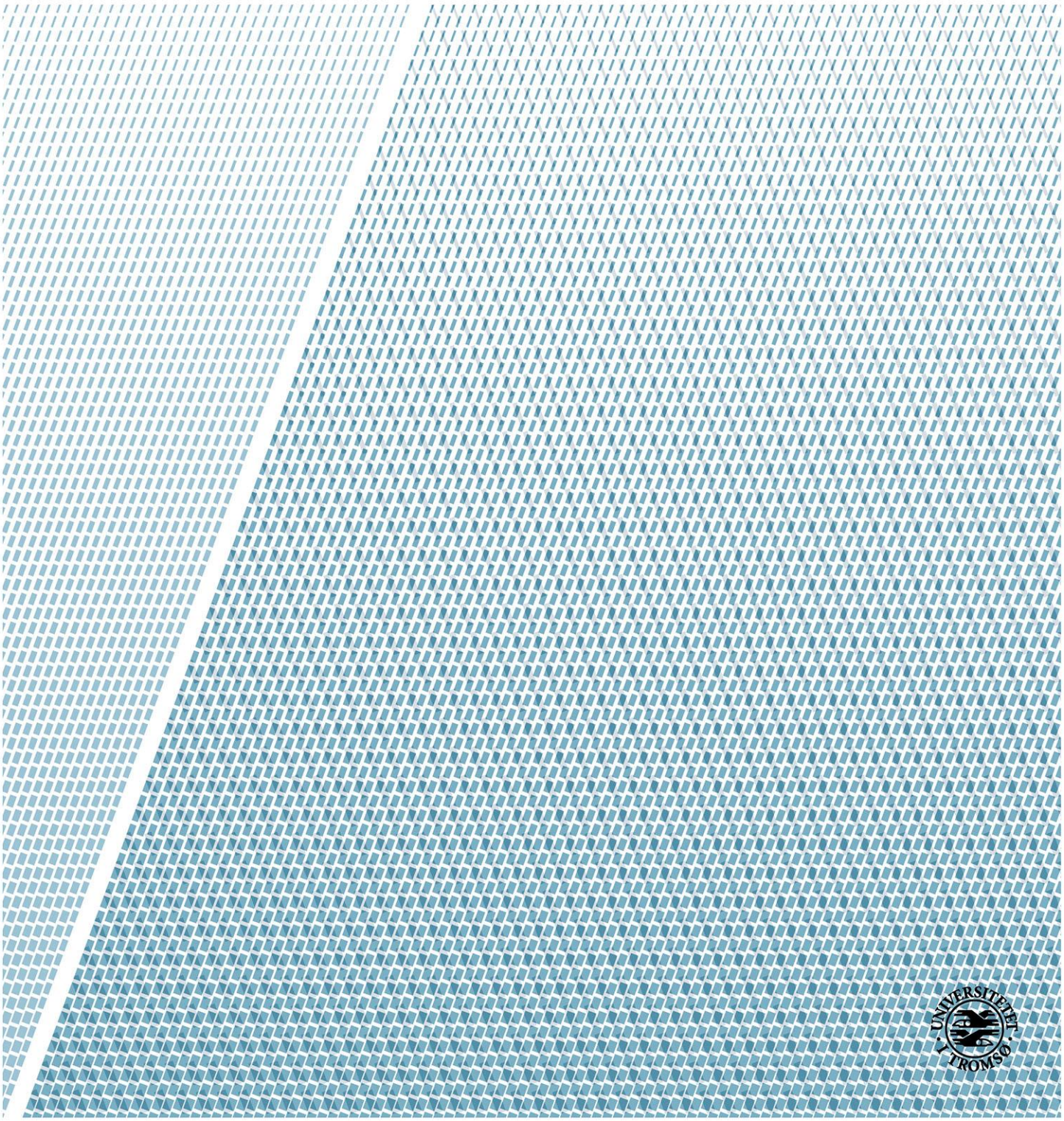
UiT
NORGES
ARKTISKE
UNIVERSITET

Fakultet for biovitenskap, fiskeri og økonomi - Norges fiskerihøgskole

Effekter av embryonal stressbelastning på utvikling av smoltegenskaper hos Atlantisk laks (*Salmo salar*)

Lone Gustavsen

Mastergradsoppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap (60 stp)
Studieretning: Havbruk
Februar 2015



Forord

Nå som jeg er kommet så langt, føler jeg at det er mange som jeg bør takkes for at jeg lyktes med å oppnå en mastergrad.

Først av alle vil jeg takke familien min; mamma du har vært en god støttespiller for meg gjennom studietiden min og uten deg hadde jeg hatt en betydelig tyngre hverdag. Sofie du har vært utrolig forståelsesfull ☺ Er utrolig glad i deg ☺ Pappa for at du alltid forteller meg hvor viktig det er å bli ferdig på det man har begynt. Charlotte for hjelp både hjemme og på lab. Takk til mine venner som alltid er der ☺ Dere vet hvem dere er ☺ Glad i dere alle sammen ☺

Har vært så heldig å få jobbe med tre hyggelige veiledere som har fått meg til å føle at dette går bra uansett hvor langt unna lyset i tunellen var. Takk til min hovedveileder Helge Johnsen for at du fikk meg igjennom siste etappe med smilet i behold og ikke mistet motet over "lasken". Takk Even for all hjelp og ikke minst at jeg fikk være med på en fantastisk opplevelse i Skottland på ICBF2014. Takk til Helge Tveiten for god humor og god hjelp på lab. For å ikke glemme Jo Espen Tau Strand for at du hjalp meg med analyser.

Det har vært hyggelig å ha kontor på AMB, studentene og professorene der opp gjør det hyggelig å komme på kontoret. Charlotte og Vegard som har vært med og hjulpet med nesten alt det praktisk med oppgaven min, dere er flinke og jeg setter pris på dere ☺

Takk til Skretting**,** KOMETEN (Nord-Norges forskingsfond) og Troms sparebanklags stipend for støtte til analyser og konferanse.

Tromsø 15. februar

Lone Gustavsen

Sammendrag

I følge Havforskningsinstituttets risikovurdering for norsk fiskeoppdrett 2013 dør nesten 20 % av all smolt som blir satt ut i havet i Norge i perioden fram til slaktemoden størrelse. Dette representerer store tap av verdier for havbruk industrien. Hensikten med mitt forsøk var derfor å studere hvorvidt kulde- og håndteringsstress påført i en tidlig fase (på egg- og plommesekkstadium) hadde en effekt på HPI-aksens integritet og derved på utviklingen av smoltegenskaper hos Atlantisk laks. HPI-aksen er en viktig mekanisme under smoltifisering av Atlantisk laks, om HPI-aksen er dysfunksjonell kan dette resultere i dårlig smoltkvalitet og i fall høy dødelighet og dårlig dyrevelferd. Dette ble gjort ved å måle plasmanivå av kortisol og utvikling av Na^+/K^+-ATPase-aktivitet (NKA) i gjellene under smoltifisering av Atlantisk laks fra AquaGen-stammen. I tillegg ble det gjort en vurdering av hypoosmoregulatorisk kapasitet gjennom målinger av plasma-klorid og plasma-osmolaritet hos fisk som ble regelmessig eksponert til standard sjøvannstester under smoltifiseringsfasen. Jeg fant ut at tidlig stress (i embryogenesen) kan påvirke den temporale utviklingen av NKA og kortisol under smoltifisering hos Atlantisk laks, og at dette kunne være av epigenetisk karakter. Jeg kunne imidlertid ikke avsløre noen positiv sammenheng mellom kortisol og NKA eller noen åpenbare effekter av stressbehandlingene på utviklingen av sjøvannstoleranse gjennom forsøket.

Nøkkelord: Atlantisk laks, *Salmo salar*, Na^+/K^+-ATPase, smoltifisering, kortisol, egpigenetikk

Innhold

1.0 Innledning 1
1.1 Smoltifisering 2
1.2 Kloridcellens funksjon 3
1.2 Endokrin regulering av smoltifisering 5
1.2.1 HPI-aksen 7
1.3 Utvikling av HPI-aksen under embryogenesen 8
1.4 Hensikt 9
2.0 Materiale og Metoder 11
2.1 Fisk og forsøksfasiliteter 11
2.2 Stressbehandling på egg- og plommesekkstadium 11
2.3 Hold av fisk 12
2.4 Prøvetaking 12
2.3 Analyser 14
2.3.1 Osmolaritet og kloridkonsentrasjon i plasma 14
2.3.2 Kortisol 14
2.3.3 Na^+/K^+-ATPase-aktivitet i gjellene 15
2.4 Utregninger 17
2.5 Statistikk 18
3.0 Resultater 19
3.1 Vekt, lengde og kondisjonsfaktor hos fisk samplet i ferskvann 19
3.2 Kortisol 22
3.3 Na^+/K^+-ATPase-aktivitet i gjellevev 24
3.3 Plasma osmolaritet og klorid 24
3.4 Sammenhenger mellom NKA og kortisol/klorid/osmolaritet 27
4.0 Diskusjon 30
4.1 Utvikling av lengde, vekt og kondisjonsfaktor 30
4.2 Utvikling av sjøvannstoleranse og smoltparametere 31
4.3 Mulige epigenetiske effekter av stressbehandlingen 35
4.4 Konklusjoner 38
5.0 Referanser 39

Appendiks 1 Kortisol; utstyr, fremgangsmåte og kjemikalier 44
Appendiks 2: Na^+/K^+-ATPase Kjemikalier 46
Appendiks 3: Statistikk vekt og lengde SWT 48
Appendiks 4: Statistikk vekt, lengde og kondisjonsfaktor FW 51
Appendiks 5: Statistikk osmolaritet og Cl^- 60
Appendiks 6: Statistikk for Na^+/K^+-ATPase og Kortisol 66
Appendiks 7: Korrelasjon kortisol og NKA 72

1.0 Innledning

Oppdrett av laksefisk i Norge er ei viktig næring og bidrar til stor verdiskapning langs hele kysten. Ved utgangen av 2013 var det bevilget totalt 959 konsesjoner for matfisk og 259 konsesjoner for settefisk. Dette inkluderer arter som Atlantisk laks (*Salmo salar* L.), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss* W.), ørret (*Salmo trutta* L.) og Arktisk røye (*Salvelinus alpinus* L.), der oppdrett av Atlantisk laks utgjør størstedelen av de konsesjoner som er aktive i dag ("Fiskeridirektoratet").

Norsk oppdrett av Atlantisk laks har opplevd en rivende utvikling siden oppstarten på 1970-tallet og må i dag betraktes som en kunnskapsbasert næring. På tross av dette sliter næringen med til dels betydelig dødelighet hos smolt etter utsetting i sjø, og det spekuleres i at denne dødeligheten i stor grad kan være forårsaket av redusert kvalitet på smolten. Havforskningsinstituttets risikovurdering for norsk fiskeoppdrett 2013 (Asplin *et al*. 2012) opplyser at nesten 20 % av all smolt som blir satt ut i havet i Norge dør i perioden fram til slaktemoden størrelse, og at 1 av 6 lokaliteter har over 11 % dødelighet etter 6 måneders produksjon i sjøen. Dette representerer en verdi på rundt 8 milliarder kroner som går tapt i løpet av en produksjonssyklus i norsk oppdrett av Atlantisk laks.

Det meste av rogn som brukes i norsk oppdrett av Atlantisk laks produseres av to store eggprodusenter. Rogna distribueres fra produsentene til ulike settefiskanlegg når de har nådd øyerognstadiet (dvs. under embryogenesen) og utviklingen av eggene fullføres i settefiskanleggene. Før rogna distribueres til settefiskanleggene blir den "sjokket", dvs. utsatt for en mekanisk belastning som gjør at svake egg dør og kan kasseres. Ved forsendelse blir øyerogna overført fra inkuberingstemperatur (ca. 9^{o}C) til is (0^{o}C) og holdt på is frem til settefiskprodusenten mottar rogna. Lite er kjent om hvorvidt dette

representereren stressbelastning som kan påvirke embryonalutviklingen, men forskning både på pattedyr og fisk antyder at utviklingen av embryoet kan påvirkes om det utsettes for stress og at dette kan ha betydning for hvordan fisken handterer utfordringer senere i livet (se nedenfor).

1.1 Smoltifisering

Atlantisk laks er en anadrom fisk, det vil si at den gyter og har yngelstadiet sitt i ferskvann og lever store deler av livet i saltvann. Prosessen hvor laksen transformeres fra en ferskvannsfisk til saltvannsfisk kalles smoltifisering og er en synkronisert morfologisk, fysiologisk og atferdsmessig transformering (Hoar 1988, McCormick & Saunders 1987). Smoltifisering hos lakseunger i naturen skjer som regel når laksen har nådd en størrelse på 11-15 cm. Laksefisken går da fra å være en bunnlevende territoriell parr som holder posisjon i vannstrømmen til å bli en pelagisk fisk som svømmer med vannstrømmen ned elven og ut i havet på våren (Staurnes *et al*.1992). Laksen smoltifiserer etter 1 til 8 år i oppvekstelva, avhengig av breddegrad (Metcalfe *et al*. 1989). Prosessen styres av endogene årsrytmer (circannualske rytmer) som synkroniseres av endringer i fotoperiode (daglengde) slik at fisken er fullstendig smoltifisert (fysiologisk "smoltvindu") når utvandringen skjer. Selve utvandringen er antatt å skje på et tidspunkt som er optimalt for arten i forhold til sjansen for å overleve og ta til seg føde når den forlater elven og vandrer ut i sjøen (det økologiske "smoltvinduet") (Heggberget *et al*. 1992).

I dagens lakseoppdrett produseres det smolt under ett år (0+) og smolt over ett år (1+). Smolten settes ut i saltvann på forskjellige tider av året, vanligvis vår (1+) eller høst (0+) (Lysfjord *et al*. 2004). Produsenten oppnår på denne måten en jevnere produksjon med slakting og levering året rundt.

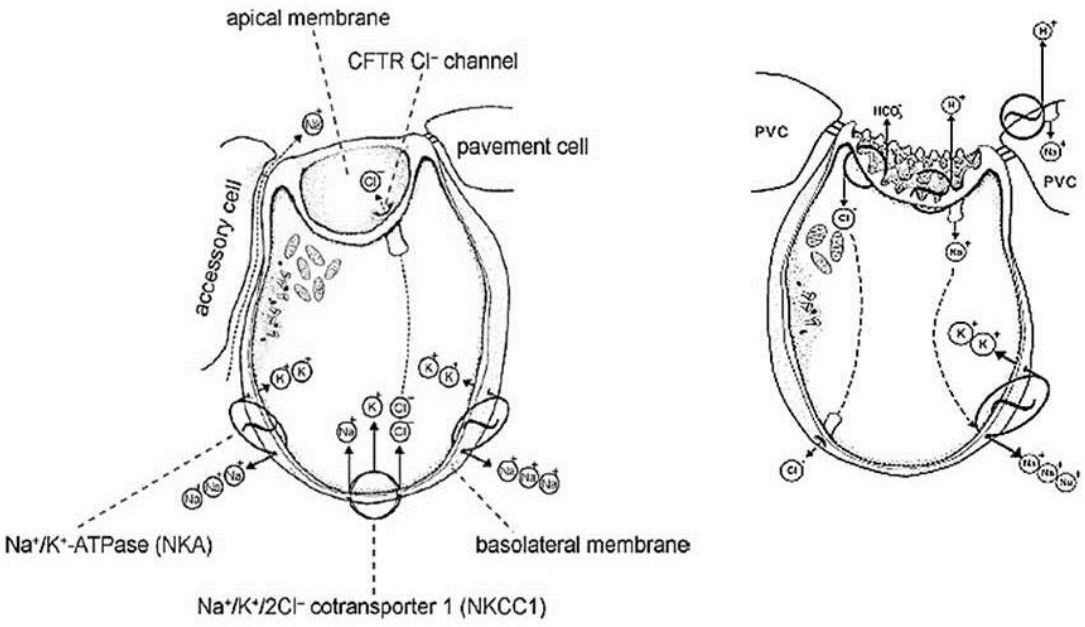
Det brukes lysregimer for å manipulere laksen på en slik måte en kan produsere 0+ smolt. Lakseparren har først en tilvekstperiode under kontinuerlig lys til den blir regnet som stor nok til å kunne smoltifisere (vanligvis større enn 20 g). Etter dette blir fisken satt på en simulert vinter ved hjelp av lysstyring (for eksempel 16 timer mørke og 8 timer lys) i ca. 6 uker før den eksponeres til en simulert sommer med kontinuerlig lys (enten som følge av direkte endring til 24 timers lys eller ved å øke daglengden gradvis til 24 timer lys over flere dager). Noen produsenter har fisken på naturlig lys frem til 4-6 uker før sjøsetting, hvoretter den eksponeres til kontinuerlig lys (Stefansson *et al*. 2005). Det kreves ca. 400 døgngrader (antall dager x gjennomsnittlig vanntemperatur) med "sommerstimulus" for å fullføre smoltifisering (Sigholt *et al*. 1998)

1.2 Kloridcellens funksjon

Når smolten vandrer ut i sjøen må den tilpasse seg fra å osmoregulere i ferskvann til å osmoregulere i saltvann. I ferskvann er laksen hyperosmotisk i forhold til vannet og må ta opp ioner, mens den i saltvann er hypoosmotisk i forhold til vannet og må aktivt skille ut ioner. Det skjer derfor forandringer i flere organer (gjelle, nyre, tarm) som er med på å regulere ione- og væskebalansen. Transport av ioner utføres primært av spesialiserte kloridceller på de primære gjellefilamentene (Handeland *et al*. 2000, Seidelin & Madsen 1999).

I ferskvann har fisken et passivt tap av monovalente ioner og et passivt opptak av vann over gjellene, samtidig som det skjer et aktivt opptak av Na^+ og Cl^- i gjellene (Figur 1). Opptak av Na^+ i ferskvann er koblet mot en protonpumpe, der H^+ blir transportert ut i vannet og Na^+ blir transportert inn i kloridcellen gjennom den apikale membranen (Evans *et al*. 2005). Det er også informasjon om at det er opptak av Na^+ gjennom såkalte pavement-celler (PVC), også her ved hjelp av en

protonpumpe (Evans *et al*. 2005, McCormick 2001). Opptak av Cl^- skjer ved hjelp av et bytte mot HCO_3^- gjennom den apikale membranen av kloridcellen.



Figur 1. Skjematisk fremstilling av kloridceller i sjøvann (til venstre) og ferskvann (til høyre) (McCormick 2001).

Na^+ forlater cellen og transporteres inn i plasma ved hjelp av Na^+/K^+-ATPase (NKA) lokalisert i den basolaterale membranen av kloridcellen. Det er også en generell oppfatning at Cl^- forlater kloridcellen ved hjelp av "cystic fibrosis transmenbrane regulator" (CFTR) i den basolaterale membranen. CFTR er også antatt å befinne seg på den basolaterale overflaten til PVC. Mellon PVC og kloridcellen er det såkalte "tight junctions" som sørger for at området er ugjennomtrengelig for ioner (Evans *et al*. 2005).

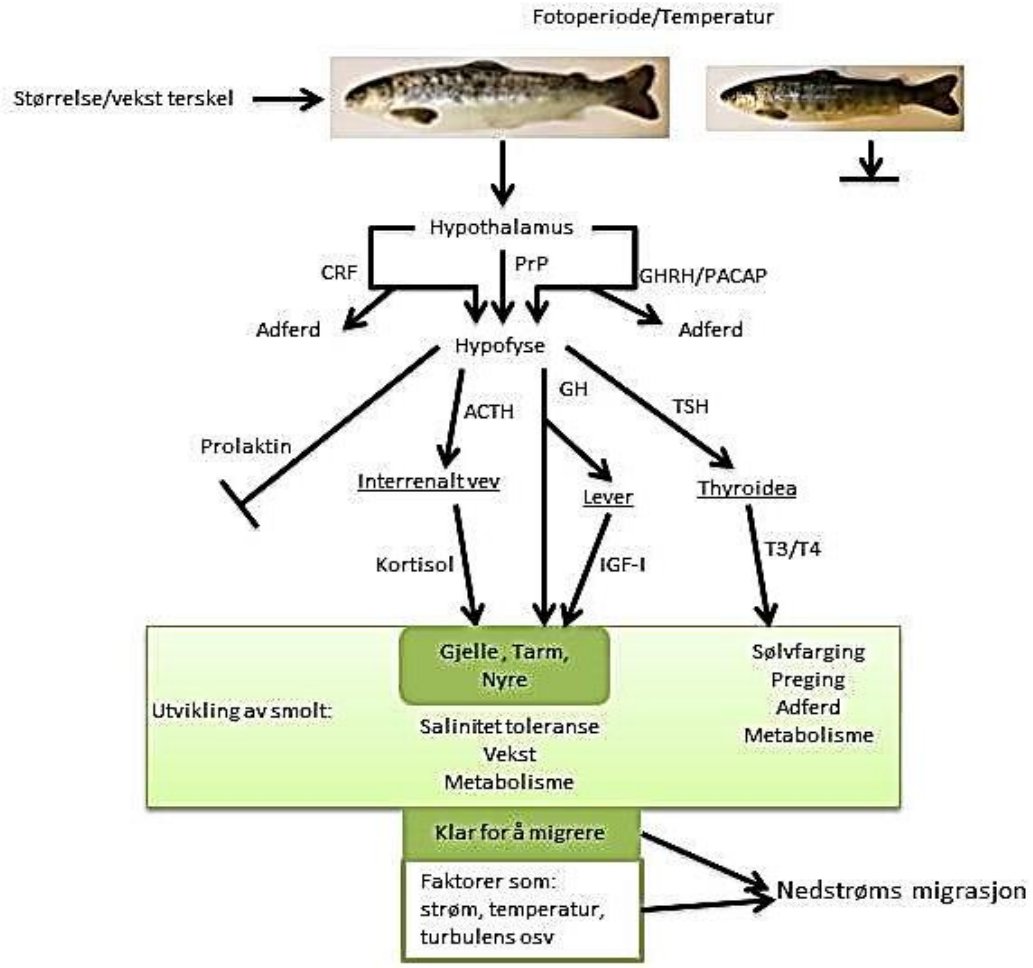
Når laksen kommer i kontakt med sjøvann vil osmolariteten i blodet øke med ca. 30 % (Bone & Moore 2008). I saltvann drikker fisken sjøvann og Na^+ og Cl^- blir tatt opp i tarm (sammen med vann) i tillegg til at det diffunderer inn over gjeller.

Kloridcellen i saltvann annerledes enn i ferskvann. CFTR er plassert i den apikale membranen og transporterer Cl^- ut av cellen ved hjelp av en elektrokjemisk gradient (cellen er negativ i forhold til saltvann). Cl^- som skilles ut transporteres inn i kloridcellen via $Na^+/K^+,2Cl^-$ co-transporter (NKCC1), som er en transportmekanisme hvor Cl^- er koplet til opptak av Na^+ og K^+ på den basolaterale siden av cellen. K^+ blir resirkulert tilbake til plasma via en K^+ kanal, mens Na^+ transporteres tilbake til plasma ved hjelp av NKA. Utskillelse av Na^+ fra fisken til sjøvannet foregår via såkalte "leaky junctions" mellom kloridcellen og en tilstøtende "pavement-celle", og er antatt å være en passiv prosess som drives av en elektrokjemisk gradient mellom plasma og sjøvannet (transepitelialt potensiale) der plasma er positivt ladet i forhold til sjøvannet. (Evans *et al*. 2005). Under smoltifiseringen skjer det en markert økning i NKA og aktiviteten av dette enzymet benyttes ofte som en indikator på status hos lakseparr som gjennomgår smoltifisering (Hoar 1988).

1.2 Endokrin regulering av smoltifisering

Smoltifisering er en prosess som reguleres av en rekke hormoner med ulike funksjoner (McCormick *et al*. 2013). Hormonene påvirker laksefiskens evne til å bli preget (sensitiv læring hvor laksefisken lærer seg å kjenne igjen den kjemiske lukten av elven den er klekket i), evne til å osmoregulere i sjøvann, morfologi og migrasjonsadferd. Det er mange prosesser som skal samhandle for at smoltifiseringen skal bli vellykket (Figur 2).

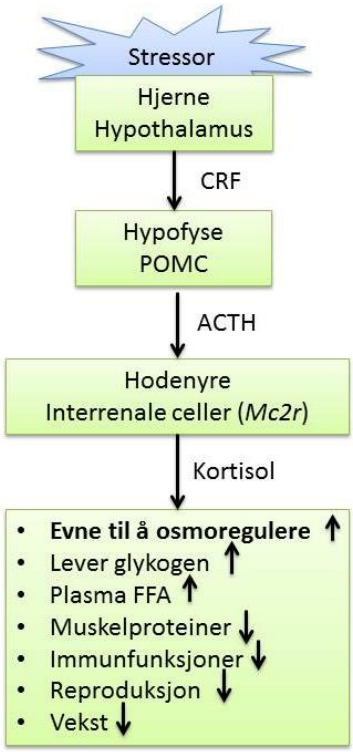
Veksthormon (GH) er første hormonet som øker i plasma under smoltifisering etterfulgt av kortisol. Sammen har disse to hormonene synergistisk virkning på utvikling av saltsekrerende kloridceller (såkalte α-kloridceller) (McCormick *et al*. 2013). Kortisol bidrar til energimobilisering og stimulering av ionepumpenes aktivitet (NKA, NKCC1 og CFTR) (McCormick *et al*. 2000).



Figur 2. Skjematisk fremstilling av neuroendokrin kontroll av smoltifisering (modifisert fra McCormick 2013). Frigjøringshormoner fra hypothalamus (CRF, PrP, GHRH/PACAP) regulerer sekresjonen av hormoner fra hypofysen (prolaktin, ACTH, GH, TSH), som igjen kontrollerer andre endokrine organer eller påvirker målorganene direkte (Heggberget *et al*. 1992)

1.2.1 HPI-aksen

Hypothalamus/hypofyse/interrenal-aksen (HPI-aksen) er en endokrin akse som mobiliseres når fisken utsettes for stressorer (Figur 3). Som en respons på stressorer produserer hypothalamus "corticotropin releasing factor" (CRF) som går via neuroner til hypofysen og stimulerer til produksjon av "pro-opiomelanocortin" (POMC). POMC-peptidene splittes og gir opphav til "adrenocorticotropic hormone" (ACTH). Dette hormonet blir transportert til hodenyren og binder seg til melanocortin-reseptorer i interrenalt vev hvor det stimulerer produksjon av kortisol. Kortisol er både et sentralt hormon i fiskens evne til å gi en adekvat respons på stress ved at det bl.a. bidrar til mobilisering av energi (Bonga 1997) og en viktig del av de endokrine mekanismene som regulerer smoltifisering hos laks (McCormick 2001).



Figur 3. Skjematisk og forenklet fremstilling av HPI-aksen hos teleoster. ↑ indikerer at en prosess blir stimulert og ↓ indikerer at en prosess blir inhibert. Modifisert etter Bonga (1997).

Stress er en fysiologisk respons på ytre eller indre stimuli (kalt stressorer) som truer individets homeostase (Chrousos 1998). Stressorer og stressresponser kan deles inn i akutt (sekunder til timer) og kronisk stress (uker, måneder). Fisk, i likhet med menneske, har normalt en velutviklet evne til å handtere akutt stress gjennom aktivering av HPI-aksen. Responsen er regnet som adaptiv for individet og er med på å allokere energi til gjenopprettelse av homeostase. For vill Atlantisk laks kan akutte stressorer for eksempel være forandring av topografi i elv, predatorer, sult, brå endringer i temperatur og vannkjemi (Dhabhar 2009). Hos oppdrettsfisk er vannkvalitet, etablering av sosiale hierarkier i fiskegruppen, brå temperaturendringer og handtering viktige stressorer (Barton *et al*. 2002). Kronisk stress er regnet som maladaptiv for individet ved at funksjoner som er mindre viktig for overlevelse på kort sikt (unngå predasjon, finne mat, sosiale interaksjoner, reproduksjon og immunforsvar) blir nedprioritert (Schreck 2010).

1.3 Utvikling av HPI-aksen under embryogenesen

Laksefisk har som andre teleoster kortisol av maternalt opphav i eggfasen. Det er først rundt klekking at det skjer en svak økning i endogent produsert kortisol som respons til stress (Barry *et al*. 1995). En helt moden HPI-akse og dermed en adekvat respons til stress er derfor ikke utviklet før etter absorbering av plommesekk (Li *et al*. 2010, Auperin & Geslin 2008, Barry *et al*. 1995). For mye kortisol i egget kan imidlertid påvirke hormonelle aksers funksjonalitet senere i livet (Li et al. 2010) og fiskens evne til å handtere utfordringer hvor disse har en avgjørende adaptiv funksjon i forbindelse med for eksempel stressbelastning og smoltifisering.

Hos pattedyr vet man at prenatalt stress kan påvirke embryoet på en slik måte at individets evne til å respondere på stress endres senere i livet (Xiong & Zhang 2013). Det er blant annet funnet at prenatalt stress kan forårsake reduksjon i mengden av både glucocorticoidreseptorer (GR) og melanokortinreseptorer (MR) i hjernen, og dermed forårsake både forlenget og økt stressrespons på grunn av manglende negativ feedback (Henry *et al*. 1994).

Prenatalt stress kan påvirke utviklingen av endokrine akser enten som en effekt av for høye eller for lave hormonnivåer direkte, eller gjennom epigenetiske mekanismer. Epigenetiske mekanismer, som utløses av miljøforhold, fører til endringer i epigenomet hvor uttrykket av gener kan endres gjennom blant annet methylering, slik at individets egenart på transkripsjonsnivå (og derved fenotype) endres (McCarrey 2012). Forandringene kan være både av permanent eller ikke-permanent karakter, og dersom den epigenetiske endringen skjer i en kjønnscelle kan den i tillegg være arvelig (Li & Leatherland 2013). Det er ikke kjent hvorvidt de effektene en til nå har sett ved prenatalt stress eller økt maternal kortisoldeponering i fiskeegg er av epigenetisk natur.

1.4 Hensikt

Auperin og Geslin (2008) oppdaget at stress på øyerognstadiet og ved klekking gir en signifikant lavere fysiologisk respons på stress og konkluderte med at stress under utviklingen av HPI-aksen har langvarige og muligens ugunstige effekter på fiskens evne til å håndtere stress senere i livet. I og med at HPI-aksen også spiller en viktig rolle under smoltifisering hos laksefisk, er det derfor interessant å spørre seg om en tidlig stressbelastning også kan påvirke utviklingen av kortisol-avhengige smoltegenskaper senere i livet. I denne

forbindelse vil kortisol knyttet til smoltutviklingen være å anse som en ikke-stress-relatert kortisolrespons.

Hensikten med mitt forsøk var derfor å studere hvorvidt kulde- og håndteringsstress påført i en tidlig fase (på egg- og plommesekkstadium) hadde en effekt på HPI-aksens integritet (kortisolrespons) og derved på utviklingen av smoltegenskaper hos Atlantisk laks. Dette ble gjort med å måle plasma kortisolnivåer og utvikling av NKA aktivitet i gjella under smoltifiseringen, samt utvikling av hypoosmoregulatorisk kapasitet gjennom regelmessige sjøvannstester under smoltifisering. I tillegg ble det gjort en vurdering av hypoosmoregulatorisk kapasitet gjennom målinger av plasma-klorid og plasma-osmolaritet hos fisk som ble regelmessig eksponert til standard sjøvannstester under smoltifiseringsfasen.

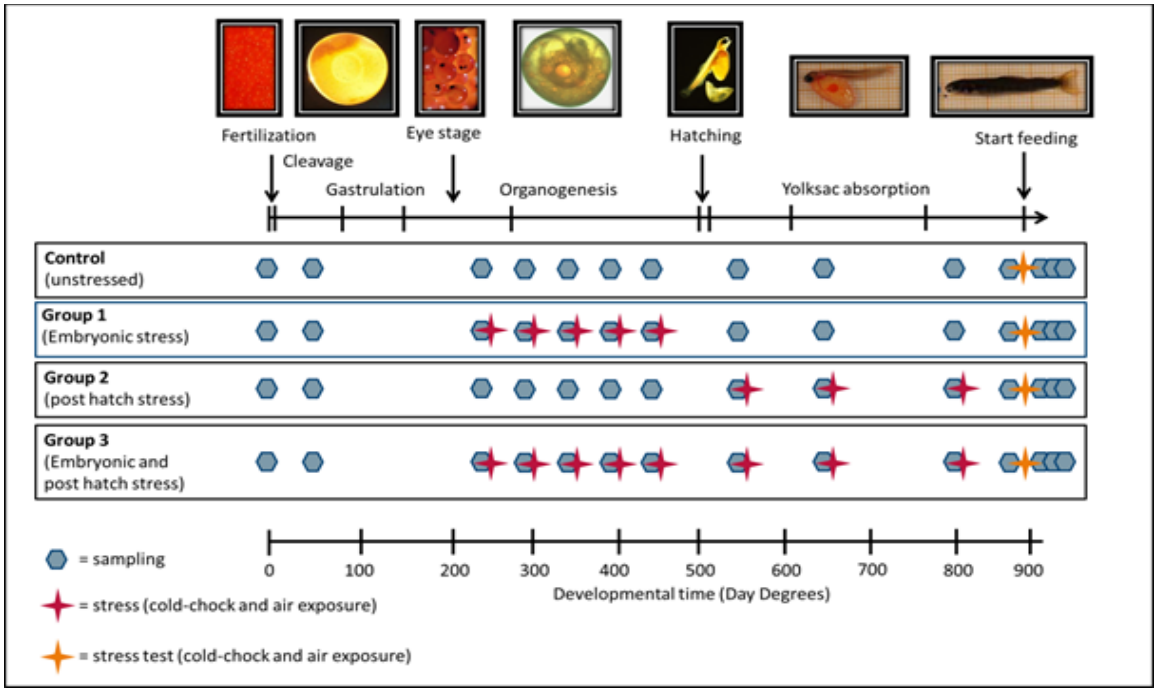
2.0 Materiale og Metoder

2.1 Fisk og forsøksfasiliteter

Forsøkene ble utført ved Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT) i perioden 29.01.2014 til 14.03.2014 med en helsøskengruppe av ca. 6 mnd. gammel lakseyngel av AquaGen-stammen. Fisken ble overtatt fra et Nofima-prosjekt, der fisken var påført kulde- og håndteringsstress på egg- og plommesekkstadiet (Figur 4).

2.2 Stressbehandling på egg- og plommesekkstadium

Det var fire ulike behandlingsgrupper (2 duplikater for hver behandlingsgruppe), fordelt på 8 kar (500 liter) som ble eksponert for en stressbelastning som bestod av et minutt kuldesjokk og et minutt luftekspONering (Figur 4). En gruppe egg ble



Figur 4**.** Skjematisk fremstilling av stressbehandlingen av lakseegg, og den funksjonelle stresstesten gjort på startfôringsyngel. Figuren angir også de ulike stadiene av eggutviklingen og utviklingstid i døgngrader.

stresset 5 ganger før klekking (behandlinggruppe 1), en gruppe ble stresset 3 ganger etter klekking (behandlingsgruppe 2) og en gruppe ble stresset åtte ganger både før og etter klekking (behandlingsgruppe 3). I tillegg ble en siste gruppe holdt ustresset gjennom hele forsøket (kontrollgruppe). Behandlingene induserte ingen dødelighet i noen av gruppene (pers. med. Helge Tveiten, Nofima).

2.3 Hold av fisk

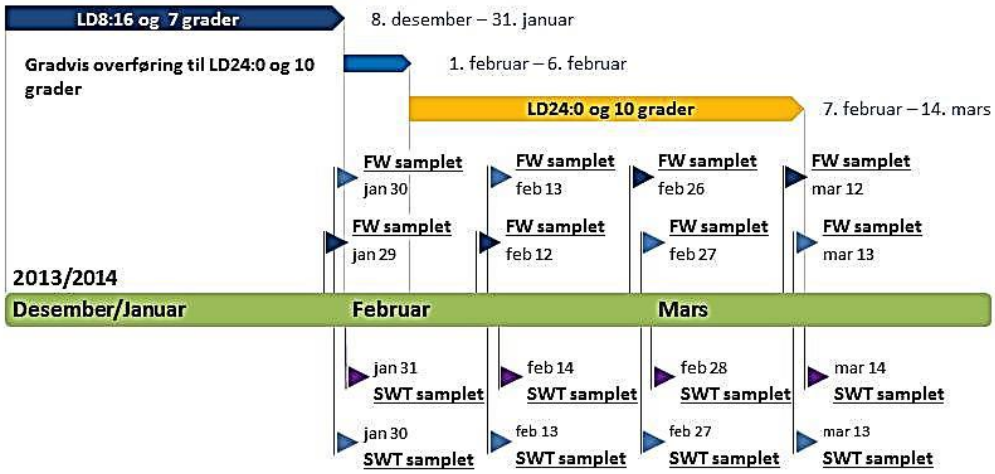
Etter klekking ble yngelen overført til Landanlegget ved HiT (23. april, 2013) og holdt ved 7°C og kontinuerlig lys (LD 24:0). Fra startfôring ble igangsatt (2. mai, 2013) og frem til forsøksstart ble fisken holdt på 10°C, kontinuerlig lys og fôret i overskudd etter tabell (Skretting AS). Dødeligheten gjennom startfôringen var mindre enn 1 % og ikke forskjellig mellom behandlingsgruppene (pers. med. Helge Tveiten, Nofima).

Åtte uker for forsøksstart (8. desember, 2013) ble daglengden endret fra kontinuerlig lys til kort dag (LD 8:16) for å gi fisken et vinterstimulus før langdagsbehandling (LD 24:0) og igangsetting av smoltifiseringen ved forsøksstart.

2.4 Prøvetaking

Vi samplet seks individer fra hvert duplikat for fisk som ble holdt i ferskvann og 10 fisk fra hvert duplikat for fisk eksponert til en sjøvannstest (SWT). For prøvetaking, lys og temperatur se Figur 5. En standard 24 timers SWT ble brukt for å vurdere utviklingen av fiskens sjøvannstoleranse gjennom forsøksperioden.

Før prøvetaking ble fisken avlivet med en overdose benzocain (200 ppm). Etter avliving ble det først foretatt måling av vekt (g) ved hjelp av en Mettler IF MultiRange Scale og lengde (gaffellengde, mm) ved hjelp av målebrett. Blodprøver ble tatt av både FW og SWT fisk. Det ble deretter tatt blodprøver fra de kaudale blodårene ved hjelp av 2 ml lithium-heparinisерte (34 IU) Vaccutainer®-rør. Plasma ble deretter separert ved hjelp av sentrifuge (Sorvall RC 5B Plus, 5000 rpm i 10min), overført til eppendorfrør og fryst ned på -80°C i påvente av senere analyser.



Figur 5. Skjematisk fremstilling av prøvetaking, lys og temperatur under forsøket. FW; ferskvann, SWT; sjøvannstest.

Det ble i tillegg tatt en vevsprøve fra gjelle hos fisken holdt på ferskvann for analyse av aktivitet av NKA. Det ble også tatt vevsprøve av hodenyre, hypofyse og hjerne og gjelle for fremtidige analyser som ikke inngår i mitt prosjekt.

2.3 Analyser

2.3.1 Osmolaritet og kloridkonsentrasjon i plasma

Osmolaritet i plasma ble målt ved hjelp av et FISKE One-Ten Osmometer. Instrumentet registrerer temperatur i en væskeprøve (15 µl) under frysing/tining og beregner osmolariteten til denne væsken basert på sammenhengen mellom osmolaritet og frysepunkt/smeltepunkt. Det ble foretatt minst 2 målinger for hver plasmaprøve, og mellom hver tiende prøve ble det brukt 15 µl standard (290 $mOsm \cdot l^{-1}$) for kontroll av instrumentet. Om det var avvik over 3 $mOsm \cdot l^{-1}$ når prøver ble målt, ble prøven analysert på nytt.

Det ble brukt en Corning 925 Chloride Analyzer for å analysere Cl^--konsentrasjon i plasma. Instrumentet titrerer klorid-ioner ved hjelp av en kjent, konstant strøm mellom to sølvelektroder som avgir protoner. Under analysen vil Cl^- binde seg med Ag^+ og danne AgCl. Når dette skjer vil maskinen registrere endringer i ledningsevne i løsningen (eddiksyre) og avlesningen stopper. Instrumentet ble klargjort for hver analyserunde ved tilsetning av 2 x 20 µl standard på (100 $mmol \cdot l^{-1}$ Cl^-) i bufferen. Det ble foretatt minst 2 målinger for hver plasmaprøve. Dersom analysene hadde et avvik på mer enn 3 $mmol \cdot l^{-1}$, ble det gjort en ny analyse av prøven. Også her ble instrumentet kontrollert mellom hver tiende prøve ved hjelp av en standard (100 $mmol \cdot l^{-1}$ Cl^-).

2.3.2 Kortisol

Plasmaverdier for kortisol ble analysert ved hjelp av radioimmunoassay (RIA) etter en etablert protokoll (Schulz 1985). Prinsippet for analysen er at man bruker en kjent mengde antigen (Ag, i dette tilfelle kortisol) merket med tritium (^3H), en ukjent mengde antigen (kortisol fra prøver) og en begrenset mengde

antistoff fra kanin (F1 - C46NP, 01.07.2002). Den ukjente mengden kortisol vil konkurrere med den kjente mengden kortisol om å binde til As til det oppstår en likevekt i reaksjonen. Hvis det er en større mengde kortisol enn merket kortisol i prøvene vil man få et lavere antall merket kortisol som er festet til As, som i sin tur vil gi lav radioaktivitet. Om det er lav mengde kortisol i prøven vil det gi utslag i at en større mengde ^{3}H-merket kortisol binder seg til antistoffet og et høyere nivå med radioaktivitet vil bli målt i prøven.

Det var totalt 192 prøver som ble analysert fordelt på 10 assay. Hvis prøvene hadde for høye eller for lave verdier til at de traff standardkurven, ble den fortynnet mer eller mindre og analysert på nytt. Fortynninger som ble brukt var 3x, 15x og 30x. Det ble brukt en kjent standard for å beregne på inter- og intraspesifikk variasjon mellom assayene. For detaljer angående utstyr fremgangsmåte og kjemikalier, se appendiks 1.

2.3.3 Na^+/K^+-ATPase-aktivitet i gjellene

Metoden som ble benyttet for måling av NKA-aktivitet er beskrevet av McCormick (1993) og Schrock *et al*. (1993). Metoden angir hvor raskt en til en gitt mengde enzym hydrolyserer ATP til ADP + P_i og er enzymatisk koplet til oksidasjon av NADH til NAD^+ (se reksjonslikning). Denne reaksjonen kan leses av ved bruk av en plateleser som endring i absorbans (optisk tetthet, OD) ved bølgelengde 340 nm.

Reaksjonslikningene Illustrerer hvordan reaksjonen forløper under analysen:

(1) $ATP + H_2O$ <-----^{ATPase}-----> $ADP + P_i$

(2) ADP + Phosphoenylpyruvat ------$^{Pyruvat\ kinase}$-------> Pyruvat + ATP

(3) Pyruvat + NADH + H^+ ----$^{Laktat\ dehydrogenase}$----> Laktat + NAD^+

Gjellefilamentene som ble brukt i denne analysen ble satt direkte i 100 µl SEI-buffer (appendiks 2, tabell 2.1), frosset ned i flytende nitrogen og oppbevart ved -80 °C til analysen skulle gjennomføres. Før analysen ble prøvene tint og tilsatt 25µl SEID løsning (appendiks 2, tabell 2.2) og homogeniserte med en Pellet "pestle motor". Det ble analysert (Spectra Max Plus 384) fire paralleller med 10 µl prøve på en 96 hullsplate for hver prøve. To av parallellene fikk tilsatt 200 µl assay mixture som var ikke-hemmende for NKA-aktivitet (AM) (se appendiks 2, tabell 2.7) og to prøver ble tilsatt 200 µl assay mixture som inneholdt oubain og var hemmende for NKA-aktivitet (AM-O) (appendiks 2, tabell 2.6). Det ble laget en standardkurve hver dag av kjente ADP konsentrasjoner (0, 5, 10 og 20 nmol ADP) for å kunne relatere avlesninger i optisk tetthet til ADP-konsentrasjon.

Homogenatet som var igjen etter å ha tatt ut 40 µl ble brukt til analyse av proteininnhold. Proteinanalysen ble utført ved hjelp av Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Rockford, IL 61101 U.S.A.). Det ble analysert tre paralleller (10 µl prøve og 200 µl reaksjonsløsning i hver brønn) på en 96 hulls mikroplate som ble satt til inkubering i 50 minutter ved 37°C. Etter inkubering ble platene lest av i plateleseren ved bølgelengde 540 nm. Utregning av proteininnhold ble gjort ved hjelp av programmet Softmax Pro 5.

Ved å bruke standardkurven for utregning av mengde ADP og verdi for mengde protein i hver prøve kan µmol ADP mg protein^{-1} time^{-1} beregnes. Alle løsninger og prøver sto på is under analysen og mikroplater sto på is helt til de ble avlest. For fremgangsmåte og kjemikalier, se appendiks 2.

2.4 Utregninger

Spesifikk vekstrate (SGR) i % per dag ble beregnet for hele forsøksperioden ved hjelp av formelen:

$100*[(\ln W2 - \ln W1)/ \Delta T]$

hvor ΔT er antall dager i hele forsøket, W2 er vekt siste dag og W1 er vekt ved første dag av forsøket (Brett, 1979).

Kondisjonsfaktor ble beregnet ved hjelp av Fulton's formel (Fulton, 1904):

$K = (g / L^3) \times 100$

der G er fiskens vekt i gram og L er fiskens lengde i cm.

NKA-aktivitet regnes ut i tre steg:

1. $\frac{\text{mOD/10µl/min (a)}}{\text{mOD/mole-ADP(b)}}$ = mmoles ADP/10µl/min

2. $\frac{\text{2mmoles – ADP/10µl/min}}{\text{µg-protein/10µl (c)}}$ = µmoles ADP/mg protein/min

3. 3µmoles ADP/mg protein/min*60 = µmol ADP mg Protein^{-1} time^{-1}

2.5 Statistikk

Data ble testet for normalfordeling (Shapiro wilk test) og alle data foruten lengde fra sjøvannstest viser seg å være skewed. Data som var skewed ble logtransformert med den naturlige logaritmen for å få økt homogenitet i datasettet. Levine test for å teste om varians på prøvene var lik (en av kravene til Tukey HSD post-hoc test).

Enveis ANOVA ble brukt for å sjekke signifikans mellom behandlingsgrupper og over tid, Tukey HSD post-hoc test for å avgjøre hvilke av behandlingsgruppene som var forskjellige fra hverandre på gitte tidspunkt. For korrelasjonsanalyse ble det gjort en Pearson Correlation test.

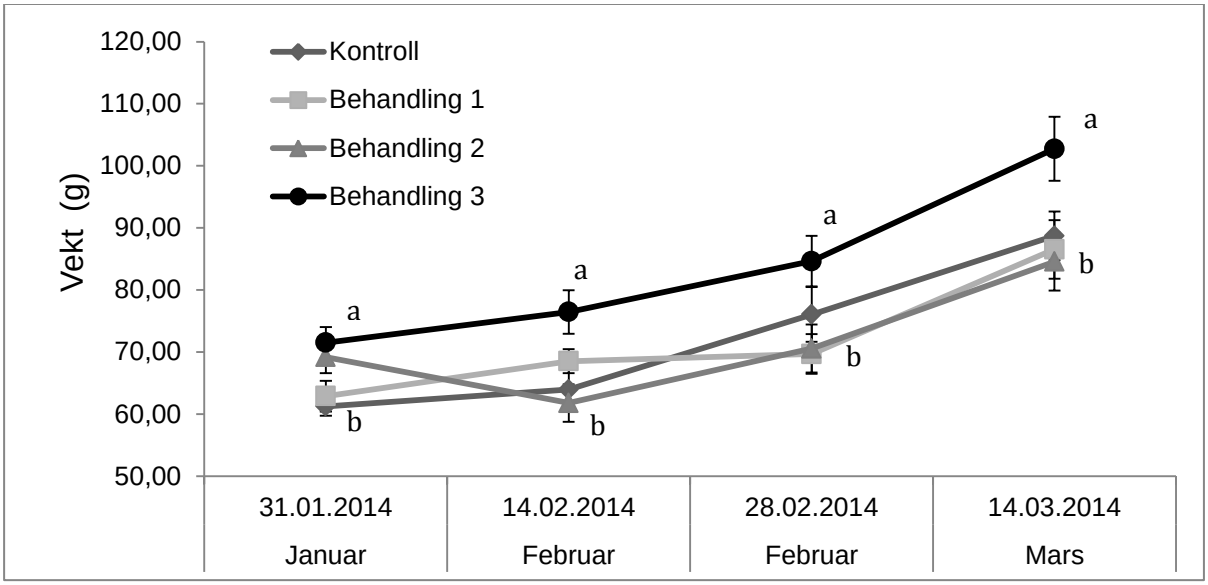
Resultater ble bestemt til å være signifikant når sannsynlighetsnivå var lavere eller lik 0,05. Alle analyser ble utført i IBM SPSS Statistics Data Editor 22. Figurer ble laget i Excel og SigmaPlot.

3.0 Resultater

Under utføring av 24 timers sjøvannstest ble det ikke observert død fisk. Alle rådata data for SWT ligger i appendiks 3.

3.1 Vekt, lengde og kondisjonsfaktor hos fisk samplet i ferskvann

Alle behandlingsgrupper øker signifikant i vekt gjennom hele forsøket (Figur 6) (se appendiks 4).

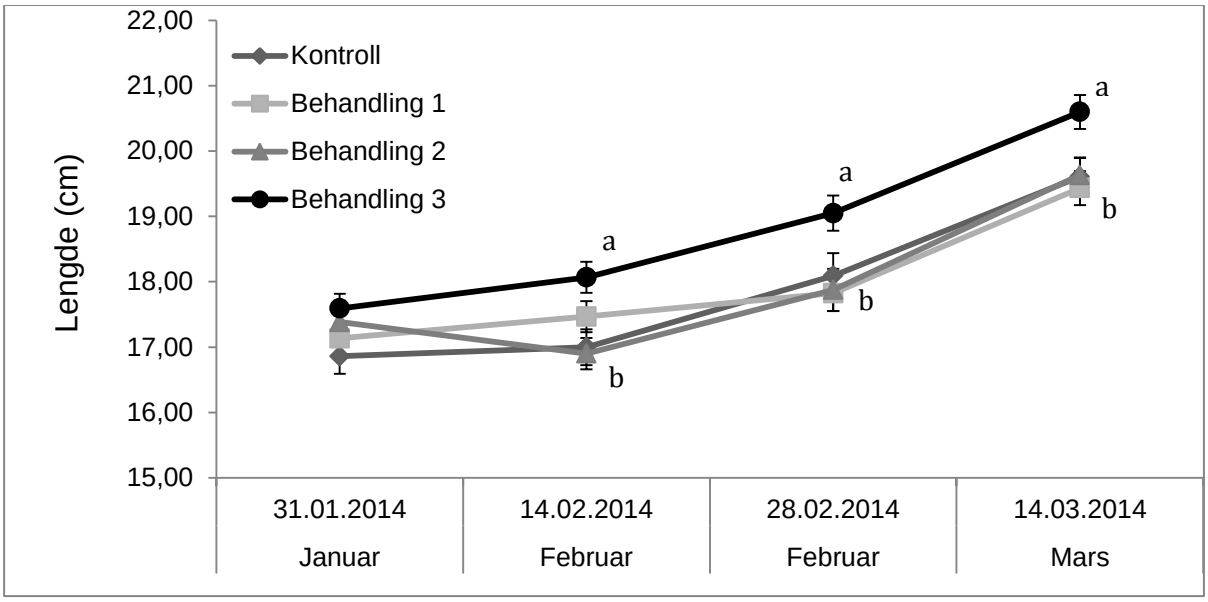


Figur 6. Utvikling av vekt hos fisk i ferskvann. Verdiene er angitt som gjennomsnitt ±standardfeil. Forskjellige bokstaver indikerer behandlinger som var signifikant forskjellig innenfor samme prøvetagningsdato.

Ved første uttak er behandlingsgruppe 3 signifikant større enn kontrollgruppe (Figur 6) og behandlingsgruppe 1. Andre uttak er behandlingsgruppe 3 forskjellig fra kontrollgruppen og behandlingsgruppe 1. Ingen av de andre behandlingene er forskjellig fra hverandre ved dette tidspunktet. Tredje uttak er behandlingsgruppe 3 forskjellig fra behandlingsgruppe 1. Ingen statistiske

forskjeller mellom noen andre behandlingsgrupper. Ved siste uttak er behandlingsgruppe 3 statisk forskjellig fra behandlingsgruppe 2 og de andre er statistisk like (appendiks 4).

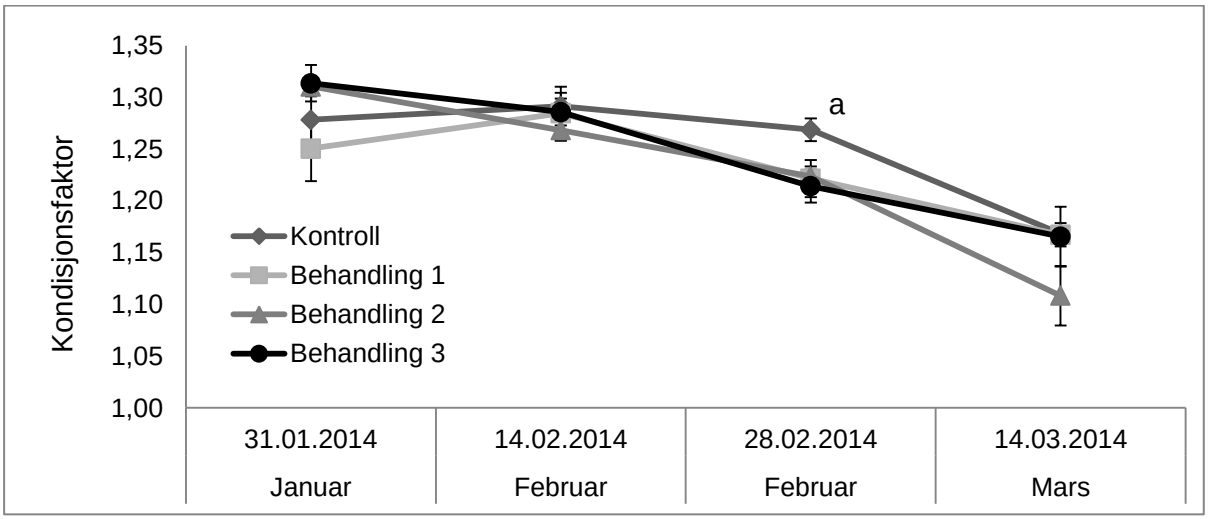
Det ble påvist signifikante økninger i lengde over tid i samtlige behandlingsgrupper, men det temporale mønsteret var forskjellig mellom behandlingsgruppene (Figur 7).



Figur 7. Utvikling av lengde hos fisk i ferskvann. Verdiene er angitt som gjennomsnitt ±standardfeil. Forskjellige bokstaver indikerer behandlingsgrupper som var signifikant forskjellig innenfor samme prøvetagningsdato.

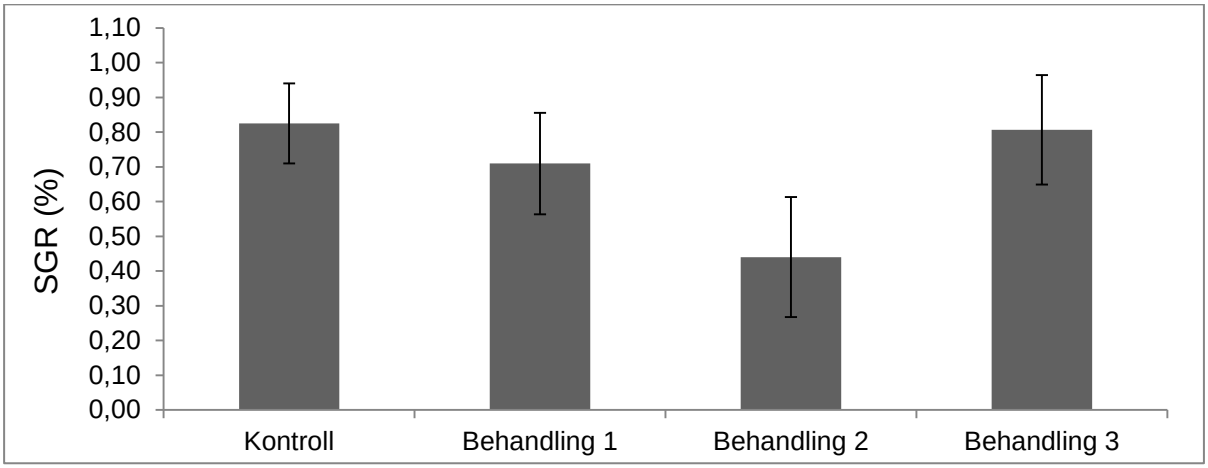
Lengde i cm har signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene på alle uttak unntatt første (Figur 7). Ved andre uttak er behandlingsgruppe 3 signifikant forskjellig fra kontrollgruppen og behandlingsgruppe 2. Ingen av de andre behandlingsgruppene er statistisk forskjellig fra hverandre. Tredje uttak viser at behandlingsgruppe 3 er forskjellig fra behandlingsgruppe 1 og 2, men

ikke kontrollgruppen. Ved siste uttak er behandlingsgruppe 3 kun forskjellig fra behandlingsgruppe 1 og alle andre behandlingsgrupper er statistisk lik (appendiks 4).



Figur 8. Utvikling av kondisjonsfaktor hos fisk i ferskvann. Verdiene er angitt som gjennomsnitt ±standardfeil. Forskjellige bokstaver indikerer behandlinger som var signifikant forskjellig innenfor samme prøvetagningsdato.

Kondisjonsfaktor synker gjennom forsøket for alle behandlingsgrupper, utenom behandlingsgruppe 1 (Figur 8). Ved tredje uttak av forsøket hadde kontrollgruppe en signifikant høyere kondisjonsfaktor enn alle andre behandlingsgrupper. Det var ingen statistisk forskjell ved forsøkets slutt (appendiks 4).

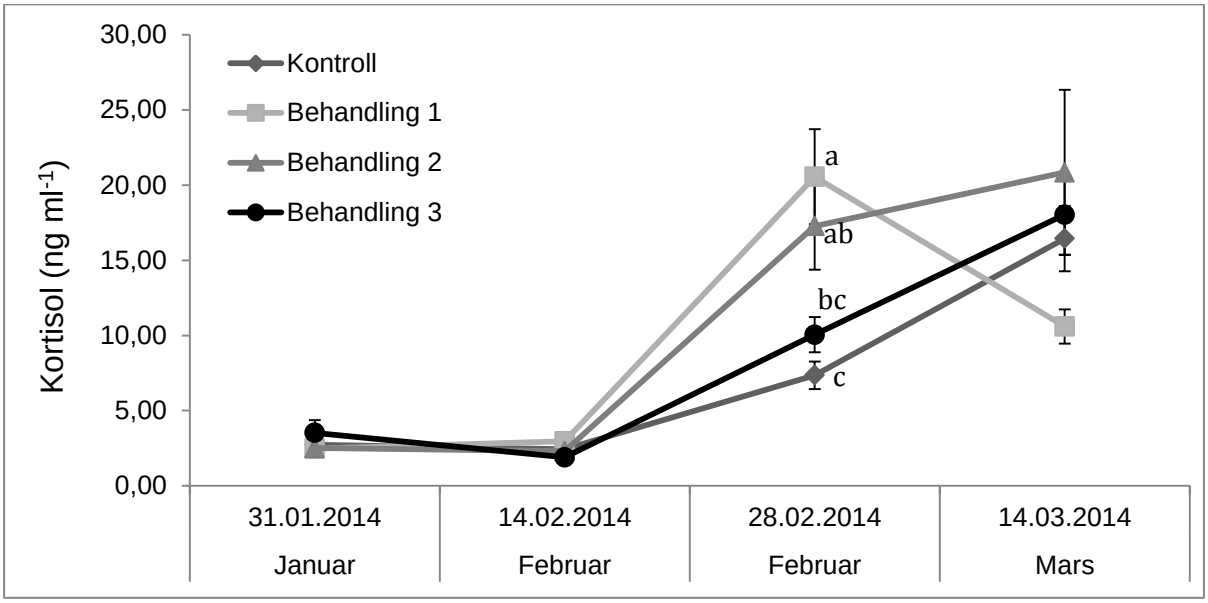


Figur 9. Spesifikk vekstrate per dag for vekt i % for gjennomsnittsvekter hele perioden ±standardfeil.

Det er ikke regnet statisitkk på disse vekstrate (Figur 9), siden fisken ikke er fulgt på enkeltnivå.

3.2 Kortisol

Det ble påvist signifikante økninger i kortisol over tid i samtlige behandlingsgrupper, men det temporale mønsteret var forskjellig mellom behandlingsgruppene. Det kan også se ut som at plasma kortisol i behandlingsgruppe 1 når en topp før de andre behandlingsgruppene (Figur 10).

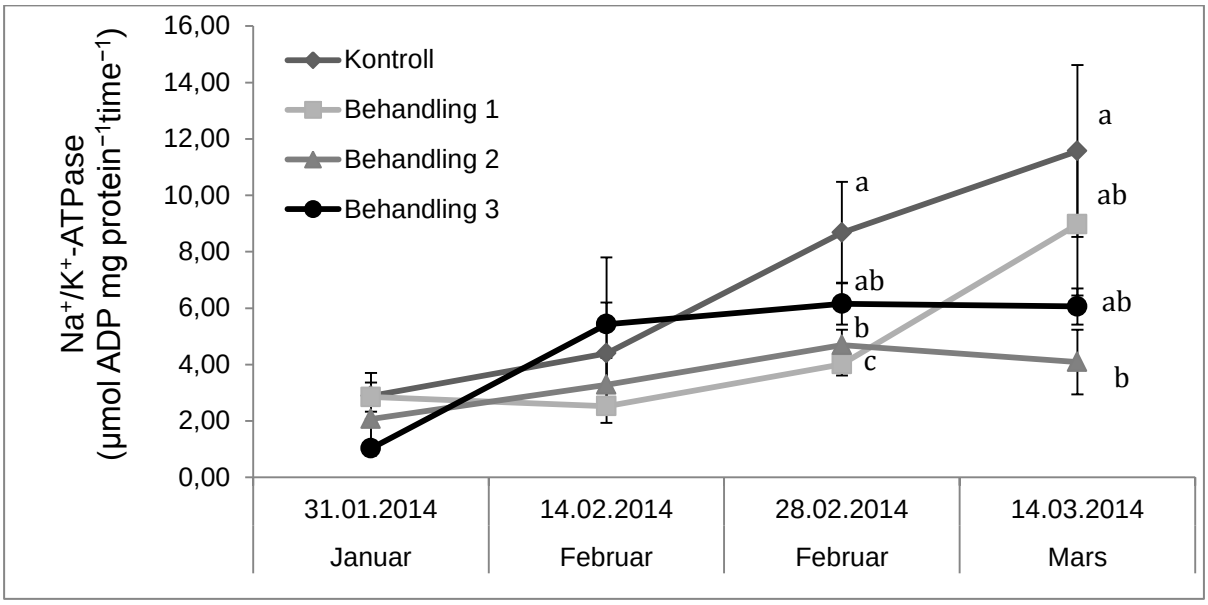


Figur 10. Endringer i plasma hos fisk i ferskvann gjennom forsøksperioden. Verdiene er angitt som gjennomsnitt ±standardfeil. Forskjellige bokstaver indikerer behandlinger som var signifikant forskjellig innenfor samme prøvetagningsdato. CV% intra assay 8, 5, CV% inter assay 13, 6

Plasma kortisol konsentrasjon økte raskere i grupper som hadde gjennomgått et kuldesjokk mellom øyerognstadiet og klekking (behandlingsgruppe 1) og mellom klekking og startfóring (behandlingsgruppe 2) sammenlignet med kontrollgruppen (Figur 10). Ved første, andre og siste uttak var det ingen signifikante forskjeller i kortisolnivå mellom de forskjellige behandlingsgruppene. Ved tredje uttak var det signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene; kontrollgruppen var forskjellig fra behandlingsgruppe 1 og 2 men ikke fra behandlingsgruppe 3. Behandlingsgruppe 1 og 2 var ikke signifikant forskjellige, mens behandlingsgruppe 3 var forskjellig fra behandlingsgruppe 1. Ved siste uttak (14.03.2014) var det ingen statistisk forskjell mellom behandlingsgruppene (appendiks 6).

3.3 Na^+/K^+-ATPase-aktivitet i gjellevev

Det ble påvist signifikante økninger i NKA-aktivitet over tid i samtlige behandlingsgrupper, utenom behandlingsgruppe 2. Det temporale mønsteret var forskjellig mellom behandlingsgruppene (se appendiks 6).



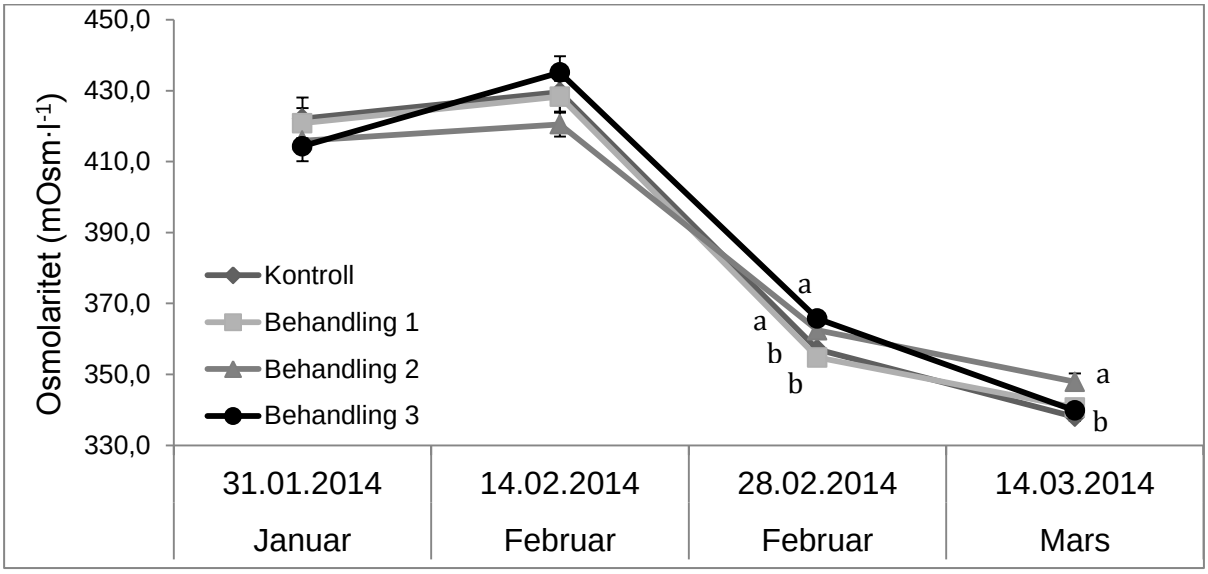
Figur 11. Utvikling av Na^+/K^+- ATPase-aktivitet i gjellevev gjennom forsøket. Verdiene representerer gjennomsnitt ±standardfeil. Forskjellige bokstaver indikerer behandlingsgrupper som var signifikant forskjellig innenfor samme prøvetagningsdato.

På tredje prøvetakningsdag var det et signifikant høyere nivå i kontrollgruppen sammenlignet med behandlingsgruppe 1 og behandlingsgruppe 2 (Figur11). Den laveste verdien tilhørere behandlingsgruppe 1. Ved siste uttak er kontrollgruppe signifikant forskjellig fra behandlingsgruppe 2 (appendiks 6).

3.3 Plasma osmolaritet og klorid

Ved første uttak er det en ikke signifikant økning i osmolaritet for alle behandlingsgrupper foruten om behandlingsgruppe 3. Mellom andre og tredje uttak er det en signifikant nedgang i osmolaritet for alle behandlingsgrupper.

Ved siste uttak ble det funnet en signifikant nedgang i plasma osmolaritet for alle behandlingsgrupper (se appendiks 5).

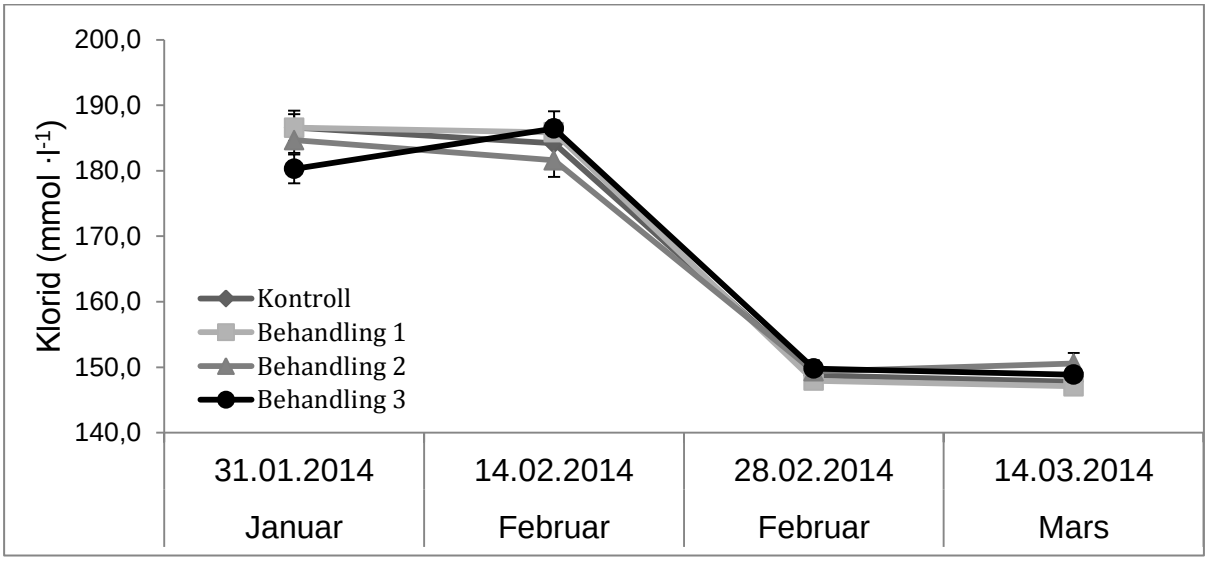


Figur 12. Utviklingen av plasma osmolaritet etter en 24 timers sjøvannstest gjennom forsøksperioden. Verdiene representerer gjennomsnitt ±standardfeil. Forskjellige bokstaver indikerer behandlingsgrupper som var signifikant forskjellig innenfor samme prøvetagningsdato.

Det er ingen signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene ved første og andre uttak (Figur 12). Ved tredje uttak er kontrollgruppen signifikant forskjellig fra behandlingsgruppe 2 og behandlingsgruppe 3. Behandlingsgruppe 1 og behandlingsgruppe 2 er statistisk like, det samme er behandlingsgruppe 3 og behandlingsgruppe 2. Det ble også merket en signifikant forskjell mellom behandlingsgruppene ved siste uttak og videre testing viser at behandlingsgruppe 2 har signifikant høyere osmolaritet enn alle behandlingsgruppene på dette tidspunktet (appendiks 5).

.

Det ble påvist signifikant nedgang i klorid over tid i samtlige behandlingsgrupper (se appendiks 5).

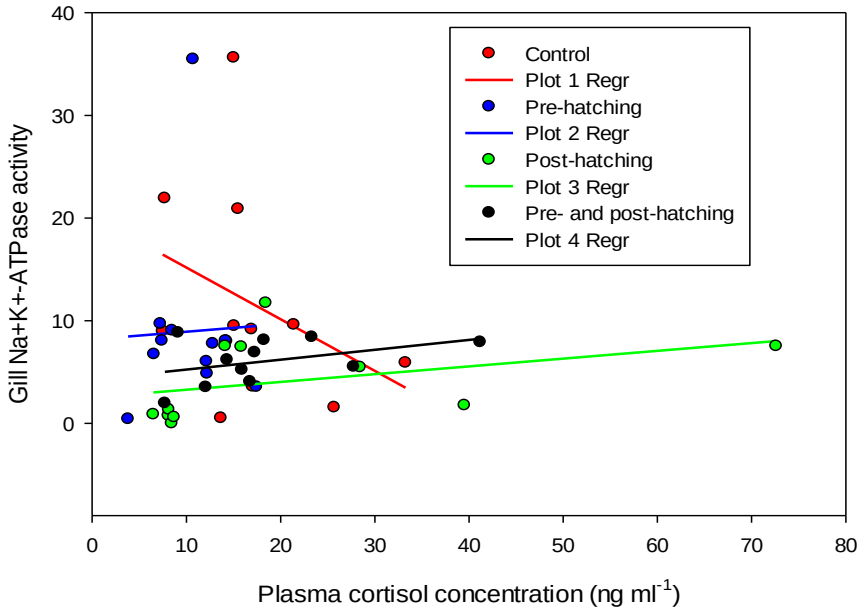


Figur 13. Utvikling av plasma klorid etter en 24 timers sjøvannstest gjennom forsøksperioden. Verdiene representerer gjennomsnitt ±standardfeil.

Det var ingen signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene (Figur 13) ved noen av prøvetakningene for mengde klorid i plasma (appendiks 5).

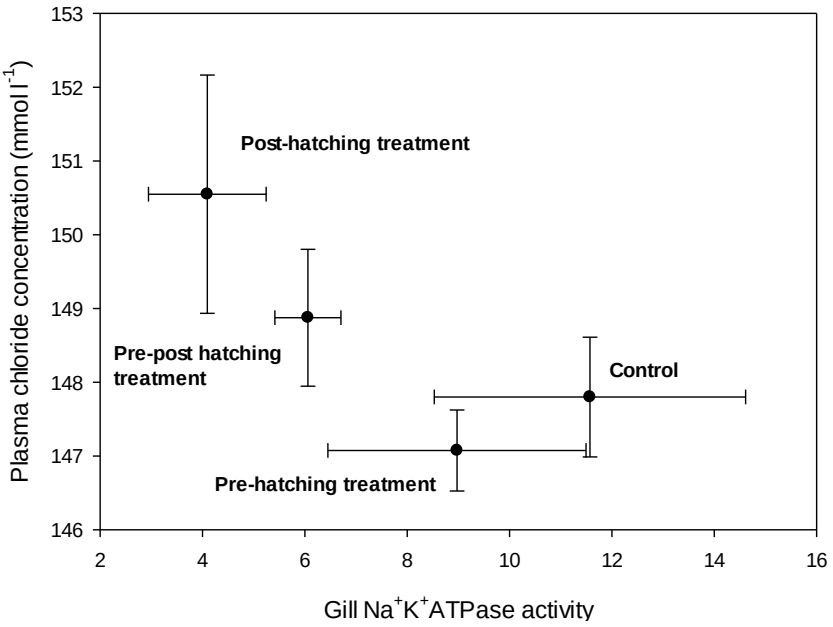
3.4 Sammenhenger mellom NKA og kortisol/klorid/osmolaritet

Det ble ikke påvist noen sammenhenger mellom plasma kortisol og NKA-aktivitet i gjellevev ved siste prøveuttak (Figur 14) (se appendiks 7).



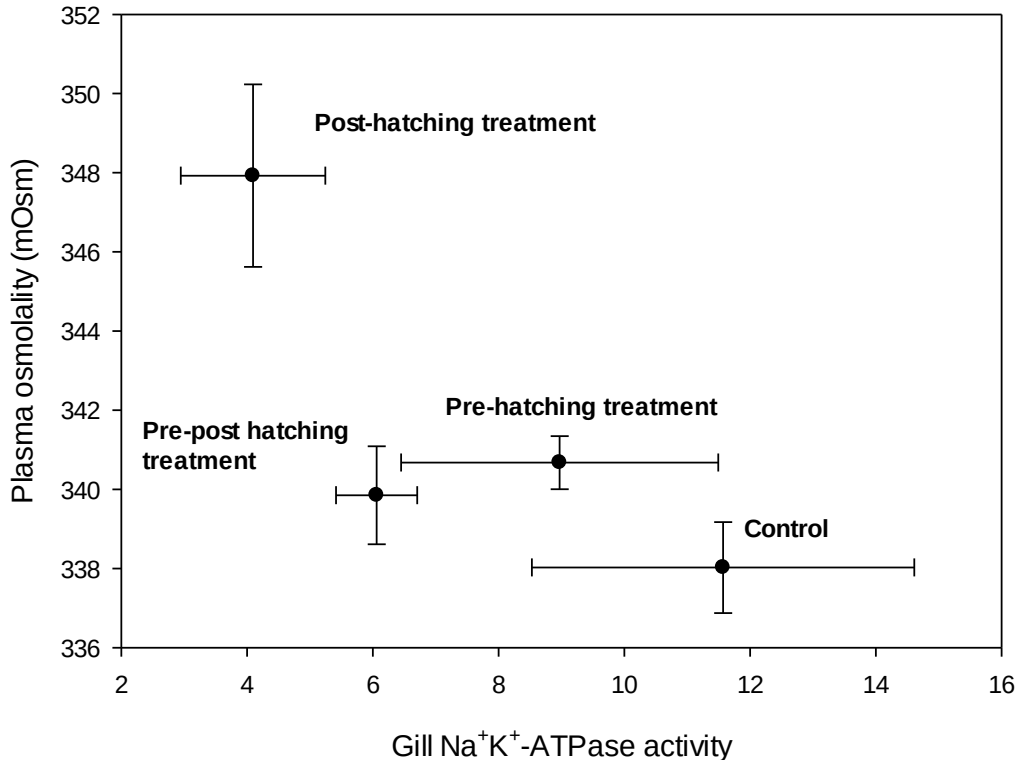
Figur 14. Sammenhengen mellom plasma kortisol konsentrasjon og gjelle NKA-aktivitet ved siste dag av forsøket i de ulike behandlingsgruppene.

Det er negativ (ikke signifikant) korrelasjon for kontrollgruppen mellom NKA-aktivitet og plasma kortisol ved siste prøveuttak og positive (ikke signifikante) korrelasjoner mellom andre behandlingsgrupper(appendiks 7).



Figur 15. Gjennomsnittverdier for NKA-aktivitet i gjellevev hos fisk samplet i ferskvann ved forsøkets slutt og plasma Cl^- konsentrasjon hos de fiskene som på samme tidspunkt hadde vært gjennom en 24 timers sjøvannstest. Verdiene representerer gjennomsnitt ±standardfeil for henholdsvis klorid (vertikale linjer) og NKA-aktivitet (horisontale linjer).

Det er ikke regnet statisitkk på disse dataene (Figur 15), da verdiene er hentet fra to ulike grupper fisk. Resultatet viser imidlertid en tendens til at en høy NKA-aktivitet gav lavere plasma klorid etter sjøvannstest.



Figur 16. Gjennomsnittverdier for NKA-aktivitet i gjellevev hos fisk samplet i ferskvann ved forsøkets slutt og plasma osmolaritet hos de fiskene som på samme tidspunkt hadde vært gjennom en 24 timers sjøvannstest. Verdiene representerer gjennomsnitt ±standardfeil for henholdsvis osmolaritet (vertikale linjer) og NKA-aktivitet (horisontale linjer).

Det er ikke regnet statistikk på disse dataene (Figur 16), da verdiene er hentet fra to ulike grupper fisk. Resultatet viser imidlertid en tendens til at en høy NKA-aktivitet gav lavere osmolaritet etter sjøvannstest.

4.0 Diskusjon

4.1 Utvikling av lengde, vekt og kondisjonsfaktor

Alle behandlingsgrupper hadde en positiv vekst (vekt og lengde) gjennom forsøksperioden. Behandlingsgruppe 3 skilte seg ut fra de andre gruppene med en signifikant høyere vekt gjennom hele forsøket, uten at vekstraten gjennom mitt forsøk syntes å være forskjellig sammenlignet med for eksempel kontrollfisken. Det kan imidlertid ikke utelukkes at veksten hos behandlingsgruppe 3 har vært påvirket av stressbehandlingen, noe som i så fall må ha skjedd i perioden fra stressbehandlingene ble utført (på egg- og plommesekkstadiet) til mitt forsøk ble igangsatt (rundt 8 måneder etter behandling). Det er interessant å merke seg at Eriksen *et al*. (2006) fant at egg (Atlantisk laks) med høyt prenatalt nivå av kortisol hadde lavere lengde, plommesekkvolum og total masse sammenlignet med egg som inneholdt normale nivå av kortisol. Sistnevnte undersøkelse er imidlertid ikke direkte sammenlignbar med mitt forsøk, siden fisken i min undersøkelse ble utsatt for stress på et ontogenetisk stadium hvor de hormonelle aksene er under utvikling og der en derfor ikke vil forvente endringer i kortisol som en direkte følge av stress (Barry *et al*. 1995). Det må imidlertid understrekes at mine data på vekt, lengde og vekstrate representerer et lite antall, tilfeldig utvalgte fisk og som sådan ikke er av en slik kvalitet at sikre konklusjoner om mulige effekter av behandling på tilvekst kan trekkes. Det er likevel litt interessant at behandlingsgruppe 2 tilsynelatende hadde lavest vekstrate av alle behandlingsgruppene. Det ble for øvrig registrert gjennomgående lavere vekt i alle behandlingsgrupper ved alle måletidspunkt hos fisk eksponert til sjøvannstesten (appendiks 3) sammenlignet med fisk som ble tatt ut direkte fra

ferskvann (appendiks 4). Dette skyldes ganske sikkert dehydrering og tap av væske hos fisken som ble eksponert til sjøvannstesten (Bone & Moore, 2008).

Alle behandlingsgrupper viste en reduksjon i kondisjonsfaktor gjennom smoltifiseringsfasen og det temporale mønsteret med hensyn til utviklingen av kondisjonsfaktor syntes å være ganske likt i alle gruppene. Nedgangen i kondisjonsfaktor var rundt 0,1 og ganske likt det som er rapportert i andre undersøkelser på laks under smoltifisering (Björnsson *et al*. 1989, Saunders *et al*. 1985, Virtanen & Soivio 1985). Reduksjonen i kondisjonsfaktor er et resultat av en relativ økning i lengdevekst og kan tilskrives både endringer i lipidmetabolisme (Stefansson *et al*. 2008) og katabolske prosesser knyttet til adaptive morfologiske forandringer som krever energi (McCormick & Saunders 1987). Disse endringene henger blant annet sammen en økning i kortisol under smoltifiseringen, slik som vist i mine forsøk.

4.2 Utvikling av sjøvannstoleranse og smoltparametere

Alle behandlingsgruppene viste en gradvis forbedring av sjøvannstoleranse gjennom forsøksperioden og det ble ikke funnet noen åpenbare effekter av stressbehandlingene på utviklingen av sjøvannstoleranse gjennom forsøket. Alle grupper responderte gradvis bedre til sjøvannstesten utover i forsøket og alle grupper endte opp med plasma osmolaritet (340-350 $mOsm \cdot l^{-1}$) og kloridverdier (140-150 $mmol \cdot l^{-1}$) etter 6 uker med langdagsbehandling (24 timer lys) som indikerer at fisken var smoltifisert (eller veldig nær fullstendig smoltifisering) ved siste måletidspunkt (Heggberget *et al*. 1992, Hoar 1988, McCormick & Saunders 1987). Det er også verdt å merke seg at fisken i behandlingsgruppe 3, som hadde signifikant høyere kroppsvekt gjennom hele forsøket, hadde samme plasma osmolaritet og kloridverdier som de andre behandlingsgruppene. Perioden med

langdagsbehandling tilsvarer 350 døgngrader (DD) med sommerstimuli (LD 24:0), noe som er litt mindre enn de 400 DD som anses som normalt for å gjennomføre smoltifisering (Sigholt *et al*. 1998). Om behandlingsgruppe 2 hadde fått 50 ekstra DD (i dette tilfellet 5 dager) hadde de kanskje ikke vært statistisk ulik de andre behandlingsgruppene ved forsøkets slutt med hensyn til plasma osomlaritet.

På tross av at det ikke ble påvist åpenbare behandlingseffekter på utviklingen av sjøvannstoleranse, ble det registrert klare forskjeller i utviklingen av NKA-aktivitet i gjellevev i siste del av smoltifiseringsfasen (henholdsvis 4 og 6 uker etter at langdagsbehandlingen ble satt i gang). Alle behandlingsgrupper, unntatt behandlingsgruppe 2, viste økt NKA gjennom forsøksperioden, men økningen var mer markert i behandlingsgruppe 1 og kontrollgruppen, sammenlignet med de andre behandlingsgruppene. Ved siste uttak var NKA-aktivitet for behandlingsgruppe 2 under det som er regnet som normalt hos ferdig smoltifisert Atlantisk laks (Lysfjord & Staurnes 1998). Høyeste aktivitet ved siste prøvetaking ble registrert i kontrollgruppen med 12 µmol ADP mg protein^{-1} time^{1}, mens laveste aktivitet ble registrert i behandlingsgruppe 2 med rundt 4 µmol ADP mg protein^{-1} time^{-1}. Økningen i NKA hos kontrollgruppen, fra rundt 3 til 12 µmol ADP mg protein^{-1} time^{-1}, samsvarer godt med det som er rapportert av andre for laks som smoltifiserer (Lysfjord & Staurnes 1998, Boeuf *et al*. 1985, Virtanen & Soivio 1985). Nivået av NKA er regnet å øke opptil 2,5 ganger under normal smoltifisering. Kontrollgruppen i dette forsøket økte NKA-aktivitet med over 3,5 ganger (McCormick *et al*. 2013, Zaugg & Wagner 1973), mens NKA-aktivitet i behandlingsgruppe 2 så vidt ble fordoblet.

Det ble imidlertid ikke funnet noen klar sammenheng mellom verken total NKA eller temporale endringer i NKA og evnen til å hypoosmoregulere i sjøvann. Mens utviklingen av NKA var forskjellig mellom behandlingsgruppene, var

utviklingen av sjøvannstoleranse noenlunde lik i alle behandlingsgruppene. Dette er et overraskende funn i og med at NKA er vist å øke under smoltifisering hos laks og antas å spille en avgjørende rolle for kloridcellenes evne til å skille ut klorid i sjøvannsfasen (McCormick *et al*. 2013). En mulig forklaring kan selvsagt være at frekvensen av prøvetakinger som ble gjort i min undersøkelse har vært for lav (14 dager mellom hvert uttak av prøver) og at det kan ha skjedd forbigående endringer i NKA mellom uttakene i min undersøkelse for noen av behandlingsgruppene (2 og 3) (McCormick *et al*. 2013). I dette forsøket har jeg målt den totale mengden av gjelle NKA aktivitet og ikke sett på hvor mye det eventuelt var av de forskjellige isoformene på gjellene til fisken og hvordan de to isoformene av NKA (i.e. ferskvannsformen NKAα1b og sjøvannsformen NKAα1a) utviklet seg gjennom smoltifiseringen. Måling av genuttrykk for disse to isoformene ville muligens ha gitt et mer korrekt bilde av de endringene i det ionereulatoriske apparat i gjellene hos de ulike behandlingsgruppene i løpet av smoltifiseringen. Det er mulig at fisken fra behandlingsgruppe 2 hadde en høyere mengde NKAα1b og dermed en adekvat mengde for å lage en elektrokjemisk gradient til at Na^+ og Cl^- kan skilles ut av gjellene. Det er også kjent at NKAα1b isoformen fortsetter å øke etter at laksen har stått i sjøvann, i noen tilfeller tar økningen bare timer (Marshall 2002). Det ble ikke tatt gjelleprøver for måling av NKA aktivitet hos fisken som hadde vært 24 timer i sjøvann og man kan dermed ikke si noe om disse fiskene hadde en økning etter de ble utsatt for sjøvann. Strand et al. (2010) har rapportert om vill laksesmolt med lave NKA-aktivitets verdier (3,3 ±2,4 μmol ADP mg protein^{-1}time^{-1}) like før sjøvannseksponering, noe som antyder at det ikke alltid er en nær sammenheng mellom gjelle NKA-aktivitet og hypoosmoregulatorisk evne hos smolt av Atlantisk laks. Det ble imidlertid i dette forsøket observert en tendens til en negativ

sammenheng mellom gjelle NKA-aktivitet hos smolt i ferskvann og plasma klorid konsentrasjon og osmolaritet etter sjøvannstest, noe som er i samsvar med den generelle oppfatningen omkring NKA-aktivitet og hypoosmoregulatorisk evne hos anadrom laksefisk (Handelanda *et al*. 2003, McCormick *et al*. 1987).

I likhet med NKA ble det også påvist temporale forskjeller i kortisol gjennom forsøket. Ved første og andre prøveuttak (henholdsvis dag 0 og dag 14 i forsøket) ble det registrert plasmanivå under 5 ng ml^{-1} i samtlige behandlingsgrupper, som er innenfor det som betraktes som basale nivå hos fisk (mindre enn 10 ng ml^{-1}, Sumpter 1997). Etter andre prøveuttak ble det registrert en økning i samtlige behandlingsgrupper, med en klart raskere økning i behandlingsgruppe 1 og 2 sammenlignet med de to andre behandlingsgruppene. Behandlingsgruppe 1 viste i tillegg en nedgang (signifikant) ved forsøkets siste prøveuttak, mens de øvrige behandlingsgruppene nådde sitt høyeste nivå ved dette tidspunktet (behandlingsgruppe 1 hadde ikke signifikant forskjellig kortisolnivå fra andre behandlingsgruppene ved siste prøveuttak). Økningen i kortisol i som ble registrert i samtlige forsøksgrupper reflekterer en naturlig fysiologisk respons som inngår som en del av flere endokrine preadaptive responser knyttet til utviklingen av det osmoregulatoriske apparatet i forbindelse med smoltifiseringen (Björnsson *et al*. 2011, Aas-Hansen *et al*. 2003). Kortisol sammen med veksthormon (GH) og "insulin-like growth factor I" (IGF I) antas å regulere utviklingen av såkalte α-kloridceller som betraktes som den aktive typen av kloridceller i sjøvann. Disse kloridcellene har flere ulike transportmekanismer (proteiner) som hver på sin måte deltar i prosessen med å skille ut klorid i sjøvannsfasen. Disse omfatter i tillegg til "sjøvannstypen" av NKA (NKAα1b) også NKCC1, som begge er lokalisert til den basolaterale siden av kloridcellen, samt CFTR som er et protein knyttet til transport av klorid over cellemembranen på

den apikale siden av kloridcellen (McCormick *et al*. 2013). Nivåene av disse transportproteinene fortsetter også å øke også etter at laksefisken har migrert til saltvann (McCormick 2001).

I og med at kortisol antas å være direkte knyttet til økningen av NKA som skjer under smoltifisering (McCormick 2001), bør en derfor forvente å finne en sammenheng mellom plasma kortisol og gjelle NKA-aktivitet. En nærmere analyse av datamaterialet i mitt forsøk kunne imidlertid ikke avsløre noen positiv sammenheng mellom kortisol og NKA. En mulig forklaring kan være at det var forskjeller mellom behandlingsgruppene i kortisolreseptorer i gjella. I løpet av smoltifiseringen skjer det en oppregulering av kortisolreseptorene i gjella gjennom en økning i plasmanivå av GH (Shrimpton *et al*. 1995). Plasma GH konsentrasjoner ble ikke målt i dette forsøket, så det er ikke mulig å trekke noen konklusjoner om mulige effekter av behandling på GH/IGF I-aksen, men denne muligheten kan ikke utelukkes.

4.3 Mulige epigenetiske effekter av stressbehandlingen

Epigenetiske forandringer er regnet som en del av evolusjon. Teorien er at individer kan får uttrykt forskjellige fenotyper gjennom blant annet metylering av enkeltgener som en tilpasning til miljøforhold de blir utsatt for i tidlige livsstadier (Li & Leatherland 2013). Forandringene kan komme i tidsrommet hvor epigenomet er mest følsom for forandringer og kan være både av positiv og negativ karakter. Eksperiment med gnagere har vist at man kan, med positiv oppfølgning etter en negativ periode i livmoren, oppnå en reversering av epigenetiske responser (Glover *et al*. 2010). Det er flere forskjellige faktorer som

kan påvirke epigenetiske forandringer og stress kjent for å indusere epigenetisk fenotypisk forandringer i mange dyr (Faulk & Dolinoy, 2011).

Forsøksfisken som ble benyttet i min undersøkelse ble overtatt fra et annet prosjekt gjennomført i regi av Nofima. I det opprinnelige prosjektet ble det foretatt måling av genuttrykket for melanokortinreseptor 2 (*Mc2r*) hos plommesekk-yngel. Disse analysene er ennå ikke gjennomført i sin helhet, men en preliminær vurdering av datamaterialet så langt viser en klar nedregulering av genuttrykket for *Mc2r* (samt "corticotropin releasing factor"; *CRF1,* "Proopiomelanocortin-A2"*; POMC-A2,* "Proopiomelanocortin-B"; *POMC-B,* "Glucocorticoid receptor *1*"*; GR1* og "mineralocorticoid receptor"; *MR*) hos yngel fra alle behandlingsgrupper utenom kontrollgruppen (pers. med. Hanne Johnsen, Nofima). *Mc2r* er lokalisert til hodenyren hos Atlantisk laks og aktiveres av ACTH, som i sin tur fører til syntese og frigjøring av kortisol (Sandor *et al*. 1984). Det kan derfor tenkes at de temporale forskjellene i plasma kortisol som ble påvist i min undersøkelse på en eller annen måte henger sammen med en tidlig nedregulering av *Mc2r* (og andre gen).

Epigenomet er følsomt for påvirkninger fra miljøet, spesielt i tidlige livsstadier hvor cellene utvikles (deling og differensiering), og kan være av permanent eller ikke-permanent karakter (Li & Leatherland 2013). Laksefisk har som andre teleoster kortisol av maternalt opphav i eggefasen, og først rundt klekking er det påvist en svak økning i mengde kortisol som respons til stress (Barry *et al*. 1995). En helt moden HPI-akse, og dermed en adekvat respons til stress, utvikles ikke før etter absorbering av plommesekk (Li *et al*. 2010, Auperin & Geslin 2008, Barry *et al*. 1995).

Behandlingsgruppe 1, 2 og 3 har i følge litteraturen fått en stresspåkjenning under en fase av livet hvor HPI-aksen er under utvikling (Barry *et al*. 1995, Auperin & Geslin 2008, Li *et al*. 2010). Det kan derfor hende at behandlingseffekten i dette forsøket har vært av permanent karakter, siden det var helt klare effekter av behandlingene på utviklingen av kortisol-responsen (knyttet til smoltifiseringen) i de ulike behandlingsgruppene. Eventuelle metyleringer kan være begrenset til visse faser av livssyklus og responderer raskt på miljø (Angers *et al*. 2010) og en skal derfor være oppmerksom på at slike effekter kan reverseres.

Behandling 1, 2 og 3 har i følge litteraturen fått en stresspåkjenning under en fase av livet hvor HPI-aksen er under utvikling (Li *et al*. 2010, Auperin & Geslin 2008, Barry *et al*. 1995). Det kan hende at mulige epigenetiske behandlingseffekter i dette forsøket er av ikke permanent karakter i og med at det ikke ble påvist statistisk signifikante forskjeller mellom behandlingene ved siste dag i forsøket. Li *et al*. (2010) så at fisk som fikk den en lavere dose eksogent kortisol hadde bedre vekst enn høy dose og ingen dose. Denne forskjellen i størrelse vedvarte under hele forsøket. Det kan derfor tenkes at fisk fra behandling 3 har fått en epigenetisk forandring på et tidlig stadium som har gjort at den i likhet med effekter rapportert i Li *et al*. (2010) har fått en annen fysiologisk fenotype. Eriksen *et al*. (2006) hadde også lavest anomali hos fisk behandlet med et mellomnivå av kortisol noe som indikerer at et moderat nivå av kortisol kan ha en positiv effekt på organismen. Om man hadde funnet ut tidsintervallet hvor epigenetiske variasjoner foregår, kunne man utnyttet denne informasjonen til å skape nye avls strategier for å produsere fisk som var bedre adaptert til det forventede miljøet i merdene (Morán *et al*. 2013).

4.4 Konklusjoner

Mine undersøkelser viser at tidlig stress (i embryogenesen) kan påvirke den temporale utviklingen av NKA og kortisol under smoltifisering hos Atlantisk laks. Det er konkludert med at disse effektene kan være av permanent epigenetisk karakter. Det ble imidlertid ikke funnet noen klar sammenheng mellom endringer i disse smoltparameterne og utviklingen av fiskens sjøvannstoleranse i samme periode, slik en kunne forvente.

5.0 Referanser

Aas-Hansen, Ø., Johnsen, H.K., Vijayan, M.M., Jørgensen, E.H., 2003. Development of seawater tolerance and concurrent hormonal changes in fed and fasted Arctic charr at two temperature regimes. Aquaculture 222, 135–148.

Angers, B., Castonguay, E., Massicotte, R., 2010. Environmentally induced phenotypes and DNA methylation: how to deal with unpredictable conditions until the next generation and after. Mol. Ecol. 19, 1283–1295.

Asplin, L., Aure, J., Bannister, R., Bjørn, P.A., Boxaspen, K.K., Dahle, G., Ervik, A., Finstad, B., Glover, K., Grøsvik, B.E., Kupka, P.H., Heino, M., Husa, V., Peder Andreas Jansen, I.A.J., Jørstad, K., Karlsbakk, E., Karlsen, Ø., Kristiansen, T.S., Kvamme, B.O., Rosa Maria Serra Llinnares, A.M., Mortensen, S., Morton, C., Nilsen, R., Otterå, H., Patel, S., Sæther, B.-S., Samuelsen, O.B., Skaala, Ø., Skår, C., Skilbrei, O., Stien, L.H., Svåsand, T., Taranger, G.L.I.U., Wennevik, T. van der M., Wennevik, V., 2012. Fisken og havet, Risikovurdering norsk fiskeoppdrett 2012.

Auperin, B., Geslin, M., 2008. Plasma cortisol response to stress in juvenile rainbow trout is influenced by their life history during early development and by egg cortisol content. Gen. Comp. Endocrinol. 158, 234–9.

Barry, T.P., Malison, J.A., Held, J.A., Parrish, J.J., 1995. Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. Gen. Comp. Endocrinol. 97, 57–65.

Barton, B.A., Morgan, J.D., Vijayan, M., 2002. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish., i: Adams, S.M. (Ed.), Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress 2002. s. 111 – 148.

Björnsson, B.T., Stefansson, S.O., McCormick, S.D., 2011. Environmental endocrinology of salmon smoltification. Gen. Comp. Endocrinol. 170, 290–298.

Björnsson, B.T., Thorarensen, H., Hirano, T., Ogasawara, T., Kristinsson, J.., 1989. Photoperiod and temperature affect plasma growth hormone levels , growth , condition factor and hypoosmoregulatory ability of juvenile Atlantic salmon (Salmo salar) during parr-smolt transformation. Aquaculture 82, 77–91.

Boeuf, G., Le Roux, A., Gaignon, J.L., Harache, Y., 1985. Gill (Na+ K+)-ATPase activity and smolting in Atlantic salmon (Salmo salar L.) in France. Aquaculture 45, 73–81.

Bone, Q., Moore, R.H., 2008. Osmoregulation and ion balance, i: Owen, E. (Ed.), Biology of Fishes. Taylor & Francis Group, Abingdon, OX14 4RN, s. 161 – 173.

Bonga, S.E.W., 1997. The stress response in fish. Physiol. Rev. 77, 591–625.

Brett, J.R., 1979. 10 Environmental Factors and Growth, Fish Physiology, Fish Physiology. Elsevier.

Chrousos, G.., 1998. Stressors, stress and neuroendocrine integration of the adaptive responses. Ann. N. Y. Acad. Sci. 851, 311–335.

Dhabhar, F.S., 2009. A hassle a day may keep the pathogens away: The fight-or-flight stress response and the augmentation of immune function. Integr. Comp. Biol. 49, 215–36.

Eriksen, M.S., Bakken, M., Espmark, A., Braastad, B.O., Salte, R., 2006. Prespawning stress in farmed Atlantic salmon Salmo salar: maternal cortisol exposure and hyperthermia during embryonic development affect offspring survival, growth and incidence of malformations. J. Fish Biol. 69, 114–129.

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. Physiol. Rev. 85, 97–177.

Faulk, C., Dolinoy, D.C., 2011. Timing is everything: The when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. Epigenetics 6, 791–797.

Firseridirektoratet [WWW Document], n.d. URL http://www.fiskeridir.no/statistikk/akvakultur/statistikk-for-akvakultur/laks-regnbueoerret-og-oerret (accessed 2.14.15).

Fulton, T.W., 1904. The rate of growth of fishes. Fish. Board Scotland, Annu. Rep. 22.

Glover, V., O'Connor, T.G., O'Donnell, K., 2010. Prenatal stress and the programming of the HPA axis. Neurosci. Biobehav. Rev. 35, 17–22.

Handeland, S.O., Berge, A., Bjornsson, B.T., Lie, Ø., Stefansson, S.O., 2000. Seawater adaptation by out-of-season Atlantic salmon (Salmo salar L.) smolts at different temperatures. Ann. N. Y. Acad. Sci. 181, 377–396.

Handeland, S.O., Järvi, T., Fernö, A., Stefansson, S.O., 1996. Osmotic stress , antipredator behaviour , and mortality of Atlantic salmon (Salmo salar) smolts. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 53, 2673–2680.

Handelanda, S.., Björnsson, B.T., Arnesen, A.., Stefansson, S.O., 2003. Seawater adaptation and growth of post-smolt Atlantic salmon (Salmo salar) of wild and farmed strains. Aquaculture 220, 367–384.

Heggberget, T.G., Staurnes, M., RitaStrand, Husby, J., 1992. Smoltifisering hos laksefisk Smoltifisering, NINA Forskningsrapport 31. Trondheim.

Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Moal, M., Maccari, S., 1994. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. 6.3 (1994): . J. Neuroendocrinol. 6, 341–345.

Hoar, S.W., 1988. The Physiology of Developing Fish - Viviparity and Posthatching Juveniles. Fish Physiol., Fish Physiology 11, 275–343.

Li, M., Bureau, D.P., King, W.A., Leatherland, J.F., 2010. The actions of in ovo cortisol on egg fertility, embryo development and the expression of growth-related genes in rainbow trout embryos, and the growth performance of juveniles. Mol. Reprod. Dev. 77, 922–31.

Li, M., Leatherland, J.F., 2013. The implications for aquaculture practice of epigenomic programming of components of the endocrine system of teleostean embryos: lessons learned from mammalian studies. Fish Fish. 14, 528–553.

Lysfjord, G., Jobling, M., Solberg, C., 2004. Atlantic salmon, Salmo salar L., smolt production strategy affects body composition and early seawater growth. Aquaculture 237, 191–205.

Lysfjord, G., Staurnes, M., 1998. Gill Na+/K+-ATPase activity and hypoosmoregulatory ability of seaward migrating smolts of anadromous Atlantic salmon (Salmo salar) , sea trout (Salmo trutta) and Arctic char (Salvelinus alpinus) in the Hals river, northern Norway. Aquaculture 168, 279–288.

Marshall, W.S., 2002. Na+, Cl-, Ca2+ and Zn2+ transport by fish gills: Retrospective review and prospective synthesis. J. Exp. Zool. 293, 264–283.

McCarrey, J.R., 2012. The epigenome as a target for heritable environmental disruptions of cellular function. Mol. Cell. Endocrinol. 354, 9–15.

McCormick, S.D., 1993. Methods for gill biopsy and measurement of Na+, K+ -ATPase activity. Can. J. Fish. Aquat. Sci 50, 656–658.

McCormick, S.D., 2001. Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. Integr. Comp. Biol. 41, 781–794.

McCormick, S.D., Regish, A.M., Christensen, A.K., Björnsson, B.T., 2013. Differential regulation of sodium-potassium pump isoforms during smolt development and seawater exposure of Atlantic salmon. J. Exp. Biol. 216, 1142–51.

McCormick, S.D., Saunders, R.L., 1987. Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids : osmoregulation , growth , and metabolism. Am. Fish. Soc. Symp. 1, 211–229.

McCormick, S.D., Saunders, R.L., Henderson, E.B., Harmon, P.R., 1987. Photoperiod control of parr-smolt transformation in Atlantic salmon (Salmo salar): changes in salinity tolerance, gill Na+, K+-ATPase activity, and plasma thyroid hormones. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 44, 1462–1468.

McCormick Stephen D, Shunsuke Moriyama, Björnsson B. Thrandur, 2000. Low temperature limits photoperiod control of smolting in Atlantic salmon through endocrine mechanisms. Am J Physiol Regul. Integr. Comp Physiol 278, 1352–1361.

Metcalfe, N.B., Huntingford, F. a., Graham, W.D., Thorpe, J.E., 1989. Early social status and the development of life-history strategies in Atlantic salmon. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 236, 7–19.

Morán, P., Marco-Rius, F., Megías, M., Covelo-Soto, L., Pérez-Figueroa, A., 2013. Environmental induced methylation changes associated with seawater adaptation in brown trout. Aquaculture 392-395, 77–83.

Sandor, T., DiBattista, J. a, Mehdi, a Z., 1984. Glucocorticoid receptors in the gill tissue of fish. Gen. Comp. Endocrinol. 53, 353–364.

Saunders, R.L., Henderson, E.B., Harmon, P.R., 1985. Effects of photoperiod on juvenile growth and smolting of Atlantic salmon and subsequent survival and growth in sea cages. Aquaculture 45, 55–66.

Schreck, C.B., 2010. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. Gen. Comp. Endocrinol. 165, 549–56.

Schrock, R.M., Beeman, J.W., Rondorf, D.W., Haner, P. V., 1993. A microassay for gill sodium, potassium-activated ATPase in juvenile pacific salmonids. Trans. Am. Fish. Soc. 123, 223–229.

Schulz, R., 1985. Measurement of five androgens in the blood of immature and maturing male rainbow trout, Salmo gairdneri (Richardson). Steroids 46, 717–726.

Seidelin, M., Madsen, S.S., 1999. Endocrine control of Na+,K+-ATPase and chloride cell development in brown trout (Salmo trutta): interaction of insulin-like growth factor-I with prolactin and growth hormone. J. Endocrinol. 162, 127–135.

Shrimpton, J.M., Devlin, R.H., McLean, E., Byatt, J.C., Donaldson, E.M., Randall, D.J., 1995. Increases in gill cytosolic corticosteroid receptor abundance and saltwater tolerance in juvenile coho salmon (Oncorhynchus kisutch) treated with growth hormone and placental lactogen. Gen. Comp. Endocrinol. 98, 1–15.

Sigholt, T., Torbjorn, A., Staurnes, M., 1998. Timing of parr-smolt transformation in Atlantic salmon (Salmo salar): effects of changes in temperature and photoperiod. Aquaculture 160, 129–144.

Staurnes, M., Sigholt, T., Reite, O., 1992. Smoltifisering, i: Døving, K., Reimers, E. (Eds.), Fiskens Fysiolog. John Grieg forelag AS, Stavanger, s. 308–316.

Stefansson, S., Bæverfjord, G., Handeland, S.O., Hansen, T., Nygård, S., Rosseland, B.O., Rosten, T., Toften, H., 2005. Fiskevelferdsmessig vurdering av produksjon av 0-års smolt. Sluttrapport 19.05.05. Oslo.

Stefansson, S. O. Mccormick, S.D., Lars, E., Björnsson, O.E., Thrandur, B., 2008. Smoltification, i: A, F., B, K. (Eds.), Fish Larval Physiology. Sci Publ, Enfield, s. 639–681.

Strand, J.E.T., Davidsen, J.G., Jørgensen, E.H., H., R.A., 2010. Seaward migrating Atlantic salmon smolts with low levels of gill Na+, K+ -ATPase activity; is sea entry delayed? Environ. Biol. Fishes 90, 317–321.

Sumpter, J.P., 1997. The endocrinology of stress, i: Fish Stress and Health in Aquaculture. s. 95–118.

Virtanen, E., Soivio, A., 1985. The patterns of cortisol and Na+-K+-ATPase during smoltification of hatchery-reared Salmo salar and comparison with wild smolts. Aquaculture 45, 97–109.

Xiong, F., Zhang, L., 2013. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. Front. Neuroendocrinol. 34, 27–46.

Zaugg, W.S., Wagner, H.H., 1973. Gill ATPase activity related to parr-smolt transformation and migration in steelhead trout (Salmo gairdneri): influence of photoperiod and temperature. Comp. Biochem. Physiol. 45, 955–965.

Appendiks 1 Kortisol; utstyr, fremgangsmåte og kjemikalier

Tabell1.1:RIA buffer

Kjemikalier	Mengde
Gelatin (Prolabo)	1,00g
NaH2PO4 + 2H2O (Fluka Chemie AG, CH-9470, Buchs)	4,38g
Na2HPO4 + 12H2O (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany)	21,84g
NaCl (Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany)	9,00g
NA-azid, 5 % løsning	1ml

Gelatinen løses i ca. 200ml varmt dH_2O og resten av saltene løses i ca. 700ml dH_2O. Når dette er blandet sammen ble det tilsatt Na-azid og rørt før alt ble helt over i en målekolbe og fylt opp til en liter

Tracer (3H – merket steroid)
Beregnet til at skulle gå med 4,3ml per assay og da ganget jeg opp i alt ettersom hvor mange assay jeg skulle ha. Løsningen av tracer blandet i alkohol som jeg brukte var 14µl/ml, dette ganget jeg med antall ml som jeg hadde bestemt å lage og fikk da ut hvor mange µl ^3H som jeg skulle ta ut og blande med RIA-buffer.

Antistoff
Var allerede fortynnet 10 ganger og det ble bestemt at jeg skulle bruke en 10 000X fortynning av det for å få rundt 50 % TB. Dette var på bakgrunn av at det ble laget ny tracer og antistoffet band veldig godt til denne. Ble beregnet 17ml RIA-buffer til hvert assay, dette ble gjort om til µl og delt på 1000 for å få mengde antistoff som skulle tilsettes til RIA-buffer for å få den rette fortynningen.

Standardkurve
Standardkurven ble laget av et steroid løst i alkohol (500µg/ml). Ti sentrifugerør merkes S1-S9. 20 µl av 500µg/ml løsning blir løst opp i 1980µl RIA-buffer (5000X fortynning). Videre blir 20µl av 5000x fortynningen blandet med 2480µl RIA-buffer, denne blir merket S9. Fra S9 røret blir det tatt 1ml og blandet med 1ml RIA-buffer (1:1 løsning), det blir S8. Man lager 1:1 løsning på de resterende sentrifugerørerne.

DCC
Dextran coated charcoal (DCC) lages ved at Charcoal activated (1,00g) og Dextran T70 (0,1g) blandes med 100ml RIA-buffer og røres på is i ca. en time ved førstegangsbruk. Før hver gang blandingen brukes (hvis den har stått en stund) må den røres på is i 10-15 minutter.

Ekstrahering av kortisol

Kortisol ble ekstrahert fra blodplasmaet ved eter ekstraksjon. Det ble pipettert ut 150µl prøve plasma til 16*120 (dimensjon) rør for og så tilsette 4 ml dietyleter. Dette ble mikset i 4 min på 1200 rpm med kork, overflyttet til stativ og fikk stå i ro i tre minutter. Det dannes da en organisk fase, som inneholder kortisolet, og en vannfase. For å få ut den organiske fasen ble prøvene satt i i flytende nitrogen i ca. 15 sekunder. I løpet av denne tiden frøs vannfasen, mens den organiske fasen ennå var flytende på grunn av et lavere frysepunkt. Vi dekanterte så den organiske fasen over til 12*75 (dimensjon) rør og overførte den til vannbad (45 grader i ca. 20 minutter). Dette ble gjort for å fordampe dietyleteren slik at man satt igjen med ufortynnet steroid. Når prøvene hadde stått i vannbad ble de satt tørt og blåst av med N_2 gass til lukten av dietylether var borte. Prøven ble så tilsatt 450µl RIA buffer slik at man hadde en 3x fortynning av løsningen og vortexet i ca. 15 sek og satt på nytt i varmebad (45 grader) i ca. fem minutter. Etter varmebadet ble prøvene vortexet på nytt i ca. 15 sekunder før de ble overført til eppendorfrør og oppbevart ved -20 °C til analysen skulle gjennomføres. Arbeidsløsningene tricer, antistoff, standardkurve og DCC ble forberedt før analysen kunne fullføres.

Tabell 1.2 : Blandingsforhold ved analyse av mengde kortisol:

Når man analyserer mengde kortisol blander man reagensene etter følgende oppskrift og lar de innkubere over natten (minimum 15-16 timer) for at reaksjonen skal oppnå likevekt.

	Buffer	Standard	Prøve	3H	Antistoff
TC	600	-	-	50	-
TB	100	-	-	50	200
NBS	300	-	-	50	-
Std. S1 - S9	50	50	-	50	200
Prøve 1-30	-	-	100	50	200

TB: Total binding som skjer mellom markert Ag og As i fravær av konkurranse fra standard eller umerket hormon

TC: total mengde radioaktivitet som er tilsatt. Denne prøven separeres ikke med DCC.

NSB: Mengde radioaktivitet som er igjen etter separeringen reflekterer hvor effektiv separeringen har vært.

Dagen etter tilsettes 300µl DCC med multipipette til hvert av rørene og inkuberes i 5min. Skal ikke gå mer enn 5min fra det siste røret får tilsatt DCC til sentrifugen blir satt på (5min, 4200rpm). Når sentrifugen er ferdig settes prøvene på is og supernatanten dekanteres over i tellerør. Når dekanteringen er ferdig tas TC ut av kjøleskapet og alle tellerørene tilsettes 7ml Ultima Gold XR scintillasjons væske. Prøvene ble godt ristet og telt på 5min i en β-teller (Tri-Carb 2900TR Liquid Scintillation Aalyzer).

Appendiks 2: Na^+/K^+-ATPase Kjemikalier

Tabell 2.1: SEI-buffer

Kjemikalier	Konsentrasjon	Mengde (g)
Succrose (BDH *Labratory supplies poole,* 102745C*)*	150	26,67
Na_2EDTA/Titriolex III (Merck, 8418)	10	1,86
Imidazol (Sigma 56750)	50	1,7

Disse kjemikaliene ble løst i 475ml dH_2O og pH ble justert opp til 7,3 med HCl. Til slutt blir det fylt opp til 500ml med dH_2O.

Tabell 2. 2: 0,5 % SEID

Kjemikalier	Mengde
Natriumdeoksycholat (Sigma D-6750)	0,1 gram
SEI-buffer	20 ml

Tabell 2.3: Imidazole buffer

Kjemikalier	Mengde
Imidazole	1,702 gram
dH_2O	475 ml

Tabell 2.4: Saltløsning

Kjemikalier	Konsentrasjon	Mengde (g)	Mengde (ml)
NaCl	189	5,52	
$MgCl_2$ * $6H_2O$	10,5	1,07	
KCl	42	1,57	
Imidazole buffer			500

Tabell 2.5: PEP

Kjemikalier	Mengde
Phosphoenolpyruvate (Sigma, P-7002)	0,491 gram
Imidazole buffer	100 ml

Den som ble brukt var allerede laget i januar 2014 og hadde vært oppbevart ved -80 °C i biofryser.

Tabell 2.6: Oubain

Kjemikalier	Mengde
Oubain (Sigma, O-3125)	0,382 gram
Imidazole buffer	50 ml

Oubain ble løst opp i buffer som var i kokende vannbad under røring og under avtrekk. Løsningen oppbevart i flaske som ble pakket inn i sølvfolie og oppbevart mørkt fordi oubain er følsomt for lys.

Tabell 2.7: AM-medium

Kjemikalier	Mengde 4 mikroplater
Pyruvat Kinase (Sigma, p-1506)	48 µl
Lactic Dehydrogenase (Sigma, L-2500)	62 µl
NADH (Sigma, 340-105)	10 mg
PEP	10 ml
ATP (Sigma, A-7699)	0,029 gram
Imidazole buffer	70 ml

Appendiks 3: Statistikk vekt og lengde SWT

Gjennomsnittlig vekt og lengde for SWT

	Vekt			
	Januar	Februar	Februar	Mars
	31.01.2014	14.02.2014	28.02.2014	14.03.2014
Kontroll	53,71	59,10	78,22	87,17
Behandling 1	60,10	57,64	72,01	82,57
Behandling 2	57,99	60,28	74,36	77,40
Behandling 3	65,41	61,82	92,03	97,40

	Lengde			
	Januar	Februar	Februar	Mars
	31.01.2014	14.02.2014	28.02.2014	14.03.2014
Kontroll	16,37	16,99	18,55	19,44
Behandling 1	16,70	16,98	18,14	19,25
Behandling 2	16,74	17,23	18,28	18,92
Behandling 3	17,47	17,37	19,57	20,20

Tabell 3.1: Normalitet lengde og vekt SWT. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Lengde D1	.983	80	.362
Lengde D2	.975	80	.124
Lengde D3	.973	80	.088
Lengde D4	.990	80	.791
Vekt D1	.984	80	.423
Vekt D2	.988	80	.633
Vekt D2	.989	80	.715
Vekt D2	.989	80	.727

Tabell 3.2: ANOVA mellom behandlinger. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lengde D1	Between Groups	12.940	3	4.313	4.670	.005
	Within Groups	70.202	76	.924		
	Total	83.142	79			

Lengde D2	Between Groups	2.199	3	.733	.986	.404
	Within Groups	56.531	76	.744		
	Total	58.730	79			
LengdeD3	Between Groups	24.963	3	8.321	8.918	.000
	Within Groups	70.913	76	.933		
	Total	95.876	79			
LengdeD4	Between Groups	18.125	3	6.042	6.282	.001
	Within Groups	73.093	76	.962		
	Total	91.218	79			
Vekt D1	Between Groups	.368	3	.123	4.088	.010
	Within Groups	2.278	76	.030		
	Total	2.646	79			
Vekt D2	Between Groups	.074	3	.025	.945	.423
	Within Groups	1.995	76	.026		
	Total	2.069	79			
Vekt D3	Between Groups	.710	3	.237	7.882	.000
	Within Groups	2.282	76	.030		
	Total	2.992	79			
Vekt D4	Between Groups	.592	3	.197	7.112	.000
	Within Groups	2.110	76	.028		
	Total	2.702	79			

Tabell 3.3: Tukey HSD mellom behandlinger. 1=kontrollgruppe, 2 = Behandlingsgruppe 1, 3 = Behandlingsgruppe 3 og 4 = Behandlingsgruppe 3. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

Dependent Variable			Std. Error	Sig.	Dependent Variable			Std. Error	Sig.
Lengde D1	1	2	,3039	,709	Vekt D1	1	2	,054749	,164
		3	,3039	,618			3	,054749	,529
		4	,3039	,003			4	,054749	,005
	2	1	,3039	,709		2	1	,054749	,164
		3	,3039	,999			3	,054749	,882
		4	,3039	,060			4	,054749	,548
	3	1	,3039	,618		3	1	,054749	,529
		2	,3039	,999			2	,054749	,882
		4	,3039	,085			4	,054749	,174
	4	1	,3039	,003		4	1	,054749	,005

		2	,3039	,060			2	,054749	,548
		3	,3039	,085			3	,054749	,174
Lengde D2	1	2	,2727	1,000	Vekt D2	1	2	,051233	,923
		3	,2727	,806			3	,051233	,968
		4	,2727	,507			4	,051233	,755
	2	1	,2727	1,000		2	1	,051233	,923
		3	,2727	,786			3	,051233	,700
		4	,2727	,485			4	,051233	,374
	3	1	,2727	,806		3	1	,051233	,968
		2	,2727	,786			2	,051233	,700
		4	,2727	,960			4	,051233	,950
	4	1	,2727	,507		4	1	,051233	,755
		2	,2727	,485			2	,051233	,374
		3	,2727	,960			3	,051233	,950
Lengde D3	1	2	,3055	,529	Vekt D3	1	2	,054798	,479
		3	,3055	,813			3	,054798	,782
		4	,3055	,007			4	,054798	,019
	2	1	,3055	,529		2	1	,054798	,479
		3	,3055	,964			3	,054798	,959
		4	,3055	,000			4	,054798	,000
	3	1	,3055	,813		3	1	,054798	,782
		2	,3055	,964			2	,054798	,959
		4	,3055	,000			4	,054798	,001
	4	1	,3055	,007		4	1	,054798	,019
		2	,3055	,000			2	,054798	,000
		3	,3055	,000			3	,054798	,001
Lengde D4	1	2	,3101	,933	Vekt D4	1	2	,052688	,737
		3	,3101	,352			3	,052688	,090
		4	,3101	,066			4	,052688	,164
	2	1	,3101	,933		2	1	,052688	,737
		3	,3101	,712			3	,052688	,529
		4	,3101	,014			4	,052688	,014
	3	1	,3101	,352		3	1	,052688	,090
		2	,3101	,712			2	,052688	,529
		4	,3101	,000			4	,052688	,000
	4	1	,3101	,066		4	1	,052688	,164
		2	,3101	,014			2	,052688	,014
		3	,3101	,000			3	,052688	,000

Appendiks 4: Statistikk vekt, lengde og kondisjonsfaktor FW

Tabell 4.1: Normalitet test lengde og vekt. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak..

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Lengde D1	.971	48	.270
Lengde D2	.976	48	.421
Lengde D3	.967	48	.185
Lengde D4	.958	48	.084
Vekt D1	.959	48	.090
Vekt D2	.981	48	.622
Vekt D3	.971	48	.288
Vekt D4	.952	48	.049

Tabell 4.2: ANOVA FW lengde og vekt mellom behandlinger. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

		Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
LDag1LN	Between Groups	.013	3	.004	1.723	.176
	Within Groups	.107	44	.002		
	Total	.119	47			
Lengde D2	Between Groups	.034	3	.011	5.334	.003
	Within Groups	.093	44	.002		
	Total	.127	47			
Lengde D3	Between Groups	.035	3	.012	3.519	.023
	Within Groups	.146	44	.003		
	Total	.181	47			
Lengde Dag4	Between Groups	.025	3	.008	3.474	.024
	Within Groups	.107	44	.002		
	Total	.132	47			
Vekt D1	Between Groups	.192	3	.064	4.313	.009
	Within Groups	.654	44	.015		
	Total	.847	47			
Vekt	Between Groups	.325	3	.108	4.786	.006

D2	Within Groups	.995	44	.023		
	Total	1.320	47			
Vekt D3	Between Groups	.289	3	.096	3.009	.040
	Within Groups	1.407	44	.032		
	Total	1.696	47			
Vekt D4	Between Groups	.277	3	.092	3.097	.036
	Within Groups	1.310	44	.030		
	Total	1.587	47			

Tabell 4.3: Tukey HSD, forskjeller mellom behandlingsgrupper. 1=kontrollgruppe, 2 = Behandlingsgruppe 1, 3 = Behandlingsgruppe 3 og 4 = Behandlingsgruppe 3. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

Dependent Variable			Std. Error	Sig.	Dependent Variable			Std. Error	Sig.
Lengde D1	1	2	,020085	,854	Vekt D1	1	2	,049784	,972
		3	,020085	,417			3	,049784	,101
		4	,020085	,156			4	,049784	,020
	2	1	,020085	,854		2	1	,049784	,972
		3	,020085	,876			3	,049784	,234
		4	,020085	,542			4	,049784	,059
	3	1	,020085	,417		3	1	,049784	,101
		2	,020085	,876			2	,049784	,234
		4	,020085	,934			4	,049784	,904
	4	1	,020085	,156		4	1	,049784	,020
		2	,020085	,542			2	,049784	,059
		3	,020085	,934			3	,049784	,904
Lengde D2	1	2	,018779	,451	Vekt D2	1	2	,061401	,596
		3	,018779	,991			3	,061401	,942
		4	,018779	,011			4	,061401	,027
	2	1	,018779	,451		2	1	,061401	,596
		3	,018779	,292			3	,061401	,277
		4	,018779	,300			4	,061401	,352
	3	1	,018779	,991		3	1	,061401	,942
		2	,018779	,292			2	,061401	,277
		4	,018779	,005			4	,061401	,006
	4	1	,018779	,011		4	1	,061401	,027
		2	,018779	,300			2	,061401	,352

		3	,018779	,005			3	,061401	,006
Lengde D3	1	2	,023501	,932	Vekt D3	1	2	,073008	,687
		3	,023501	,959			3	,073008	,763
		4	,023501	,130			4	,073008	,417
	2	1	,023501	,932		2	1	,073008	,687
		3	,023501	1,000			3	,073008	,999
		4	,023501	,034			4	,073008	,051
	3	1	,023501	,959		3	1	,073008	,763
		2	,023501	1,000			2	,073008	,999
		4	,023501	,043			4	,073008	,069
	4	1	,023501	,130		4	1	,073008	,417
		2	,023501	,034			2	,073008	,051
		3	,023501	,043			3	,073008	,069
Lengde D4	1	2	,020142	,967	Vekt D4	1	2	,070442	,976
		3	,020142	1,000			3	,070442	,881
		4	,020142	,080			4	,070442	,193
	2	1	,020142	,967		2	1	,070442	,976
		3	,020142	,951			3	,070442	,988
		4	,020142	,027			4	,070442	,084
	3	1	,020142	1,000		3	1	,070442	,881
		2	,020142	,951			2	,070442	,988
		4	,020142	,093			4	,070442	,040
	4	1	,020142	,080		4	1	,070442	,193
		2	,020142	,027			2	,070442	,084
		3	,020142	,093			3	,070442	,040

Tabell 4.4: ANOVA Forandring over tid for vekt og lengde K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Lengde K	Between Groups	.176	3	.059	18.495	.000
	Within Groups	.140	44	.003		
	Total	.316	47			
Lengde B1	Between Groups	.110	3	.037	14.812	.000
	Within Groups	.109	44	.002		
	Total	.220	47			
Lengde B2	Between Groups	.152	3	.051	20.056	.000
	Within Groups	.112	44	.003		

	Total	.264	47			
Lengde B3	Between Groups	.174	3	.058	27.808	.000
	Within Groups	.092	44	.002		
	Total	.266	47			
Vekt K	Between Groups	1.007	3	.336	13.562	.000
	Within Groups	1.089	44	.025		
	Total	2.097	47			
Vekt B1	Between Groups	.632	3	.211	9.729	.000
	Within Groups	.952	44	.022		
	Total	1.584	47			
Vekt B2	Between Groups	.596	3	.199	7.301	.000
	Within Groups	1.197	44	.027		
	Total	1.794	47			
Vekt B3	Between Groups	.867	3	.289	11.275	.000
	Within Groups	1.128	44	.026		
	Total	1.994	47			

Tabell 4.5: Tukey HDS for Lengde og vekt over tid. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3. 1 = første uttak, 2 =r andre uttak, 3 = tredje uttak og 4 = fjerde uttak.

Dependent Variable			Sig.	Dependent Variable			Sig.
Lengde K	1	2	,984	Vekt K	1	2	,952
		3	,020			3	,016
		4	,000			4	,000
	2	1	,984		2	1	,952
		3	,049			3	,059
		4	,000			4	,000
	3	1	,020		3	1	,016
		2	,049			2	,059
		4	,005			4	,071
	4	1	,000		4	1	,000
		2	,000			2	,000
		3	,005			3	,071
Lengde B1	1	2	,753	Vekt B1	1	2	,453
		3	,221			3	,367
		4	,000			4	,000

	2	1	,753	2	1 ,453
		3	,773		3 ,999
		4	,000		4 ,003
	3	1	,221	3	1 ,367
		2	,773		2 ,999
		4	,001		4 ,005
	4	1	,000	4	1 ,000
		2	,000		2 ,003
		3	,001		3 ,005
Lengde B2	1	2	,516	Vekt B2	1 2 ,309
		3	,559		3 ,998
		4	,000		4 ,030
	2	1	,516	2	1 ,309
		3	,047		3 ,227
		4	,000		4 ,000
	3	1	,559	3	1 ,998
		2	,047		2 ,227
		4	,000		4 ,048
	4	1	,000	4	1 ,030
		2	,000		2 ,000
		3	,000		3 ,048
Lengde B3	1	2	,492	Vekt B3	1 2 ,776
		3	,001		3 ,075
		4	,000		4 ,000
	2	1	,492	2	1 ,776
		3	,034		3 ,422
		4	,000		4 ,000
	3	1	,001	3	1 ,075
		2	,034		2 ,422
		4	,001		4 ,026
	4	1	,000	4	1 ,000
		2	,000		2 ,000
		3	,001		3 ,026

Tabell 4.6: Normalitet test kondisjonsfaktor. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

Tests of Normality				
	Behandling	Shapiro-Wilk		
		Statistic	df	Sig.
D1	1	.502	12	.000
	2	.910	12	.212
	3	.927	12	.351
	4	.865	12	.057
D2	1	.981	12	.987
	2	.878	12	.083
	3	.947	12	.597
	4	.898	12	.148
D3	1	.918	12	.271
	2	.872	12	.070
	3	.910	12	.215
	4	.815	12	.014
D4	1	.953	12	.674
	2	.953	12	.685
	3	.896	12	.139
	4	.864	12	.056

Tabell 4.7: Levine's test kondisjonsfaktor. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
D1	2.148	3	44	.108
D2	1.038	3	44	.385
D3	.554	3	44	.648
D4	7.017	3	44	.001

Tabell 4.8: ANOVA kondisjonsfaktor mellom behandlingsgrupper D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
D1	Between Groups	.006	3	.002	1.280	.293
	Within Groups	.068	44	.002		
	Total	.074	47			
D2	Between Groups	.001	3	.000	.351	.789
	Within Groups	.028	44	.001		
	Total	.029	47			
D3	Between Groups	.004	3	.001	3.017	.040
	Within Groups	.022	44	.000		
	Total	.026	47			
D4	Between Groups	.007	3	.002	1.891	.145
	Within Groups	.055	44	.001		
	Total	.062	47			

Tabell 4.9: Tukey HSD kondisjonsfaktor mellom behandlingsgrupper. 1=kontrollgruppe, 2 = Behandlingsgruppe 1, 3 = Behandlingsgruppe 3 og 4 = Behandlingsgruppe 3. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

Dependent			Sig.	Dependent			Sig.
D1	1	2	.785	D3	1	2	.103
		3	.865			3	.134
		4	.888			4	.046
	2	1	.785		2	1	.103
		3	.330			3	.999
		4	.358			4	.985
	3	1	.865		3	1	.134
		2	.330			2	.999
		4	1.000			4	.962
	4	1	.888		4	1	.046
		2	.358			2	.985
		3	1.000			3	.962
D2	1	2	.987	D4	1	2	1.000
		3	.761			3	.201

		4	.995			4	.999
	2	1	.987		2	1	1.000
		3	.917			3	.217
		4	1.000			4	.999
	3	1	.761		3	1	.201
		2	.917			2	.217
		4	.880			4	.264
	4	1	.995		4	1	.999
		2	1.000			2	.999
		3	.880			3	.264

* The mean difference is significant at the 0.05 level.

4.10 ANOVA Kondisjonsfaktor over tid. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
K-Faktor K	Between Groups	.024	3	.008	8.708	.000
	Within Groups	.040	44	.001		
	Total	.063	47			
K-Faktor B1	Between Groups	.018	3	.006	4.552	.007
	Within Groups	.056	44	.001		
	Total	.074	47			
K-Faktor B2	Between Groups	.057	3	.019	25.818	.000
	Within Groups	.033	44	.001		
	Total	.090	47			
K-Faktor B3	Between Groups	.032	3	.011	10.606	.000
	Within Groups	.044	44	.001		
	Total	.076	47			

Tabell 4.11: Tukey HDS for Kondisjonsfaktor over tid. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3. Første uttak = 1, andre uttak = 2, tredje uttak = 3 og fjerde uttak = 4

Dependent Variable			Sig.	Dependent Variable			Sig.
K-Faktor K	1	2	,987	K-Faktor B2	1	2	,358
		3	,964			3	,007
		4	,001			4	,000
	2	1	,987		2	1	,358
		3	,848			3	,292
		4	,000			4	,000
	3	1	,964		3	1	,007
		2	,848			2	,292
		4	,003			4	,000
	4	1	,001		4	1	,000
		2	,000			2	,000
		3	,003			3	,000
K-Faktor B1	1	2	,709	K-Faktor B3	1	2	,868
		3	,842			3	,012
		4	,073			4	,000
	2	1	,709		2	1	,868
		3	,244			3	,079
		4	,005			4	,001
	3	1	,842		3	1	,012
		2	,244			2	,079
		4	,347			4	,296
	4	1	,073		4	1	,000
		2	,005			2	,001
		3	,347			3	,296

Appendiks 5: Statistikk osmolaritet og Cl^-

Tabell 5.1: Normalitet test vekt og lengde. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
$mOsm \cdot l^{-1}$ D1	.956	79	.008
$mOsm \cdot l^{-1}$ D2	.978	79	.186
$mOsm \cdot l^{-1}$ D3	.979	79	.216
$mOsm \cdot l^{-1}$ D4	.814	79	.000
$mmol \cdot l^{-1}$ Cl D1	.982	79	.311
$mmol \cdot l^{-1}$ Cl D2	.972	79	.077
$mmol \cdot l^{-1}$ Cl D3	.950	79	.004
$mmol \cdot l^{-1}$ Cl D4	.836	79	.000

Tabell 5.2: Levine's test . D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
$mOsm \cdot l^{-1}$ D1	4.085	3	76	.010
$mOsm \cdot l^{-1}$ D2	1.599	3	75	.197
$mOsm \cdot l^{-1}$ D3	5.539	3	76	.002
$mOsm \cdot l^{-1}$ D4	2.896	3	76	.041
$mmol \cdot l^{-1} Cl^-$ D1	.426	3	76	.735
$mmol \cdot l^{-1} Cl^-$ D2	2.356	3	75	.079
$mmol \cdot l^{-1} Cl^-$ D3	1.750	3	76	.164
$mmol \cdot l^{-1} Cl^-$ D4	1.979	3	76	.124

Tabell 5.3: ANOVA osmolaritet og klorid mellom behandlinger. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
$mOsm \cdot l^{-1}$ D1	Between Groups	.004	3	.001	.643	.590
	Within Groups	.176	76	.002		
	Total	.181	79			
$mOsm \cdot l^{-1}$ D2	Between Groups	.011	3	.004	1.664	.182
	Within Groups	.169	75	.002		
	Total	.180	78			
$mOsm \cdot l^{-1}$ D3	Between Groups	.013	3	.004	6.248	.001
	Within Groups	.054	76	.001		
	Total	.067	79			
$mOsm \cdot l^{-1}$ D4	Between Groups	.009	3	.003	8.988	.000
	Within Groups	.027	76	.000		
	Total	.036	79			
$mmol \cdot l^{-1} Cl^-$ D1	Between Groups	.016	3	.005	1.841	.147
	Within Groups	.215	76	.003		
	Total	.230	79			
$mmol \cdot l^{-1} Cl^-$ D2	Between Groups	.008	3	.003	.640	.592
	Within Groups	.302	75	.004		
	Total	.310	78			
$mmol \cdot l^{-1} Cl^-$ D3	Between Groups	.002	3	.001	.632	.597
	Within Groups	.067	76	.001		
	Total	.068	79			
$mmol \cdot l^{-1} Cl^-$ D4	Between Groups	.006	3	.002	2.031	.117
	Within Groups	.071	76	.001		
	Total	.077	79			

Tabell 5.4: Tukey HSD mellom behandlingsgrupper. D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak. 1 = kontrollgruppe, 2 = Behandlingsgruppe 1, 3 = Behandlingsgruppe 3 og 4 = Behandlingsgruppe 3.

Dependent Variable			Std. Error	Sig.	Dependent Variable			Std. Error	Sig.
mOsm·l^{-1} D3	1	2	,008395	,895	mOsm·l^{-1} D4	1	2	,005906	,544
		3	,008395	,267			3	,005906	,000
		4	,008395	,011			4	,005906	,800
	2	1	,008395	,895		2	1	,005906	,544
		3	,008395	,063			3	,005906	,004
		4	,008395	,001			4	,005906	,974
	3	1	,008395	,267		3	1	,005906	,000
		2	,008395	,063			2	,005906	,004
		4	,008395	,527			4	,005906	,001
	4	1	,008395	,011		4	1	,005906	,800
		2	,008395	,001			2	,005906	,974
		3	,008395	,527			3	,005906	,001

Tabell 5.5 ANOVA Osmolaritet over tid. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
mOsm·l^{-1} K	Between Groups	.851	3	.284	128.971	.000
	Within Groups	.167	76	.002		
	Total	1.018	79			
mOsm·l^{-1} B1	Between Groups	.811	3	.270	230.574	.000
	Within Groups	.089	76	.001		
	Total	.900	79			
mOsm·l^{-1} B2	Between Groups	.543	3	.181	186.911	.000
	Within Groups	.073	75	.001		
	Total	.616	78			
mOsm·l^{-1} B3	Between Groups	.758	3	.253	199.521	.000
	Within Groups	.096	76	.001		
	Total	.854	79			

Tabell 5.6: Tukey HSD, Osmolaritet over tid. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3. . Første uttak = 1, andre uttak = 2, tredje uttak = 3 og fjerde uttak = 4

Dependent Variable			Sig.	Dependent Variable			Sig.
$mOsm \cdot l^{-1}$ K	1	2	,626	$mOsm \cdot l^{-1}$ B2	1	2	,688
		3	,000			3	,000
		4	,000			4	,000
	2	1	,626		2	1	,688
		3	,000			3	,000
		4	,000			4	,000
	3	1	,000		3	1	,000
		2	,000			2	,000
		4	,003			4	,000
	4	1	,000		4	1	,000
		2	,000			2	,000
		3	,003			3	,000
$mOsm \cdot l^{-1}$ B1	1	2	,372	$mOsm \cdot l^{-1}$ B3	1	2	,000
		3	,000			3	,000
		4	,000			4	,000
	2	1	,372		2	1	,000
		3	,000			3	,000
		4	,000			4	,000
	3	1	,000		3	1	,000
		2	,000			2	,000
		4	,002			4	,000
	4	1	,000		4	1	,000
		2	,000			2	,000
		3	,002			3	,000

Tabell: 5.7 ANOVA klorid over tid. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
mmol·l Cl^- K	Between Groups	.980	3	.327	114.131	.000
	Within Groups	.218	76	.003		
	Total	1.198	79			
mmol·$l^{-1}Cl^-$ B1	Between Groups	1.076	3	.359	208.924	.000
	Within Groups	.130	76	.002		
	Total	1.206	79			
mmol·$l^{-1}Cl^-$ B2	Between Groups	.792	3	.264	145.289	.000
	Within Groups	.136	75	.002		
	Total	.929	78			
mmol·$l^{-1}Cl^-$ B3	Between Groups	.844	3	.281	125.881	.000
	Within Groups	.170	76	.002		
	Total	1.014	79			

Tukey HSD klorid over tid. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3. . Første uttak = 1, andre uttak = 2, tredje uttak = 3 og fjerde uttak = 4.

Dependent Variable			Sig.	Dependent Variable			Sig.
mmol·$l^{-1}Cl^-$ K	1	2	,833	mmol·$l^{-1}Cl^-$ B2	1	2	,619
		3	,000			3	,000
		4	,000			4	,000
	2	1	,833		2	1	,619
		3	,000			3	,000
		4	,000			4	,000
	3	1	,000		3	1	,000
		2	,000			2	,000
		4	,981			4	,945
	4	1	,000		4	1	,000
		2	,000			2	,000
		3	,981			3	,945

mmol·l^{-1}Cl^{-} B1	1	2	,987	mmol·l^{-1}Cl^{-} B3	1	2	,129
		3	,000			3	,000
		4	,000			4	,000
	2	1	,987		2	1	,129
		3	,000			3	,000
		4	,000			4	,000
	3	1	,000		3	1	,000
		2	,000			2	,000
		4	,973			4	,979
	4	1	,000		4	1	,000
		2	,000			2	,000
		3	,973			3	,979

Appendiks 6: Statistikk for Na^+/K^+-ATPase og Kortisol

Tabell 6.1: Normalitet test kortisol og NKA. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

	Shapiro-Wilk		
	Statistic	df	Sig.
Kort D1	.978	40	.634
Kort D2	.968	40	.301
Kort D3	.437	40	.000
Kort D4	.967	40	.282
NKA D1	.953	40	.096
NKA D2	.862	40	.000
NKA D3	.922	40	.009
NKA D4	.920	40	.008

Tabell 6.2: Levine's test NKA og Kortisol. D1 er første uttak, D2 er andre uttak, D3 er tredje uttak og D4 er fjerde uttak.

	Levene Statistic	df1	df2	Sig.
NKA D1	1.705	3	41	.181
NKA D2	1.956	3	44	.134
NKA D3	1.787	3	43	.164
NKAD4	2.529	3	40	.071
Kort D1	2.725	3	43	.056
Kort D2	.939	3	44	.430
Kort D3	2.588	3	44	.065
Kort D4	1.931	3	44	.138

Tabell 6.3: ANOVA NKA, D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
NKA D1	Between Groups	2.047	3	.682	1.822	.157
	Within Groups	16.102	43	.374		
	Total	18.149	46			
NKA D2	Between Groups	1.686	3	.562	.910	.444
	Within Groups	27.166	44	.617		
	Total	28.852	47			
NKA D3	Between Groups	2.048	3	.683	4.987	.005
	Within Groups	5.887	43	.137		
	Total	7.935	46			
NKA D4	Between Groups	4.984	3	1.661	2.854	.049
	Within Groups	23.864	41	.582		
	Total	28.847	44			

Tabell 6.4: Tukey HDS NKA. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak. 1 = kontrollgruppe, 2 = Behandlingsgruppe 1, 3 = Behandlingsgruppe 3 og 4 = Behandlingsgruppe 3.

Dependent Variable		Std. Error	Sig.	Dependent Variable		Std. Error	Sig.
NKA D1	1 2	,255434	,994	NKA D3	1 2	,154446	,005
	3	,255434	,398		3	,154446	,037
	4	,255434	,515		4	,154446	,554
	2 1	,255434	,994		2 1	,154446	,005
	3	,249819	,251		3	,151051	,872
	4	,249819	,347		4	,151051	,120
	3 1	,255434	,398		3 1	,154446	,037
	2	,249819	,251		2	,151051	,872
	4	,249819	,997		4	,151051	,439
	4 1	,255434	,515		4 1	,154446	,554
	2	,249819	,347		2	,151051	,120
	3	,249819	,997		3	,151051	,439
NKA D2	1 2	,320782	,898	NKA D4	1 2	,318460	,980
	3	,320782	,995		3	,325310	,049
	4	,320782	,801		4	,325310	,824

2	1	,320782	,898	2	1	,318460	,980
	3	,320782	,969		3	,318460	,102
	4	,320782	,388		4	,318460	,959
3	1	,320782	,995	3	1	,325310	,049
	2	,320782	,969		2	,318460	,102
	4	,320782	,660		4	,325310	,277
4	1	,320782	,801	4	1	,325310	,824
	2	,320782	,388		2	,318460	,959
	3	,320782	,660		3	,325310	,277

Tabell 6.5: ANOVA kortisol D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kort D1	Between Groups	.361	3	.120	.512	.676
	Within Groups	10.114	43	.235		
	Total	10.475	46			
Kort D2	Between Groups	.468	3	.156	.673	.573
	Within Groups	10.193	44	.232		
	Total	10.661	47			
Kort D3	Between Groups	5.739	3	1.913	9.038	.000
	Within Groups	9.313	44	.212		
	Total	15.052	47			
Kort D4	Between Groups	1.705	3	.568	2.249	.096
	Within Groups	11.114	44	.253		
	Total	12.819	47			

Tabell 6.6: Tukey HSD kortisol. D1 = første uttak, D2 = andre uttak, D3 = tredje uttak og D4 = fjerde uttak. 1 = kontrollgruppe, 2 = Behandlingsgruppe 1, 3 = Behandlingsgruppe 3 og 4 = Behandlingsgruppe 3.

Dependent Variable			Sig.	Dependent Variable			Sig.
Kort D1	1	2	,909	Kort D3	1	2	,000

		3	,851			3	,003
		4	,995			4	,460
	2	1	,909		2	1	,000
		3	,999			3	,786
		4	,801			4	,013
	3	1	,851		3	1	,003
		2	,999			2	,786
		4	,727			4	,123
	4	1	,995		4	1	,460
		2	,801			2	,013
		3	,727			3	,123
Kort D2	1	2	,805	Kort D4	1	2	,250
		3	1,000			3	,994
		4	,964			4	,981
	2	1	,805		2	1	,250
		3	,767			3	,157
		4	,521			4	,122
	3	1	1,000		3	1	,994
		2	,767			2	,157
		4	,977			4	,999
	4	1	,964		4	1	,981
		2	,521			2	,122
		3	,977			3	,999

Tabell 6.7: ANOVA forandring over tid for kortisol og NKA. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3.

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Kortisol K	Between Groups	21.627	3	7.209	43.068	.000
	Within Groups	7.365	44	.167		
	Total	28.992	47			
Kortisol B1	Between Groups	27.503	3	9.168	41.774	.000
	Within Groups	9.656	44	.219		
	Total	37.159	47			
Kortisol B2	Between Groups	34.130	3	11.377	33.901	.000
	Within Groups	14.430	43	.336		
	Total	48.560	46			

Kortisol B3	Between Groups	27.063	3	9.021	42.758	.000
	Within Groups	9.283	44	.211		
	Total	36.346	47			
NKA K	Between Groups	9.202	3	3.067	5.705	.002
	Within Groups	22.044	41	.538		
	Total	31.246	44			
NKA B1	Between Groups	6.351	3	2.117	7.143	.001
	Within Groups	13.040	44	.296		
	Total	19.391	47			
NKA B2	Between Groups	5.363	3	1.788	3.960	.014
	Within Groups	19.413	43	.451		
	Total	24.776	46			
NKA B3	Between Groups	9.783	3	3.261	7.571	.000
	Within Groups	18.521	43	.431		
	Total	28.305	46			

Tabell 6.8: Tukey HSD forandring over tid for kortisol og NKA. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3. Første uttak = 1, andre uttak = 2, tredje uttak = 3 og fjerde uttak = 4

Dependent Variable			Sig.	Dependent Variable			Sig.
Kortisol K	1	2	,653	NKA K	1	2	,918
		3	,000			3	,018
		4	,000			4	,011
	2	1	,653		2	1	,918
		3	,000			3	,071
		4	,000			4	,048
	3	1	,000		3	1	,018
		2	,000			2	,071
		4	,001			4	,998
	4	1	,000		4	1	,011
		2	,000			2	,048
		3	,001			3	,998
Kortisol B1	1	2	,931	NKA B1	1	2	,976
		3	,000			3	,390
		4	,000			4	,003
	2	1	,931		2	1	,976

		3	,000			3	,199
		4	,000			4	,001
	3	1	,000		3	1	,390
		2	,000			2	,199
		4	,029			4	,152
	4	1	,000		4	1	,003
		2	,000			2	,001
		3	,029			3	,152
Kortisol B2	1	2	,998	NKA B2	1	2	,241
		3	,000			3	,007
		4	,000			4	,215
	2	1	,998		2	1	,241
		3	,000			3	,434
		4	,000			4	1,000
	3	1	,000		3	1	,007
		2	,000			2	,434
		4	,994			4	,518
	4	1	,000		4	1	,215
		2	,000			2	1,000
		3	,994			3	,518
Kortisol B3	1	2	,293	NKA B3	1	2	,016
		3	,000			3	,001
		4	,000			4	,001
	2	1	,293		2	1	,016
		3	,000			3	,731
		4	,000			4	,790
	3	1	,000		3	1	,001
		2	,000			2	,731
		4	,043			4	1,000
	4	1	,000		4	1	,001
		2	,000			2	,790
		3	,043			3	1,000

Appendiks 7: Korrelasjon kortisol og NKA

Tabell 7.1: Korrelasjon behandlingsgrupper på siste prøveuttak. K = Kontrollgruppe, B1 = Behandlingsgruppe1, B2 = Behandlingsgruppe 2, B3 = Behandlingsgruppe 3

Korrelasjon kontrollgrupper

		Kortisol K	NKA K
Kortisol K	Pearson Correlation	1	-.356
	Sig. (2-tailed)		.282
	N	12	11
NKA K	Pearson Correlation	-.356	1
	Sig. (2-tailed)	.282	
	N	11	11

Korrelasjon behandlingsgruppe 1

		Kortisol B1	NKA B1
Kortisol B1	Pearson Correlation	1	.034
	Sig. (2-tailed)		.917
	N	12	12
NKA B1	Pearson Correlation	.034	1
	Sig. (2-tailed)	.917	
	N	12	12

Korrelasjon behandlingsgruppe 2

		Kortisol B2	NKA B2
Kortisol B2	Pearson Correlation	1	.381
	Sig. (2-tailed)		.248
	N	12	11
NKA B2	Pearson Correlation	.381	1
	Sig. (2-tailed)	.248	
	N	11	11

Korrelasjon behandlingsgruppe 3

		Kortisol B3	NKA B3
Kortisol B3	Pearson Correlation	1	.408
	Sig. (2-tailed)		.212
	N	12	11
NKA B3	Pearson Correlation	.408	1
	Sig. (2-tailed)	.212	
	N	11	11