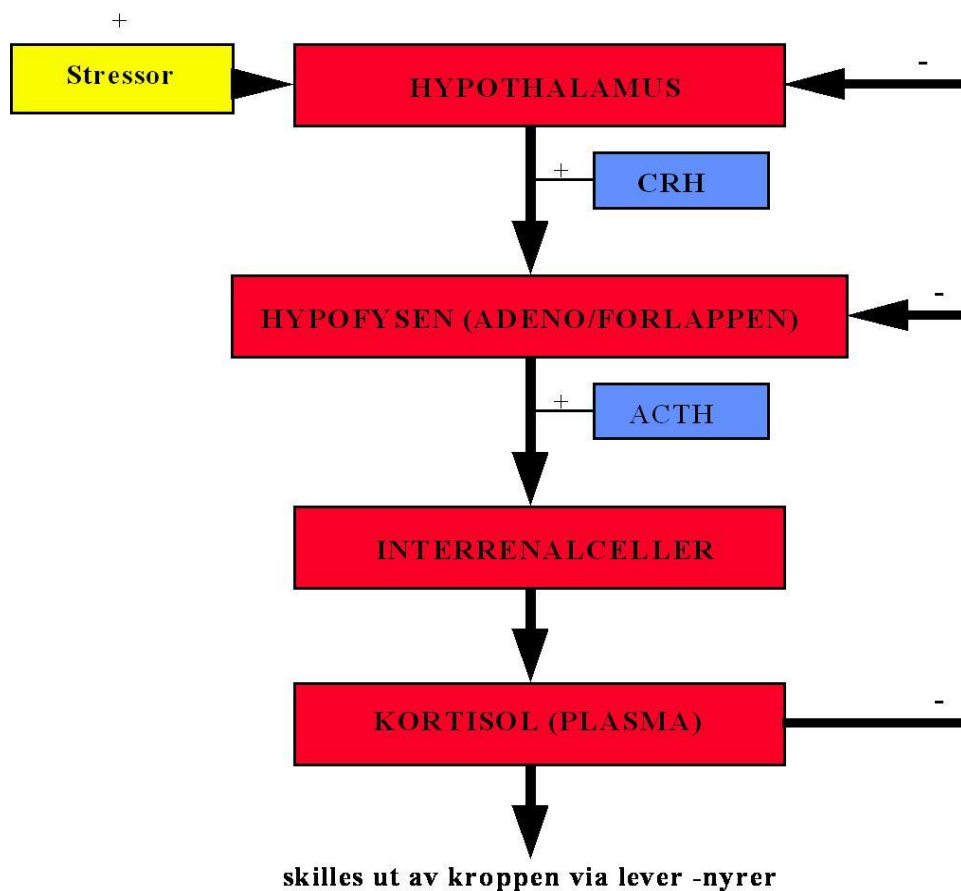


Fig. 5.10 Schematic diagram illustrating localization of the different endocrine organs in fish.

**Figur 2.** Organene som er ansvarlige for produksjon av stresshormonene i HPI-aksen er indikert med blå firkanter, og hormonene fra de ulike endokrine organene er indikert med røde firkanter. Modifisert etter en tegning av Bernier et al. (2009).

Utskillelse av kortisol starter med en aktivering av HPI-aksen, som da fører til at kortisol blir produsert, og skilt ut fra den fremre del av nyren (Bernier, 2006). Utskillelsen starter med utslipp av kortikoliberin hormon (CRH), eller faktor (CRF), fra hypothalamus, som i sin tur stimulerer utskillelsen av adrenokortikotropt hormon (ACTH) fra hypofysens fremre lapp og ut i sirkulasjonssystemet. ACTH binder seg til melanokortin 2 reseptor (MC2R) på interrenal steroidogene celler. Disse aktiverer en kaskade av reaksjoner som fører til biosyntese av kortisol, og som igjen skilles ut i sirkulasjonssystemet (Figur 3) (Bernier, 2006).



**Figur 3.** Prinsippkisse av hypothalamus – hypofyse – interrenal aksens funksjon hos fisk (Bernier et al., 2009).

HPI-aksen beskrevet ovenfor er en forenkling, og er meget kompleks og til dels lite forstått. Det er nemlig slik at det er flere faktorer (primært hormoner) som virker inn på CRH og ACTH på alle nivå, som vil utøve kontroll og være med å regulere konsentrasjonen av kortisol i blodplasma (Alsop & Vijayan, 2009a; Bradford et al., 1992).

## 1.5 Kontroll av kortisolutskillelsen

Den endokrine kontroll av kortisolutskillelse hos beinfisk er kompleks. Atrial natriuretisk faktor, angiotensin II, veksthormon, tyroksin, arginin vasotokin og katekolaminer har alle kortikotrofiske aksjoner, hvor kortisol viser til å påvirke sin egen utskillelse ved negativ tilbakekobling av sin egen sekresjon direkte på interrenale celler. I tillegg viser det seg at interleukin-liknende faktorer kan ha hemmende og stimulerende effekter på kortisolutskillelsen, men at effektene av disse faktorene er sannsynligvis kun involvert i modulering av kortikotrofiske aksjoner av hormoner som har sin opprinnelse i hypofysen. Studier på fisk som har fått fjernet hypofysen, indikerer at det er hypofysen som dominerer kontroll av sekresjon av kortisol (Wendelaar Bonga, 2011).

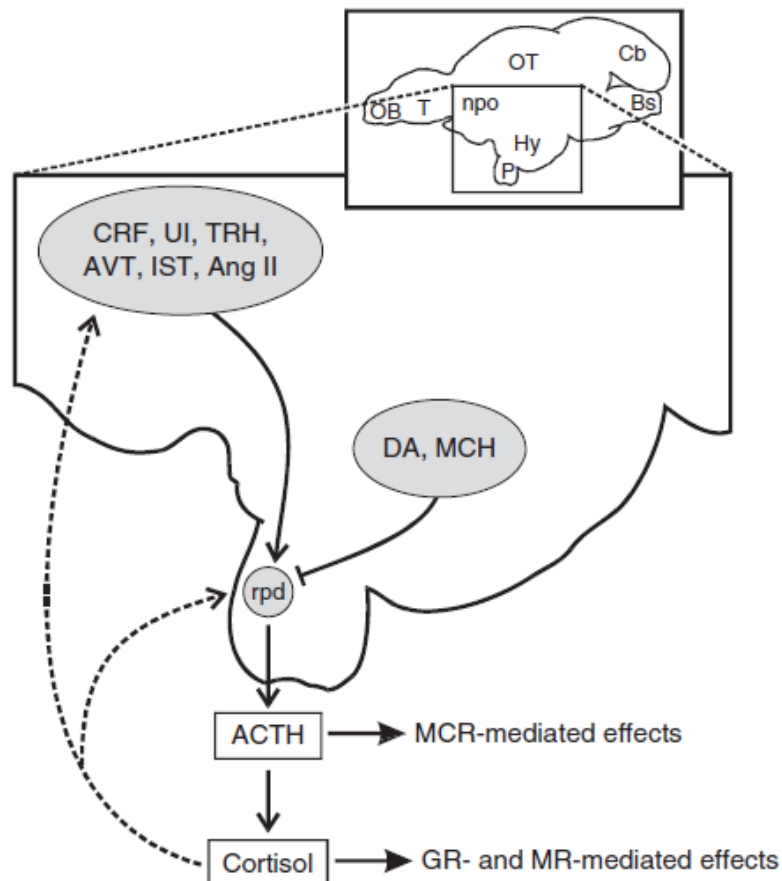
### 1.5.1 CRH/CRF og den hypothalamiske kontroll av ACTH

Kortikoliberin hormon (CRH) eller faktor (CRF) er et peptid bestående av en sekvens på 41 aminosyrer, og likner strukturen til urotensin I (UI) lokalisert i urofysen hos beinfisk og er den mest potente stimulerende faktor for regulering av ACTH (Bernier et al., 2009; Engelsma et al., 2002; Ojima & Iwata, 2010). CRH stimulerende celler er dokumentert i hypothalamiske nucleus preopticus (NPO) og i nucleus tuberis (NLT) i kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*), gullfisk (*Carassius auratus*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og «white sucker» (*Catostomas commersoni*), og viser å spille en vesentlig rolle under tilpasninger til stressorer (Bernier et al., 2009). Det er flere faktorer som kontrollerer ACTH utskillelse bl.a. arginine vasotokin (AVT), tyreotropin (TRH), POMC-derivatet ACTH, og endorfiner. Det er usikkert om peptidene produseres i de samme CRF produserende cellene eller i separate celler, og intercellulær kommunikasjon foregår muligens via synaptiske eller synapselignende kontakt, eller spesifisert via lokaliserte reseptorer på neuronene (Bernier et al., 2009; Flick et al., 2006).

Det synes som CRH neuronene i NPO og NLT har ulike funksjoner, ettersom lesjon i gullfisker sine NPO stoppet plasmakortisol produksjonen, men påvirket derimot ikke innhold av ACTH. NLT lesjon reduserte både hypofysens innhold av både ACTH og plasmakortisol. Dette kan indikere at disse to regionene i hjernen har ulike fysiologiske roller når det kommer til kontroll av CRH (Bernier et al., 2009; Flick et al., 2006; Norris & Hobbs, 2006).

### 1.5.2 Adrenokortikotropisk hormon ACTH

ACTH er det minste peptidet i adenohipofysen (AN – forlappen av hypofysen) og består av en enkel lineær kjede med 39 aminosyrer. ACTH produseres i Rostral Pars Distalis (RPD) regionen av AN, og regulerer utskillelsen av kortisol. ACTH sin rolle i fisk er å regulere steroidogenesen i de interrenale cellene i hodenyren (Bernier et al., 2009; Wendelaar Bonga, 2011). Melanocortin reseptorer (MCR) i hodenyren er målcellene for ACTH, og andre POMC derivater. MCR reseptorene er del av en familie bestående av 7-transmembrane G-protein koblede reseptorer som stimulerer adenylat-syklase og syklisk adenosinmonofosfat (cAMP) sekundære budbringersystemet. Det er identifisert fem MCR reseptorer i flere arter fisk, og ACTH viser seg til å være det eneste ligandet/molekylet som binder seg til og aktiverer MC2R, men at både ACTH og MSH binder seg til de fire andre MCR (MC1R, MC3R, MC4R og MC5R) (Bernier et al., 2009).



**Figur 4.** Oversikt over de største faktorene som påvirker den kortikotrofiske aksen hos beinfisk. (Bernier et al., 2009). Heltrukne piler indikerer stimulering og stripete piler indikerer negative tilbakekobling. Ang II = angiotensin II; AVT = arginine vasotocin; Bs = hjernestammen; Cb = cerebellum; CRF = kortikoliberin; DA = dopamine; GR = glukokortikoide reseptor; Hy = hypothalamus; IST = isotokin; MCH, melanocyt-konsenterende hormon; MCR = melanocortin reseptorer; MR = mineralokortikoide reseptorer; npo = nucleus preopticus; OB = luktelappen; OT = optiske nerve; P = hypofysen; rpd = rostral pars distalis; T = telencephalon; TRH = tyrotropin; UI = urotensin I.



### 1.5.3 Stimulerende faktorer på ACTH utskillelsen

CRH er den viktigste faktoren for regulering av ACTH. Som tidligere nevnt spiller andre faktorer/hormoner også inn, som vist på Figur 4. Urotensin I (UI) har en stimulerende effekt på ACTH i fisk, ettersom UI i «white sucker» viser å være mer potent enn CRH er til å stimulere ACTH fra RPD i gullfisk, og når CRH reseptorene blokkeres vil de kortikotrofiske aksjonene til både UI og CRH reverseres (Fryer et al., 1985; Weld & Fryer, 1987; Weld et al., 1987). Det er også vist at neurohypofysiske hormoner deltar i regulering av ACTH; både arginine vasotokin (AVT) og isotokin (IST) har vist å stimulere utskillelse av ACTH fra hypofysen til gullfisk og regnbueørret. Angiotensin (ANG), og tyrotropin (TRH) synes også å stimulere ACTH. Både Ang I og II kan stimulere sekresjon av ACTH fra celler i pars distalis i gullfisk, men forsterker verken CRH eller UI sine kortikotrofiske aksjoner. I dorade (*Sparus aurata*) stimulerer TRH sekresjon av ACTH fra hypofysen, men hadde ingen effekt på ACTH sekresjon i pars distalis cellene hos gullfisk (Bernier et al., 2009).

### 1.5.4 Hemmende faktorer på ACTH

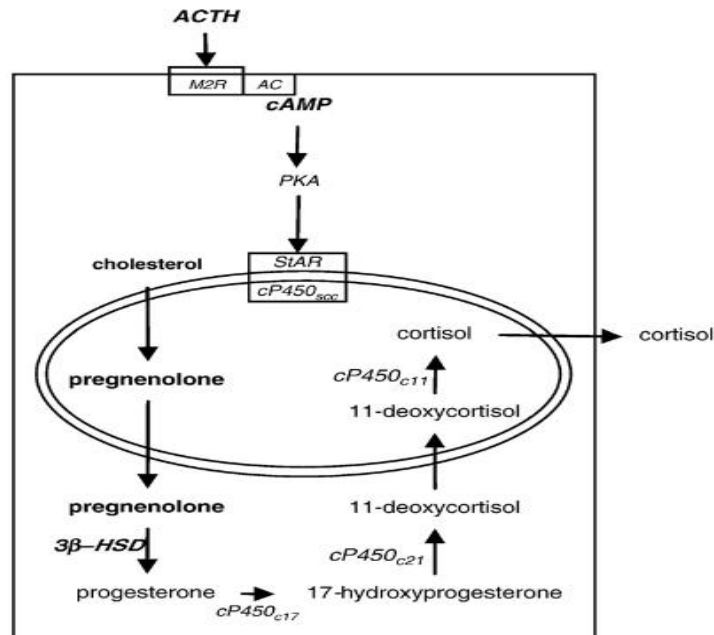
Melaninkonsentrerende hormon (MCH) og dopamin (DA) kan ha en hemmende effekt på utskillelsen av ACTH. MCH og DA har sin opprinnelse i hypothalamus. MCH i regnbueørret har vist seg å hemme utskillelse av ACTH i rostral pars distalis (RPD). Det meste av MCH fibre som ender opp i hypofysen er neurohypofysiske og derfor viktige når det kommer til evnen til å tilpasse seg bakgrunnsfarger. Det er foreslått at noen av disse fibre forsyner RPD. Det er også rapportert at regnbueørret, ål og «red porgy» (*Pagrus pagrus*) oppdrettet i kar med lys bakgrunn hadde et høyere nivå av MCH, og lavere konsentrasjoner av ACTH og kortisol i blod, sammenliknet med fisk som ble oppholdt i mørk bakgrunn (Baker et al., 1985a; Baker et al., 1985b; Rotllant et al., 2003b). I tillegg finnes det noen cytologiske og fysiologiske bevis som på at DA kan hemme sekresjon av ACTH i fisk. DA injisert i gullfisk, viser å fremkalle cytologiske endringer med en hemmende effekt på utskillelse og sekresjon av ACTH. Også i en «in vitro» studie på karpe (*Caprius caprio*) forslo de at «in vitro» utskillelse av ACTH er under DA hemmende kontroll, og at CRH kun kan stimulere sekresjon av ACTH under en mild DA utskillelsesrytme (Bernier et al., 2009).

## 1.6 Kortisol

HPI-aksen hos fisk er ansvarlig for flere biologiske prosesser, og det er utskillelsen av kortisol som regulerer disse (Bernier, 2006; Ellis et al., 2012; Tsalafouta et al., 2014). Det er kjent at kortisol har en adaptiv funksjon mot stressorer, i og med at den regulerer energimetabolismen, hydro-mineralbalansen, oksygenopptaket og ulike funksjoner i immunforsvaret. På den andre siden, kan økte konsentrasjoner av kortisol i blodplasma være skadelige for fisk, hvor nedsatt vekst, forsinket kjønnsmodning (Schreck, 2010), og redusert funksjonalitet av immunforsvaret kan forekomme (Engelsma et al., 2002; Tort, 2011). Kortisol brukes som indikator på stress, men få studier har faktisk målt kinetikken av kortisol hos fisk. Plasma kortisol reflekterer den totale produksjonen og utskillelsen av hormonet. Utskillelsen av kortisol er avhengig av proteinbindinger, målvev, reseptorer og katabolismen av hormonet kortisol (Mommsen et al., 1999).

### 1.6.1 Biosyntese av kortisol

De steroidogene cellene, kalt interrenal celler, er distribuert i hodenyre regionen, primært langs den bakre kardinal venen, og dets forgreininger (Mommsen et al., 1999). En aktivering av HPI-aksen vil skille ut CRH, produsert i hypothalamic nucleus preopticus (NPO). CRH vil stimulere hypofysen til skille ut ACTH (Bernier et al., 2009; Flik et al., 2006; Norris & Hobbs, 2006). ACTH binder seg til en membranreseptor (M2R) i den steroidogene adrenokortikale cellen og aktiverer cAMP regulert protein kinase A for å stimulere, via steroidogenisk akutt regulatorisk protein (StAR), opptaket av kolesterol via mitokondriene. Kolesterol transformeres til pregnenolone, deretter vil en serie av ulike cytokrom P450 enzymer i det endoplasmatiske retikulum og mitokondriet transformere pregnenolone til kortisol (Figur 5) (Alsop & Vijayan, 2009b; Aluru & Vijayan, 2007; Hagen et al., 2006).



**Figur 5.** Biosyntese av kortisol hos beinfisk. ACTH = adrenocorticotrop hormone, M2R = melanocortin 2 receptor, AC = adenylyl cyclase, cAMP = cyclic adenosine monophosphate, PKA = protein kinase A, StAR = steroidogenic acute regulatory protein, cP450 scc = cytochrome P450 side chain cleavage, 3 β-HSD = 3 β-hydroxysteroid-Δ 5-steroid dehydrogenase, cP450c17 = cytochrome P450 17 α-hydroxylase-17,20 lyase, cP450c21 = cytochrome P450 21-hydroxylase, and cP450c11 = cytochrome P450 11 β-hydroxylase (Hagen et al., 2006).

### 1.6.2 Transport av plasmakortisol i blodbanen

Som nevnt tidligere produseres kortisol hos fisk i de interrenale cellene, hvor de via diffusjon, fraktes til blodbanen. Kortisol er et fettløselig hormon, og derfor avhengig av å være bundet til transportproteiner for å kunne fraktes til målceller, via blodbanen. I pattedyr heter dette transportproteinet kortikosteroidbindende globulin (CBG) (Mommsen et al., 1999). I blodbanen til pattedyr er det er en likevekt mellom bundet kortisol, og fritt kortisol. Fritt kortisol er det biologisk aktive hormonet, og som binder seg til membranreseptorer på overflater eller mer vanlig til cytosoliske reseptorer inne i målcellen. Hos fisk derimot, er antall prosent bundet kortisol mye lavere, og man har enda ikke klart å identifisere et spesifikt kortisolbindende protein i fisk (Mommsen et al., 1999).

### 1.6.3 Glukokortikoid og mineralkortikoid reseptor

De to viktigste funksjonene til kortikosteroider har i vertebrater vært en glukokortikoid funksjon som påvirker metabolisme og vekst, og en mineralkortikoid funksjon som regulerer bevegelse av vann og ioner. I mange vertebrater er disse to funksjonene styrt av to forskjellige hormoner; kortisol og aldosteron. Hver av dem har spesielle reseptorer, henholdsvis

glukokortikoid reseptor (GR) og mineralkortikoid reseptor (MR) (Iversen et al., 2013). I og med at beinfisk ikke er i stand til å syntetisere aldosteron, fungerer kortisol også som en mineralkortikoid. De fysiologiske effektene av kortisol på målvev formidles av GR og MR. Det er blitt klonet og sekvensert en MR og to GR (GR1 og GR2) i flere arter beinfisk, med unntak av sebrafisk, som kun har en enkel GR i sitt genom (Bernier et al., 2009). GR reseptorer er identifisert i lever, gjeller, tarm, nyre, hjertet, gonader, leukocytter, erythrocytter, skjelettmuskulatur og milt. Det er også identifisert både GR og MR reseptorer flere steder i hjernen, som for eksempel i dorsal telecephalon, NPO, NLT, hypothalamus, kaudal neurosekretorisk system, og forlappen av hypofysen nærmere bestemt pars distalis og pars intermedia (Bernier et al., 2009).

#### *1.6.4 Negativ tilbakekobling*

Det synes at kortisol kan begrense omfanget og varigheten av den endokrine stressresponsen i fisk, med flere negative tilbakekoblingskretser. De molekylære mekanismene bak denne regulering er derimot fremdeles uklar og lite forstått (Bernier et al., 2009). Hvor setene for negative tilbakekoblingsmekanismer av kortisol er lokalisert er under diskusjon, men en tror de er lokalisert i hjernen; i hypofysen og kanskje i interrenal cellene. Tilbakekoblingsmekanismen av HPI aksens er kritiske for å opprettholde et settpunkt av sirkulerende kortisol, og er en viktig komponent for organismens homeostase (Veillette et al., 2007).

#### *1.6.5 Metabolisme og utskillelse av kortisol.*

Et fettløselig hormon vil enten finnes i bundet form til ulike transportprotein (biologisk inaktiv) eller i ubunden form fritt i plasma (biologisk aktivt), og i tillegg vil man finne hormonet i metabolisert og inaktiv form inne i en celle. Metabolske endringer gjør at kortisol blir redusert og inaktivert. Disse endringene gjør at kortisol blir ugjenkjennelig for GR og MR reseptorene, og kortisol blir også mer vannløselig. Hormon og reseptor vil til syvende og sist løsrives fra hverandre, og hormonet vil hovedsakelig bli deponert gjennom leveren, via det hepatobiliære systemet som hovedrute for klaring av kortisol (Davis, 2006; Greenspan & Gardner, 2004; Mommsen et al., 1999).

Faktorene som regulerer metabolisme og utskillelse av kortisol vet en veldig lite om. Men hos pattedyr tror man at metabolismen av kortisol hovedsakelig foregår i leveren, hvor kortisol reduseres, oksideres eller hydrolyseres (Davis, 2006; Greenspan & Gardner, 2004; Mommsen et al., 1999). Kort fortalt, vil den største reduksjonen av kortisol oppnås ved en reduksjon av 4.5 dobbeltbindingen av A-ringen og dens keto-gruppe i posisjon 3 (Greenspan

& Gardner, 2004). Konjugasjon av den resulterende hydroksylgruppa på karbon 3 sammen med sulfat og glukuronsyre gjør steroidet mer vannløselig, og svekker bindingen til CBG, slik at steroidet kan passere gjennom de glomerulære kapillærene og skilt ut via urinen (Davis, 2006; Greenspan & Gardner, 2004; Mommsen et al., 1999).

#### *1.6.6 Kortisol som indikator på stress og dyrevelferd*

En økning av kortisol i blodplasma, er den mest brukte indikatoren på stress hos fisk, (Barton, 2002; Ellis et al., 2012; Mommsen et al., 1999; Ramsay et al., 2009). Det er en enkel og pålitelig metode for å gradere effekten av en stressor, i og med at hvilenivået av steroidet hos salmonider er såpass lave (<13,8 nM (5ng/mL) (Wendelaar Bonga, 1997). I motsetning til kromaffine celler, som reagerer fra millisekunder til sekunder, vil syntese og utskillelse av kortisol, fra interrenale celler, ha en tid på flere minutter. Derfor er det enklere å utvikle en riktig protokoll for prøvetaking for å måle hvilenivået av kortisol, da stressrelatert prøvetaking er enklere å unngå (Barton, 2002). Som et resultat kan den sirkulerende mengden kortisol bli brukt som en indikasjon på grad av stress hos fisk. Utskillelsen av kortisol styres gjennom negativ tilbakekobling av hormonet på alle nivå av HPI-aksen (Wendelaar Bonga, 2011). Som nevnt tidligere produseres kortisol i interrenale celler hos fisk, og at aktivitet og utskillelse av kortisol styres av faktorer i hjernen gjennom HPI-aksen (Barton, 2002). For hver endring i miljøet, som fisken oppfatter som forstyrrende vil via HPI-aksen styre utskillelsen av kortisol, og vil derfor være et mål på trivsel eller dyrevelferd (Iversen & Eliassen, 2012).

### **1.7 Triploider**

Det å være triploid, betyr at en organisme har tre sett kromosomer, altså ett ekstra sett kromosomer enn det som er normalt i diploide organismer, og resulterer i et individ som ikke er forplantningsdyktig, altså steril. Denne tilstanden er vanlig blant planter, men oppstår også sporadisk i vertebrater som fisk, amfibier og reptiler (Cnaani et al., 2014; Fjelldal et al., 2012; Fraser et al., 2012). Hos fisk skyldes triploidisering forstyrrelser i modningsprosessen til rogn, og fører til at deler av arvematerialer som opprinnelig skal ekskluderes blir blokkert, og forblir i egget (Maxime, 2008). Triploider forekommer naturlig blant laksefisk, men er heller mer sjeldent enn det er normalt (Fjelldal et al., 2012).

Triploid fisk forekommer ikke bare i naturen, men kan også produseres kunstig av oss mennesker. Manipulering av fiskers kromosomer ble første gang utført på 40-tallet, men det

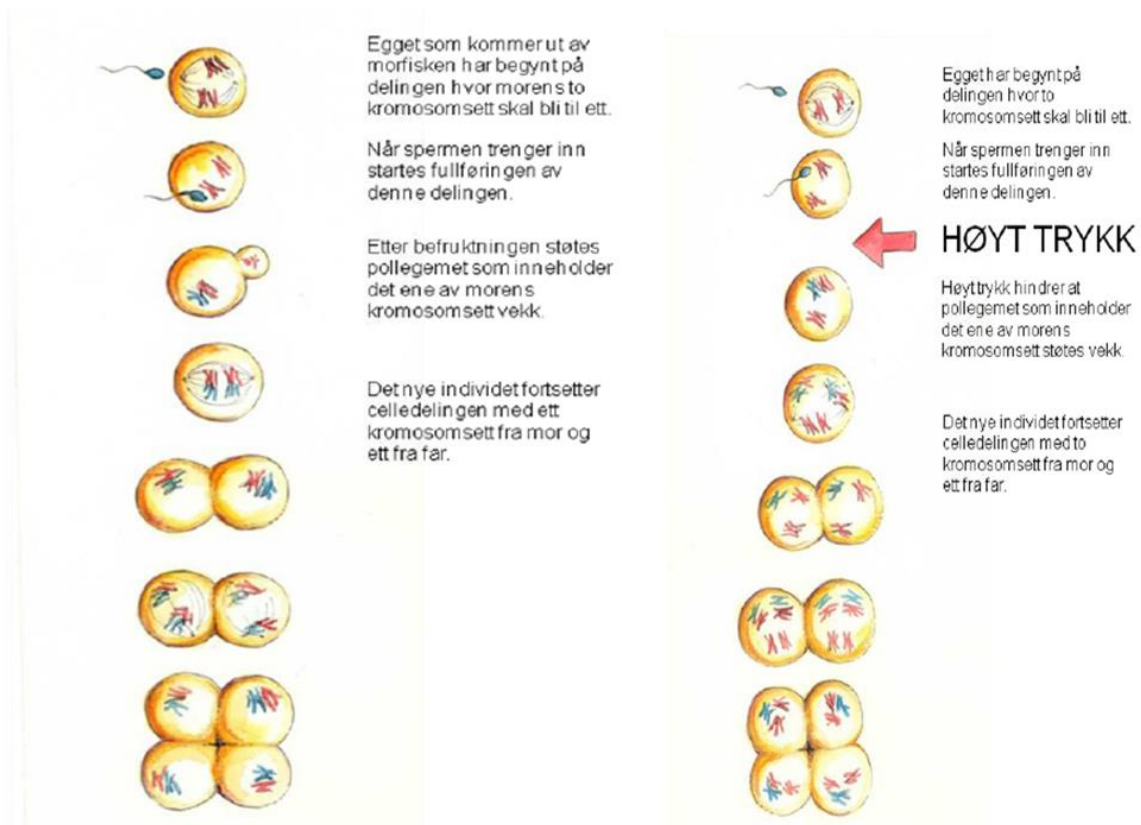
var ikke før på slutten av 50-tallet at triploider ble fulgt opp til voksen alder og sammenlignet med diploid sin vekst og kjønnsmodning (Maxime, 2008).

### *1.7.1 Triploidisering*

Hybridisering (krysse arter) er en metode for å produsere steril fisk, men den mest praktiske, økonomiske og effektive metoden er triploidisering. Den vanligste og beste metoden for produksjon av triploider gjøres ved å utsette diploid rogn for høyt trykk, rett etter befruktning (Fjellidal et al., 2012; Fraser et al., 2012). Ved befruktning er det ett ekstra sett med kromosomer tilstede i egget, det er ett kromosomsett som normalt sett støtes ut av egget, kort tid etter befruktning. Men om egget påføres trykkbehandling, vil kromosomsettet bli fanget i embryoet. Dette medfører at embryoet inneholder tre kromosomsett, to fra mor og ett fra far. Normalt sett inneholder et befrukta egg to kromosomsett, ett i fra mor og ett i fra far. Når trykket senkes igjen vil den normale celledelingen foregå som normalt og skape et levedyktig avkom (Hansen et al., 2007). Forklaring på hvorfor triploider ikke kan produsere avkom, er fordi de ikke kan produsere balanserte sett kromosomer i celledelingen når de tre kromosomparene skal fordeles på kjønncellene under reduksjonsdeling. Mekaniske problemer oppstår mest sannsynligvis på grunn av det ekstra settet med kromosomer når homologe (kromosomer som er bærere av de samme egenskapene) kromosomer skal pares ved celledeling (Figur 6, s.23) (Hansen et al., 2007).

### *1.7.2 Triploid laks*

Steril triploid fisk er av økende bruk innen oppdrett av laks. Dette nettopp for å unngå de økonomiske og økologiske utfordringene som er knyttet til tidlig uønsket kjønnsmodning hos fisk, og interaksjoner mellom oppdrettsfisken og villfisken (Fraser et al., 2014c). Kjønnsmodning er et kostbart stadium i livssyklusen hos de fleste fiskearter, og krever mye energi. Dette resulterer i en reduksjon i både vekst og kjøttkvalitet, i og med at all energi de har til gode blir brukt til utvikling av gonader og melke, istedenfor somatisk vekst (Sacobie et al., 2012). En av de største utfordringene havbruksnæringa har er at oppdrettsfisken rømmer fra anlegg, og blander seg med de ville bestandene. Flere studier har demonstrert at rømt oppdrettslaks har hatt genetiske innvirkninger på ville bestander. Bruken av steril laks i oppdrett vil derfor minimere sannsynligheten for at dette skjer (Fraser et al., 2014c).



**Figur 6.** Normal befruktning og celledeling sammenliknet med triploid produksjon. Trykkbehandlingen skjer 30 minutter etter befruktning (Tegning av Hansen et al. (2007)).

### 1.7.3 Triploider og dyrevelferd

Triploider har fundamentale ulikheter i celle organisasjonen, noe som påvirker dem fysiologisk og atferdsmessig, sammenliknet med diploider. Triploid laks har høyere grad av skjelletdeformiteter i ryggsøylen og i underkjeven. De er også mer sensitive til produksjonsstressorer, som temperatur og oksygen (Fjelldal et al., 2012). Det finnes også sporadiske observasjoner på at triploider har høyere risiko for katarakt (grå stær), og at det forekommer høyere dødelighet hos triploid laks frem til startfôring. De viktigste årsakene til at vanlig laks utvikler deformiteter er inkuberingstemperaturen til eggene, og hvor mye fosfor det er i fôret fisken får, og hvor tilgjengelig dette fosforet er (Fjelldal et al., 2012; Hansen et al., 2014).

## 1.8 Problemstilling

Målet med denne oppgaven var å studere effekten av akutt allostatisk belastning på hypothalamus-hypofyse-interrenal akse hos diploid og triploid atlantisk laksesmolt (*Salmo salar* L.). De følgende tre hypoteser ble testet ut:

1. Det er ingen forskjell i den adrenokortikotropisk hormonelle (ACTH) sensitiviteten i triploid og diploid laksesmolt etter akutt allostatisk belastning.
2. Det er ingen forskjell i det negative tilbakekoblingssystemet til HPI-aksen hos triploid og diploid laksesmolt etter akutt allostatisk belastning.
3. Det er ingen forskjell i stressresponsen hos triploid eller diploid laksesmolt etter akutt allostatisk belastning.



## 2 MATERIAL OG METODE

Forsøket og all analyse ble utført ved Mørkvedbukta forskningsstasjon ved Universitetet i Nordland, Norge. Forsøksperioden varte fra 2.10.14 til 19.10.14.

### 2.1 Godkjenning av bruk av dyr i forsøk

Ekperimentet ble godkjent av den lokale forsøksdyransvarlig ved Fakultet for Biovitenskap og Akvakultur, og er registrert med ID nummer 6931, og ble utført i henhold til forskrift om bruk av dyr i forsøk (LOV, 1996).

### 2.2 Forsøksfisk og forhold

Fem hundre Atlantisk laks (*Salmo salar*) ble brukt under forsøket. Fisken var smoltifisert (0+ smolt), og sjøvannsklar ved forsøksstart. Av de fem hundre, var 250 diploid og 250 triploid. Laksen ble hentet fra Cermaq Hopen (N/B0005) 05.09.2014, og fraktet til Mørkvedbukta forskningsstasjon i Bodø. Fisken ble transportert i forskningsstasjonens egne, godkjente transportenheter (600 liter (L) plastkar med lokk), og fikk tilførsel av oksygen under lasting og lossing. Diploid og triploid laks var av henholdsvis stammene AquaGen DIPLOID R\*E QTL IPN/PD + ILA/IPN/PD og AquaGen TRIPLOID R\*E QTL, og ble levert til Hopen som rogn i ultimo desember 2013, og klekket i perioden januar-februar. Ploiditet hos den triploide laksen ble bestemt ved hjelp av flowcytometri av DNA innholdet i erytrocytter, og var 100 % (AquaGen, 2013).

Fisken ble så flyttet inn i hall 5, og tilfeldig fordelt i fire kar (0,5 m<sup>3</sup> (450 L)) med håv. Før forsøkstart (06.10.14) ble fisken akklimert i 31 dager (05.09.2014 til 06.10.14). Fisken fikk kontinuerlig tilførsel av sjøvann med et salinitetsnivå på 33-34 ‰. Vanntemperaturen gjennom forsøket var  $9,2 \pm 0,2^{\circ}\text{C}$ , og oksygenivået var  $76,1 \pm 8,5$  % O<sub>2</sub> metning. Laksen ble foret med kommersielt tørrfôr via automatiske fôringsautomater under hele perioden. Tankene hvor fisken ble holdt i, ble skjermet for innsyn og forstyrrelser med ugjennomsiktige plastplater. Det var også skiltet med adgang forbudt skilt under forsøket, for å minimere eventuelle forstyrrelser.

## 2.3 Pre-stress

For å kunne bestemme effekten trenging (stressfaktoren) har på primære (plasmakortisol) og sekundære (laktat, glukose, osmolalitet, klor og magnesium) stressresponser ble det tatt blodprøver før oppstart av forsøket (pre-stress) og 0, 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, og 72 timer etter at fisken var utsatt for stress. Før forsøksstart ble det tatt blodprøver av 24 fisk (Pre-stress), og gjennomført en sensitivitets (ACTH)- og negativ tilbakekoblingstest (dexametason) (se kapittel 2.3.4, s. 27) Dette ble gjort for å se hvordan blodverdiene og tilstanden til HPI aksene hos den diploide og triploide fisken opprinnelig var (kontroll).

### 2.3.1 Forsøksoppsett

Fem hundre Atlantiske laks ble som sagt fordelt ut i fire atskilte kar (450 L), og nummerert med tall fra 1 - 4. Kar nummer 1 og 2 inneholdt diploid laks, hvor det første karet var en kontrollgruppe og det andre var en stressgruppe. Kar nummer 3 og 4 inneholdt triploid laks, hvor det tredje karet var en kontrollgruppe og det fjerde og siste karet var en stressgruppe. Hvert kar inneholdt omtrent 120 laksefisk. Kontrollgruppene skulle ikke utsettes for nevneverdig stress med unntak av flytting, mens stressgruppene skulle i tillegg til flytting utsettes for 20 minutters stress før flytting og prøvetak (se kapittel 2.3.3, s. 27). Det ble tatt to grupper i uken (en kontrollgruppe og en stressgruppe), så selve forsøket hadde et forløp på totalt 14 dager.

Forsøksfisken ble utsatt for 20 minutters stress eller ikke (kontroll), deretter ble fisken direkte håvet ut og fordelt over i ulike kar. Fordelingen var som følgende: 24 fisk ble fordelt 12 og 12 i to ulike kar (450 L) for sensitivitets- og negativ tilbakekoblingstest etter 24 og 72 timer, 6 fisk (0 t) ble direkte tatt ut for prøvetak og lagt i bedøvelse (metomidate, 5 mg/L), resten av fisken ble fordelt 6 stykker i 9 forskjellige kar (80 L) for prøvetak etter 1, 2, 3, 4, 6, 12, 24, 48, og 72 timer.

Karene med fisk for sensitivitets- og negativ tilbakekoblingstest etter 24 og 72 timer, ble skjermet med ugjennomsiktige plastplater, mens 80 L karene for vanlig prøvetak var tildekket med svarte søppelsekker og isolert fra hverandre.

**Tabell 1.** Oppsummering av forsøksgruppene og de ulike stressorene de ble påført gjennom eksperimentet

<b>Forsøksgruppe</b>	<b>Flytting</b>	<b>20 min. trenging</b>
<b>Kontroll Diploid</b>	X	
<b>Stress Diploid</b>	X	X
<b>Kontroll Triploid</b>	X	
<b>Stress Triploid</b>	X	X

### 2.3.2 Prøvetak

6 fisk (per gruppe) ble håvet ut av et kar og lagt i 10 L bønne med bedøvelse (Metomidate, 5mg/ L). 5 mg/L metomidate har i tidligere forsøk vist seg å blokkere enhver økning i plasmakortisol etter inntrådt anestesi (Iversen et al., 2003). En og en fisk ble tatt opp for prøvetak. Hver fisk ble avlivet med slag i hodet og lagt på en fuktig klut (stabilitet). Vekt og lengde ble notert ned, for å til slutt få tatt blodprøve. Blodet ble tappet fra caudalvenen ved bruk av 0,5 x 16-mm hepariniserte sprøyter. Glukose og laktat ble målt fortløpende (se kapittel 2.4.5, s.29). Blodet ble sentrifugert ved 5000 rpm i omtrent 5 minutter. Blodplasma ble pipettert ut og lagt over i eppendorfrør, og fryst ned ved - 40 °C, frem til utførelse av analyser.

### 2.3.3 Stressor

Stressgruppen for diploid og stressgruppen for triploid ble påført 20 minutters stress før prøvetak. Trenging ble brukt som stressfaktor. Dette ble gjort ved at vannstanden ble senket ned slik at ryggfinnerne ble tørrlagt, og holdt i denne posisjonen i 20 minutter. Vannstanden ble styrt fysisk med «munk» (åpning av sluk), slik at den appliserte stressoren ble observert fra start til slutt. Det tok ca. 6,45 minutter for oppnå laveste vannstand, og maksimal tetthet ved trenging var 262 kg/m<sup>3</sup>.

### 2.3.4 Sensitivitets (ACTH)- og negativ tilbakekoblingstest (dexametason)

«Sensitivitetstesten (ACTH)» ble utført etter 24 timer og 72 timer etter påført stressor. 24 fisk per gruppe (totalt 96 fisk + 24 fisk til pre-stress) ble brukt til denne testen. Etter 24 timer ble 12 fisk håvet over i en 10 L bønne med bedøvelse (metomidate, 5 mg/L). Fisken ble veiet og deretter injisert med deksametason i buken (0,1 ml/100g fisk), og lagt tilbake i en ny 10 L bønne med rent vann for oppvåkning. Deretter ble fisken plassert tilbake i karet. 24 timer etterpå ble fisken igjen håvet ut i 10 L bønne med metomidate (5 mg/L), 6 av fiskene ble veiet

og injisert med PBS (dosering: 0,1 ml/100g fisk) (negativ tilbakekoblingstest), og 6 ble veiet og injisert med ACTH (0,1ml/100g fisk). Fiskene ble så adskilt i to forskjellige kar. To timer senere ble de tatt ut igjen for prøvetak. Det ble notert ned vekt og lengde, og det ble tatt blodprøver etter metode beskrevet ovenfor. Prøvene ble analysert for plasmakortisol, laktat og glukose (se kapittel nedenfor).

## **2.4 Analytiske prosedyrer**

### *2.4.1 Kortisol*

Konsentrasjon av plasmakortisol ble analysert etter en RIA-metode, beskrevet av Iversen et al. (1998). Kort fortalt ble det brukt en [<sup>3</sup>H]-kortisol (TRK 407, Institutt for energiteknikk, Kjeller) som tracer. Standard- rekke (0-137,5 nmol/L (nM)) ble laget av hydrokortison (H 4001, Sigma). Antistoffet ble skaffet fra (F3-314) Endocrine Science, Tarzana USA. Prøvene ble sentrifugert (Haraeus sepatech Omnifuge 2.ORS radius 154 mm, rotor 3360) og inkubert ved 4-5 °C i 24 timer. Antistoff-antigen komplekset ble telt i en scintilasjonsteller type Packard Tri Carb 1900 TR. Assayet sin sensitivitet var på 1,68 nM. Prøver under "detection limit" ble satt lik sensitiviteten til assayen. Intraassay var mindre enn 10 %, og interassay var 12,5 % ved henholdsvis 80 nM. NSB varierte fra 2.1 til 4,8 % av den totale aktivitet. Tidligere kvalitetstester ved laboratoriet til UiN gav følgende resultat. Måling av 4, 17, 34 og 69 nM radiomerket kortisol tilsatt plasma viste en gjenvinning på henholdsvis 90, 94, 96 and 95 % (gjenvinningstest). En serie fortykning av blodplasma av stresset atlantisk laks gav en tilnærmet parallell line til dose respons kurven (parallellitetstest= immunologisk identitet).

### *2.4.2 Osmolalitet*

Osmolalitet (mOsm) ble målt med Fiske One-Ten Osmometer (Fiske Associates, Norwood, MA, USA) og resultatene ble uttrykt i mOsm/L.

### *2.4.3 Klor*

Klor (Cl<sup>-</sup>) ble målt med Sherwood Chloride analyse 926s (Sherwood Scientific CTD, UK), og resultatene ble uttrykt i mmol/L (mM)

#### 2.4.4 *Magnesium*

Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) ble målt med et analysekit, Fluitest Mg-XB levert av Biocon (Biocon Diagnosemittel GmbH & Co, Tyskland). Dette er en kolimetrisk metode, hvor magnesium danner et lilla kompleks med xylydyl blått, og konsentrasjonen av magnesium leses fotometrisk som avtakende xylydyl blå absorbanse. 10  $\mu$ l blodplasma fortynnes i 1 ml eppendorfrør og inkuberes i 5 minutter ved 30 °C, før avlesing i plateleser ved 520 nm. Ved å regne mot blank prøve (destillert vann) og magnesium standard får man magnesiuminnholdet i hver enkel prøve (blodplasma) som mmol/L (mM).

#### 2.4.5 *Laktat og glukose*

Laktat og glukose ble bestemt på helblod umiddelbart etter prøvetaking ved hjelp av henholdsvis en Laktat Pro (Arkray KDK, Kyoto, Japan) og Freestyle Freedom Lite (Abbott Diabetes care Ltd, Oxon, UK). Laktat- og glukosenivåer under deteksjonsgrensen ble gitt en verdi som svarer til sensorenes følsomhet, noe som var henholdsvis 0,8 mM (laktat) og 1,1 mM. Well og Pankhurst (1999) validert effekten av bærbare instrumenter for måling av laktat og glukose og sammenlignet de med etablerte laboratorieteknikker. De konkluderte med at bærbare instrumenter for måling av blodglukose og laktat kunne anvendes som et relativt mål for å vurdere responser til stressfaktorer.

### 2.5 **Statistisk analyse**

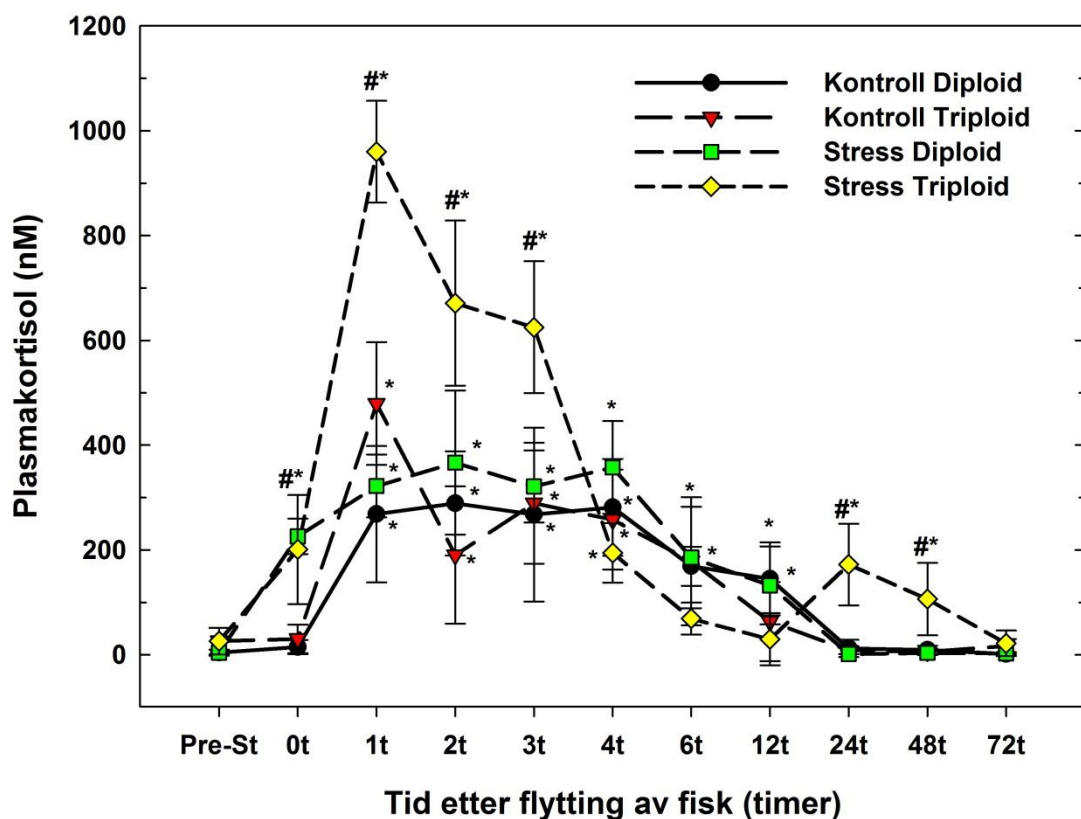
Statistisk analyse ble gjort ved hjelp av statistikk programmet SPSS (ver. 18.00) og SYSTAT (ver 13.00.05) for Windows. All data ble testet for normalitet og homogenitet ved hjelp av henholdsvis Komogorov-Smirnov test og Levene's test. Hvis nødvendig ble data logtransformert for å møte disse antagelsene. Endring i et parameter fra pre-stress til et annet tidspunkt etter flytting og applisert stressor innen en forsøksgruppe, og fra en forsøksgruppe til en annen ved et gitt tidspunkt ble testet ved analyse av varians (ANOVA). Hvis F-verdiene var signifikante ble en Bonferroni post hoc test kjørt for å bestemme om det var forskjeller mellom gruppene og tidspunktene. Signifikant forskjell ble bestemt på 0.05 nivå. Alle resultater er uttrykt i gjennomsnitt med standard avvik ( $\bar{n} \pm SD$ ). Signifikante forskjeller mellom gruppene ved et gitt tidspunkt ble indikert med # i figurene, og tilsvarende ble signifikante forskjeller i figurene innen en gruppe ved ulike prøvetakingstidspunkt sammenliknet med pre-stress indikert med \*.

For å studere en mulig sammenheng mellom den primære stressresponsen (plasmakortisol) og de sekundære stressresponsene laktat, glukose, osmolalitet, plasmaklorid og plasmamagnesium ble det gjennomførte en Pearson korrelasjonstest ved de ulike forsøksgruppene.

### 3 RESULTATER

#### 3.1 Primær stressrespons

##### 3.1.1 Plasmakortisol



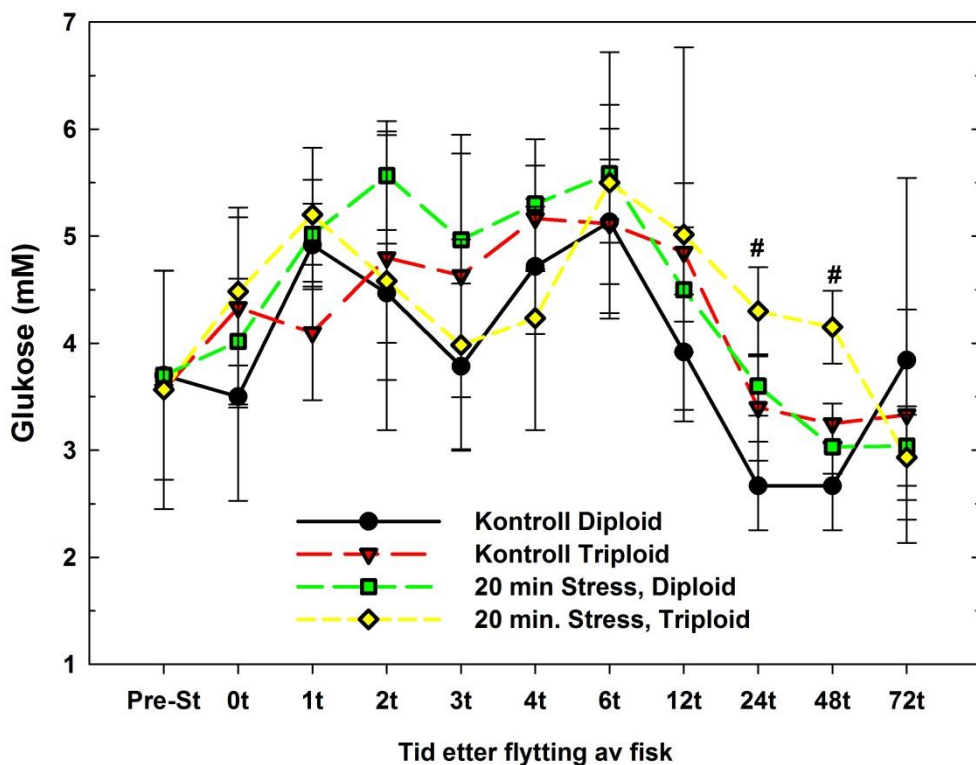
**Figur 7.** Gjennomsnittlige verdier av plasmakortisol ( $\bar{n} \pm SD$ ) før og etter flytting av fisk (kontroll diploid og kontroll triploid) og etter 20 minutter trening (stress diploid og stress triploid) laksesmolt ( $n=6$ ). \* Indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene ved et gitt prøvetakingstidspunkt

Figur 7 viser gjennomsnittlige verdier av kortisol i blodplasma før og etter flytting, og etter 20 minutter påført stress (trening). De gjennomsnittlige verdiene av plasmakortisol før forsøksstart (pre-stress) varierte fra  $4.1 \pm 5.9$  nM (diploid), og  $26.2 \pm 25.2$  nM (triploid). Høyeste og laveste målte gjennomsnittsverdi av plasmakortisol for forsøksgruppene kontroll

diploid og stress diploid var henholdsvis  $1.7 \pm 0.0$  (72 timer etter flytting) og  $289.0 \pm 99.5$  nM (2 timer etter stress og flytting), og  $1.7 \pm 0.0$  (24 timer etter stress og flytting). For forsøksgruppene kontroll triploid og stress triploid varierte gjennomsnittsnivåene av plasmakortisol fra henholdsvis  $5.9 \pm 6.4$  nM (48 timer etter flytting), og  $479.4 \pm 117.2$  nM (1 time etter flytting); og  $1.5 \pm 0.9$  nM (72 timer etter stress og flytting), og  $960,0 \pm 97.1$  nM (1 time etter stress og flytting). Plasmakortisol var signifikant høyere i alle gruppene sammenliknet med pre-stress (pre-St), henholdsvis 1, 2, 3 og 4 timer, samt 0, 24 og 48 timer etter flytting for stress triploid, samt 6 og 12 timer etter flytting for kontroll diploid og stress diploid. Stress triploid var signifikant høyere enn kontroll diploid, kontroll triploid og stress diploid 1,2, 3, 24 og 48 timer etter flytting av fisk.

### 3.2 Sekundære stressresponser

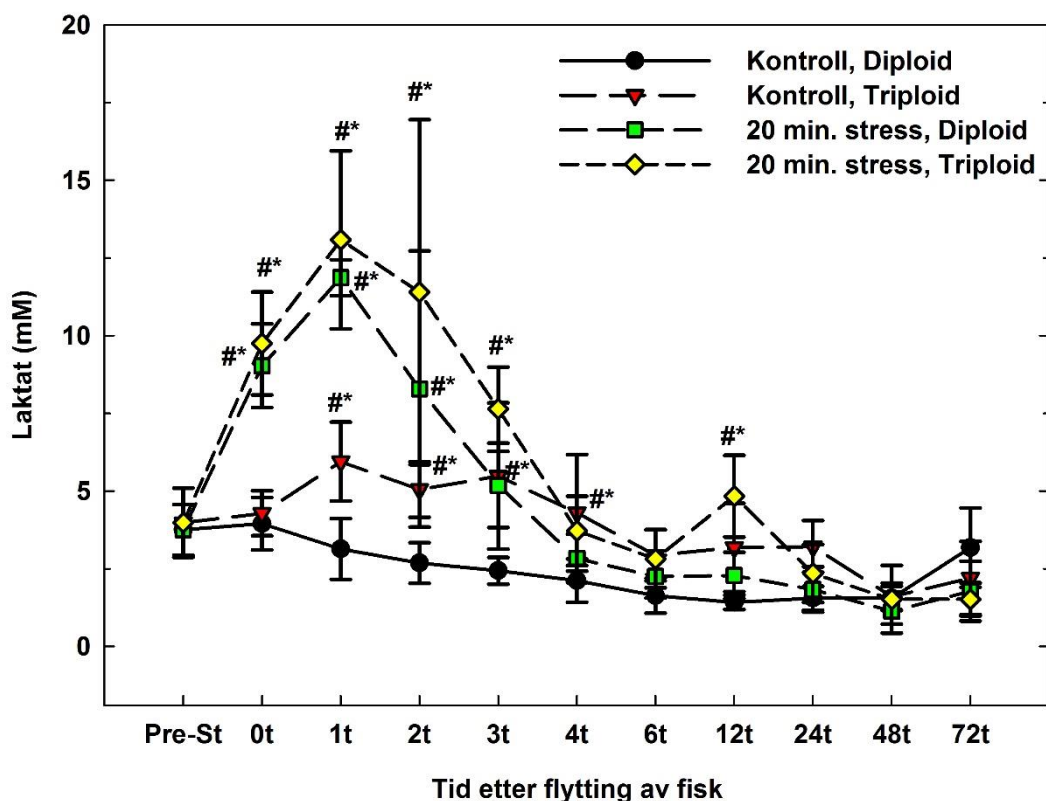
#### 3.2.1 Glukose



**Figur 8.** Gjennomsnittlige verdier av plasmaglukose ( $\bar{n} \pm SD$ ) før og etter flytting (kontroll diploid og kontroll triploid) og etter 20 minutter trening (stress diploid og stress triploid) laksesmolt ( $n=6$ ). # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene ved et gitt prøvetakingstidspunkt.

Figur 8 viser de gjennomsnittlige verdiene av glukose i blodplasma før og etter flytting, og etter 20 minutter trenging. Gjennomsnittsverdiene for plasmaglukose før forsøksstart (pre-stress) varierte fra  $3,7 \pm 1,0$  mM (diploid), og  $3,6 \pm 1,1$  mM (triploid). Høyeste og laveste målte gjennomsnittsverdi av plasmaglukose for forsøksgruppene kontroll diploid og stress diploid var henholdsvis  $5,1 \pm 0,6$  mM (6 timer etter flytting) og  $2,7 \pm 0,41$  mM (2 timer flytting); og  $5,6 \pm 0,6$  mM (6 timer etter stress og flytting) og  $3,0 \pm 0,4$  mM (72 timer etter stress og flytting). Tilsvarende varierte de gjennomsnittlige nivåene av plasmaglukose i forsøksgruppene kontroll triploid og stress triploid fra henholdsvis  $5,1 \pm 0,5$  mM (4 timer etter flytting) og  $3,3 \pm 0,2$  mM (48 timer etter flytting); og  $5,5 \pm 1,2$  mM (6 timer etter stress og flytting) og  $2,9 \pm 0,4$  mM (72 timer etter stress og flytting). Triploid stress var signifikant høyere enn de andre forsøksgruppene 24 og 48 timer etter flytting av fisk (Figur 8).

### 3.2.2 Laktat



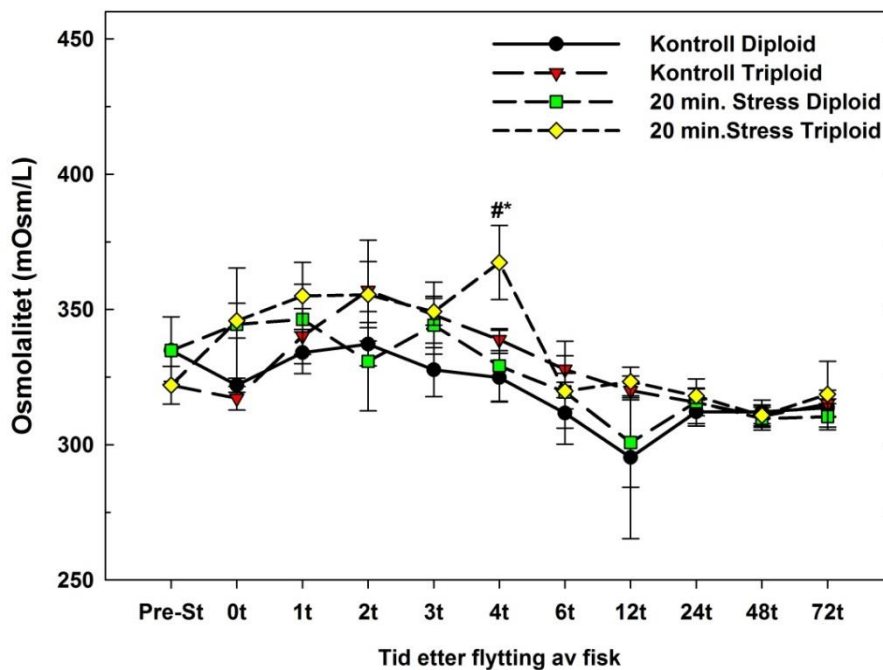
**Figur 9.** Gjennomsnittlige verdier av plasmalaktat ( $\bar{n} \pm SD$ ) før og etter flytting (kontroll diploid og kontroll triploid) og etter 20 minutter trenging (stress diploid og stress triploid) laksesmolt ( $n=6$ ). \* Indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene ved et gitt prøvetakingstidspunkt.



Figur 9 viser de gjennomsnittlige verdiene av laktat i blodplasma før og etter flytting av fisk (kontroll diploid og kontroll triploid), og etter 20 minutter trenging (stress diploid og stress triploid). Gjennomsnittsverdiene for plasmalaktat før forsøksstart (pre-stress) varierte fra  $3,8 \pm 0,8$  mM (diploid), og fra  $4,0 \pm 1,1$  mM (triploid). Høyeste og laveste målte gjennomsnittsverdi av plasmalaktat for forsøksgruppene kontroll diploid og stress diploid var henholdsvis  $4,0 \pm 0,9$  mM (0 timer etter flytting) og  $1,6 \pm 0,4$  mM (48 timer etter flytting); og  $11,9 \pm 0,6$  mM (1 time etter stress og flytting), og  $1,1 \pm 0,4$  mM (48 timer etter stress og flytting). Tilsvarende varierte de gjennomsnittlige nivåene av plasmalaktat i forsøksgruppene kontroll triploid og stress triploid fra henholdsvis  $6,0 \pm 1,3$  mM (1 time etter flytting) og  $1,6 \pm 1,1$  mM (48 timer etter flytting); og  $13,9 \pm 4,6$  mM (1 time etter stress og flytting) og  $1,5 \pm 19,60$  mM (48 timer etter stress og flytting). I forsøksgruppene kontroll triploid, stress triploid og stress diploid var plasmalaktat signifikant høyere enn pre-stress, henholdsvis 1, 2, 3 og 4 timer etter flytting, 0; 1, 2, 3 og 12 timer etter flytting, og 0, 1, 2, og 3 timer etter flytting.

Det var en signifikant forskjell mellom forsøksgruppene kontroll triploid, stress triploid og stress diploid, henholdsvis 1, 2, 3 og 4 timer etter flytting; 0, 1, 2, 3 og 12 timer etter flytting, og 0, 1 og 2 timer etter flytting.

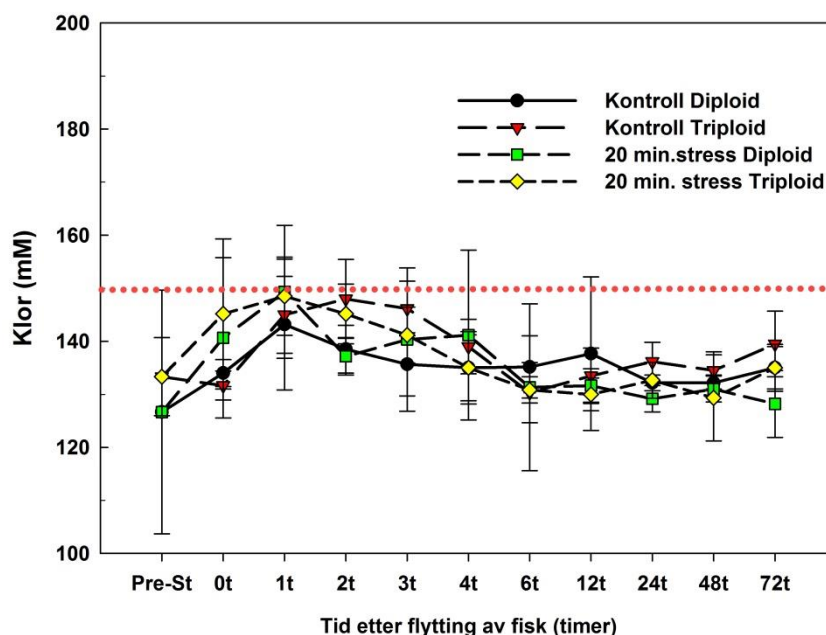
### 3.2.3 Plasmaosmolalitet



**Figur 10.** Gjennomsnittlige verdier av plasmaosmolalitet ( $\bar{n} \pm SD$ ) før og etter flytting (kontroll diploid og kontroll triploid), og etter 20 minutter trenging (stress diploid og stress triploid) laksesmolt ( $n=6$ ). \* Indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene ved et gitt prøvetakingstidspunkt.

Figur 10 viser de gjennomsnittlige verdiene av osmolalitet (mOsm/L) i blodplasma før og etter flytting av fisk (kontroll diploid og kontroll triploid), og etter 20 minutter trenging (stress diploid og stress triploid). Gjennomsnittsverdiene for plasmaosmolalitet før forsøksstart (pre-stress) varierte henholdsvis  $335 \pm 12,5$  mOsm/L (diploid), og  $322 \pm 7,0$  mOsm/L (triploid). Høyeste og laveste målte gjennomsnittsnivå av plasmaosmolalitet for forsøksgruppene kontroll diploid og stress diploid var henholdsvis  $337 \pm 8,0$  mOsm/L (2 timer etter flytting) og  $295 \pm 30,0$  mOsm/L (12 timer etter flytting); og  $344 \pm 10,7$  mOsm/L (3 timer etter stress og flytting), og  $300 \pm 5,1$  mOsm/L (12 timer etter stress og flytting). Tilsvarende varierte de gjennomsnittlige nivåene av plasmalaktat i forsøksgruppene kontroll triploid og stress triploid fra henholdsvis  $357 \pm 18,6$  mOsm/L (2 timer etter flytting) og  $317 \pm 4,1$  mOsm/L (0 timer etter flytting); og  $367 \pm 13,7$  mOsm/L (4 timer etter stress og flytting) og  $311 \pm 3,9$  mOsm/L (48 timer etter stress og flytting). Stress triploid var signifikant høyere enn både pre-stress og de andre gruppene 4 timer etter flytting av fisk.

### 3.2.4 Plasmaklorid

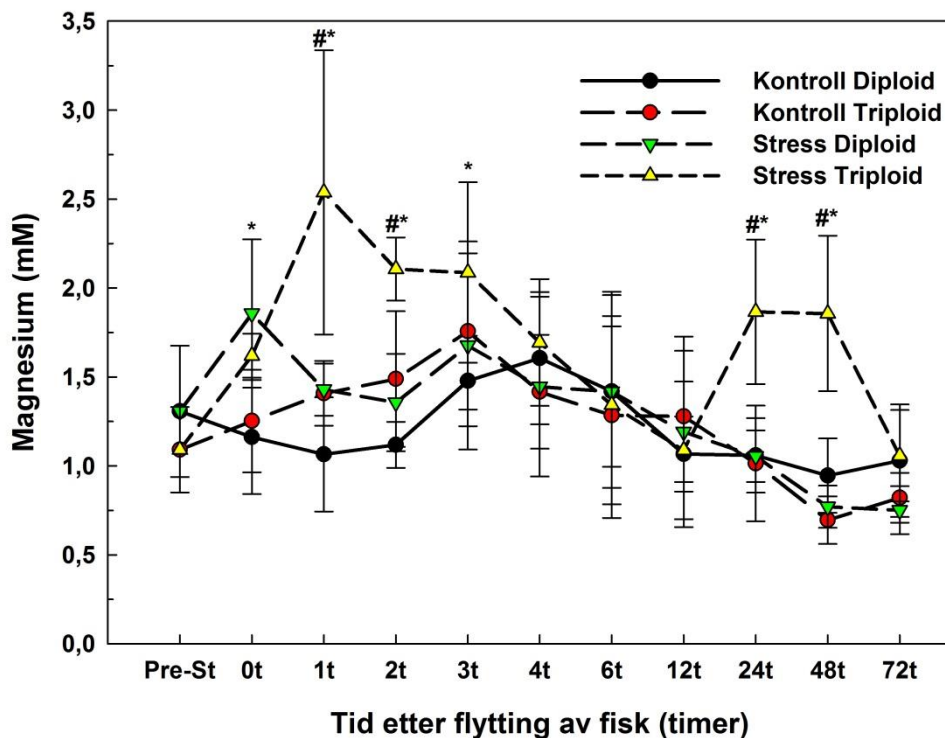


**Figur 11.** Gjennomsnittlige verdier av plasmaklorid ( $\bar{n} \pm SD$ ) før og etter flytting (kontroll diploid og kontroll triploid), og etter 20 minutter trenging (stress diploid og stress triploid) laksesmolt ( $n=6$ ). Den prikkete linjen markerer 150 mM.

Figur 11 viser de gjennomsnittlige verdiene av klor i blodplasma før og etter flytting, og etter 20 minutter trenging. Gjennomsnittsverdiene for plasmaklorid før forsøksstart (pre-stress) varierte henholdsvis  $127 \pm 23,0$  mM (diploid), og  $133 \pm 7,4$  mM (triploid). Høyeste og

laveste målte gjennomsnittsverdi av plasmaklorid for forsøksgruppene kontroll diploid og stress diploid var henholdsvis  $143 \pm 12,3$  mM (1 time etter flytting), og  $132 \pm 1,5$  mM (1 time etter flytting); og  $149 \pm 12,5$  mM (1 time etter stress og flytting), og  $128 \pm 6,3$  mM (72 timer etter stress og flytting). Tilsvarende varierte de gjennomsnittlige nivåene av plasmaklorid i forsøksgruppene kontroll triploid og stress triploid fra henholdsvis  $148 \pm 4,5$  mM (3 timer etter flytting) og  $130 \pm 5,7$  mM (6 timer etter flytting); og  $149 \pm 7,4$  mM (1 time etter stress og flytting) og  $129 \pm 8,1$  mM (48 timer etter stress og flytting). Det var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene ved noen prøvetakingstidspunkt.

### 3.2.5 Plasmamagnesium



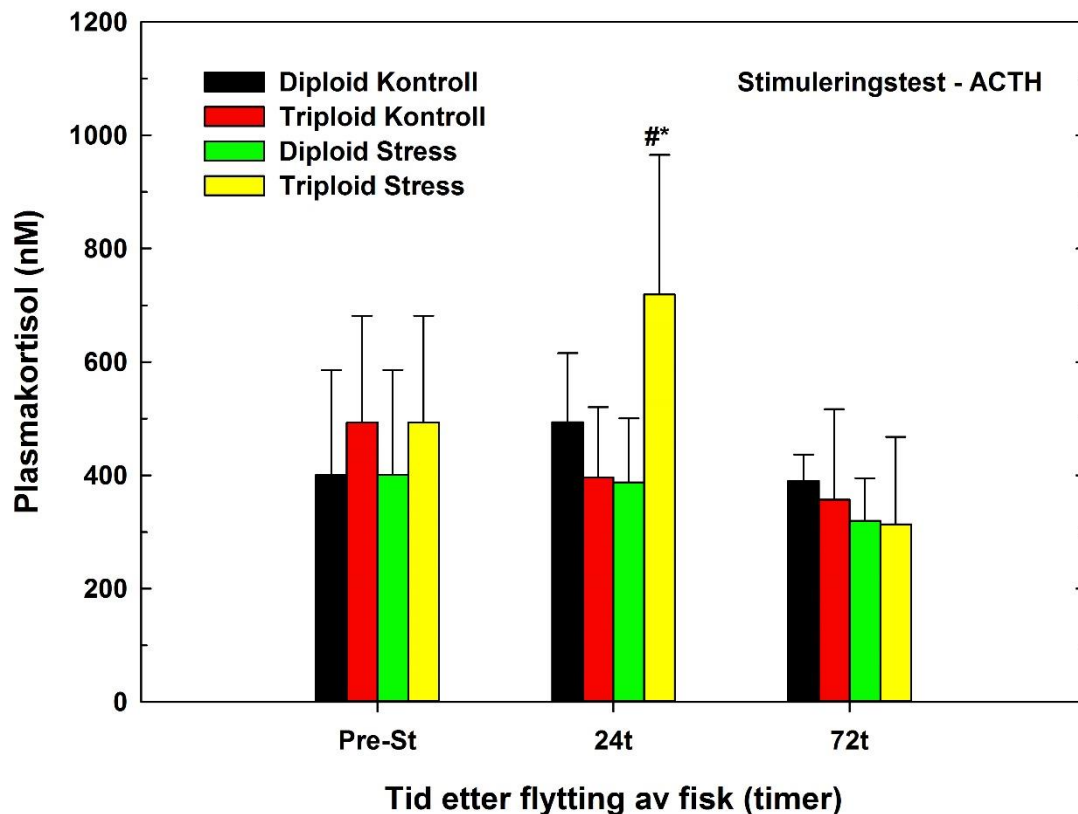
**Figur 12.** Gjennomsnittlige verdier av plasmamagnesium ( $\bar{n} \pm SD$ ) før og etter flytting (kontroll diploid og kontroll triploid), og etter 20 minutter trening (stress diploid og stress triploid) laksesmolt ( $n=6$ ). \* Indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene ved et gitt prøvetakingstidspunkt.

Figur 12 viser de gjennomsnittlige verdiene av magnesium i blodplasma før og etter flytting, og etter 20 minutter trening. Gjennomsnittsverdiene for plasmamagnesium før forsøksstart (pre-stress) varierte henholdsvis  $1.3 \pm 0,4$  mM (diploid), og  $1,1 \pm 0,2$  mM (triploid). Høyeste og laveste målte gjennomsnittsnivå av plasmamagnesium for forsøksgruppene kontroll diploid og stress diploid var henholdsvis  $1,6 \pm 0,4$  mM (1 time etter

flytting) og  $1,0 \pm 0,3$  mM (48 timer etter flytting); og  $1,9 \pm 0,4$  mM (0 timer etter stress og flytting), og  $0,8 \pm 0,1$  mM (48 timer etter stress og flytting). Tilsvarende varierte de gjennomsnittlige nivåene av plasmamagnesium i forsøksgruppene kontroll triploid og stress triploid fra henholdsvis  $1,8 \pm 0,4$  mM (3 timer etter flytting) og  $0,7 \pm 0,1$  mM (48 timer etter flytting); og  $2,5 \pm 0,8$  mM (1 time etter stress og flytting) og  $1,9 \pm 0,4$  mM (12 timer etter stress og flytting). Stress triploid var signifikant høyere enn de andre forsøksgruppene ved 1, 2, 24 og 48 timer etter start av forsøket.

### 3.3 HPI-akseresponsen

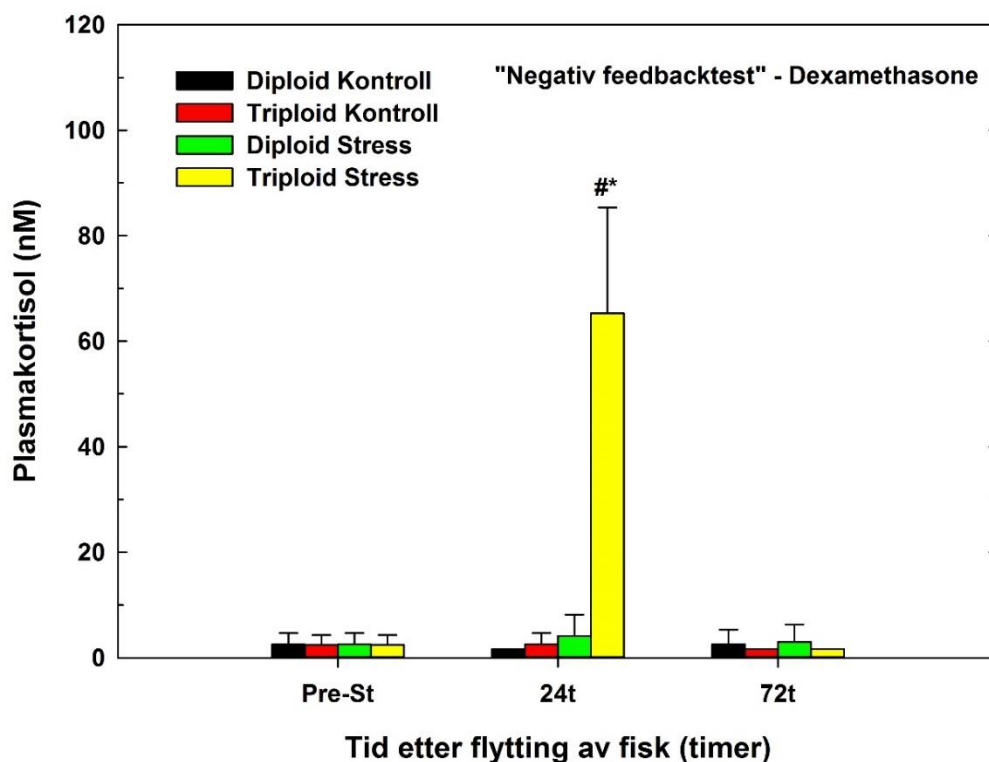
#### 3.3.1 Sensitivitetstest (ACTH)



**Figur 13.** Gjennomsnittlige verdier av plasmakortisol ( $\bar{n} \pm SD$ ) to timer etter injisering av vektjustert ACTH<sub>1-24</sub> (n=6). \* Indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene ved et gitt prøvetakingstidspunkt.

Gjennomsnittlig plasmakortisol i deksametason injisert fisk etter 2 timer etter ACTH<sub>1-24</sub> injeksjon er vist i Figur 13. Det var en signifikant øking i plasmakortisol i forhold til pre-stress 24 timer etter flytting i triploid stress gruppen, og denne økningen ble målt til  $719,0 \pm 246,3$  nM. Ved samme tidspunkt var triploid stress signifikant høyere enn resten av gruppene.

### 3.3.2 Negativ tilbakekoblingstest



**Figur 14.** Gjennomsnittlige verdier av plasmakortisol ( $\bar{n} \pm SD$ ) to timer etter injisering av vektjustert PBS ( $n=6$ ). \* Indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene ved et gitt prøvetakingstidspunkt

Gjennomsnittlig plasmakortisol i deksametason injisert fisk etter 2 timer etter PBS injeksjon er vist i Figur 14. Det var en signifikant øking i plasmakortisol i forhold til pre-stress 24 timer etter flytting i triploid stress gruppen, og denne økningen ble målt til  $65,3 \pm 20,1$  nM. Ved samme tidspunkt var triploid stress signifikant høyere enn resten av gruppene.

### 3.4 Sammenhengen mellom primære og sekundære stressresponser

#### 3.4.1 Kontroll diploid

**Tabell 2.** Pearson korrelasjonstest som viser sammenhengen mellom plasmakortisol og ulike sekundære stressrespons parameter som laktat, glukose, osmolalitet, klor og magnesium i gruppen kontroll diploid. Rød uthevet skrift indikerer positiv korrelasjon mellom plasmakortisol og gitte parameter

	Laktat	Glukose	Osmolalitet	Klor	Magnesium
<b>Korrelasjonskoeffisient ( r )</b>	0,006	<b>0,517</b>	<b>0,275</b>	0,216	0,193
<b>P verdi</b>	0,961	<b>0,000</b>	<b>0,029</b>	0,089	0,124

#### 3.4.2 Kontroll triploid

**Tabell 3.** Pearson korrelasjonstest som viser sammenhengen mellom plasmakortisol og ulike sekundære stressrespons parameter som laktat, glukose, osmolalitet, klor og magnesium i gruppen kontroll triploid. Rød uthevet skrift indikerer positiv korrelasjon mellom plasmakortisol og gitte parameter.

	Laktat	Glukose	Osmolalitet	Klor	Magnesium
<b>Korrelasjonskoeffisient ( r )</b>	<b>0,618</b>	0,0612	<b>0,549</b>	<b>0,309</b>	0,073
<b>P verdi</b>	<b>0,000</b>	0,625	<b>0,000</b>	<b>0,012</b>	0,278

#### 3.4.3 Stress diploid

**Tabell 4.** Pearson korrelasjonstest som viser sammenhengen mellom plasmakortisol og ulike sekundære stressrespons parameter som laktat, glukose, osmolalitet, klor og magnesium i gruppen stress diploid. Rød uthevet skrift indikerer positiv korrelasjon mellom plasmakortisol og gitte parameter.

	Laktat	Glukose	Osmolalitet	Klor	Magnesium
<b>Korrelasjonskoeffisient ( r )</b>	<b>0,538</b>	<b>0,642</b>	<b>0,370</b>	<b>0,358</b>	<b>0,514</b>
<b>P verdi</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,004</b>	<b>0,005</b>	<b>0,000</b>

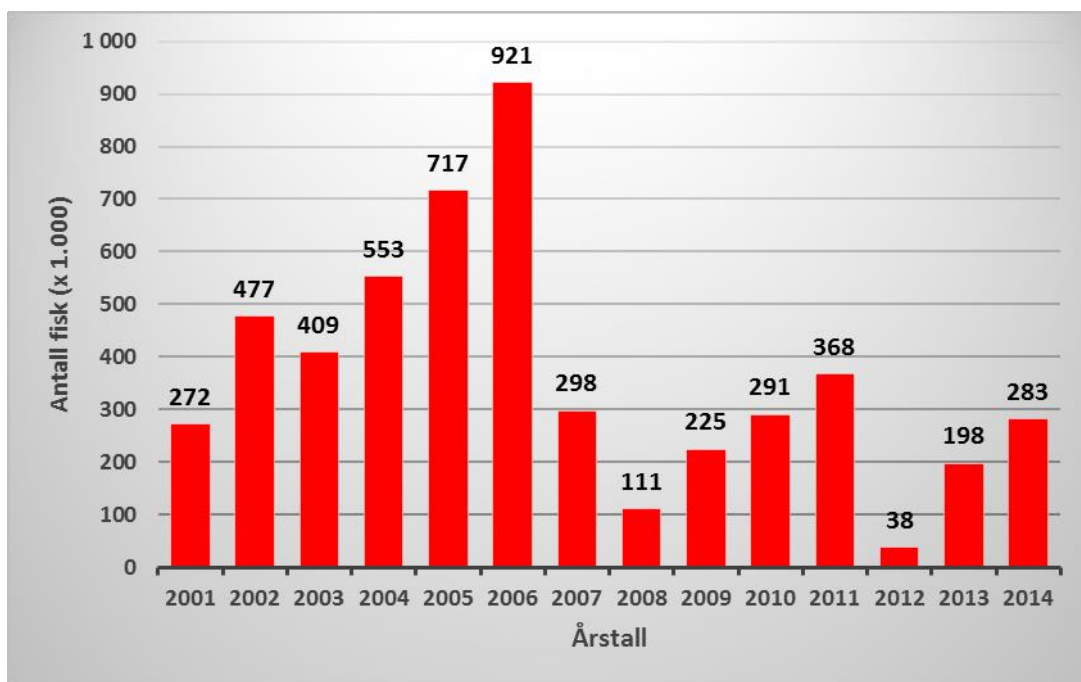
#### 3.4.4 Stress triploid

**Tabell 5.** Pearson korrelasjonstest som viser sammenhengen mellom plasmakortisol og ulike sekundære stressrespons parameter som laktat, glukose, osmolalitet, klor og magnesium i gruppen stress triploid. Rød uthevet skrift indikerer positiv korrelasjon mellom plasmakortisol og gitte parameter.

	Laktat	Glukose	Osmolalitet	Klor	Magnesium
<b>Korrelasjonskoeffisient ( r )</b>	<b>0,650</b>	0,168	<b>0,592</b>	<b>0,540</b>	<b>0,603</b>
<b>P verdi</b>	<b>0,000</b>	0,203	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>

## 4 DISKUSJON

Rømming er en av de største miljøutfordringene oppdrettsnæringa har. Rømt oppdrettslaks kan påvirke de ville bestandene på mange måter, men den største bekymringen ligger i muligheten for at den skal gyte sammen med, og permanent endre den genetiske sammensetningen i villaksstammene (Fjellidal et al., 2012). Antall rømt oppdrettslaks i Norge lå i 2001 på 272 000, i 2006 var det 921 000 tilfeller og i 2014 ligger det foreløpige tallet på 283 000 (figur 15) (FDIR, 2014). Det er flere årsaker til at laks rømmer fra anlegg på land og i sjø, men undersøkelser har vist at menneskelig svikt, teknisk svikt, feil bruk av utstyr, fartøy som lager hull i nota, samt ekstremvær er viktig bidragsfaktorer. Regelverket er nå blitt strammet inn med ulike tekniske krav til anleggene i sjø, blant annet skal anlegg i sjø dimensjoneres til å tåle ekstremvær oppimot orkanstyrke som kan forventes en gang i løpet av en 50 årsperiode (FDIR, 2014).



**Figur 15.** Antall laks, regnbueørret og marine fiskearter som oppdretter har rapportert som rømt fra norske akvakulturanlegg i perioden fra 2001 til 30.11.2014 (FDIR, 2014)

Selv med disse ekstra tiltakene rømmer det fortsatt fisk fra merdene, og man har igangsatt produksjonen av triploid laks med den hensikt for å redusere den genetiske trusselen rømt oppdrettslaks representer for den ville norske atlantiske laksen. Triploid laks forekommer naturlig i naturen hvor hunnlaksen er steril, mens den triploide hannlaksen fortsatt kjønnsmodner. På grunn av lav fekunditet er triploid laks i naturen meget sjelden (Fjellidal et al., 2012; Fraser et al., 2012; Maxime, 2008). Triploid laks med et ekstra

kromosomsett er som sagt delvis sterile, og alet opp for å kunne forhindre potensielle genetiske interaksjoner mellom rømt oppdrettsfisk og ville bestander. Den fulle biologiske effekten av å ha et ekstra kromosomsett er ikke fullstendig kjent, men en tror at triploider er mer sensitive til sub – optimale miljøforhold (Fraser et al., 2015).

#### **4.1 Stress og allostasis hos fisk**

Som tidligere nevnt anses stress hos fisk for å være en tilstand hvor homeostasen trues eller forstyrres på grunn av en eller flere indre og/eller ytre stimuli, definert som stressorer (Schreck, 2010; Selye, 1950; 1973; Wendelaar Bonga, 1997). Konseptet allostase ble introdusert for å støtte opp konseptet stress, og mer presist et forsøk på å forklare hvilke roller de primære budbringerne (for eksempel: glukokosteroider) har under en respons til en stressor. Allostase tillater fisk å tilpasse sitt fysiologiske system i møte med forutsatte og uforutsatte miljøendringer. Allostatisk tilstand refererer til tilstander hvor aktiviteten til de primære mediatorene er endrede og vedvarende. En organisme kan tolerere og tilpasse seg stressorer, men har sine begrensninger. En gjentatt allostatisk tilstand kan føre til en allostatisk overbelastning, som enten kan være adaptiv (overbelastning type 1) eller maladaptiv (overbelastning type 2), (Iversen & Eliassen, 2014; McEwen & Wingfield, 2003).

Schreck (2010) mente at konseptet allostase også er relevant hos fisk. Flere undersøkelser som omhandler fisk og stress har inkorporert begrepet allostase i deres studier (Anderson et al., 2011; Iversen & Eliassen, 2014; Leong et al., 2009; Prunet et al., 2012; Schreck, 2010). Hypothalamus – hypofyse - interrenal (HPI) – aksene hos fisk aktiveres i respons til stress. Aksene starter med produksjon og utslipp av kortikoliberin (CRH/CRF), fra forskjellige nukleuser i hypothalamus, som stimulerer til utskillelse av adrenokortikotrop hormon (ACTH) (Backstrøm et al., 2011; Flik et al., 2006). Sirkulerende ACTH vil binde seg til Melanocortin 2 reseptor (MC2R) i de interrenale cellene i hodenyren. Bindingen av ACTH og MC2R aktiverer en cAMP – sekundær signaliserende kaskade, som resulterer i syntese av «stresshormonet» kortisol (Backstrøm et al., 2011; Flik et al., 2006). Graden av stress, eller den allostatiske ladningen, er avhengig av intensiteten og varigheten til en type stressor. Kronisk stress gir langvarige, moderate endringer av stresshormon i blodplasma, mens akutt stress er vist å gi en kortvarig respons med mer markante hormonelle endringer (Backstrøm et al., 2011; Flik et al., 2006). En økning av dette hormonet kortisol, refererer til en primær stressrespons hos fisk (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997). Pre-stress nivåene før oppstart av forsøket lå innenfor hva man betegner som normale hvilenivå for



plasmakortisol hos postsmolt laksefisk (Carey & McCormick, 1998; Iversen et al., 2009). Hos smoltifiserende laksefisk kan plasmakortisolnivåene være fra oppimot 55 til 165 nM, avhengig av lakseart (Carey & McCormick, 1998). Alle forsøksgruppene i dette forsøket hadde en forhøyet konsentrasjon av plasmakortisol etter påført stressor, noe som indikerer at en allostatisk belastning på HPI – aksene, både hos diploid og triploid laksesmolt, fører til en primær stressrespons. I og med at stressrespons hos fisk er naturlig, er stressresponsen adaptiv. Dette betyr at fisken er i stand til å hente seg inn igjen etter en stressor, og opprettholder homeostasen. En adaptiv stressrespons er ikke skadelig men øker individets mulighet for å overleve (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 2011; Wendelaar Bonga, 1997). Strekkes stressresponsen ut over lengre tid og utenfor de normale grensene kan stressresponsen være maladaptiv, og effekten kan dermed være skadelig for fisken, (Pickering & Pottinger, 1989). I dette forsøket synes henholdsvis begge gruppene av diploid og kontroll triploid laks å håndtere en akutt allostatisk belastning som en adaptiv respons (allostatisk overbelastning type 1), da de økte verdiene av plasmakortisol hadde en rask nedgang og var tilbake på pre-stress nivåer innen 24 timer. I tillegg kunne en ikke se noen endringer i hverken sensitiviteten eller i tilbakekoblingsmekanismene, noe som kan indikere at HPI - aksene hos diploid laks ikke ble påvirket av stressbelastningen. En time etter påført stressor synes plasmakortisol i alle grupper og nå en topp. Nivåene av plasmakortisol og hastigheten på responsen (med unntak av stress triploid) synes å være sammenliknbar med andre undersøkelser. I et forsøk med «walleye» nådde man en kortisoltopp ca. 1 time etter 30 sekunders tørrlegging (Barton et al., 2003; Barton & Zitzow, 1995), og tilsvarende har lasting av atlantisk laksesmolt vist likende resultat både i tid og nivå (Iversen & Eliassen, 2009; Iversen et al., 2005b; Sandodden et al., 2001). Tidligere studier har også vist at selv fanging og håndtering var de mest potente stressorene i sortering- eller transportfasen av laksesmolt (Arnekleiv et al., 2004; Carey & McCormick, 1998; Dyer et al., 2004; Finstad et al., 2003; Geslin & Auperin, 2004; Iversen et al., 2005b; Iversen et al., 1998; Iversen & Eliassen, 2014; Mazur & Iwama, 1993; Mesa, 1994). Det var derimot en gruppe som skilte seg ut i dette forsøket, og det var stress triploid. Plasmakortisolverdiene i denne gruppen var signifikant høyere enn de andre gruppene 0, 1, 2, 3, 24 og 48 timer etter flytting. Det synes at evnen til å håndtere en akutt allostatisk belastning ble redusert hos triploid laksesmolt, da triploid stress gruppen ikke returnert til pre-stress-nivåer før etter 72 timer etter flytting og påført stressor. Den «spontane» økningen i plasmakortisol etter 24 og 48 timer kan skyldes ukontrollerte forstyrrelser i omgivelsene. Dette imidlertid lite sannsynlig da forsøket foregikk i et område med trafikkforbud, og karene var isolert fra hverandre så lenge forsøket pågikk.

Triploid stress gruppen synes å komme inn i grenseland mellom allostatisk overbelastning type 1 (akutt) og type 2 (kronisk). Det er finnes forskning som viser at kronisk stress kan assosieres med plasmakortisol hos fisk så lavt som 27.5 nM, mens den hos ustresset fisk normalt er under 13.8 nM kortisol. Iversen og Eliassen (2010) viste tilsvarende at laksesmolt i settefiskanlegg som gjennom produksjonen hadde en gjennomsnittlig plasmakortisolnivå over 50 nM gav 3.1 større sjanse for å få en dødelighet over 5 %, og 4.9 ganger større sjanse for å utvikle en sykdomsdiagnose etter utsett i sjø. Nivåene av den «spontane» økningen hos stress triploid gruppen ligger godt over disse anbefalte nivåene, og det synes at triploid stress gruppen midlertidig var i en allostatisk overbelastning type 2 tilstand (kronisk), men innhenter seg og ender i en allostatisk overbelastning type 1 tilstand (akutt).

#### **4.2 Modifisering av HPI-akseresponsen**

Som et resultat av kronisk stress er det blitt dokumentert endringer i aktiviteten til HPA-aksen (analog til HPI -aksen hos fisk) til pattedyr som vekttap; hypotrofisk tymus; spredning av kortikotrofe celler i hypofysen (en trofisk effekt av CRH); hemmende syntese av ACTH (av kortisol); redusert tilbakekoblingseffekt av GR agonister på utskillelse av ACTH; økt størrelse på den adrenale kjertelen, samt økt sensitivitet til ACTH. Denne nullstillingen av HPA –aksen til forhøyet aktivitet er beskrevet av Selye (1973) som stadiet av motstand, også kjent som allostase (Mormede et al., 2007). For å kunne påvise disse endringene beskrevet ovenfor, kan en bruke ulike metoder som stimulerings- og deksametason (DEX) tilbakekoblingstester. Stimuleringstester utføres som regel ved bruk av en vektjustert injeksjon av syntetisk ACTH. Det er også mulig å injisere CRH, men det er mer sjeldent enn bruken av ACTH. Disse testene måler sensitiviteten til hypofysen og de interrenale cellene. En kan også bruke deksametason tilbakekoblingstest, hvor det blir injisert en vektjustert dose av deksametason, som er et syntetisk steroid med en glukokortikoid aktivitet (Mormede et al., 2007). Gruppene kontroll diploid og triploid samt stress diploid viste ingen endring i responsen til HPI-aksen når man sammenlikner med pre-stress. Stress triploid gruppen derimot viste en oversensitivitet til ACTH og en redusert fungerende tilbakekoblingsmekanisme 24 timer etter flytting og påført stressor. Denne endrete responsen til HPI-aksen til stress triploid gruppen kan forklare den forsinkede økningen i plasmakortisol en observerte 24 og 48 timer etter start av forsøket.

Få studier på ACTH sensitivitet har blitt gjort på fisk. Men Pottinger og Carrick (2001) viste at to stammer av regnbueørret valgt utfra kriteriene for høy (HR) og lav (LR) stressrespons hadde forskjellig plasmakortisolrespons på vektjusterte ACTH dose. Der LR

belastningen hadde betydelig lavere produksjon av plasmakortisol i forhold til HR belastning. Tilsvarende viste Iversen og Eliassen (2014) at en daglig påført stressor (sammentrengingsstressor) gav permanente negative endringer i responsen til HPI-aksen med oversensitivitet til ACTH, og ikke fungerende tilbakekoblingsmekanisme. I pattedyr har en injeksjon av ACTH gitt økt ACTH sensitivitet i dyr alet opp i dårlig betingelser eller utsatt for gjentatte belastninger. For eksempel er dette blitt observert hos kalver tvunget til langvarig opphold i små rom og manglende sosial kontakt (Friend et al., 1985), gjentatt omgruppering av kyr (Veissier et al., 2001), voksne griser med begrenset plass (Meunier-Salaun et al., 1987) og fastbundne purker (Janssens et al., 1994).

Deksametason tilbakekoblingstesten ble i utgangspunktet laget for å kunne oppdage endringer i HPA-aksen til mennesker med dype depresjoner (Banki et al., 1986; Kumar et al., 2008; Wilens et al., 1984). Deksametason injeksjon hos mennesker har vist å redusere økningen av kortisol om morgningen, og denne reduserende effekten er større hos friske mennesker sammenlignet med mennesker med alvorlige depresjoner (Kumar et al., 2008). Dyr utsatt for kronisk stress viser å respondere til deksametason på samme måte som hos deprimerte mennesker (Mormede et al., 2007). Denne responsen er også observert i forsøk utført av Iversen og Eliassen (2014), som påførte fisken kronisk stress med en daglig stressor i 4 uker. I dette forsøket ble ikke fisken utsatt for kronisk stress, men en akutt stressor. Resultatene indikerer at triploid laksesmolt utsatt for en akutt allostatisk belastning resulterer i en allostatisk overbelastning i grenseland av type 1 og type 2 respons med en oversensitivitet til ACTH, og et redusert negativt tilbakekoblingssystem. Den triploide smolten kom seg igjen ved slutten av forsøket, og ingen dødelighet ble registrert, noe som indikerer at en overbelastning type 1 er assosiert med akutte stressorer med midlertidige endringer i sensitiviteten til HPI-aksen. Tilsvarende observasjoner ble sett hos laksesmolt som ble revaksinert og deretter stresset daglig i fire uker (vaksine+stress), mens en gruppe laksesmolt som ble stresset i fire uker og deretter revaksinert (stress+vaksine) forble oversensitiv til ACTH, hadde et ikke fungerende tilbakekoblingsmekanisme og høy dødelighet (Iversen & Eliassen, 2014). Resultatene fra denne undersøkelsen tydet på at fisk som kom inn i en allostatisk overbelastning type 2 (stress + vaksine) var oversensitiv til ACTH, hadde et redusert effektivt negativ tilbakekoblingssystem og forhøyet hvilenivå av plasmakortisol med alvorlige effekter på dyrevelferden. Vaksine + stress gruppen syntes å representere en allostatisk overbelastning type 1 med midlertidig oversensitivitet til ACTH og forbigående redusert effektiv tilbakekoblingssystem tilsvarende stress triploid gruppen i dette forsøket.

### 4.3 Plasmakortisol og sekundære stressresponser

Økte konsentrasjoner av katekolaminer (adrenalin og noradrenalin) og kortikosteroider (kortisol) i blodplasma, refereres ofte til den primære stressresponsen (Selye, 1950; 1973). Resultatet av en primær stressrespons kan føre til sekundære stressresponser. Sekundære stressresponser påvirker celler og organer, og inkluderer metabolske, cellulære, osmoregulatoriske og hematologiske endringer, samt forandringer i immunfunksjonen. Disse endringene er relatert til fysiologiske tilpasninger i forbindelse med selve stressresponsen (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997).

#### 4.3.1 *Plasmaglukose og – laktat*

I tillegg til økte konsentrasjoner av kortisol, fører stress også til økte konsentrasjoner av plasmaglukose og laktat. En økning i plasmaglukose i forbindelse med stress genereres først via en katekolamin - mediert glykolyse, og ved senere stadier via en kortisol mediert glukoneogenese (Pankhurst, 2011). Plasmaglukose er den mest brukte indikatoren på sekundære stressresponser (Mommsen et al., 1999). En fysiologisk stressrespons er energikrevende (Barton, 2002), og med begrensende tilgang til ressurser vil dette gå på bekostning av andre energikrevende prosesser, noe som vil føre til «livshistorie trade-off» (Cook et al., 2012). Det er enda ikke kjent hvilke rolle kortisol har innen regulering av energikrevende prosesser, men studier viser at kortisol øker forbreningen i leveren, ved glukoneogenese og dermed øker utskillelsen av glukose. Denne metabolske prosessen er en sentral del av gjenopprettingsprosessen (homeostase) av stress, i og med at glukose er det foretrukne drivstoff, spesielt for gjeller og hjerne, i møte med energikravene som trengs under en stressrespons (Aluru & Vijayan, 2007; Iversen & Eliassen, 2014; Mommsen et al., 1999). Plasmaglukoseverdiene var veldig variable i alle forsøksgruppene, og en kunne ikke se noen konsekvente endringer i plasmaglukose som følge av en primær stressrespons hos laksesmolten i dette forsøket. Det ble kun påvist sammenheng mellom plasmakortisol og glukose hos diploid kontroll og diploid stress gruppene. Denne tilsynelatende tilfeldige effekten av plasmakortisol på plasmaglukose er observert i flere andre studier, hvor det både er registrert økte og reduserte verdier av glukose som følge av kortisol (Cook et al., 2012; Iversen & Eliassen, 2014; Iversen et al., 2013; Mommsen et al., 1999). Dette kan skyldes den metabolske statusen til fisken før forsøksstart. Fisk sultet eller ei kan resultere i endret mageinnhold og blodsukkerkonsentrasjon. På samme måte har sulting vist å kunne påvirke glukoserespons, samt øke leverens følsomhet for adrenergiske stimuleringer (Barton, 2002). I

dette forsøket ble ikke fisken sultet før forsøksstart. En pearson korrelasjonstest viser sammenhengen mellom primære og sekundære stressresponser, og viser i dette forsøket at det er positiv korrelasjon mellom plasma kortisol og glukose hos diploid laksesmolt, men ikke hos den triploide laksesmolten (se Tabell 1, 2, 3, og 4, s.38). Ut ifra denne testen kan det se ut for at en akutt allostatisk belastning fører til sekundære stressresponser i diploid laksesmolt, men ikke hos triploid laksesmolt. Det er mulig at dette er kun en tilfeldig sammenheng, men man kan ikke se bort ifra at dette er en effekt av triploidisering som har gitt et mulig avvikende utslag i det fysiologiske uttrykket i forbindelse med stressresponsen. Men det må understrekes at det å prøve å korrelere plasmaglukose til kun plasmakortisol kan være vanskelig, spesielt uten og helt sikkert vite hvordan dyret opplever stresset gjennom eksperimentet. En allostatisk overbelastning type 1 (akutt) og en allostatisk overbelastning type 2 (kronisk) kan begge gi ulike utfall av plasmaglukose, alt etter varighet og omfang (Iversen & Eliassen, 2014). En kan heller ikke utelukke at glukose ikke er en pålitelig indikator på sekundære stressresponser. I fisk er plasmaglukose veldig variabel og ikke like godt regulert som i pattedyr, og for karnivore arter, som atlantehavslaksen, kan det hende at glukose ikke i det hele tatt kan brukes som indikator på metabolsk status (Mommensen et al., 1999).

Laktat produseres fra glukose i en anaerob glykolyse (Olsen et al., 1995). En økende konsentrasjon av laktat i blodplasma, rett etter stress, er trolig på grunn av anaerob nedbryting av glukose i muskelvev (Moon & Foster, 1995), og laktaten blir muligens brukt for anaerobisk glukoneogenesis i leveren til fisk (Vijayan & Moon, 1992).

I forsøket økte laktat signifikant en time etter flytting og påført stressor, i stress diploid, stress triploid og kontroll triploid gruppene. Stressgruppene (diploid og triploid) nådde et laktat nivå på 12 til 13 mM, og dette er ikke høyt sammenliknet med nivåer som er målt (> 20 Mm) i andre undersøkelser hvor ulike fiskearter som salmonider (*Salmo sp.* og *Onchorhynchus sp.*) (Liebert & Schreck, 2006; Olsen et al., 1995; Pagnotta & Milligan, 1991; Wood et al., 1990), stripet havabbor (*Morone saxatilis*) (Cech et al., 1996), sabelfisk (*Anoplopoma fimbria*) (Davis et al., 2001), vinterflyndre (*Pseudopleuronectes americanus*) (Pagnotta & Milligan, 1991) og «lingcod» (*Ophiodon elongatus*) (Milston et al., 2006), som enten ble utsatt for tung fysisk aktivitet eller lufteksponeringer. Men de høyeste laktatnivåene registrert i denne undersøkelsen synes å være sammenliknbare med undersøkelser gjort av Nomura et al. (2009) under kommersiell transport av laksesmolt. Uavhengig av graden av nivåer av laktat bør en være forsiktig med å trekke for bombastiske konklusjoner om fisken i dette forsøket er mer eller mindre «stresset» til sammenlikning med andre undersøkelser.

Nivåene av laktat og glukose kan være et artefakt av benyttet målemetode, da en benyttet en Laktat Pro (Arkray KDK, Kyoto, Japan) og Freestyle Freedom Lite (Abbott Diabetes care Ltd, Oxon, UK). Well og Pankhurst (1999) har validert effekten av bærbare instrumenter for måling av laktat og glukose og sammenlignet de med etablerte laboratorieteknikker. De konkluderte med at bærbare instrumenter for måling av blodglukose og laktat kunne anvendes som et relativt mål for å vurdere responser til stressfaktorer, men man skulle vise varsomhet når man sammenliknet resultatene med undersøkelser som benyttet andre metoder.

En økning av glukose og laktat i blodplasma etter stress er ofte brukt som indikator på aktivering av HPI – aksene (Wendelaar Bonga, 2011; Wendelaar Bonga, 1997), men forsøket tyder at man må være forsiktig med denne konklusjonen. En økning i plasmaglukose kan være begrenset hos fiskearter med et begrenset glykogenlager i leveren, og som viser ulike økninger eller endringer i gjenvinningsfasen av den primære stressresponsen (Schreck, 2010; Segner et al., 2012). Studier på blant annet salmonider utsatt for stressorer som behandling og trening viste at nivået av kortisol kunne øke uten at laktatverdiene ble påvirket, og omvendt (Pankhurst, 2011).

#### 4.3.2 Effekten på osmoregulering

Salinitet er en av de viktigste miljøfaktorene som påvirker fisken sin overlevelse, metabolisme og distribusjon, og for at en fisk skal klare å etablere seg i et gitt habitat er den avhengig av å kunne håndtere salinitetsvariasjoner gjennom osmoregulering. Fisk har utviklet tre fundamentale strategier for reguleringen av vann- og saltbalansen i ekstracellulære væsker som blodplasma, lymfevæske og intestinalvæske. Disse strategiene omtales som osmokonform (plasmaosmolalitet lik miljøet), hyperosmotisk (plasmaosmolariteten høyere enn miljøet) og hypoosmotisk (plasmaosmolariteten lavere enn miljøet) (McCormick, 2013).

Osmolalitet angir mengden løste partikler per kilo væske og salinitet angir mengden løste salter i vann. Beinfisk holder generelt osmolaliteten i blodet på omlag 300 mOsm/L, og for å oppnå dette må vann og ioner reguleres over en rekke organer (Peruzzi et al., 2005). Som tidligere nevnt er HPI-aksene ansvarlig for flere biologiske prosesser, og hormonet kortisol regulerer mange av disse prosessene (Bernier, 2006; Bernier et al., 2009). Kortisol regulerer fysiologiske prosesser som energimetabolismen, hydro-mineralbalansen, oksygenopptaket og ulike funksjoner i immunforsvaret (Mommensen et al., 1999). Med dette vil hver endring i osmolalitet, klorid og magnesium være egenskaper som kan indikere sekundære stressresponser (Veiseth et al., 2006).

Plasmakortisol øker naturlig ved økt sjøvannstoleranse og smoltifisering hos ulike laksearter, og fungerer derfor som et adaptivt hormon i og med at kortisol har vist seg å fremme cellulær differensiering av kloridceller og stimulere  $\text{Na}^+\text{K}^+$  - ATPase i gjellene, tarm og nyrene, under smoltifisering (Björnsson et al., 2011; Björnsson et al., 2010; Mommsen et al., 1999). På samme vis er kortisol også involvert i adaptering til ferskvann (McCormick, 2013), og studier har vist at økt kortisol øker transkriberingen av  $\text{NKA}\alpha 1a$ , som trolig er involvert i opptak av ioner via kloridceller i ferskvann (Kiilerich et al., 2007; Kiilerich et al., 2011). Tilsvarende viser undersøkelser at kortisol øker overflatevolumet til kloridcellene, og økt innstrømming av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$  i et hypotont miljø, samt at kortisol også inkluderer aktivt opptak av  $\text{Na}^+$  og  $\text{Cl}^-$ . Med dette kan osmolalitet, ulike mono- og divalente-ioner brukes som indikatorer for å evaluere kapasiteten og integriteten av osmoregulatoriske organer som gjeller, tarm og nyrer, for å opprettholde hydro-mineral balanse i både ferskvann og saltvann (Mommsen et al., 1999; Takahashi & Sakamoto, 2012; Wendelaar Bonga, 2011; Wendelaar Bonga, 1997).

I dette forsøket var det ingen signifikant økning i plasmaosmolalitet i diploid (kontroll og stress) eller triploid (kontroll) gruppene under hvileperioden, etter flytting eller etter påført stressor. Triploid stress gruppen var signifikant høyere enn både pre-stress og de andre gruppene 4 timer etter flytting av fisk, og det var en positiv korrelasjon mellom plasmakortisol og plasmaosmolalitet i alle gruppene. Tilsvarende var ingen signifikante forskjeller mellom gruppene i plasmakloridverdiene under forsøket, men det var positiv korrelasjon mellom plasmakortisol og plasmaklorid i forsøksgruppene kontroll diploid, stress diploid og stress triploid. Ingen gjennomsnittlige plasmakloridverdier i postsmolten under hvileperioden etter påført flytting og tilleggsstressor ble målt over 150 mM, noe som indikerer en godt smoltifisert laks (Imslund et al., 2011; McCormick et al., 2009; McCormick & Saunders, 1987; Stefansson et al., 2009). Stress har vist seg å påvirke osmoreguleringen negativt i fisk, spesielt tydelig blir dette i anadrome og katadrome arter som flytter seg mellom fersk- og sjøvann (Aluru & Vijayan, 2009; Dyer et al., 2004; Ellis et al., 2012; Iversen et al., 2013; Liebert & Schreck, 2006; Olsen et al., 2005; Peters, 1982; van de Vis et al., 2003; Veissier & Boissy, 2007; Zellner et al., 2006). Forsøk har vist at laksesmolt som er påført en stressor taper monovalente ioner til omgivelsene i ferskvann, og opplever at tilsvarende ioner akkumuleres inn i kroppen i sjøvann (Deane & Woo, 2009; Handeland et al., 2003; Iversen & Eliassen, 2006; Iversen et al., 2005a; Iversen et al., 1998; Specker & Schreck, 1980; Wells et al., 2006). Andre studier har igjen ikke kunne påvist noen endringer i osmolaliteten (Barton & Zitzow, 1995) og kloridnivåene (Barton et al., 2005) når fisk ble

utsatt for en trengingsstressor («crowding stress»). Både osmolaliteten og klorid i dette forsøket synes å øke tidlig i hvilefasen for deretter å stabilisere seg på et nivå litt under pre-stress verdiene ved forsøkslutt (dog ikke signifikant). En mulig forklaring til dette kan være en effekt av regulatorisk volum reduksjon («regulatory volume decrease; RVD») foreslått av Trischitta et al. (2005). Fisk i hypersaline forhold (sjøvann) vil prøve å bruke intracellulære osmolytter (myoinositol, trimethylamine oksid (TMAO), glysine o.l.) som del av osmoreguleringen, da forhøyet plasmaosmolalitet kan medføre alvorlig celledempning. Disse osmolyttene vil kunne bidra til å delvis dempe effekten av stress på osmoreguleringen (Fiess et al., 2007; Trischitta et al., 2005).

Verdiene av magnesium i blodplasma varierte blant gruppene. Alle gruppene hadde en forhøyet gjennomsnittlige verdier av plasmamagnesium etter flytting, men returnerte til pre-stress nivå etter 12 (kontroll diploid) og 24 timer (kontroll triploid og stress diploid). Stress triploid derimot var signifikant høyere enn de andre gruppene 1, 2, 24 og 48 timer etter flytting, og returnerte ikke til pre-stress nivå før etter 72 timer.

I sjøvann må beinfisk drikke vann for å kompensere mot vanntapet til det osmotiske miljøet for å forhindre dehydrering. Fisken skiller ut divalente ioner som  $Mg^{2+}$  og  $SO_4^{2-}$  fra kroppsvæsken via magen og nyrene under denne prosessen. I de fleste tilfeller vil den totale konsentrasjonen av magnesium i blodplasma ikke overstige 2 mM, og den totale konsentrasjonen av ioner vil normalt ikke være under 1 mM (Bijvelds et al., 1998a; Bijvelds et al., 2001; Bijvelds et al., 1998b). I dette forsøket viser resultatene at forsøksgruppen stress triploid hadde verdier av osmolalitet over 2 mM ved 1, 2, 3, 24 og 48 timer etter flytting. Noe som kan indikere en forstyrrelse i hydromineralbalansen. Selv om det er få undersøkelser av effekter av stress på magnesiumreguleringen viste Staurnes et al. (1994) en signifikant økning i plasmamagnesium hos atlantisk torsk (*Gadus morhua*), sammenliknet med en kontrollgruppe under transport med høy tetthet. Tilsvarende har forsøk med sjøvannstilvendt sølv laks (*Oncorhynchus kisutch*) vist tilsvarende økning i plasmamagnesium under stress (Redding & Schreck, 1983), og  $Mg^{2+}$  økte tilsvarende hurtig i stripet havabbor (*Sparus aurata*) utsatt for forlenget lufteksponering (Arends et al., 1999). Under transport av laksesmolt og utsett i sjø er det blitt dokumentert ved flere anledninger kraftig økning i plasmamagnesium med etterfølgende høy dødelighet i høy stressrespons gruppene sammenliknet med lav stressrespons gruppene, mens osmolaliteten og plasmaklorid forble upåvirket av denne økte stressbelastningen (Iversen & Eliassen, 2009; Iversen et al., 2009; Iversen & Eliassen, 2014). Dette er i kontrast til undersøkelser gjort av Libert og Schreck (2006) som viste ingen effekt på kalium-, magnesium- eller kalsiumnivåene hos regnbueørret



(*Oncorhynchus mykiss*) utsatt for en trengingsstressor («crowding stressor»). En mulig forklaring på den negative effekten på plasmamagnesium av stress i dette forsøket, er at selv om økte konsentrasjoner av katekolaminer kan ha positive effekter ved å stimulere oksygenopptak via gjellene, så vil dette også gi økt permeabilitet i gjellene til vann og ioner (Arends et al 1999). Konsentrasjonen av magnesium i sjøvann er om lag 50 til 100 ganger større enn det er i blodplasma til fisk, og dermed kan en relativt liten økning i permeabilitet i gjellene under stress, forårsake stor inntrenging av magnesium (Redding & Schreck, 1983).

Det synes at plasmamagnesium er en mer presis sekundær indikator på stress sammenliknet med osmolalitet og plasmaklorid. Årsaken til dette kan være at en kombinasjon av økt inntrenging av magnesium over gjellene på grunn av adrenerge effekter (Arends et al., 1999), samt redusert utskillelse av magnesium over nyrene som er en vanlig sideeffekt av plasmakortisol under en akutt eller kronisk stressrespons hos fisk og pattedyr (Bradford et al., 1992; Iversen & Eliassen, 2014; Prunet et al., 2012; Rotllant et al., 2003a; Schreck, 2010; Sørensen et al., 2011; Wendelaar Bonga, 1997; Wingfield & Sapolsky, 2003).

#### **4.4 Dyrevelferd og triploid laksesmolt**

Det finnes en del forskning på ploiditet hos fisk, og hvordan dette påvirker velferden hos fisk med avvikende kromosomoppsetninger (Ellis et al., 2013; Fraser et al., 2012; Fraser et al., 2014c; Fraser et al., 2015; Sadler et al., 2000; Taylor et al., 2007). Triploid laks testes ut i kommersielle anlegg, men det gjenstår fremdeles noen ubesvarte spørsmål før en slik laks kan produseres med like god velferd som den vanlige diploide laksen har. En storskala produksjon av triploid laks må testes under ulike drifts – og miljøforhold. Det pågår derfor i dag flere store prosjekt for testing av fullskala produksjon av triploid laks i regi av seks norske oppdrettsselskap langs hele norskekysten. Prosjektet startet opp i 2013, hvor de første gruppene ble slaktet sent i 2014, og de siste gruppene skal slaktes i 2017 (Fraser et al., 2012; Fraser et al., 2015; Hansen & Fjellidal, 2015; Hansen et al., 2014). Praktisk oppdrett innebærer ulike stressende situasjoner for fisken, og lite informasjon medfører manglende grunnlag for å kunne avgjøre om triploid laks er mer følsom for stress enn den diploide laksen er og hvordan følsomheten for akutte situasjoner påvirkes av miljøfaktorer som temperatur og oksygennivå (Hansen & Fjellidal, 2015).

De funksjonelle konsekvensene av triploidisering av fisk er lite undersøkt i og med at det er få tilgjengelige artikler om triploiders fysiologi (Maxime, 2008). En oppegående og fungerende stressrespons er essensiell for å kunne opprettholde homeostasen under

utfordrende eller endrede oppdrettssituasjoner. Med dette kan en uregelmessig stressfysiologi muligens forklares via en inkonsistent triploid ytelse. Resultatene i denne undersøkelsen indikerer at triploid laksesmolt utsatt for en akutt allostatisk belastning resulterer i en allostatisk overbelastning i grenseland av type 1 og type 2 respons med en oversensitivitet til ACTH, og et redusert negativt tilbakekoblingssystem, med en midlertidig redusert regulatorisk evne av divalente-ioner. Det synes som den triploide laksesmolten er mer sensitiv til stress sammenliknet med den diploide fisken i dette forsøket. Tidligere studier på triploider har rapportert liten eller ingen akutt biokjemisk respons til stress (for eksempel: kortisol og glukose) (Fraser et al., 2014c; Sadler et al., 2000). Men i en nylig undersøkelse gjennomført av Fraser et al. (2015) hvor man studerte den monoaminske (dopamin og serotonin) neurokjemiske responsen i hjernen (telencephalon og hjernestammen) hos diploid og triploid lakseyngel utsatt for ulike stressorer, ble det vist en klar signifikant overproduksjon av serotonin i triploid fisk sammenliknet med diploid fisk. Tilsvarende hadde triploid lakseyngel ingen dopaminergisk aktivitet i telencephalon regionen under stress, noe den diploide lakseyngelen uttrykte tydelig fysiologisk. De konkluderte med at oppdrettet triploid laks hadde økt stressrespons og monoaminergisk dysfunksjon som kunne komprimere den triploide laks sin velferd og toleranseevne (Fraser et al., 2015).

Det antas at triploid fisk har samme velferdskrav som diploid fisk. Men da en ikke vet de optimale og ideelle miljøforhold for triploider, kan det være vanskelig å sammenlikne deres dyrevelferd. Til tross for at triploid og diploid laks er tilsynelatende like fysiologisk sett, finnes det ulikheter. Hansen et al. (2014) viser at triploid laks er noe ulik diploid laks i områdene som omhandler krav til temperatur og fôr, og viser at triploid lakseegg må inkuberes ved en lavere temperatur enn diploid laks, for å forhindre deformiteter. Diploid laks inkuberes normalt sett ved 8 °C, noe som resulterer i deformiteter hos triploide laks. Men ved å senke temperaturen til 6 °C hos triploide lakseegg under inkubering viste det seg at det forekom mindre deformiteter. Fosfor og tilgjengeligheten av dette i fôret, er en av de viktigste risikofaktorene i forhold til deformiteter i ryggsøyle og underkjeve, i og med at fosfor er et viktig beinmineral som fisken må det tilføres via fôret. Forsøk har vist til lavere grad av deformiteter hos triploider som får økt fosfor i fôret (Fraser et al., 2014a). Andre velferdsutfordringer som kan oppstå hos triploid laks er følsomheten for å utvikle katarakt og mindre toleranse for høye temperaturer. Tilførsel av histidin i fôret, har tidligere vist å redusere mengden katarakt hos vanlig laks (Fraser et al., 2012). Problemer med høye sjøvannstemperaturer om somrene kan unngås ved å prøve å unngå å sette ut fisken i områder hvor det kan være fare for høye temperaturer over lengre perioder (Fraser et al., 2012; Fraser

et al., 2014a). Dette vil kunne sette begrensinger på triploid lakseproduksjon i de sørlige områdene av Norge som Agder, Rogaland og Hordaland.

Ettersom den triploide laksen som ble utsatt for stress i dette forsøket synes å ha en redusert evne til å håndtere en akutt allostatisk belastning, kan dette indikere at den er mindre rustet og mer sensitiv for negative fysiologiske påvirkninger i forbindelse med stress i forhold til den diploide laksen. Selv om ingen negative tertiære stressresponser som redusert vekst eller økt dødelighet ble påvist i dette forsøket, kan den oversensitive triploide laksen i dette forsøket fort ende opp i en allostatisk overbelastning type 2 (kronisk stress) med etterfølgende komprimert dyrevelferd, hvis den utsettes for en kraftigere eller mer langvarig stressor. Videre studier på hvilke effekter en langvarig allostatisk belastning har på HPI-aksen og stressresponsen hos triploid og diploid laksesmolt er nødvendig for kunne gjøre seg opp en formening om hvor godt triploid laks håndterer kroniske stressbelastninger. Før dette er gjort bør triploid laks håndteres så skånsomt som mulig, med lavest mulig stressbelastning for unngå at dyrevelferden til den triploide laksen blir satt på en alvorlig prøve i kommersiell oppdrettssammenheng.

## 5 KONKLUSJON

I henhold til hypotesene i dette forsøket kan alle forkastes, ettersom det er en klar forskjell i ACTH sensitiviteten, det negativ tilbakekoblingssystemet og i stressresponsen mellom diploid og triploid laksesmolt.

Resultatene i denne undersøkelsen indikerer at triploid laksesmolt utsatt for en akutt allostatisk belastning resulterer i en allostatisk overbelastning i grenseland av type 1 og type 2 respons med en midlertidig oversensitivitet til ACTH og et redusert negativt tilbakekoblingssystem, med en midlertidig redusert regulatorisk evne av divalente ioner.

Selv om ingen negative tertiære stressresponser som redusert vekst eller økt dødelighet ble påvist i dette forsøket, kan den oversensitive triploide laksen fort ende opp i en allostatisk overbelastning type 2 (kronisk stress) med etterfølgende komprimert dyrevelferd, hvis den utsettes for en kraftigere eller mer langvarig stressor. Den triploide laksen bør derfor håndteres så skånsomt som mulig med lavest mulig stressbelastning for unngå at dyrevelferden til den ploide laksen blir satt på en alvorlig prøve i kommersiell oppdrettssammenheng.

## 6 REFERANSER

- Alsop D, Vijayan M (2009a) The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *General and Comparative Endocrinology*, **161**, 62-66.
- Alsop D, Vijayan MM (2009b) Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **153**, 49-54.
- Aluru N, Vijayan MM (2007) Hepatic transcriptome response to glucocorticoid receptor activation in rainbow trout. *Physiological Genomics*, **31**, 483-491.
- Aluru N, Vijayan MM (2009) Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. *General and Comparative Endocrinology*, **164**, 142-150.
- Anderson PA, Berzins IK, Fogarty F, Hamlin HJ, Guillette Jr LJ (2011) Sound, stress, and seahorses: The consequences of a noisy environment to animal health. *Aquaculture*, **311**, 129-138.
- AquaGen (2013) Steril laks. AquaGen AS; <http://aquagen.no/produkter/lakserogn/produktoversikt-og-dokumentasjon/steril-laks/>.
- Arends RJ, Mancera JM, Munoz JL, Wendelaar Bonga SE, Flik G (1999) The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, **163** (1), 149-157.
- Arnekleiv JV, Urke HA, Kristensen T, Halleraker JH, Flodmark LEW (2004) Recovery of wild, juvenile brown trout from stress of flow reduction, electrofishing, handling and transfer from river to an indoor simulated stream channel. *Journal of Fish Biology*, **64**, 541-552.
- Ashley PJ (2007) Fish welfare: Current issues in aquaculture. *Applied Animal Behaviour Science*, **104**, 199-235.
- Backström T, Schjolden J, Øverli Ø, Thörnqvist P-O, Winberg S (2011) Stress effects on AVT and CRF systems in two strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) divergent in stress responsiveness. *Hormones and Behavior*, **59**, 180-186.
- Baker BI, Bird DJ, Buckingham JC (1985a) Salmonid melanin-concentrating hormone inhibits corticotrophin release. *Journal of Endocrinology*, **106**, R5–R8.
- Baker BI, Eberle AN, Baumann JB, Siegrist W, Girard Jr (1985b) Effect of melanin concentrating hormone on pigment and adrenal cells in vitro. *Peptides*, **6**, 1125-1130.
- Banki CM, Arato M, Papp Z, Rihmer Z, Kovacs Z (1986) Associations among dexamethasone non-suppression and TRH-induced hormonal responses: increased specificity for melancholia. *Psychoneuroendocrinology*, **11**, 205-211.
- Barton BA (2002) Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, **42**, 517-525.
- Barton BA, Haukenes AH, Parsons BG, Reed JR (2003) Plasma cortisol and chloride stress responses in juvenile walleyes during capture, transport, and stocking procedures. *North American Journal of Aquaculture*, **65**, 210-219.
- Barton BA, Ribas L, Acerete L, Tort L (2005) Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquac. Res.*, **36**, 172-179.
- Barton BA, Zitzow RE (1995) Physiological-Responses of Juvenile Walleyes to Handling Stress with Recovery in Saline Water. *Progressive Fish-Culturist*, **57**, 267-276.
- Bernier NJ (2006) The corticotropin-releasing factor system as a mediator of the appetite-suppressing effects of stress in fish. *General and Comparative Endocrinology*, **146**, 45-55.
- Bernier NJ, Flik G, Klaren PHM (2009) Regulation and contribution of the corticotropic, melanotropic and thyrotropic axes to the stress response in fishes. In: *Fish Neuroendocrinology* (ed. by Bernier NJ, Van Der Kraak G, Farrell AP, Brauner CJ). Elsevier, London, UK., pp. 235-311.
- Bernier NJ, Peter RE (2001) The hypothalamic-pituitary-interrenal axis and the control of food intake in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **129**, 639-644.
- Bijvelds MJC, Flik G, Kolar ZI (1998a) Cellular magnesium transport in the vertebrate intestine. *Magnesium Research*, **11**, 315-322.

- Bijvelds MJC, Kolar ZI, Flik G (2001) Electrodifusive magnesium transport across the intestinal brush border membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *European Journal of Biochemistry*, **268**, 2867-2872.
- Bijvelds MJC, Van der Velden JA, Kolar ZI, Flik G (1998b) Magnesium transport in freshwater teleosts. *Journal of Experimental Biology*, **201**, 1981-1990.
- Björnsson BT, Einarsdóttir IE, Power D (2011) Is salmon smoltification an example of vertebrate metamorphosis? Lessons learnt from work on flatfish larval development. *Aquaculture*, **in press, corrected proof**; doi:10.1016/j.aquaculture.2011.03.002.
- Björnsson BT, Stefansson SO, McCormick SD (2010) Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology*, **170**, 290-298.
- Bradford SC, Fitzpatrick MS, Schreck CB (1992) Evidence for ultra-short-loop feedback in ACTH-induced interrenal steroidogenesis in coho salmon: Acute self-suppression of cortisol secretion in vitro. *General and Comparative Endocrinology*, **87**, 292-299.
- Carey JB, McCormick SD (1998) Atlantic salmon smolts are more responsive to an acute handling and confinement stress than parr. *Aquaculture*, **168**, 237-253.
- Cech JJ, Bartholow J, S. D. , Young PS, Hopkins TE (1996) Striped bass exercise and handling stress in freshwater: physiological responses to recovery environment. *Transactions of the American Fisheries Society*, **125**, 308–320.
- Cnaani A, McLean E, Hallerman EM (2014) Reprint of: Effects of growth hormone transgene expression and triploidy on acute stress indicators in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture*, **420**, S124-S133.
- Cook KV, O'Connor CM, McConnachie SH, Gilmour KM, Cooke SJ (2012) Condition dependent intra-individual repeatability of stress-induced cortisol in a freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **161**, 337-343.
- Davis KB (2006) Management of Physiological Stress in Finfish Aquaculture. *North American Journal of Aquaculture*, **68**, 116–121
- Davis MW, Olla BL, Schreck CB (2001) Stress induced by hooking, net towing, elevated sea water temperature and air in sablefish: lack of concordance between mortality and physiological measures of stress. *Journal of Fish Biology*, **58**, 1-15.
- Deane EE, Woo NYS (2009) Modulation of fish growth hormone levels by salinity, temperature, pollutants and aquaculture related stress: a review. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **19**, 97-120.
- Dhabhar FS, McEwen BS (1997) Acute stress enhances while chronic stress suppresses immune function in vivo: a potential role for leucocyte trafficking. *Brain Behavior and Immunology*, **11**, 286–306.
- Dyer AR, Upton Z, Stone D, Thomas PM, Soole KL, Higgs N, Quinn K, Carragher JF (2004) Development and validation of a radioimmunoassay for fish insulin-like growth factor I (IGF-I) and the effect of aquaculture related stressors on circulating IGF-I levels. *General and Comparative Endocrinology*, **135**, 268-275.
- Dykes A (2012) Cost and benefits of fish welfare – A producer's perspective. *Aquaculture Economics & Management*, **16**, 429–432.
- Ellis LE, Sacobie CFD, Kieffer JD, Benfey TJ (2013) The effects of dissolved oxygen and triploidy on critical thermal maximum in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **166**, 426-433.
- Ellis T, Yildiz HY, Lopez-Olmeda J, Spedicato MT, Tort L, Overli O, Martins CIM (2012) Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiol Biochem*, **38**, 163-188.
- Engelsma MY, Huisling MO, van Muiswinkel WB, Flik G, Kwang J, Savelkoul HFJ, Verburg-van Kemenade BML (2002) Neuroendocrine-immune interactions in fish: a role for interleukin-1. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **87**, 467-479.
- Evans JC (2009) The ethics of fish welfare. *Journal of Fish Biology*, **75**, 2872-2874.

- FDIR (2014) Fiskeridirektoratet, Bergen. Oppdaterte rømmingstall. <http://www.fiskeridir.no/statistikk/akvakultur/oppdaterte-roemmingstall>; Publisert: 18.03.05 Sist oppdatert: 19.12.14.
- FEAP (2013) The European aquaculture production industry - Animal welfare. Aquaculture Economics & Management; <http://www.feap.info/default.asp?SHORTCUT=616>.
- Fiess JC, Kunkel-Patterson A, Mathias L, Riley LG, Yancey PH, Hirano T, Grau FG (2007) Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **146**, 252-264.
- Finstad B, Iversen M, Sandodden R (2003) Stress-reducing methods for releases of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in Norway. *Aquaculture*, **222**, 203-214.
- Fjelldal PG, Glover K, Wennevik V, Ørnsrud R, Fraser T, Fleming M, Breck O, Hansen TH (2012) Triploid laks – en kandidat for kommersielt oppdrett? *Havforskningsrapporten*, **3**, 11-13.
- Flik G, Klaren PHM, Van den Burg EH, Metz JR, Huising MO (2006) CRF and stress in fish. Novel Functions of the Corticotropin-Releasing Factor System. Review. *General and Comparative Endocrinology* **146**, 36-44.
- Fraser D, Weary DM, Pajor EA, Milligan BN (1997) A scientific conception of animal welfare that reflects ethical concerns. *Animal Welfare*, **6**, 187-205.
- Fraser TWK, Fjelldal PG, Hansen T, Mayer I (2012) Welfare Considerations of Triploid Fish. *Reviews in Fisheries Science*, **20**, 192-211.
- Fraser TWK, Hansen T, Mayer I, Skjæraasen JE, Glover KA, Sambraus F, Fjelldal PG (2014a) The effect of triploidy on vaccine side-effects in Atlantic salmon. *Aquaculture*, **433**, 481-490.
- Fraser TWK, Mayer I, Skjæraasen JE, Hansen T, Fjelldal PG (2014c) The effect of triploidy on the efficacy and physiological response to anesthesia with MS 222 and isoeugenol in Atlantic salmon post-smolts. *Aquaculture International*, **22**, 1347-1359.
- Fraser TWK, Vindas MA, Fjelldal PG, Winberg S, Thornqvist P, Øverli Ø, Skjæraasen J, Hansen TJ, Mayer I (2015) Increased reactivity and monoamine dysregulation following stress in triploid Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part A*, **Accepted manuscript 05.04.2015**.
- Friend TH, Dellmeier GR, Gbur EE (1985) Comparison of four methods of calf confinement. I. Physiology. *Journal of Animal Science*, **60**, 1095–1101.
- Fryer J, Lederis K, Rivier J (1985) ACTH-releasing activity of urotensin I and ovine CRF: Interactions with arginine vasotocin, isotocin and arginine vasopressin. *Regulatory Peptides*, **11**, 11-15.
- Geslin M, Auperin B (2004) Relationship between changes in mRNAs of the genes encoding steroidogenic acute regulatory protein and P450 cholesterol side chain cleavage in head kidney and plasma levels of cortisol in response to different kinds of acute stress in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *General and Comparative Endocrinology*, **135**, 70-80.
- Greenspan FS, Gardner DG (2004) *Basic and clinical endocrinology*, Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York, seventh edition.
- Hagen IJ, Kusakabe M, Young G (2006) Effects of ACTH and cAMP on steroidogenic acute regulatory protein and P450 11 $\beta$ -hydroxylase messenger RNAs in rainbow trout interrenal cells: Relationship with in vitro cortisol production. *General and Comparative Endocrinology*, **145**, 254-262.
- Handeland SO, Björnsson, Arnesen AM, Stefansson SO (2003) Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (*Salmo salar*) of wild and farmed strains. *Aquaculture*, **220**, 367-384.
- Hansen T, Fjelldal PG (2015) Er steril laks klar for kommersielt oppdrett? *Havbruksrapporten 03/15*, 12-14.
- Hansen T, Fraser TWK, Sambraus F, Fjelldal PG (2014) Triploid laks krever tilpassete produksjonsbetingelser. *Havbruksrapporten 03/14*, 21-22.

- Hansen T, Mejdell C, Svåsand T, Osland A, Bergh Ø, Taranger GL (2007) Oppdrett av steril laks. *Rapport fra Havforskningen*, **3**, 34.
- Huntingford F, Adams C, Braithwaite VA, Kadri S, Pottinger TG, Sandoe P, Turnbull JF (2007) The implications of a feelings-based approach to fish welfare: a reply to Arlinghaus et al. *Fish and Fisheries*, **8**, 277-280.
- Huntingford FA, Kadri S (2008) Welfare and fish. In: *Fish Welfare* (ed by Branson EJ). Blackwell Publishing Ltd, Oxford UK, pp. 19-32.
- Imsland AK, Vage KA, Handeland SO, Stefansson SO (2011) Growth and osmoregulation in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in response to different feeding frequencies and salinities. *Aquac. Res.*, **42**, 469-479.
- Iversen M (2008) Betydningen av stress i smoltproduksjon (Del 1). *Europharma Fokus*, **1**, 20-21.
- Iversen M (2009a) Betydningen av stress i smoltproduksjon (Del 2). *Europharma Fokus*, **1**, 22-24.
- Iversen M (2009b) Stressnivåene i Fútakletturs settefiskanlegg. Effekten av håndtering, vaksinerings og transport på lakseparr og -smolt (*Salmo salar* L.). HBO-rapport 2/2009, Bodø, Norway, pp. 26.
- Iversen M (2013) Stress and its impact on animal welfare during commercial production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In: *University of Nordland, PhD in aquaculture no. 9, Bodo, Norway. 148 pp.*
- Iversen M, Eliassen R (2012) Stressovervåking av settefiskproduksjonen i Mainstream Norway AS 2009 - 2011. Stresskartlegging av laksesmolt (*Salmo salar* L.), og effekten av stressreducerende tiltak på stressnivå, dyrevelferd og produksjonsresultatet. UiN-rapport nr 05/2012, pp. 54.
- Iversen M, Eliassen RA (2006) Stressnivåene i to kommersielle settefiskanlegg gjennom en produksjonssesong. Effekten av håndtering og transport på laksesmolt (*Salmo salar* L.). Høgskolen i Bodø, HBO-rapport nr. 4, pp. 29.
- Iversen M, Eliassen RA (2009) The Effect of AQUI-S<sup>R</sup> Sedation on Primary, Secondary, and Tertiary Stress Responses during Salmon Smolt, *Salmo salar* L., Transport and Transfer to Sea. *Journal of the World Aquaculture Society*, **40**, 216-225.
- Iversen M, Eliassen RA (2010) Produksjonsstrategi ved Mainstream Norway AS, Avd. MN-Dyping i 2010. Effekten på smoltkvalitet, dyrevelferd og produksjonsresultatet. Høgskolen i Bodø, HBO 4/2010, pp. 51.
- Iversen M, Eliassen RA, Finstad B (2009) Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar* L. transport and transfer to sea. *Aquac. Res.*, **40**, 233-241.
- Iversen M, Eliassen RA, Finstad B, Evjen T (2005a) Effekten av håndterings- og transportstress på overlevelse og trivsel hos laksesmolt etter utsetting i sjø. *Norsk Fiskeoppdrett*, **8**, 50-52.
- Iversen M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA (2003) The efficacy of metomidate, clove oil, Aquic-S (TM) and Benzoak (R) as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, **221**, 549-566.
- Iversen M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA, Carlsen KT, Evjen T (2005b) Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture*, **243**, 373-382.
- Iversen M, Finstad B, Nilssen KJ (1998) Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts. *Aquaculture*, **168**, 387-394.
- Iversen MH, Eliassen RA (2014) The effect of allostatic load on hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem*, **40**, 527-538.
- Iversen MH, Okland F, Thorstad EB, Finstad B (2013) The efficacy of Aquic-S vet. (iso-eugenol) and metomidate as anaesthetics in European eel (*Anguilla anguilla* L.), and their effects on animal welfare and primary and secondary stress responses. *Aquac. Res.*, **44**, 1307-1316.
- Janssens CJG, Helmond FA, Wiegant VM (1994) Increased cortisol response to exogenous adrenocorticotrophic hormone in chronically stressed pigs: influence of housing conditions. *Journal of Animal Science*, **72**, 1771-1777.



- Kiilerich P, Kristiansen K, Madsen SS (2007) Cortisol regulation of ion transporter mRNA in Atlantic salmon gill and the effect of salinity on the signaling pathway. *Journal of endocrinology*, **194**, 417–427.
- Kiilerich P, Milla S, Sturm A, Valotaire C, Chevolleau S, Giton F, Iversen M (2011) Implication of the mineralocorticoid axis in rainbow trout osmoregulation during salinity acclimation. *J. Endocrinol*, **209**, 221–235.
- Kumar R, Mukherjee SC, Ranjan R, Nayak SK (2008) Enhanced innate immune parameters in *Labeo rohita* (Ham.) following oral administration of *Bacillus subtilis*. *Fish & Shellfish Immunology*, **24**, 168-172.
- Leong H, Ros AFH, Oliveira RF (2009) Effects of putative stressors in public aquaria on locomotor activity, metabolic rate and cortisol levels in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fish Biology*, **74**, 1549-1561.
- Liebert AM, Schreck CB (2006) Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-1, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation. *General and Comparative Endocrinology*, **148**, 195-202.
- LOV (1996) Forskrift om forsøk med dyr. FOR-1996-01-15-23, sist endret 06.08.2010.
- LOV (2009) LOV 2009-06-19 nr 97: Lov om dyrevelferd. <http://www.lovdatab.no/all/hl-20090619-097.html>. Last updated 15.02.13.
- Mattilsynet (2012) Fiskevelferd. [http://www.mattilsynet.no/fisk\\_og\\_akvakultur/fiskevelferd/](http://www.mattilsynet.no/fisk_og_akvakultur/fiskevelferd/). Published 27.08.12 and last updated 31.01.14.
- Maxime V (2008) The physiology of triploid fish: current knowledge and comparisons with diploid fish. *Fish and Fisheries*, **9**, 67-78.
- Mazur CF, Iwama GK (1993) Effect of Handling and Stocking Density on Hematocrit, Plasma- Cortisol, and Survival in Wild and Hatchery-Reared Chinook Salmon (*Oncorhynchus-Tshawytscha*). *Aquaculture*, **112**, 291-299.
- McCormick SD (2013) Smolt Physiology and Endocrinology. In: *Euryhaline Fishes* (ed. by McCormick SD, Farrell AP, Brauner CJ). Academic Press, USA, pp. 199-251.
- McCormick SD, Regish AM, Christensen AK (2009) Distinct freshwater and seawater isoforms of Na(+)/K(+)-ATPase in gill chloride cells of Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology*, **212**, 3994-4001.
- McCormick SD, Saunders RL (1987) Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth, and metabolism. *American Fisheries Society Symposium*, **1**, 211-229.
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease - Allostasis and allostatic load. In: *Neuroimmunomodulation*, pp. 33-44.
- McEwen BS (2005) Stressed or stressed out: What is the difference? *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, **30**, 315-318.
- McEwen BS, Kalia M (2010) The role of corticosteroids and stress in chronic pain conditions. *Metabolism-Clinical and Experimental*, **59**, S9-S15.
- McEwen BS, Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, **43**, 2-15.
- McEwen BS, Wingfield JC (2010) What is in a name? Integrating homeostasis, allostasis and stress. *Hormones and Behavior*, **57**, 105-111.
- Mellor DJ, Stafford KJ (2001) Integrating practical, regulatory and ethical strategies for enhancing farm animal welfare. *Australian Veterinary Journal*, **79**, 762-768.
- Mesa MG (1994) Effects of Multiple Acute Stressors on the Predator Avoidance Ability and Physiology of Juvenile Chinook Salmon. *Transactions of the American Fisheries Society*, **123**, 786-793.
- Meunier-Salaun MC, Vantrimpont MN, Raab A, Dantzer R (1987) Effect of floor area restriction upon performance, behavior and physiology of growing/finishing pigs. *Journal of Animal Science*, **64**, 1371-1377.

- Milston RH, Davis MW, Parker SJ, Olla BL, Clements S, Schreck CB (2006) Characterization of the Physiological Stress Response in Lingcod. *Transactions of the American Fisheries Society*, **135**, 1165–1174
- Moberg GP (1985) Influences of stress on reproduction: measure of well-being. In: *Animal stress* (ed by Pickering AD). American Physiological Society, Bethesda, pp. 245-267.
- Mommsen TP, Vijayan MM, Moon TW (1999) Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **9**, 211-268.
- Moon TW, Foster GD (1995) Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. In: *Metabolic and Adaptational Biochemistry*, Elsevier, Amsterdam (ed. by Hochachka PW, Mommsen TP), pp. 65–100.
- Mormede P, Andanson S, Auperin B, Beerda B, Guemene D, Malnikvist J, Manteca X, Manteuffel G, Prunet P, van Reenen CG, Richard S, Veissier I (2007) Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology & Behavior*, **92**, 317-339.
- Nomura M, Sloman KA, von Keyserlingk MAG, Farrell AP (2009) Physiology and behaviour of Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts during commercial land and sea transport. *Physiology & Behavior*, **96**, 233-243.
- Norris DO, Hobbs SL (2006) The HPA axis and functions of the corticosteroids in fishes. In: *Fish endocrinology volume 2* (ed. by Reinecke M, Zaccone G, Kapoor BG), Science Publishers, Enfield, NH, Usa, pp. 721-767.
- Ojima D, Iwata M (2010) Central administration of growth hormone-releasing hormone and corticotropin-releasing hormone stimulate downstream movement and thyroxine secretion in fall-smolting coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology*, **168**, 82-87.
- Olsen RE, Sundell K, Mayhew TM, Myklebust R, Ringo E (2005) Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture*, **250**, 480-495.
- Olsen YA, Einarsdottir IE, Nilssen KJ (1995) Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, **134**, 155-168.
- Pagnotta A, Milligan CL (1991) The role of blood glucose in the restoration of muscle glycogen during recovery from exhaustive exercise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus*). *The Journal of Experimental Biology*, **161**, 489–508.
- Pankhurst NW (2011) The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, **170**, 265-275.
- Peruzzi S, Varsamos S, Chatain B, Fauvel C, Menu B, Falguiere JC, Severe A, Flik G (2005) Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, **244**, 359-367.
- Peters G (1982) The effect of stress on the stomach of the European eel, *Anguilla anguilla* L. *J Fish Biol* **21**, 497–512.
- Pickering AD, Pottinger TG (1989) Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiol Biochem*, **7**, 253-258.
- Poli BM, Parisi G, Scappini F, Zampacavallo G (2005) Fish welfare and quality as affected by pre-slaughter and slaughter management. *Aquaculture International*, **13**, 29-49.
- Pottinger TG, Carrick TR (2001) ACTH does not mediate divergent stress responsiveness in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular and Integrative Physiology*, **129**, 399-404.
- Prunet P, Overli O, Douxfils J, Bernardini G, Kestemont P, Baron D (2012) Fish welfare and genomics. *Fish Physiol Biochem*, **38**, 43-60.
- Ramsay JM, Feist GW, Varga ZnM, Westerfield M, Kent ML, Schreck CB (2009) Whole-body cortisol response of zebrafish to acute net handling stress. *Aquaculture*, **297**, 157-162.

- Redding MJ, Schreck CB (1983) Influence of Ambient Salinity on Osmoregulation and Cortisol Concentration in Yearling Coho Salmon during Stress. *Transactions of the American Fisheries Society*, **112**, 800–807.
- Rose JD, Arlinghaus R, Cooke SJ, Diggles BK, Sawynok W, Stevens ED, Wynne CDL (2014) Can fish really feel pain? *Fish and Fisheries*, **15**, 97-133.
- Rotllant J, Ruane NM, Caballero MJ, Montero D, Tort L (2003a) Response to confinement in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) is characterised by an increased biosynthetic capacity of interrenal tissue with no effect on ACTH sensitivity. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **136**, 613-620.
- Rotllant J, Tort L, Montero D, Pavlidis M, Martinez M, Wendelaar Bonga SE, Balm PHM (2003b) Background colour influence on the stress response in cultured red porgy *Pagrus pagrus*. *Aquaculture*, **223**, 129-139.
- Sacobie CFD, Glebe BD, Barbeau MA, Lall SP, Benfey TJ (2012) Effect of strain and ploidy on growth performance of Atlantic salmon, *Salmo salar*, following seawater transfer. *Aquaculture*, **334**, 58-64.
- Sadler J, Pankhurst NW, Pankhurst PM, King H (2000) Physiological stress responses to confinement in diploid and triploid Atlantic salmon. *Journal of Fish Biology*, **56**, 506-518.
- Saligaut C, Linard B, Breton B, Anglade I, Bailhache T, Kah O, Jégo P (1999) Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture*, **177**, 13-20.
- Sandodden R, Finstad B, Iversen M (2001) Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. *Aquac. Res.*, **32**, 87-90.
- Sandøe P, Christiansen SB (2007) The value of animal life: how should we balance quality against quantity? *Animal Welfare*, **16**, 109-115.
- Schreck CB (2010) Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, **165**, 549-556.
- Segner H, Sundh H, Buchmann K, Douxfils J, Sundell KS, Mathieu C, Ruane N, Jutfelt F, Toften H, Vaughan L (2012) Health of farmed fish: its relation to fish welfare and its utility as welfare indicator. *Fish Physiol Biochem*, **38**, 85-105.
- Selye H (1950) Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, **1 (4667)**, 1383-1392.
- Selye H (1973) Homeostasis and heterostasis. *Perspectives of Biological Medicine*, **16**, 441-445.
- Sneddon LU (2006) Ethics and welfare: Pain perception in fish. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, **26**, 6-10.
- Sneddon LU (2009) Pain Perception in Fish: Indicators and Endpoints. *ILAR Journal*, **50**, 338-342.
- Specker JL, Schreck CB (1980) Stress Responses to Transportation and Fitness for Marine Survival in Coho Salmon (*Oncorhynchus-Kisutch*) Smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **37**, 765-769.
- Staurnes M, Sigholt T, Pedersen HP, Rustad T (1994) Physiological-Effects of Simulated High-Density Transport of Atlantic Cod (*Gadus-Morhua*). *Aquaculture*, **119**, 381-391.
- Stefansson SO, Imsland AK, Handeland SO (2009) Food-deprivation, compensatory growth and hydro-mineral balance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) post-smolts in sea water. *Aquaculture*, **290**, 243-249.
- Sterling P (2012) Allostasis: A model of predictive regulation. *Physiology & Behavior*, **106**, 5-15.
- Sørensen C, Bohlin LC, Øverli Ø, Nilsson GE (2011) Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiology & Behavior*, **102**, 518-523.
- Takahashi H, Sakamoto T (2012) The role of "mineralocorticoids" in teleost fish: Relative importance of glucocorticoid signaling in the osmoregulation and "central" actions of mineralocorticoid receptor. *General and Comparative Endocrinology*; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ygcen.2012.11.016>.

- Taylor JF, Needham MP, North BP, Morgan A, Thompson K, Migaud H (2007) The influence of ploidy on saltwater adaptation, acute stress response and immune function following seawater transfer in non-smolting rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, **152**, 314-325.
- Tort L (2011) Stress and immune modulation in fish. *Developmental & Comparative Immunology*, **35**, 1366-1375.
- Trischitta F, Denaro MG, Faggio C (2005) Cell volume regulation following hypotonic stress in the intestine of the eel, *Anguilla anguilla*, is Ca<sup>2+</sup>-dependent. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **140**, 359-367.
- Tsalafouta A, Papandroulakis N, Gorissen M, Katharios P, Flik G, Pavlidis M (2014) Ontogenesis of the HPI axis and molecular regulation of the cortisol stress response during early development in *Dicentrarchus labrax*. *Scientific Reports*, **4:5525**, 1-12.
- van de Vis H, Kestin S, Robb D, Oehlenschläger J, Lambooij B, Munkner W, Kuhlmann H, Kloosterboer K, Tejada M, Huidobro A, Ottera H, Roth B, Sorensen NK, Akse L, Byrne H, Nesvadba P (2003) Is humane slaughter of fish possible for industry? *Aquac. Res.*, **34**, 211-220.
- Veillette PA, Serrano X, Garcia MM, Specker JL (2007) Evidence for the onset of feedback regulation of cortisol in larval summer flounder. *General and Comparative Endocrinology*, **154**, 105-110.
- Veiseth E, Fjaera SO, Bjerkeng B, Skjervold PO (2006) Accelerated recovery of Atlantic salmon (*Salmo salar*) from effects of crowding by swimming. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology*, **144 (3)**, 351-358.
- Veissier I, Boissy A (2007) Stress and welfare: Two complementary concepts that are intrinsically related to the animal's point of view. *Physiology & Behavior*, **92**, 429-433.
- Veissier I, Boissy A, De Passille AM, Rushen J, Van Reenen CG, Roussel S (2001) Calves' responses to repeated social regrouping and relocation. *Journal of Animal Science*, **79**, 2580-2593.
- Vijayan MM, Moon TW (1992) Acute Handling Stress Alters Hepatic Glycogen-Metabolism in Food-Deprived Rainbow-Trout (*Oncorhynchus-Mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **49**, 2260-2266.
- Wedemeyer GA (1996) *Physiology of fish in intensive culture systems*, Chapman & Hall, New York.
- Weld MM, Fryer JN (1987) Stimulation by angiotensins I and II of ACTH release from goldfish pituitary cell columns. *General and Comparative Endocrinology*, **68**, 19-27.
- Weld MM, Fryer JN, Rivier J, Lederis K (1987) Inhibition of CRF- and urotensin I-stimulated ACTH release from goldfish pituitary cell columns by the CRF analogue  $\alpha$ helical CRF-(9-41). *Regulatory Peptides*, **19**, 273-280.
- Wells A, Grierson CE, MacKenzie M, Russon IJ, Reinardy H, Middlerniss C, Bjorn PA, Finstad B, Bonga SEW, Todd CD, Hazon N (2006) Physiological effects of simultaneous, abrupt seawater entry and sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*) infestation of wild, sea-run brown trout (*Salmo trutta*) smolts. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **63**, 2809-2821.
- Wells RMG, Pankhurst NW (1999) Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, **2**, 276-284.
- Wendelaar Bonga SE (2011) Hormonal responses to stress. In: *Encyclopedia of Fish Physiology* (ed by Anthony PF). Academic Press, San Diego, pp. 1515-1523.
- Wendelaar Bonga SEW (1997) The stress response in fish. *Physiological Reviews*, **77**, 591-625.
- Wilens TE, Ritchie JC, Carroll BJ (1984) Comparison of plasma cortisol and corticosterone in the dexamethasone suppression test for melancholia. *Psychoneuroendocrinology*, **9**, 45-55.
- Wingfield JC, Sapolsky RM (2003) Reproduction and resistance to stress: When and how. *Journal of Neuroendocrinology*, **15**, 711-724.
- Wood CC, Walsh PJ, Thomas Sa, Perry SF (1990) Control of red blood cell metabolism in rainbow trout after exhaustive exercise. *Journal of Experimental Biology*, **154**, 491-507.
- Zellner DA, Loaiza S, Gonzalez Z, Pita J, Morales J, Pecora D, Wolf A (2006) Food selection changes under stress *Physiology & Behavior*, **87**, 789-793