

MASTEROPPGAVE

Emnekode: AK306F

Navn / kandidatnr.: Kristin Erdal / 3

Stress, fiskevelferd og sårheling hos fisk.

Hvordan stress påvirker sårheling og
fiskevelferden hos atlantisk post-smolt

(Salmo salar L.).

Dato: 01.06.2021

Totalt antall sider: 70

Forord

Denne oppgaven teller 60 studiepoeng, og er en del av en master i biovitenskap spesialisert på akvakultur ved fakultet for biovitenskap og akvakultur ved Nord Universitet i Bodø.

Dyrevelferd og helse har alltid vært viktig for meg. På universitetet i Bodø ble jeg kjent med min veileder Martin Haugmo Iversen, og med hans engasjement og uendelige kunnskap om stress og stressets påvirkning på fisk var det ingen tvil om hvem jeg ønsket å ha som veileder på min masteroppgave. Jeg ønsker å rette en stor takk til Martin, som til tross for den vanskelige tiden vi har vært gjennom har vært fantastisk løsningsorientert og fleksibel, alltid stilt opp, kommet med gode tilbakemeldinger og motivasjon, samt gitt meg utrolig mye kunnskap som jeg skal ta med meg videre. Jeg er så takknemlig! Jeg vil også takke min med-veileder Monica F. Brinchmann for svært nyttige tilbakemeldinger og all hjelp.

Dette forsøket er en del av et større prosjekt i regi av Arctic Seafood Group, med den hensikt å utvikle et akustisk merke som kan overvåke laksen under praktiske oppdrettsforhold. Jeg ønsker derfor å takke Arctic Seafood Group ved Lasse Vebostad for finansiell støtte til dette forsøket.

Jeg vil også rette en stor takk til Miira Virtanen og Deepti Manjari Patel, som har vært fantastisk dyktige samarbeidspartnere under prøveuttak og analyser. Tusen takk for at dere alltid har stilt opp, og for alt dere har lært meg. I tillegg vil jeg takke alle ansatte ved Mørkvedbukta forskningsstasjon som har stått på for å gjøre dette prosjektet mulig å gjennomføre.

Min tid som student på Nord Universitet hadde ikke vært den samme uten Maja Erichsen. Du er best! Takk for alt du har lært meg og for gode samarbeid - jeg håper det blir flere i fremtiden.

Til slutt vil jeg takke min nydelige familie og min flotte samboer for at dere alltid har hatt troen på meg og for den uerstattelige støtten dere har gitt meg under studietiden. Jeg er evig takknemlig.

Stavanger, juni 2021

Kristin Erdal

Innholdsfortegnelse

Forord	i
Innholdsfortegnelse	ii
Sammendrag	iv
Summary	v
Liste over figurer	vi
Liste over forkortelser	vii
1. Introduksjon	1
1.1. Dyrevelferd	1
1.2. Bevissthet	2
1.3. Velferdsbehov	3
1.4. Velferdsindikatorer	4
1.5. Hva er stress?	6
1.6. Fysiologien bak en stressreaksjon	8
1.6.1. Primær stressrespons	9
1.6.2. Sekundær stressrespons	10
1.6.3. Tertiær stressrespons	10
1.7. Måling av stress	11
1.8. Fiskens immunsystem	11
1.8.1. Akutt stress og immunsystemet	13
1.8.2. Kronisk stress og immunsystemet	13
1.9. Hud og slim	13
1.10. Sårheling	15
1.11. Hensikten med forsøket	16
2. Material og metode	17
2.1 Godkjenning av bruk av dyr i forsøk	17
2.2 Forsøksfisk	17
2.3 Forsøksoppsett	17
2.3.1 Forsøket	17
2.3.2 Stressor	19
2.3.3 Prøveuttak	19
2.4 Analytiske prosedyrer	19
2.4.1 ACTH	19
2.4.2 Kortisol	20
2.4.3 Glukose	21
2.4.4 Laktat	21
2.4.5. Vekst og spesifikkvekstrate (SGR)	21
2.4.6. Osmolalitet (mOsm/kg)	21
2.4.7. Ioner	21
2.4.9. Finneslitasje skår	22
2.5 Statistisk analyse	22
3. Resultat	24
3.1. Primære stressrespons	24

3.1.1. ACTH	24
3.1.2. Plasmakortisol	25
3.2. Sekundære stressresponser	26
3.2.1. Glukose.....	26
3.2.2. Laktat.....	26
3.2.3. Osmolalitet	27
3.2.4. Ioner	28
3.3. Tertiære stressresponser	31
3.3.1. Vekst.....	31
3.3.1.1. Vekt	31
3.3.1.2. Lengde.....	32
3.3.1.3. Spesifikk vekstrate	33
3.3.2. Operative velferdsindikatorer (OVI).....	34
3.3.2.1. Brystfinner (Pectoral).....	34
3.3.2.2. Bukfinner (Pelvic).....	35
3.3.2.3. Analfinne.....	36
3.3.2.4. Halefinne (caudal).....	37
3.5. Sårheling.....	38
4. Diskusjon.....	39
4.1. Primære stressresponser	39
4.1.1. ACTH.....	39
4.1.2. Kortisol.....	40
4.1.3. Sammenhengen mellom ACTH og kortisol i sår- og stress-gruppen.....	41
4.2. Sekundære stressresponser	42
4.2.1. Glukose.....	42
4.2.2. Laktat.....	43
4.2.3. Osmoregulatoriske effekter	44
4.2.3.1. Osmolalitet	45
4.2.3.2. Kloridioner	47
4.2.3.3. Magnesiumioner.....	48
4.2.3.4. Kalsiumioner	49
4.3. Tertiære stressresponser	50
4.3.1. Vekst.....	50
4.3.2. Finneslitasje.....	51
4.5. Sårheling.....	52
4.6. Oppsummering	53
5. Konklusjon	54
Litteraturliste	55

Sammendrag

Stress er et nøkkelproblem i akvakultur. Oppdrettsfisk lever i et miljø hvor de kontinuerlig kan bli eksponert for ulike stressfaktorer som for eksempel høy tetthet, temperaturforandringer, menneskelig håndtering, transport, og patogene organismer. Økt stress som følge av disse faktorene øker også sjansen for at det oppstår sår, og det er estimert at 1-2,5% av oppdrettslaks dør hvert år på grunn av sår. Å være i stand til å håndtere disse utfordringene er essensielt for at fisken skal klare å overleve, trives og vokse i miljøet den lever i. Dette prøver de å håndtere ved hjelp av en stressreaksjon som sørger for å skaffe energi til umiddelbar handling rettet mot overlevelse, og gjenoppretting av eventuelle forstyrrelser i den hydromineral balansen. Hensikten med dette eksperimentet var å undersøke om kronisk stress påvirker sårheling etter et kirurgisk inngrep, og om fiskevelferden ble negativt påvirket over tid.

Dette forsøket ble utført i triplikat og bestod av tre forskjellige grupper fordelt på ni kar; kontroll-gruppe, sår-gruppe og sår- og stress-gruppe. I de to sistnevnte gruppene ble det operert inn en dummy smart-tag (ikke aktiv) før forsøksstart. Sår- og stress-gruppen ble utsatt for daglig stress i 8 uker i form av akutt tetthets økning og 20 sekunders lufteksponering. Plasma ACTH analyser viste betydelige økninger i basalnivå hos sår- og stress-gruppen i uke 4 og 5, og kortisolanalyser viste signifikante økninger i basalnivå hos sår- og stress-gruppen i uke 6, 7 og 8. Analyser av sekundære stressresponser viste ingen signifikante endringer hos noen av gruppene for glukose, laktat, kloridioner, magnesiumioner, og kalsiumioner. Kontroll-gruppen hadde en betydelig reduksjon i osmolalitet etter 1 uke. Sår- og stress-gruppen hadde betydelig høyere finneskår på brystfinner i uke 3, 4, 5, 6, 7 og 8 og analfinne i uke 6 og 7 sammenlignet med de andre gruppene. Såret til sår- og stress-gruppen hadde en raskere helingsprosess enn sår-gruppen. Ved forsøksslutt var det kun kontroll-gruppen som hadde en signifikant økning i vekt sammenlignet med forsøksstart.

Resultatene i dette eksperimentet indikerer at kronisk stress ikke har noen negativ effekt på sårheling og fiskevelferd, men en kan ikke utelukke at dette hadde skjedd dersom forsøket hadde vedvart over lengre tid. Undersøkelsen viser at fisken i sår- og stress-gruppen går over i en allostatisk overbelastning type 2 ettersom basalnivåene av plasmakortisol hadde en signifikant økning i uke 6, 7 og 8.

Summary

Stress is a key problem in aquaculture. Farmed fish live in an environment in which they may be continuously exposed to various stressors such as high density, temperature changes, human handling and transport, and pathogenic organisms. Increased stress as a result of these factors also increases the chance of wounds occurring, and it is estimated that 1-2,5% of the farmed salmon die each year due to wounds. Being able to deal with these challenges is essential for the fish to be able to survive, thrive and grow in the environment in which they live. They try to deal with this by means of a stress response that provides energy for immediate action aimed at survival and recovery of any disturbances in the hydromineral balance. The purpose of this experiment was to investigate whether chronic stress affect wound healing after a surgical procedure, and whether the fish welfare was negatively affected over time.

This experiment was performed in triplicate and consisted of three different groups divided into nine tanks; control-group, wound-group and wound- and stress-group. In the latter two groups a dummy smart tag (not active) was inserted surgically before the start of the experiment. The wound- and stress-group was exposed to daily stress for 8 weeks and the stressor was acute increase in density and 20 seconds of air exposure. Plasma ACTH analyses showed significant increases in basal levels in the wound- and stress-group at weeks 4 and 5, and cortisol analyses showed significant increase in the same group at weeks 6, 7 and 8. Analyses of secondary stress responses showed no significant changes in any of the groups for glucose, lactate, chloride ions, magnesium ions, and calcium ions. The control-group had a significant reduction in osmolality after 1 week. The wound- and stress-group had significantly higher fin scores on pectoral fins in weeks 3, 4, 5, 6, 7 and 8 and anal fins in weeks 6 and 7 compared to the other two groups. The wound- and stress-group also had a faster wound healing compared to the wound-group. At the end of the experiment, only the control-group had a significant increase in weight compared to the start of the experiment.

The results of this experiment indicate that chronic stress has no negative effects on wound healing and fish welfare, but one cannot exclude that this might have happened if the experiment would have continued for a longer period. The study shows that the fish in the wound- and stress-group go into an allostatic overload type 2 as the basal levels of plasma cortisol had a significant increase in weeks 6, 7 and 8.

Liste over figurer

Figur 1. Velferdsbehov hos laks.....	4
Figur 2. Konseptet allostatisk overbelastning type 1 og type 2.....	8
Figur 3. Illustrasjon av stressreaksjon..	9
Figur 4. Oversikt over lymfoide organer hos laksefisk.....	12
Figur 5. Tredimensjonalt snitt av huden til laksefisk.....	14
Figur 6. Eksperimentelt design.....	18
Figur 7. Kirurgisk implantasjonsprosedyre av «dummy-tags»	18
Figur 8. Morfologisk skåringssystem for diagnostikk og klassifisering av finneskader.....	22
Figur 9. Gjennomsnittlige verdier av ACTH (pmol/L) ($n \pm SD$) i plasma hos alle gruppene gjennom hele forsøket.....	24
Figur 10. Gjennomsnittlige verdier av plasmakortisol (nmol/L) ($n \pm SD$) hos alle gruppene gjennom hele forsøket..	25
Figur 11. Gjennomsnittlige verdier av plasma osmolalitet (mOsm/kg) ($n \pm SD$) for alle gruppene gjennom hele forsøket.....	27
Figur 12. Gjennomsnittlige verdier av kloridioner (mM) ($n \pm SD$) i plasma hos alle gruppene gjennom hele forsøket.....	28
Figur 13. Gjennomsnittlige verdier av magnesiumioner (mM) ($n \pm SD$) i plasma gjennom forsøket.....	29
Figur 14. Gjennomsnittlige verdier av kalsiumioner (mM) ($n \pm SD$) i plasma gjennom forsøket.....	30
Figur 15. Gjennomsnittlige verdier av vekt (kg) ($n \pm SD$) hos alle gruppene gjennom hele forsøket.....	31
Figur 16. Gjennomsnittlige verdier av lengde (cm) ($n \pm SD$) hos alle gruppene gjennom hele forsøket.....	32
Figur 17. Gjennomsnittlig spesifikk vekstrate (%) for alle gruppene gjennom de første fire ukene og de fire siste ukene av forsøket.....	33
Figur 18. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) ($n \pm SD$) på brystfinner gjennom forsøket.....	34
Figur 19. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) ($n \pm SD$) på bukfinner hos alle gruppene gjennom forsøket.....	35
Figur 20. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) ($n \pm SD$) på analfinne hos alle gruppene gjennom forsøket.....	36
Figur 21. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) ($n \pm SD$) på halefinne gjennom forsøket.....	37
Figur 22. Bilde av utviklingen av sårheling.....	38
Figur 23. Gjennomsnittlige verdier av plasma ACTH og kortisol ($n \pm SD$) hos sår- og stressgruppen.....	42

Liste over forkortelser

ACTH – Adrenokortikotropt hormon

CRH – Kortikotropinfrigjørende hormon

EIA – Enzyme immunoassay

ELISA – Enzyme-linked immunosorbent assay

GAS – General adaptation syndrome

GR – Glukokortikoidreseptor

HPI – aksen – Hypothalamus-hypofyse-interrenal-aksen

HRP - Horseradish peroxidase

HSC - aksen - Hypothalamus-sympatisk-kromaffin aksen

IEC – Mellomliggende epidermale celler

IL – Interleukin

IRF – Interferon regulatorisk faktor

LABVI – Laboratoriebaserede velferdsindikatorer

MR - Mineralokortikoidreseptor

OVI – Operative velferdsindikatorer

RVD - Regulatory volume decrease

SWIM – Salmon welfare index model

TGF – Transforming growth factor

TMAO – Trimetylaminoksyd

TMB - 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine

TNF - Tumor necrosis factor

VI - Velferdsindikator

1. Introduksjon

1.1. Dyrevelferd

Sjømatnæringen er i stadig vekst. Stor etterspørsel etter norsk sjømat globalt i tillegg til lønnsomhet i produksjon og fangstdelen av næringen har gjort at verdiskapningen fra sjømatnæringen nådde 100 milliarder kroner i 2018. Oppdrett av laks (*Salmo salar*) og ørret (*Salmo trutta*) er hovedårsaken til økning i eksportverdi, og utgjør dermed en stor del av verdiskapningen innen den norske sjømatnæringen (Richardsen et al., 2019). I dag er Norge verdens største produsent av laksefisk. Hvert år blir over 350 millioner laks og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) satt ut i merdene i sjøen, hvorav omtrent 60 millioner (15-20%) av fisken dør før de når slaktevekt (Havforskningsinstituttet, 2019). Sykdom, parasitter og skader som følge av menneskelig håndtering og transport resulterer i store lidelser for oppdrettslaksen. Noen av de som overlever kan oppleve andre produksjonsrelaterte velferdsproblemer som ryggraddeformiteter og lesjoner. Selv om bare en relativt liten prosentandel av fisken er berørt, snakker vi fortsatt om millioner av fisk (Havforskningsinstituttet, 2019). Visjonene for oppdrettsnæringen er store, og ifølge Fiskeridepartementet (2015) estimeres det et potensial for femdobling av produksjonen av laksefisk innen 2050 sammenlignet med 2010. Fiskevelferd er derfor et viktig tema som det må rettes fokus på, ettersom god velferd hos oppdrettsfisk er viktig av både av etiske, økonomiske og kvalitetsmessige grunner (Noble et al., 2018).

Ifølge loven om dyrevelferd §23 skal alle dyr i fangenskap holdes i miljø som gir god velferd ut fra artstypiske og individuelle behov, herunder gi mulighet for stimulerende aktiviteter, bevegelse, hvile, og annen naturlig atferd. Dyrers levemiljø skal fremme god helse og bidra til trygghet og trivsel (Dyrevelferdsloven, 2009). I dagens fiskemerder er det opp mot 200 000 fisk i hver merd (Høy et al., 2013), og å passe på at hver fisk har det bra er en omfattende oppgave som krever kunnskap om fiskens velferdsbehov og aktiv evaluering av velferdsindikatorer (se kap. 1.3 og 1.4).

Dyrevelferd kan defineres som individets subjektive opplevelse av sin mentale og fysiske tilstand når det gjelder sitt forsøk på å takle sine omgivelser (Damsgård et al., 2006), eller enklere forklart livskvalitet som oppfattet av dyret selv (Noble et al., 2018). Det handler i hovedsak om å behandle dyrene bra og gi de gunstige levekår slik at de får en god opplevelse av livet. Konseptet om dyrevelferd har ulike synsvinkler, og kan diskuteres i sammenheng med biologisk funksjon, retten til å ha et naturlig liv, eller dyrenes følelser og affektive tilstander. Ved å likestille dyrevelferd med biologisk funksjon menes det at så lenge dyret er sunt og har god vekst og ytelse har det også god dyrevelferd. Retten til naturlig liv innebærer at når dyret

får mulighet til å leve i et naturlig miljø med naturlig vekst og ytelse, og har mulighet til å utføre medfødte, artsspesifikke og instinktive adferdsmønstre, har det god dyrevelferd. Dersom man ser på dyrevelferd i sammenheng med dyrenes følelser og affektive tilstander legges det vekt på at et dyr har høyt velferdsnivå om det er fri fra langvarige negative følelser. Ved å inkludere alle disse faktorene i konseptet om dyrevelferd blir det et veldig komplekst begrep som kan være vanskelig å vurdere og dokumentere i praksis (Noble et al., 2018).

For å enklere kunne definere og vurdere dyrevelferd ble fem brede behovsområder klassifisert tidlig på 1980-tallet av UK Farm Animal Welfare Council. Disse behovsområdene har senere blitt omgjort til det vi i dag kjenner som De fem frihetsgrader (Mellor & Stafford, 2001). De fem frihetsgrader skisserer fem aspekter av dyrevelferd som skal være oppfylt for dyr som er under menneskelig kontroll. Disse aspektene innebærer at dyr i fangenskap skal ha 1) Frihet fra sult og tørst, ved lett tilgang til ferskvann og et kosthold laget for å opprettholde best mulig helse, 2) Frihet fra ubehag, ved å tilby et passende miljø inkludert ly og et komfortabelt hvileområde, 3) Frihet fra smerte, skade eller sykdom, ved forebygging eller rask diagnostisering og behandling, 4) Frihet til å uttrykke sin normale oppførsel, ved å gi tilstrekkelig plass og tilstrekkelig fasiliteter og selskap av dyrets egen art, og 5) Frihet fra frykt og nød, ved å sikre forhold og behandling som unngår psykisk lidelse (Damsgård et al., 2006).

1.2. Bevissthet

For å kunne oppleve sin egen livskvalitet må fisken ha en bevisst kvalitativ opplevelse av livet (Noble et al., 2018). Bevissthet kan defineres som ens evne til å oppleve verden rundt oss og oss selv, både i øyeblikket og over tid. Hva man er bevisst på er individuelt, og kommer an på situasjon og ens forståelse av tidligere opplevelser (Svartdal). Det er dermed viktig å understreke at fiskens oppfattelse av omverden sannsynligvis er svært annerledes enn menneskets oppfatning. Fisken bruker andre sensoriske egenskaper som sender signaler til hjernen slik at de kan skape sin egen indre forståelse av sin ytre verden og hva som skjer rundt dem (Noble et al., 2018).

Fisken bruker sanser som lukt, smak, syn, hørsel, vibrasjonsfølelser, trykk, temperatur, vannbevegelse og nosireseptorer til å samle inn informasjon som den evner å bruke for å oppfylle sine behov, overleve og reprodusere seg. Av denne informasjonen skapes det en forståelse av hva som skjer i det fisken oppfatter som sin verden. På denne måten klarer fisken å samhandle med sine omgivelser, og en slik oppførsel og levemåte hadde ikke vært mulig uten noen form for oppfatning, læring, hukommelse og bevissthet (Noble et al., 2018).

Pattedyr er avhengig av funksjonene til neocortex, en sterk foldet hjernebark (prefrontal cortex) som kun finnes i pattedyr, og som gir mennesker evnen å være bevisst på seg selv og omgivelsene. Denne delen av hjernebarken eksisterer ikke i fisk, og fiskens bevissthet er dermed et omdiskutert tema (Rose, 2002). I følge Noble et al. (2018) har det blitt observert under forskning at fisk har god evne til å lære og å huske, har forventninger om fremtiden, en forståelse av tid, kan knytte sammen tid og sted, lage mentale kart over omgivelsene, gjenkjenne grupped medlemmene sine og samarbeide med dem. Fisk kan også lære ved å observere andre, og noen arter kan til og med gjøre innovasjoner og bruke verktøy (Noble et al., 2018). Et eksempel er observasjoner av leppefisk (*Choerodon schoenleinii*) som viser at de kan bruke stein som ambolt for å knuse skjell (Barstein, 2011), og torsk (*Gadus morhua L.*) som i et forsøk utført av Millot et al. (2014) lærte seg å bruke en dorsalt festet ekstern tag for å aktivere et automatisk foringssystem (Millot et al., 2014).

Selv om studier indikerer at fisk har bevissthet, er det fortsatt delte meninger om det i det hele tatt er mulig å ha bevissthet dersom man mangler neocortex. Noen mener at det ikke er mulig, mens andre mener at det er mulig ettersom forskjellige deler av hjernen kan ha funksjoner som er homologe til neocortex. Noen mener også at neocortex kun definerer graden av bevissthet, og ikke nødvendigvis er en avgjørende faktor for å kunne ha bevissthet (Braithwaite & Boulcott, 2007; Sneddon, 2011).

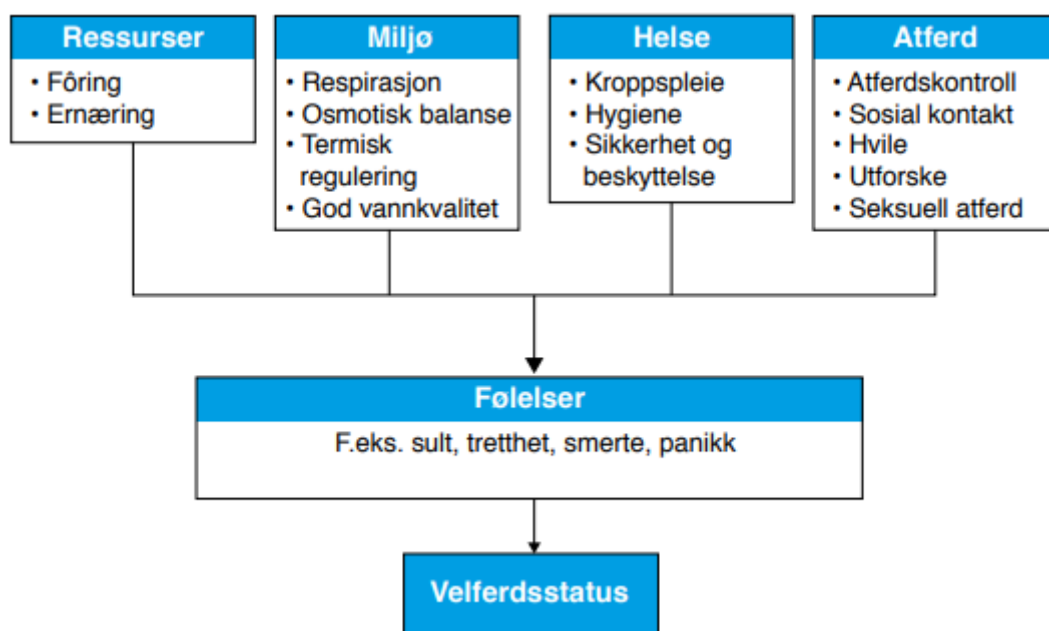
1.3. Velferdsbehov

Alle dyr har visse behov som må oppfylles for at de skal kunne trives, vokse og formere seg i omgivelsene de lever i. Når behovene blir oppfylt skaper det positive følelser som velbehag og tilfredshet og påvirker velferden på en positiv måte, og når de ikke blir oppfylt gir det negative følelser som frustrasjon, frykt, aggresjon, depresjon og smerte og påvirker dermed velferden negativt. Dette kalles velferdsbehov. I følge Noble et al. (2018) kan velferdsbehov deles inn i ultimate og proksimate behov, hvor ultimate behov er behov som er nødvendig for dyrets overlevelse (f.eks. respirasjon, ernæring, termoregulering, vedlikehold av osmotisk balanse og kroppintegritet) og proksimate behov er behov eller atferd som øker dyrets evne til å få oppfylt sine ultimate behov i naturen (f. eks. hopping for laks, lek hos unge pattedyr, utforsking av omgivelser, samhandling med andre individ) og dermed ikke er livsnødvendige i seg selv.

Følelser som smerte, sult, frykt, aggresjon, forventning og tilfredshet genereres av det emosjonelle belønningssystemet i hjernen for å lede dyrets adferd mot å oppfylle sine velferdsbehov (Noble et al., 2018). På denne måten kan dyret på mange måter kontrollere selv

hva det trenger mer eller mindre av eller hvordan det skal håndtere situasjoner, hvis målet er å oppnå tilfredshet. Noen faktorer kan derimot være vanskeligere å avdekke, som for eksempel vitamin eller mineralmangel, eller skadelige kjemikalier i miljøet (Noble et al., 2018).

Stien et al. (2013) har laget en semantisk modell for total velferdsvurdering av atlantisk laks oppdrettet i sjømerd. Modellen kalles laksevelferds indeks modellen (Salmon Welfare Index Model, SWIM) 1.0, og er laget for at oppdrettere skal kunne foreta en formell og standardisert vurdering av fiskevelferd ved hjelp av et sett med utvalgte velferdsindikatorer. De valgte indikatorene i denne modellen er vanntemperatur, saltinnhold, oksygenmetning, vannstrøm, fisketetthet, belysning, forstyrrelse, daglig dødelighetsgrad, appetitt, luseangrep, kondisjonsfaktor, avmagring, vertebrale deformasjoner, modningstrinn, smoltifiseringstrinn, finnetilstand og hudtilstand (Stien et al., 2013). Noble et al. (2018) har i tillegg laget en modell hvor velferdsbehovene har blitt delt inn i behov knyttet til tilgjengelige ressurser, vannmiljø, helse, og grad av atferds frihet. Denne modellen viser hvordan ulike velferdsindikatorer kan påvirke laksens mentale tilstand og dermed også velferdsstatusen (figur 1).



Figur 1. Velferdsbehov hos laks kan grovt kategoriseres i ressurser som må være tilgjengelig, egnet vannmiljø, god helse og atferdsmessig frihet. Graden av oppfyllelse av disse behovene, påvirker laksenes mentale tilstand og dermed deres velferds status som enkeltindivider (Noble et al., 2018).

1.4. Velferdsindikatorer

For å evaluere om fiskens velferdsbehov er oppfylt bruker man velferdsindikatorer (VI). Ved å observere dyrenes tilstand og adferd kan man bedømme velferden direkte, og dersom det ikke er mulig kan man basere velferden på hvilke ressurser og miljø dyrene lever under (f.eks. temperatur og oksygenmetning) og dermed måle velferden indirekte (Duncan, 2005; Stien et

al., 2013). Det er dermed vanlig å dele VI-er inn i dyrebaserte (direkte) og miljøbaserte (indirekte) VI-er (Noble et al., 2018).

Effekten av miljøbaserte VI-er kan bli vurdert basert på hvordan fysiologien til dyret påvirkes. Velferdsproblemer oppstår ofte på grunn av et suboptimalt miljø, noe som gjør at miljøbaserte VI-er i mange tilfeller kan gi et forvarsel om potensielle velferdsproblemer før de synes på tilstanden eller atferden til dyrene (Noble et al., 2018). Duncan (2005) hevder likevel at stressrespons og atferd vil være bedre bevis på dyrets opplevde velferd.

Ved bruk av dyrebaserte VI-er ser man direkte på dyrets egenskaper og får en indikasjon på hvor godt velferdsbehovene er overholdt. Eventuell svikt i systemet vil på et eller annet tidspunkt gjenspeile seg på dyret. For eksempel kan dårlig kondisjonsfaktor, avmagring og dårlige vekstrater være et tegn på at det kan være svikt i foringssystemet og ernæringen til fisken. Bleke gjellefilamenter kan tyde på at fisken ikke vil klare å oppfylle sitt behov for tilstrekkelig respirasjon, og høy gjellelokkfrekvens og gisping i overflaten kan komme av dårlige oksygenforhold i vannet (Noble et al., 2018). Dyrebaserte VI-er måler resultatet av behandlingen av dyrene, og blir ofte synlige først etter at problemet har oppstått. Samtidig vil tegn på dårlig velferd hos en mindre andel av individer i en populasjon indikere at velferden til hovedpopulasjonen også står i fare, og på den måten kan dyrebaserte VI-er fungere som varsel på et økende velferdsproblem på populasjonsnivå (Noble et al., 2018).

Noen indirekte og direkte VI-er kan være enkle å bruke for å evaluere dyrevelferd på laboratoriet eller under kontrollerte studier, men kan være mer utfordrende å bruke i praksis på kommersielle anlegg. Utvalgte VI-er som kan brukes i den daglige driften av kommersiell dyreproduksjon betegnes som operative velferdsindikatorer (OVI-er). Disse må gi en gyldig refleksjon av dyrevelferd, være enkle å bruke, være pålitelige, være repeterbare og sammenlignbare, og være aktuell og passe til formålet indikatoren er bestemt for (Noble et al., 2012; Noble et al., 2018). Noen VI-er tilfredsstiller de fleste operative krav til OVI-er, men innebærer at man må sende inn en prøve for analyse til et laboratorium. Slike velferdsindikatorer kalles for laboratoriebaserte velferdsindikatorer (LABVI), og innebærer eksempelvis kortisol-, histopatologi- og osmolalitätsanalyser (Noble et al., 2018).

Dyrebaserte VI-er kan måles på gruppenivå eller individnivå. På gruppenivå er det vanlig å bruke dødelighetsrate, atferd, overflateaktivitet, appetitt, vekst, indikasjoner i vann, og sykdom for å bedømme dyrevelferden. Denne metoden involverer ingen forstyrrelser for fisken eller noen form for håndtering. Ved måling av velferd på individnivå trenger man i de fleste tilfeller

å håndtere fisken, enten for å undersøke den eller for å ta blodprøver. Dyrebaserte VI-er på individnivå kan måles ved gjellelokkfrekvens, lakselus, bleking av gjeller, kondisjonsfaktor, utmagringsgrad, kjønnsmodningsgrad, smoltifiseringsgrad, ryggspytledeformitet, finneskade (ikke fersk), finnestatus, skjelltap og hudtilstand, øyeskade, gjellelokkdeformitet, organer i bukchulen, eller vaksinerelatert patologi. Blodprøver kan også tas for måling av kortisol, osmolalitet, sammensetning av ioner, glukose, og laktat (Noble et al., 2018).

1.5. Hva er stress?

Iversen og Eliassen (2014) definerer stress som en tilstand der den dynamiske likevekten til en organisme, kalt homeostase, er truet eller forstyrret som et resultat av virkningen av interne eller eksterne stimuli. Når en organisme blir eksponert for denne type stimuli settes det i gang en fysiologisk kaskade av hendelser i kroppen som skal hjelpe organismen til å beseire, håndtere, og overleve utfordringen ved å reetablere homeostase. Tilstanden hvor fiskens homeostase er forstyrret defineres som stress (Wendelaar Bonga, 1997, 2011).

Stressfaktorer (stressorer) kan være alt som utfordrer fisken og setter i gang den fysiologiske kaskaden av hendelser som finner sted under et stressrespons (Schreck & Tort, 2016). Dette kan innebære fysiske og miljøbaserte stressorer som håndtering, dårlig vannmiljø, sosiale stressorer som aggressivitet forårsaket av høy tetthet eller tidlig kjønnsmodning i merdene, til akutte stressorer som predasjon, underernæring, sykdom og likende (Tort, 2011). Tort (2011) hevder at stress kan induseres av «kognitive» og «ikke-kognitive» stimuli, hvor kognitive stressorer er de som kan oppdages gjennom det sensoriske system i nervesystemet, mens ikke-kognitive stressorer for det meste er fysiske ikke-erhvervede stressfaktorer. Alvorlighetsgraden og varigheten av stressoren bestemmer utfallet av den primære, sekundære og tertiære stressresponsen (Schreck & Tort, 2016)

Et konsept kalt «The general adaptation syndrome» (GAS) ble introdusert av Hans Selye på midten av 1900-tallet (Selye, 1950; Selye, 1973). Dette konseptet går ut i på at stressresponsen til en organisme er lik uansett type eller opprinnelse av stressoren. GAS-konseptet hevder at det er tre viktige hendelser som finner sted under stressrespons, nemlig alarm, motstand, og enten kompensasjon eller utmattelse/død (Iversen & Eliassen, 2014; Schreck & Tort, 2016).

Konseptet om allostase ble introdusert av Sterling og Eyer i 1988 for å utfylle begrepet stress og Selye's GAS-konsept. Allostase betraktes som «evnen til å oppnå stabilitet gjennom endring» (Iversen & Eliassen, 2014). Når en organisme utsettes for stress og det skjer en vedvarende endring i aktivitetsnivået hos de primære mediatorene (kortikosteroider og

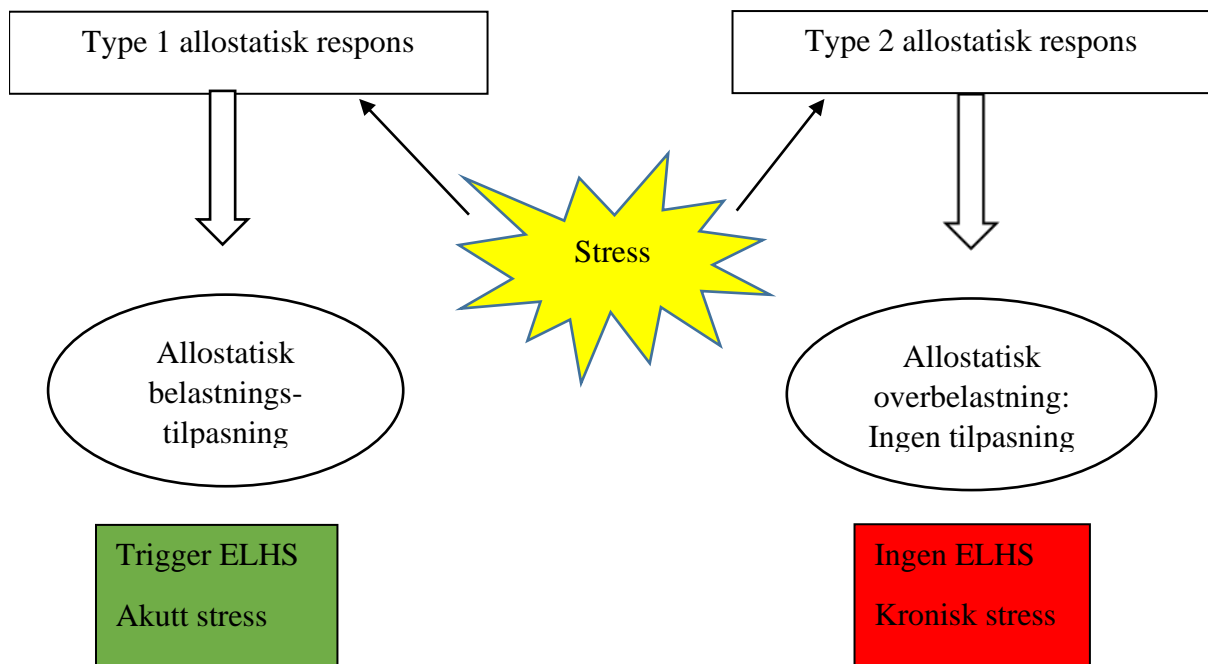
katekolaminer), går organismen inn i en allostatisk tilstand. Under en slik reaksjon oppstår det en ubalanse av de primære mediatorene, for eksempel at det er en overdreven produksjon av kortikosteroider og utilstrekkelig produksjon av katekolaminer. En slik tilstand kan opprettholdes i en begrenset periode dersom matinntak og lagret energi kan gi næring til homeostatiske mekanismer og holde dem under kontroll (McEwen, 1998; Schreck, 2010).

Dersom en allostatisk tilstand vedvarer over lengre tid og blir uavhengig av å opprettholde tilstrekkelige energireserver, resulterer det i en allostatisk belastning. Ifølge Iversen (2013) refererer allostatisk belastning til den kumulative fysiologiske belastningen som belastes kroppen, ettersom individer tilpasser morfologien, fysiologien og oppførselen til mer forbigående faktorer som sesong, miljøendringer eller reproduksjonsstatus, og til mer permanente faktorer som sosial status, parasitter, sår og aldring. Allostatisk belastning kan dermed betraktes som det samlede energibehovet til en organisme som følger av de daglige og sesongmessige rutinene, pluss den ekstra energien som trengs for å forbedre overlevelse som for eksempel å finne en make, avle, migrere, og unngå rovdyr. På denne måten kan man gjennom dette konseptet forene både forutsigbare og uforutsigbare hendelser i livssyklusen. En økning i allostatisk belastning ledsages vanligvis av en økning i glukokortikoid konsentrasjoner, som deretter kan utløse fakultativ adferdsmessige og fysiologiske prosesser som hjelper organismen med å redusere allostatisk belastning, slik at den enkelte kan unngå eller motstå potensialet for kronisk stress (McEwen, 1998; Schreck, 2010)

Dersom ekstra mengder uforutsigbare hendelser som sykdom, menneskelige forstyrrelser og sosiale interaksjoner kommer i tillegg til den allostatiske belastningen, kan belastningen øke drastisk og bli til en allostatisk overbelastning (McEwen, 1998; Schreck, 2010). Man kan dele allostatisk overbelastning inn i type 1 og type 2 (figur 2). Allostatisk overbelastning type 1 er vanligvis assosiert med akutt stress hvor energibehovet overstiger energigevinst og som vil utløse en adaptiv adferd, ved å optimalisere energiforbruket tilpasset den stressfulle situasjonen. Allostatisk overbelastning type 2 er vanligvis assosiert med kroniske stressfaktorer hvor energibehovet til organismen ikke overskrides og ikke utløser noen form respons, men hvor stressfaktoren er til stede og etter hvert kan overstige individets evne til å takle påkjenningen (Iversen & Eliassen, 2014; McEwen & Wingfield, 2003).

ALLOSTASE

Å opprettholde stabilitet gjennom endring



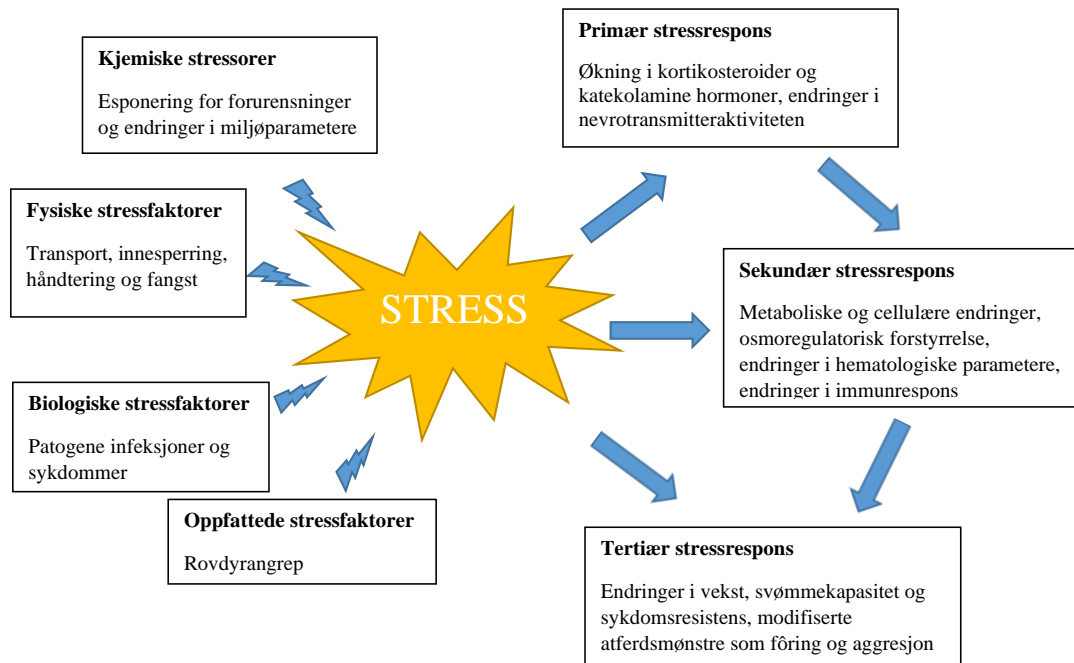
Figur 2. Konseptet allostatisk overbelastning type 1 og type 2. Tegning etter McEwen og Wingfield (2003).

Tiden det tar for organismen å komme seg etter å ha blitt utsatt for en stressor identifiserer forskjellen mellom akutt og kronisk stressrespons (Schreck & Tort, 2016). Det er vanskelig å definere et klart skille mellom akutt og kronisk stress, men Zwollo (2018) hevder at i det minste for mennesker er kort tids stress definert som en hendelse som varer i minutter til timer, mens kronisk stress er stress som vedvarer i flere dager, uker eller måneder. Når en organisme utsettes for en akutt stressfaktor som ikke er alvorlig, er sjansene for full helbredelse høy. Men, dersom fisken utsettes for flere livstruende akutt stressfaktor som går over i en kronisk stresstilstand, vil sjansene for å komme seg være mindre eller små (Schreck & Tort, 2016; Zwollo, 2018).

1.6. Fysiologien bak en stressreaksjon

Schreck og Tort (2016) hevder at stressresponsen viktigste oppgave er å allokere energi for å klare å optimalisere overlevelsen i nåtid. Stressresponsen består av to nøkkelssystemer i teleoster; hypothalamus-hypofyse-interrenal (HPI) aksen og hypothalamus-sympatisk-kromaffin aksen (HSC). Det er HPI-aksen som styrer frigjøring av adrenokortikotrop hormon

(ACTH), mens HSC-aksen styrer frigjøringen av katekolaminer i hodenyren (Zwollo, 2018). For å skille de forskjellige prosessene som skjer i kroppen under en stressreaksjon skiller man vanligvis mellom primær, sekundær, og tertiær stressrespons (figur 3).



Figur 3. Illustrasjon av stressreaksjon. Tegning etter Iversen og Eliassen (2014).

1.6.1. Primær stressrespons

Det første som skjer når sentralnervesystemet mottar stimuli fra en stressor og initierer en fysiologisk stressrespons, er at kromaffinvevet i hodenyren stimuleres til å produsere og skille ut katekolaminer som adrenalin og noradrenalin (Barton, 2002; Zwollo, 2018). Samtidig blir hypothalamus i hjernen stimulert til å syntetisere og frigjøre kortikotropinfrigjørende hormon (CRH), som i fisk beveger seg fra hypothalamus til hypofysen via direkte nevralt kontakt (Ellis et al., 2012) og binder seg til CRH-reseptorer i de kortikotropiske cellene til hypofysen (Tort, 2011). Dette stimulerer de kortikotropiske cellene i hypofysens *pars distalis* til å skille ut ACTH, som igjen stimulerer frigjøring av kortisol fra interrenale celler lokalisert i hodenyren (Tort, 2011). Frigjøringen av kortikosteroider er en litt mer tidskrevende prosess som tar opptil flere minutter sammenlignet med frigjøringen av katekolaminer. I motsetning til kortisol, som blir frigjort gjennom en kaskade av kjemiske budbringere, blir katekolaminer frigjort gjennom direkte stimulering av nervekreter, noe som er gjort innen et par sekunder (Barton, 2002; Ellis et al., 2012; Schreck & Tort, 2016). Økningen av kortikosteroider og katekolaminer i sirkulasjonen er det vi kaller den primære stressresponsen (Barton, 2002; Ellis et al., 2012).

1.6.2. Sekundær stressrespons

Økningen av kortikosteroider og katekolaminer fører til høyere slagvolum for å øke antall røde blodlegemer og dermed øke transporten av oksygen rundt i kroppen. I tillegg stimulerer adrenalin nedbrytningen av glykogen (glykogenolyse) i leveren, noe som fører til økt glukosefrigivelse som gir høyere nivåer av glukose i blodet tilgjengelig for energi (Ellis et al., 2012; Wendelaar Bonga, 1997, 2011). Denne reaksjonen er hva man kaller den sekundære stressresponsen. Samtidig vil adrenalin endre permeabiliteten til gjellene og gjellens blodstrømningsmønster, noe som fører til at fisken ikke klarer å balansere vann- og mineralinnholdet i kroppen. I tillegg til dette vil langvarig økte nivåer av plasmakortisol svekke immunforsvaret ved å deaktivere evnen lymfocytter har til å syntetisere antistoffer. Dette gjør fisken mer mottakelig for sykdom under stressresponsen (Schreck & Tort, 2016).

Hovedfunksjonen til adrenalin er å gi energi til umiddelbar handling rettet mot overlevelse, noe som støttes av kortisol som har i hovedoppgave å omdisponere energi bort fra vekst, reproduksjon og immunsystem for at kroppen skal få nok energi til å håndtere utfordringene. Videre fremmer kortisol tilpasninger som øker stressmotstanden og gjenoppretter forstyrrelsen av den hydromineral ubalansen som fort oppstår hos fisk under stress. Under kronisk stress kan høye nivåer av adrenalin føre til kardiovaskulære problemer, mens forhøyede nivåer av kortisol kan gi tap av kroppsvekt, reproduksjonssvikt og redusert sykdomsresistens (Wendelaar Bonga, 2011).

1.6.3. Tertiær stressrespons

Dersom fisken klarer å tilpasse seg stressoren, eller dersom stressoren har kort varighet, kan homeostase gjenopprettes uten alvorlige konsekvenser. Under slike tilfeller kan effekten av stressoren ha positiv effekt ved å gi forbedret ytelse i fremtiden, som for eksempel å gi økt kapasitet for unngåelse av rovdyr eller økt sykdomsresistens. I slike tilfeller kan en tertiær stressrespons knapt observeres (Wendelaar Bonga, 2011). Dersom fisken ikke klarer å tilpasse seg stressoren, eller om stressoren er kronisk, vil den tertiære stressresponsen bli mer tydelig. Under tertiær stressrespons påvirkes hele fiskens generelle tilstand. Slike høye stressnivåer fører til redusert vekstrate, nedsatt helse og sykdomsresistens, og redusert svømmekapasitet som igjen utfordrer fiskens evne til å unngå rovdyr. Alle disse faktorene kan føre til økt dødelighet innen en fiskepopulasjon (Ellis et al., 2012; Schreck & Tort, 2016; Wendelaar Bonga, 2011).

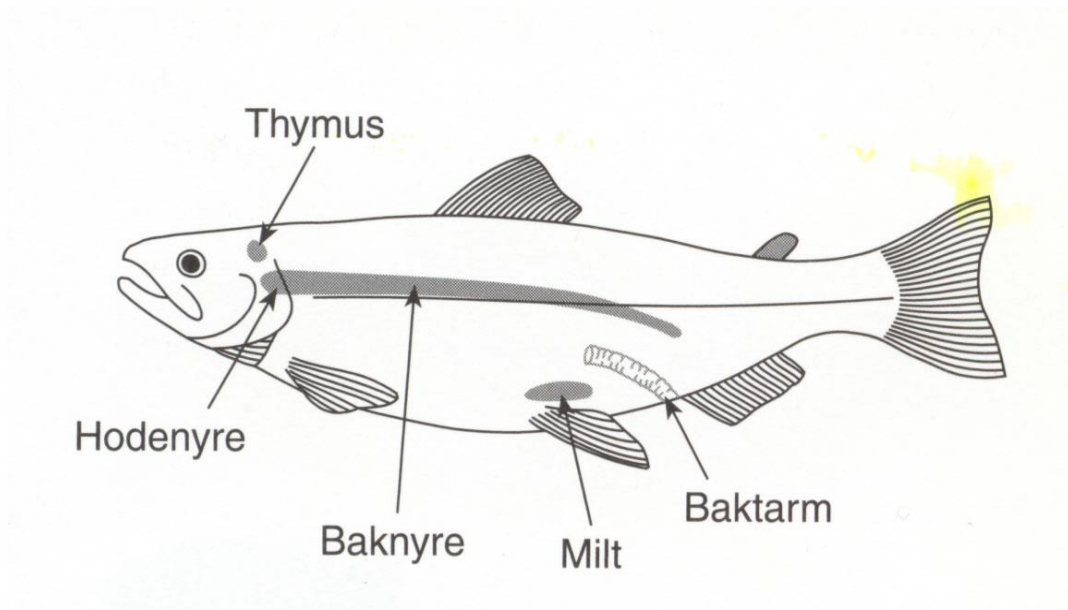
1.7. Måling av stress

Selv om adrenalin er hormonet som frigjøres raskest under en stressreaksjon, er det økning i plasmakortisol er den mest brukte stressindikatoren på fisk. Dette skyldes at syntesen og frigjøringen av kortisol tar opptil flere minutter, noe som gjør at man kan måle kortisolnivået en stund etter at fisken har blitt utsatt for en stressor (Barton, 2002; Ellis et al., 2012). Basalnivået av kortisol er som oftest <13,8 nmol/L (5 ng/ml) i salmonider, og økninger opptil 10-100 ganger har blitt rapportert etter akutt stress (Wendelaar Bonga, 1997). Disse store forskjellene gjør det enkelt å bestemme om fisken har vært stresset eller ikke. Gode metoder for å analysere plasmakortisol er radio-immunoassay (RIA), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), eller enzyme immunoassay (EIA) (Ellis et al., 2012).

Grunnen til at adrenalin og noradrenalin ikke blir målt og brukt som en indikator på stress er at responsen er såpass hurtig, samt at den biologiske halveringstiden er ca. 10 minutter i fisk (Fabbri et al., 1998). Dette gjør at det er vanskelig å få målt basalnivåene av katekolaminene i blodet, ettersom selve prøvetakingen vil være med på å øke nivået umiddelbart. Uten basalnivåene har man ikke noe å sammenligne prøvene med, og adrenalin og noradrenalin er dermed ikke egnet som en målbar indikator på stress (Ellis et al., 2012).

1.8. Fiskens immunsystem

Immunsystemet er et forsvarssystem som ble utviklet i alle levende organismer for å beskytte dem fra invaderende patogene mikroorganismer og kreft. Det kan skape en enorm variasjon av celler og molekyler som er i stand til å spesifikt gjenkjenne og eliminere fremmede inntrengere. Disse cellene og molekylene fungerer sammen i et dynamisk nettverk (Zwollo, 2018). Fisk har immunorganer som er homologe til de som finnes i pattedyr (figur 4), men deres strukturelle kompleksitet er mindre. Dette kan potensielt begrense muligheten til å generere fullt funksjonelle adaptive immunresponser mot patogeninvasjon (Tort et al., 2003). På grunn av disse begrensningene regnes det medfødte immunsystemet som den viktigste komponenten i bekjempelse av patogene organismer i fisk (Jensen, 2015).



Figur 2.1. Lymfoide organer hos laksefisk.

38

Figur 4. Oversikt over lymfoide organer hos laksefisk (Staurnes et al., 1992).

Immunsystemet til virveldyr er delt inn i det medfødte og det adaptive immunsystemet. Komponentene av den medfødte immuniteten utgjør den første forsvarslinjen mot infeksjon og er antigen uspesifikk. Dette systemet er alltid klart til å respondere umiddelbart når kroppen møter invaderende patogener, og det mangler all form for minne (Yada & Tort, 2016). Komponentene av det adaptive immunsystemet, derimot, kan gjenkjenne og selektivt eliminere spesifikke antigener. Det adaptive immunsystemet er antigenspesifikt, og det kan ta opptil flere dager før det fungerer optimalt. Fordi det har minne, reagerer det adaptive immunsystemet raskere og mer effektivt andre gang det er i kontakt med samme antigen (Lulijwa et al., 2019).

Viktige regulatorer av både det medfødte og det ervervede immunsystemet er cytokiner og kjemokiner. Disse molekylene kan ha både pro-inflammatorisk, anti-inflammatorisk og patogen-drepende egenskaper (Jensen, 2015). Cytokiner er glykoproteiner eller proteiner som produseres som svar på et antigen, og fungerer som kjemiske budbringere (Yada & Tort, 2016). Kjemokiner er en familie av små cytokiner som regulerer immuncellemigrasjon under både inflammatoriske og normale fysiologiske tilstander (Jensen, 2015). Alle cytokiner er sammenkoblet i et nettverk som er ansvarlig for intercellulær kommunikasjon i immunforsvaret samt for informasjonsutveksling mellom immunforsvaret og andre systemer. Disse proteinene er lite studert i fisk, men det er kjent at et betydelig antall er funksjonelt aktive i teleoster.

Interleukin (IL) -1 β er en viktig formidler av betennelse som respons på infeksjon og har også vist seg å påvirke HPI-aksen i ørret ved å stimulere kortisolsekresjon. Tumor necrosis factor (TNF) - α , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, transforming growth factor (TGF) - β og interferon-regulatorisk faktor (IRF) -1 har det også blitt rapportert funn av i fisk (Yada & Tort, 2016).

1.8.1. Akutt stress og immunsystemet

Under kortvarig stress har det vist seg å skje en endring i immuncellesammensetningen i blodet. Studier har vist at mengden kortisol i blodet under akutt stress fører til økte nivåer av polymorfonukleære leukocytter i blodet, og reduserte nivåer av lymfocytter. Denne mekanismen har vist seg å forekomme i både regnbueørret og karpe (*Cypriniiformes sp*). Polymorfonukleære leukocytter er en viktig del av det medfødte immunforsvaret, og er de første cellene som ankommer et infisert område (Zwollo, 2018). Det har også vist seg at kortvarig eksponering for kortisol kan forbedre immunresponsen ved å mobilisere B- og T-lymfocytter fra milten til infeksjonsstedet (Zwollo, 2018).

1.8.2. Kronisk stress og immunsystemet

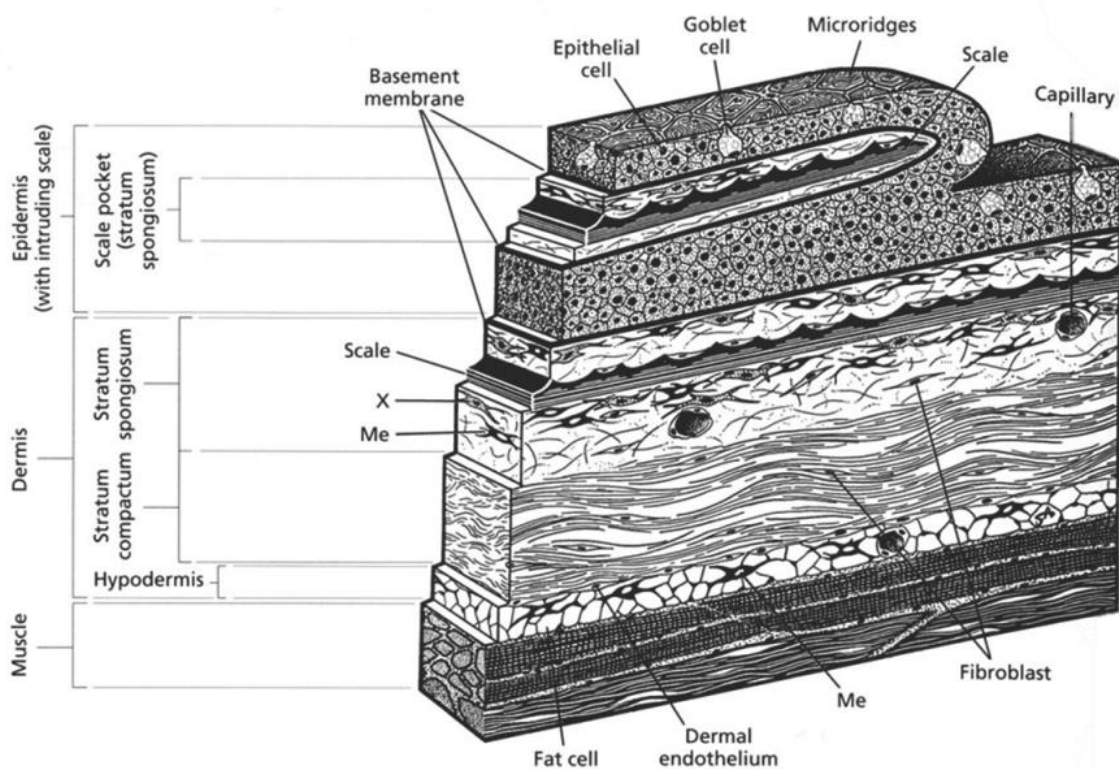
Dersom stresset varer lenger, og plasmakortisolnivået forblir økt over lengre tid kan dette påvirke immunforsvaret negativt (Tort, 2011). Kronisk stress har vist seg å føre til undertrykt aktivitet av fagocytter og lysozymer, og inhibering av lymfocyttaktivering og mobilisering (Zwollo, 2018). I tillegg til dette påvirkes evnen til lymfocytter til å syntetisere antistoffer. På denne måten kan kronisk stress føre til immunsuppresjon, og gjør fisken mer utsatt for sykdom (Schreck & Tort, 2016).

1.9. Hud og slim

Kroppen til vannlevende organismer blir kontinuerlig utsatt for interaksjon med forskjellige typer mikroorganismer. Det mest eksponerte vevet til fisken er tarmen, åndedrettssystemet, og huden (Tort et al., 2003). Disse strukturene fungerer som eksterne barrierer og gir beskyttelse fra omkringliggende patogene organismer. Denne beskyttelsen forsterkes av epidermale sekreter og lymfoide vev som distribueres omkring disse områdene. Aktiviteten og mengden av epidermale sekreter kan variere mellom arter, men i de fleste arter inkluderer det komplement, antimikrobielle proteiner, lysozym, fosfataser og trypsin (Tort et al., 2003). I tillegg til lymfoide vev og epidermale sekreter, er tarmen, åndedrettssystemet og huden utstyrt med immunkompetente celler som leukocytter og intraepiteliale plasmatiske celler (Tort et al., 2003). Disse organene kan derfor også kalles for slimhinneimmunsystemet til teleoster (Zwollo, 2018).

Fiskens hud har to hovedfunksjoner som skiller seg fra andre virveldyr. Den første er at den ikke har et keratinisert ytre lag, noe som gjør at de levende epitelcellene er i direkte kontakt med miljøet. Den andre er at store deler av kroppen er dekket av skjell. Disse funksjonene gjør at fiskens hud er spesialtilpasset livet i vann (Jensen, 2015).

Det livsviktige organet er bygget opp av flere ulike lag (figur 5). Det innerste laget kalles for dermis, og er satt sammen av flere lag med bindevev. Utenfor dermis ligger epidermis. Fiskeskjellene er festet i dermis, og strekker seg ut til hudoverflaten gjennom lommer i epidermis. Dette betyr at dersom fisken mister et skjell dannes det et åpent sår helt inn til underhuden. På utsiden av epidermis ligger det et tykt og serøst lag av slim (Skretting, u.å.). De slimproduserende cellene finner sted i epidermis, oftest i det midterste til det ytterste laget (*Stratum superficiale*). De skiller seg fra vanlige epitelceller i nedre del av epidermis (*Stratum spinosum*), og migrerer mot overflaten. Etter hvert utvikler de vesikler som blir større når de nærmer seg det ytterste laget. Når cellene når overflaten brister cellemembranen på det apikale punktet, og cellens innhold blir frigjort. Etter dette dør cellen og blir erstattet av nye slimceller som ankommer overflaten (Jensen, 2015).



Figur 5. Tredimensjonalt snitt av huden til laksefisk, som viser de forskjellige hudlagene og de viktigste cellypene i epidermis og dermis. Forkortelser: X = xanthophore; Me = melanophore (Elliott, 2000).

1.10. Sårheling

Sår er et stort problem i norsk akvakulturindustri. Stress, aggresjon, høy fisketetthet og parasitter som for eksempel lakselus er med på å øke sjansene for at sår oppstår. Det har blitt estimert at 1 - 2,5% av oppdrettslaks dør hvert år på grunn av sår (Jensen, 2017). Skader på huden truer fiskens barrierefunksjon og kan føre til redusert dyrevelferd (Sveen et al., 2018). Viktigheten av å identifisere faktorer som påvirker sårheling er derfor stor (Jensen, 2017).

Epitelcellene til fisk er metabolsk aktive, motile, og kan formere seg via mitose i alle lagene av epidermis (Fontenot & Neiffer, 2004; Jensen, 2015). Dette gjør at fisken har en helt unik sårreparasjonsmekanisme. Som i andre virveldyrarter inkluderer stadiene av sårheling i fisk skade, inflammasjon, reepitelisering, spredning, organisering og differensiering (Fontenot & Neiffer, 2004). Sårhelingsprosessen initieres av en reepiteliseringsprosess ledsaget av inflammasjon og senere start av vevsreparasjon og remodellering (Sveen et al., 2018). En inflammatorisk respons blir som regel tydelig 2-3 timer etter påført skade, og kan vanligvis observeres i 3-4 dager (Fontenot & Neiffer, 2004). Starten av den inflammatoriske reaksjonen er preget av at polymorfonukleære celler ankommer såret, selv om det vanligvis er en overvekt av mononukleære celler som spiller den primære rollen i inflammasjon (Fontenot & Neiffer, 2004). Etter hvert vil skadet vev begynne å vise degenrative endringer, og fagocytiske celler (primært mononukleære hvite blodceller) samler seg rundt degenerativt vev. Cellerester og nekrotisk vev blir fagocyttert av makrofager, og det antas også at epidermale celler er i stand til å utføre fagocytose (Fontenot & Neiffer, 2004).

I laksefisk starter reepitelisering umiddelbart når det oppstår sår (Sveen et al., 2018). Innen en time etter forekomst av skade begynner epitelceller ved sårkanten å migrere mot sårhulen i kompakte grupper for å dekke til såret (Elliott, 2000; Fontenot & Neiffer, 2004). Dette gir en mekanisk barriere mot opportunistisk infeksjon i de tidlige stadiene av sårhelingen (Elliott, 2000). For en rask reepitelisering kreves det rekruttering og migrering av udiffereensierte mellomliggende epidermale celler (IEC) til sårkanten. Aktiverte IEC sprer seg over sårhulen og festes som et tynt, ettlags cellelag (Fontenot & Neiffer, 2004). Etter dette vil nye IEC migrere over det første laget, og differensieres til basalceller. Reepiteliserings er vanligvis fullført innen 12-24 timer i de fleste fiskearter (Fontenot & Neiffer, 2004)

Selv om reepiteliseringen er relativt rask, er hudvev fortsatt utsatt for osmotisk sjokk og potensielle patogener. Det mistenkes at dermis har spesielle forsvarsmekanismer for å beskytte mot dette, inkludert keratinisering eller apoptose av hudcellene som beskyttelse for subdermale

cellelag, akkumulering av ekssudat nær kollagenbunter og skjellommer for å danne et osmotisk beskyttelseslag, og slimproduksjon fra nærliggende uskadet epidermis (Fontenot & Neiffer, 2004).

Spredning, organisering og differensiering av cellene for å helbrede såret forekommer 9-48 timer etter reepitelisering, og er vanligvis fullført på 3 til 4 dager (Fontenot & Neiffer, 2004). Spredning begynner med at det tynne celledaget som dannes under reepitelisering formerer seg for å danne 3 epidermale lag. De øverste lagene dannes først for å beskytte lagene som dannes under, og de overfladiske cellene blir flatere med reduserte intercellulære mellomrom i tillegg til at de begynner å danne mikrovilli. De kuboidale basalcellene beholder formen (Fontenot & Neiffer, 2004). Etter hvert utvikles det nye slimceller, og 2 til 3 dager etter påført sår vil epitellagene i sårområdet infiltreres med fibroblaster og kapillærer (Fontenot & Neiffer, 2004). Hastigheten på fullstendig sårlukking avhenger av faktorer som vanntemperatur, størrelse og alvorlighetsgrad av såret, og i noen tilfeller også fiskeart, men kan oppnås etter noen få timer til noen få dager (Elliott, 2000). Dersom muskelvev blir skadet, starter regenerering av muskler 7 til 8 dager etter påført skade, og fullføres innen 10-15 dager (Fontenot & Neiffer, 2004).

Det er et skifte i plasmaimmuncellesammensetningen under adaptivt stress som kan være nyttig for hudimmunitet. Under kronisk stress derimot, kan effekten av forhøyede plasmakortisolnivåer svekke hudens evne til å komme seg etter skade. Kortisolbehandling av atlantisk laks og sebrafisk, og kroniske stressituasjoner hos mus og mennesker er assosiert med redusert hudreparasjon og forsinket sammentrekning av såret (Sveen et al., 2018). Kronisk forhøyede kortisolnivåer kan forstyrre både den medfødte og den ervervede immunresponsen hos voksen fisk ved å hemme B-lymfopoese og antistoffresponser, gi ukontrollert betennelse, økt infeksjonshastighet og langsommere sårheling (Zwollo, 2018).

1.11. Hensikten med forsøket

Dette forsøket er en del av et større prosjekt med den hensikt å utvikle et akustisk merke som kan overvåke laksen under praktisk oppdrettsforhold. Ulempen med slike avanserte merker er at de per dags dato må kirurgisk settes inn i buken på fisken. En ønsket derfor med dette eksperimentet å undersøke om kronisk stress påvirker sårheling etter slike kirurgiske inngrep, og om fiskevelferden ble påvirket negativt over tid. Følgende hypoteser ble ønsket testet:

H₀: Kronisk stress har ingen effekt på sårheling.

H₁: Kronisk stress påvirker ikke basalnivåene av plasmakortisol

H₂: Kronisk stress har ingen påvirkning på generelle fiskevelferden.

2. Material og metode

2.1 Godkjenning av bruk av dyr i forsøk

Forsøket ble behandlet og godkjent av mattilsynet den 24.05.2019, og er registrert med godkjennelse FOTS ID 19447.

2.2 Forsøksfisk

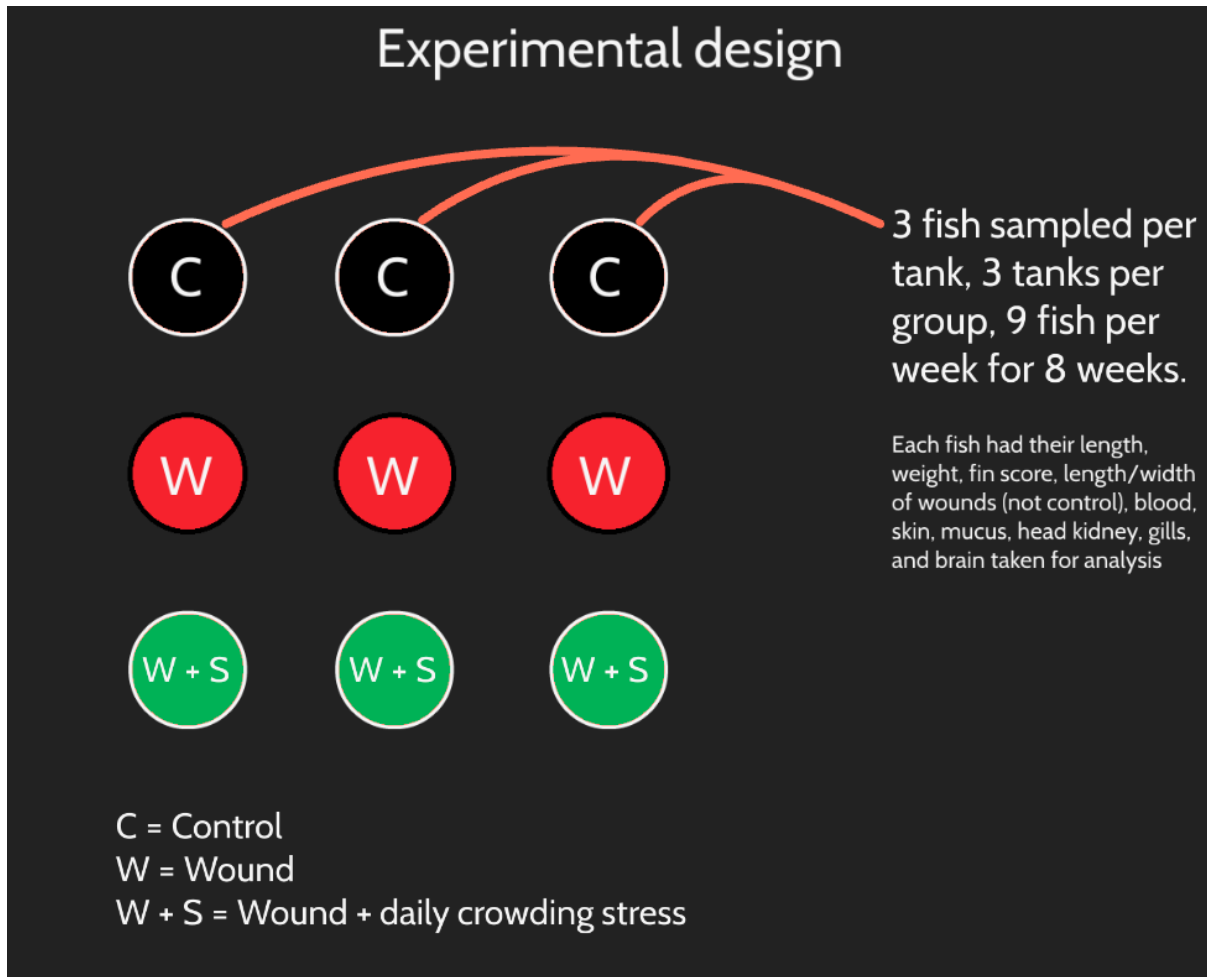
Det ble totalt brukt 216 antall atlantiske laksesmolt (*Salmo salar*) i dette eksperimentet. Fisken som ble brukt var av stamme AquaGen QTL-Innova SHIELD, og ble klekket 08.12.2018 hos Cermaq settefisk avdeling Hopen. Fisken ble transportert med bil til Mørkvedbukta forskningsstasjon den 9.05.2019, og ble plassert i hall 5. Her hadde den en gjennomsnittstemperatur på $12,3 \pm 1,0^{\circ}\text{C}$, og et gjennomsnittlig oksygennivå på 87,7%. Fisken ble smoltifisert ved hjelp av en 6 ukers vinterperiode (8L:16M), og deretter overført til kontinuerlig lys (24L:0M). Etter 400 døgngader var fisken fullstendig smoltifisert, og overført til 35‰. Fisken ble så flyttet videre til hall 4 den 21.04.2020 for akklimatisering i 30 dager frem til forsøksstart, men grunnet uforutsette hendelser (Covid-19) ble forsøket utsatt og akklimatiseringsperioden varte frem til forsøksstart den 29.06.2020. Ved forsøksstart var det omtrent 90 fisk i hvert kar (1 m^3). Gjennomsnittlig vekt og lengde på fisken var henholdsvis $1,01 \pm 0,3 \text{ kg}$ og $43,14 \pm 3,33 \text{ cm}$. Fisken var i hall 4 frem til forsøket var over den 21.08.2020. Her hadde den en gjennomsnittstemperatur på $7,3 \pm 0,3^{\circ}\text{C}$, og gjennomsnittlig oksygennivå på 97,7%. Alle karene (1 m^3) ble kontinuerlig tilført sjøvann fra 50 m dyp med en salinitet på 33,5 ‰.

2.3 Forsøksoppsett

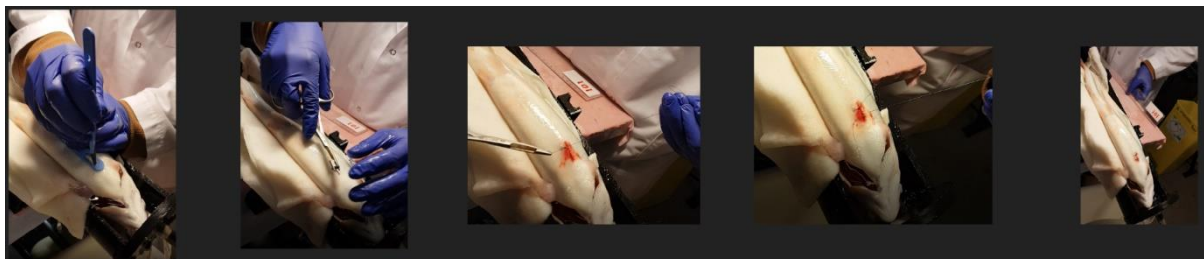
2.3.1 Forsøket

Forsøket ble utført over en periode på åtte uker. Fisken i forsøket var delt inn i tre ulike grupper (triplikat, totalt ni kar); 1. Kontroll-gruppe, 2. En gruppe som gjennomgikk et kirurgisk inngrep (sår-gruppe), og 3. En gruppe som gjennomgikk et kirurgisk inngrep og som i tillegg ble utsatt for daglig trengselstress (sår- og stress-gruppe). Før forsøksstart ble det operert inn en ikke funksjonell («dummy») smart-tag (0,3x1,5 cm, Arctic Seafood Group) i all fisken som tilhørte gruppe 2 og 3. Operasjonen ble utført på et kirurgiske bord, mens fisken var i full bedøvelse (stadium 4; Iversen et al. (2003)) ved hjelp av anestesimiddelet Finquel vet (MSD Animal Health Norge AS). En dose på 60 mg/L ble brukt under operasjonen. Gjellene ble kontinuerlig ventilert med vann inneholdende 60 mg/L Finquel vet under hele prosedyren. Det ble laget et snitt i buken fra baksiden av brystfinnen og bakover (ca. 1,5cm) med skalpell, og en «dummy-tag» (lengde 1,5 cm og bredde 0,3 cm) ble plassert i operasjonssåret. Såret ble lukket ved å sy

to sting (monofilament sutur), som deretter ble forseglet med histoacryl (B Braun Medical AS, Vestskogen Norge «kirurgisk vevs lim»). Varigheten av prosedyren var 60-90 sekunder per fisk. Etter operasjonen ble fisken overført til ett oppvåkingsbad hvor fisken ble holdt til likevekt og rømningsrespons var gjenopprettet. Oppvåkningstiden var 1-2 minutter for likevekt, og 2-6 minutter for rømningsrespons (se figur 6 og 7).



Figur 6. Eksperimentelt design. 3 kar per gruppe (triplikat; kontroll, sår, sår + daglig stress) ble brukt til å gjennomføre dette forsøket. Det ble tatt ut tre fisk per uke fra hvert kar; totalt 9 fisk per gruppe (av Miira Virtanen).



Figur 7. Kirurgisk implantasjonsprosedyre av «dummy-tags» fra venstre til høyre. Det ble gjort et snitt av standard lengde (1,5 cm) på den ventrale siden av fisken rundt området av den kaudale levervenen. «Dummy-taggen» ble deretter plassert inn i snittet, og lukket med to av ikke-absorberbar monofilament-sutur. Bilder av Miira Virtanen.

2.3.2 Stressor

Gruppe 3 ble utsatt for daglig stress ved å tappe ut vannet i tanken og utsette fisken for 20 sekunders lufteksponering samt sammentrenging stressor (akutt tetthetsøkning på 385 kg/m³) en gang hver dag på forskjellige tidspunkt mellom 08:00 og 15:00. Hele denne prosessen tok 22 minutter.

2.3.3 Prøveuttak

Hver uke i løpet av forsøkets varighet på åtte uker, ble det på samme dag (mandag gruppe 1, onsdag gruppe 2 og torsdag gruppe 3), og tidspunkt håvet ut tre fisk fra hvert kar (totalt ni fisk) som ble bedøvd med overdose av Finquel vet (120 mg/l) i 10L bøtter. En og en fisk ble tatt opp av bedøvelsesbøtten og avlivet ved å få ett slag i hodet. Deretter ble vekt og lengde målt, og to blodprøver ble tatt fra kaudalvenekomplekset med en 3 mL sprøyte. Blodet ble fylt i to forhåndsmerkede eppendorfrør (VWR, Norge) på 1,5 ml, og det ble tatt prøve av laktat og glukose (se beskrivelse under kapittel 2.4.3. og 2.4.4.). Deretter ble blodet sentrifugert på 5000 rpm (3500 g; Heraeus Fresco 21, Thermo, Tyskland) i fem minutter før blodplasma ble pipettert ut og overført i nye eppendorfrør på 1,5 ml. Prøvene ble oppbevart i en fryser ved -40°C i påvente av fremtidige analyser.

2.4 Analytiske prosedyrer

2.4.1 ACTH

Konsentrasjonen av ACTH i blodplasma ble analysert ved hjelp av et ACTH ELISA kit (Fish ACTH ELISA kit; CSB-E15926Fh Cusabio Houston, TX, USA), hvor produsentens instruksjoner ble fulgt. Kitet bestod av en mikrotiter analyseplate ferdig belagt med et antistoff spesifikt for ACTH, 6 standardløsninger og 6 standard reagenser (konjugat, Horseradish Peroxidase (HRP)-avidin, vaskebuffer, substrat A, substrat B og stopp løsning), og 4 lim strimler til å dekke over analyseplaten under inkubasjon. Alle reagenser og prøver ble tint til romtemperatur og sentrifugert før analysen ble satt i gang. 50 µl av standardløsningene, positiv kontroll og prøvene ble pipettert i hver sin brønn. Det ble brukt forskjellig pipettespiss for hvert reagens for å unngå krysskontaminering. Standardløsningene og positiv kontroll ble analysert i triplikate, mens prøvene ble analysert i duplikate. Tre brønner ble satt tomme uten noen løsning i. 50 µl konjugat ble pipettert i alle brønnene utenom de tomme, og blandet godt. Blandingen ble inkubert 60 minutter i 37°C. Etter inkuberingen ble innholdet i alle brønnene kastet ut, og hver brønn ble vasket tre ganger med 200 µl vaskebuffer. Brettet ble slått mot rent papir etter hver vask for å få ut all resterende væske. Deretter ble 50 µl HRP-avidin pipettert i hver brønn utenom de tomme brønnene og blandet godt. Brettet ble så inkubert 30 minutter i 37°C. Etter

inkuberingen ble innholdet i brønnene kastet ut, og hver brønn ble igjen vasket tre ganger med 200 µl vaskebuffer. 50 µl av substrat A og substrat B ble så pipettert i hver brønn og blandet godt. Blandingen ble inkubert 15 minutter i mørket i 37°C. 50 µl stoppløsning ble så lagt til i hver brønn, og den optiske tettheten til hver brønn ble bestemt innen 10 minutter ved hjelp av en mikroplateleser satt til 450 nm (Tecan Sunrise Remote, Bergman diagnostika, Østerrike). Intra- og interassay koeffisienten var henholdsvis >10% og 15.3% (CSB-E15926Fh, Cusabio Houston, TX, USA). Sensitiviteten til ELISA kitet er oppgitt til å være 17 pmol/L (75 pg/mL). ACTH er oppgitt i pmol/L (pM; ng/mL=0,2202 nM)

2.4.2 Kortisol

Kortisolkonsentrasjonen i blodplasma ble analysert ved hjelp av kortisol ELISA kit (Fish Cortisol ELISA Kit; CSB-E08487f, Cusabio Houston, TX, USA), og produsentens instruksjoner ble fulgt. Kitet bestod av en mikrotiter analyseplate, 2 standardløsninger, antistoff, antistofffortynningsmiddel, HRP-konjugat, HRP-konjugat fortynningsmiddel, prøvefortynner, vaskebuffer, 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) substrat, stoppløsning, og 4 lim strimler. Alle reagenser og prøver ble tint til romtemperatur og sentrifugert før analysen ble satt i gang. Plasmaprøvene ble fortynnet (1:100) med prøvefortynner før sentrifugering. Etter sentrifugering ble antistoff og HRP-konjugat fortynnet (1:100) med henholdsvis antistofffortynningsmiddel og HRP-konjugat fortynningsmiddel. 50 µl av standardløsningene, positiv kontroll og prøvene ble så pipettert i forskjellige brønner, og blandet med 50 µl antistoff. Blandingen ble inkubert i 40 minutter ved 37°C. Positiv kontroll ble analysert i triplikate, mens prøvene ble analysert i duplikate. Etter 40 minutter inkubasjon ble innholdet i brønnene dekantert, og alle brønnene ble vasket 3 ganger med 200 µl vaskeløsning. Etter vask ble 100 µl HRP-konjugat pipettert i hver brønn, og brettet ble inkubert i 30 minutter i 37°C. Deretter ble vaskeprosessen gjentatt 5 ganger. 90 µl TMB-substrat ble så tilsatt i hver brønn, og analyseplaten ble inkubert i 20 minutter ved 37°C. Den enzymatiske reaksjonen ble stanset ved at 50 µl stoppløsning ble pipettert og blandet inn i hver brønn. Absorbansen til hver brønn ble avlest av en 450 nm mikrotiterplate-leser (Tecan Sunrise Remote, Bergman diagnostika, Østerrike) innen 5 minutter etter at stoppløsningen ble blandet inn. Intra- og interassay koeffisienten var henholdsvis >10% og 11.1% (CSB-E08487f, Cusabio Houston, TX, USA). Sensitiviteten til ELISA kitet er oppgitt til å være 0,006 nmol/L (0,0023 ng/mL). Plasmakortisol er oppgitt i nmol/L (nM; ng/mL=2.76 nM)

2.4.3 Glukose

Det håndholdte instrumentet Freestyle Freedom Lite tm (Abbot Diabetes Care, Itd, Oxon, United kingdom) ble brukt under dette forsøket til å måle glukosenivåer av fisken. Instrumentet har en målelengde på 0,5 – 25 mmol/L. Det ble tatt måling av glukosenivået i helblod umiddelbart etter at blodprøve var blitt tatt av fisken. Glukose ble oppgitt i mmol/L (mM).

2.4.4 Laktat

Laktatnivået ble målt av helblod ved hjelp av et håndholdt instrument kalt Lactate Scout+ (Arkray KDK, Kyoto, Japan) umiddelbart etter at blodprøve var blitt tatt av fisken. Laktat er oppgitt i mmol/L (mM). Instrumentet har en målelengde på 0.6– 33.3 mmol/L.

2.4.5. Vekst og spesifikkvekstrate (SGR).

Veksten ble målt ved å måle lengde (cm) og vektendring (g) i løpet av eksperimentet for alle de 3 eksperimentelle gruppene fra pre-stress, 1 uke, 2 uker, 3 uker, 4 uker, 5 uker, 6 uker, 7 uker, og 8 uker etter forsøksstart. Spesifikkvekstrate ble beregnet fra gjennomsnittsvekten til pre-stress (startvekt) og gjennomsnittlig vekt for hver eksperimentelle gruppe hver for seg; kontroll, sår uten stress, og sår med daglig stress etter 4 uker, og fra 4 til 8 uker ved bruk av følgende ligning:

$$\frac{\ln(\text{sluttvekt (g)}) - \ln(\text{startvekt (g)})}{\text{Antall dager}} \times 100$$

2.4.6. Osmolalitet (mOsm/kg)

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

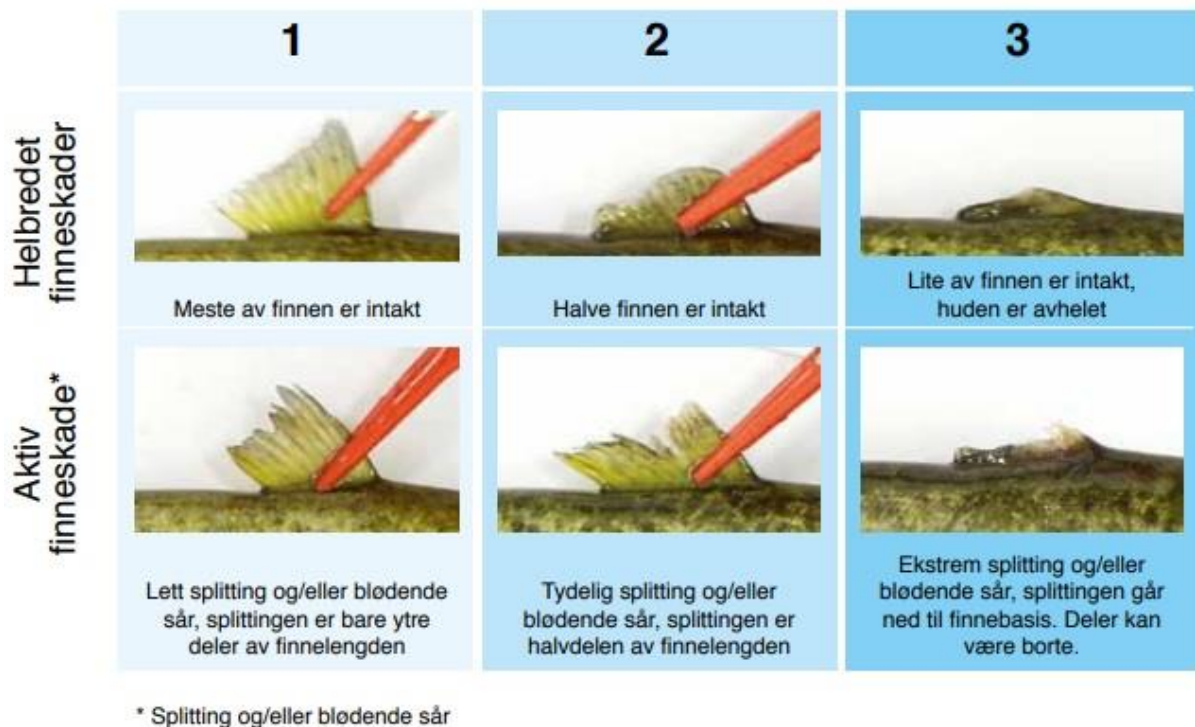
2.4.7. Ioner

Plasma ioner ble analysert ved hjelp av det analytiske instrumentet Respons 910 (DiaSys, Holzheim, Tyskland). og produsentens instruksjoner ble fulgt. Følgende ioner ble analysert; klor (Cl⁻, Chloride 21 FS), magnesium (Mg²⁺, Magnesium XL FS) og kalsium (Ca²⁺, Calcium P FS). Klor, magnesium og kalsium hadde henholdsvis følgende målesensitivitet 40-170 mM, 0,08-3,00 mM og 0,22 – 4,00 mM. Alle prøver ble fortynnet 1:2 med ione-fritt destillert vann for å holde seg innenfor det lineære området det kan måles ved. Respons 910 ble validert for fisk ved å parallelteste 20 prøver av fiskeplasma oppimot tidligere metoder beskrevet for fisk

for henholdsvis klor og magnesium (Iversen og Eliassen, 2013). Interassaykoeffisienten mellom analysemetodene var henholdsvis 8,3 % og 2.1%.

2.4.9. Finneslitasje skår

Finneslitasje ble målt ved hjelp av subjektive observasjoner på brystfinner, bukfinner, analfinne og halefinne. Observasjonene ble utført av Miirto Virtanen på alle gruppene etter henholdsvis 0 (pre stress), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 og 8 uker etter operasjon. Bruk av kun én person til å vurdere finneskår ga rom for en mer konsistent og presis vurdering, da én person alltid vil merke finneskåren etter sin egen oppfatning av slitasjen. Det ble brukt et morfologisk skåringsystem (figur 8) for diagnostikk og klassifisering av finneskader hentet fra Noble et al. (2018). I dette eksperimentet ble det ikke gjort skille mellom aktiv og helbredet finneskade.



Figur 8. Morfologisk skåringsystem for diagnostikk og klassifisering av finneskader. Nivå 0: Liten eller ingen tegn, det vil si normal (ikke vist). Nivå 1-3: Blir gradvis verre. (Figur: C. Noble, D. Izquierdo-Gomez, L. H. Stien, J. F. Turnbull, K. Gismervik, J. Nilsson. Foto: K. Gismervik, L. H. Stien, J. Nilsson, J. F. Turnbull, C. Noble, P. A. Sæther, I. K. Nerbøvik, I. Simeon, B. Tørud, B. Klakegg, C. Karlsen, K. J. Merok, F. Gregersen).

2.5 Statistisk analyse

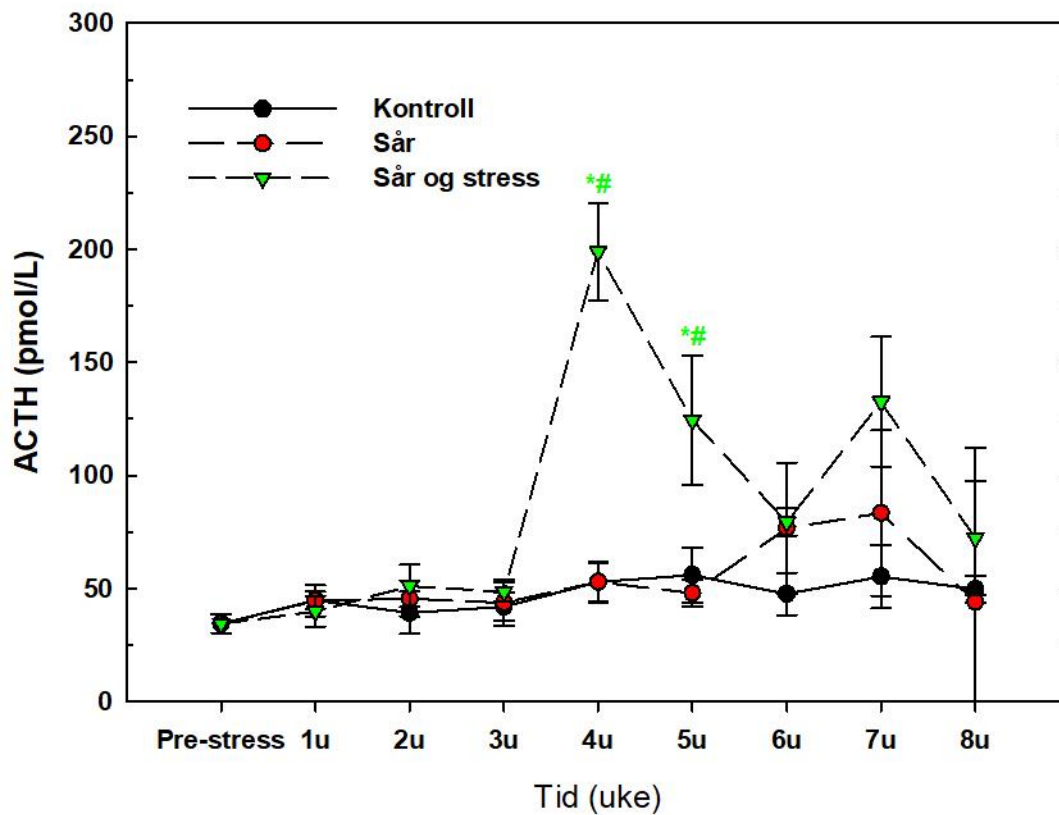
Statistisk analyse ble gjort ved hjelp av statistikkprogrammet GraphPad Prism (ver 9,00) for Windows. Alle data ble testet for normalitet og homogenitet ved hjelp av henholdsvis Komogorov-Smirnov test og Levene's test. Hvis nødvendig ble data logtransformert for å møte disse antagelsene. For å måle endringene i de ulike fysiologiske og morfologiske parameterene

fra pre-stress til et annet tidspunkt innen en forsøksgruppe ble det benyttet en enveis variansanalyse (oneway-ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1987). Enveis variansanalyse ble også brukt for å måle forskjeller i fysiologiske og morfologiske parametere mellom de ulike forsøksgruppene ved samme prøvetakningspunkt. 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 standardavvik ($\bar{n} \pm SD$). Signifikante forskjeller i figurene innen en gruppe ved ulike prøvetakingstidspunkt sammenliknet med pre-stress ble indikert med *, og forskjeller mellom forsøksgruppene ved samme prøvetakingstidspunkt ble indikert med #.

3. Resultat

3.1. Primære stressresponser

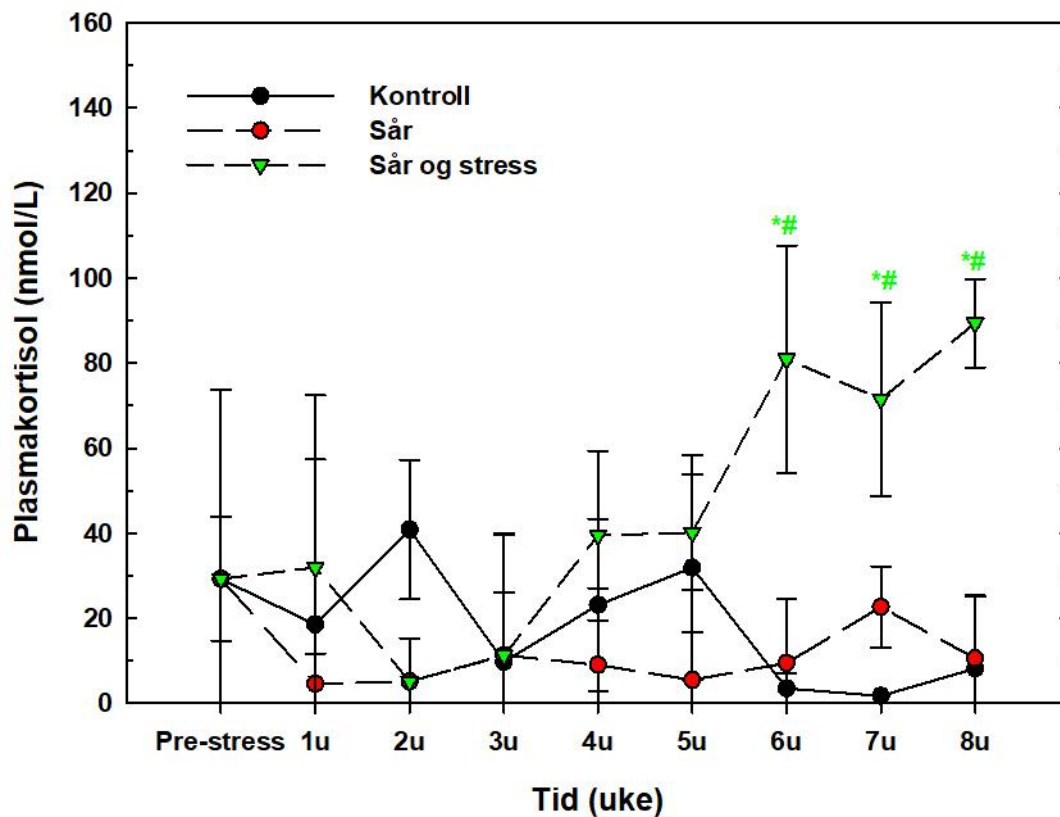
3.1.1. ACTH



*Figur 9. Gjennomsnittlige verdier av ACTH (pmol/L) ($n \pm SD$) i plasma hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Merk at * indikerer signifikant forskjell fra forsøksstart (pre-stress) og # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakningspunkt.*

Figur 9 viser gjennomsnittlige verdier av ACTH (pmol/L) i plasma hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlige verdier ved forsøksstart var $34,46 \pm 4,14$ pmol/L. Etter 4 og 5 uker hadde sår- og stress-gruppen en signifikant økning i ACTH verdier ($198,95 \pm 81,55$ pmol/L og $124,39 \pm 78,72$ pmol/L) sammenlignet med både pre-stress verdiene og de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt. Kontroll-gruppen og sår-gruppen har ikke hatt noen signifikante endringer av ACTH i plasma gjennom forsøket.

3.1.2. Plasmakortisol



Figur 10. Gjennomsnittlige verdier av plasmakortisol (nmol/L) ($n \pm SD$) hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Merk at * indikerer signifikant forskjell fra forsøksstart (pre-stress) og # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakningspunkt.

Figur 10 viser gjennomsnittlige verdier av plasmakortisol (nmol/L) hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlige verdier ved forsøksstart var $29,22 \pm 44,53$ nmol/L. I uke 6, 7 og 8 hadde sår-og stress-gruppen en signifikant økning til henholdsvis $80,89 \pm 36,81$ nmol/L, $71,51 \pm 62,77$ nmol/L og $89,38 \pm 10,46$ nmol/L sammenlignet med både pre-stress verdier og de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt. Verken kontroll-gruppen eller sår-gruppen har hatt signifikante endringer sammenlignet med pre-stress eller andre grupper ved samme prøvetakningspunkt iløpet av forsøket.

3.2. Sekundære stressresponser

3.2.1. Glukose

Tabell 1. Gjennomsnittlige verdier av glukose i plasma (mM) ($n \pm SD$) hos alle gruppene gjennom hele forsøket.

Tidspunkt	Kontroll ●	Sår ●	Sår- og stress ▼
Pre-stress	$2,71 \pm 0,13$	$2,71 \pm 0,13$	$2,71 \pm 0,13$
1 uker	$3,66 \pm 0,38$	$4,07 \pm 0,72$	$4,03 \pm 0,84$
2 uker	$4,28 \pm 2,22$	$3,32 \pm 0,32$	$3,54 \pm 0,49$
3 uker	$3,43 \pm 0,37$	$4,26 \pm 0,34$	$3,58 \pm 0,32$
4 uker	$3,32 \pm 0,47$	$4,06 \pm 1,14$	$3,44 \pm 0,38$
5 uker	$3,52 \pm 0,39$	$3,27 \pm 0,30$	$3,43 \pm 0,30$
6 uker	$3,49 \pm 0,22$	$3,63 \pm 0,43$	$3,64 \pm 0,26$
7 uker	$3,57 \pm 0,38$	$3,57 \pm 0,48$	$3,69 \pm 0,64$
8 uker	$3,68 \pm 0,43$	$3,48 \pm 0,16$	$3,82 \pm 0,41$

Tabell 1 viser gjennomsnittlige verdier av glukose i plasma (mM) hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlige verdier ved forsøksstart (pre-stress) var $2,71 \pm 0,13$ mM. Ingen av gruppene har hatt signifikante endringer i plasma glukose sammenlignet med pre-stress verdier eller med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt.

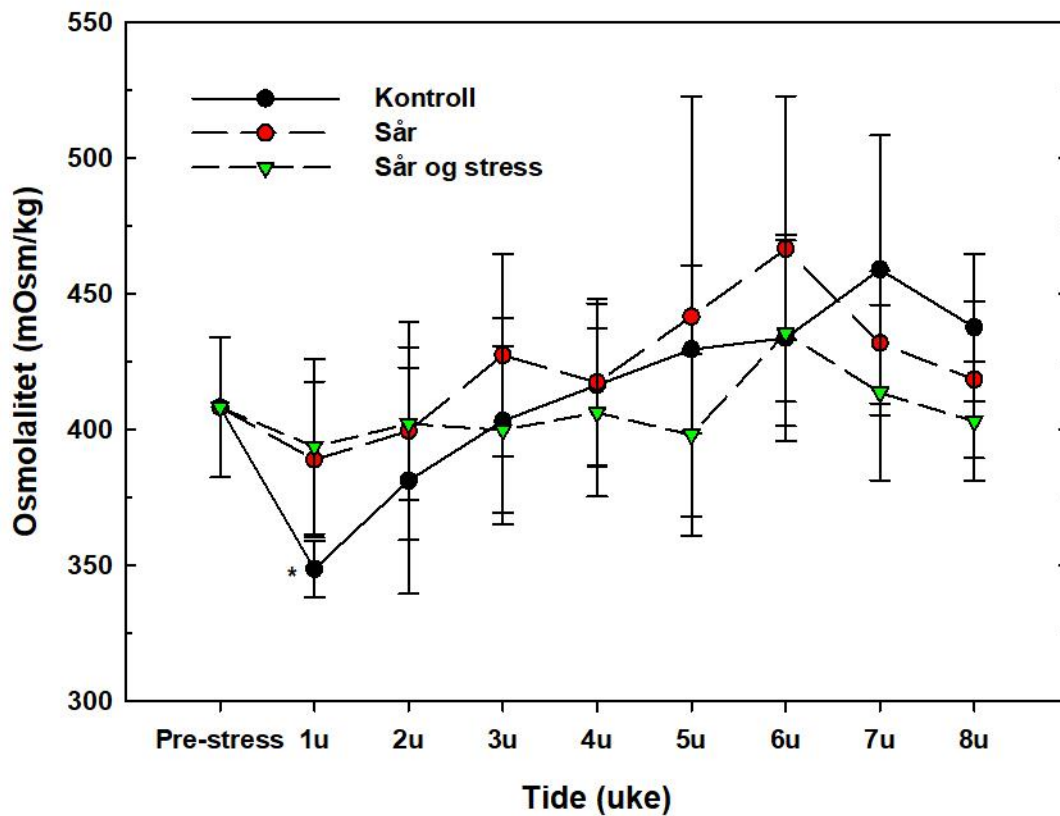
3.2.2. Laktat

Tabell 2. Gjennomsnittlige verdier av laktat i plasma (mM) ($n \pm SD$) hos alle gruppene gjennom hele forsøket.

Tidspunkt	Kontroll ●	Sår ●	Sår- og stress ▼
Pre-stress	$3,26 \pm 0,69$	$3,26 \pm 0,69$	$3,26 \pm 0,69$
1 uker	$3,67 \pm 0,97$	$4,56 \pm 1,87$	$4,33 \pm 1,31$
2 uker	$3,71 \pm 1,02$	$3,71 \pm 1,17$	$4,20 \pm 1,29$
3 uker	$3,99 \pm 0,74$	$5,08 \pm 1,35$	$4,89 \pm 1,53$
4 uker	$4,60 \pm 0,71$	$4,34 \pm 1,05$	$4,14 \pm 0,51$
5 uker	$4,39 \pm 0,97$	$3,72 \pm 0,65$	$3,41 \pm 0,58$
6 uker	$4,62 \pm 1,09$	$5,12 \pm 2,04$	$5,29 \pm 1,27$
7 uker	$4,79 \pm 0,81$	$5,14 \pm 1,45$	$4,54 \pm 1,57$
8 uker	$5,73 \pm 0,90$	$4,27 \pm 0,65$	$4,87 \pm 0,99$

Tabell 2 viser gjennomsnittlige verdier av laktat i plasma (mM) hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlige verdier ved forsøksstart (pre-stress) var $3,26 \pm 0,69$ mM. Ingen av gruppene har hatt signifikante endringer i plasma laktat sammenlignet med pre-stress verdier eller med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt.

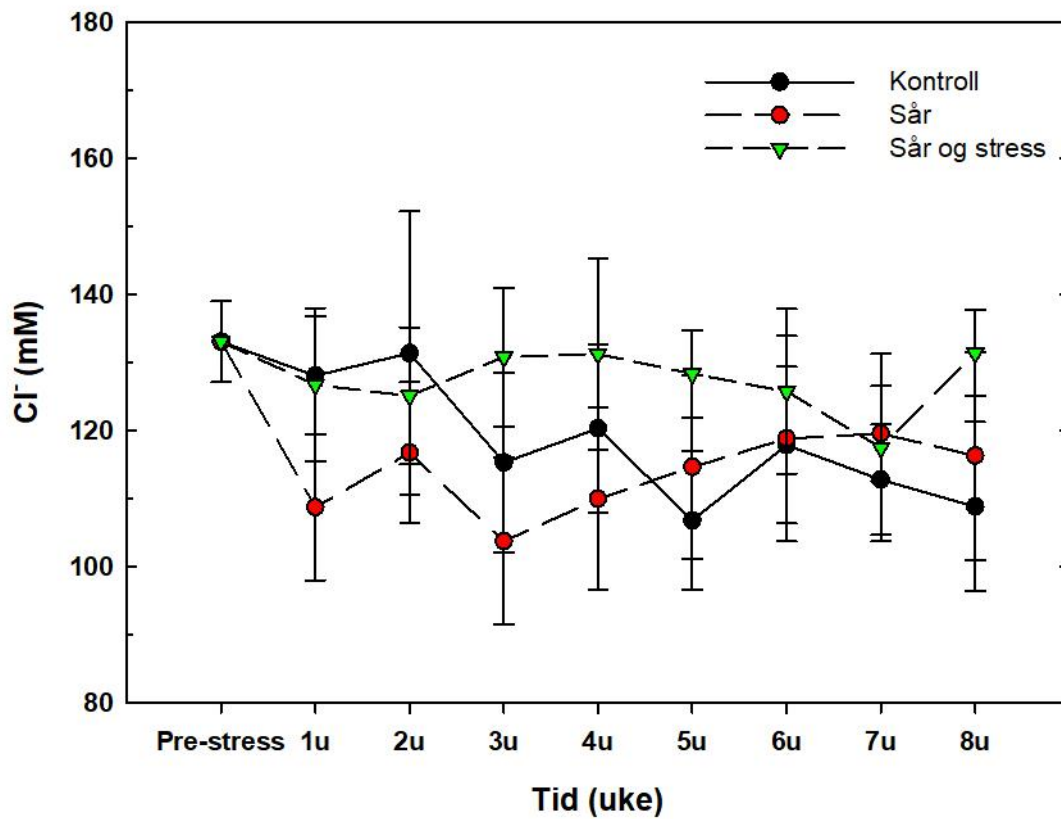
3.2.3. Osmolalitet



Figur 11. Gjennomsnittlige verdier av plasma osmolalitet (mOsm/kg) ($n \pm SD$) for alle gruppene gjennom hele forsøket. * indikerer signifikant forskjell fra forsøksstart (pre-stress).

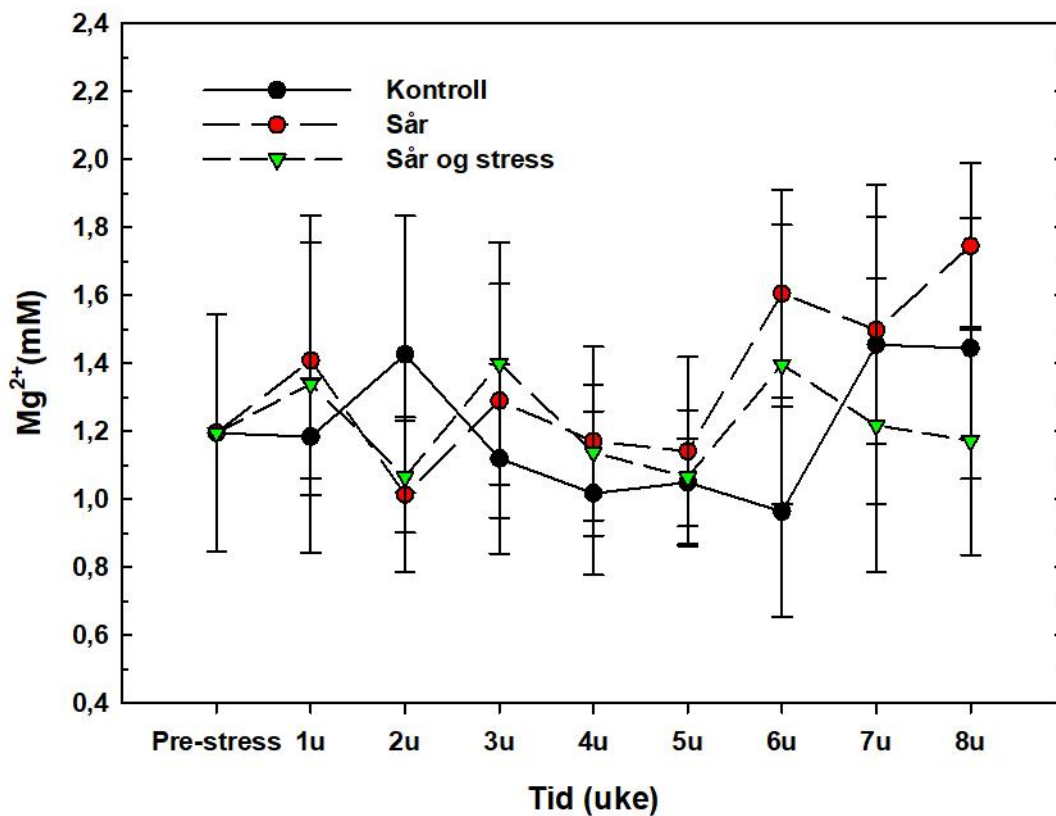
Figur 11 viser gjennomsnittlige verdier av plasma osmolalitet (mOsm/kg) for alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlige verdier av plasma osmolalitet ved forsøksstart (pre-stress) var $408 \pm 25,72$ mOsm/kg. Etter 1 uke hadde kontroll-gruppen en signifikant endring sammenlignet med pre-stress verdier, da verdiene sank til $348,78 \pm 10,31$ mOsm/kg. Sår-gruppen og sår- og stress-gruppen har ikke noen signifikante endringer sammenlignet med pre-stress. Ingen av gruppene har signifikante endringer i plasma osmolalitet sammenlignet med andre grupper ved samme prøvetakningspunkt.

3.2.4. Ioner



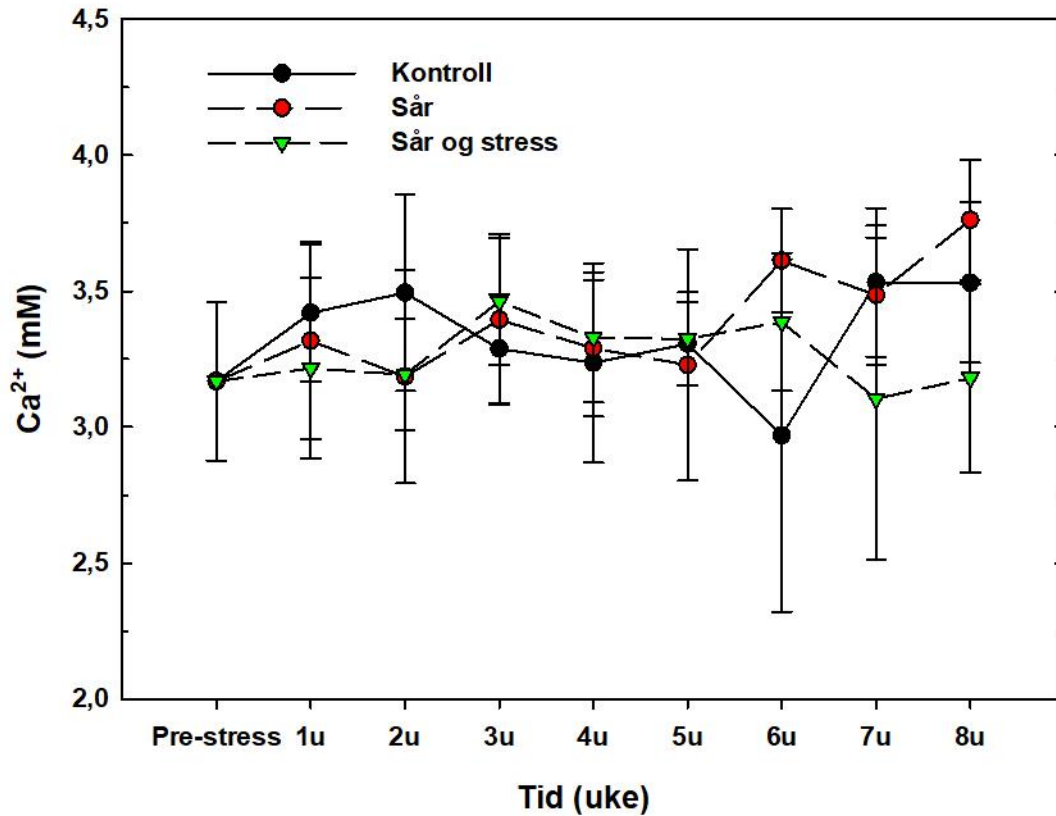
Figur 12. Gjennomsnittlige verdier av kloridioner (mM) ($n \pm SD$) i plasma hos alle gruppene gjennom hele forsøket.

Figur 12 viser gjennomsnittlige verdier av kloridioner (mM) i plasma hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Ved forsøksstart (pre-stress) var gjennomsnittlig verdi av kloridioner i plasma $133,14 \pm 5,93$ mM. Gjennom hele forsøket har ingen av gruppene hatt signifikante endringer av kloridioner i plasma sammenlignet med forsøksstart eller med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt.



Figur 13. Gjennomsnittlige verdier av magnesiumioner (mM) ($n \pm SD$) i plasma gjennom forsøket.

Figur 13 viser gjennomsnittlige verdier av magnesiumioner (mM) i plasma hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Ved forsøksstart (pre-stress) var gjennomsnittlige verdier av magnesiumioner i plasma $1,20 \pm 0,35$ mM. Ingen av gruppene har hatt signifikante endringer i plasma magnesium sammenlignet med pre-stress verdier eller med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt.



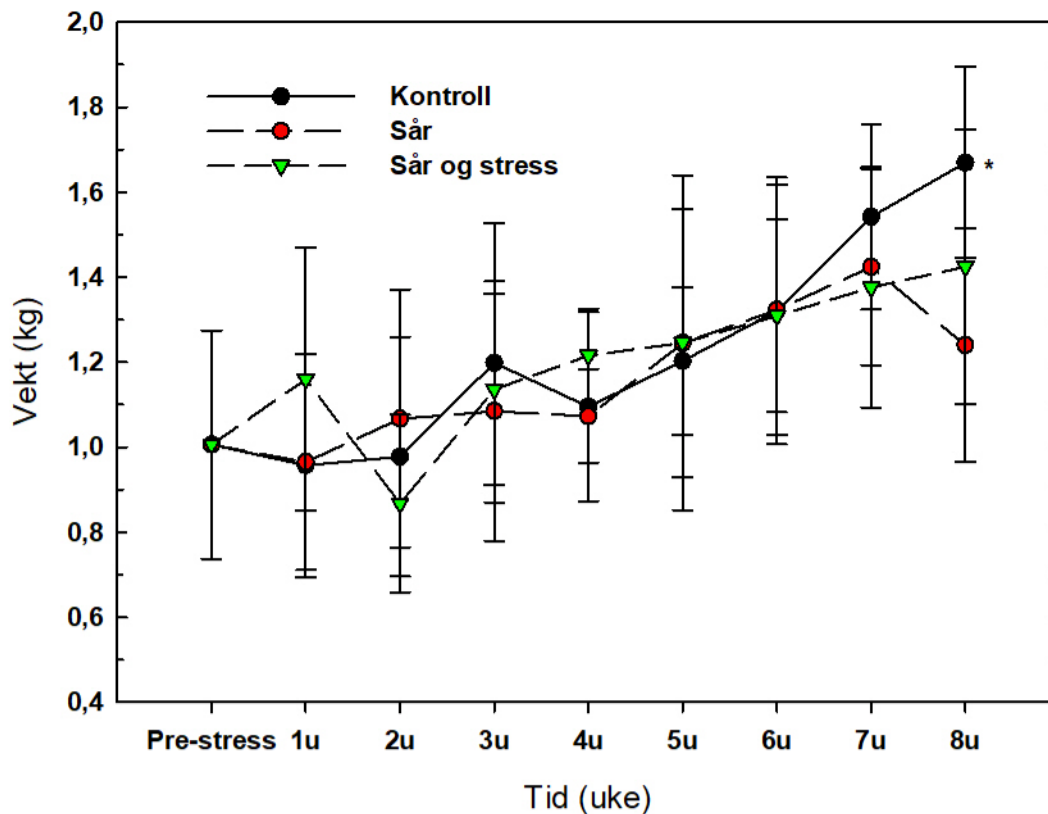
Figur 14. Gjennomsnittlige verdier av kalsiumioner (mM) ($n \pm SD$) i plasma gjennom forsøket.

Figur 14 viser gjennomsnittlige verdier av kalsiumioner (mM) i plasma for alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlige verdier av kalsiumioner i plasma ved forsøksstart (pre-stress) var $3,17 \pm 0,29$ mM. Gjennom hele forsøket har ingen av gruppene hatt signifikante endringer i verdier av kalsiumioner i plasma sammenlignet med pre-stress verdier eller med andre grupper ved samme prøvetakningspunkt.

3.3. Tertiære stressresponser

3.3.1. Vekst

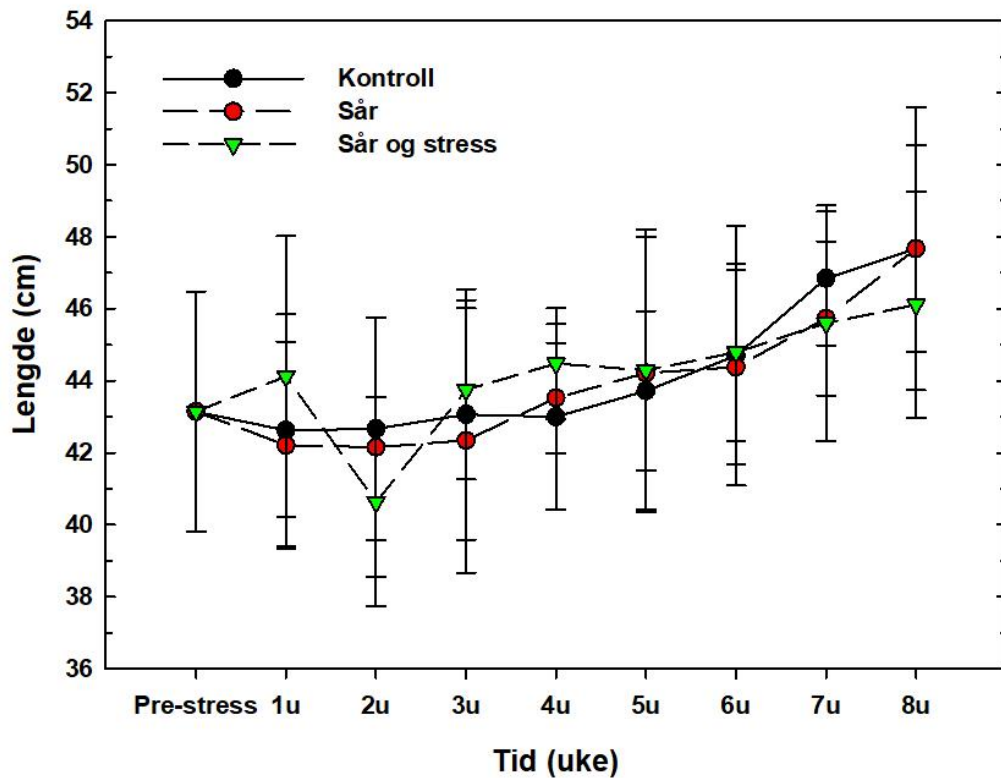
3.3.1.1. Vekt



Figur 15. Gjennomsnittlige verdier av vekt (kg) ($n \pm SD$) hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Merk at * indikerer signifikant forskjell fra forsøksstart (pre-stress).

Figur 15 viser gjennomsnittlig vekt (kg) hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Ved forsøksstart (pre-stress) hadde fisken en gjennomsnittsvikt på $1,01 \pm 0,27$ kg. I uke 8 hadde kontroll-gruppen nådd en signifikant økning i vekt ($1,67 \pm 0,43$ kg) sammenlignet med pre-stress verdier. Sår-gruppen og sår- og stress-gruppen hadde på ingen tidspunkt signifikante endringer i vekt sammenlignet med pre-stress verdier. Ingen av de 3 gruppene hadde på noen tidspunkt signifikante endringer i vekt sammenlignet med andre grupper ved samme prøvetakningspunkt.

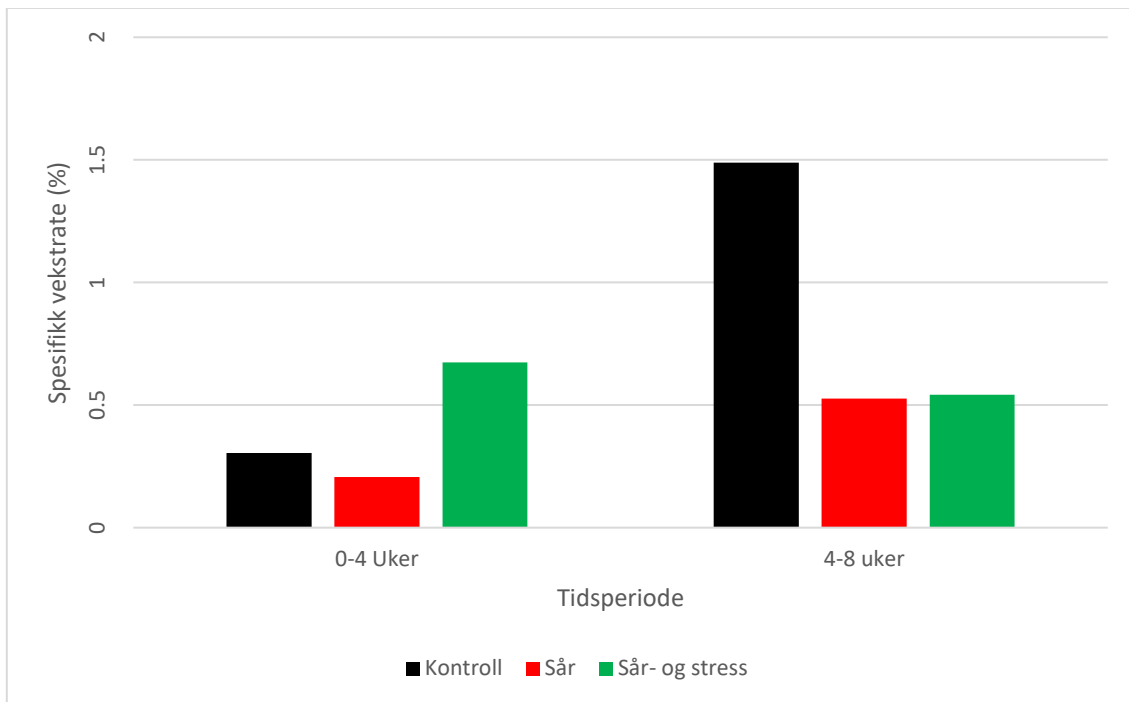
3.3.1.2. Lengde



Figur 16. Gjennomsnittlige verdier av lengde (cm) ($n \pm SD$) hos alle gruppene gjennom hele forsøket.

Figur 16 viser gjennomsnittlig lengde (cm) hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlig lengde ved forsøksstart (pre-stress) var $43,14 \pm 3,33$ cm. Ingen av gruppene har på noen tidspunkt hatt en signifikant endring i lengde sammenlignet med pre-stress verdiene. Det har heller ikke på noen tidspunkt vært signifikante forskjeller mellom gruppene ved samme prøvetakningspunkt.

3.3.1.3. Spesifikk vekstrate

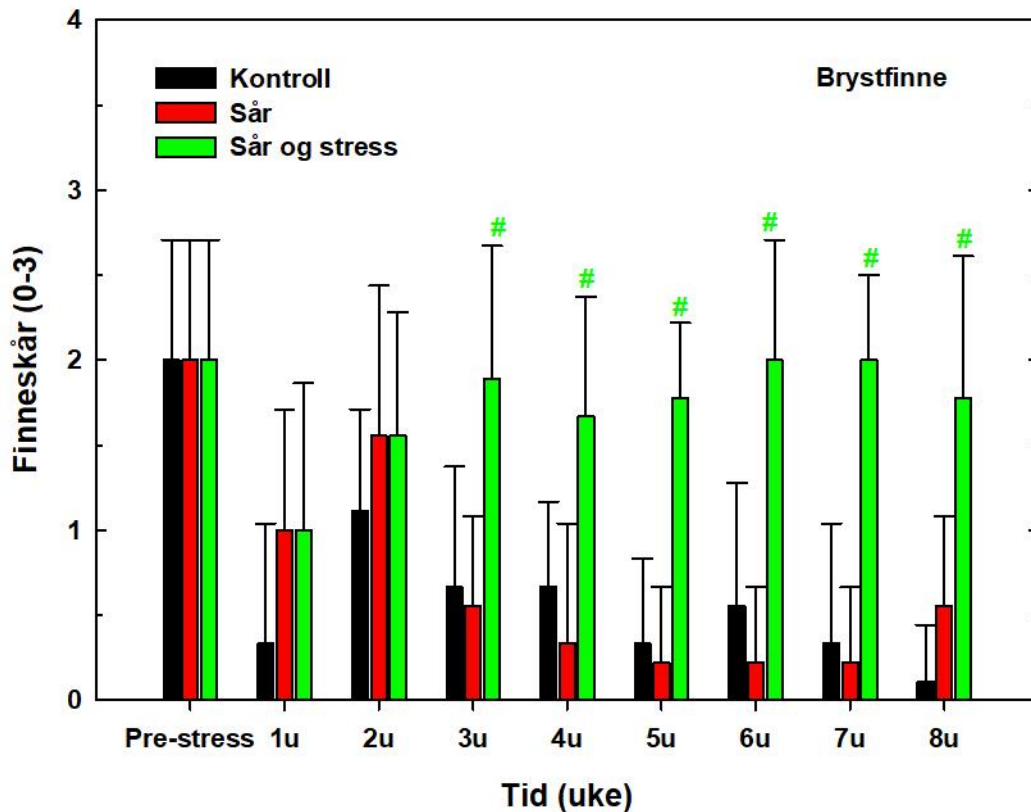


Figur 17. Gjennomsnittlig spesifikk vekstrate (%) for alle gruppene gjennom de første fire ukene og de fire siste ukene av forsøket.

Figur 17 viser gjennomsnittlig spesifikk vekstrate (%) for alle gruppene iløpet av de fire første ukene av forsøket, og de fire siste ukene av forsøket. Kontroll-gruppen hadde en spesifikk vekstrate på 0,3% per dag i uke 0-4, og 1,49 % per dag i uke 4-8. Sår-gruppen og sår- og stress-gruppen hadde en spesifikk vekstrate på henholdsvis 0,2 og 0,6 % per dag i uke 0-4, og 0,53 og 0,54 % per dag i uke 4-8.

3.3.2. Operative velferdsindikatorer (OVI)

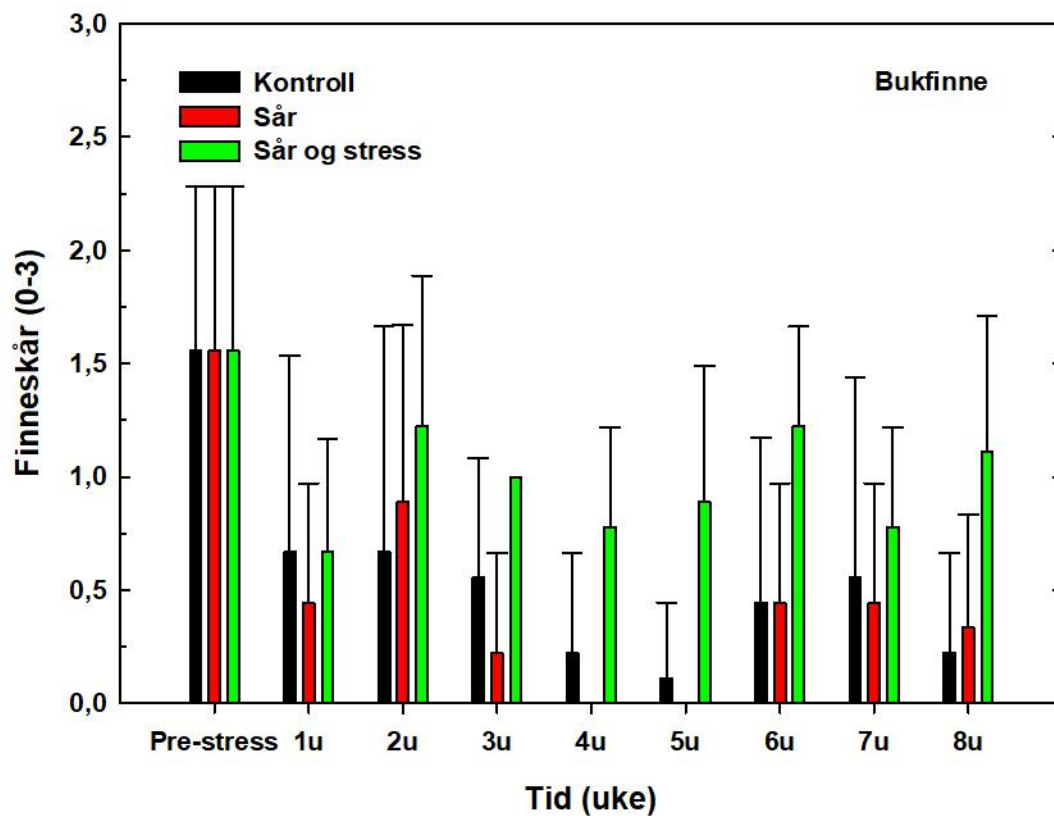
3.3.2.1. Brystfinner (Pectoral)



Figur 18. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) ($n \pm SD$) på brystfinner gjennom forsøket. Merk at # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakningspunkt.

Figur 18 viser gjennomsnittlige verdier for finneslitasje (skår 0-3) på brystfinner til alle gruppene gjennom hele forsøket. Ved forsøksstart (pre-stress) var gjennomsnittlig finneskår $2,00 \pm 0,71$. I uke 3, 4, 5, 6, 7 og 8 har sår- og stress-gruppen hatt en signifikant endring i finneskår sammenlignet med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt, med en gjennomsnittlig finneskår på henholdsvis $1,89 \pm 0,78$, $1,78 \pm 0,44$, $2,0 \pm 0,71$, $2,0 \pm 0,50$ og $1,78 \pm 0,83$. Ingen av endringene for sår- og stress-gruppen har vært signifikante sammenlignet med pre-stress verdier. Kontroll-gruppen og sår-gruppen har ikke hatt signifikante endringer av finneskår på brystfinner sammenlignet med pre-stress eller med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt.

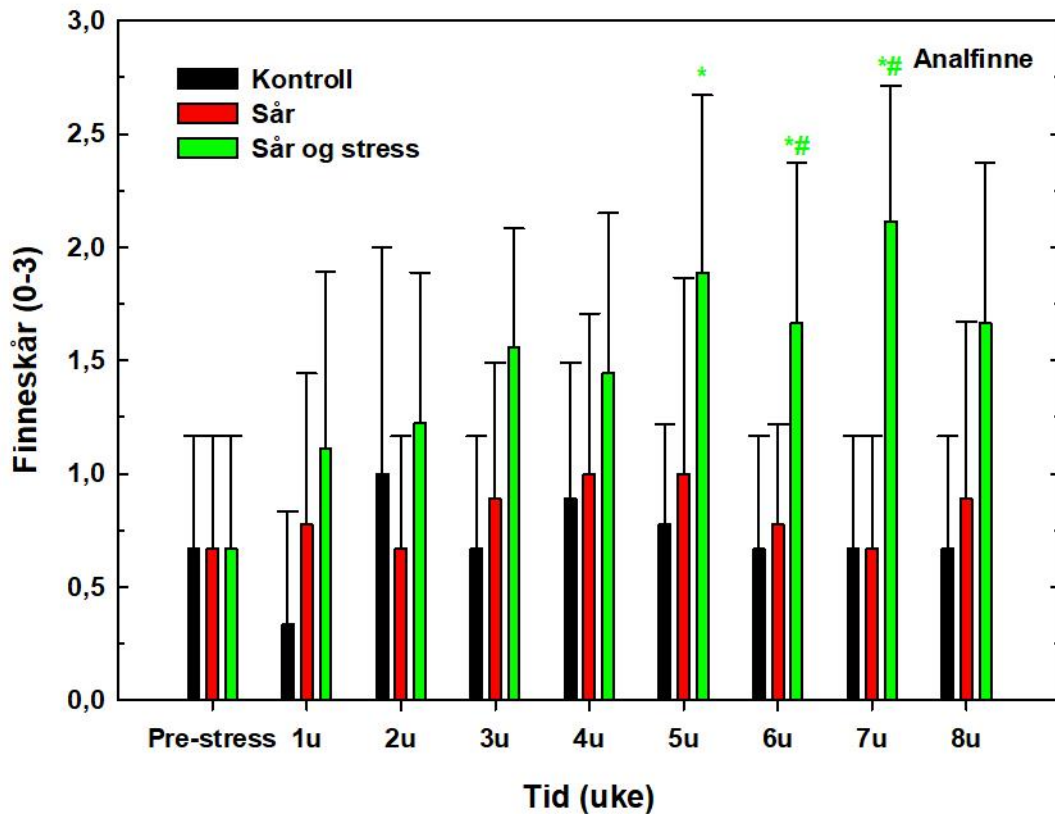
3.3.2.2. Bukfinner (Pelvic)



Figur 19. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) ($n \pm SD$) på bukfinner hos alle gruppene gjennom forsøket.

Figur 19 viser gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) på bukfinner hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlig finneskår ved forsøksstart (pre-stress) var $1,56 \pm 0,73$. I løpet av forsøket har ingen av gruppene hatt signifikante endringer i finneskår sammenlignet med uke 1 eller med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt.

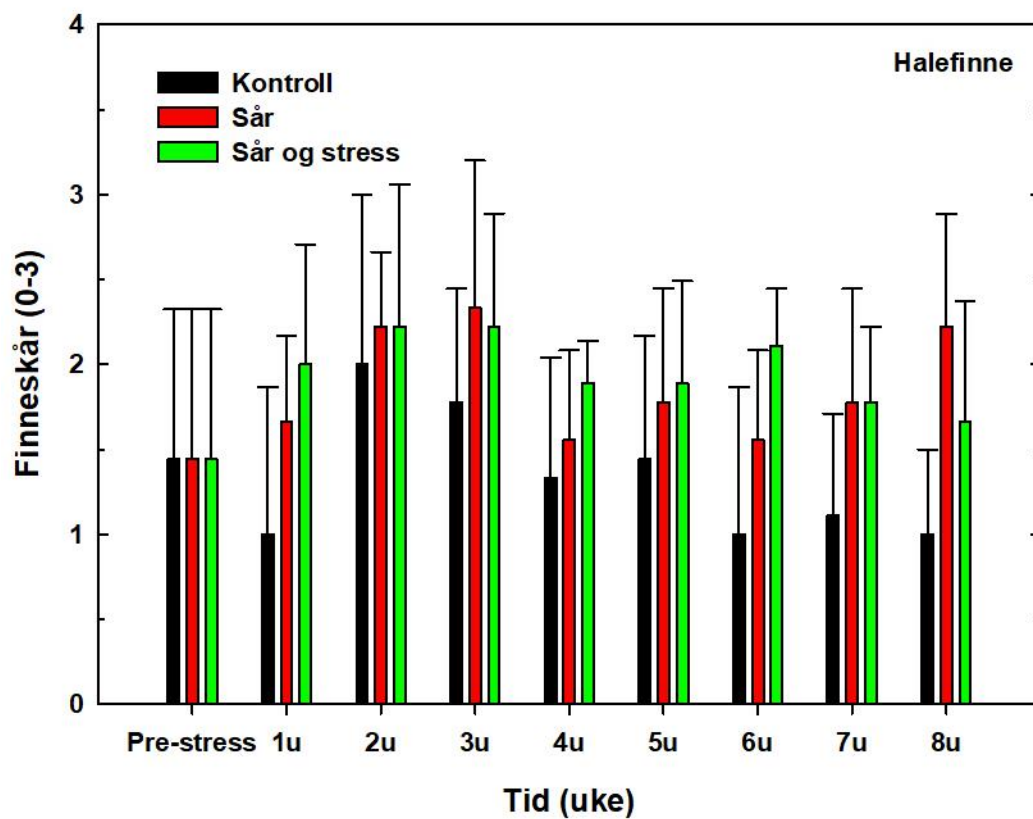
3.3.2.3. Analfinne



Figur 20. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) ($n \pm SD$) på analfinne hos alle gruppene gjennom forsøket. Merk at * indikerer signifikant forskjell fra forsøksstart (pre-stress) og # indikerer signifikant forskjell mellom gruppene ved samme prøvetakningspunkt.

Figur 20 viser gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) på analfinne hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlig finneskår ved forsøksstart var $0,67 \pm 0,50$. Etter 5, 6 og 7 uker har sår- og stress-gruppen fått en signifikant endring i finneskår sammenlignet med pre-stress verdiene med en finneskår på henholdsvis $1,89 \pm 0,78$, $1,67 \pm 0,71$ og $2,11 \pm 0,60$. Endringene til sår- og stress-gruppen i uke 6 og 7 er også signifikante sammenlignet med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt. Kontroll-gruppen og sår-gruppen har ikke hatt signifikante endringer i finneskårverdi gjennom hele forsøket.

3.3.2.4. Halefinne (caudal)



Figur 21. Gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) ($n \pm SD$) på halefinne gjennom forsøket.

Figur 21 viser gjennomsnittlige verdier av finneslitasje (skår 0-3) på halefinne hos alle gruppene gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlig finneskår ved forsøksstart (pre-stress) var $1,44 \pm 0,88$. Gjennom hele forsøket har ingen av gruppene hatt signifikante endringer i finneskår sammenlignet med pre-stress verdier eller med andre grupper ved samme prøvetakningspunkt.

3.5. Sårheling



Figur 22. Bilde av utviklingen av sårheling under progresjon av forsøket i gruppene sår (venstre bildeserie) og sår og daglig stress (høyre bildeserie). Bilde av Miira Virtanen.

Figur 22 viser utviklingen av sårheling under progresjon av forsøket for sår-gruppen (venstre bildeserie) og sår- og stress-gruppen (høyre bildeserie). Sårene til fisken som har blitt utsatt for daglig stress har grodd raskere enn sårene til fisken som ikke har blitt utsatt for stress. Ved 8 uker er såret til sår- og stress gruppen grodd igjen, mens såret til sår-gruppen er fortsatt inflammert.

4. Diskusjon

4.1. Primære stressresponser

Den primære stressresponsen inkluderer stimuli av kromaffinvev i hodenyren som resulterer i produksjon og frigjørelse av katekolaminer, samt stimuli av HPI-aksen som fører til frigjøring av kortikosteroide hormoner fra interrenale celler i hodenyren (Barton, 2002; Zwollo, 2018). Frigjørelse av kortisol ledsages av en forsinkelsesfase som ikke finner sted i frigjørelse av katekolaminer, og grunnet dette er det mulig å måle basalnivåer av dette hormonet i fisk. Kortisol er derfor en mer pålitelig indikator å bruke under måling av stress (Barton, 2002; Iversen, 2013). I dette forsøket ble ACTH og kortisol brukt som indikator på primær stressrespons.

4.1.1. ACTH

ACTH er den viktigste stimulanten av interrenale celler under stress for syntese og frigjøring av kortisol (Wendelaar Bonga, 2011). Rask utskillelse av CRH og ACTH under stress gjør det utfordrende å måle basalnivåene av hormonene. Målinger av CRH og ACTH i fisk blir derfor sjeldent brukt som stressindikatorer (Ellis et al., 2012). For å vurdere HPI-aksens aktivering hos fisk er det derimot ideelt å måle indikatorer i selve hjernen som CRF, eller så nær opprinnelsen til den til den hormonelle kaskaden som mulig, som for eksempel ACTH (Ellis et al., 2012).

I dette forsøket ble det observert en signifikant økning i plasma ACTH hos sår- og stressgruppen sammenlignet med pre-stress verdier og de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt i uke 4 og 5. Sekresjonskontroll av ACTH skjer via en negativ tilbakekoblingsmekanisme som fører til nedregulering av ACTH utskillelse når plasma kortisol stiger (Barcellos et al., 1999). En mulig forklaring på økt plasma ACTH er at denne negative tilbakekoblingen har fått redusert effekt som følge av høyt stress over lengre tid. Sumpter et al. (1986) observerte at akutt stress i form av håndtering og inneslutning forårsaket en jevn, men forbigående økning i plasma ACTH-nivået hos coho-laks (*Oncorhynchus kisutch*) og regnbueørret. Etter påført stress var ACTH-nivåene i plasma økt betraktelig innen 2 minutter, og fortsatte å stige i 30 minutter, mens kortisolnivåene begynte å stige etter 5 minutter (Sumpter et al., 1986). Iversen og Eliassen (2014) observerte at atlantisk laks fikk en overfølsomhet ovenfor ACTH etter å ha blitt utsatt for kronisk stress i 4 uker, som igjen førte til et mindre effektivt negativt tilbakemeldingssystem og forhøyede nivåer av plasma kortisol.

4.1.2. Kortisol

Kortisol spiller en viktig rolle i fiskens dagligdagse liv, ettersom det bidrar til vedlikehold av både basal og stressrelatert homeostase og regulering av metabolske funksjoner som glukose- og ioneregulering. Både basal og stressede kortisolnivåer varierer mye mellom arter og innenfor en art, ettersom det påvirkes av faktorer som temperatur, kjønn, seksuell modenhet og genetikk (Ellis et al., 2012). Ettersom kortisol er viktig for daglige fysiologiske prosesser i kroppen, endres også basalnivåene med tid på dagen og sesong. Hos dagaktive arter forekommer det vanligvis en kortisoltopp i begynnelsen av lysfasen, mens hos nattdyr kommer kortisoltoppen på slutten av lysfasen. Slike daglige rytmer i kortisol er også beskrevet i forskjellige fiskearter, inkludert laksefisk som atlantisk laks og ørret. Når fisk utsettes for kroniske stressfaktorer, ser det ut til at rytmen opprettholdes med samme akrofase, men at gjennomsnittsverdiene og amplituden øker (Ellis et al., 2012).

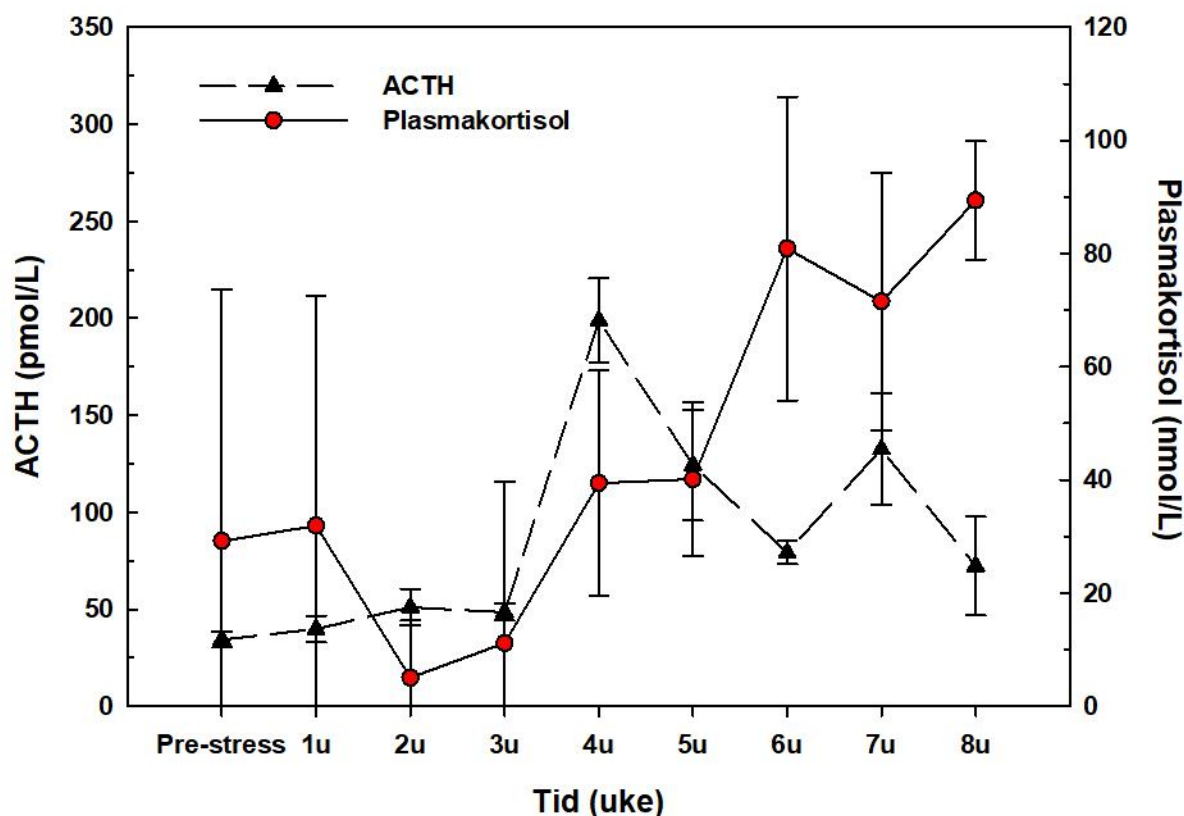
I følge Wendelaar Bonga (2011) ligger basalnivåene av plasmakortisol i teleoster vanligvis mellom 5-30 nmol/L. For laksefisk ligger basalnivåene av plasmakortisol i ustresset fisk vanligvis mellom 0-13,8 nmol/L (0-5 ng/ml), men det kan være stor variasjon mellom ulike stammer (Pickering & Pottinger, 1989; Wendelaar Bonga, 1997). Under alvorlig akutt stress kan det oppstå toppnivåer på mer enn 800 nmol/L, mens under kronisk stress vil kortisolnivåene vanligvis stabilisere seg to til fem ganger over basalkonsentrasjonen. Under akutt stress når kortisolkonsentrasjonen en toppverdi ca. en til to timer etter påført stressor (Wendelaar Bonga, 2011). I dette forsøket ble fisken stresset ved ulike tidspunkt mellom 08:00 og 15:00 hver dag, mens prøveuttaket ble utført ved samme tidspunkt hver uke. På denne måten ble det unngått å ta målinger av kortisoltopper etter akutt stress, ettersom det var kronisk stress og dermed endringer i basalnivåer som en ønsket å studere. Ved forsøksstart lå gjennomsnittsverdien av kortisol i plasma innenfor det Wendelaar Bonga (2011) betegner som normale basalnivåer hos teleoster ($29,22 \pm 44,53$ nmol/L). I kontroll-gruppen og sår-gruppen holdt verdiene seg innenfor 5-30 nmol/L gjennom hele forsøket. I sår- og stress-gruppen ble det derimot observert en signifikant økning i plasmakortisol sammenlignet med pre-stress verdiene fra uke 6 og til slutten av eksperimentet (uke 8). Denne økningen i basalnivåene i sår- og stress gruppen lå to til tre ganger over basalnivået som ble målt ved forsøksstart (pre-stress).

Et forsøk utført av Pickering og Pottinger (1989) viste at ørret utsatt for kronisk stress i form av innesperring og høy tetthet/trengsel produserte en langvarig forhøyning i plasma kortisolnivåer. I deres forsøk kom forhøyningene etter 2-10 dager, og gikk tilbake til basalnivåer igjen omtrent 4 uker etter forsøksstart. Iversen og Eliassen (2014) registrerte også

en betydelig økning i kortisol hos atlantisk laks etter 3 og 4 uker med trengselsstress, i tillegg til en ytterligere økning i uke 5 og 6 etter at fisken ble utsatt for andregangsvaksinering i uke 4 samtidig som de fortsatt ble utsatt for daglig trengselstress. Andre forskere har observert en forbigående forhøyning av kortisolnivået under sammentrengning hos nilmunnruger (*Oreochromis niloticus*) og karpe (*Cyprinus carpio*) (Barcellos et al., 1999; Ruane et al., 2002). Det har også blitt registrert tilfeller hvor det ikke har blitt registrert noen endringer i plasmakortisol etter påført stressor hos matrinxã (*Brycon cephalus*), rødpagell (*Pagrus pagrus*) og bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*) (Fanouraki et al., 2007; Martins da Rocha et al., 2004; Vijayan & Leatherland, 1990). Hos regnbueørret har det også blitt observert en reduksjon i plasmakortisol etter trengselstress (Leatherland & Cho, 1985).

4.1.3. Sammenhengen mellom ACTH og kortisol i sår- og stress-gruppen

Kortisol skilles ut av interrenalvev som følge av virkningen til hypofysehormonet ACTH på kortikosteroidogene celler (Barcellos et al., 1999). Kontroll og frigjøring av kortisol fra HPI-aksen som respons på stressorer styres nøye av negativ tilbakemeldingsregulering på alle nivåer av HPI-aksen (Kiilerich et al., 2018). I fisk er kortisol ligand for glukokortikoidreseptorene GR1 og GR2, samt en mineralokortikoidreseptor MR. Alle disse reseptorene er til stede i hypothalamus, hypofysen og den interrenale kjertelen hos flere fiskearter (Kiilerich et al., 2018). GR har også vist seg å være aktiv i tilbakemeldingsregulering av kortisolfrigivelse (Kiilerich et al., 2018; Mommsen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 1997). Under stress vil den forhøyede plasmakonsentrasjonen av kortisol strømme tilbake til de CRF-utskillende nevronene i hypothalamus og ACTH-utskillende cellene i den fremre hypofysen. Her virker kortisol for å redusere utskillelsen av CRF og ACTH for å kontrollere aktivitetsnivået til HPI-aksen (Vijayan et al., 2010). Kronisk forhøyning av kortisol kan dermed bli nedregulert av HPI-aksen (Barcellos et al., 1999). Resultatene i dette forsøket indikerer at fisken i sår- og stress-gruppen har hatt effektiv negativ tilbakemelding under de første ukene av eksperimentet, og utløst en adaptiv adferd hvor de har klart å optimalisere energiforbruket til den daglige trengselstressoren de ble utsatt for (allostatisk overbelastning type 1). Etter hvert ser det ut til at belastningen har blitt for stor, og fisken har i uke 6 gått inn i en allostatisk overbelastning type 2 hvor det er redusert effektivt negativt tilbakemeldingssystem og forhøyede basalnivåer av kortisol (figur 23) (Iversen & Eliassen, 2014).



Figur 23. Gjennomsnittlige verdier av plasma ACTH og kortisol ($n \pm SD$) hos sår- og stress-gruppen.

4.2. Sekundære stressresponser

Den sekundære stressresponsen inkluderer økt glukosefrigivelse, endringer i gjellenes permeabilitet samt svekking av immunforsvaret som følger av den primære stressresponsen (Ellis et al., 2012; Schreck & Tort, 2016; Wendelaar Bonga, 2011). For å undersøke hvordan stresset påvirket den sekundære stressresponsen ble det i dette forsøket gjort målinger av glukose og laktat i blod, plasma klorid, plasma magnesiumioner, plasma kalsiumioner, og plasma osmolalitet.

4.2.1. Glukose

Glukose er et viktig drivstoff for metabolismen, og vev som hjerne, hjerte, blodceller og gjeller er i hovedsak avhengig av glukose for å kunne fungere (Mommensen et al., 1999). Energien som brukes under en stressrespons går på bekostning av disse energikrevende prosessene, ettersom energien blir omdisponert for å gjenopprette homeostase. For å allokere mer energi under stressresponsen skjer det en frigjøring av lagret leverglykogen i plasma, som glukose (Ellis et al., 2012; Iversen & Eliassen, 2014; Wendelaar Bonga, 1997, 2011). Denne frigjøringen genereres i utgangspunktet av katekolamin-mediert glykogenolyse, og på senere stadier av

kortisol-mediert glukoneogenese (Pankhurst, 2011). Selv om plasma glukosenivåer etter stress kan variere mellom arter, blir post-stress økning i plasmaglukose ofte brukt som fullverdig mål på aktivering av HPI aksene (Mommsen et al., 1999; Pankhurst, 2011).

I dette forsøket var endringene i glukosenivåene ubetydelige, og kan ikke bli brukt til å gi en indikasjon på kronisk stress i de ulike gruppene. Resultater fra tidligere studier på akutt stressrespons har vist at glukosenivået i blodet øker raskt etter påført stress, og kommer ned til pre-stress verdier innen 2-20 timer avhengig av stressor og art (Acerete et al., 2004; Bracewell et al., 2004; Faught & Vijayan, 2016; Lim & Hur, 2018; López-Patiño et al., 2014; Mommsen et al., 1999; Rodrigues et al., 2015). Et forsøk hvor det ble gjort målinger av stressrespons hos atlantisk smolt under kommersiell brønnbåttransport viste ingen økninger i blod-glukose under transporten (Iversen et al., 2005). Et annet forsøk viste tydelige økninger i blod-glukose hos atlantisk smolt i 1, 24 og 48 timer etter transport (Iversen et al., 1998). Effektene av kortisol på glykogennivået i leveren er dermed varierende, og økninger så vel som nedgang er beskrevet etter administrering av kortisol (Iversen et al., 2005; Wendelaar Bonga, 1997). Siden sår- og stress-gruppen i dette forsøket sannsynligvis ikke har gått over i en kronisk stresstilstand før i uke 6, er det en mulighet at plasma glukose nivået har økt i en viss periode etter påført stressor, og sunket til basalnivå igjen før prøveuttakene har blitt utført. En annen mulig forklaring at en kronisk stressbelastning ikke har påvirket glukosenivåene i nevneverdig grad. Tidligere forsøk har vist at økte glukosenivåer umiddelbart etter en stressor sannsynligvis opprettholdes ved glykogenolyse, mens kronisk forhøyede glukosekonsentrasjoner opprettholdes ved glukoneogenese i leveren (Liebert & Schreck, 2006). Glykogenolysen styres av katekolaminer (CA) da stimulering av β_2 -adrenoreceptoren i hepatocytene resulterte i mobilisering av glukose, og adrenalin var mer potent enn noradrenalin i stimuleringen av hepatocytene (Van Heeswijk et al., 2006; Wendelaar Bonga, 1997)

4.2.2. Laktat

Studier av stressresponser hos fisk har vist at laktatverdier korrelerer med et bredt spekter av stressfaktorer (Wells & Pankhurst, 1999). Laktat er et produkt av glykolyse under anaerobe forhold (Pankhurst, 2011; Pottinger, 1998). Produktet dannes av cytoplasmatiske melkesyrehydrogenase som tilrettelegger for omdanning av pyruvat til laktat. Hos fisk genereres laktat primært fra muskelglykogen, i motsetning til mange andre virveldyr som produserer laktat gjennom Cori-syklusen i leveren (Vargas-Chacoff et al., 2017). Laktatproduksjon i de hvite musklene til teleoster settes i gang når glykogen brukes som drivstoff under anaerobiose eller under plutselige angrep som krever raske rømmingsbevegelser

(Currey et al., 2013; Vargas-Chacoff et al., 2017). Økninger i plasma laktat er dermed ikke en stressindikator i seg selv, men gjenspeiler påkjenningen av anaerob metabolisme som følge av hypoksi eller stressorer som gir akutte, raske bevegelser der vevskravet til oksygen overstiger tilgangen (Pottinger, 1998; Sopinka et al., 2016).

Fordi laktat primært dannes i muskelceller kan det ta opp til en til tre timer etter startet laktatproduksjon før økningene vises i plasma (Fazio, Ferrantelli, et al., 2015). Basalnivåer av laktat i teleoster har vist seg å kunne ligge på så lavt som $<0,5$ mmol/L (Erikson et al., 2016; Pottinger, 1998), mens tidligere pre-stress målinger av plasma laktat i atlantisk smolt har ligget på rundt 1-5 mmol/L (Iversen et al., 2005; Iversen et al., 1998). I dette forsøket lå pre-stress verdiene på $3,26 \pm 0,69$ mM, og hadde ingen signifikante endringer hos noen av gruppene gjennom forsøket. For sår- og stress-gruppen kan dette virke unormalt, ettersom stresset de bli utsatt for både ga delvis hypoksi (dropp i oksygen i kar) og raske rømningsbevegelser hvor laktatproduksjon mest sannsynlig ble initiert. Ifølge Pankhurst (2011) har det blitt utført studier på laksefisk som viser at plasmakortisolnivåer etter sammentrengning og raske rømningsbevegelser kan øke uten noen endringer i laktatnivåer, og omvendt. I tillegg har tidligere forsøk vist at laktatnivåene etter akutt stress hos laksefisk faktisk kan gå tilbake til pre-stress verdier innen 2-24 timer etter påført stressor (López-Patiño et al., 2014; Shabani et al., 2016). Ettersom fisken i sår- og stress-gruppen i dette forsøket sannsynligvis ikke har gått over i en kronisk stresstilstand før i uke 6, er det mulig at de har hatt en økning i laktatnivå etter at de har blitt utsatt for stress, og at nivåene har gått tilbake til pre-stress verdier før prøveuttakene fant sted 12 til 18 timer senere.

4.2.3. Osmoregulatoriske effekter

Atlantisk laks er en euryhalin fiskeart, noe som betyr at den tilbringer deler av livet sitt både i ferskvann og i saltvann. Store områder av fiskens permeable epitel er i kontakt med vannet, og siden atlantisk laks ikke er isosmotiske til det ytre miljøet vil det være osmotiske gradienter over disse permeable overflatene (Bone & Moore, 2008). Når fisk er i sjøvann vil sjøvannet ha større ionekonsentrasjon enn fisken, og vann vil dermed automatisk diffundere ut av fisken og ioner vil diffundere inn for å oppnå osmotisk likevekt. For å kompensere for det osmotiske vanntapet må fisken drikke sjøvann. Når fisken er i ferskvann, vil den derimot ha større ionekonsentrasjon enn vannet rundt, og vann vil derfor diffundere inn i fisken mens ioner diffunderer ut. For å kompensere for dette osmotiske vanninntaket skilles det ut store mengder med fortynnet urin, omtrent 10 ganger så mye som når fisken er i sjøvann (Bone & Moore,

2008). Generelt sett må fisk bruke 25-50% av sin totale energiproduksjon for å takle disse ubalansene (Bone & Moore, 2008).

Osmoregulering i teleoster er en integrert kombinasjon av transportaktivitet i nyre, tarm og gjeller, og er i stor grad kontrollert av hormoner (Bone & Moore, 2008). Et hormon som har en veletablert rolle i den endokrine kontrollen av osmoregulering er det bemerkelsesverdige allsidige hormonet kortisol (Chasiotis & Kelly, 2011). Studier som har fokusert på kortisolens rolle i å endre elementer i den transcellulære transportveien i gjellevev har vist at kortisol både er assosiert med økt saltsekresjon over gjellene under hyperosmotiske forhold (sjøvann), og økt ioneopptak over gjellepitelet under hypoosmotiske forhold (ferskvann) ved å øke uttrykket av Na-K-Cl kotransportør og Na⁺-K⁺ aktivert ATPase aktivitet (Chasiotis & Kelly, 2011; Evans et al., 2005; Sakamoto & McCormick, 2006). Kortisol virker også på tarm og nyrer for å inducere hypo-osmoreguleringsmekanismer og øke sjøvannstoleransen hos atlantisk laks (Nisembaum et al., 2021). I tillegg er det antatt at kortisol er nødvendig for å regulere ione- og vannbevegelse over tarmepitelet i ferskvannsfisk (Sakamoto & McCormick, 2006). På denne måten kan den sekundære stressresponsen inkludere endringer i nivåer av plasma osmolalitet, klorid, magnesiumioner og kalsiumioner. Det må påpekes at kortisol ikke alltid leder til disse effektene alene, men at en kombinasjon av kortisol og andre hormoner noen ganger er nødvendig (se f.eks. Sakamoto og McCormick (2006) og Nisembaum et al. (2021))

4.2.3.1. Osmolalitet

Osmolalitet er et mål på osmotisk trykk, og defineres som antall løste molekyler eller ioner i 1 kg av løsningsmiddelet i den effektive konsentrasjonen av et ion i løsning (Kierulf, 2020). For å holde på osmolaliteten må fisk hele tiden regulere deres indre ionekonsentrasjon. Enzymet Na⁺/K⁺-ATPase i gjellene deltar i ionetransport enten gjennom bevegelse av Na⁺ og K⁺ over cellemembranen, eller indirekte ved å generere ioniske og elektriske gradienter som setter i gang sekundær aktiv transport (Peruzzi et al., 2005). Na⁺/K⁺-ATPase finnes også i nyre og tarm, og anses å være drivkraften for ionebytte både i ferskvann og sjøvannstilpassede teleoster (Gjennomgått i McCormick (1995)) (Iversen et al., 2009; Peruzzi et al., 2005).

Frigjøring av stresshormoner har funksjoner som øker hjertevolumet, øker blodtrykket, rekrutterer gjellelameller, og øke gjellens diffunderende kapasitet for å lette oksygenopptaket når fisk prøver å møte forhøyede oksygenbehov (Suski et al., 2007). Disse funksjonene kan være positive under stress, og føre til økt overlevelse og evne til å håndtere utfordringer. Samtidig kan stresshormoner gi endringer i gjellemorfologi som letter ionepermeabilitet ved å

forstyrre tette celleforbindelser og redusere motstanden mot ionediffusjon. På denne måten vil stress vanligvis føre til økt mineralisering sammen med økt vanntap til miljøet for marin fisk, og omvendt for fisk i ferskvann (Suski et al., 2007; Wendelaar Bonga, 1997). Generelt sett pleier teleoster å ha en osmolalitet på 290-340 mOsm/kg uavhengig av saliniteten i vannet rundt (Svendsen et al., 2021)

I dette forsøket skjedde det ingen signifikante endringer i plasma osmolalitet i sår-gruppen eller sår- og stress-gruppen. Kontroll-gruppen hadde en signifikant reduksjon uke 1 etter forsøksstart, men dette er sannsynligvis tilfeldig ettersom saltholdighetsnivået i vannet var konstant i tillegg til at osmolalitetsnivåene økte igjen og forble relativt stabile resten av forsøket. Tidligere forsøk utført av Barton og Zitzow (1995) (akutt stress) og González et al. (2016) (kronisk stress) på henholdsvis gul gjedde (*Sander vitreus*) og atlantisk laks viste også til ingen endringer i osmolalitet etter påført stressor. González et al. (2016) hevdet at økt slimproduksjon kan beskytte fisk mot osmoregulatoriske problemer, og at økt produksjon av små slimceller muligens er grunnen til at det ikke blir observert store endringer i osmolalitet hos atlantiske laks infisert med lakselus (*Caligus rogercresseyi*). Svendsen et al. (2021) har derimot utført et forsøk på akutt stress hos atlantisk laks, hvor det ble observert en signifikant økning i plasma osmolalitet ca. 4,5 timer etter å ha blitt påført samme stressor som sår- og stress gruppen ble utsatt for i dette forsøket. Det ble dog ikke registrert hvor fort nivåene sank til pre-stress verdier. I et annet forsøk utført av Barton et al. (2005) på gyllen havkaruss (*Sparusa urata*) ble det observert at fisk som ble holdt i høy tetthet som en kronisk stressor hadde en økning i osmolalitet 2 timer etter å ha blitt utsatt for en påfølgende akutt håndteringsstressor. Osmolaliteten returnerte til pre-håndteringsnivåer innen 4 timer.

Den forsinkede eller manglende effekten av stress på osmolalitet kan skyldes kompenserende responser på cellenivå ettersom fiskeceller eksponert for hypotoniske medier, raskt hovner opp, men deretter har en tendens til å gå tilbake til sitt opprinnelige volum ved å eliminere cellulære osmolytter og dermed vann. Denne reguleringsmekanismen kalles regulatorisk volumreduksjon («regulatory volume decrease» RVD) (Trischitta et al., 2005). I motsetning vil fisk under hypersalin (sjøvann) forsøke å bruke intracellulære osmolytter som en del av osmoreguleringen, fordi forhøyet plasmaosmolalitet vil forårsake cellekrymping med mindre osmolytter akkumuleres. I de fleste organismer er disse oppløste stoffene ikke uorganiske ioner, men snarere nøytrale frie aminosyrer som taurin og glycine, små karbohydrater som myo-inositol og metylaminer som trimetylaminoksyd (TMAO). Slike organiske osmolytter, i motsetning til vanlige uorganiske ioner, forstyrrer ikke celle-makromolekyler og kalles derfor kompatible

oppløste stoffer; og i noen tilfeller beskytter de til og med makromolekyler mot forstyrrelser som temperatur, urea, trykk og reaktive radikaler (Fiess et al., 2007; Trischitta et al., 2005).

Selv om nivåene av plasma osmolalitet i dette forsøket ikke har hatt betydelige endringer hos sår-gruppen og sår- og stress-gruppen, har nivåene ligget langt over det som anses som normalen. Ifølge Arnesen et al. (1998) er plasma osmolalitetsnivå på 324-344 mOsm/kg vanlig for sjøtilpasset atlantisk laks. Andre forsøk støtter denne påstanden, og man finner pre-stress verdier innenfor denne grensen hos atlantisk laks i for eksempel González et al. (2016), Iversen et al. (2009), Knoph og Thorud (1996) og Svendsen et al. (2021). I dette forsøket lå pre-stress verdiene på $408 \pm 25,72$ mOsm/kg, og for sår-gruppen var verdiene helt oppe i $466,67 \pm 56,26$ mOsm/kg i uke 6 (dog ikke en signifikant økning). For sår- og stress-gruppen holdt nivåene seg på rundt 400 mOsm/kg gjennom hele forsøket. Ifølge Jawad (2013) vil langvarige avvik fra vanlige osmolalitetsnivå føre til dødelighet, men dette ble ikke observert i dette forsøket. Siden dette høye osmolalitetsnivået ble observert i alle gruppene, er det usannsynlig at stress er årsaken.

4.2.3.2. Kloridioner

For sjøvannstilpasset fisk vil kortisol kunne føre til akkumulering av ioner og økt vanntap (Suski et al., 2007; Wendelaar Bonga, 1997). Ved overgang til sjøvann skjer det en økning i antall kloridceller i gjellene, og ved hjelp av en elektrokjemisk gradient driver disse cellene aktiv transport av klor fra blodet og ut i sjøvannet. Den primære drivkraften for Cl^- sekresjon er Na^+K^+ -ATPase i kloridcellen som holder den cytoplasmiske konsentrasjonen av Na^+ lav. Dette fører til en stor Na^+ -gradient som gir energi til å drive bæremediert elektronisk nøytral innføring av Na^+ og Cl^- fra blodet. Cl^- diffunderer deretter til toppen av kloridcellen, hvor den passerer ut til sjøvannet via Cl^- kanaler. Etersom kloridcellenes membranpotensiale er negativt med hensyn til sjøvann, vil enhver økning i cytoplasmisk Cl^- føre til tilsvarende Cl^- utgang til sjøvannet. Na^+ forlater passivt via de lekkende tette kryssene mellom kloridceller som følge av transepitelgradienten som oppstår når Cl^- forlater cellen (Bone & Moore, 2008). Tidligere studier har demonstrert at plasma kloridnivåer stiger under stress hos fisk i sjøvann som følge av at økte plasma kortisolnivåer endrer permeabiliteten i gjellene og fører til redusert utstrømming av Cl^- og Na^+ (Iversen et al., 1998; Redding & Schreck, 1983). Dette kan skje ettersom stresshormoner fører til økt minuttvolum i hjertet og økt blodtrykk, noe som forårsaker hevelse i gjellenes epitel og lameller. Dette forstyrrer de lekkende tette kryssene mellom kloridcellene og reduserer motstanden mot ionediffusjon (Suski et al., 2007; Wendelaar Bonga,

1997). Plasma kloridnivåer er dermed en nyttig indikator for å vurdere utskillelseskapasiteten i gjellene for å opprettholde hydromineral balanse (Iversen et al., 2009).

I dette forsøket har plasmakloridnivået holdt seg stabilt gjennom hele forsøket, og det har ikke vært noen betydelige forskjeller mellom gruppene eller sammenlignet med pre-stress verdiene. Det samme skjedde i forsøket utført av Barton et al. (2005) på stressresponsen til gyllen havkaruss, mens andre forsøk utført på marin fisk viser til forhøyede kloridnivåer etter påført stressor (Iversen et al., 1998; Suski et al., 2007). Benfey og Biron (2000) utførte et forsøk på akutt stressrespons hos triploid regnbueørret og bekkerøye, og observerte ingen signifikante endringer på verken diploide eller triploide regnbueørret, men at det oppstod en betydelig økning hos diploid bekkerøye 40 minutter etter håndteringsstress. Det ble dog ikke registrert hvor lang tid det tok før nivåene gikk tilbake til normalen.

4.2.3.3. Magnesiumioner

Marine teleoster inntar sjøvann for å motvirke det osmotiske vanntapet, og må dermed kvitte seg med toverdige ioner som Mg^{2+} og SO_4^{2-} som entrer plasma via vannet de drikker. Sjøvann inneholder omtrent 50 mM Mg^{2+} og 25 mM SO_4^{2-} som er mye høyere konsentrasjon enn det er av disse ionene i plasma (Bone & Moore, 2008, s. 176). Opptak av magnesium skjer i magen, mens ekskresjon foregår ved hjelp av nefroner i nyren (Bone & Moore, 2008, s. 176; Iversen et al., 2009). I tillegg har forskning indikert at gjelleptielet hos fisk også er gjennomtrengelig for magnesium (Kirschner et al., 1974). Total konsentrasjon av plasma magnesiumioner stiger vanligvis ikke over 2 mM, og dersom det skjer er det et tegn på forstyrrelser i den hydromineral balansen (Iversen et al., 2009).

I tidligere studier på stress og stressrespons hos atlantisk laks har det blitt observert høyere nivåer av plasma magnesium etter at fisken har blitt utsatt for stressor (Iversen & Eliassen, 2009; Iversen et al., 2009; Iversen & Eliassen, 2014). I en undersøkelse av akutt og kronisk stressrespons på Gyllen havkaruss ble det også observert signifikante økninger i plasma magnesiumnivåer hos fisken etter at den ble utsatt for lufteksponering og trengsel (akutt stress) og 11 dagers trengsel (kronisk stress) (Arends et al., 1999). Tilsvarende har det blitt registrert betydelige økninger i plasma magnesiumnivåer på atlantisk torsk sammenlignet med en kontrollgruppe etter å ha blitt utsatt for transport med høy tetthet (Staurnes et al., 1994). I motsetning til disse resultatene har Liebert og Schreck (2006) registrert ubetydelige endringer i plasma magnesiumnivåer hos regnbueørret utsatt for lufteksponerings- og trengselsstressor, men dette forsøket foregikk i ferskvann og dermed ikke sammenliknbare.

I dette forsøket ble det ikke observert noen betydelige forskjeller hos noen av gruppene sammenlignet med pre-stress verdier eller de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt. Verdiene har også holdt seg under 2 mM gjennom hele eksperimentet, noe som tyder på at den hydromineral balansen er under kontroll.

4.2.3.4. Kalsiumioner

Kalsium er viktig for vekst, reproduksjon og mange andre fysiologiske prosesser som muskelsammentrekning, nervesignal transduksjon, og kontroll av membranpermeabilitet og cellulær metabolisme (Wendelaar Bonga & Flik, 1993). Disse prosessene er avhengig av en effektiv kontroll av de ioniske kalsiumnivåene i ekstracellulær væske (ECF) (Wendelaar Bonga & Flik, 1993). Kalsiumkonsentrasjonen i blodet blir regulert innen snevre grenser. Hypokalsemi vil resultere det i overeksitering av nervesystemet og muskelspasmer, mens hyperkalsemi vil føre til muskelsvakhet, inkludert i hjertemuskel, ettersom nervesystemet da vil deaktiveres (Wendelaar Bonga & Flik, 1993; Aarnes, 2003). Nøyaktig kontroll av kalsiumnivåer i blodet er dermed ekstremt viktig (Wendelaar Bonga & Flik, 1993). Kalsiummetabolisme hos teleoster inkluderer aktivt opptak av Ca^{2+} i gjeller og tarmepitel (Marshall, 2002). Denne mekanismen er hormonregulert av prolaktin, stanniocalcin og kalsitonin (Wendelaar Bonga & Flik, 1993).

Etter å ha passert passivt inn i kloridcellene ved hjelp av den elektrokjemiske gradienten skjer videre regulering via ATP-drevne Ca^{2+} pumper og $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ vekslere (Wendelaar Bonga & Flik, 1993). Kortisol kan påvirke forekomsten av ATP, og kan dermed påvirke kalsiumionenes transportkapasitet i gjellene og tarmen (Wendelaar Bonga & Flik, 1993). Overskudd av ioner skilles ut med avføringen eller via nyrene (Aarnes, 2003).

Tidligere forsøk på regnbueørret og gyllen havkaruss viser til ubetydelige endringer i plasma kalsiumnivåer etter påført stressor (Arends et al., 1999; Liebert & Schreck, 2006). Samtidig har forsøk på benfisk (*Albula vulpes*) vist til økt konsentrasjon av kalsiumioner etter påført stressor, i tillegg til forsinket gjenoppretting av mineralbalanse sammenlignet med kloridionene (Suski et al., 2007).

I dette forsøket ble det ikke observert signifikante forskjeller i plasma kalsiumnivåer hos noen av gruppene sammenlignet med pre-stress verdier og med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt. I tidligere eksperimenter utført på euryhaline teleoster har normale plasma kalsiumnivåer blitt gjenopprettet innen 3-6 timer etter å ha blitt utsatt for en dobbel økning (Wendelaar Bonga & Flik, 1993). Det kan dermed være mulig at fisken som ble brukt i dette

forsøket har klart å gjenvinne plasma kalsiumbalanse før prøvetakningen har funnet sted 12 til 18 timer etter påført stressor.

4.3. Tertiære stressresponser

Tertiære stressresponser er resultatet av de kumulative endringene i fysiologien samlet opp fra de primære og sekundære stressresponsene som til slutt gir endringer på hele kroppen (tertiær stressrespons). Typiske endringer forbundet med tertiær stressrespons er endringer i vekstrate, generell tilstand, sykdomsresistens, metabolsk funksjon, atferd og overlevelse (Barton, 2002). Endringene som ble registrert i dette forsøket var vekstrate og finneslitasje.

4.3.1. Vekst

Når stressaksen er forhøyet over en lengre periode (dvs. kronisk stress), kan stressresponsen føre til reduksjon i somatisk vevsvekst, immunsuppresjon og redusert fôring (Midwood et al., 2017). For å oppfylle økningen i energibehov som oppstår under kronisk stress, blir energi i form av glukose fra lagrede glukoseresserver mobilisert bort fra andre livsviktige oppgaver som for eksempel somatisk vevsvekst (Pankhurst & Kraak, 1997). Energi er imidlertid ikke den eneste faktoren som må vurderes i henhold til vekst, ettersom vekst også styres av flere endokrine systemer (se Pickering (1993)). Van Weerd og Komen (1998) diskuterer om stress har en direkte påvirkning på vekst, ettersom mange eksperimenter rettet mot å etablere det fysiologiske forholdet mellom stress og vekst har gitt tvetydige resultater. Imidlertid har Gregory og Wood (1999), Fevolden et al. (2002) og Madison et al. (2015) observert at forhøyede nivåer av plasmakortisol reduserer vekstraten betraktelig hos regnbueørret. Indikasjoner på at kortisol har effekt på vekstrate har også blitt beskrevet hos gullfisk (*Carassius auratus*), bekkerøye, karpe, abbor (*Perca fluviatilis*), og kanalmalle (*Ictalurus punctatus*) (Bernier et al., 2004; Chadwick & McCormick, 2017; Fazio, Hon Jung, et al., 2015; Jentoft et al., 2005; Small, 2004).

Tidligere studier med bruk av eksogent kortisol har knyttet de vekstdempende effektene av kortisol til hormonets effekt på matinntak, mellomliggende metabolisme og muskelmasseregulering. Likevel er de nøyaktige mekanismene om hvordan kortisol påvirker disse komplekse systemene langt fra klare (Madison et al., 2015). I dette forsøket ble det observert at kun kontroll-gruppen hadde en signifikant økning i vekt ved slutten av forsøket, sammenlignet med forsøksstart. Dette gir mening med tanke på at denne fisken ikke har blitt utsatt for stress i form av sår eller trengsel, og har dermed hatt normale vekstforhold gjennom hele forsøket. Gjennomsnittlig spesifikk vekstrate viser også at kontroll-gruppen har hatt en

mye høyere vekstrate enn de andre gruppene gjennom de siste 4 ukene av forsøket. Fisken i sår-gruppen og sår- og stress-gruppen har også hatt en økning i vekt siden forsøksstart, dog ikke betydelig. Gjennomsnittlig sluttvekt til sår- og stress-gruppen og sår-gruppen var henholdsvis $1,42 \pm 0,32$ og $1,24 \pm 0,27$ kg, noe som antyder at fisken i disse gruppene har mobilisert bort energi fra vekst eller redusert matinntaket under forsøket. Samtidig har alle gruppene hatt en ubetydelig økning i lengde gjennom forsøket. Disse resultatene kan komme av redusert matinntak og/eller omdisponering av energi som følge av sårheling hos sår gruppen, og sårheling og trengselstress hos sår- og stressgruppen. Andre faktorer som kan påvirke veksten er temperatur, sosiale hierarkier, mangelfull oksygenering, vannhastighet, vannkvalitet, appetitt, sykdommer, og næringsinnholdet i fôret (Chadwick & McCormick, 2017; Grobler & Wood, 2013; Noble et al., 2018).

4.3.2. Finneslitasje

Finneslitasje og finneskader er definert som «en skade på levende vev inkludert nerveender på finner», og blir derfor klassifisert som et fiskevelferdsspørsmål (Gonzalez et al., 2020; Hoyle et al., 2007). Laksens finner består av levende vev i form av et epiteliallag eller fold som støttes opp av finnestråler. Finnene har også nociseptorer. Slitasje og skader på finner kan dermed være en stor velferdstrussel, ettersom det både er smertefullt i tillegg til at det gir en åpning for patogene organismer (Noble et al., 2018). Finneskader kan ha mange ulike årsaker, og forskning har vist at faktorer som vannkvalitet, høy tetthet, fôring og håndtering er av stor betydning (Gonzalez et al., 2020). I tillegg kan alvorlighetsgrad på finneskader variere mellom arter og ulike livsstadier. Hos smolt og postsmolt kan eksempelvis tap av brystfinner føre til osmotisk ubalanse (Noble et al., 2018). Som et resultat av disse faktorene har det oppstått en betydelig interesse for å forstå og redusere finneskader på oppdrettsfisk (Hoyle et al., 2007)

Et forsøk utført av Gregory og Wood (1999) viste at regnbueørret med kronisk forhøyede plasmakortisol nivåer hadde økt finneslitasje på rygg- og halefinne og redusert appetitt. Forsøk på stressrespons hos atlantisk postsmolt har også vist at fisk som ble utsatt for daglig stress i 4 uker før vaksinerings hadde en signifikant høyere grad av finneslitasje på ryggfinne sammenlignet med en kontrollgruppe og en gruppe som fikk vaksine før den ble utsatt for daglig stress i 4 uker (Iversen & Eliassen, 2014). Winfree et al. (1998) studerte effekten av vanntemperatur, tetthet, og matmangel på ryggfinneskader hos regnbueørret, og observerte at finneskår ble betydelig påvirket av alle faktorene.

I dette forsøket ble det registrert finneskår på brystfinner, bukfinner, analfinne og halefinne. I sår- og stress-gruppen ble det registrert en signifikant høyere finneskår på brystfinner i uke 3, 4, 5, 6, 7 og 8 sammenlignet med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt. I tillegg ble det observert signifikante endringer i finneskår på analfinnen til sår- og stress-gruppen i uke 5, 6 og 7 sammenlignet med pre-stress verdiene, og i uke 6 og 7 sammenlignet med de andre gruppene ved samme prøvetakningspunkt. På bukfinner og halefinne ble det ikke observert noen betydelige forskjeller i finneskår hos noen av gruppene. Disse resultatene tyder på at stress har en innvirkning på finneslitasje, ettersom det kun er registrert signifikante endringer i finneskår hos fisk som har blitt utsatt for daglig stress. Det ble dog ikke observert osmotisk ubalanse hos individene, selv om brystfinnerne var de som ble sterkest påvirket av eksperimentet.

4.5. Sårheling

Observasjoner av sårheling i hornhinne-, tannkjøtt- og trakealvev hos terrestriale virveldyr har vist at den høyeste helbredelsesfrekvensen oppstår i fuktig miljø. Gitt de unike og sofistikerte egenskapene til teleostenes hud og skjell, i tillegg til konstant eksponering for fuktige omgivelser, har det blitt antatt at sårhelingsprosessen hos akvatiske arter er raskere og mer effektiv sammenlignet med terrestriske virveldyr (Fontenot & Neiffer, 2004).

Under en akutt stressrespons skjer det en endring i immuncellesammensetningen i blodet som fører til økte nivåer av polymorfonukleære leukocytter, som er de første immuncellene som ankommer et infisert område. Dette skiftet i immuncellesammensetning kan forbedre responsen fra det medfødte immunforsvaret og kan også bli forbundet med forbedret hudimmunitet. Under korttids stress kan kortisol dermed ha en positiv effekt på immunsystemet og sårheling (Tort, 2011; Zwollo, 2018). Samtidig har det blitt observert at kortvarig økte plasmakortisolnivåer også kan ha noen negative effekter. In vitro studier av celler fra hodenyrene til kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*) og karpe har vist at eksponering for kortisol kan hemme antistoffresponsen i fisken ved å redusere IgM⁺ immunoglobulin-utskillende celler, og dermed også redusere antall utskilt IgM i hodenyren. Det foreslås derfor at kortvarig eksponering for kortisol in vitro kan hemme antistoffresponsen i teleoster (Zwollo, 2018).

Sveen et al. (2018) hevder at for å beskytte et sår er fisk avhengig av en rask reepiteliseringsprosess og en slimplugg for å beskytte såret. Høy fisketetthet er ofte korrelert med stress, og et eksperiment på hvordan høy fisketetthet påvirker sårheling viste at flere gener involvert i sekretoriske funksjoner og slimresponser ble påvirket ved høy fisketetthet. Dette

inkluderte nedregulering av zymogen granulatmembranprotein 16, som antas å være involvert i slimutskillelse i fiskeskin, og glykosyltransferaser, som er involvert i glykosylering av muciner. Det ble foreslått at reduksjonen av transkripsjoner relatert til slimproduksjon i behandlingen med høy fisketetthet er en allostatisk respons på et utfordrende miljø. Mindre slim og færre slimceller i behandlingen med høy fisketetthet kan dermed påvirke sårets evne til å motstå sekundære infeksjoner (Sveen et al., 2018).

Resultatene til Sveen et al. (2018) støtter mange av effektene som det har blitt bevist at kronisk forhøyede kortisolnivåer kan ha på immunforsvaret. Matrix metalloproteinase 9 og 3, som er viktige komponenter i flere sårhelingsprosesser, viste en firedobling i løpet av de første to ukene av eksperimentet. Det har blitt rapportert at forbedret aktivitet av disse proteolytiske enzymene forårsaker kronisk og forsinket sårheling hos pattedyr, noe som tyder på at dette også kan ha skjedd med fisken som ble utsatt for høy tetthet. I tillegg til dette ble også transkripsjonen av gener involvert i vevsreparasjon undertrykt ved høy fisketetthet. Dette ble støttet av de histologiske resultatene som viste at høy fisketetthet resulterte i forsinket epidermal reparasjon, skjell mineralisering og dannelse av dermis (Sveen et al., 2018).

I dette forsøket var det sårene til fisken som ble utsatt for kronisk stress som hadde raskest sårheling. Det kan dermed diskuteres om fisken har klart å adaptere seg til det daglige stresset den ble utsatt for i de første ukene, før det har slått over til kronisk stress i uke 6, 7 og 8. På denne måten kan fisken ha fått en økt immunrespons under akutt stressrespons de første ukene, som kan ha ført til at sårhelingsprosessen har blitt fullført før den kroniske stressresponsen har slått inn. Dette stemmer overens med kortisolresultatene som viser at plasmakortisol nivåene i sår- og stress-gruppen hadde sunket tilbake til normalverdier før prøveuttaket i uke 1-5, noe som tyder på at fisken har tilpasset seg det daglige stresset den ble utsatt for disse ukene. Gruppen hadde ikke en signifikant økning i basalnivåer før i uke 6, hvor nivåene deretter stabiliserte seg 2-3 ganger over pre-stress verdiene. I tillegg viser figur 22 tydelig forskjell på sårhelingsprosessen til gruppene i uke 5 og 6, hvor sårene til sår- og stress-gruppen nesten er lukket og inflammasjonen er tydelig redusert mens sårene til sår-gruppen fortsatt ikke har lukket seg og fortsatt er inflammete.

4.6. Oppsummering

Hensikten med dette forsøket var å undersøke om kronisk stress hadde negativ påvirkning på sårheling og fiskevelferd etter et kirurgisk inngrep. I oppdrettsnæringen blir fisk kontinuerlig utsatt for ulike stressfaktorer, og ville derfor i mange tilfeller sannsynligvis ha hatt en viss

økning i kortisol før et eventuelt kirurgisk inngrep dersom dette akustiske merket skulle blitt tatt i bruk. Det kunne derfor vært hensiktsmessig i dette forsøket å utføre operasjonen på et senere tidspunkt slik at fisken allerede hadde vært kronisk stresset før operasjonen. I forsøket til Iversen og Eliassen (2014) ble en gruppe med atlantisk laks stresset i 4 uker før vaksinasjon, og resultatene i deres forsøk viste at forhøyninger i plasmakortisol før vaksinerings kunne starte en allostatisk overbelastning type 2 med alvorlige konsekvenser for dyrevelferden. For å studere tydeligere hvordan stress påvirker sårheling og fiskevelferden kunne det dermed vært en idé å kjøre et forsøk med en sår- og stress-gruppe som fikk operert inn en tag før forsøksstart, og en stress- og sår-gruppe som fikk operert inn en tag etter 4 uker med stress, samt en gruppe med sår og tag som ikke ble stresset (positiv kontroll) og en gruppe uten sår og stress (negativ kontroll). På denne måten kunne man sammenligne hvordan fisken reagerer på operasjonen både med og uten kroniske forhøyninger i plasmakortisol i forkant, og brukt dette videre for å finne en metode for å redusere risikoen for å gå på bekostning av dyrevelferden og gjøre den totale allostatiske belastningen minst mulig.

5. Konklusjon

Resultatene i forsøket indikerer at sår- og stress-gruppen mest sannsynlig har kommet inn i en negativ spiral med forhøyede kortisolverdier og økt finneslitasje. Denne gruppen synes ikke ved avslutningen av forsøket å ha fått en redusert fiskevelferd, men en kan ikke utelukke at dette kunne ha skjedd dersom forsøket hadde vedvart over lengre tid. Resultatene viser også at sår- og stress-gruppen har hatt en effektiv sårhelingsprosess til tross for kronisk stress. H_0 : kronisk stress har ingen effekt på sårheling og H_2 : kronisk stress har ingen påvirkning på den generelle fiskevelferden kan dermed aksepteres under tvil.

Plasma kortisolnivåene til fisken i sår- og stress gruppen hadde en signifikant økning i uke 6, 7 og 8. Undersøkelsen viser dermed at fisken i denne gruppen har gått over i en allostatisk overbelastning type 2, som blant annet kjennetegnes med forhøyede basalnivå av plasmakortisol. H_1 : kronisk stress påvirker ikke basalnivåene av plasmakortisol må derfor forkastes.

Litteraturliste

- Acerete, L., Balasch, J. C., Espinosa, E., Josa, A. & Tort, L. (2004). Physiological responses in Eurasian perch (*Perca fluviatilis*, L.) subjected to stress by transport and handling. *Aquaculture*, 237(1), 167-178. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.03.018>
- Arends, R. J., Mancera, J. M., Munoz, J. L., Wendelaar Bonga, S. E. & Flik, G. (1999). The stress response of the gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) to air exposure and confinement. *Journal of Endocrinology*, 163(1), 149-157. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1630149>
- Arnesen, A. M., Johnsen, H. K., Mortensen, A. & Jobling, M. (1998). Acclimation of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) smolts to 'cold' sea water following direct transfer from fresh water. *Aquaculture*, 168(1), 351-367. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00361-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00361-5)
- Barcellos, L. J. G., Nicolaiewsky, S., De Souza, S. M. G. & Lulhier, F. (1999). Plasmatic levels of cortisol in the response to acute stress in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.), previously exposed to chronic stress. *Aquaculture Research*, 30(6), 437-444. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2109.1999.00348.x>
- Barstein, G. (2011, 14.07.2011). Denne fisken knuser skjell med en "ambolt". *Dagbladet*.
- Barton, B. A. (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), 517-525. <https://doi.org/10.1093/icb/42.3.517>
- Barton, B. A., Ribas, L., Acerete, L. & Tort, L. (2005). Effects of chronic confinement on physiological responses of juvenile gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., to acute handling. *Aquaculture Research*, 36(2), 172-179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.01202.x>
- Barton, B. A. & Zitzow, R. E. (1995). Physiological responses of juvenile walleyes to handling stress with recovery in saline water. *The Progressive Fish-Culturist*, 57(4), 267-276. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1995\)057](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1995)057)
- Benfey, T. J. & Biron, M. (2000). Acute stress response in triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Aquaculture*, 184(1), 167-176. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(99\)00314-2](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(99)00314-2)
- 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. *General and Comparative Endocrinology*, 135(2), 230-240. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2003.09.016>
- Bone, Q. & Moore, R. H. (2008). *Biology of fishes* (3rd ed. utg.). Taylor & Francis.
- Bracewell, P., Cowx, I. G. & Uglow, R. F. (2004). Effects of handling and electrofishing on plasma glucose and whole blood lactate of *Leuciscus cephalus*. *Journal of Fish Biology*, 64(1), 65-71. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00281.x>
- Braithwaite, V. & Boulcott, P. (2007). Pain perception, aversion and fear in fish. *Diseases of aquatic organisms*, 75, 131-138. <https://doi.org/10.3354/dao075131>
- Chadwick, J. G. & McCormick, S. D. (2017). Upper thermal limits of growth in brook trout and their relationship to stress physiology. *Journal of Experimental Biology*, 220(21), 3976-3987. <https://doi.org/10.1242/jeb.161224>
- Chasiotis, H. & Kelly, S. P. (2011). Effect of cortisol on permeability and tight junction protein transcript abundance in primary cultured gill epithelia from stenohaline goldfish and euryhaline trout. *General and Comparative Endocrinology*, 172(3), 494-504. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.04.023>
- Currey, L. M., Heupel, M. R., Simpfendorfer, C. A. & Clark, T. D. (2013). Blood lactate loads of redthroat emperor *Lethrinus miniatus* associated with angling stress and

- exhaustive exercise. *Journal of Fish Biology*, 83(5), 1401-1406.
<https://doi.org/10.1111/jfb.12216>
- Damsgård, B., Juell, J.-E. & Braastad, B. O. (2006). *Welfare in farmed fish*. (Vol. 5/2006, p.100). Fiskeriforskning. <https://nmbu.brage.unit.no/nmbu-xmlui/handle/11250/283476>
- Duncan, I. J. (2005). Science-based assessment of animal welfare: farm animals. *Revue scientifique et technique (international office of epizootics)*, 24(2), 483-492.
- Dyrevelverdsloven. (2009). *Lov om dyrevelverd* (LOV-2009-06-19-97). Lovdata.
<https://lovdata.no/dokument/LTI/lov/2009-06-19-97>
- Elliott, D. G. (2000). Integumentary system: microscopic functional anatomy. I G. K. Ostrander (Red.), *The Laboratory Fish* (s. 271-306). Academic press.
- Ellis, T., Yildiz, H. Y., López-Olmeda, J., Spedicato, M. T., Tort, L., Øverli, Ø. & Martins, C. I. M. (2012). Cortisol and finfish welfare. *Fish Physiology and Biochemistry*, 38(1), 163-188. <https://doi.org/10.1007/s10695-011-9568-y>
- Erikson, U., Digre, H. & Grimsmo, L. (2016). Electrical immobilisation of saithe (*Pollachius virens*): Effects of pre-stunning stress, applied voltage, and stunner configuration. *Fisheries Research*, 179, 148-155. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2016.02.017>
- Evans, D. H., Piermarini, P. M. & Choe, K. P. (2005). The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews*, 85(1), 97-177.
<https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2003>
- Fabbri, E., Capuzzo, A. & Moon, T. W. (1998). The role of circulating catecholamines in the regulation of fish metabolism: An overview. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 120(2), 177-192.
[https://doi.org/10.1016/S0742-8413\(98\)10017-8](https://doi.org/10.1016/S0742-8413(98)10017-8)
- Fanouraki, E., Divanach, P. & Pavlidis, M. (2007). Baseline values for acute and chronic stress indicators in sexually immature red porgy (*Pagrus pagrus*). *Aquaculture*, 265(1), 294-304. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.01.006>
- Faught, E. & Vijayan, M. M. (2016). Mechanisms of cortisol action in fish hepatocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 199, 136-145. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2016.06.012>
- Fazio, A., Hon Jung, L., De Boeck, G. & Faggio, C. (2015). Feeding and cortisol alter branchial Na⁺/K⁺ ATPase activity and growth performance differently in common carp *Cyprinus carpio*. *Journal of Biological Research (Catanzaro)*, 88(1), 67-68.
- Fazio, F., Ferrantelli, V., Fortino, G., Arfuso, F., Giangrosso, G. & Faggio, C. (2015). The influence of acute handling stress on some blood parameters in cultured Sea Bream (*Sparus aurata linnaeus*, 1758). *Italian Journal of Food Safety*, 4(1), 4174.
<https://doi.org/10.4081/ijfs.2015.4174>
- Fevolden, S.-E., Røed, K. H. & Fjalestad, K. T. (2002). Selection response of cortisol and lysozyme in rainbow trout and correlation to growth. *Aquaculture*, 205(1), 61-75.
[https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00660-3](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00660-3)
- Fiess, J. C., Kunkel-Patterson, A., Mathias, L., Riley, L. G., Yancey, P. H., Hirano, T. & Grau, E. G. (2007). Effects of environmental salinity and temperature on osmoregulatory ability, organic osmolytes, and plasma hormone profiles in the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 146(2), 252-264.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.10.027>
- Fontenot, D. K. & Neiffer, D. L. (2004). Wound management in teleost fish: biology of the healing process, evaluation, and treatment. *The Veterinary Clinics of North America. Exotic animal practice*, 7(1), 57-86. <https://doi.org/10.1016/j.cvex.2003.08.007>

- Gonzalez, M. P., Marin, S. L., Mancilla, M., Canon-Jones, H. & Vargas-Chacoff, L. (2020). Fin erosion of *Salmo salar* infested with the parasite *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000). *Animals (Basel)*, 10(7). <https://doi.org/10.3390/ani10071166>
- González, M. P., Vargas-Chacoff, L. & Marín, S. L. (2016). Stress response of *Salmo salar* (Linnaeus 1758) when heavily infested by *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo 2000) copepodids. *Fish Physiology and Biochemistry*, 42(1), 263-274. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0134-x>
- Gregory, T. R. & Wood, C. M. (1999). The effects of chronic plasma cortisol elevation on the feeding behaviour, growth, competitive ability, and swimming performance of juvenile rainbow trout. *Physiological and Biochemical Zoology*, 72(3), 286-295. <https://doi.org/10.1086/316673>
- Grobler, J. M. B. & Wood, C. M. (2013). The physiology of rainbow trout in social hierarchies: two ways of looking at the same data. *Journal of comparative physiology*, 183(6), 787-799. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0752-5>
- Havforskningsinstituttet. (2019). Topic: Fish welfare. Hentet 4. april 2021 fra <https://www.hi.no/en/hi/temasider/aquaculture/fish-welfare>
- Hoyle, I., Oidtmann, B., Ellis, T., Turnbull, J., North, B., Nikolaidis, J. & Knowles, T. G. (2007). A validated macroscopic key to assess fin damage in farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquaculture*, 270(1), 142-148. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2007.03.037>
- Høy, E., Sunde, L. M. & Bjelland, H. V. (2013). Hvor mye laks er det egentlig i merden? *Norsk Fiskeoppdrett nummer 2*. https://www.sintef.no/globalassets/upload/fiskeri_og_havbruk/havbruksteknologi/exactus/dokument/exactus-nfo-artikkel_paaskrift.pdf
- 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 of the World Aquaculture Society*, 40(2), 216-225. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.2009.00244.x>
- Iversen, M., Eliassen, R. A. & Finstad, B. (2009). Potential benefit of clove oil sedation on animal welfare during salmon smolt, *Salmo salar L.* transport and transfer to sea. *Aquaculture Research*, 40(2), 233-241. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2008.02091.x>
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. & Eliassen, R. (2003). The efficacy of metomidate, clove oil, AQUI-STM and Benzoak as anaesthetics in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts, and their potential stress-reducing capacity. *Aquaculture*, 221, 549-566. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00111-X](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00111-X)
- Iversen, M., Finstad, B., McKinley, R. S., Eliassen, R. A., Carlsen, K. T. & 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), 373-382. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.10.019>
- Iversen, M., Finstad, B. & Nilssen, K. J. (1998). Recovery from loading and transport stress in Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) smolts. *Aquaculture*, 168(1), 387-394. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(98\)00364-0](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(98)00364-0)
- Iversen, M. H. (2013). *Stress and its impact on animal welfare during commercial production of Atlantic salmon (Salmo salar L.)* [Doktorgradsavhandling]. University of Nordland.
- Iversen, M. H. & Eliassen, R. A. (2014). The effect of allostatic load on hypothalamic–pituitary–interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar L.*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(2), 527-538. <https://doi.org/10.1007/s10695-013-9863-x>

- Jawad, L. A. (2013). Fish physiology: euryhaline fishes IS. D. McCormick, A. P. Farrell & C. J. Brauner (Red.), *Journal of Fish Biology* (Bd. 83, s. 1485-1486). Elsevier.
<https://doi.org/10.1111/jfb.12249>
- Jensen, L. B. (2015). *Nutritional and environmental impacts on skin and mucus condition in Atlantic salmon (Salmo salar L.)* [Doktorgradsavhandling]. University of Bergen.
<https://bora.uib.no/bora-xmlui/bitstream/handle/1956/10604/dr-thesis-2015-Linda-B-Jensen.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Jensen, P. M. (2017). Stress påvirker sårhelingen hos oppdrettsfisk. *Kyst.no*.
<https://www.kyst.no/article/stress-paavirker-saarhelingen-hos-oppdrettsfisk/>
- Jentoft, S., Aastveit, A. H., Torjesen, P. A. & Andersen, Ø. (2005). Effects of stress on growth, cortisol and glucose levels in non-domesticated Eurasian perch (*Perca fluviatilis*) and domesticated rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 141(3), 353-358. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2005.06.006>
- Kierulf, P. (2020, 10.02.2020). *Osmolalitet*. Store medisinske leksikon. Hentet 10.05.21 fra <https://sml.snl.no/osmolalitet>
- Kiilerich, P., Servili, A., Péron, S., Valotaire, C., Goardon, L., Leguen, I. & Prunet, P. (2018). Regulation of the corticosteroid signalling system in rainbow trout HPI axis during confinement stress. *General and Comparative Endocrinology*, 258, 184-193.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.08.013>
- Kirschner, L. B., Kirschner, L. B., Greenwald, L., Greenwald, L., Sanders, M. & Sanders, M. (1974). On the mechanism of sodium extrusion across the irrigated gill of sea water-adapted rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *The Journal of General Physiology*, 64(2), 148-165. <https://doi.org/10.1085/jgp.64.2.148>
- Knoph, M. B. & Thorud, K. (1996). Toxicity of ammonia to Atlantic salmon (*Salmo salar L.*) in seawater—Effects on plasma osmolality, ion, ammonia, urea and glucose levels and hematologic parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 113(4), 375-381. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(95\)02078-0](https://doi.org/10.1016/0300-9629(95)02078-0)
- Leatherland, J. F. & Cho, C. Y. (1985). Effect of rearing density on thyroid and interrenal gland activity and plasma and hepatic metabolite levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Journal of Fish Biology*, 27(5), 583-592.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1985.tb03203.x>
- Liebert, A. M. & Schreck, C. B. (2006). Effects of acute stress on osmoregulation, feed intake, IGF-1, and cortisol in yearling steelhead trout (*Oncorhynchus mykiss*) during seawater adaptation. *General and Comparative Endocrinology*, 148(2), 195-202.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.03.002>
- Lim, H. K. & Hur, J. W. (2018). Effects of acute and chronic air exposure on growth and stress response of juvenile olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 18(1), 143-151.
- López-Patiño, M. A., Hernández-Pérez, J., Gesto, M., Librán-Pérez, M., Míguez, J. M. & Soengas, J. L. (2014). Short-term time course of liver metabolic response to acute handling stress in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 168, 40-49.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2013.10.027>
- Lulijwa, R., Alfaro, A. C., Merien, F., Meyer, J. & Young, T. (2019). Advances in salmonid fish immunology: A review of methods and techniques for lymphoid tissue and peripheral blood leucocyte isolation and application. *Fish & Shellfish Immunology*.
- Madison, B. N., Tavakoli, S., Kramer, S. & Bernier, N. J. (2015). Chronic cortisol and the regulation of food intake and the endocrine growth axis in rainbow trout. *Journal of Endocrinology*, 226(2), 103-119. <https://doi.org/10.1530/joe-15-0186>

- Marshall, W. S. (2002). Na⁺, Cl⁻, Ca²⁺ and Zn²⁺ transport by fish gills: retrospective review and prospective synthesis. *Journal of Experimental Zoology*, 293(3), 264-283. <https://doi.org/10.1002/jez.10127>
- Martins da Rocha, R., Carvalho, E. G. & Urbinati, E. C. (2004). Physiological responses associated with capture and crowding stress in matrinxã *Brycon cephalus* (Gunther, 1869). *Aquaculture Research*, 35(3), 245-249. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2109.2004.00998.x>
- McCormick, S. D. (1995). Hormonal control of gill Na⁺, K⁺-ATPase and chloride cell function. *Fish Physiology*, 14, 285-315.
- McEwen, B. S. (1998). Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 840, 33-44. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb09546.x>
- McEwen, B. S. & Wingfield, J. C. (2003). The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Hormones and Behavior*, 43(1), 2-15.
- Mellor, D. J. & Stafford, K. J. (2001). Integrating practical, regulatory and ethical strategies for enhancing farm animal welfare. *Australian Veterinary Journal*, 79(11), 762-768. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.2001.tb10895.x>
- Midwood, J. D., Peiman, K. S., Burt, A. E. W., Sarker, M. Y., Nannini, M. A., Wahl, D. H. & Cooke, S. J. (2017). Size-dependent consequences of exogenous cortisol manipulation on overwinter survival and condition of Largemouth Bass. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological and Integrative Physiology*, 327(1), 5-17. <https://doi.org/10.1002/jez.2064>
- Millot, S., Nilsson, J., Fosseidengen, J. E., Begout, M.-L., Fern, A., Braithwaite, V. A. & Kristiansen, T. S. (2014). Innovative behaviour in fish: Atlantic cod can learn to use an external tag to manipulate a self-feeder. *Animal Cognition*, 17(3), 779-785. <https://doi.org/10.1007/s10071-013-0710-3>
- Mommsen, T., Vijayan, M. & Moon, T. (1999). Cortisol in teleost dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9, 211-268. <https://doi.org/10.1023/A:1008924418720>
- Nisembaum, L. G., Martin, P., Lecomte, F. & Falcón, J. (2021). Melatonin and osmoregulation in fish: A focus on Atlantic salmon *Salmo salar* smoltification. *Journal of Neuroendocrinology*, 33(3). <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jne.12955>
- Noble, C., Berrill, I. K., Waller, B., Kankainen, M., Setälä, J., Honkanen, P., Mejdell, C. M., Turnbull, J. F., Damsgård, B., Schneider, O., Toften, H., Kole, A. P. W. & Kadri, S. (2012). A multi-disciplinary framework for bio-economic modeling in aquaculture: a welfare case study. *Aquaculture Economics & Management*, 16(4), 297-314. <https://doi.org/10.1080/13657305.2012.729250>
- Noble, C., Gismervik, K., Iversen, M. H., Kolarevic, J., Nilsson, J., Stien, L. H. & Turnbull, J. F. (2018). *Welfare indicators for farmed Atlantic salmon: tools for assessing fish welfare*. ISBN 978-82-8296-556-9. FHF, Oslo. 351pp.
- Nærings- og Fiskeridepartementet. (2015). *Forutsigbar og miljømessig bærekraftig vekst i norsk lakse- og ørretoppdrett* (Meld. St. 16 (2014-2016)). <https://www.regjeringen.no/contentassets/6d27616f18af458aa930f4db9492f5e5/no/pdfs/stm201420150016000dddpdfs.pdf>
- Pankhurst, N. W. (2011). The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), 265-275. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2010.07.017>
- Pankhurst, N. W. & Kraak, G. v. d. (1997). Effects of stress on reproduction and growth of fish. I (s. 73-93). Cambridge University Press.

- Peruzzi, S., Varsamos, S., Chatain, B., Fauvel, C., Menu, B., Falguière, J.-C., Sévère, A. & Flik, G. (2005). Haematological and physiological characteristics of diploid and triploid sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *Aquaculture*, 244(1), 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2004.11.028>
- Pickering, A. D. (1993). Growth and stress in fish production. *Aquaculture*, 111(1), 51-63. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(93\)90024-S](https://doi.org/10.1016/0044-8486(93)90024-S)
- Pickering, A. D. & Pottinger, T. G. (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1), 253-258. <https://doi.org/10.1007/BF00004714>
- Pottinger, T. G. (1998). Changes in blood cortisol, glucose and lactate in carp retained in anglers' keepnets. *Journal of Fish Biology*, 53(4), 728-742. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.1998.tb01828.x>
- Redding, J. M. & Schreck, C. B. (1983). Influence of ambient salinity on osmoregulation and cortisol concentration in yearling Coho Salmon during Stress. *Transactions of the American Fisheries Society*, 112(6), 800-807. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1983\)112](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1983)112)
- Richardsen, R., Myhre, M. S. & Tyholt, I. L. (2019). *Nasjonal betydning av sjømatnæringen*. SINTEF.
- Rodrigues, E., Feijó-Oliveira, M., Suda, C. N. K., Vani, G. S., Donatti, L., Rodrigues, E. & Lavrado, H. P. (2015). Metabolic responses of the Antarctic fishes *Notothenia rossii* and *Notothenia coriiceps* to sewage pollution. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5), 1205-1220. <https://doi.org/10.1007/s10695-015-0080-7>
- Rose, J. D. (2002). The neurobehavioral nature of fishes and the question of awareness and pain. *Reviews in Fisheries Science*, 10(1), 1-38. <https://doi.org/10.1080/20026491051668>
- Ruane, N. M., Huisman, E. A. & Komen, J. (2002). The influence of feeding history on the acute stress response of common carp (*Cyprinus carpio*). *Aquaculture*, 210(1), 245-257. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(01\)00819-5](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(01)00819-5)
- Sakamoto, T. & McCormick, S. D. (2006). Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology*, 147(1), 24-30. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.10.008>
- Schreck, C. B. (2010). Stress and fish reproduction: The roles of allostasis and hormesis. *General and Comparative Endocrinology*, 165(3), 549-556. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2009.07.004>
- Schreck, C. B. & Tort, L. (2016). 1 - The Concept of Stress in Fish. I C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell & C. J. Brauner (Red.), *Fish physiology* (Bd. 35, s. 1-34). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00001-1>
- Selye, H. (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1(4667), 1383-1392. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.4667.1383>
- Selye, H. (1973). Homeostasis and Heterostasis. *Perspectives in Biology and Medicine*, 16(3), 441-445.
- Shabani, F., Erikson, U., Beli, E. & Rexhepi, A. (2016). Live transport of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) and subsequent live storage in market: Water quality, stress and welfare considerations. *Aquaculture*, 453, 110-115. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.11.040>
- Skretting. (u.å.). Verdt å vite om sår og skinn; Sår, småskader og skjelltap. Hentet 3. mars 2021 fra <https://www.skretting.com/nb-NO/arkiv/om-sar-og-skinn/>
- Small, B. C. (2004). Effect of dietary cortisol administration on growth and reproductive success of channel catfish. *Journal of Fish Biology*, 64(3), 589-596. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8649.2004.00322.x>

- Sneddon, L. U. (2011). Cognition and welfare. *Fish cognition and behavior*, 2, 405-434.
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1987). *Introduction to biostatistics* (2. utg.). Dover publications.
- Sopinka, N. M., Donaldson, M. R., O'Connor, C. M., Suski, C. D. & Cooke, S. J. (2016). 11 - Stress Indicators in Fish. I C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell & C. J. Brauner (Red.), *Fish Physiology* (Bd. 35, s. 405-462). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00011-4>
- Staurnes, M., Sigholt, T., Pedersen, H. P. & Rustad, T. (1994). Physiological effects of simulated high-density transport of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Aquaculture*, 119(4), 381-391. [https://doi.org/10.1016/0044-8486\(94\)90302-6](https://doi.org/10.1016/0044-8486(94)90302-6)
- Staurnes, M., Sigholt, T. & Reite, O. B. (1992). Smoltifisering. I K. Døving, & E. Reimers (Red.), *Fiskens fysiologi* (s. 308-317). John Grieg Forlag.
- Stien, L. H., Bracke, M. B. M., Folkedal, O., Nilsson, J., Oppedal, F., Torgersen, T., Kittilsen, S., Midtlyng, P. J., Vindas, M. A., Øverli, Ø. & Kristiansen, T. S. (2013). Salmon Welfare Index Model (SWIM 1.0): a semantic model for overall welfare assessment of caged Atlantic salmon: review of the selected welfare indicators and model presentation. *Reviews in Aquaculture*, 5(1), 33-57. <https://doi.org/10.1111/j.1753-5131.2012.01083.x>
- Sumpter, J. P., Dye, H. M. & Benfey, T. J. (1986). The effects of stress on plasma ACTH, alpha-MSH, and cortisol levels in salmonid fishes. *General and Comparative Endocrinology*, 62(3), 377-385. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(86\)90047-x](https://doi.org/10.1016/0016-6480(86)90047-x)
- Suski, C. D., Cooke, S. J., Danylchuk, A. J., O'Connor, C. M., Gravel, M.-A., Redpath, T., Hanson, K. C., Gingerich, A. J., Murchie, K. J., Danylchuk, S. E., Koppelman, J. B. & Goldberg, T. L. (2007). Physiological disturbance and recovery dynamics of bonefish (*Albula vulpes*), a tropical marine fish, in response to variable exercise and exposure to air. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 148(3), 664-673. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2007.08.018>
- Svartdal, F. (19.09.2019). Bevissthet (psykologi). snl.no. Hentet 9. april fra https://snl.no/bevissthet_-_psykologi
- Sveen, L. R., Timmerhaus, G., Krasnov, A., Takle, H., Stefansson, S. O., Handeland, S. O. & Ytteborg, E. (2018). High fish density delays wound healing in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Scientific Reports*, 8(1), 16907. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35002-5>
- Svendsen, E., Fore, M., Okland, F., Grans, A., Hedger, R. D., Alfredsen, J. A., Uglem, I., Rosten, C. M., Frank, K., Erikson, U. & Finstad, B. (2021). Heart rate and swimming activity as stress indicators for Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 531, Artikkel 735804. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2020.735804>
- Tort, L. (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and comparative immunology*, 35(12), 1366-1375. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2011.07.002>
- Tort, L., Balasch, J. & Mackenzie, S. (2003). Fish immune system. A crossroads between innate and adaptive responses. *Immunologia*, 22 (3), pp. 277-286.
- Trischitta, F., Denaro, M. G. & Faggio, C. (2005). Cell volume regulation following hypotonic stress in the intestine of the eel, *Anguilla anguilla*, is Ca²⁺-dependent. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 140(3), 359-367. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.10.011>
- Van Heeswijk, J. C. F., Vianen, G. J. & van den Thillart, G. E. E. J. M. (2006). The adrenergic control of hepatic glucose and FFA metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Increased sensitivity to adrenergic stimulation with fasting. *General and Comparative Endocrinology*, 145(1), 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.07.001>

- Van Weerd, J. H. & Komen, J. (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 120(1), 107-112. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(98\)10017-X](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(98)10017-X)
- Vargas-Chacoff, L., Muñoz, J. L. P., Hawes, C., Oyarzún, R., Pontigo, J. P., Saravia, J., González, M. P., Mardones, O., Labbé, B. S., Morera, F. J., Bertrán, C., Pino, J., Wadsworth, S. & Yáñez, A. (2017). Ectoparasite *Caligus rogercresseyi* modifies the lactate response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) and Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Veterinary Parasitology*, 243, 6-11. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.05.031>
- Vijayan, M. M. & Leatherland, J. F. (1990). High stocking density affects cortisol secretion and tissue distribution in brook charr, *Salvelinus fontinalis*. *Journal of Endocrinology*, 124(2), 311-318. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1240311>
- Vijayan, M. M., Neelakanteswar, A. & Leatherland, J. F. (2010). Stress response and the role of cortisol. I J. F. Leatherland & P. T. K. Woo (Red.), *Fish Diseases and Disorders* (2. utg., Bd. 2, s. 182-201). CABI.
- Wells, R. M. G. & Pankhurst, N. W. (1999). Evaluation of simple instruments for the measurement of blood glucose and lactate, and plasma protein as stress indicators in fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(2), 276-284. <https://doi.org/10.1111/j.1749-7345.1999.tb00876.x>
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77(3), 591-625. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.3.591>
- Wendelaar Bonga, S. E. (2011). Hormonal responses to stress | Hormone response to stress. I A. P. Farrell (Red.), *Encyclopedia of Fish Physiology* (s. 1515-1523). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374553-8.00183-0>
- Wendelaar Bonga, S. E. & Flik, G. (1993). Calcium regulation in fish. I B. Lahlou; & P. Vitiello (Red.), *Aquaculture : fundamental and applied research* (s. 47-60).
- Winfree, R. A., Kindschi, G. A. & Shaw, H. T. (1998). Elevated water temperature, crowding, and food deprivation accelerate fin erosion in juvenile steelhead. *The Progressive Fish-Culturist*, 60(3), 192-199. [https://doi.org/10.1577/1548-8640\(1998\)060](https://doi.org/10.1577/1548-8640(1998)060)
- Yada, T. & Tort, L. (2016). 10 - Stress and disease resistance: Immune system and immunoendocrine interactions. I C. B. Schreck, L. Tort, A. P. Farrell & C. J. Brauner (Red.), *Fish physiology* (Bd. 35, s. 365-403). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802728-8.00010-2>
- Zwollo, P. (2018). The humoral immune system of anadromous fish. *Developmental & Comparative Immunology*, 80, 24-33. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2016.12.008>
- Aarnes, H. (2003). *Fysiologi hos dyr og mennesker* (2007/2012. utg.). <https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/zoologi/immun.pdf>