

MASTEROPPGAVE

Emnekode: AK306F

Navn på kandidat: Jan Jensen

Effekten av akutt allostatisk belastning på hypothalamus –
hypofyse – interrenal aksen hos liten rognkjeks (*Cyclopterus
lumpus*)

Dato: 15.06.2018

Totalt antall sider: 63

Innhold

Forord.....	4
Liste over figurer og tabeller	5
Sammendrag	6
Summary	7
1 Norsk oppdrett	8
1.1 Miljøutfordringer med lakseoppdrett	9
1.2 Lakselus	10
1.3 Bekjempelse av lakselus	11
1.4 Bruk av rensefisk i bekjempelsen av lakselus.....	13
1.5 Rognkjeks.....	15
2 Stress	16
2.1 Den fysiologiske stressrespons.....	16
2.2 Allostase, allostatisk tilstand og overbelastning	17
2.3 Endokrine stressrespons	20
2.3.1 HPI-akserespons	20
2.4 Kontroll av kortisolsekresjon	21
2.4.1 Kortikoliberin (CRH).....	22
2.4.2 Adrenokortikotropt hormon (ACTH)	23
2.5 Kortisol.....	24
2.5.1 Glukokortikoid og mineralkortikoid reseptorer	26
2.5.2 Negativ tilbakemelding.....	26
2.5.3 Problemstilling.....	27
3 Materialer og metode	28
3.1 Forsøksfisk og forhold	28
3.2 Forsøksoppsett.....	28

3.3	Prøvetaking.....	29
3.4	Sensitivitets (ACTH)- og negativ tilbakekoblingstest (dexametason).....	29
3.5	Analytiske prosedyrer.....	29
3.5.1	Kortisol.....	29
3.5.2	Osmolalitet	30
3.5.3	Klor	30
3.5.4	Magnesium.....	30
3.5.5	Laktat og glukose.....	30
3.5.6	Finneslitasje.....	30
3.6	Statistisk analyse	30
4	Resultater	32
4.1	Primærstressrespons.....	32
4.1.1	Plasmakortisol	32
4.1.2	HPI-aksen.....	33
4.2	Sekundære stressresponser	35
4.2.1	Glukose.....	35
4.2.2	Laktat	36
4.2.3	Osmolalitet	37
4.2.4	Plasmaklorid	38
4.2.5	Plasmamagnesium.....	39
4.3	Tertiære stressresponser	40
4.3.1	Finneslitasje.....	40
5	Diskusjon	41
5.1	Stress	43
5.2	Primær stressrespons - Allostasis.....	44
5.3	HPI – Akserespons	45
5.4	Sekundære stressresponser	46

5.4.1	Glukose	46
5.4.2	Laktat	46
5.4.3	Osmolalitet og osmoregulering	47
5.5	Tertiær stressrespons – Fysiologiske endringer	49
6	Konklusjon	52
7	Referanser	53

Forord

Takk til alle involverte! Takk til veileder Martin Haugmo Iversen for all mulig hjelp. Takk til Kyle D. Rogers og Bente Sunde for hjelp til prøvetaking og analysering. Takk til Monica Fengsrud Brinchman for en siste gjennomlesing.

Til sist vil jeg si at jeg er takknemlig for at deltidsopplegget med Nord universitet har gjort det mulig for meg å gjennomføre denne masteren.

Melsomvik, 14.06.2018

Jan Jensen

Liste over figurer og tabeller

Figur 1. Illustrasjon av lakselusens livssyklus. (Illustrasjon: T. A. Schram)	10
Figur 2. Plansje for bestemmelse av leppefisk (HI, 2010)	14
Figur 3. Rognkjeks (foto Jan Jensen)	14
Figur 4. Den fysiologiske stressresponsen (etter figur av Martin H. Iversen)	17
Figur 5. Skjematisk representasjon av allostatisk belastning. Figur: Iversen, 2013.	18
Figur 6: Organene i HPI-aksen ansvarlige for stressrespons. Modifisert etter Khansari, et al, 2017	20
Figur 7. Hypothalamus-hypofyse-interrenalaksen (HPI-aksen) (Iversen, 2013).....	22
Figur 8. Opioid peptider avledet fra proopiomelanocortin (POMC) deling. Fra Mosconi et al. (2006).	23
Figur 9. Gjennomsnittlige verdier av plasmakortisol	32
Figur 10. Gjennomsnittlig plasmakortisol etter ACTH «sensitivitetstest»	33
Figur 11. Gjennomsnittlig plasmakortisol etter PBS «negativ tilbakekoblings test»	34
Figur 12. Gjennomsnittlige verdier av glukose.....	35
Figur 13. Gjennomsnittlige verdier av plasmalaktat.	36
Figur 14. Gjennomsnittlige verdier av osmolalitet.....	37
Figur 15. Gjennomsnittlige verdier av plasmaklorid	38
Figur 16. Gjennomsnittlige verdier av plasmamagnesium.....	39
Figur 17. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje.....	40
Figur 18: Antall behandlinger mot lakselus i perioden 2011 til 2016. (Handlingsplan mot resistens mot legemidler mot lakselus, 2017).	41
Figur 19: Oppsummering av planer og mål for hvordan lakselus skal håndteres. (Handlingsplan mot resistens mot legemidler mot lakselus, 2017).	42
Figur 20: Sammenheng mellom stress og dødelighet (Iversen et al., 2015).	43
Figur 21: En undersøkelse av Iversen viste forskjellige kortisolnivåer blant forskjellige fiskeslag. (Iversen et al., 2015).	44
Tabell 1: Antall lusebehandlinger 2011-2016. (Veterinærinstituttet, 2016).	11

Sammendrag

Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) er en anadrom fiskeart som har sine første leveår i ferskvann før den smoltifiserer og vandrer ut i sjøen. Laks i oppdrett blir knyttet til faser i både ferskvann og saltvann gjennom manipulasjon. I 2016 ble det produsert 1 328 027 tonn matfisk hvorav 93 % var laks.

Produksjon av laks har vært lønnsomt for landet, men økt produksjon har gitt flere nye utfordringer. Dette er utfordringer knyttet til rømming, forurensning, spredning av sykdommer og resistens mot medikamenter. Særlig har lakselus blitt en stor utfordring for bransjen. I denne studien er det fokusert på bruken av renseskjell som spiser lakselus helt naturlig. Dette er en fiskeart som er vanlig langs hele norskekysten, men den økte bruken har ført til opprettelse av egne oppdrettsanlegg kun for denne fisken, og den er nå den tredje største målt i verdi. Rognkjeks har vist seg å være godt egnet da den er robust og tåler lavere temperaturer og dermed et godt verktøy i bekjempelsen av lakselus. Våren 2015 la Regjeringen frem Stortingsmelding om vekst i havbruksnæringen. Hovedmålet med denne meldingen er å drøfte hvordan Norge kan øke verdiskapningen basert på forutsigbar, bærekraftig vekst og bedre miljøtilpassing i oppdrettsnæringen (Meld. St. 16, 2014-2015). Som et tiltak er det viktig å bygge opp kapasitet på produksjon og ha fokus på riktig bruk av renseskjell. For næringen vil det derfor være viktig å ha tilgang til operative velferdsindikatorer (OVI) og kunnskap om grenseverdier for påvirkning for å få best mulig nytte av hver enkelt renseskjell som settes inn i merdene for lusekontroll og samtidig gi god fiskevelferd.

Det har de siste årene vært forsket mye på stress hos oppdrettsfisk og konsekvensene dette har økonomisk og velferdsmessig. Dette forsøket bestod av to grupper; kontroll (vanlig håndtering) og stress (håndtering + stress). Stressgruppen ble utsatt for en trengings-stressor i 20 minutter. Stressresponsen er tredelt i det vi kaller: primære-, sekundære- og tertiære stressresponser. Dette er knyttet til HPI-aksen hos fisk der sluttproduktet er katekolaminer og kortisol. Kortisol er hovedhormonet som skilles ut, og kontrollen av kortisolsekresjon i teleoster er kompleks. Stress er en naturlig reaksjon hos alle dyr og styrer utførelse av viktige livsfunksjoner i møte med ugunstige situasjoner. Stress er derfor en viktig og livsnødvendig respons for overlevelse. Men vedvarende stress kan i verste fall være dødelig. Dette har igjen velferdsmessige og økonomiske konsekvenser.

I dette forsøket viste fisken forhøyede verdier av kortisol som vendte tilbake til normalen innen 48 timer etter å ha blitt utsatt for en allostatisk overbelastning av type I. Det ble registrert en midlertidig oversensitivitet av ACTH, men ikke et redusert negativt tilbakekoblingsystem. Fisken viste en midlertidig redusert regulatorisk evne. Stresstet fisk viser også en mer aggressiv territoriell adferd med økt finne-biting. Alle parametre ser ut til å vende tilbake til startverdiene i løpet av studien.

Summary

Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) is an anadrom fish species that lives first year in fresh water before it smoltifies and migrates into the sea. Salmon in farming is linked to both fresh- and saltwater through manipulation. In 2016, 1 328 027 tonnes of food were produced, 93 % of which were salmon.

Salmon production has been profitable for the country, but increased production has given rise to several new challenges. These are challenges related to escapes, contamination, spread of diseases and drug resistance. In particular, salmon lice have become a major challenge for the industry. In this study, it is focused on the use of the cleanerfish lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) that eat salmon lice naturally. This is a fish species that is common throughout the Norwegian coast, but the increased use has led to the creation of own fish farms for this fish, and it is now the third largest measured in value. Lumpfish has proven to be well-suited as it is robust and withstands lower temperatures and thus a good tool in the fight against salmon lice. In spring 2015, the Government announced the priority of predictable and sustainable growth in Norwegian salmon and trout farming (Meld. St. 16, 2014-2015). It was stated that measures against steady increase in drug treatment and drug resistance is a challenge in terms of environmentally sustainable production. As a measure, it is important to build production capacity and focus on the correct use of cleaner fish. Therefore, for the industry, it will be important to have access to operational welfare indicators (OVI) and knowledge of limit values for impact to maximize the benefit of each cleaner fish that is put into lice control.

In recent years, there has been a lot of research on stress in farmed fish and the consequences that this has in terms of economic and welfare. This experiment consisted of two groups; control (common handling) and stress (handling + stress). The stress group was exposed to a stressor for 20 minutes. The stress response is threefold in what we call: primary, secondary and tertiary stress responses. This is related to the HPI axis of fish whose final product is catecholamines and cortisol. Cortisol is the main hormone secreted, and the control of cortisol secretion in teleost is complex. Stress is a natural reaction of all animals and controls the execution of important life functions in the face of unfavorable situations. Stress is therefore an important and vital response to survival. But persistent stress can in worst case be fatal.

In this experiment, the fish showed elevated values of cortisol returning to the normal within 48 hours after being exposed to a type I allostatic overload. A temporary oversensitivity of ACTH was detected but not a reduced negative feedback system. The fish showed a temporary reduced regulatory capacity. Stressed fish also show a more aggressive territorial behavior with increased fin erosion. All parameters appear to be normalized during the study.

1 Norsk oppdrett

Fiskeoppdrett er en form for akvakultur der man aler opp fisk. Dette har lange tradisjoner i land som Egypt og orientalske land. Fra Kina foreligger rapporter om fiskeoppdrett fra 4000-5000 år tilbake. I Europa var fiskeproduksjon av stor betydning i klostrene i middelalderen (Hallenstvedt, 2015). De første klekkeriene ble bygget i Norge i 1850-årene. Formålet var å styrke bestandene tilknyttet viktige ferskvannsfiskerier. Egg fra laksefisk ble klekket og utsatt i vassdrag som nyklekt yngel som et kulturtiltak. I 1882 ble det innført amerikansk regnbueørret til Europa. Da denne arten lett lærte seg å ta kunstig fôr og vokste hurtig, viste den seg å være egnet for oppdrett. I 1960-årene fant brødrene Vik i Sykkylven at regnbueørret gradvis kunne vennes til sjøvann, noe som var en viktig oppdagelse for overgangen av oppdrett fra land til sjø (Hallenstvedt, 2015). Ørreten vokste raskere i det varme sjøvannet og nye driftsteknikker i sjø med merder og innhegninger viste seg dessuten både sikrere og rimeligere enn driftsformer på land. På Hitra satte brødrene Grøntvedt ut laksesmolt i merder i sjøen i 1969, og gjennombruddet for lakseoppdrett kom i begynnelsen av 1970-årene (Miljødirektoratet, 2015). Norge har med sine mange fjorder en lang kystlinje, over 25 000 kilometer, og det er langs denne mange godt egnede steder for oppdrett. Norge produserte i alt 1 328 027 tonn matfisk i 2016 (SSB, 2017). Av dette utgjorde laks 93.0 % og Regnbueørret 6.6 %. Mindre andeler fordeler seg over andre arter. For laks er dette en økning på 34.9 % fra året før med en førstehåndsverdi på nesten 60 milliarder kroner.

Atlantisk laks (*Salmo salar L.*) er en anadrom fiskeart som har sine første leveår i ferskvann før den vandrer ut i sjøen hvor den oppholder seg i ett til fem år for deretter å returnere til elven den ble født i for å gyte. Dette skjer i perioden mai til oktober (McCormick et al, 1998). Denne tilpasningen til et liv i to forskjellige miljøer krever evne til store endringer i fiskens fysiologi, og denne adaptasjonen kalles for smoltifisering og omfatter endringer i morfologi og atferd (Bjornsson et al, 2011; McCormick et al, 1998). Fordelen med en utvandring til sjøvann er en generelt høyere næringstilgang, men overgangen fra ferskvann til saltvann innebærer også utfordringer knyttet til økt salinitet, andre patogen, parasitter og predatorer (McCormick et al, 1998). Laks i oppdrett blir derfor bestående av faser knyttet til både ferskvann og saltvann. I naturen er utviklingen knyttet til faktorer som fotoperiode, temperatur, næringstilgang, konkurranse og tilstedeværelse av patogener. I en oppdrettssituasjon er derimot miljøet i mer og mindre grad manipulert og kontrollert, noe som gir både fordeler og ulemper sett fra forskjellige perspektiver. Endringer i fotoperiode (daglengde) blir ansett som den viktigste eksterne stimulusen for fisken, og fiskens vekst synes å være en sentral faktor for igangsettelse av smoltifiseringsprosessen. Lakseyngelen (i denne fasen kalt parr) må nå en kritisk størrelse på cirka 8-12 cm høsten før en eventuell smoltifisering kan starte påfølgende vår (Bjornsson & Bradley, 2007;

McCormick et al, 1998). I produksjonen av laks deles smolten gjerne inn i to forskjellige kategorier. Vårsmolt (1+) angir fisk satt ut i perioden mars til juli og høstsmolt (0+) som angir utsett i perioden juli til november. Ved å kombinere smoltutsettet på både vår og høst og muligheter for å regulere tilvekst i sjø med fôringsregime, kan oppdretterne tilby slakteklar laks over et lengre tidsrom og ikke bare i den perioden vårsmolten var klar til slakt. I tillegg kunne produksjonen økes da produksjonstiden ble kortere. Høstsmolten som overføres til sjø er cirka 50-70 gram, og vårsmolten veier cirka 80-130 gram. I denne fasen står fisken i havet i merder. Her står den til den når en slaktevekt på rundt 3-6 kg i løpet av 12 til 18 måneder, avhengig av blant annet vanntemperatur og fôring. Disse merdene er lokalisert på steder som anses gunstige med tanke på en rekke faktorer. Lokalteter med gjennomstrømning og dybde er viktig med tanke på lokal forurensning og temperaturer. I en studie fra Nasjonalt institutt for ernærings- og sjømatforskning (NIFES) ble det vist at laks trivdes best i lavere temperaturer enn tidligere antatt, 13 grader gav høyest fôr inntak og vekst hos laksen (Hevrøy et al., 2013).

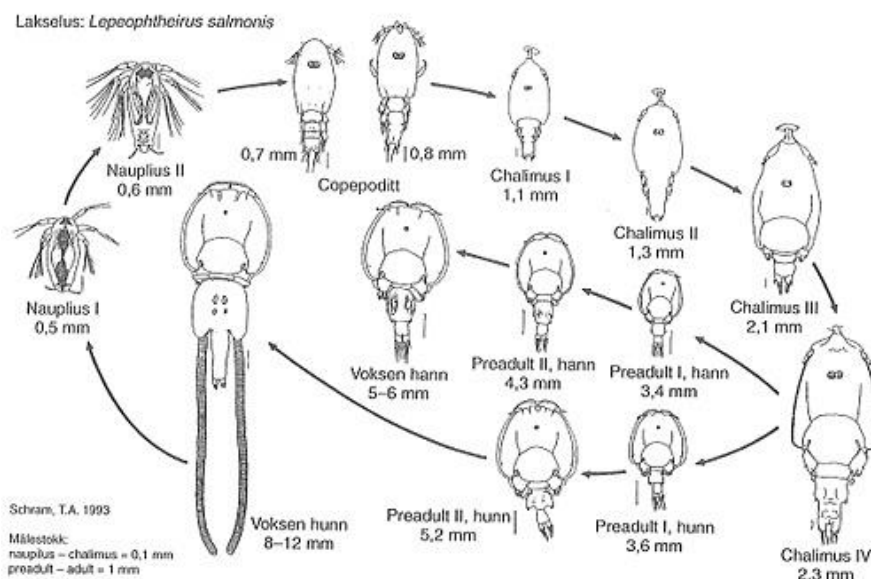
1.1 Miljøutfordringer med lakseoppdrett

Det er ifølge Lovdata (2017) strenge reguleringer for å hindre spredning av smitte og parasitter blant annet ved regler for avstand mellom anleggene og regler for brakklegging ved eventuelle sykdomsutbrudd. Norge er forpliktet av internasjonale avtaler og EU-lovgivningen til å ha et overvåkingsprogram for legemidler, ulovlige stoffer og miljøgifter i matproduserende dyr. Årlig undersøker NIFES oppdrettsfisken for blant annet dioksin og dioksinlignende polyklorerte bifenyl (PCB), tungmetaller, pesticider og bromerte flammehemmere. All mat inneholder uønskede stoffer i varierende mengder. Når det gjelder fet fisk som laks er det de fettløselige miljøgiftene, som dioksiner og PCB det er mest fokus på. Dette skyldes hensynet til sårbare grupper, som gravide og barn. Derfor overvåkes jevnlig nivåene av disse stoffene i både fet villfisk og oppdrettsfisk på oppdrag fra Mattilsynet. For 2015 analyserte NIFES (nå slått sammen med Havforskningsinstituttet) omtrent 2500 prøver av oppdrettsfisk (ca. 12000 fisk), og ingen av prøvene var over grenseverdi. Andre store miljøutfordringer i oppdrettsnæringen er lakselus og fisk som rømmer ifølge en risikovurdering av norsk fiskeoppdrett fra Havforskningsinstituttet (2016). Her vises det til blant annet at lakselus påvirker villfisken gjennom økt smittepress på smolt og negativ påvirkning av sjøørret og sjørøye i oppdrettsintensive områder (Miljødirektoratet, 2015). Lus er også en av tapsårsakene i oppdrett av laksefisk i dag. I følge en rapport fra Nofima (2017) er kostnader knyttet til bekjempelse av lakselus den faktoren som øker mest (Iversen, 2017). I 2015 kostet lakselus næringen nærmere 5 milliarder kroner. Dette er tap knyttet til utgifter for rensfisk, økt dødelighet, økt fôrfaktor og rengjøring av nøter. Lakselus er den vanligste parasitten på oppdrettslaks. Overvåkning viser at omfanget øker klart, og at lusa i noen tilfeller er blitt resistent mot den foretrukne behandlingsmetoden (Dalvin S., et al

2010). Oppdrettere er derfor pålagt å holde kontroll med mengden av lakselus i anlegget og sette i gang tiltak når det blir nødvendig. Lakselusdata kan følges på Barentswatch, som er et system for å dele informasjon i norske kyst- og havområder (Barentswatch, 2018). Lakselusa er også ifølge Fiskehelse rapporten (2016) en av de mest alvorlige helseproblemene i norsk lakseoppdrett i dag. Den viser også et markant skifte i behandlingsmetoder fra bruk av legemidler til uten bruk av legemidler (det vil si mekanisk, termisk, behandling med ferskvann eller bruk av rensefisk) fra 2015 til 2016. Lakselusa rammer laksen både direkte og indirekte. Direkte ved beiting på huden, slik at den mister blod og får problemer med saltbalansen; indirekte ved at skader for vertens hud åpner for infeksjoner med bakterier og virus (Costello, 2009). Der er flere kjemiske stoffer som brukes til avlusning av laksefisk. Disse kjennetegnes ved at de er mer giftige for lakselus enn for laksen som skal behandles (Samuelsen, O., 2008). Disse er dessverre også giftige for andre marine dyr. Derfor er det påbudt å finne ut hvordan avlusningskjemikaliene påvirker dyr som lever i sjøen nær oppdrettsanlegg. Mange tiltak og teknologier er utprøvd for å bøte med problemene. Dette er strukturelle og forebyggende tiltak som bruk av soner, vaksiner, avl og helsefôr, biologisk kontroll gjennom bruk av leppefisk, bruk av legemidler, overvåkning, mekanisk fjerning av lus, filtrering, bruk av ferskvann, presenning og undervannsføring (Fiskehelse rapporten, 2016).

1.2 Lakselus

Krepsdyrparasitter på fisk hører til klassene hoppekreps (*Copepoda*) og fiskelus (*Branchiura*). Noen parasitter finnes bare på én fiskeart (lakselus), mens andre kan bruke nesten hvilken som helst fisk som vert for å gjennomføre sin livssyklus. Den finnes i alle havområder på den nordlige halvkule (Lusedata,



Figur 1. Illustrasjon av lakselusens livssyklus. (Illustrasjon: T. A. Schram). Lakselusen er en parasitt med åtte livsstadier fordelt på tre frittlevende, to fastsittende og tre mobile stadier.

2018). Mengden av lakselus øker med mengden av verter. Veksten i norsk oppdrettsnæring har gjort at det er mange verter for lakselus og dermed endret levevilkårene for lusa. Det finnes også en annen type lus som angriper laksefisk i oppdrettsanlegg kalt «skottelus» (*Caligus elongatus*). Skottelusa er i slekt med lakselusa og den finnes regelmessig på mange arter i sjøen. En av hovedvertene til denne parasitten er nettopp rognkjeksken (Fiskehelse rapporten, 2016). Lakselus er ifølge (HI, 2009) den vanligste parasitten på oppdrettslaks, og det største sykdomsproblemet i næringen. Overvåkning viser at omfanget øker klart, og at lusa i noen tilfeller er blitt resistent mot den foretrukne behandlingsmetoden (Fallang et al., 2004). Lakselus har vist seg å redusere vekst og appetitten hos laksen og biomassen har i prosent sunket mellom 3.62 og 16.55 % avhengig av lokasjon (Abolofia et al., 2017). Lakselus er en parasittisk hoppekreps som lever av slimet, huden og blodet til verten. Den klekkes fra egg rett ut i vannmassene. Hver generasjon tar cirka 6 uker ved en temperatur på 10-12 °C. Lakselus har et bredt hodebryststykke med en smalere bakkropp, og bruker føtter for bevegelse (se figur 1). Den har en livssyklus bestående av 8 stadier med skallskifte imellom, er fritt svømmende i naupilus-stadiet og angriper fisken i copepodit-stadiet. Varigheten til lakselusas fritt svømmende stadier er 10-15 dager dersom sjøtemperaturen er 10°C. I løpet av denne tida vil hovedsakelig de varierende strømforholdene spre lakselusa omkring. For mange lakselus er en trussel mot vill laksefisk og andre arter, og spesielt den ville laksesmolten når den vandrer ut om våren. Blant annet er det forskning som viser at lusa kan leve en tid på sjøørret og sjørøye (Bjørn et al., 2006; Grimnes et al., 1997). Hver vår er ifølge (Meld. St. 16.) oppdrettere pålagt å gjennomføre felles behandling for å sikre så lavt lusenivå som mulig i villaksen sin utvandningsperiode.

1.3 Bekjempelse av lakselus

Målet med lakselusbekjempelsen er å forebygge og begrense skadevirkningen av lakselus på fisk i oppdrettsanlegg og på villlevende bestander av laks og sjøørret, og motvirke utvikling av resistens mot lusemidlene (Lovdata, 2017). Lakselus bekjempes med legemidler, mekaniske metoder og rensefisk.

Lusebehandlinger	2011	2012	2013	2014	2015	2016
Medikamentelle behandlinger	1348	2249	2185	3477	3269	1941
Ikke-medikamentelle behandlinger		136	110	176	185	1174
Sum behandlinger	1348	2385	2295	3653	3454	3115

Tabell 1: Antall lusebehandlinger 2011-2016. Tabellen viser et markant skifte fra behandlinger med legemidler til behandlinger uten (dvs mekanisk, termisk eller behandling med ferskvann) fra 2015 til 2016 (Veterinærinstituttet, 2016).

Det skal til enhver tid være færre enn 0,5 voksen hunnlus av lakselus i gjennomsnitt per fisk i anlegget. Oppdretterne er ansvarlig for å sikre at mengden lakselus ikke er over grensen (Mattilsynet, 2016). Klarer de ikke det med tiltak kan de bli pålagt til å slakte ut. Legemidler har vært den vanligste metoden

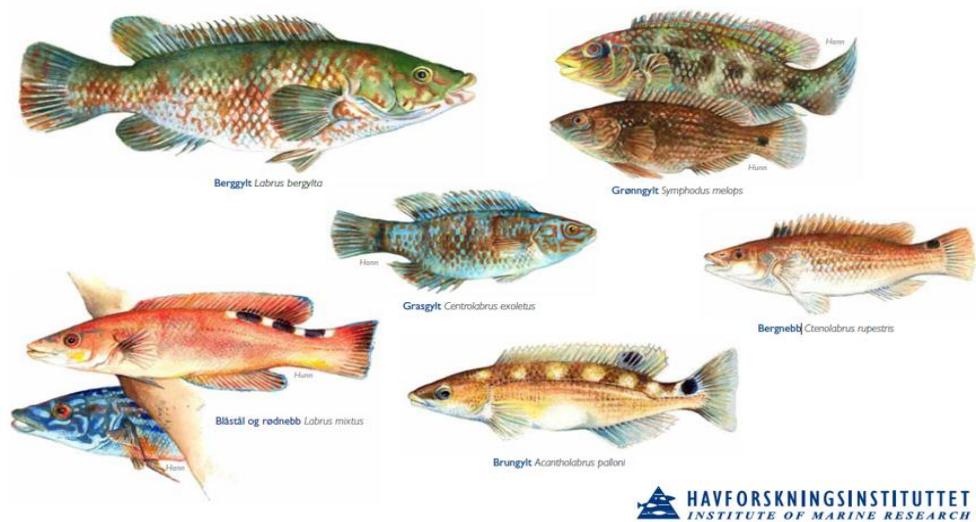
å bekjempe lakselus på, men ifølge mattilsynet ble antall ikke-medikamentelle behandlinger mer enn seksdoblet fra 2015 til 2016, samtidig som behandlinger med legemidler sank med 41 prosent (se tabell 1). De nye metodene fører til at stadig mer fisk dør som følge av tøffere lusebehandlinger. Selv om forebyggende tiltak vil bidra til å redusere problemene med lakselus, vil det også i fremtiden være behov for å gjennomføre kjemisk avlusning av fisk i kombinasjon med alternative avlusningsmetoder. I følge (Burridge et al., 2010) kan disse klassifiseres i to forskjellige grupper basert på hvordan de distribueres til fisken. Disse to måtene er badebehandling og gjennom fôret. Eksempler er organofosfatene, pyretriner og pyretroider. Organofosfatene virker på preadulte og adulte lus og har lammende effekt. Pyretriner og pyretroider som også fungerer på lus i de fastsittende chalimusstadiene fører til koordinasjonssvikt, hyperaktivitet, paralys og død. En annen type legemiddel er kitinhemmere som blokkerer produksjon av kitin og dermed skalldannelse. Stoffene kan dessverre også være giftige for andre marine krepsdyr dyr. En studie av larvene til krabbearten chilensk steinkrabbe viste at selv lave konsentrasjoner av bademiddelet cypermetrin påvirker krabbelarver (Gebauer et al., 2017). Ved medikamentell behandling av lakselus er det altså viktig at både oppdretteren selv og fiskehelsepersonell følger nøye med på hvordan parasittangrepet utvikler seg. Ved å observere og telle lus på individuelle fisk er det forholdsvis lett å danne seg et bilde av situasjonen. Hovedårsaken til lakselus problemet er at den etter gjentatte avlusninger kan utvikle motstand mot avlusningsmidlene (HI, 2010). Dette er en naturlig utvikling siden det er de individene som best tåler avlusningsmiddelet som overlever hver gang. De er bærere av egenskapen som gjør at de overlever behandlingen og kan formere seg videre. Etter hvert kan man oppleve at legemidlene fungerer dårligere eller slutter å fungere (HI, 2010). Nye mekaniske metoder som bruk av ferskvann, laser, børstning og spyling har økt i takt med at lakselusen har utviklet resistens mot legemidlene. Lakselus trives ikke i ferskvann fordi den har liten evne til osmoregulering. Ved å tilsette ferskvann i merdene senkes saltinnholdet i det øverste vannlaget. Dette skal hindre at lakselusen kommer inn i anlegget. Dermed reduseres påslaget. Lav salinitet ser ut til å redusere nivåene av lakselus (Heuch 1995, Tucker et al., 2000, Bricknell et al. 2006). Men det kan vise seg at bruk av ferskvann heller ikke er helt problemfritt da det er sannsynlig at lakselus kan utvikle endret toleranse gjennom økt seleksjonstrykk som følge av behandlinger (Mattilsynet, 2016). En annen løsning er en optisk/mekanisk bekjempelse. Dette er en node som flyter rundt i merden. Noden har maskinsyn og en laserkanon som kan skyte enkeltlus tilsynelatende uten å skade eller stresse fisken. Thermolicer er en metode der laksen eksponeres for vanntemperatur over 30° i cirka 20 sekunder. Lusa har mindre overflate: volum forhold og dør dermed forttere enn laksen ved oppvarming. Dette har dessverre i flere tilfeller ført til massedød av laks i oppdrettsanlegg. Mekanisk fjerning av lakselus ved spyling med sjøvann er en metode som har vært under utvikling de siste årene. Laksen trenges sammen før den pumpes opp i en

maskin hvor lakselusene spyles av. Både trenging og pumping kan medføre stress, oksygenmangel og skader (HI, 2014). En rapport fra Veterinærinstituttet viste at teknologiens påvirkning basert på fiskevelferd kan variere avhengig av både fiskestørrelse, forhold rundt trengingen samt innstillinger med tanke på vanntrykk (VI, 2017). Ved børsting suges laksen først opp i fra merd, før den kostes ren av to myke børster. All lakselus samles opp i et filter og destrueres. En metode som i dag er utstrakt er bruken av både villfanget og oppdrettet renseskisk. Renseskisk spiser lus som sitter på oppdrettsfisken, og lever sammen med oppdrettsfisken i merdene. Bruken av renseskisk har økt kraftig de seneste årene. Denne metoden gir flere fordeler da lakselusnivået holdes nede uten spredning av miljøgifter (Imsland et al., 2014).

1.4 Bruk av renseskisk i bekjempelsen av lakselus

Renseskisk er en velkjent biologisk betegnelse på fiskearter som har spesialisert seg på å beite på parasitter på annen fisk. De mest kjente renseskiskene finnes blant tropiske arter av leppefiskfamilien bergnebb (*Ctenolabrus rupestris*), berggyllt (*Labrus bergyllt*), grønnngyllt (*Symphodus melops*), litt gressgyllt (*Centrolabrus exoletus*), noen rødnebb (*Labrusmixtus*) samt rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) (se figur 2). Leppefisk og rognkjeks blir brukt som renseskisk i lakse- og ørretoppdrett. Berggyllt er mest effektiv på mindre laks og når det ikke er for kaldt i vannet (Havforskningsrapporten, 2016). Den er derfor ikke så effektiv for langt nord der det er kaldere i vannet. Mest effektivt er det å ha flere arter leppefisk i samme merd, ettersom disse har forskjellig adferd, fordeler seg ulikt i merden og på den måten utfyller hverandre. Tidligere, når kjemiske avlusningsmidler var effektivt var interessen for renseskisk liten. Mange anlegg bruker nå renseskisk i kombinasjon med andre metoder (både kjemiske og andre alternativer). Bruk av renseskisk har derfor økt kraftig fra en sped begynnelse på 1990-tallet, til at det nå blir brukt rundt 20 millioner villfangede leppefisk årlig (Havforskningsrapporten, 2016). I tillegg til den villfangede leppefisken, er det også etablert noen få anlegg som produserer berggyllt, og de siste årene har det vært stor satsing på oppdrett av rognkjeks. I 2016 var det 23 oppdrettsselskaper og 48 tillatelser for renseskisk. Produksjonen av Rognkjeks har økt hvert år siden 2014 til 15 168 266 fisk i 2016. Det har samtidig vært en reduksjon i produksjon av berggyllt til 423 600 fisk i samme tidsperiode. Gjennomsnittlig pris for berggyllt var kr 28,59 og for rognkjeks kr 18,16 i 2016. Rognkjeks har økt til å bli den tredje viktigste oppdrettsarten i Norge etter laks og regnbueørret med hensyn til verdi (Fiskeridirektoratet, 2016).

Det er en rekke utfordringer forbundet med å bruke så store mengder villfanget leppefisk hvert år. Fisket skal ikke ha varige negative effekter på bestandene. Utfisking av leppefisk kan påvirke økosystemene våre. I tillegg flyttes leppefisk over større avstander, og rømlinger kan viske ut lokale tilpasninger og spre sykdommer (Risikorapport norsk fiskeoppdrett, 2017).



Figur 2. Plansje for bestemmelse av leppefisk (HI, 2010)

Det er vanlig med 5% innblanding av rensefisk i merdene, men dette blir ofte justert ut fra lusesituasjonen og tilgang på rensefisk. For at rensefisken skal holde seg friske og være effektive er forholdene viktige. Det må være rikelig skjul og jevnlig fôring av fisken. Rognkjeks spiser ofte plankton, maneter og organismer som vokser på merder. Dersom det er god tilgang på næring inne i merdene blir rognkjeks mindre effektiv som luseplukker, noe som i perioder kan være et problem (Havforskningsrapporten, 2016).



Figur 3. Rognkjeks (foto Jan Jensen)

Rensefisken spiser for det meste de største stadiene av lus, og spesielt hunn lus med eggstrenger forsvinner fort (Havforskningsrapporten, 2016), en effekt av dette er at det gir lite smitte til omgivelsene. En annen effekt er at bruk av rensefisk gjør at laksen krever mindre håndtering. Dette har også mange fordeler da enhver håndtering krever sulting av laksen, som medfører nedsatt vekst. I tillegg er det alltid risiko for uhell ved pumping, trenging, vaksinerings og ved kjemisk behandling. Ekstra håndtering medfører også mer stress for fisken og dermed nedsatt fiskevelferd (Iversen & Eliassen, 2013, Iversen et al., 2009).

1.5 Rognkjeks

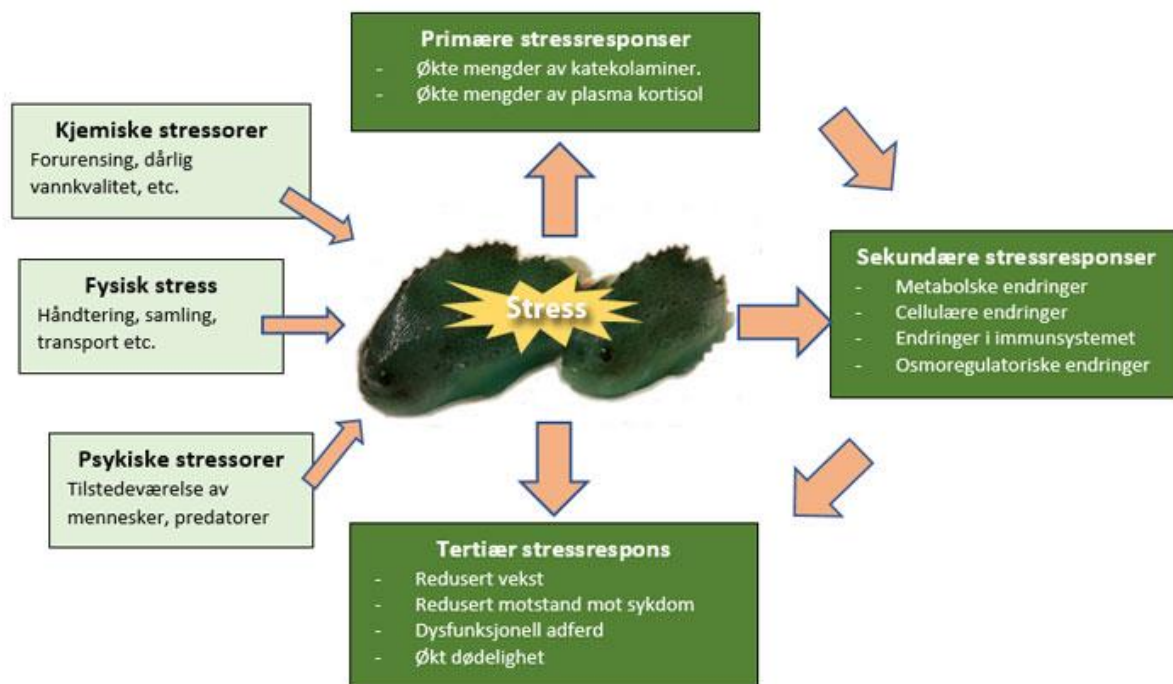
Rognkjeks (figur 3) er en fiskeart som er vanlig langs hele norskekysten. Den har en rund kropp med tykk hud og sju rekker med beinknuter på sidene og buken. Mellom brystfinnene er det en stor sugeskive som er dannet av bukfinnene, og denne bruker den til å feste seg til steiner eller annet underlag (Davenport, 1985). Rognkjeks kommer inn om våren for å gyte på grunt vann. Hver rognkjeks gyter en klump som er omtrent en sjuendedel av kroppsvekten. Klumpen er klebrig og fester seg til steiner eller fjell. Hannen vokter eggklumpen til eggene klekkes etter cirka 60 dager. De nyklekte larvene måler rundt 4,5-6 mm, er grønnaktige og utrustet med en liten plommesekk som varer i noen få dager. Etter fire døgn er sugeskiven på rognkjeks blitt utviklet, og den er da i stand til å feste seg til tare. De to første årene holder ungfisken til i strandsonen, før de vandrer ut på dypt vann for å unngå predasjon. Fisken mangler svømmeblære og hviler mest mulig ved å suge seg fast på ulike overflater. Den er aktiv hele året og viser fortsatt god appetitt ved temperaturer helt ned mot 3°C (Ingòlfsson & Kristjånsen, 2002). Man skiller mellom rognkallen som er hanfisk (kan bli opptil 30 cm) og rognkjeks som er hunfisk (kan bli opptil 60 cm). Morfologien er også forskjellig da rognkallen får en tydelig ryggfinne mens rognkjeks er bredere over magen og utvikler en klump istedenfor en ryggfinne. Rognkjeks tar ikke til seg næring i gytetiden, men på dypere vann senere på året er det stor næringsaktivitet, der pelagiske krepsdyr og maneter er den viktigste føden. Arten er utbredt på begge sider av Nord-Atlanteren der den lever fritt svømmende (på 50-150 meters dyp) i havet store deler av livet (Blacker, 1983; Holst 1993). Sykdomsutbrudd hos arten er et problem. Hittil er ingen virusinfeksjon kjent hos arten, men man har i oppdrett opplevd flere typer av bakterieinfeksjoner. Det er også funnet ni arter naturlig forekommende encellede parasitter hos rognkjeks (Havforskningsrapporten, 2014). Rognkjeks ble allerede i 2001 foreslått som en avluser da man fant over 100 lakselus i en rognkjeks (Willumsen, 2001). I merder med en rognkjeks tetthet på 10-15% var mengden av lakselus signifikant lavere (Imsland, et al., 2014).

2 Stress

Stress er definert som en tilstand hvor den dynamiske likevekten av en organisme, kalt homeostase er truet eller forstyrret som følge av virkningene av indre eller ytre stimuli, ofte definert som stressfaktorer (Selye 1950; Varsamos et al. 2006; Wendelar Bonga 1997, 2011). Stressfaktorer i akvakultur kan være dårlig vannkjemi, håndtering, transport, vaksinerer, predatorer, sykdom underernæring og liknende. Definisjonen av stress er noe som fortsatt debatteres (Wendelar Bonga 1997). Men stress-konseptet er fortsatt viktig for å forstå virveldyrs evne til å utføre nødvendige livsfunksjoner under ugunstige situasjoner som promoterer overlevelse (Schreck et al. 1993). Flere definisjoner har vært foreslått (Schreck 2010), men i hovedsak handler det om en fysiologisk respons skapt av en eller flere stressorer. En mer spesifikk definisjon involverer en endokrin kaskade som svar på en ikke-spesifikk respons. I et noe bredere perspektiv på stress sier (Schreck 2010) at stress er en fysiologisk kaskade av hendelser som oppstår når organismen forsøker å re-etablere homeostase i møte med en utfordring. Det har de siste årene vært forsket mye på stress hos oppdrettsfisk og konsekvensene dette har økonomisk og velferdsmessig. Dårligere kvalitet og økt dødelighet får store økonomiske konsekvenser (Iversen et al, 2013). Den fysiologiske responsen på stress har fått mye oppmerksomhet i løpet av de siste 10-årene forskningsmessig, og man har i senere tid innført begrepet allostase for å komplettere stress konseptet, og bedre beskrive hvilken rolle primære mediatorer har på en stressfaktor (Goyman og Wingfield 2004; McEwen 1998, 2005; McEwen og Wingfield 2003; Wingfield 2005). Allostase vil si å oppnå stabilitet gjennom endringer. Dette er en prosess som støtter homeostase, som miljø og/eller endringer i livshistorie stadier. Allostase er et begrep som ble introdusert på slutten av åttitallet av Sterling og Eyer (1998). McEwen (1998) og McEwen og Wingfield (2003) betrakter allostase som evnen til å oppnå stabilitet gjennom endring. Opprinnelsen for dette konseptet er basert på en ny tolkning og kritikk av Selye's General Adaption Syndrom (GAS). McEwen mente at den tredje fasen trengte en tolkning i lys av ny kunnskap om stressmediatorer, som avhengig av størrelse og varighet på responsen kunne ha positiv eller skadelig virkning (McEwen 2005).

2.1 Den fysiologiske stressrespons

Vi deler gjerne de fysiologiske stressresponsen hos fisk inn i primære, sekundære og tertiære stressrespons (se figur 4). De primære stressresponsene involverer nevroendokrine responser, som



Figur 4. Den fysiologiske stressresponsen (etter figur av Martin H. Iversen)

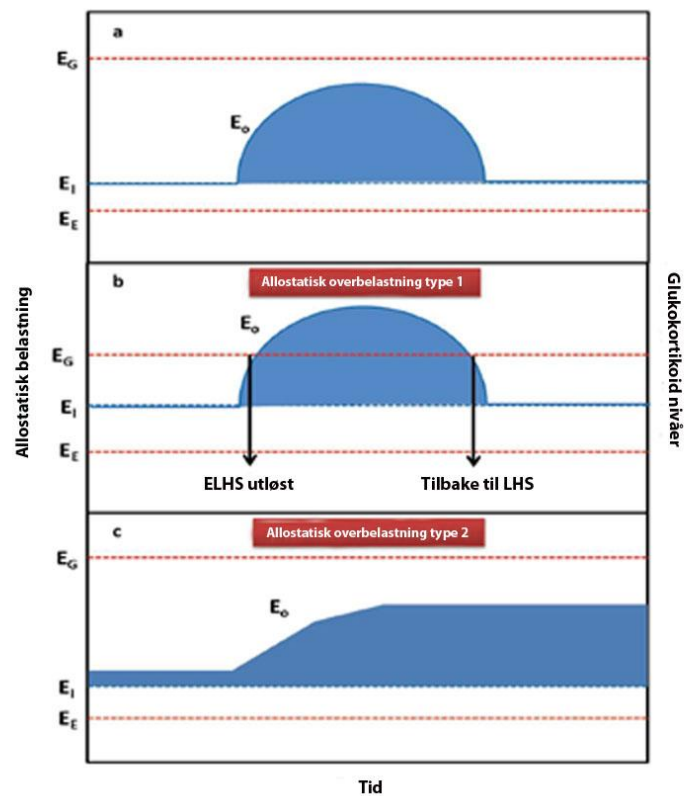
inkluderer frigjøring av katekolaminer. Dette er i hovedsak utskillelse av adrenalin og noradrenalin fra kromafint vev, og stimulering av hypotalamus-hypofyse-interrenal (HPI) aksen som endres ved dannelse av kortikosteroider hvor kortisol er det viktigste. Sekundære responser relateres til fysiologiske endringer og er blant annet metabolske, cellulære, osmoregulatoriske og hematologiske endringer i immune funksjonen (Barton 2002, Iversen et al. 1998; Mommsen et al. 1999; Selye 1950, 1973; Wendelaar Bonga 1997, 2011). Ved langvarig stress kan tertiære responser være en konsekvens. Dette er responser som nedsatt vekst, dårligere immunforsvar, svømmeevne og utholdenhet, og økt dødelighet. En slik respons kan omfatte hele organismen eller hele populasjonen (Barton 2002; Wendelaar Bonga, 1997).

2.2 Allotase, allostatisk tilstand og overbelastning

Allotase er altså en endring som har som mål å oppnå stabilitet. Denne prosessen støtter homeostase. Primære formidlere av allotase er typiske hormoner som kortikosteroider, katekolaminer og cytokiner. Allostatisk tilstand refererer til endrede og vedvarende aktivitet av de primære endokrine formidlerne, som igjen styrer den fysiologiske responsen i forhold til endrede omgivelser (Goymann og Wingfield 2004; McEwen 1998, 2005, Wingfield 2005). Med andre ord kan altså en allostatisk tilstand endre aktivitetsnivået hos de primære budbringerne. Tilstanden kan opprettholdes i

begrensede perioder dersom matinntaket og lagret energi kan støtte opp om energibehovet. Dersom ubalansen fortsetter i lengre perioder vil vi få en allostatisk belastning (McEwen 2005).

Allostatisk belastning kan dermed betraktes som den energien som kreves av en organisme for å opprettholde de daglige rutinene som det å skaffe mat og liknende, i tillegg til den energien som kreves for overlevelse og formering (Goymann og Wingfield 2004). Alle disse tilpasningene for å motvirke stress kalles på engelsk «The emergency life history stage», her forkortet (ELHS). ELHS er viktig for å hele tiden justere organismens helsetilstand (se figur 5).



Figur 5. Skjematiske representasjon av allostatisk belastning (-) og glukokortid sekresjon (farget blått). E_E = hvile energiforbruk (basalforbrenning), E_I = energien som trengs for å oppta mat og prosessere den under ideelle forhold, E_o = energien som trengs for å oppta mat og prosessere den under ikke-ideelle forhold. E_G = energi som opptas fra miljøet. (a) Allostatisk belastning glukokortid konsentrasjoner øker samtidig som energi behovet for organismen (E_o) øker. (b) Allostatisk overbelastning type 1: når $E_o > E_G$, vil glukokortikoidene utløse en ELHS. ELHS motvirker andre livsprosesser og resulterer i en netto minskning i allostatisk overbelastning og glukokortikoid konsentrasjoner under E_G . Organismen kan dermed overleve til tross for negative endringer i miljøet. (c) Allostatisk overbelastning type 2: ved permanente negative endringer som for eksempel en vedvarende stress, øker E_o og forblir høy. Glukokortikoid konsentrasjonene øker og forblir høye, men siden E_o ikke overskrider E_G blir ikke ELHS utløst. Figur: Iversen, 2013.

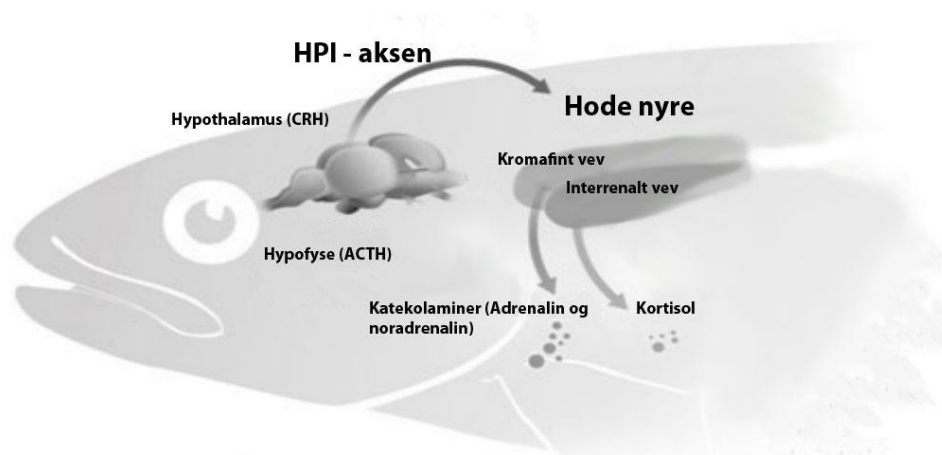
Kortikosteroider synes altså å være viktig med hensyn på organisering av EHLS-hendelser og atferd (Wingfield 2005, Wingfield og Sapolsky 2003). En økning i allostatisk belastning er vanligvis etterfulgt av en økning i glukokortikoide konsentrasjoner. Dette kan utløse atferdsmessige og fysiologiske prosesser som bidrar til å redusere organismens allostatisk belastning, slik at hvert individ kan unngå eller motstå den potensielle faren for kronisk stress (Goymann og Wingfield 2004). Innenfor visse grenser, representerer en økning i allostatisk belastning en adaptiv respons til sesongmessige endringer og andre krav. Men hvis tilleggsbelastning av uforutsigbare hendelser som sykdom, menneskelige forstyrrelser og negative sosiale interaksjoner er innført, kan allostatisk belastning øke dramatisk (Wingfield og Sapolsky 2003). Økninger i allostatisk belastning er vanligvis ledsaget av en økning av glukokortikoide konsentrasjoner (Iversen 2013). Dersom allostatisk belastning øker dramatisk så kan energibehovet (EO) til en organisme overskride de tilgjengelige energiforsyningene (EG), noe som resulterer i type I allostatisk overbelastning. På dette tidspunktet når konsentrasjonene av glukokortikoid terskelen der de utløser en ELHS. En slik ELHS kan undertrykke ekspresjonen av andre livshistorie trinn (tildeling av energireserver), som deretter resulterer i en netto reduksjon i energibehovet under den tilgjengelige tilførsel av energi og en netto reduksjon av allostatisk belastning. Denne typen allostatisk overbelastning hjelper organismen til å takle uforutsigbare hendelser som enten øker kostnadene ved å skaffe tilgjengelige ressurser eller ved å kompromittere tilgjengeligheten av disse ressursene (reducere EG) (Goymann og Wingfield 2004). Energiforbruket øker i slike typer av allostatisk belastning, men i de fleste tilfeller overstiger den ikke energiforsyningen og dermed utløses ikke en ELHS (McEwen 2005; McEwen og Wingfield 2003). Dersom denne typen konflikt er permanent kan det resultere i en tilstand som har blitt kalt type II allostatisk overbelastning. Den er preget av kronisk forhøyet glukokortikoid sekresjon med et stort potensial for sykdom. (Goymann og Wingfield 2004; Juster et al., 2010; McEwen 2005, McEwen og Wingfield 2003). På en forenklet og generell måte kan man konkludere med at overbelastning type I kan være assosiert med mer akutte stressfaktorer og type II overbelastning være assosiert med flere kroniske stressfaktorer (Iversen 2013). Men som Schreck (2010) vektla, er forskjellen mellom akutt og kronisk relativt uklart, og det er vanskelig å generalisere om effekten av forskjellige belastninger på forskjellige dyr. Men det å bruke uttrykkene akutt og kronisk er nyttig for å forstå og forenkle stresskonseptet. Stress er også en individuell erfaring da fisk kan reagere forskjellig ovenfor samme stressor og oppleve forskjellig utfall. Allostatisk belastning kan øke «fitness» på kort sikt men være skadelig på lengre sikt (Schreck 2010).

2.3 Endokrine stressresponser

Det finnes to endokrine stressresponser hos fisk. En adrenergisk respons som fører til økte konsentrasjoner av adrenalin og nordadrenalin i blodplasma, og tre forskjellige endokrine akser. Den kortikotrofiske-, melanotrofiske- og den tyrotrofiske aksene (Bernier et al. 2009). I denne oppgaven er det fokusert på den kortikotrofiske, kalt HPI-aksen, som fører til økte konsentrasjoner av kortisol i blodplasma når den blir aktivert (Wendelar Bonga, 2011).

2.3.1 HPI-akserespons

Alle komponentene i HPI-aksen hos pattedyr er tilstede hos fisk men med noen strukturelle og funksjonelle endringer. Denne aksene er et resultat av konvergent evolusjon siden artene har utviklet liknende strukturer uavhengig av hverandre (Tsalafouta et al., 2014). En "akse" er en kunstig og konseptuell tilnærming for å studere og beskrive hvordan det endokrine systemet er under kontroll. En typisk endokrin akse er lagdelt med kontrollerende hierarki. I pattedyr og teleost består det regulatoriske endokrine systemet av hypothalamus (med tilstøtende områder i hjernen), hypofysen, og i tillegg perifere endokrine kjertler. Hos teleost har vi en liknende organisering bortsett fra at istedenfor kjertler har teleost celler som er regulert av hypofysens sekresjon (Hadley 1992). Hypotalamus frigjør kortikotrofin frigjørende hormon, CRH eller kortikotrofin frigjørende faktor; CRF. Disse hormonene stimulerer i sin tur adenohipofysial cellene til å frigjøre adrenokortikotrop hormont; ACTH (Kortikotropin) inn i det generelle kretsløpet. ACTH vil i sin tur stimulere cellene i binyrebarken (*zona fasciculata*) til å syntetisere og frigjøre steroidhormoner, vanligvis glukokortikoider (kortisol og kortikosteron) (Iversen, 2013).

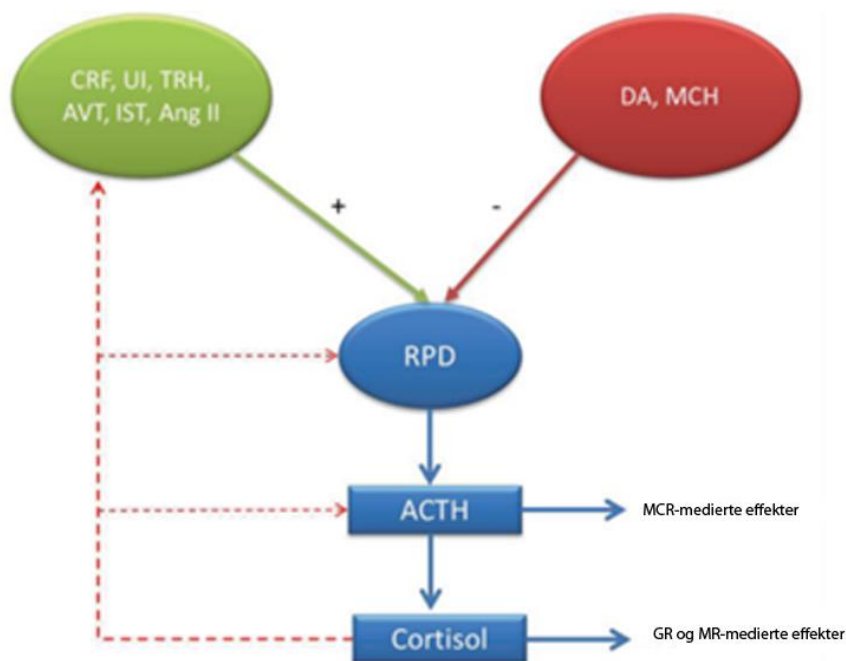


Figur 6: Organene i HPI-aksen ansvarlige for stressresponser. Modifisert etter Khansari, et al, 2017

Kortisol har flere forskjellige oppgaver i teleost som å stimulere proteinkatabolismen i musklene og glukogeneringen i leveren. Kortisol kan også hemme opptak av glukose til andre celler foruten cellene i nervesystemet, dette resulterer i heving av blodsukker som brukes av hjernen under «Freeze-, flight-, fight» syndromet hos pattedyr (Balment et al 2006;. Geslin og Auperin 2004). Kortisol sammen med andre glukokortikoider virker tilbake på seg selv som «negativ feedback» primært på nivå med hjernen for å undertrykke frigjøring av CRH og dermed redusere ACTH sekresjonen. Dette vil igjen stoppe eller redusere kortisol sekresjonen fra binyrebarken. Kortisol har også en kortere negativ feedback loop hvor kortisol har en undertrykkende rolle på ACTH utskillelsen i adenohipofysen, og dermed en innvirkning på kortisol utskillelsen i hode-nyrene hos pattedyr (Greenspan og Gradner 2004; Hadley 1992). Alle virveldyr har hypofyse og den er en ren nevroendokrin kjertel som skiller ut en rekke hormoner under påvirkning av spesialiserte nerveceller i hjernen. Den menneskelige hypofysen består av en distinkt adenohipofyse (AH) og en nevrohipofyse (NH). Mens kommunikasjonen mellom AH og hjernen hos pattedyr oppfylles av et lokalt-hypofyse-nettverkssystem, så er dette systemet fraværende i hypofysekjertelen i teleost. I teleost er det ingen forbindelse mellom NH og AH, og direkte forbindelse mellom de endokrine cellene i AH (Agulleiro et al 2006;. Pankhurst 2011; Schreck 2010; Singh et al. 1999; Wendelar Bonga 1997). AH er delt i tre deler i fisk: rostral pars distalis (RPD), proksimale pars distalis (PPD) og pars intermedia (PI).

2.4 Kontroll av kortisolsekresjon

Kortisol er altså hovedhormonet som skilles ut, og kontrollen av kortisol sekresjon i teleost er kompleks. Det er flere hormoner med kortikotrofiniske aksjoner, hvor den viktigste ser ut til å være kortikotrofin frigjørende hormon/faktor CRH. Andre hormoner er atrial natriuretisk faktor, angiotensin II, veksthormon, thyroxin, arginin vasotocin og katekolaminer (Wendelar Bonga 2011). Kortisol har også vist seg også å undertrykke seg selv gjennom negativ tilbakekobling fra egen sekresjon på det interrenale nivået (Bradford et al., 1992). I tillegg har interleukin liknende faktorer både hemmende og stimulerende effekt på kortisolutskillelsen, men denne effekten er sannsynligvis bare involvert i modulerende kortikotrofiniske handlinger fra hormoner som stammer fra hypofysen (Wendelar Bonga 1997, 2011). Studier der man har fjernet hypofysen hos fisk har vist at kjertelen dominerer kontroll av kortisol sekresjon (Wendelar Bonga 2011).



Figur 7. Hypotalamus-hypofyse-interrenalaksen (HPI-aksen) (Iversen, 2013).

2.4.1 Kortikoliberin (CRH)

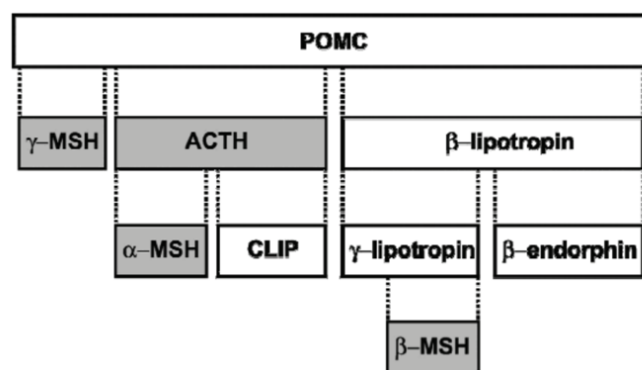
Kortikotrofin frigjørende hormon/faktor CRH er en peptid rest bestående av 41 aminosyrer som likner mye på urotensin i struktur som finnes i urofysen hos beinfisk (Hadley 1992). Av de mange faktorer som påvirker sekresjon av ACTH er det CRH som anses å være hovedregulatoren (Bernier et al., 2009). CRH nevroner er dokumentert i preoptisk-nucleus (NPO) og i tuberis-nucleus (NLT) i flere forskjellige typer fisk, blant annet Chinook laks, gullfisk, regnbueørret og hvit sucker (Iversen 2013). I flere arter er CRH peptidet lokalisert sammen med peptidet arginin vasotocin (AVT) og med urotensin I (UI) i NLT region av hjernen (Norris og Hobbs 2006). Det antydes at CRH nevroner i NPO og NLT har ulike funksjoner ettersom lesjon i gullfisk NPO fjernet all plasmakortisol. Dette hadde ingen effekt på innholdet i ACTH, som i motsetning til lesjoner i NLT reduserte både hypofysens innhold av ACTH, så vel som plasma kortisol (Norris og Hobbs 2006). Andre faktorer/hormoner som stimulerer utskillelsen av ACTH er uotensin I (UI) angiotensin II (Ang II) og thyrotrofin-frigjørende hormon (TRH). Angiotensin I og II kan stimulere ACTH sekresjon *in vitro* i gullfisk RPD, men de hadde ingen forsterkende effekt på den kortikotrofiske aktiviteten av CRH eller UI (Weld et al., 1987). Selv om TRH hadde positiv effekt *in vitro* på ACTH utskillelsen hos dorade (*Sparus aurata*) (Rotllant et al. 2000), hadde det ingen effekt *in vitro* i ACTH-utskillelsen hos gullfisk (Bernier et al. 2009). Hos pattedyr har urocortin (som er analog til UI) en potent ACTH «releasing» aktivitet i *in vivo*-forsøk (Oki og Sasano 2004). Flere studier er

nødvendig for å fastslå den relative betydningen av endogen UI i fisk som kortikotrofisk faktor (Bernier et al 2009; Flik et al 2006). Der er også god dokumentasjon på at nevrohypofysiale hormoner deltar i regulering av ACTH. I in vitro-forsøk har både arginin vasotocin (AVT) og istocin (IST) vist seg å stimulere ACTH frigjøring fra hypofysen hos gullfisk (Fryer et al. 1985) og regnbueørret (Backstrøm og Winberg 2009). I gullfisk er AVT og IST ikke like sterk som CRH og UI, (Lederis et al. 1994) viste at den maksimale ACTH utgivelsesaktiviteten av AVT og IST er omtrent halvparten av det som er fra CRH og UI, og i motsetning til i pattedyr (Aguilera et al. 2008). Verken AVT eller IST økte de kortikotrofiske aksjonene til CRH eller UI (Fryer et al. 1985). Hos regnbueørret er det observert liknende effekter fra AVT og IST på ACTH-utskillende egenskaper og AVT forsterket ikke den ACTH-utskillende egenskapene til CRH sammenliknet med gullfisk (Bernier 2006; Bernier et al 2009).

Det finnes også hemmende faktorer på ACTH. Melanin-konsentrerende hormon (MCH) og dopamin (DA) er begge av hypotalamisk opprinnelse og kan hemme ACTH utskillelsen i hypofysen. MCH i regnbueørret har vist seg å være en potent inhibitor in vitro på ACTH-skresjonen i rostral pars distalis (RPD) (Baker et al 1985b; Barber et al 1987). I karpe (*Cyprinus carpio*) så antyder in vitro studier at frigjøring av ACTH er under DA hemmende kontroll og bare CRH kan stimulere ACTH i tilstedeværelsen av milde DA hemmende faktorer. Men hvorvidt hemmende funksjon av DA på ACTH sekresjonen i karpe er et generelt trekk i teleost sekresjonen må det gjøres ytterligere undersøkelser (Bernier et al. 2009).

2.4.2 Adrenokortikotropt hormon (ACTH)

Proopiomelanocortin (POMC) er en forløper til en rekke peptider som kan bli delt inn i tre grupper: adrenokortikotropt hormon (ACTH), endorfin-lignende og MSH-lignende produkter (figur 8).



Figur 8. Opioid peptider avledet fra proopiomelanocortin (POMC) deling. Fra Mosconi et al. (2006).

ACTH er det minste peptidhormonet i fremre hypofyse (AN) og består av en enkelt lineær kjede av 39 aminosyrer. Den biologisk aktive delen i ACTH er fra 1-24 og ser ut til å være konstant i pattedyr (Algulleiro et al 2006;. Hadley 1992). ACTH blir produsert i celler i RPD regionen av AN, og regulerer kortisol utskillelsen, og er involvert i både stressresponsen (Mormede et al 2007;. Wendelaar Bonga 2011), og i tilpasning til hypoosmotiske miljøer (Björnsson et al. 2010, 2011). Formålet med ACTH i fisk er å regulere steroidogenesen i interrenal cellene i hodenyren (Wendelar Bonga 1997, 2011). ACTH og andre POMC avledede melanokortiner oppgaver er å nå melanokortinreseptorer (MCR) i hodenyrene. MCR er en del av en superfamilie av syv transmembrane G-proteiner. Denne reseptoren styrer signalformidling fra celleoverflaten og inn i cellen ved å stimulere adenylatsyklase cAMP, som er sekundær budbringer system i cella (Bernier et al. 2009). I flere arter av fisk (som hos pattedyr) har det blitt identifisert fem typer MCR (Flik et al 2006;. Logan et al 2003;. Schiöth et al 2005). Både i fisk og pattedyr er ACTH den eneste liganden som binder og aktiverer MC2R, og både ACTH og MSH binder seg til fire andre MCR (Schiöth et al 2005). Men i motsetning til pattedyr så har de fire MCR (MCR1R, MC3R, MC4R og MC5R) større affinitet for ACTH1-14 enn for ulike MSH'er. Derfor kan bindingsegenskapene til de forskjellige MCRene i fisk (og kylling) antyde at ACTH er en eldre ligand enn MSH. Dette indikerer at affiniteten MCR'ene har for MSH har utviklet seg i høyere virveldyr (Schiöth et al., 2005).

2.5 Kortisol

Når fisken utsettes for en stress faktor (trussel) blir den fysiologiske stressresponsen initiert av sentralnervesystemet (CNS). Sympatiske nervefibre som innerverer kromafine celler, stimulerer frigjøringen av katekolaminer (CA) via kolinerge reseptorer (Wendelar Bonga, 1997; 2011). Det kromafine vevet befinner seg hovedsakelig i den fremre delen av nyrene hos teleost fisk. Sirkulerende nivåer av katekolaminer øker umiddelbart etter en stress-hendelse men er uegnet som indikator da den brytes raskt ned (Wendelar Bonga 1997; 2011). Man vet at kortisol har en adaptiv funksjon mot stressorer og at den er med å regulere energimetabolismen, hydro-mineralbalansen, oksygen opptak og ulike funksjoner i immunforsvaret (Schreck, 2010). Mens plasmakortisol blir brukt som en gyldig indikator for stress hos fisk da frigjøringen er forsinket i forhold til katekolaminer (Wendelar Bonga 1997, 2010), er det få studier der det måles «kinetikken» reaksjonshastigheten for kortisol i fisk (Mommsen et al., 1999). Plasmakortisol gjenspeiler nettoeffekten av produksjon og utskillelse av hormonet (Mommsen et al. 1999). Kortisol er ofte forbundet med de skadelige effektene av stress inkludert reduserte vekstrater og reproduktiv dysfunksjon (Mommsen et al 1999, Morgan et al 1999, Schreck et al. 2001), økt forekomst av sykdom og parasitter (Schreck et al 1993), redusert

sjøvannstoleranse (Iversen et al., 1998) og overlevelse (Iversen et al., 1998; 2005). Det er foreslått at dersom ikke fisken får tilstrekkelig tid til å hente seg inn etter stress, kan en ny stressituasjon få fatale konsekvenser (Carmicheal, 1984). Slik kan altså stress akkumuleres. Denne kunnskapen er viktig da en oppdretter potensielt kan forhindre uønskede situasjoner ved å gi fisken tilstrekkelig med restitusjon (Barton 2002).

Fisk har ikke nyre slik som pattedyr og kortisolproduserende celler kalt interrenal celler er spredt i «hode-nyre regionen» hovedsakelig langs bakre kardinal årer og dets forgreininger. ACTH binder seg til MC2R reseptorer i de steroidogene adrenokortikale cellene og her blir det aktivert enzymsystemer som konverterer kolesterol til kortisol (Aluru og Vijayan 2009). ACTH forbedrer kapasiteten til steroidcellene ved å stimulere det steroidgenisk-akutt-regulatoriske transport proteinet (StAR) (Aluru et al 2005; Aluru og Vijayan 2009; Hagen et al., 2006), cytokrom P450 sidekjede spalter enzymet (P450_{scc}) (Aluru et al., 2005) og 11 β -hydroksylase (P450_{c11}) (Hagen et al., 2006). StAR letter transporten av pregnenolon (som er det hastighetbegrensede enzymatiske trinnet av kortisol syntesen) og endelig (etter flere enzymatiske prosesser) så konverterer P450_{c11} 11-deoksykortisol til kortisol (Mommsen et al., 1999), og slik foregår biosyntesen av kortisol. ACTH har en stimulerende effekt på MC2R ekspresjon som også mest sannsynlig bidrar til økt steroidgenisk effekt etter akutte stressfaktorerer (Hagen et al., 2006). Det adrenokortikale vevet i fisk vil i de fleste tilfeller kun skille ut ét kortikosteroid som er kortisol, bruskfisk utsonderer en unik α -hydroxycorticosterone og lungefisk primært korticosterone eller deoksykorticosterone. Sammenliknet med pattedyr så er aldosteron bare påvist en gang i teleost, og det virker som kortisol har funksjon som både mineralkortikoid og glukokortikoid (Norris & Hobbs, 2006).

Kortisol finnes i plasma i fri form og bundet til et transportprotein kalt kortikosteroid bindende globulin (CBG) eller transcortin. Den proteinbundne delen av kortisol er i likevekt med kortisol plasma, det er bare «fri» kortisol som binder seg til membran reseptorer på overflaten eller mer vanlig, cytosoliske reseptorer inne i målcellen, siden kortisol og fosfolipidlagene i cellemembranene er fettløselige kan kortisol vandre «fritt» via diffusjon (Caldwell et al., 1991). Tilsynelatende finnes det plasmaproteiner i alle virveldyr som er i stand til å binde kortisol selv om prosentandelen av bundet kortisol er lavere i fisk enn i pattedyr. Kortikosteroidene, kortisol globulin (CBG) og albumin er de viktigste kortisolbindende proteinene i pattedyr og fugler (Siiteri et al., 1982). Et spesifikt kortisolbindende protein har ennå ikke blitt funnet i fisk (Caldwell et al., 1991) viste at cirka 20% av kortisol i umodne regnbueørret var bundet til et globulin-liknende molekyl og 40% var bundet til et humant albumin-liknende protein.

2.5.1 Glukokortikoid og mineralkortikoid reseptorer

Målet for kortisol i teleost er ligand-aktiverte transkripsjonsfaktorer som inkluderer både glukokortikoid reseptorer (GR) og mineralkortikoid reseptorer (MR). Disse reseptorene utviklet seg etter en genom dupliserings hendelse i de tidlige gnathostomes og en annen hendelse som dateres tilbake til 335 millioner år siden som førte til to forskjellige GR proteiner og gjenværende duplikat av MR (Bury og Sturm, 2007). Således, i de fleste teleost så er kortisol signalet overført via to reseptorer (MR og GR) (Prunet et al., 2006). Det finnes noen varianter fra denne regelen, som sebrafisk som har en enkel GR reseptor og et enkelt MR-gen og en GR β -spleisevariant, men som oppfører seg som en negativ hemmer av GR α transactivation (Alsop & Vijayan 2009). Ved ligandbinding gjennomgår GR en 27-konformasjonsendring som forflyttes fra HSP og translokaliseres til kjernen hvor den kan modifisere ekspresjon av multiple gener gjennom en rekke mekanismer (Basu et al., 2003;. Basu et al., 2001).

Uttrykk for GRs er funnet i leveren, gjeller, tarm, nyre, milt, hjerte, skjelettmuskel, gonader, leukocytter og erytrocytter (Bernier et al 2009;. Mommsen et al 1999.; Takahashi et al. 2006; Vijayan et al., 2003). Både GR og MR uttrykkes i cellene i flere områder av hjernen, for eksempel i dorsal telecephalon, NPO, NLT, i interior lobe of the hypothalamus and the caudal neurosecretory system, i tillegg har det også blitt påvist i *Ans pars distalis* og *pars intermedia* (Pepels et al 2004;. Stolte et al., 2008).

2.5.2 Negativ tilbakemelding

Det er flere mulige tilbakemeldingsveier for plasma kortisol på HPI-aksen. Implantater i hjernen (intraperitoneal) kan inaktivere eller hemme CRH uttrykket i NPO hos gullfisk (Bernier et al 2004;. Bernier et al., 1999), og ved fjernelse av den negative tilbakemeldingen av kortisol ved farmakologisk adenektomi (metrypone) fører det til økt CRH produksjon i NPO i hvit sucker (Okawara et al. 1992) og gullfisk (Bernier & Peter, 2001). Mens det er kjent at ekspresjon i pattedyr differensielt reguleres i adskilte områder av hjernen (Shepard et al., 2000, 2006 Smith et al., 1997), er det usikkert om liknende effekter finnes på liknende celletyper med kortisol på uttrykk av CRH i teleost (Bernier et al., 2009). På hypofyse nivå hemmer kortisol frigjøring av ACTH, og den ACTH-frigjørende aktiviteten av CRH og UI i gullfisk (Fryer et al., 1985). Eksogent kortisol kan også undertrykke ACTH nivåer i dorade (Rotllant et al., 2000) og ørret (Bernier et al., 2009), og en dose avhengig reduksjon i hypofysens POMC uttrykk og plasma ACTH nivåer i regnbueørret har også blitt dokumentert (Bernier et al. 2009). I interrenal cellene kan kortisol undertrykke sin egen sekresjon som en parakrin tilbakemeldingseffekt. Dette har blitt diskutert da det har blitt dokumentert i coho (Bradford et al., 1992), men man har ikke klart å dokumentere dette i dorade (Rotlland et al. 2000). Flere rapporter har også vist at kortisol kan redusere GR reseptor protein (Aluru og Vijayan 2009; Veillette et al 2007;. Wendelar Bonga 2011). Mens det er klare bevis på at kortisol kan begrense omfanget og varigheten av den endokrine stressresponsen hos

fisk via flere negative «tilbakemeldingslooper», de molekylære mekanismer bak denne reguleringen er fortsatt uklart og dårlig forstått (Bernier et al., 2009; Wendelaar Bonga 2011).

2.5.3 Problemstilling

I denne oppgaven skal jeg se på akuttstressfasen hos liten rognkjeks og beskrive gjenvinningsfasen inntil 72 timer etter påført stressor på viktige fysiologiske parametere som plasmakortisol, glukose, laktat, osmolalitet, klor og magnesium hos liten rognkjeks. I tillegg ble det gjennomført en såkalt HPI-akse test ved forsøksstart og slutt. Det ble kjørt to grupper; 1. akutt stress og 2. kontroll (ingen stress). Følgende fire hypoteser ble testet ut:

1. Det er ingen forskjell i stressresponsen hos rognkjeks etter akutt allostatisk belastning.
2. Det er ingen forskjell i de primære-, sekundære- og tertiære stressresponsene etter akutt allostatisk belastning.
3. Det er ingen forskjell i den adrenokortikotropisk hormonelle (ACTH) sensitiviteten hos liten rognkjeks i gruppe 1 og 2.
4. Det er ingen forskjell i det negative tilbakekoblingssystemet til HPI-aksen hos rognkjeks for gruppe 1 og 2.

3 Materialer og metode

Forsøket og all analyse ble utført ved Mørkvedbukta forskningsstasjon ved Universitetet i Nordland, Norge. Forsøksperioden varte fra 15.09.2016 til 15.11.2016. Eksperimentet ble godkjent av den lokale forsøksdyransvarlig ved Fakultet for Biovitenskap og Akvakultur, og er registrert med ID nummer 8707, og ble utført i henhold til forskrift om bruk av dyr i forsøk (LOV, 1996).

3.1 Forsøksfisk og forhold

240 fisk ble brukt til forsøket. Av disse var 120 en kontrollgruppe mens den andre gruppen var en stressgruppe. Fisken ble akklimatisert i mer enn 14 dager før oppstart. Oppstartsdagen var 06.10.2016. Fisken fikk kontinuerlig tilførsel av filtrert sjøvann (33 ‰) fra 250 m dyp og ble foret daglig til metning. Vanntemperatur var ($8,5 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$), oksygenmetningen varierte med ($92 \pm 3\%$) O_2 gjennom forsøksperioden. Tankene ($0,5 \text{ m}^3$) var skjermet for eventuelle forstyrrende faktorer.

3.2 Forsøksoppsett

Vi hadde en kontroll-gruppe med 120 fisk og en stress-gruppe på 120 fisk, totalt 240 fisk. De samme prosedyrene ble utført på begge disse gruppene. Totalt 240 rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) som ble tilfeldig distribuert over forskjellige tanker brukt i eksperimentet.

Før forsøket startet ble 24 fisk tatt ut fra hver forsøksgruppe og testet. Det ble tatt blodprøver og en sensitivitetstest (ACTH- og negativ tilbakekoblingstest, dexametason). Dette er såkalte 0 prøver (pre-stress) som viser utgangspunktet før start. Disse ble brukt til å sammenlikne tidsserien under forsøket. Av de gjenværende 96 fiskene som gjenstod fra hvert forsøk ble disse fordelt på følgende måte. 6 fisker ble testet for plasmakortisol, laktat, glukose, osmolalitet, klor og magnesium ved følgende tidspunkter: pre (før), ved 30 min, 1t, 2t, 3t, 6t, 12t, 24t, 48t, og ved 72 t (totalt 60 fisk). Ved 24t og ved 72t ble det i tillegg tatt ut 12 fisker (36 til sammen med 0 prøven) for en (ACTH- og negativ tilbakekoblingstest, dexametason).

Kontroll-gruppen ble utsatt for et minimum av stress som flytting og håving. Stress-gruppen ble i tillegg utsatt for 20 minutters sammentrengningsstressor, før den gjennomgikk de samme prosedyrene som kontroll-gruppen. Trenging ble brukt som stressfaktor. Dette ble gjort ved at vannstanden ble senket ned slik at ryggfinnene 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 å oppnå laveste vannstand, og maksimal tetthet ved trenging var 262 kg/m^3 .

3.3 Prøvetaking

Fisken ble tatt ut av tankene med håv og lagt i en 10 liters bøtte med 5 mg/L metomidate. Tidligere forsøk har vist at dette var tilstrekkelig for å hindre en videre økning i plamakortisol (Olsen et al., 1995; Iversen et al., 2003) Det ble hele tiden tilført oksygen til vannet. Fisken ble først veiet og målt før det ble tappet blod fra caudalvenen med en heparinisert sprøyte. Deretter ble fisken avlivet med et kutt tvers over hjernestammen. Blodet ble fordelt over 2 eppendorfrør og sentrifugert i 5 minutter på hastighet 6500 RPM. Plasmaet ble pipetert ut og lagt i små eppendorfrør for senere analyse.

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 bøtte 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 bøtte med rent vann for oppvåkning. Deretter ble fisken plassert tilbake i karet. 24 timer etterpå ble fisken igjen håvet ut i 10 L bøtte 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).

3.5 Analytiske prosedyrer

3.5.1 Kortisol

Kortisol ble målt med en ELISA-metode (1998). Kortisol (Cusabio Biotech, Kina) nivåer ble analysert ved hjelp av enzym-koblet immunosorbent-assay (ELISA) kit. Et anti-antistoff spesifikt for antistoffet og antigenet av hormonet ble forhåndslagt på en mikroplate, etterfulgt av 50 ul plasma og 50 ul HRP-konjugat. Disse ble blandet godt og deretter inkubert i 1 time ved 37°C. Etter tre skylle- og vaskesykluser ble noen gjenværende vaskebuffer dekantert, og 50 ul substratoppløsning ble tilsatt til hver brønn. Substratløsninger ble deretter inkubert i 15 minutter ved 37°C i mørket, hvorefter de skiftet fra fargeløs eller lyseblå til mørkere nyanser av blå. Etter inkubering ble 50 µl stoppløsning tilsatt til hver brønn, hvilket resulterte i et fargeskift fra blå til gul. Den optiske tettheten av oppløsningen i hver brønn ble deretter bestemt etter 10 minutter ved bruk av en mikroplate leser satt til 450 nm. ELISA-følsomhet var 0,006 nM. Intra assay Variabilitetskoeffisient (CV) var <8% og interassay CV <10%.

3.5.2 Osmolalitet

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

3.5.3 Klor

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

3.5.4 Magnesium

Magnesium (Mg²⁺) 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 µl 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).

3.5.5 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.

3.5.6 Finneslitasje.

Halefinneslitasje ble målt ved slutten av forsøket (25.04.2008) ved bruk av en metode beskrevet av Hoyle et al. (2007) med mindre endring ved å bruke en ordinær skala av 0, 1, 2 og 3, tilsvarende erosjon (0% finneerosjon), mild erosjon (1-24% av erodert), Moderat (25-49% erodert) og alvorlig erosjon (> 50% erodert) (N = 96).

3.6 Statistisk analyse

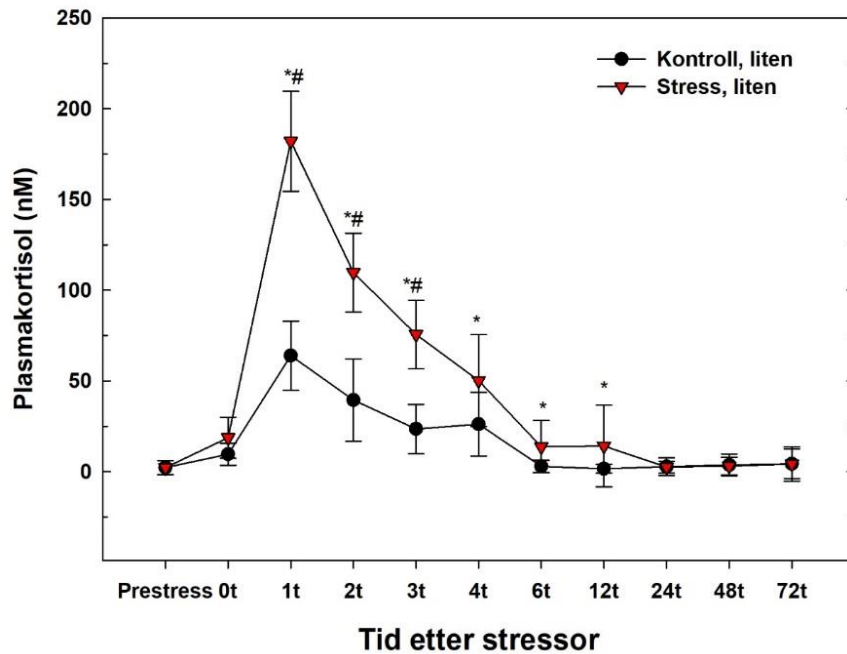
Statistisk analyse ble gjort ved hjelp av statistikk programmet SPSS (ver. 18.00) og SYSTAT (ver 13.00.05) for Windows. All data ble testet for normalitet og homogenitet ved hjelp av henholdsvis Komogorov-Smirnov test og Levene's test. Hvis nødvendig ble data logtransformert for å møte disse

antagelsene. Endring i en parameter fra pre-stress til et annet tidspunkt 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 *

4 Resultater

4.1 Primærstressrespons

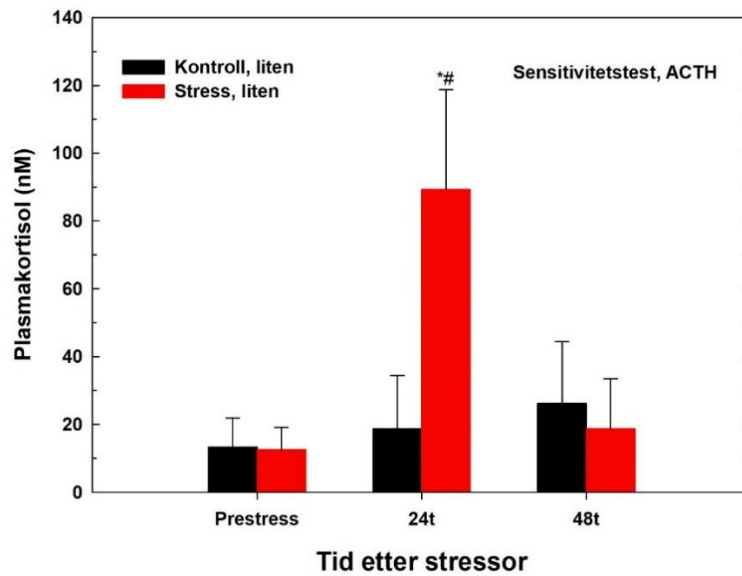
4.1.1 Plasmakortisol



Figur 9. Gjennomsnittlige verdier av plasmakortisol ($\bar{x} \pm SD$) før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trenging av liten rognkjeks ($n=6$). 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 *.

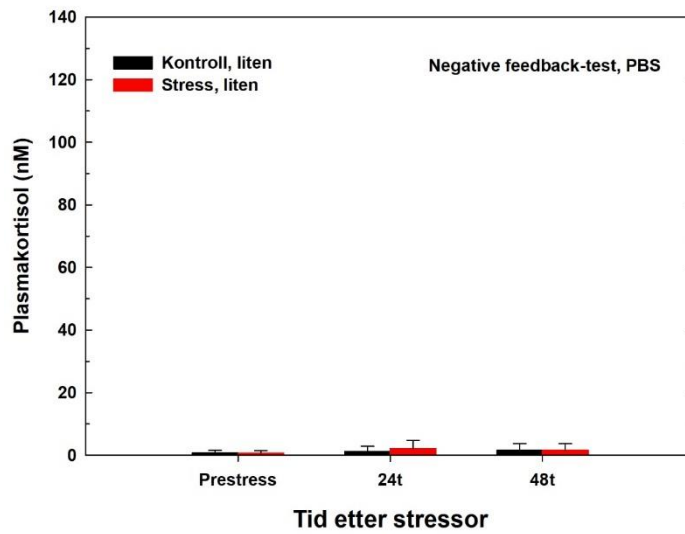
Figur 9 viser endringer i plasmakortisol før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter med trenging av liten rognkjeks. Verdiene for plasma kortisol økte i begge gruppene, men var signifikant (både mellom gruppene og i forhold til pre-stress) høyere i stressgruppen etter 1-, 2-, 3- og 4 timer påført stressor. Den høyeste målte gjennomsnittsverdien var ($182,78 \pm 27,52$ mM) etter 1 time. Gjennomsnittsverdiene for 6- og 12 timer, var også signifikant høyere enn pre-stress.

4.1.2 HPI-aksen



Figur 10. Gjennomsnittlig plasmakortisol (nM) etter ACTH «sensitivitetstest» før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trenging av liten rognkjeks (n=6). 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 *.

Figur 10 viser gjennomsnittlig plasma kortisol nivåer i fisk injisert med ACTH løsning viser en signifikant økning i stressgruppen etter 24 timer sammenliknet med kontroll og sammenliknet med pre-stress. Verdiene ble da målt til ($89,24 \pm 29,49$ mM).

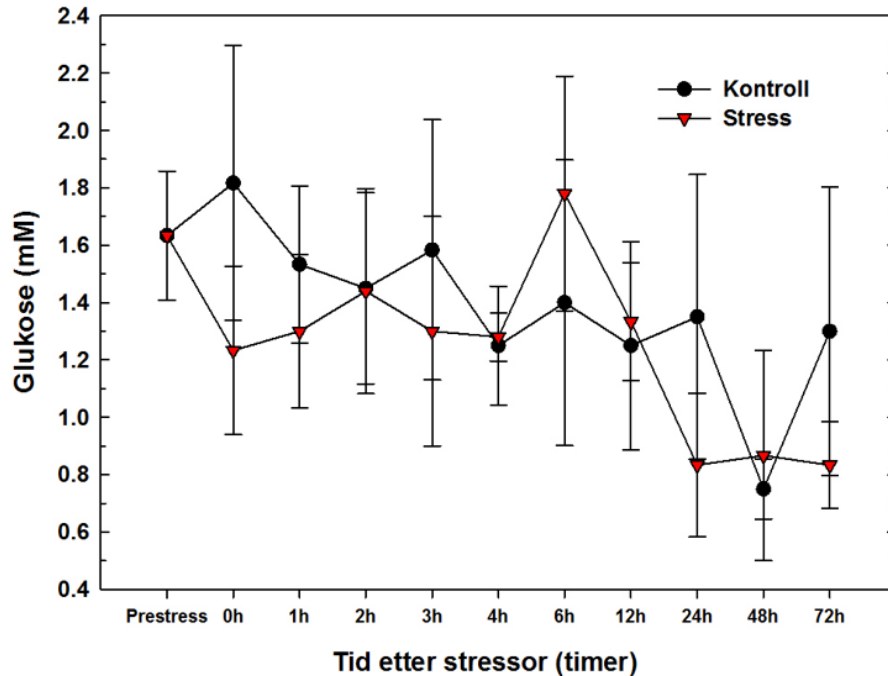


Figur 11. Gjennomsnittlig plasmakortisol (nM) etter Negative feedback-test, PBS, før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trening av liten rognkjeks (n=6). Signifikante forskjeller mellom gruppene ved et gitt tidspunkt ble indikert med # i figurene, og tilsvarende ble signifikante forskjeller i figurene innen en gruppe ved ulike prøvetakingstidspunkt sammenliknet med pre-stress indikert med *.

Figur 11 viser gjennomsnittlige verdier av plasma kortisol injisert med en vektjustert PBS løsning. Her ble det ikke påvist noen signifikante forskjeller mellom gruppene.

4.2 Sekundære stressresponser

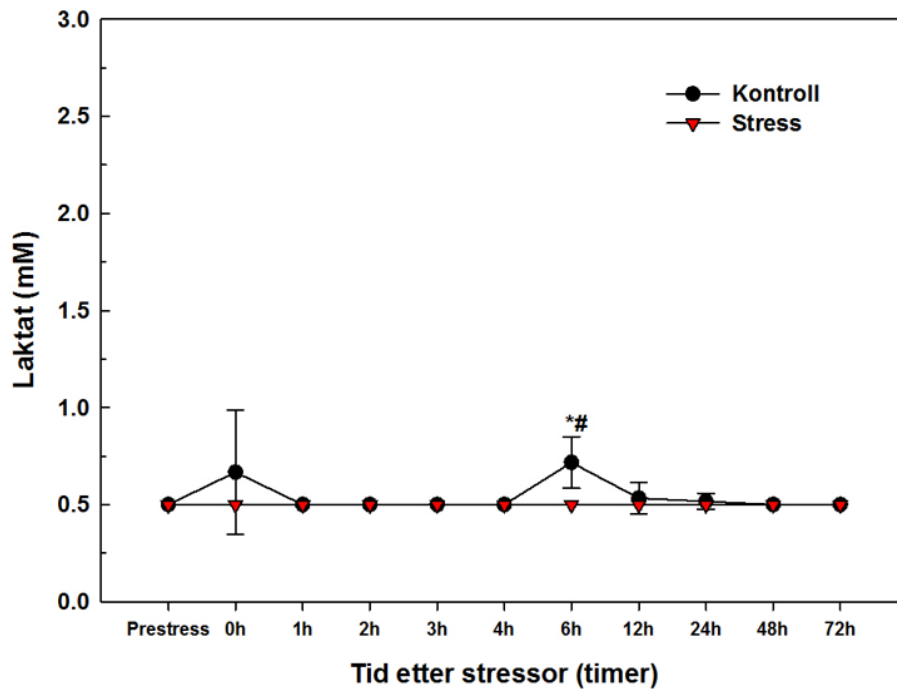
4.2.1 Glukose



Figur 12. Gjennomsnittlige verdier av glukose ($\bar{x} \pm SD$) før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trening av liten rognkjeks ($n=6$).

Figur 12 viser de gjennomsnittlige verdiene av glukose i blodplasma før og etter flytting, og etter 20 minutter trening. Gjennomsnittsverdiene for plasmaglukose før forsøksstart (pres-stress) var ($1,63 \pm 0,23$ mM). Den høyeste gjennomsnittsverdien for kontrollgruppen (0h etter flytting) var ($1,82 \pm 0,48$ mM), og den laveste verdien var (48t etter flytting), denne verdien var ($0,75 \pm 0,10$ mM). Tilsvarende var den høyeste og laveste verdien i stressgruppen henholdsvis (6h etter flytting) ($1,78 \pm 0,41$ mM) og (24h etter flytting) ($0,83 \pm 0,25$ mM). Det var ingen signifikante forskjeller ved noe måletidspunkt.

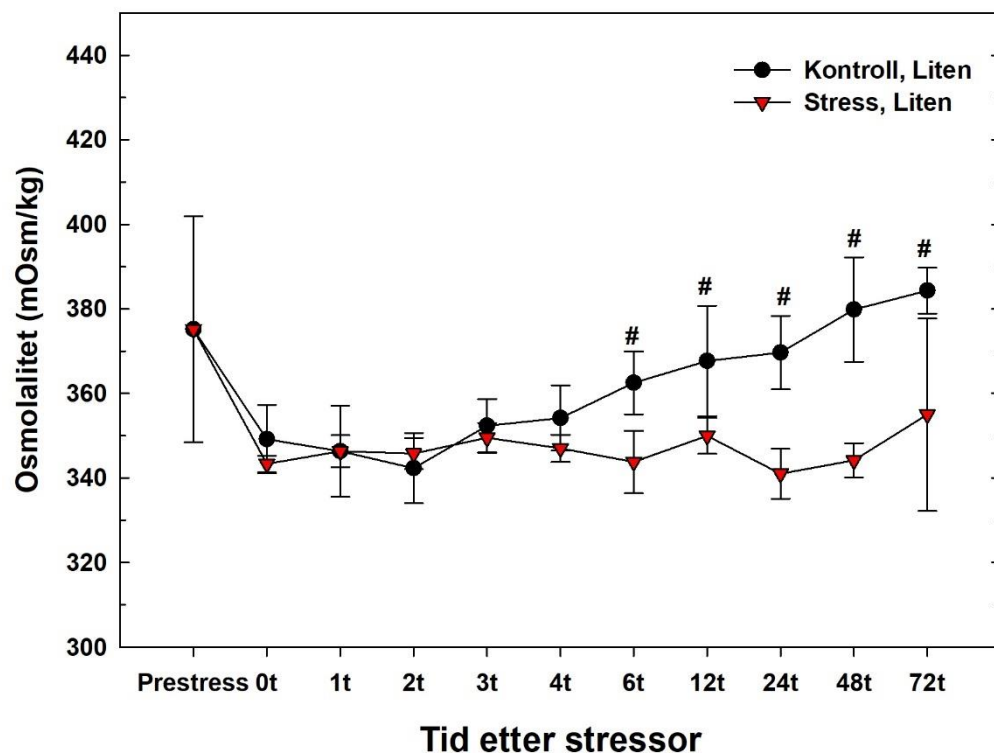
4.2.2 Laktat



Figur 13. Gjennomsnittlige verdier av plasmalaktat ($\bar{n} \pm SD$) for og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trening av liten rognkjeks ($n=6$). * indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene.

Figur 13 viser de gjennomsnittlige verdiene av laktat i blodplasma før og etter flytting, og etter 20 minutter trening. Gjennomsnittsverdiene for laktat før forsøksstart (pre-stress) var ($0,5 \pm 0,0$ mM). Med unntak av kontrollgruppen 6 timer etter påført stressor ($0,72 \pm 0,13$ mM) var det ingen endringer i laktat under forsøket. Kontrollgruppen etter 6 timer var signifikant høyere enn pre-stress og stressgruppen ved samme tidspunkt.

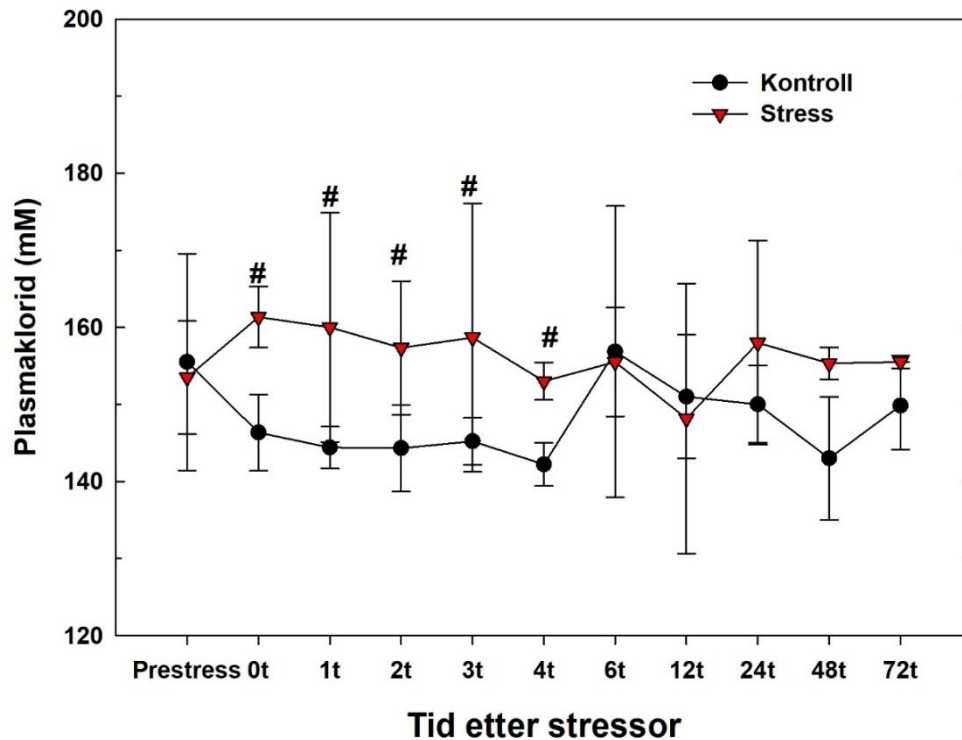
4.2.3 Osmolalitet



Figur 14. Gjennomsnittlige verdier av osmolalitet (mOsm/kg) ($\bar{n} \pm SD$) før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trening av liten rognkjeks ($n=6$). * indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene

Figur 11 viser de gjennomsnittlige verdiene av osmolalitet (mOsm/L) i blodplasma før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trening av fisk. Gjennomsnittsverdiene for plasmaosmolalitet før forsøksstart (pre-stress) varierte mellom ($375,17 \pm 26,17$ mM). De laveste verdiene ble målt etter 2t (kontroll) og etter 24t (stress). Da var verdiene henholdsvis ($342,33 \pm 8,33$ mM) og ($369,67 \pm 8,66$ mM). De høyeste verdiene av plasmaosmolalitet ble i begge gruppene målt etter 72t. Kontroll gruppen ble da målt til ($384,33 \pm 5,43$ mM) og i stressgruppen var verdiene ($355,00 \pm 22,74$ mM). Det var signifikante forskjeller mellom gruppene ved: 6t, 12t, 24t, 48t og 72t etter flytting av henholdsvis kontroll- og stressgruppen hvor stressgruppen. Det ble ikke målt noen signifikant forskjell i forhold til pre-stress.

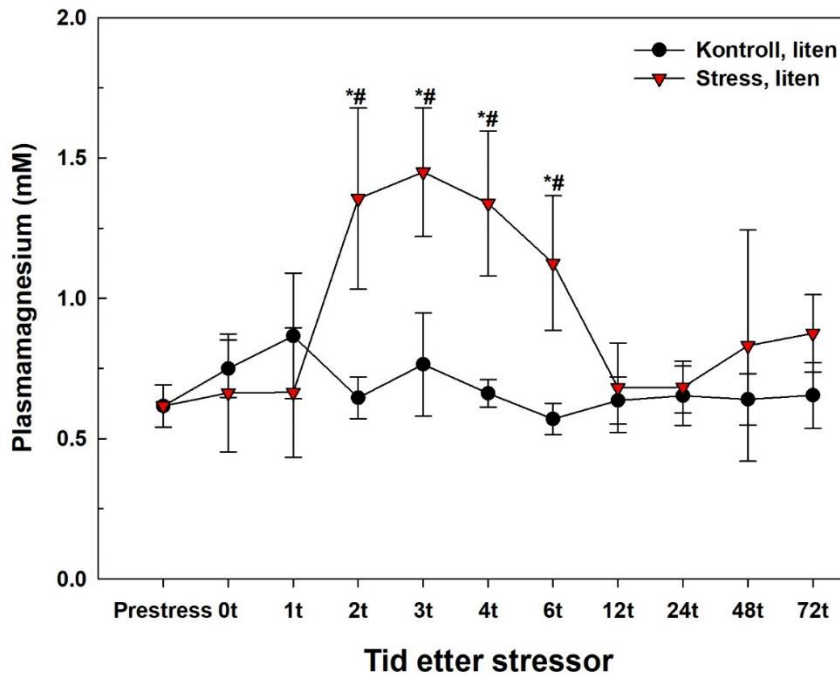
4.2.4 Plasmaklorid



Figur 15. Gjennomsnittlige verdier av plasmaklorid (mM) ($\bar{n} \pm SD$) før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trening av liten rognkjeks ($n=6$). * indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene.

Figur 15 viser de gjennomsnittlige verdiene av klor i blodplasma før og etter flytting og etter 20 minutters trening. Gjennomsnittsverdiene for plasmaklorid før forsøksstart var ($153,50 \pm 7,34$ mM). Laveste verdi ble målt etter 4t (kontroll), da var verdien ($153,00 \pm 2,45$ mM). I stress-gruppen ble den laveste verdien målt etter 12t, da var den ($156,83 \pm 18,90$ mM). Den høyeste verdien i kontrollgruppen ble målt etter 6t, da var verdien ($155,5 \pm 7,06$ mM). Den høyeste verdien i stress-gruppen ble målt etter 0t, da var verdien ($155,5 \pm 14,05$ mM). Det var signifikant høyere verdier i stress-gruppen ved 0t, 1t, 2t, 3t og 4t sammenliknet med kontrollgruppen.

4.2.5 Plasmamagnesium

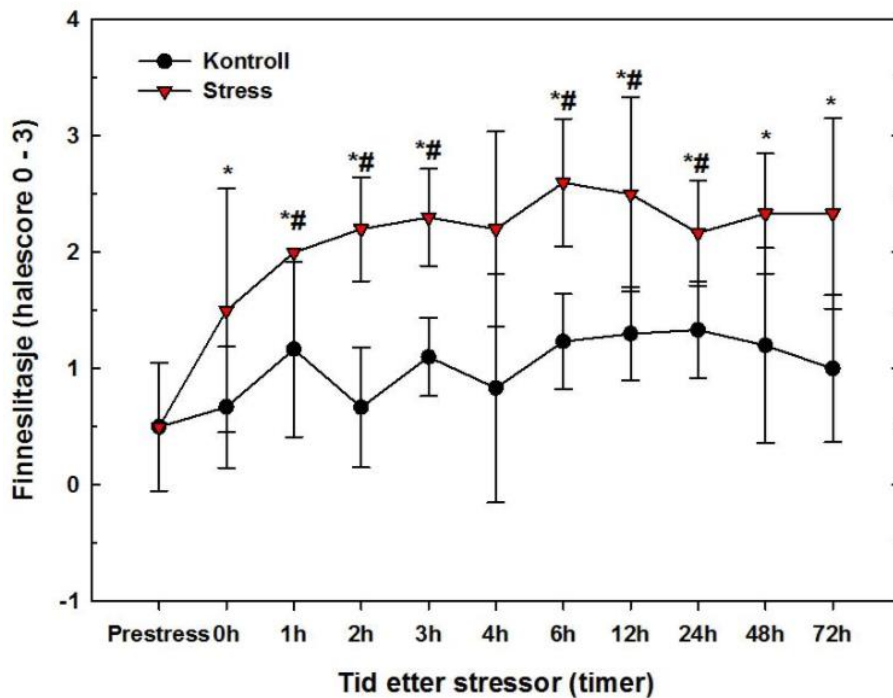


Figur 16. Gjennomsnittlige verdier av plasmamagnesium (mM) ($\bar{x} \pm SD$) før og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trening av liten rognkjeks (n=6). * indikerer signifikant forskjell fra pre-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene

Figur 16 viser de gjennomsnittlige verdiene av magnesium i blodplasma før og etter flytting, og etter 20 minutter trening. Gjennomsnittsverdiene før forsøksstart var ($0,62 \pm 0,08$ mM). Høyeste måling (kontroll) var etter 1t, da var verdien ($0,87 \pm 0,22$ mM). De laveste verdiene ble målt etter 6t (kontroll) da var verdiene ($0,57 \pm 0,06$ mM). Laveste verdi (stress) ble målt før forsøksstart. De høyeste verdiene i kontroll-gruppen ble målt etter 1t, den var da ($0,87 \pm 0,22$ mM). Høyeste verdi (stress) ble målt etter 3t, verdiene var da ($1,45 \pm 0,23$ mM). Det var signifikante forskjeller mellom gruppene etter 2t, 3t, 4t og 6t, og ved samme tidspunkt var det også signifikante forskjeller i forhold til pre-stress nivåer.

4.3 Tertiære stressresponser

4.3.1 Finneslitasje



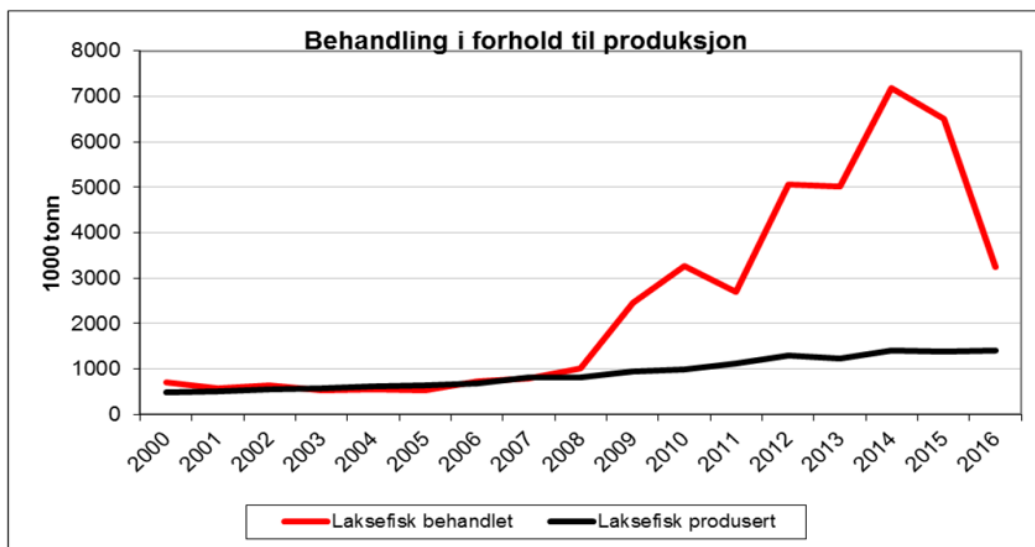
Figur 17. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje ($\bar{n} \pm SD$) for og etter flytting av kontroll og etter 20 minutter trening av liten rognkjeks ($n=8$). * indikerer signifikant forskjell fra pres-stress (pre-St), og # indikerer signifikant forskjell mellom de ulike gruppene.

Figur 11 viser de gjennomsnittlige verdiene av finneslitasje før og etter flytting, og etter 20 minutter trening. Gjennomsnittsverdiene for finneslitasje score før forsøksstart (pres-stress) var ($0,5 \pm 0,0$).

Den høyeste gjennomsnittsverdien finneslitasjescore for kontrollgruppen (6h etter flytting) var ($2,6 \pm 0,55$) for stress-gruppen, og den høyeste gjennomsnittsverdien i kontrollgruppen var ($1,33 \pm 1,02$). Det er signifikant forskjell mellom gruppene etter 1t, 2t, 3t, 6t, 12t og 24t, og det er i stressgruppa signifikant forskjell mellom pre-stress og 1t, 2t, 3t, 6t, 12t, 24h, 48t og 72t.

5 Diskusjon

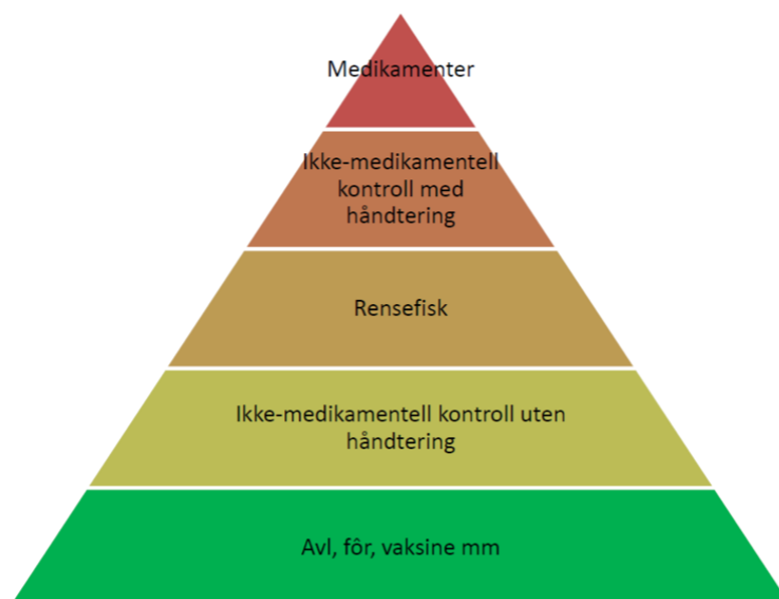
Våren 2015 la Regjeringen fram Meld. St. 16 om forutsigbar og miljømessig bærekraftig vekst i norsk lakse- og ørretoppdrett (Meld. St. 16, 2014-2015). Her ble det vist til at den utstrakte legemiddelbruken har utviklet resistens mot medikamentene som brukes, unntatt flubenzuroner. Det ble videre pekt på at resistensproblemer kan medføre både økt bruk av medikamenter og at bruken endres til medikamenter som er mindre gunstige for miljøet. Her ble påpekt at den stadige økningen i medikamentelle behandlinger og legemiddelresistens derfor er en utfordring med tanke på miljømessig bærekraftig produksjon. På bakgrunn av dette fattet Stortinget den 15. juni 2015 anmodningsvedtak nr 680: "Stortinget ber regjeringen legge fram en handlingsplan mot resistens". Denne oppgaven inngår i et prosjekt ved Fiskeri- og havbruksnæringens forskningsfond (FHF) der målet er å utvikle og levere robuste og kunnskapsbaserte operative velferdsindikatorer (OVI) som kan brukes for å sikre god velferd hos rensefiskartene berggyllt og rognkjeks. Prosjektet skal også gi ny kunnskap om grenseverdier for miljøfaktorer som kan være kritiske for artens velferd. En kombinasjon av OVI's kan hjelpe oppdrettere til å kartlegge fisken velferd (Turnbull et al., 2005).



Figur 18: Figuren oppsummerer antall behandlinger mot lakselus i perioden 2011 til 2016. Svart linje viser produsert laksefisk og rød linje viser behandlet laksefisk. Fallet fra 2015 til 2016 skyldes mindre bruk av legemidler samt flere mekaniske behandlinger (Handlingsplan mot resistens mot legemidler mot lakselus, 2017).

Lakselusa er et økende problem for norsk oppdrett. Problemene er blant annet knyttet til velferd ved at den spiser slim og ødelegger skinnet, noe som kan føre til stress, lidelse og død (Costello, 2009; Whelan 2010). Ensidig bruk av legemidler som første valg for å kontrollere lakselus situasjonen hos oppdrettsfisk har allerede ført til betydelige utfordringer med nedsatt følsomhet og resistens mot legemidler (Regjeringens handlingsplan, 2016). Det er et høyere press fra forbrukerne om en renere

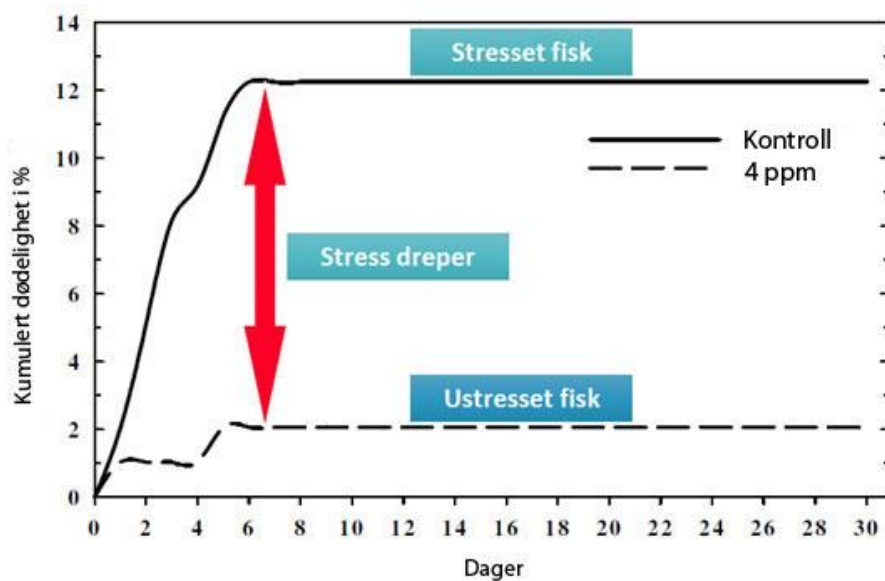
produksjon og det er også funnet resistente lakselus på villaks (Havforskningsinstituttet, 2017). I regjeringens plan for (2015) vil det prioriteres kunnskap om fiskehelse og -velferd. På kort sikt er det et særlig behov for bred og grunnleggende forskning om forebygging og bekjempelse av lakselus, og det foregår en lang rekke forskings- og utviklingsaktiviteter knyttet til dette. Når det gjelder rensefisk foregår det mye forskningsaktivitet knyttet både til produksjon og til bruk og stell av rensefisken. Tiltakene for å stanse og reversere resistensutviklingen handler om reduksjon i bruk av legemidler, bruk av gode, alternative metoder for å kontrollere lusepåslag og bevisst rotasjon i både legemiddelbruk og ikke-medikamentell behandling (figur 18). Rapporten understreker også viktigheten av å bygge opp kapasitet for produksjon av rensefisk, og at det må være fokus på riktig bruk av rensefisk (figur 19). Oppdrettsnæringen, fiskehelsepersonell, forvaltningen og forskningsmiljøene har en viktig rolle og et ansvar for at målene nås. Rognkjeksen er ny i oppdrett og en har bare skrappt i overflaten på en svært annerledes art enn det en er vant med i oppdrett. Rognkjeks er en rensefisk med høy vekstrate og overlever ved lave temperaturer og kan blir brukt i større skala enn andre arter av rensefisk (Chilvers, 2013). Samtidig har man opplevd problemer i forhold til sykdommer, finneslitasje, fysisk ødeleggelse og økt dødelighet (Hansen et al., 2016).



Figur 19: En oppsummering av planer og mål for hvordan lakselus skal håndteres. Hovedvekten i næringsplaner ligger på forebygging og ikke-medikamentell lusekontroll (Handlingsplan mot resistens mot legemidler mot lakselus, 2017).

5.1 Stress

Det finnes flere forskningsrapporter som tar for seg fiskens velferd (Ellis et al., 2002; Huntingford et al., 2006). Stress har en nøkkelrolle for hvordan vertebrater overlever og utfører sine livsfunksjoner i ugunstige situasjoner (Schreck et al., 1993). Stress kan påvirke overlevelse, vekst og adferd, og dermed hvor effektivt rognkjeksene kan avluse laks. Dette har derfor stor økonomisk betydning for en oppdretter da stress kan medføre økt dødelighet og nedsatt dyrevelferd (figur 20). Rognkjeksens spesielle stressadferd gjør det vanskelig å skille ustresset fra stresset fisk, siden den ikke viser en typisk fluktrrespons som en kjenner fra laks (Akvaplan-niva, 2017).

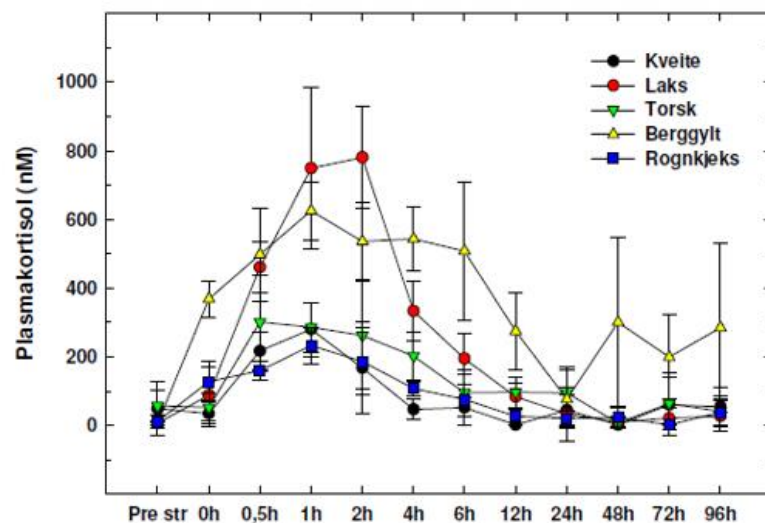


Figur 20: Det er en klar sammenheng mellom forhøyde hvilenivå (kronisk stress) av plasmakortisol i settefiskproduksjonen og dødeligheten etter utsett. Dødeligheten er sterkt økende allerede innenfor 72 timer (Iversen et al., 2015).

En har liten kunnskap om kort- og langtidseffekter av stress knyttet til transport og håndtering og det er derfor nødvendig å etablere gode prosedyrer for dette. Fortsatt dør det for mye fisk i månedene etter transport og utsett i sjø i verden. En av årsakene til dette kan synes å være stressrelatert som Iversen et al. (2005) viste ved ulike transportert i Skottland, Sør-Trøndelag, Nordland, Troms og Finnmark. Stress kan bli målt på flere måter. Blant annet ved å måle mengden av kortisol i blod, slim, avføring eller i vannet der fisken holder til (Scott & Ellis, 2007). Dette kan være tidkrevende, kostbart og vanskelig å gjennomføre rent praktisk. Bransjen trenger derfor artsspesifikke «gjennomførbare» teknikker til bruk i dagligdagse situasjoner. Disse blir kalt velferdsindikatorer OVI (North et al., 2008), og må være robuste. For næringen vil det være viktig å ha tilgang til operative velferdsindikatorer (OVI) og kunnskap om grenseverdier for påvirkning for å få best mulig nytte av hver enkelt rensefisk som settes inn i merdene for lusekontroll.

5.2 Primær stressrespons - Allostasis

Stress utløser en hormonreaksjon. Det første vi kan måle stress på er at det kommer en økning av hormoner og økt hjerneaktivitet. Stress skal forberede deg til noe, enten det er å sloss eller å flykte. Man får mange ulike reaksjoner og i verste fall ender det med døden, men da har stresset vært massivt. Økning i kortisolnivåer har sammenheng med primærresponsen hos fisk (Barton, 2002; Wendelaar Bonga, 1997, 2011). Man snakker om primærrespons dersom hjerne sentra er aktivert og det resulterer i en stimulering av hypothalamus-hypofyse-interrenal (HPI) akselen (Iversen, 2013; Momsen et al., 1999) og som følge av dette stigende nivåer av kortikosteroider som for eksempel kortisol (Balm et al., 1994) og katekolaminer (Adrenalin og noradrenalin) (Iversen & Eliassen, 2012b). Kortisol er ansett som en god indikator på stress siden det tar over en time til nivåene er normalisert, i motsetning til katekolaminer som brytes ned svært raskt. Ved kronisk stress vil mange fiskearter oppleve forhøyede kortisol nivåer over tid. Primære formidlere av allostase er typiske hormoner som kortikosteroider, katekolaminer og cytokiner (Goymann og Wingfield 2004; McEwen 1998, 2005, Wingfield 2005).



Figur 21: En undersøkelse av Iversen viste forskjellige kortisolnivåer blant forskjellige fiskeslag. Vi ser at Rognkjeks (*Cyclopterus lumpus*) har moderate økninger, ikke ulikt kveite (*Hippoglossus L*) Iversen 2015.

Stressprofilen til rognkjeks er annerledes enn andre fiskearter som laks, torsk og berggyllt, men veldig lik profilen til kveite (*Hippoglossus L.*) slik figur 21 viser (Iversen et al., 2015). Liknende hvilenivåer av kortisol hos rognkjeks ble funnet av både Iversen & Eliassen (2014); Haatuft (2015); Hansen et al., (2016). Stress er en viktig reaksjon for overlevelse, men vedvarende høye verdier av kortisol kan være problematisk. En viktig egenskap er derfor å vende tilbake til pre-stress nivåer (Wendelaar Bonga, 2011). De lave kortisolnivåene hos rognkjeks kan ses i et evolusjonært perspektiv. De fleste teleoster har en

refleks knyttet til flukt som utløses av et par nevroner i fiskens bakhjerne kalt Mauthner cellene (Bierman et al., 2009, Webb, 1976). Det kan se ut som om rognkjeks mangler disse nevronene (Hale, 2000). Den primære responsen kan være å feste seg til underlaget med sugeskålen og gjemme seg istedenfor å flykte. Rognkjeks stoler derfor på sin beinbygning og sugeplate som sitt første forsvar mot farer (Davenport, 1985). I dette forsøket håndterer begge gruppene den påførte stressoren da begge gruppene returnerte til pre-stress nivå innen 24 timer. Gruppen (flytting + stress) hadde derimot en annen en høyere kurvetopp med høyeste verdi cirka en time etter stressor ($182,78 \pm 27,52$ mM). Liknende kurver med en kortisoltopp etter cirka en time er sammenliknbar med andre studier (Iversen & Eliassen, 2009; Iversen et al., 2005b). Forhøyningen i kortisol tyder på at stressgruppen ble utsatt for en allostatisk overbelastning type I (figur 5).

5.3 HPI – Akserespons

Det er forskjellige metoder å oppdage akutt stress på (allostatisk overbelastning type 1). Man har stimuleringstester (med CRH, CRH/vasopressin, ACTH) som måler relativ følsomhet av hypofysen, og en inhiberingstest som bruker dexamthason (DEX) for å bevise reduserte muligheter for negativ feedback. Inhiberingstest med bruk av dexamethasone (DEX) ble opprinnelig laget for å oppdage endringer i HPA-aksen hos mennesker med dype depresjoner (Wilens et al. 1984; Kumar et al. 1986). DEX har vist seg å hindre økningen i menneskets kortisol nivåer fra morgenen av. Hindringen er størst hos friske mennesker. Sammenliknet med mennesker med depresjon (Kumer et al. 1986).

I dette forsøket blir fisken midlertidig oversensitiv 24 timer etter (flytting + stress), men er tilbake på normalen etter 48t. Liknende resultater finner vi i et forsøk (Iversen & Eliassen 2014) på laksesmolt som ble revaksinert og stresset daglig i fire uker forble gruppen oversensitiv til ACTH og hadde en ikke fungerende tilbakekoblingsmekanisme med høy dødelighet. Tilsvarende viste (Hatløy, 2015) at akutt stresset triploid laksesmolt hadde et forhøyet hvilenivå av plasmakortisol med alvorlige effekter på dyrevelferden. I et forsøk fra 2016 ved Universitet Nord viste daglig stresset rognkjeks oversensitivitet til ACTH etter 28 dager. Det samme forsøket viste også allostatisk endring i fiskens tilbakekobling system med forhøyede kortisolnivåer (Hansen, et al., 2016). Dette forsøket tyder på at en akutt stressor hos liten rognkjeks ikke fører til økte nivåer av kortisol (figur 11), men returnerer til utgangspunktet. Slik figur 5 viser ser vi at en ELHS blir utløst men vender tilbake til LHS. Forsøket indikerer viktigheten av å unngå at stressende faktorer som for eksempel håndtering, transport og vaksinerings tidsmessig ikke ligger for tett inntil hverandre.

5.4 Sekundære stressresponser

Den primære stressresponsen gir økte konsentrasjoner av katekolaminer (adrenalin og noradrenalin) og kortikosteroider (kortisol) i blodplasma (Selye, 1973). En primær respons kan gi påfølgende sekundære stressresponser som innebærer endringer på celle- og organnivå. Slike endringer kan være metabolske, cellulære, osmoregulatoriske, hematologiske eventuelt endringer i immunsystemet (Barton, 2002; Wendelar Bonga, 1997).

5.4.1 Glukose

Økte konsentrasjoner av kortisol som følge av en stressor fører vanligvis til økte endringer i glukose og laktat nivåer, selv om det viser seg at det er store variasjoner mellom forskjellige fiskeslag (Iversen, 2015). En fysiologisk stressrespons er energikrevende og kan (se figur 5) føre til endringer i ELHS (Goyman & Wingfield, 2004). I stressresponsen er glukose det foretrukne brenselet (Iversen & Eliassen, 2014). Dersom energikravene overstiger glukosemengden i plasma vil kortisol intensivere en prosess i leveren kalt glukoneogenesen. I denne prosessen dannes det glukose fra substrater som aminosyrer, hovedsakelig alanin, fra nedbrytning av muskelvev, glycerol fra nedbrytning av triglycerider og laktat fra anaerob forbrenning av glukose. Denne prosessen medfører sekresjon av glukose i blodet og er en sentral del av gjenopprettelse av homoestase. Gjeller og hjernen er organene som er mest involvert i en stress reaksjon, og det er disse som har utbytte av forhøyede glukose nivåer (Mommsen et al., 1999). I dette forsøket viser glukoseverdiene ingen signifikante forskjeller mellom kontroll og stressgruppen. Det er heller ingen signifikante forskjeller innad i gruppene. Den høyeste verdien ble målt etter 6 timer, gjennomsnittlige verdier var da $(1,78 \pm 0,41 \text{ mM})$. Men det var ingen signifikant forskjell fra kontroll gruppen eller i forhold til pre-stress. En allostatisk overbelastning type 1 (akutt) kan gi ulike utfall av plasmaglukose (Aluru & Vijayan, 2007; Iversen M. 2013; Mommsen et al, 1999). I fisk er plasmaglukose mere variabelt sammenliknet med pattedyr, særlig for karnivore arter. Det kan hende at glukose i det hele tatt ikke er egnet som indikator på stress (Mommsen et al., 1999).

5.4.2 Laktat

Som tidligere nevnt dannes laktat i en anaerob glykolyse prosess (Olsen et al, 1995). Med andre ord vil funn av laktat indikere et høyt aktivitetsnivå hos fisken. Laktat omdannes til pyruvat som er et substrat brukt i glukoneogensen, og det er antatt at laktat er et «stort» bidrag til denne substratmengden. Forhøyede laktatverdier rett etter stress skyldes antakelig muskel glykolyse (Moon & Foster, 1995). Kontrollgruppen hadde et oppsving i laktatverdiene etter henholdsvis 0 og 6 timer. Etter 6 timer er verdiene $0,72 \pm 0,13$ som også er signifikant forskjellig fra stressgruppen. Fiskens metabolske status er viktig, sultet eller mett, noe som kan øke leverens følsomhet for adrenerge stimuleringer (Barton, 2002). Det er vanskelig å si noe spesifikt ut i fra målingene da det ikke er unormalt høye verdier og

variasjon i effekten av plasmakortisol som respons til glukose og laktat er observert i andre studier (Cook et al., 2012; Iversen et al., 2013; Mommsen et al., 1999). Måling av stress basert på laktatkonsentrasjon kan variere vesentlig da det er store variasjoner både i populasjoner og mellom forskjellige arter (Iversen, 2013; Mommsen et al., 1999). Dette kan muligens forklare ved at den evolusjonære tilpasningen av stresshåndtering mellom forskjellige fiskearter og graden av muskelaktivitet knyttet til den (Jørgensen et al., 2017). C-start responsen er en slik evolusjonær tilpasning. Denne utløses av Mauthner-celler (M-celler) som trigger en tre-trinns fluktrrespons fra predatorer (Bierman et al., 2009; Bronson & Preuss, 2017; Eaton et al., 2001). Det er foreslått av (Hale, 2000) at slik M-celleaktivitet er tilstedeværende i tidlige livsstadier hos enkelte fiskearter men som senere blir fraværende. Dette kan være en tilpasning for å spare energi og opprettholde metabolsk homeostase under stress. Rognkjeks er avhengig av å feste seg til underlaget, gjemme seg eller stole på sine morfologiske egenskaper som forsvar. Dette reduserer behovet energi ved en eventuell fluktrrespons (Hansen et al., 2018; Ingólfsson & Kristjánsson, 2002; Treasurer et al., 2018). Denne atferdsmessige tilpasningen er trolig vellykket i sitt naturlige miljø og den følgende fysiologiske responsen er tilstrekkelig til å gjenopprette homeostase fra stressoren (Athanasios et al., 2016; Ingólfsson & Kristjánsson, 2002). Liknende resultater med manglende korrelasjon mellom kortisol og glukose nivåer er funnet i flere andre studier (Mommsen et al., 1999; Wendelar Bonga 1997). Forhøyede verdier kan også være relatert til bedøvelse og oppvåkingsperioden (Iversen, 2013). Det kan ut ifra dette se ut som laktat er vanskelig å bruke som en indikator på sekundær stressrespons hos liten rognkjeks.

5.4.3 Osmolalitet og osmoregulering

Fisk har en betydelig mengde vann tilstede ekstracellulært. Dette inkluderer væsker som brukes i forskjellige utgaver av sirkulasjonssystemer, kjertelsekresjoner og så videre. Men størstedelen av det består av ekstracellulære væsker som kroppen bader i. Ved å holde konstante forhold i dette rommet (homeostase) kan de cellulære mekanismene virke effektivt og mer uavhengig av forandringer som skjer i det ytre miljø (Wendelar Bonga, 1997), og ulike tester kan vise fiskens evne til osmoregulering (Staurnes et al., 1992). Som osmoregulatorer er fisk i stand til å opprettholde konsentrasjonene i kroppsvæskene selv om det er betydelige forandringer i det ytre miljø. Alle marine teleoster, i motsetning til størstedelen av marine organismer, opprettholder konsentrasjonen av oppløste stoffer i kroppsvæskene betraktelig under den i omgivelsene, de hypoosmoregulerer. Osmolalitet er et mål på osmotisk trykk, lik det totale antallet løste molekyler eller ioner i 1 kg av løsningsmiddelet i den effektive konsentrasjonen av et ion i løsning. Beinfisk holder generelt osmolaliteten i blodet på om lag 300 mOsm/L. For å oppnå dette må vann og ioner reguleres over en rekke organer (Peruzi et al., 2005).

En rekke hormoner og særlig neurohypofysepeptidene, adrenokortikale steroider, katekolaminer og prolaktin deltar i reguleringen av vann- og saltbalansen hos vertebrater. Kortisol er kjent for å påvirke både mineral- og karbohydratmetabolismen i fisk og har vist seg å stimulere Na^+ - transport over gjeller og tarm (Bernier et al., 2009a; Mommsen et al., 1999). En forandring i osmolalitet, klorid (Cl^-) og magnesium (Mg^{2+}) vil være egenskaper som kan indikere sekundære stressresponser (Veiseth et al., 2006). Svært kraftig stressbelastning vil også kunne resultere i falskt negativt resultat (Iversen et al., 1998).

I dette forsøket ser vi til å begynne med en nedgang i plasmaosmolalitet i begge gruppene. Slike forandringer kan skyldes RVN (Regulatorisk volumnedgang). En liknende reaksjon av stress på hydromineral balansen er sannsynligvis en kompenserende mekanisme der cellen først sveller før cellen justerer seg tilbake til sitt normale nivå ved å eliminere cellulære osmolytter og således vann ved osmose (Iversen & Eliassen, 2014). Fisk i sjøvann (hypersalin) vil forsøke å regulere cellevolumet via uorganiske ioner og ulike lavmolekylære organiske stoffer som aminosyrer, aminosyren taurin og metylaminoksyd (TMAO) organiske fosfater, urea, glycin og betain. Etter 3 timer utvikler kurvene seg forskjellig etter at begge gruppene har hatt en nedgang i osmolalitet. Kontrollgruppen «henter seg inn» og er etter 48 timer tilbake på pre-stress nivå. Derimot ser vi at stressgruppen forblir på tilsvarende lave nivåer nesten gjennom hele forsøket, med en signifikant forskjell mellom gruppene ved målingene ved 6t, 12t, 48t og 72t. Dette kan være en indikator på at begge gruppene vender tilbake til pre-stress nivåer, selv om stressgruppen returnerer noe seinere. Marine teleoster må drikke sjøvann for å kompensere for vanntapet. Dette gir et overskudd av monovalente salter, hovedsakelig Na^+ og Cl^- blir begge skilt ut av kloridceller og øvre del av nyren. Kortisol har vist seg å fremme cellulær differensiering av kloridceller og stimulere Na^+K^+ -ATPase i gjellene, tarm og nyrene under smoltifiseringen hos laks (Bjørnson et al., 2011; Momsen et al., 1999). Undersøkelser har vist at kortisol øker overflatevolumet til kloridcellene, og økt innstrømming av Na^+ og Cl^- (Redding og Schreck, 1983; Staurnes et al 2001). For plasmaklorid ser vi en signifikant forskjell mellom gruppene allerede etter 0t, 2t, 3t, og 4t, altså fra og med rett etter stressor. Dette kan tyde på at stressoren har satt i gang en respons med økt aktivt opptak av monovalente ioner for å opprettholde hydro-mineral balansen, og stressgruppen viser her en nedsatt evne.

Når marine teleoster drikker saltvann blir magnesium- og sulfationer eliminert. I marine teleoster spiller nyren en mindre rolle i osmoregulering, dens hovedrolle er opptak og ekskresjon av divalente ioner (Mg^{2+} , SO_4^{2-} og PO_4^{3-}) og vann. Dette medfører at antall glomeruli er redusert og noen marine fisk er til og med uten glomeruli, de er aglomerular. Rognkjeks har glomeruli og opptak og ekskresjon skjer i fordøyelsestrakten og nyra (Bijvelds et al., 1998a). I de fleste testede arter vil ikke nivået av

magnesium være høyere enn 2nm og kan også være lavere enn 1nm (Biwelds et al., 2001). Tidligere rapporter på atlantisk torsk (*Gadus morhua*), viser sterk korrelasjon mellom stress og økning i konsentrasjon av plasma magnesium (Staurnes et al., 1994). I kontroll gruppen ser vi forhøyede verdier ved 2t, 3t, 4t, og 6t men som vender tilbake til prestressnivå etter 12 timer. Gjennomsnittsverdiene for plasmamagnesium etter 2t, 3t, 4t og 6t var også signifikant høyere enn kontrollgruppen. De samme verdiene var også signifikant høyere enn prestressnivåene. Under en 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 stressresponsgruppene, mens osmolaliteten og plasmaklorid forble upåvirket av denne stressbelastningen (Iversen & Eliassen, 2009; Iversen et al., 2009; Iversen & Elisassen, 2014). Dette kan muligens ha en sammenheng med at økte mengder av katekolaminer stimulerer opptak av oksygen via gjellene samtidig øker permeabiliteten i gjellene til vann og ioner. En liten økning i permeabilitet kan føre til inntrenging av magnesium (Redding & Schreck, 1983). I tillegg er en redusert utskillelse av magnesium over nyrene en effekt av økt kortisol (Bradford et al., 1992; Iversen & Eliassen, 2014; Wendelar Bonga, 1997). Liknende økning i plasmamagnesium ble også funnet i stressforsøk hos sølvflaks (*Oncorhynchus kisutch*) (Redding & Schreck, 1983) og hos stripet havabbor (*Sparusa urata*) (Arends et al., 1999). Plasmamagnesium ser ut til å være et godt mål på stress.

5.5 Tertiær stressrespons – Fysiologiske endringer

Ved endringer på vekst, sykdomsforekomster og økende dødelighet kalles det tertiære stressresponser (Wendelar Bonga, 1997). For å etablere homeostasis etter en stress reaksjon må organismen overføre all energi til viktige oppgaver som bevegelse og respirasjon. Så lenge en fare eksisterer så vil fysiologiske oppgaver som vekst eller reproduksjon ikke bli prioritert (Wendelar Bonga, 1997). Goede & Barton (1990) foreslo at redusert vekst og form kunne bli brukt som troverdige indikatorer på fiskens tilstand. Vekstrate reflekterer appetitt og matinntak, opptak i tarmkanalen, metabolisme og alle disse faktorene kan bli påvirket av stressorer (Wendelar Bonga, 1997). Tidligere studier har vist at kortisol ofte er assosiert med skadelige effekter fra stress som mindre vekstrater og dysfunksjonell reproduksjon (Momsen et al., 1999), flere tilfeller av sykdom (Barton 2002) redusert toleranse for sjøvann (Iversen et al., 2009; Momsen et al., 1999) og overlevelse (Iversen et al., 2005). I et forsøk ved Universitetet Nord ble det vist at kronisk stressede rognkjeks gav forhøyede kortisolverdier og mindre vekst (Hanssen, 2016). Petersen & Small (2004) viste at kortisol reduserer konsentrasjonen av vekst hormoner og insulin-liknende vekst faktorer (IGF's) i blodet, som påvirker mat opptak og hvordan opptaket konverteres og brukes.

Juvenile rognkjeks er kjent for å vise konkurransedyktig, territoriell oppførsel og høye frekvenser av konfrontasjon i fangenskap (Treasurer et al., 2018). Fysiologiske endringer som finneslitasje er hovedsakelig et problem i akvakultur, men observeres også i ville populasjoner. Finnebiting foreslås å være en del av det naturlige oppførsels repertoaret og øke med størrelsesforskjell blant individer i fangenskap (Treasurer et al., 2018). Flere studier er blitt gjort på laksefisk og de vanligste årsakene antas å være skade fra overflatekontakt, finne-biting, ernæringsproblemer og bakterie infeksjoner. Skader ved finne-biting er ofte forbundet med sekundære infeksjoner (Latremouille, 2003). Økt dødelighet relatert til sår og slitaskader, primært hale og finneslitasje kan i noen tilfeller relateres til bakterielle problemer og høy tetthet (VI, 2016). I denne studien viste daglig stresset liten rognkjeks vedvarende økning av finneslitasje. Små juvenile rognkjeks i naturen (<90 mm), er vanligvis stasjonære og klamrer seg til faste underlag i tidevannssonen eller på flytende tang når de venter på byttedyr (Ingólfsson & Kristjánsson, 2002; Brown, 2006). Stressgruppen viste en signifikant høyere verdi av finneslitasje i forhold til kontrollgruppen allerede fra 1 time og helt til slutten av eksperimentet (bortsett fra målingen etter 4 timer). Det var også signifikante forskjeller fra pre-stress etter 1, 2, 3, 6, 12 og 24 timer. Under stressoren blir fisken tvunget til å forlate sin plass på tankveggen i løpet av en periode. Dette kan ha utløst en maladaptiv territoriell oppførsel, noe som kan ha utløst høye frekvenser av finnebiting (McEwen & Wingfield; 2003). Stor rognkjeks viste ingen signifikant variasjon i finneslitasje som indikerer at en adferdsendring i forhold til størrelse eller alder kan påvirke rognkjeksens adferd under stress (Ruiz-Gomez et al., 2008; Rackovan & Howell 2017). To størrelser av rognkjeks (20g og 100g) i studien (Treasurer et al., 2018) så ut til å være på hver side av tidspunktet for emigrering, hvor preadulte forlater oppvekstområdene for en semi-pelagisk livsstil (Rackovan & Howell, 2017). Sammen med kortisoldata og vekstdata kan det foreslås at fisk rundt 100g tåler en mer proaktiv håndteringsstrategi enn fisk rundt 20g, og at dette er relatert til ulike fysiologiske og miljømessige tilpasninger i ulike miljøer. Finneslitasje foreslås å være størrelsesavhengig og hovedsakelig hos fisk (<10g). Graderingsprotokoller og miljøendringer som flere skjul foreslås å redusere denne oppførselen under optimale forhold (Treasurer et al., 2018). Det er imidlertid vist tydelige indikasjoner på en stressfremkalt økning i finneslitasje hos fisk (>10g) og andre skader. Noe som tyder på aggressiv atferd (Hansen et al., 2018; Treasurer et al., 2018). Det kan også ut ifra denne studien tyde på en slik sammenheng. Forskjeller i finnebitingsadferd og hva som utløser den har blitt diskutert av Latremouille (2003), og synes å variere mellom arter, for eksempel har atlantehavslaks vist redusert finneslitasje når individene er modne og når gruppene er inhomogene. Forfatteren nevner også at både høy og lav individtetthet kan utløse denne oppførselen. Endringer i miljøet er foreslått for å redusere finnebiting, da det gir rognkjeks nok tilleggsområder og skjul for å stimulere naturlig oppførsel. Alvorlig langvarig overbelastning kan også være en mulig forklaring på

finneslitasjen, og muligens en medvirkende faktor for den finnebitende oppførselen observert i små (<40g eller <90 mm) juvenile rognkjeks under oppdrettsforhold med høy individtetthet (Treasurer et al., 2018). I denne studien med liten rognkjeks økte finneslitasjen hos stress gruppen i begynnelsen men begynte gradvis å returnere til kontrollverdier. Dette kan tyde på at dersom fisken blir gitt tilstrekkelig med gjenopprettingstid mellom stressorer kan den muligens tilpasse seg den allostatisk belastningen og gjenopprette normal oppførsel. Finneslitasje ser ut til å være en indikasjon på hvorvidt fisken er stresset eller ikke og en god OVI da dette er enkelt å observere.

6 Konklusjon

I denne studien ble det satt opp 4 hypoteser. Den første hypotesen så kan denne forkastes da det er en klar forskjell i stressresponsen etterfulgt av en akutt allostatisk belastning. Hypotese to forkastes også da er klar forskjell i de primære-, sekundære- og tertiære stressresponsene etter akutt allostatisk belastning. Tredje hypotesen forkastes også da stressgruppen viste en midlertidig oversensitivitet for ACTH. Den fjerde hypotesen kan ikke forkastes da det ikke ble påvist noen forskjell i tilbakekoplingsystemet mellom de to gruppene.

Resultatene i denne oppgaven indikerer at en akutt allostatisk belastning type I er der verdiene vender tilbake til det normale etter en viss tid. Stressgruppen viste midlertidig forhøyede nivåer av kortisol, midlertidig nedsatt evne til osmoregulering og midlertidig aggressiv territoriell adferd som er en del av type I responsen. Vi ser at fisken klarer å oppnå stabilitet gjennom forandring.

7 Referanser

- Abolofia, J., Asche, F, Wilen, J.E. "The Cost of Lice: Quantifying the Impacts of Parasitic Sea Lice on Farmed Salmon," *Marine Resource Economics* 32, no. 3 (July 2017): 329-349.
- Aguilera G, Subburaju S, Young S, Chen J, Inga DN, Rainer L (2008) The parvocellular vasopressinergic system and responsiveness of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress. *In: Progress in Brain Research*, Volume 170. Elsevier, pp 29-39
- Agulleiro B, Hernández MPG, Ayala AG (2006) Teleost adenohypophysis: morphofunctional and developmental aspects. *In: Reinecke M, Zaccane G, Kappor BG (eds) Fish endocrinology* Volume 1. Science Publishers, Enfield NH, USA, pp 289-325
- Akvaplan-niva (2017) Bransjeveileder lakselus. Lastet ned fra: <http://lusedata.no/wp-content/uploads/2012/05/Veileder-for-h%C3%A5ndtering-og-transport-av-rognkjeks-oppdatert-v%C3%A5r-2017.pdf>
- Alsop D, Vijayan M (2009) The zebrafish stress axis: Molecular fallout from the teleost-specific genome duplication event. *General and Comparative Endocrinology*, **161** (1):62-66
- Aluru N, Renaud R, Leatherland JF, Vijayan MM (2005) Ah receptor-mediated impairment of interrenal steroidogenesis involves StAR protein and P450scc gene attenuation in rainbow trout. *Toxicological Sciences* 84 (2):260-269
- Aluru N, Vjayan MM (2007) Hepatic transcriptome responses til glucocorticoid receptor activation in rainbow trout. *Physiological Genomics* **31**(3):483-491. doi:10.1152/physiolgenomics
- Aluru N, Vijayan MM (2009) Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signalling. *General and Comparative Endocrinology*, **164** (2-3):142-150
- Arends RJ, Mancera JM, Munoz JL, Wendelar Bonga SE, Flik G (1999) The stress response og the gilthead sea bream (*Sparus aurate* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology* **163** (1), 149-157.
- Backstrøm, T., Schjolden, J., Øverli, Ø., Thårnqvist, P.-O. & Winberg, S. (2011). Stress effects on AVT and CRF systems in two strains of rainbow trout (*Ocorhynchus mykiss*) divergent in stress responsiveness. *Hormones and Behaviour*, **59**(1), 180-186.
- Backström T, Winberg S (2009) Arginine vasotocin influence on aggressive behavior and dominance in rainbow trout. *Physiology & Behavior*, **96**(3):470-475
- 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 (6):1125-1130
- Balm, P. H., Pepels, P., Helfrich, S., Hovens, M. L. & Bonga, S. E. (1994). Adrenocorticotropic hormone in relation to interrenal function during stress in tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Gen Comp Endicronol*, **96**(3), 347-360. Doi: 10.1006/gcen.1994.1190
- Balment RJ, Lu W, Weybourne E, Warne JM (2006) Arginine vasotocin a key hormone in fish physiology and behaviour: A review with insights from mammalian models. *General and Comparative Endocrinology* **147** (1):9-16
- Barber LD, Baker BI, Penny JC, Eberle AN (1987) Melanin concentrating hormone inhibits the release of aMSH from teleost pituitary glands. *General and Comparative Endocrinology* **65** (1):79-86
- Barentswatch. (2018). Lakselus og fiskesykdommer i oppdrett. Lastet ned (09.06.2018) fra: <https://www.barentswatch.no/fiskehelse/>

- 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, B. A., Barton, L. D., Schreck, C. B. (1987). Effects of Chronic Cortisol Administration and Daily Acute Stress on Growth, Physiological Conditions, and stress Responses in Juvenile Rainbow-Trout. *Diseases of Aquatic Organisms*, **2**(3), 173-185.
- Basu N, Kennedy CJ, Iwama GK (2003) The effects of stress on the association between hsp70 and the glucocorticoid receptor in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology* **134A** (3): 655-663
- Basu N, Nakano T, Grau EG, Iwama GK (2001) The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *General and Comparative Endocrinology* **124** (1):97-105
- 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, N.J., 2006. The corticotropin-releasing factor system as a mediator of the appetite suppressing effects of stress in fish. *Gen. Comp. Endocrinol*, **146**, 45-55.
- Bernier, N.J., Bedard, N., Peter, R.E., 2004. Effects of cortisol on food intake, growth, and forebrain neuropeptide Y and corticotropin-releasing factor gene expression in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135**, 230-240.
- Bierman, H.S., Zottou, S.J. and Hale, M.E. (2009) Evolution of the Mauthner axon cap. *Brain Behaviour Evolution* **73**, 174-187.
- Bijwelds MJC, Flik G, Kolar ZI (1998a) Cellular magnesium transport in the vertebrate intestine. *Magnesium Research*, **11**, 315-322.
- Bijwelds MJC, Kolar ZI, Flik G (2001) Electrodiffusive magnesium transport across the intestinal brush border membrane of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *European Journal of Biochemistry*, **268**, 2867-2872.
- Björnsson, B.T. & Bradley, T.M. 2007. Epilogue: Past successes, present misconceptions and future milestones in salmon smoltification research. *Aquaculture*. **273**, 384-391.
- Björnsson B.T, Einarsdottir IE, Power D (2011) Is salmon smoltification an example of vertebrate metamorphosis? Lessons learnt from work on flatfish larval development. *Aquaculture* 36: 264-272
- Björnsson BT, Stefansson SO, McCormick SD (2010) Environmental endocrinology of salmon smoltification. *General and Comparative Endocrinology* 170 (2): 290-298
- Blacker, R (1983). Pelagic records of the lump sucker, *Cyclopterus lumpus*, Vol **77**, (591-625).
- 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.
- Bricknell, I.R., Dalesman, S.J., O'Shea, B., et al. (2006) Effect of environmental salinity on sea lice *Lepeophtheirus salmonis* settlement success. *Diseases of Aquatic Organisms*, **71**, 201-212.
- Bronson D & Preuss T. (2017) Cellular mechanisms of cortisol-induced changes in Mauthner-cell excitability in the startle circuit of goldfish. *Front Neural Circuits* 11:68.
- Brown, A. J. (2006). The development of feeding behaviour in the lumpfish, *Cyclopterus lumpus* (29).
- Bury NR, Sturm A (2007) Evolution of the corticosteroid receptor signalling pathway in fish. *General and Comparative Endocrinology* **153** (1-3): 47-56

- Caldwell CA, Kattesh HG, Strange RJ (1991) Distribution of Cortisol among Its Free and Protein-Bound Fractions in Rainbow-Trout (*Oncorhynchus mykiss*) - Evidence of Control by Sexual-Maturation. *Comparative Biochemistry and Physiology* **99A** (4):593-595
- Carmichael, G. J., J. R. Tomasso, B. A. Simco, and K. B. Davis. 1984. Confinement stress and water quality-induced stress in largemouth bass. *Transactions of the American Fisheries Society* **113**:767–777.
- Chilvers, H.S. (2013). Lumpfish: The latest weapon in the battle against sea lice? Available from: <http://www.thefishsite.com/articles/1787/lumpfish-the-latest-weapon-in-the-battleagainst-sea-lice/> (accessed 02.12.2013).
- Cook, K. V., O'Connor, C. M., McConnachie, S. H., Gilmour, K. M. & Cooke, S. J. (2012). Condition dependent intra-individual repeatability of stress induced cortisol in a freshwater fish. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology*, **161**(3), 337-343.
- Costello, M. J. (2009). The global economic cost of sea lice to the farming industry. *J Fish Dis*, **32**(1), 115-118. Doi: 10.1111/j.1365-2761.2008.01011.x
- Dalvin, S., Rasmus, S-M., Espedal, P.G., 2010. Havforskningsinstituttet???. Resistens hos lakselus lastet ned fra: http://www.imr.no/filarkiv/2010/04/resistens_og_lakselus_akvakultur_.pdf/nb-no
- Davenport, J. (1985). Synopsis of biological data on the lumpsucker, *Cyclopterus lumpus* (Linnaeus, 1758). *FAO fisheries synopsis*.
- Eaton, R. C., Lee, R. K., Foreman, M. B. (2001). The Mauthner cell and other identified neurons of the brainstem escape network of fish. *Prog. Neurobiol.* **63**, 467-485.
- 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.
- Fiskehelse rapporten 2016. Lastet ned fra https://www.vetinst.no/rapporter-og-publikasjoner/rapporter/2017/fiskehelse-rapporten-2016/_attachment/download/ca6438b2-7cba-4fbb-9fe4-4c694a23e450:29b1e9542df5172339e4e378b23ace7cd9f70c76/Fiskehelse-rapporten%202016_web.pdf
- Fiskeridirektoratet, Statistikk-Akvakultur. Oppdatert 2017: lastet ned fra: <https://www.fiskeridir.no/Akvakultur/Statistikk-akvakultur/Akvakulturstatistikk-tidsserier/Rensefisk>
- 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** (1): 36-44
- 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** (1):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

- Goede, R. W. & Barton. (1990). *Organismic Indices and Autopsy-Based Assessment as Indicators of Health and Condition of fish*. Paper presented at American Fisheries Society Symposium.
- Goymann W, Wingfield JC (2004) Allostatic load, social status and stress hormones: the costs of social status matter. *Animal Behaviour* 67:591-602. doi:10.1016/j.anbehav.2003.08.007
- Greenspan FS, Gardner DG (2004) *Basic and clinical endocrinology*, Lange Medical Books/McGrawHill, New York, seventh edition.
- Grimnes A., Bengt F., Bjørn P. A., Tovslid B. M., Lund R., (1997) Registrering av lakselus på laks, sjøørret og sjørøye. NINA. Oppdragsmelding 525: 1-33.
- Grøntvedt, R.N, (2010). Veterinærinstituttet. Oversikt over tiltak mot lakselus – med focus på FoU. Hentet 27. august 2017 fra: <https://www.forskningsradet.no/servlet/Satellite?blobcol=urldata&blobheader=application%2Fpdf&blobheadername1=ContentDisposition&blobheadervalue1=+attachment%3B+filename%3D%22Grontvedtproduksjonsbiologi.pdf%22&blobkey=id&blobtable=MungoBlobs&blobwhere=1274505267914&ssbinary=true>
- Haatuft, A.C. (2015) Effects of reduced water oxygen saturation on growth and plasma cortisol levels in juvenile lumpfish (*Cyclopterus lumpus*) in aquaculture. MSc thesis. University of Troms. 55 pp.
- Hadley ME (1992) *Endocrinology*. Prentice-Hall Int. UK. 608 pp.
- Hagen IJ, Kusakabe M, Young G (2006) Effects of ACTH and cAMP on steroidogenic acute regulatory protein and P450 11 β -hydroxylase messenger RNAs in rainbow trout interrenal cells: Relationship with in vitro cortisol production. *General and Comparative Endocrinology* **145**(3):254-262
- Hale, M. E. (2000) Startle responses of fish without Mauthner neurons: escape behavior of the lumpfish (*Cyclopterus lumpus*). *Biological Bulletin* **199**, 180-182.
- Hallenstvedt, Abraham. (2015, 12. juni). Fiskeoppdrett. I Store norske leksikon. Hentet 12. august 2017 fra <https://snl.no/fiskeoppdrett>
- Handlingsplan mot resistens mot legemidler mot lakselus (2016) Nærings- og fiskeridepartementet lastet ned fra: https://www.regjeringen.no/contentassets/bac8a85fb17145939d38ce038130ce0e/w-0016_handlingsplan-mot-resistens-mot-legemidler-mot-lakselus.pdf
- Hansen, A.B., Patel, D., Brinchmann, M.F. and Iversen, M.H. (2016) The effect of long-term stress on basal levels of plasma cortisol and hypothalamic-pituitary-Interrenal (HPI) Axis in lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*). *Aquaculture Research* submitted.
- Hatløy, T. (2015). Effekten av akutt allostatisk belastning på hypothalamus – hypofyse – interrenal akse, og dets betydning på dyrevelferden hos diploid og triploid atlantisk lakssmolt (*Salmo salar* L.) (Master). Nord University.
- Havforskningsinstituttet, 2017. Risiko norsk fiskeoppdrett. Lastet ned fra: https://www.imr.no/filarkiv/2017/05/risikorapport_2017.pdf/nb-no
- Havforskningsrapporten, 2014. Sykdom og parasitter i vill og oppdrettet rognkjeks. Lastet ned fra: https://www.imr.no/filarkiv/2014/03/sykdom_og_parasitter_i_vill_og_oppdrettet_rognkjeks.pdf/nb-no
- Havforskningsrapporten, 2016. Lastet ned fra: https://issuu.com/havforskningsinstituttet/docs/havforskningsrapporten_2016

- Hevrøy, E.M, Hunskår, C., Gelder, S., Shimizu, M., Waagbø, R., Breck, O., Takle, S.S, Hansen, T. 2013. GH-IGF system regulation of attenuated muscle growth and lipolysis in Atlantic salmon reared at elevated sea temperatures (vol 183, pg 243, 2013). *Journal of Comparative Physiology B*. **183** (2) 243-259.
- Heuch P.A., Parsons A. & Boxaspen K. 1995. Diel vertical migration: a possible hostfinding mechanism in salmon louse (*Lepeophtheirus salmonis*) copepodids? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 52, 681-689.
- HI, 2010. Resistens og lakselus. Havforskningsrapporten – Ressurser, miljø og akvakultur på kysten og i havet. 2010. Lastet ned 29.08.2017 fra: https://www.imr.no/filarkiv/2010/07/havforskningsrapport2010_web.pdf/nb-no
- HI, 2010. Fakta om leppefisk. Havforskningsinstituttet, Publisert: 23.04.2010 – Oppdatert: 03.07.2017.
- HI, 2014. Risikovurdering norsk fiskeoppdrett. Havforskningsinstituttet 2014. Lastet ned fra: http://www.imr.no/filarkiv/2015/04/risikovurdering_2014_web.pdf/nb-no
- HI, 2016. Fakta om lakselus. Havforskningsinstituttet; Publisert: 07.04.2009 – Oppdatert: 19.05.2016 Lastet ned fra <http://www.imr.no/temasider/parasitter/lus/lakselus/nb-no>
- Huntingford, A., Adams, C.V.A., Braithwaite, V., Kadri, S., Pottinger, T.G., Sandøe, P. and Turnbull, J.F. (2006) Current issues in fish welfare. *Journal of Fish Biology* **68**, 32-372.
- Imsland, A., Reynolds, P., Eliassen, G., Hangstad, T., Foss, A., Vikingstad, E., et al. (2014). The use of lumpfish (*Cyclopterus lumpus* L.) to control sea lice (*Lepeophtheirus salmonis* Krøyer) infestations in intensively farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* (18-23).
- Ingólfsson, A. and Kristjánsson, B.K. (2011) Diet og juvenile lumpsucker *Cyclopterus lumpus* 476. doi:10.1643/0045-8511(2002)002[0472:DOJLCL]2.0.CO;2
- Innst. 361 S (2014–2015) Innstilling fra næringskomiteen om forutsigbar og miljømessig bærekraftig vekst i norsk lakse- og ørretoppdrett: <https://www.stortinget.no/no/Saker-og-publikasjoner/Publikasjoner/Innstillinger/Stortinget/2014-2015/inns-201415-361/> (lenke sist åpnet 21.05.2018)
- Iversen, Audun (2017). Produksjonskostnadene opp 96%. Nofima. Lastet ned fra: <https://nofima.no/nyhet/2017/09/produksjonskostnadene-opp-96-prosent/>
- Iversen M (2013) Stress and its impact welfare during commercial production of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). In: *University of Nordland, PhD in aquaculture no. 9, Bodø, Norway*. 148 pp.
- Iversen, Martin Haugmo; Jakobsen, Roald; Eliassen, Robert. 2015. Stress; en viktig bidragsyter til svinn i sjø. *Norsk Fiskeoppdrett* 2015; Volum NFexpert. s. 22-27
- Iversen, Martin Haugmo; Jakobsen, Roald; Eliassen, Robert; Ottesen, Oddvar. 2015. Sedasjon av berggylt og rognkjeks for å redusere stress og dødelighet. *Norsk Fiskeoppdrett* 2015; Volum NF expert. s. 42-46.
- Iversen, M. & Eliassen. R. A. 2009. The Effect of AQUI-S® Sedation on Primary, Secondary and Tertiary Stress Responses during Salmon Smolt (*Salmo salar* L.) Transport and Transfer to Sea. *Journal World of Aquaculture Society*. **40** (2): 216-225
- Iversen, M.H. and Eliassen, R.A. (2014). The effect of allostatic load on hypothalamus-pituitary-interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry* **40**, 527-538.

- 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**, 2333-241.
- Iversen, M., Eliassen, R. A. & Robb D. H. F. (2013). The effects of Aquil-S vet. sedation during vaccination on survivability, appetite, growth, immunological capacity, primary, secondary and tertiary stress responses in Atlantic salmon parr (*Salmo salar* L). *Aquaculture* (submitted)
- 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, Bodoe, Norway. 148 pp.
- 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 M, Finstad B, McKinley RS, Eliassen RA, Carlsen KT, Evjen T (2005) Stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts during commercial well boat transports, and effects on survival after transfer to sea. *Aquaculture* **243** (1-4):373-382
- Juster RP, McEwen BS, Lupien SJ (2010) Allostatic load biomarkers of chronic stress and impact on health and cognition. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* **35** (1):2-16. doi:10.1016/j.neubiorev.2009.10.002
- Khansari, A. L. I. R., Carles Balasch, J., Reyes-López, F. & Tort, L. (2017). *Stressing the inflammatory network: Immuno-endocrine responses to allostatic load in fish*.
- Kumar, A., Alcers, K., Grunhaus, L. & Greden, J.F. (1986). Relationships of the dexamethasone suppression test to clinical severity and degree of melancholia. *Biological Psychiatry*, **21**(5-6), 436-444.
- Latremouille D. N. (2003) Reviews in Fisheries Science Volume 11. Taylor and Francis Ltd. Pp. 315-335(21). Doi: 10.1080/10641260390255745
- Lederis K, Fryer JN, Okawara Y, Schönrock C, Richter D (1994) Corticotropin-Releasing Factors Acting on the Fish Pituitary: Experimental and Molecular Analysis. In: Sherwood NM, Hew CL, Farrell AP, Randall DJ (eds) *Fish Physiology, Vol 13. Academic Press*, pp 67-100
- Lee, L. E. J. & Bols, N. C. (1989). The corticosteroid receptor and the action of various steroids in rainbow trout fibroblasts. *Gen Comp Endocrinol*, **74**, 85-95.
- Logan DW, Bryson-Richardson RJ, Pagáin KE, Taylor MS, Currie PD, Jackson IJ (2003) The structure and evolution of the melanocortin and MCH receptors in fish and mammals. *Genomics* **81** (2):184-191
- Lovdata, 2017. Forskrift om etablering og utvidelse av akvakulturanlegg, zoobutikker m.m. lastet ned 24.08.2017: fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2008-06-17-823>
- Lovdata, 2017. Forskrift om bekjempelse av lakselus i akvakulturanlegg. Lastet ned 03.09.2017 fra: <https://lovdata.no/dokument/SF/forskrift/2012-12-05-1140>
- Lusedata, 2018. Om lakselus. Sjømat Norge. Lastet ned fra: <http://lusedata.no/om-lakselus/>
- Mattilsynet, 2016. Seksjon fiskehelse og fiskevelferd. Mulighet og/eller sannsynlighet for at lakselus kan utvikle endret toleranse for ferskvann som følge av behandlinger med ferskvann mot lakselus og AGD i oppdrettsanlegg – forvaltningsstøtte. Lastet ned 02.09.2017 fra: <http://www.eng.vetinst.no/layout/set/print/content/download/17048/190404/file/Vurdering%20av%20risiko%20for%20lakselus%20sin%20toleranse%20mot%20ferskvann.pdf>

- McCormick, S.D, Hansen, L.P, Quinn, T.P. & Saunders, R.L., 1998. Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. **55**, 77-92
- McEwen BS (1998) Stress, adaptation, and disease - Allostasis and allostatic load. In: Neuroimmunomodulation, vol 840. *Annals of the New York Academy of Sciences*. pp 33-44
- McEwen BS, Wingfield JC (2003) The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior* **43** (1):2-15. doi:10.1016/s0018-506x(02)00024-7
- McEwen BS (2005) Stressed or stressed out: What is the difference? *Journal of Psychiatry & Neuroscience* **30** (5):315-318
- Miljødirektoratet, 2015. Fiskeoppdrett. Lastet ned fra:
<http://www.miljostatus.no/Tema/Hav-og-kyst/Fiskeoppdrett/>
- 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, T. W. & Foster, G. D. (1995). Tissue carbohydrate metabolism, gluconeogenesis and hormonal and environmental influences. I: P. W. Hochachka & T. P. Mommsen (Red.). *Metabolic and Adaptional Biochemistry, Elsevier, Amsterdam* (s. 65-100.).
- Morgan MJ, Wilson CE, Crim LW (1999) The effect of stress on reproduction in Atlantic cod. *J Fish Biol.* **54** (3):477-488
- 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. *Physiol. Behav.* **92** (3):317-339
- Mosconi G, Cardinaletti G, Carrotti M, Palermo F, Soverchia L, Polzonetti-Magni AM (2006) Neuroendocrine mechanisms regulating stress response in cultured teleost species. In: Reinecke M, Zaccone G, Kapoor BG (eds) *Fish endocrinology volume 2. Science Publisher, Enfield, NH, USA*. pp 693-720.
- 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.
- North, B.P., Turnbull, J.F.T., Ellis, T., Porter, M.J., Migaud, H., Bron, J. and Bromage, N.R. (2006) The impact of stocking density on the welfare of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture* **255**, 466-479.
- Okawara Y, Ko D, Morley SD, Richter D, Lederis KP (1992) Insitu hybridization of corticotropin-releasing factor-encoding messenger RNA in the hypothalamus of the white sucker, *Catostomus commersoni*. *Cell and Tissue Research* **267** (3):545-549. doi:10.1007/bf00319377
- Oki Y, Sasano H (2004) Localization and physiological roles of urocortin. *Peptides* **25** (10):1745-1749 Pankhurst NW (2011) The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, **170**, 265-275.
- Olsen YA, Einarsdottir IE & Nilssen KJ (1995) Metomidate anaesthesia in Atlantic salmon, *Salmo salar*, prevents plasma cortisol increase during stress. *Aquaculture*, **134**, 155-168.
- Paulina Gebauer, Kurt Paschke, Claudia Vera, Jorge E. Toro, Miguel Pardo, Mauricio Urbina., 2017. Lethal and sub-lethal effects of commonly used anti-sea lice formulations on non-target crab *Metacarcinus edwardsii* larvae. *Chemosphere*. **185**, 1019-1029

- Pepels P, van Helvoort H, Wendelaar Bonga SEW, Balm PHM (2004) Corticotropin-releasing hormone in the teleost stress response: rapid appearance of the peptide in plasma of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Journal of Endocrinology* **180** (3):425-438
- 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.
- Petersen, B. C. & Small, B. C. (2004). Effects of fasting on circulating IGF-Binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Domestic Animal Endocrinology*, **26**(3), 231-240.
- Prunet P, Sturm A, Milla S (2006) Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts. *General and Comparative Endocrinology* **147** (1):17-23
- Rackovan, J. L. & Howell, W. H. (2017). Spatial and temporal distribution of juvenile *Cyclopterus lumpus* (lumpfish) in a New England estuary. *Regional Studies in Marine Science*, **16**, 109-115. doi: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2017.08.013>
- 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.
- Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2016. Lastet ned fra http://www.imr.no/filarkiv/2016/04/risikovurdering_2016.pdf/nb-no
- Rotllant J, Balm PHM, Ruane NM, Páez-Sánchez J, Wendelaar-Bonga SE, Tort L (2000) Pituitary Proopiomelanocortin-Derived Peptides and Hypothalamu-Pituitary-Interrenal Axis Activity in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) during Prolonged Crowding Stress: Differential Regulation of Adrenocorticotropin Hormone and Melanocyte-Stimulating Hormone Release by Corticotropin-Releasing Hormone and Thyrotropin-Releasing Hormone. *General and Comparative Endocrinology* **119** (2):152-163
- Ruiz-Gomez MD, Kittilsen S, Höglund E, Huntingford FA, Sørensen C, Pottinger TG, Bakken M, Winberg S, *Coping styles: When doves become hawks. Horm Behav* **54**:534-538.
- Sandodden R, Finstad B, Iversen M (2001) Transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): anaesthesia and recovery. *Aquac. Res.*, **32**, 87-90.
- Schram TA (1993) Supplementary descriptions of the developmental stages of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) (Copepoda: Caligidae). In: GA Boxshall D. Defaye. *Pathogens of wild and farmed fish: sea lice*. New York: Ellis Horwood. pp. 30-47
- Schiöth HB, Haitina T, Ling MK, Ringholm A, Fredriksson R, Cerdá-Reverter JM et al. (2005) Evolutionary conservation of the structural, pharmacological, and genomic Selye H (1950) Stress and the general adaption syndrome. *British Medical Journal*, **1** (4667), 1383- 1392.
- Schreck CB, Maule AG, Kaattari SL (1993) Stress and disease resistance. In: Roberts RJ, Muir JF (eds) *Recent Advances in Aquaculture, IV*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp 170-175
- Schreck CB, Contreras-Sanchez W, Fitzpatrick MS (2001) Effects of stress on fish reproduction, gamete quality, and progeny. *Aquaculture* **197** (1-4):3-24
- Schreck CB (2010) Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, **165**, 549-556.
- Selye H (1973) Homeostasis and heterostasis. *Perspectives of Biological Medicine*, **16**, 441-445.

- Shepard JD, Barron KW, Myers DA (2000) Corticosterone delivery to the amygdala increases corticotropin-releasing factor mRNA in the central amygdaloid nucleus and anxiety-like behavior. *Brain Research* **861** (2):288-295
- Shepard JD, Schulkin J, Myers DA (2006) Chronically elevated corticosterone in the amygdala increases corticotropin releasing factor mRNA in the dorsolateral bed nucleus of stria terminalis following duress. *Behavioural Brain Research* **174** (1):193-196
- Singh A, Petrides JS, Gold PW, Chrousos GP, Deuster PA (1999) Differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis reactivity to psychological and physical stress. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **84** (6):1944-1948
- Siiteri PK, Murai JT, Hammond GL, Nisker JA, Raymoure WJ, Kuhn RW (1982) The serum transport of steroid hormones. *Recent Progress in Hormone Research* 38:457–510
- Smith MA, Weiss SRB, Berry RL, Zhang L-X, Clark M, Massenburg G et al. (1997) Amygdala-kindled seizures increase the expression of corticotropin-releasing factor (CRF) and CRF-binding protein in GABAergic interneurons of the dentate hilus. *Brain Research* **745** (1-2):248-256
- Sorensen, C., Bohlin, L. C., Overli, O. & Nilsson, G. E. (2011). Cortisol reduces cell proliferation in the telencephalon of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Physiol Behav*, **102**(5), 518-523. Doi: 10.1016/j.physbeh.2010.12.023
- Staurnes M, Sigholt T, Pedersen HP, Rustad T (1994) Physiological-Effects of Simulated High-Density Transport of Atlantic Cod (*Gadus-Morhua*). *Aquaculture*, **290**, 243-249.
- Staurnes M., Sigholt, T., Åsgård, T. & Baeverfjord, G., 2001. Effects of a temperature shift on seawater challenge test performance in Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolt. *Aquaculture*. **201**, 153-159.
- Stolte EH, Nabuurs SB, Bury NR, Sturm A, Flik G, Savelkoul HFJ et al. (2008) Stress and innate immunity in carp: Corticosteroid receptors and pro-inflammatory cytokines. *Molecular Immunology* 46 (1):70-79
- Takahashi H, Sakamoto T, Hyodo S, Shepherd BS, Kaneko T, Grau EG (2006) Expression of glucocorticoid receptor in the intestine of a euryhaline teleost, the mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*): Effect of seawater exposure and cortisol treatment. *Life Sciences* **78** (20):2329-2335
- Rotllant J, Balm PHM, Ruane NM, Páez-Sánchez J, Wendelaar-Bonga SE, Tort L (2000) Pituitary Proopiomelanocortin-Derived Peptides and Hypothalamu-Pituitary-Interrenal Axis Activity in Gilthead Sea Bream (*Sparus aurata*) during Prolonged Crowding Stress: Differential Regulation of Adrenocorticotropin Hormone and Melanocyte-Stimulating Hormone Release by Corticotropin-Releasing Hormone and Thyrotropin-Releasing Hormone. *General and Comparative Endocrinology* **119** (2):152-163
- Scott, A. and Ellis, T. (2007) Measurement of fish steroid in water – a review. *General comparative Endocrinology* **153**, 392-400.
- Statistisk sentralbyrå. (2017). Fiskeoppdrett. <https://www.ssb.no/fiskeoppdrett>
- Treasurer, J., Noble, C., Velmurugu P., Sonia, R., Iversen, M. H (2018) Cleaner fish welfare. *Unpublished material*.
- 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.

- Tucker, CS, Sommerville, C & Wootten, R. (2000). The effect of temperature and salinity on the settlement and survival of copepodids of *Lepeophtheirus salmonis* (Krøyer, 1837) on Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Diseases* **23**, 309-320.
- Turnbull, J., Bell, A., Adams, C. Bron, J. and Huntingford, F. (2005) Stocking density and welfare of cage farmed Atlantic Salmon: application of multivariate analysis. *Aquaculture* **243**, 121-132.
- Varsamos S, Flik G, Pepin JF, Bonga SEW, Breuil G (2006) Husbandry stress during early life stages affects the stress response and health status of juvenile sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Fish & Shellfish Immunology* **20** (1):83-96
- 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** (1-3):105-110
- Veiseth, E., Fjaera, S. O., Bjerkeng, B. & Skjervold, P. O. (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.
- Vijayan MM, Raptis S, Sathiyaa R (2003) Cortisol treatment affects glucocorticoid receptor and glucocorticoid-responsive genes in the liver of rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology* **132** (2):256-263
- 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.
- 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 ahelical CRF-(9-41). *Regulatory Peptides* **19** (5-6):273-280
- Whelan, K. (2010). *A Review of the Impacts of the Salmon Louse, Lepeophtheirus salmonis (Krøyer, 1837) on Wild Salmonids:*
- Wilens TE, Ritchie JC, Carrol BJ (194) Comparison of plasma cortisol and corticosterone in the dexamethasone suppression test for melancholia. *Psychoneuroendocrinology* **9**(1):45-55
- Willumsen, L. (2001). *Fangst av rognkjeks (Cyclopterus Lumpus L.) og rognkjeks som lusespiser på laks*. GIFAS.
- Wingfield, J. C. (2005). The concept of allostasis: Coping with a capricious environment. *Journal of Mammalogy*, **86**(2), 248-254.
- Wingfield J. C. & Sapolsky RM (2003) Reproduction and resistance to stress: When and how. *Journal of Neuroendocrinology* **15**, 711-724.