

# **Fysiologiske responser på handtering hos**

## **Flekksteinbit**

*(Anarhichas minor* Olafsen)

Mastergradsoppgave i fiskerifag (60 stp)

Studieretning oppdrettsbiologi

av

Maren Marie Thode Iversen



**Institutt for akvatisk biologi  
Norges fiskerihøgskole  
Universitetet i Tromsø  
November 2007**



Foto (forside): Per Eide. Rettigheter: EFF.

## **FORORD**

Denne oppgaven markerer slutten på min tid som student. Prosjektet er gjennomført ved institutt for akvatisk biologi (IAB) ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Jeg vil først takke min veileder, professor Even H. Jørgensen for fantastisk og tålmodig veiledning både under forsøk og i skriveprosessen. Deretter vil jeg takke min praktiske veileder Marianne Frantzen for kritisk og konstruktiv veiledning.

Videre vil jeg takke Bjørn Erik Bye, Erik Frøyland, Judith Walkers og Tanja Hanebrekke ved Norges Fiskerihøgskole for god hjelp i Kårvika og på labben. I tillegg vil jeg også takke Øyvind Aas-Hansen og Unn Sørum ved Fiskeriforskning for god hjelp på labben. Forsøkene ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Kårvika, takk til personalet der.

Takk til mine medstudenter ved NFH for en kjempe fin studietid, og spesielt takk til kollokviegruppa jeg var så heldig å få være med i. En stor takk til jentene på kontoret for oppmuntring i den hektiske tiden før innlevering.

Mine foreldre, søsken og svigerforeldre fortjener en stor takk for støtte, motivasjon og ikke minst barnepass i innspurten av oppgaven. En spesiell takk til min syrra Eline og pappa for korrekturlesing av oppgaven. Takk til venner og familie for godt vennskap og gode råd.

Sist, men ikke minst vil jeg takke min kjære Henning-Ivar og lille Albert for tålmodighet og støtte.

Maren Marie Thode Iversen

Tromsø, november 2007.



## SAMMENDRAG

Stress og fysiologiske responser på stress kan være et stort problem i oppdrett av fisk. Dette har blitt forsket mye på hos laksefisk. Flekksteinbit (*Anarhichas minor* Olafsen), er en lovende oppdrettsart. I motsetning til laksefisk synes flekksteinbit i fangenskap å være svært fortrolig med folk og handtering. Fysiologiske responser på ulike stressorer har tidligere ikke vært undersøkt hos flekksteinbit. Formålet med denne oppgaven var å beskrive de primære (endring i kortisolnivå) og sekundære (endring i glukosenivå) stressresponser på en akutt stressor (handtering og nedtapping av kar i 10 min) hos flekksteinbit. Plasma kortisolnivå viste en økning etter fire timer, men økningen var svært svak (dobling). Dette er ulikt responsen hos laksefisk, hvor plasma kortisol vanligvis når en topp mellom 0,5-1 time etter stressbelastning og viser en 10-40 gangers økning. På tross av en svært svak økning i plasma kortisol etter stress, ble det allikevel målt en økning i plasma glukosenivå (50 %) som er tilsvarende det en måler hos andre arter, og adaptivt i forhold til å handtere en stressor. På grunn av en kraftig kortisolrespons på injisert ACTH (11 gangers økning i plasma kortisol), er det konkludert at den lave kortisolresponsen på stressor hos flekksteinbit ikke er fysiologisk betinget, men heller reflekterer fiskens ”kognitive” oppfattelse av stressoren (”passive coping strategy”). Et svært lavt basalt plasma glukosenivå hos flekksteinbit reflekterer sannsynligvis denne artens normale atferd, med et svært lavt aktivitetsnivå. Undersøkelsen tyder på at flekksteinbit lett tilvenner seg et liv i fangenskap.

Nøkkelord: Flekksteinbit, *Anarhichas minor*, handtering, stressrespons, kortisol, glukose.



# INNHOLDSFORTEGNELSE

<b>FORORD</b> .....	<b>II</b>
<b>SAMMENDRAG</b> .....	<b>III</b>
<b>INNHOLDSFORTEGNELSE</b> .....	<b>IV</b>
<b>1. INNLEDNING</b> .....	<b>1</b>
1.1. Flekksteinbitens biologi.....	1
1.2. Oppdrett av flekksteinbit.....	2
1.3. Stressorer og stress responser.....	2
1.4. Stress hos fisk i oppdrett.....	4
1.5. Målsetning.....	5
<b>2. MATERIALE OG METODER</b> .....	<b>7</b>
2.1. Forsøksfisk.....	7
2.2. Pilotforsøk.....	7
2.3. Hovedforsøk: Primære og sekundære stressresponser på nedtapping av vann i kar, samt injeksjon av ACTH.....	8
2.4. Kvantifisering av kortisol.....	11
2.5. Kvantifisering av glukose.....	13
2.6. Statistikk og presentasjon av data.....	15
<b>3. RESULTATER</b> .....	<b>17</b>
3.1. Pilotforsøk.....	17
3.2. Stressforsøk.....	18
3.2.1. Stressforsøk 1.....	18
3.2.2. Stressforsøk 2.....	20
3.3. ACTH injeksjon 1.....	22
3.4. ACTH injeksjon 2.....	22
<b>4. DISKUSJON</b> .....	<b>25</b>
4.1. Kortisol (primær respons).....	25
4.2. Glukose (sekundær respons).....	30
<b>5. KONKLUSJON</b> .....	<b>32</b>
<b>6. LITTERATURLISTE</b> .....	<b>33</b>
<b>7. APPENDIKS</b> .....	<b>37</b>
7.1. Kortisolanalyse.....	37
7.2. Glukoseanalyse.....	37
7.3. Statistikk.....	38





# 1. INNLEDNING

## 1.1. Flekksteinbitens biologi

Den arktiske fisken *Anarhichas minor* Olafsen, bedre kjent som flekksteinbit, er en bentisk sedentarisk art som tilhører Anarhichadidae familien. Flekksteinbit finnes på begge sidene av Nord Atlanteren, fra Skottland til Cape Breton i den Arktiske sjø. Den lever i den kalde, åpne kontinentalsokkelen på dyp mellom 25 og 550 meter på sand eller mudderbunn (Pethon 1998). Steinbiter er store marine fisker med kraftige kjever som karakteriseres av fremtredende stavformede tenner i fronten, og store flate jeksellignende tenner på siden av kjevne (Nelson 1994). Flekksteinbiten har stort hode og en avrundet snute, med en ryggfinne som følger langs den langstrakte kroppen. Brystfinnene er store og flekksteinbiten har ikke bukfinner. Den er gulaktig eller grålig brun til mørk brun, med mange markante, svart- brune flekker på kroppen. Kroppen er naken på grunn av lite utviklede skall (McClane 1978). Ryggfinnen ender i en rekke små, frittstående piggstråler som gir forbindelse med halefinnen. Flekksteinbiten er en bunnlevende predator som hovedsakelig lever av echinodermater som sjøstjerner, kråkeboller og andre benetiske organismer som snegler, musling og fisk. Flekksteinbit kan vokse til en lengde på ca 180 cm og 26 kg, og er den største steinbitarten i Nord Europa. Flekksteinbiten er en vanlig kommersiell art som omsettes flådd og uten hode, som fersk iset eller frosset filet. Fangstene gjøres særlig på line, i garn og trål, og i de nordlige farvann som Barentshavet og på de nordnorske bankene (Pethon 1998).

De fleste marine artene, f.eks kveite (*Hippoglossus hippoglossus*) og arktisk torsk (*Gadus morhua*) er porsjongsytere med små, pelagiske egg, som ved klekking har larver som bare er et par millimeter i lengde. I motsetning til de andre marine artene gyter steinbiten store, demersale egg med samme størrelse som salmonidene (Tilseth 1990). Vekstraten til de ville steinbitene er relativt lav. Det drives også oppdrett av gråsteinbit i Norge (*Anarhichas lupus*). Denne arten later til å vokse med en lavere vekstrate enn flekksteinbit (Moksness 1994). Vill flekksteinbit vokser mest de fem første leveårene. Det første året vokser den til 14-20 cm. Etter fem år er den 45-60 cm. I vill tilstand blir flekksteinbiten vanligvis ikke kjønnsmoden før den er mellom syv og ti år (Pethon 1998).

## **1.2. Oppdrett av flekksteinbit**

For tiden er de mest aktuelle marine fiskeartene i oppdrett her i landet torsk, kveite og steinbit. Steinbitoppdrett befinner seg i det man kan kalle for et førkommersielt stadium, selv om de første oppdretterne er i gang. Interessen er økende, men bare tiden vil vise om flekksteinbit blir en av de store, nye artene i norsk fiskeoppdrett. Det er for tidlig å uttale seg om betalingsviljen i markedet siden det hittil bare er omsatt små volum av oppdrettet flekksteinbit. Samtidig er det klart positivt å kunne tilby fersk flekksteinbit jevnt gjennom hele året. (Fiskeri og havbruksnæringens landsforening, rapport: ”oppdrett av flekksteinbit”

<http://www5.nho.no/havbruksnett/steinbit/FHL%20folder%20Flekksteinbit.pdf> ).

Et av hovedproblemene med oppdrett av marine fisker er å komme over den store dødeligheten i forbindelse med startfôring (Tilseth 1990). Ved klekking er flekksteinbiten fult utviklet (Falk – Petersen & Hansen 2001) og er i likhet med salmonider klar til å kunne fôres med kommersielt fôr. Til forskjell fra oppdrett av andre marine arter som kveite, hyse og torsk kreves det ikke produksjon av levende fôr til oppdrett av steinbitarter. De fleste andre marine artene har en lengre plommesekkperiode, som representerer en periode med økt ømfintlighet for bakterier (Tilseth 1990). Flekksteinbiten er en hardfør art. Den har en høy toleransegrense til variasjoner i eksterne vannparametere som salinitet, hypoxi(a), hyperoxi(a) og ammoniakk (Foss et al. 2003 a; Foss et al. 2003 b; Foss et al. 2003 c). Siden flekksteinbiten viser lite aggressiv atferd ser den ut til å være velegnet til fiskeoppdrett (Øiestad 1999). I lengdestrømsrenner har flekksteinbit fôret med formulert flytefôr oppnådd lovende tilvekst, med vekter opp til 5,1 kg etter 4 års produksjon (Falk- Petersen et al. 1999).

## **1.3. Stressorer og stress responser**

Stress relateres til et spekter av fysiske og psykologiske påvirkninger i miljøet (”stressorer”) som er en trussel for dyrets homeostase. Stressresponser relateres til organismens generelle reaksjon, først og fremst ressursmobilisering på ulike ”stressorer”. Stressresponser kan i henhold til sin art, styrke og varighet ha både ”positive” og negative virkninger på organismen. En ”positiv” stressrespons er en adaptiv fysiologisk respons som gjør dyret i stand til å opprettholde/gjenopprette homeostasen og øker individets overlevelsesevne. Denne er først og fremst knyttet til kortvarig, akutt stress. Langvarig og kronisk stress kan derimot gi maladaptive responser. Siden dyret ikke lengre er i stand til å opprettholde/gjenopprette homeostase vil dette kunne føre til redusert evne til vekst, reproduksjon og overlevelse.

Stressbegrepet ble innført av Hans Selye med utgangspunkt i studier på mennesker (Selye 1936), men brukes nå også i forbindelse med fisk og andre dyr.

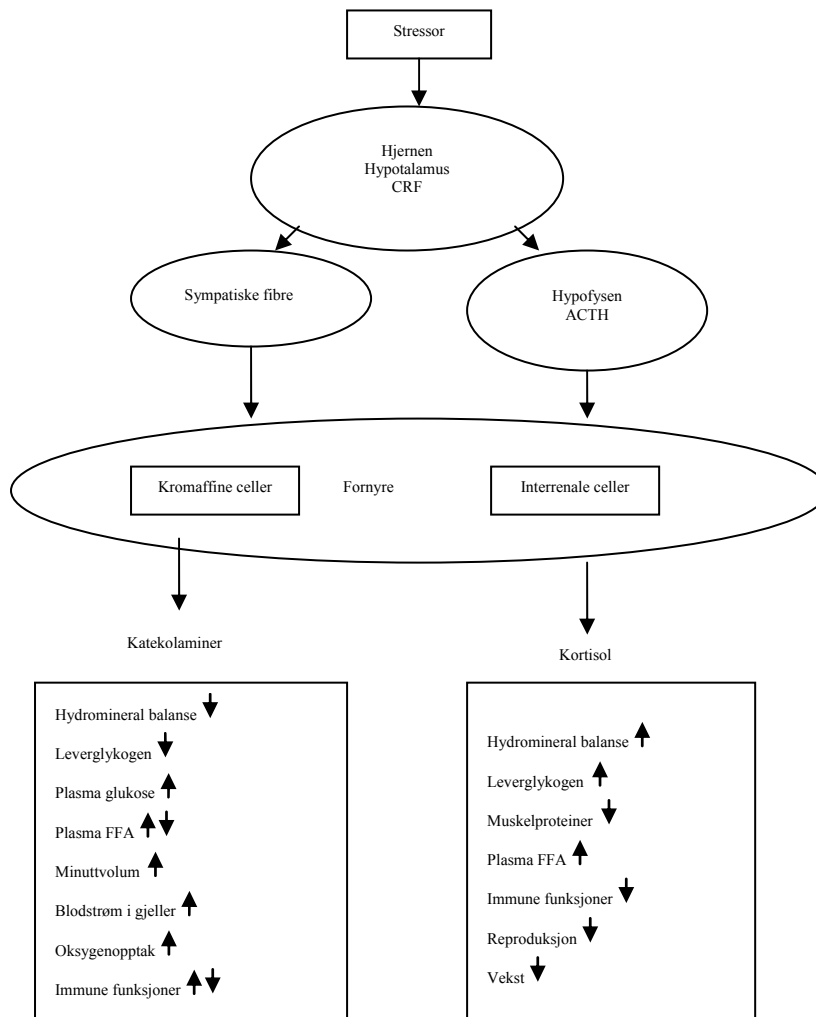
Stressresponsen kan deles inn i tre faser (Mazeaud et al. 1977; Wedemeyer & McLeay 1981).

- 1) Primære responser som omfatter neurale og neuro-endokrine responser.
- 2) Sekundære responser som omfatter de fysiologiske reaksjoner som utløses av de primære responser.
- 3) Tertiære responser omfatter blant annet endret atferd, redusert vekst og økt mottagelighet for sykdom.

Primære og sekundære responser karakteriseres som adaptive responser. De tertiære responsene er maladaptive.

Hypothalamus- hypofyse interrenal-aksen (HHI- aksen) utgjør et viktig element i virveldyrs respons på stressorer. Denne aksen har blitt nøye beskrevet for mange virveldyr. Med kortikotrofin frigjørende faktor (CRF) og adrenokortikotroft hormon (ACTH) som de viktigste stimulerende substanser, og kortisol eller kortikosterone som sluttproduktet fra hodenyren i HHI – aksen (Chrousos & Gold 1992). Hos fisk produseres kortikosteroider i de interrenale celler i fornyret. Katekolaminer (adrenalin, noradrenalin) skilles ut fra kromaffine celler i fornyren, samt direkte fra sympatiske nerver som innnerverer en lang rekke vev (Wendelaar-Bonga 1997). Økt katekolaminnivå gir endring i respirasjon, sirkulasjon, osmoregulering og metabolisme. Stimulering fra en stressor fører til aktivering av HHI – aksen som fører til utskillelse av kortikosteroider. Reaksjonen starter ved at hypothalamus skiller ut kortikotrofin frigjørende faktor. Dette stimulerer spesielle celler i hypofysen som igjen skiller ut adrenokortikotroft hormon (ACTH). Dette hormonet stimulerer til kortikosteroidsekresjon fra interrenalceller i fiskens fornyre. HHI -aksen reguleres blant annet gjennom en negativ tilbakekoblingsmekanisme, hvor kortisol virker hemmende på sekresjon av CRF og ACTH fra henholdsvis hypothalamus og hypofyse. Kortikosteroider er ikke lagringshormon, men syntetiseres umiddelbart ved behov, og passerer da lett over cellemembranen. Hos beinfisk er reseptorer for kortikosteroider funnet i hjerne, tarm, gjeller, erytrocytter, leukocyttter og hepatocyttter (Olsen 1993). Kortikosteroidene påvirker en rekke fysiologiske prosesser. Det er for eksempel vist at kortisol virker stimulerende på glukoneogenesen hos fisk ved dannelse av glukose fra nedbryting av proteiner (Storer 1967;

Chan & Woo 1978; Lidman et al. 1979; Leach & Taylor 1982; Mommsen et al. 1999). En oppsummering av responser og effekter er gitt skjematisk i figur 1.



Figur 1: Figuren viser et generalisert diagram over neuroendokrine elementer som integreres som stressrespons i beinfisk. CRF; kortikotrofin frigjørende faktor, ACTH; adrenokortikotroft hormon, FFA; frie fettsyrer, ↓ hemmende effekt, ↑ Stimulerende effekt (Kilde: Wendelaar-Bonga, 1997)

#### 1.4. Stress hos fisk i oppdrett

Stress og fysiologiske responser på stress kan være et stort problem i oppdrett av fisk. Med kronisk eller kontinuerlig stress menes betingelser fisken ikke kan rømme fra. I oppdrettssammenheng er høy tetthet og dårlig vannkvalitet typiske former for kronisk stress. Under slike forhold vil HHI-aksen aktiveres (Mazur & Iwama 1993). Håndtering av oppdrettsfisk i forbindelse med veiing, sortering, flytting og transport er nødvendige operasjoner, dette kan medføre at fisken får utløst akutte stressreaksjoner. Stress forårsaker ubalanse i den naturlige homeostase i fisk, og under forhold med gjentatt akuttstress eller kronisk stress kan forsvarsmekanismen svekkes slik at organismer som vanligvis er harmløse for fisken forårsaker sykdomsutbrudd. Fysiologiske tilstander som ligner de en finner i

forbindelse med stress (for eksempel økt plasmanivå av kortisol) kan også finne sted ved fysiologiske prosesser som ikke er utløst av stressorer, som smoltifisering og kjønnsmodning (Barton et al. 1985; Young et al. 1989; Billard et al. 1981; Donaldson & Hunter 1983). Dette gjør fisken mer mottakelig for sykdom i disse periodene. Det har blitt forsket mye på dette hos laksefisk. I motsetning til laksefisk synes steinbit å være mer fortrolig med folk og handtering enn laksefisk. Dette kan bety at den reagerer mindre på slike stressorer enn laksefisk. Fysiologiske responser på ulike stressorer har hittil ikke vært undersøkt hos flekksteinbit. Dette er viktig å gjøre for å finne ut om vanlige oppdrettsrutiner som for eksempel handtering stresser denne arten. Kortisolresponsen på stress er i denne sammenhengen et nyttig redskap for å kvantifisere graden av respons hos en art på ulike stressorer. Med bakgrunn i dette ble følgende målsetning skissert for dette studiet.

### **1.5. Målsetning**

Målet for dette studiet er å beskrive primære (endring i plasma kortisolnivå) og sekundære (endring i plasma glukosenivå) stressresponser på handtering og nedtapping av kar hos flekksteinbit. På grunn av at det ble målt en svært lav kortisolrespons på handteringsstress i hovedforsøket, ble det gjennomført en injeksjon av ACTH i et oppfølgingsforsøk. Dette ble gjort for å undersøke om den lave stressresponsen som ble funnet hos flekksteinbit kunne skyldes lav interrenal sensitivitet ovenfor ACTH.



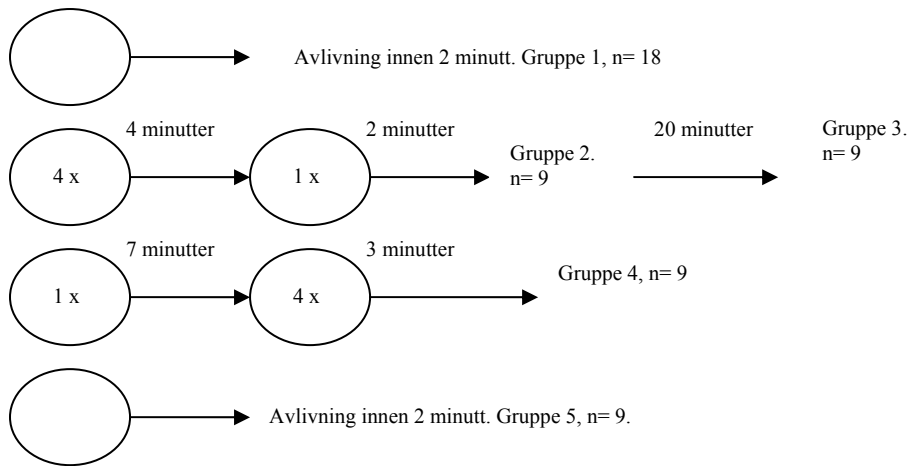
## 2. MATERIALE OG METODER

### 2.1. Forsøksfisk

Forsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø, i indre Kårvik på Ringvassøy, Tromsø kommune. I forsøket ble det benyttet flekksteinbit (*Anarhichas minor* Olafsen), klekket i 2003, som var avlet opp ved havbruksstasjonens foreldregenerasjon fra 1996. Steinbiten klekket i 2003 hadde fått DanaFeed (Dana Feed Norge, Vågseidet, Norge) etter Dana Feed tilveksttabell i forkant av forsøket. Den var blitt startfôret på Aglonorsfôr (Ewos, Bergneset, Norge) og så gått over på DanaFeed 0,6 som yngel. Frem til forsøksstart hadde steinbiten vært holdt på naturlig sjøvannstemperatur som var 3,5 °C i mars og 4,0 °C i mai, og naturlig lys med ekstra arbeidslys på dagtid. Fisken ble sjekket for kjønnsmodning og det ble funnet at ingen av fiskene var kjønnsmodne.

### 2.2. Pilotforsøk

I et pilotforsøk ble det gjennomført tester av hvordan ulike samplingsprosedyrer påvirker plasmanivå av kortisol hos flekksteinbit (Fig. 2). Dette ble gjort for å kunne velge en samplingsprosedyre som i seg selv ikke skulle påvirke plasmanivå av kortisol under selve hovedforsøket. I tillegg til å teste ut basalverdien for kortisolnivåer hos steinbiten som ble avlivet umiddelbart, ble mulige endringer i nivået av kortisol i plasma testet. Blodprøver ble tatt etter ulik tid etter at den var forstyrret og etter bedøvelse. Som bedøvelsesmiddel ble det brukt Benzocaine i ulike doser, med en utgangsdose på 1 ml stamløsning av Benzocaine og etanol per l vann (Benzocaine konsentrasjon lik 60 ppm). Først ble 18 fisk avlivet raskt ved slag i hodet, for å måle basalt kortisolnivå (gruppe 1). I den neste gruppen ble 18 fisker overført til en firedobbel konsentrasjon med Benzocaine (240 ppm) i 4 minutter og deretter håvet over i en enkel konsentrasjon (60 ppm) med bedøvelse. Det ble tatt ut 9 fisker etter 2 minutter ved 60 ppm (gruppe 2) mens de resterende 9 fiskene fikk stå i 20 minutter til før de ble tatt ut og avlivet (gruppe 3). Fiskene i gruppe 4 (9 fisk) ble satt i enkel (60 ppm) konsentrasjon med bedøvelse i 7 minutter og deretter satt i firedobbel konsentrasjon i 3 minutter før de ble avlivet. Den siste gruppen med 9 fisk, (gruppe 5) ble i likhet med den første gruppen avlivet umiddelbart for å måle basalt kortisolnivå.



Figur 2. Figuren gir oversikt over de ulike behandlingene fisken fikk i pilotforsøket.

### 2.3. Hovedforsøk: Primære og sekundære stressresponser på nedtapping av vann i kar, samt injeksjon av ACTH

Handteringsforsøkene ble utført i Kårvik i 2 perioder våren 2005. Det første forsøket (forsøk 1) ble gjennomført i perioden 03.03.05 til 21.03.05 og det andre forsøket (forsøk 2) ble gjennomført i perioden 30.03.05 til 11.05.05. Den første prøvetakingen fant sted 21.03.05 og den siste 09.-11.05.05. Injeksjonsforsøkene ble utført i 2 perioder våren 2006. Det første injeksjonsforsøket (ACTH injeksjon 1) ble gjennomført 05.01.06 og det andre injeksjonsforsøket (ACTH injeksjon 2) ble gjennomført 21.03.-22.03.06.

#### 2.3.1. Forsøk 1: Tidlig respons

To uker før forsøksstart ble 150 fisker sortert ut fra stamkaret og fordelt i 10 kar, med 15 fisk i hvert kar. Under sorteringen ble fiskene bedøvd med Benzocaine (60 ppm) og fisken ble fordelt slik at snittvekten (272 gram) i karene skulle bli så lik som mulig. Karene ble tilført rent sjøvann med en naturlig vanntemperatur (3,5 °C) og fiskene fikk stå i to uker for å akklimeres til de nye karene. Det ble utført daglig rutine (fôring, tilsyn) alle dagene utenom forsøksdagen, da det ikke skulle være noe trafikk inn og ut av rommet. Forsøket startet opp 21/03-05. Før fiskene ble utsatt for handtering, ble fisk fra to av karene tatt ut. Fiskene ble hurtig avlivet med slag i hodet, og all fisk var avlivet innen 2,5 minutt etter at håving startet. Deretter ble det tatt blodprøver og all fisk ble målt og veid. Fiskene i disse to karene blir heretter benevnt pre-stress grupper. Etter at dette var gjennomført ble fiskene i de resterende



karene utsatt for lik behandling: hurtig tømning av vannet fra karene og vanntomt kar i 10 minutter. Etter behandlingen ble karet fylt opp med vann og fiskene overlatt til seg selv uten forstyrrelser. Deretter ble fisken i to og to kar avlivet på samme måte som pre-stress gruppene etter 30 minutter, 1, 2 og 4 timer. Håving og avlivning av fisk ved hvert tidspunkt ble gjennomført på en slik måte at de resterende kar med fisk ble forstyrret minimalt.

Det ble tatt blodprøver med litiumhepatiserte vacutainerrør (Brecton Dickison, Franklin Lakes, NJ, USA) 0,8 x 38 mm) fra kaudalvena. Alle blodprøvene ble umiddelbart satt på is og senere sentrifugert (Jouan CR 4 22) ved 2700 g i 10 minutter ved 4 °C. Deretter ble blodplasma pipettert ut, fordelt i to eppendorfrør (parallell A og B) og frosset ned til -80 °C for senere analyser. De to parallellene ble oppbevart i to separate frysere.

### **2.3.2. Forsøk 2: Utvidet responstid**

Det andre forsøket foregikk i perioden 09.-11. mai 2005. Fiskene ble sortert ut med snittvekt på 282 gram, og fordelt mellom 10 kar to uker før den første forsøksdagen for akklimering. Fiskene fra to kar ble tatt ut som pre-stress prøve før handtering. Fiskene i de resterende karene ble deretter utsatt for lik behandling: hurtig tømning av vannet fra karene og vanntomt kar i 10 minutter. Etter handteringen ble karene fylt med vann. Fiskene i de ulike karene ble så overlatt til seg selv, uten forstyrrelse, inntil all fisk i to og to kar ble avlivet etter henholdsvis 4, 8, 24 og 48 timer. All fisk ble avlivet ved at en høy dose Benzocaine (160 ppm) ble slått direkte i karene. Det ble tatt blodprøver, samt at alle fiskene ble målt og veid. De samme prosedyrene som for blodprøvetakingen i forsøk 1, samt behandling av prøvene etter prøvetakingen, ble gjennomført i forsøk 2.

### **2.3.3. Forsøk 3a: Effekt av ACTH injeksjon på primære og sekundære stressresponser**

Dette forsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Kårvik 5. januar 2006, ved at ulike doser av porcine (produsert fra gris) adrenokortikotrop hormon (ACTH) ble injisert i flekksteinbit. Vi delte inn fiskene i tre grupper, hvor en ble behandlet med lavdose ACTH (LD), en med høydose ACTH (HD), mens den tredje gruppen fikk injisert fysiologisk saltvann (kontroll). Fiskene vi brukte i forsøket hadde en gjennomsnittsvikt på 600 gram, og var av samme opprinnelse som den som ble brukt i forsøk 1 og 2. I tidligere injeksjonsforsøk med ACTH (e.g. Girard et al. 1998) har doser mellom 2 og 4 internasjonale enheter (IU) per 100 gram fisk gitt gode kortisolresponser. På grunnlag av dette ble steinbiten i dette forsøket gitt en totaldose på henholdsvis 12 IU per fisk (~ 2 IU per 100 gram fisk) i lavdosegruppen og

24 IU per fisk (~ 4 IU per 100 gram fisk) i høydosegruppen. De ulike dosene ble blandet ut i 600 µl fysiologisk saltvann og injisert ved hjelp av 1 ml sprøyter. Dosene med ACTH ble laget til samme dag som forsøket og holdt på is. Før vi startet forsøket ble det tatt ut 10 fisker fra stamkaret. Disse ble avlivet i Benzocaine (160 ppm) og blodtappet for å måle plasma kortisolnivå i en pre-behandlet kontroll. Deretter hentet vi inn 30 fisk fra stamkaret og bedøvde de i Benzocaine (60 ppm). Når de var tilstrekkelig bedøvd (ingen respons på handling og injisering) injiserte vi de to dosene med ACTH og fysiologisk saltvann, i bukhalen til fiskene (10 fisk pr behandling) og merket de med Floy tags (FTF 69 Fingerling Tags, Floy Tag and Mfg.). Injeksjonen ble gjort ved at nålen ble ført forsiktig inn gjennom bukveggen i bakkant av brystfinnen. Fiskene i de tre behandlingsgruppene ble så satt over i samme kar. Deretter ble nye 30 fisk behandlet og satt i ett nytt kar. I alt 4 kar med 30 fisk (10 per behandling/kar) ble etablert. Karene fikk deretter stå uten forstyrrelse av noe slag til fiskene i et og et kar ble avlivet i Benzocaine (160 ppm) etter henholdsvis 1, 2, 4 og 6 timer. Etter avlivning ble det tatt en blodprøve av alle individene, på samme måte som under forsøk 1 og 2, hvoretter de ble målt og veid. Blodprøvene ble sentrifugert som i forsøk 1 og 2, og plasmaprøvene oppbevart ved - 80 °C inntil analyse.

#### **2.3.4. Forsøk 3b: Effekt av ACTH injeksjon på primære og sekundære stressresponser**

Dette oppfølgingsforsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Kårvik i mars 2006, ved injisering av porcine adrenokortikotrop hormon (ACTH) i flekksteinbit. Vi delte inn fiskene i tre grupper, hvor en ble behandlet med ACTH, en med saline, mens den tredje gruppen ikke ble behandlet (kontroll). Fiskene vi brukte i forsøket hadde en gjennomsnittsvikt på 600 gram, og var av samme opprinnelse som den som ble brukt i forsøk 1, 2 og 3a. På grunnlag av resultatene i forsøk 3a, ble fiskene injisert med totaldose på 24 IU per fisk. Dosene ble blandet ut i 600 µl fysiologisk saltvann og injisert ved hjelp av 1 ml sprøyter. Dosene med ACTH ble laget til samme dag som forsøket og holdt på is. Ved forsøksstart ble det tatt ut 12 fisker fra stamkaret, som ble avlivet i Benzocaine (160 ppm) og blodtappet. Disse fungerte som en pre-behandlet kontroll. Deretter hentet vi inn fisk fra stamkaret og bedøve de i Benzocaine (60 ppm). Når de var tilstrekkelig bedøvd (ingen respons på handling og injisering) injiserte vi doser med ACTH, eller saline i bukhalen til fiskene (36 fisk pr behandling) på samme måte som i forsøk 3a. Atten fisk fra hver behandlingsgruppe ble deretter plassert i samme kar (2 kar per behandling) og i tillegg ble 36 ubehandlede fisk fordelt mellom to andre kar. Karene fikk deretter stå uten forstyrrelse av noe slag inntil 6 fisk fra hvert kar ble håvet opp og avlivet i Benzocaine (160 ppm) etter henholdsvis 4, 8 og 24 timer. Håvingen av fisk ble gjort slik at

resten av fisken ble minimalt forstyrret. Etter avlivning ble det tatt en blodprøve av alle individene, på samme måte som under forsøk 1, 2 og 3a, hvoretter de ble målt og veid. Blodprøvene ble sentrifugert som i de tidligere forsøkene, og plasmaprøvene oppbevart ved –80 °C inntil analyse.

## **2.4. Kvantifisering av kortisol**

Etter avslutning av forsøket ble konsentrasjonen av steroidhormonet kortisol i blodplasma fra forsøksfisken bestemt ved hjelp av RadioImmunoAssay (RIA). Denne metoden går i prinsippet ut på at antigen binder seg til antistoff med høy spesifisitet til antigenet. I denne analysen er kortisol antigenet som binder seg til antistoff. Kvantifisering av hormonene i de ulike prøvene gjøres gjennom konkurrerende binding til antistoffet mellom umerket og radioaktivt ( $^3\text{H}$ ) merket hormon, hvor nivået av hormonet bestemmes ut fra en standardkurve. Mindre av det merkede steroidet vil være bundet til antistoffet jo mer av det umerkede som blir tilsatt. RIA metoden er verifisert for bruk på blodplasma fra steinbit (Frantzen pers. med). Hormonanalysen ble utført på laboratorium ved institutt for akvatisk biologi (IAB) ved Norges Fiskerihøgskole (NFH) i Tromsø.

### **2.4.1. Eterekstrahering**

Før analyse ble steroidene ekstrahert ut av plasmaprøvene. Eterekstrahering er en metode som ekstraherer frie steroider fra plasma. Det ble tatt ut 300  $\mu\text{l}$  plasma og tilsatt 4 ml diethyleter (DEE). Dette ble satt til røring i fire minutter for å skille vannfasen fra eterfasen. Deretter ble vannfasen frosset i flytende nitrogen, og eterfasen med fritt kortisol dekantert over i glassrør. Disse ble satt til avdamping av eter i varmebad ved 45 °C. Steroidene ble deretter resuspendert i 900  $\mu\text{l}$  RIA buffer (1 liter: 1g Gelatin, 4,83 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4+2\text{H}_2\text{O}$ , 21,84 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4+12\text{H}_2\text{O}$ , 9 g NaCl, 1 ml Na-azid (5 % løsning)). Prøvene ble lagret i merkede eppendorfrør ved -18 grader inntil RIA analyse.

### **2.4.2. Antistoff**

Antistoffet som ble benyttet i forsøket var fremstilt i kanin av Helge Tveiten, IAB, NFH. Antistoffet ble lagret ved -80 °C, med fortytning 1:9 med RIA buffer. Like før bruk ble antistoffet tint, tilsatt natriumazid for å hindre bakteriedannelse, og fortynt videre til bruksløsning. Rett før bruk ble en passe mengde fortynt med RIA buffer til bruksløsning som gav ca. 50 % binding (4000x fortytning) av det radioaktivt merkede steroidet i fravær av ikke radioaktive steroid.

### 2.4.3. Radioaktivt stoff

Radioaktivt kortisol, var merket med tritium ( $^3\text{H}$ ), som er en radioaktiv isotop av hydrogen med halveringstid på 12,3 år. Radioaktivt kortisol, løst i etanol (EtOH), ble oppbevart i kjøleskap ved 4 °C. Like før bruk i RIA analysen ble en passe mengde radioaktivt kortisol fortynnet med RIA buffer til en løsning som gav en "total count" (TC) på ca. 4500 counts per minute (cpm)/50 $\mu\text{l}$  for analyse av kortisol.

### 2.4.4. Standardkurve

Standardkurvene bestod av ulike konsentrasjoner av ikke radioaktivt merket kortisol løst i RIA buffer (kalde standarder). Kortisol ble løst og fortynnet i EtOH til 500  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (standardløsning) og ble deretter fortynnet med RIA buffer til 2000 pg 50  $\mu\text{g ml}^{-1}$  (40 ng  $\text{ml}^{-1}$ ) og merket S9. De neste konsentrasjonene (S8-S1) av standardløsningene ble laget ved 1:1 fortynning med RIA buffer (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8125 pg/50  $\mu\text{l}$ ).

### 2.4.5. Dextran coated charcoal løsning (DCC)

1 g charcoal activated og 0,1 g dextran (T70) ble tilsatt 100 ml kald RIA buffer. Løsningen ble satt til røring i isbad på magnetrører i en time og ble oppbevart ved 4 °C. Løsningen ble alltid satt i 10-15 minutter på omrøring i isbad før bruk for å holde temperaturen nede. DCC-løsningen absorberer frie steroider som ikke er bundet til antistoff, og blir derfor benyttet til å separere frie og antistoffbundne steroider.

### 2.4.6. RIA analyse

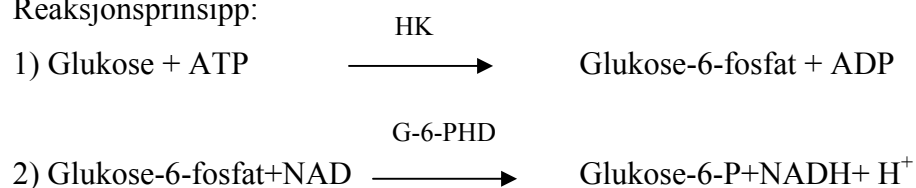
Plasmaprøvene ble tint ved romtemperatur og blandet godt (vortexer). Deretter ble standardkurven pipettert ut. Det ble brukt 10x 75 mm glassrør som innholdt enten 50  $\mu\text{l}$  standard (til standardkurven) eller 100  $\mu\text{l}$  prøve (p1-p 29). De rørene hvor det var mindre enn 100  $\mu\text{l}$  prøve, og i rør med standard ble det etterfylt med RIA buffer til et volum på 100  $\mu\text{l}$ . Rørene ble så tilsatt 50  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -kortisol (ca 4500 cpm) og til slutt 200  $\mu\text{l}$  antistoff. Prøvene og standardene ble satt opp med to paralleller. Total binding (TB) ble bestemt ved å tilsette 200  $\mu\text{l}$  antistoff og 50  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -kortisol til 100  $\mu\text{l}$  RIA buffer og ikke spesifikk bundet (NSB) ble laget til med 300  $\mu\text{l}$  RIA buffer og 50  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -kortisol. Det ble også laget til en total count (TC) hvor det ble pipettert ut 600  $\mu\text{l}$  RIA buffer og 50  $\mu\text{l}$   $^3\text{H}$ -kortisol direkte i tellerør for å se at TC var

korrekt (ca 4500 cpm). Alle rørene ble blandet godt ved vortexing, og satt til inkubering ved 4 °C i minimum 16 timer. Dagen etter ble prøvene satt på is og tilsatt 300 µl DCC (alle, unntatt TC) og inkubert i 5 minutter og så sentrifugert i 5 minutter ved 5600 g ved 4 °C (GH 3,7 Horizontal Rotor). Etter sentrifugeringen ble supernatantene, som inneholdt steroid bundet til antistoff, dekantert over i tellerør og tilsatt 7 ml scintillasjonsvæske (Ultima Gold XR). Også TC rørene ble tilsatt scintillasjonsvæske. Prøvene ble ristet godt og radioaktivitet i alle rørene ble telt i fem minutter (cpm) i scintillasjonsteller (MINIMAX β Tri-carb 4000 series, United Technologies Pacard). (For standardkurve, se appendiks).

## 2.5. Kvantifisering av glukose

For analysen av plasmaprøven mht. glukose ble det brukt et Randox Glucosekit, Liquid reagent hexokinase method (Randox Laboratories Ltd., United Kingdom). Kittet brukes for å bestemme glukose i blod, serum, plasma og urin. Metoden er enzymatisk og bruker både hexokinase (HK; reaksjon 1) og glukose-6- fosfat dehydrogenase enzymer (G-6-PHD; reaksjon 2). (For reagenskomponenter, se appendiks).

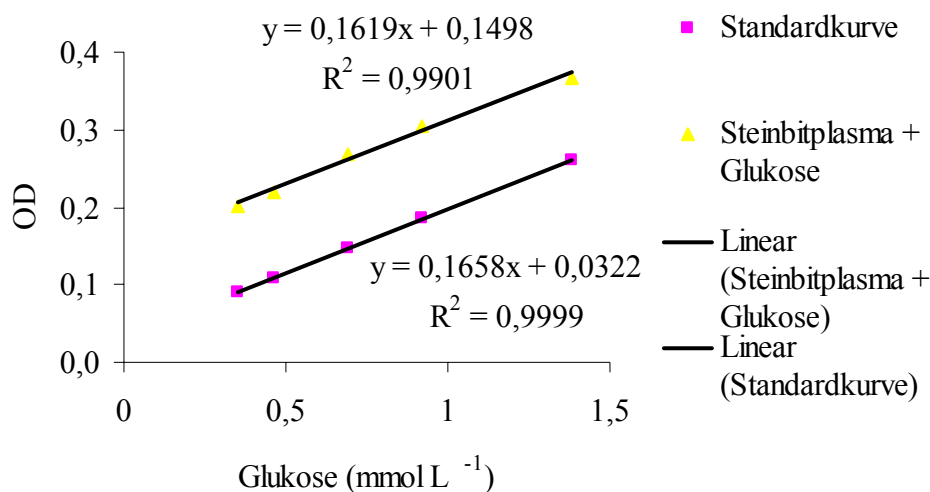
Reaksjonsprinsipp:



Metodens prinsipp går ut på å kvantifisere Glukose-6-P+NADH+H<sup>+</sup> som absorpsjon ved spektrofotometrisk måling ved 340/380 nanometer. En 0,1 nM løsning av NADH har en absorpsjon ved 340 nm i en 1 cm bølglengdes kuvette, mens NAD<sup>+</sup> ikke har absorpsjon ved denne bølglengden. Konversjon fra NAD<sup>+</sup> til NADH blir derfor fulgt av en sterk økning i absorpsjon av lys ved denne bølglengden. Analysen gjøres ved at absorpsjon i prøve tilsatt buffer måles før tilsetning av enzym (a1). Etter tilsetning av enzym måles absorpsjon på nytt (a2). Etter måling subtraheres absorpsjon i prøve etter tilsetning av enzym med absorpsjon i prøve uten tilsatt enzym (a2-a1). For å beregne glukosekonsentrasjon i prøve (mmol L<sup>-1</sup>) brukes følgende formel: 5,55 x (absorpsjon i prøve/absorpsjon i standard).

For å kunne bruke denne metoden på steinbitplasma måtte kittet valideres. I valideringstesten brukte vi steinbitplasma tilsatt en kjent mengde glukose, og en standard med en kjent mengde glukose. Valideringen går ut på å undersøke om det er parallellitet i absorpsjonskurvene for

fortynningsserier av steinbitplasma og glukosestandard. For å få en flerpunkts parallellitetsfigur må den kjente glukosestandard og steinbitplasma tilsatt en kjent mengde glukose fortynnes. 30 µl standard og plasma ble pipettert med to paralleller over i 96 brønners plate, og fortynnet 5 ganger med buffer. Den kjente konsentrasjonen i glukosestandard var da 1.38, 0.92, 0.69, 0.46 og 0.35 mmol L<sup>-1</sup>. Plasma fra flekksteinbit ble tilsatt en mengde med samme konsentrasjon av glukose og deretter fortynnet på samme måte. Disse ble analysert for å sjekke om det var parallellitet i kurveforløpet som beskriver forholdet mellom glukosekonsentrasjon og absorbans. Deretter ble det pipettert ut 200 µl buffer i brønnene og absorbans, a1 ble målt. Vi tilsatte så 10 µl enzym (hexokinase og G-6-PHD var på forhånd mikset sammen til en reagent) og blandet løsningen godt ved pipettering i brønnene. Løsningen ble så satt til inkubering i romtemperatur i 10 minutter. Deretter ble absorbansen målt på nytt, a2. For å regne ut absorbansen subtraherer man a2-a1.



Figur 3: Viser resultater av parallellitetstest etter absorbans i fortynninger av glukosestandard med en kjent glukosekonsentrasjon og steinbitplasma tilsatt en kjent mengde glukose.

Valideringen viste at absorbanskurvene for standarden og glukose tilsatt steinbitplasma var parallelle, og at kittet derved fungerte utmerket for steinbitplasma. Plasmaprøvene ble deretter analysert ved at 10 µl standard eller prøve ble pipettert med to paralleller over i 96 brønners plate og deretter tilsatt 200 µl buffer. Prøvene ble blandet godt med pipettering og målt absorbans (a1). Etter måling ble 10µl enzym tilsatt og inkubert i 10 minutter i romtemperatur og absorbans ble målt på nytt (a2). Det ble satt en grense på maksimum 15 % differanse mellom gjennomsnittet av parallellene med hensyn til målt glukosekonsentrasjon. Det viste

seg å være vanskelig å oppnå i noen plasmaprøver, dels fordi nivået av plasma glukose viste seg å være svært lavt hos steinbit. I alt 51 plasmaprøver var forskjellen mellom parallellene mer enn 15 %. De er allikevel tatt med fordi disse verdiene ikke hadde betydning for de endelige resultater og konklusjonen i forsøkene.

## **2.6. Statistikk og presentasjon av data**

Statistiske beregninger ble utført i programmet STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) og figurer laget i Microsoft Office, Excel 2003. Verdiene for de målte parameterne presenteres som gjennomsnitt  $\pm$  standard feil (SEM). SEM er et estimat på spredningen av gjennomsnittene til et tilfeldig utvalg fra en normalfordelt populasjon og beregnes slik:  $SEM = S/\sqrt{n}$ , der S er standardfeil og n er antall verdier i målingen (Zar 1999). Resultatene blir regnet som signifikante dersom  $p \leq 0,05$ .

For å utføre statistiske tester på resultatene fra forsøket ble alle data for plasma kortisol og plasma glukose log transformert. Log transformering er en metode som benyttes for å gjøre skjeve fordelinger mer symmetriske. Slike distribusjoner blir kalt lognormale (Quinn & Keough 2002). Parametriske tester som for eksempel ANOVA (se under) forutsetter normalfordelte data for maksimal styrke, mens styrken i testen synker når den brukes på datasett som er ikke-normalfordelte, eller bare delvis normalfordelte. En log-transformering av datasettet øker testens styrke.

### **2.6.1. ANOVA (ANalysis Of VAriance)**

ANOVA testene er parametriske, forutsetter normalfordeling i datasettet og lik varians mellom gruppene. Med ANOVA kan man teste om det er signifikant forskjell mellom gjennomsnittsverdiene i to eller flere utvalg. Ved å derivere variansen mellom gjennomsnittsverdiene med variansen innenfor hver behandlingsgruppe får man en testobservator (F). Dersom testverdien er større eller lik en kritisk F verdi, er det signifikant forskjell mellom to eller flere av snittverdiene.

Enveis ANOVA benyttes for å teste om gjennomsnittsverdiene i den avhengige variabel er forskjellige, hvor det kun er en uavhengig variabel. I en toveis ANOVA analyseres variasjonen mellom gruppene i forhold til to eller flere uavhengige variabler. Etter denne analysen får vi forskjellige F verdier og p-verdier, en for hver variabel. Fordelen med toveis

ANOVA er at man kan teste for flere faktorer samtidig slik at man slipper å utføre enveis ANOVA for hver av faktorene (Zar 1999). I denne studien ble det benyttet en to-veis ANOVA for å teste effekt av både behandling (nedtapping av kar; ACTH – injeksjon), tid etter behandling og kar (duplikater) på plasmanivå av kortisol og glukose. ANOVA benyttes for å finne ut om det er signifikant forskjell mellom tre eller flere gruppers gjennomsnittsverdier. ANOVA analysen forteller kun om det eksisterer en signifikant forskjell mellom to eller flere grupper, men ikke om hvilke grupper som er forskjellig fra hverandre. For å finne ut hvilke grupper som eventuelt er forskjellig fra hverandre, må det gjennomføres en post hoc test. Tukey multippel test er en post hoc test som er laget for å utføre en parvis sammenligning av gruppene gjennomsnitt ved de ulike tidspunkt for å se i mellom hvilke grupper den signifikante forskjellen er (resultat av post- hoc test av prøvene, se appendiks).

### **2.6.2. Korrelasjonsanalyse**

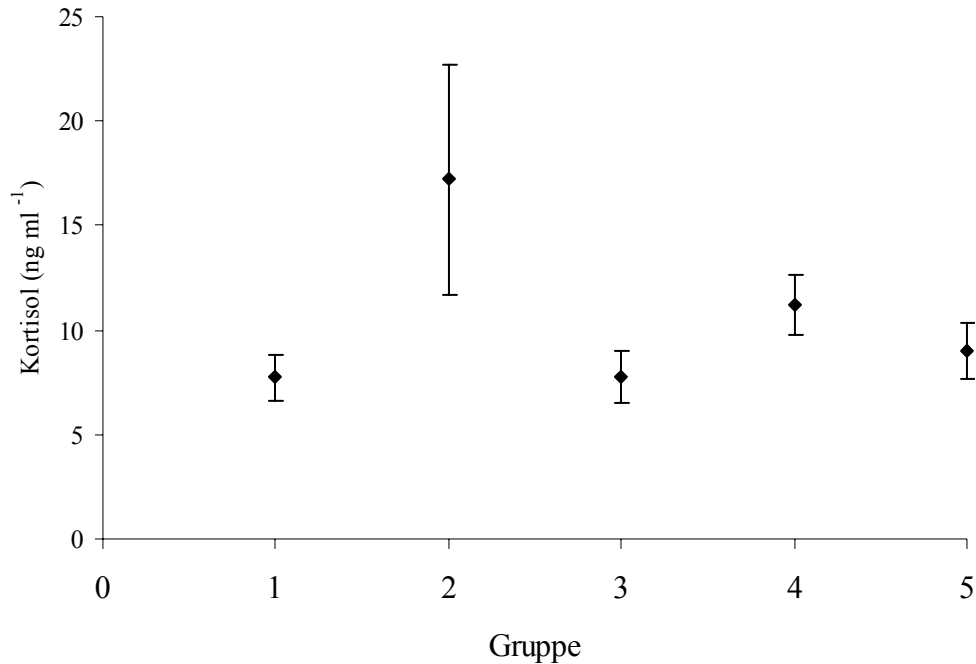
Lineær regresjonsanalyse undersøker korrelasjon mellom to variabler. Et vanlig brukt mål for om det er noen lineær samvariasjon mellom de to variablene er korrelasjonskoeffesienten,  $r$ . Verdien 0 indikerer at det ikke er noen lineær sammenheng mellom variablene, da har regresjonslinjen ingen helning. Økende positive verdier indikerer en økende positiv sammenheng, med  $r = +1$  som det ekstreme: alle punktene ligger da rett på en linje. Tilsvarende svarer negative verdier til en negativ sammenheng, slik at  $r = -1$  betyr at alle punktene ligger på en rett fallende linje (Kristianslund 1985). Hvor stor andel av den totale variasjonen i  $Y$  som er forklart med den tilpassede regresjonen oppgives som  $r^2$  (kvadrat av korrelasjonskoeffesienten). I denne oppgaven ble korrelasjonsanalysen benyttet til å undersøke om det var noen sammenheng mellom variablene kortisol, glukose og fiskevekt.



### 3. RESULTATER

#### 3.1. Pilotforsøk

Figur 4 viser konsentrasjonen av kortisol i plasma i de ulike behandlingsgruppene i pilotstudiet.



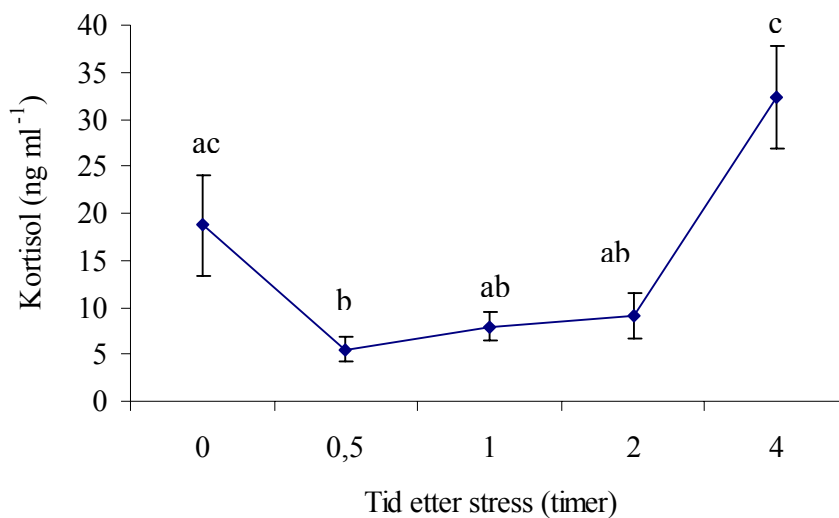
Figur 4: Konsentrasjonen av kortisol i plasma hos flekksteinbit etter de ulike behandlingene i pilotforsøket. Gruppe 1 (n=18) ble avlivet umiddelbart med slag i hodet. I de neste gruppene ble 18 fisker overført til en firedobbel konsentrasjon med Benzocaine (240 ppm) i 4 minutter og deretter håvet over i en enkel konsentrasjon (60 ppm) med bedøvelse. Det ble tatt ut 9 fisker etter 2 minutter ved 60 ppm (gruppe 2) mens de resterende 9 fiskene fikk stå i 20 minutter til før de ble tatt ut og avlivet (gruppe 3). Fiskene i gruppe 4 (n=9) ble satt i enkel konsentrasjon med bedøvelse i 7 minutter og deretter satt i firedobbel konsentrasjon i 3 minutter før de ble avlivet. Den siste gruppen, gruppe 5 (n=9), ble i likhet med den første gruppen avlivet umiddelbart for å måle basalt kortisolnivå. Verdiene representerer gjennomsnitt ± SE.

### 3.2. Stressforsøk

Det var ingen effekt av fiskevekt på plasma kortisol i de to stressforsøkene, og fiskevekt er derfor ikke tatt hensyn til i de statistiske analysene (for resultat av regresjonsanalyse: se appendiks).

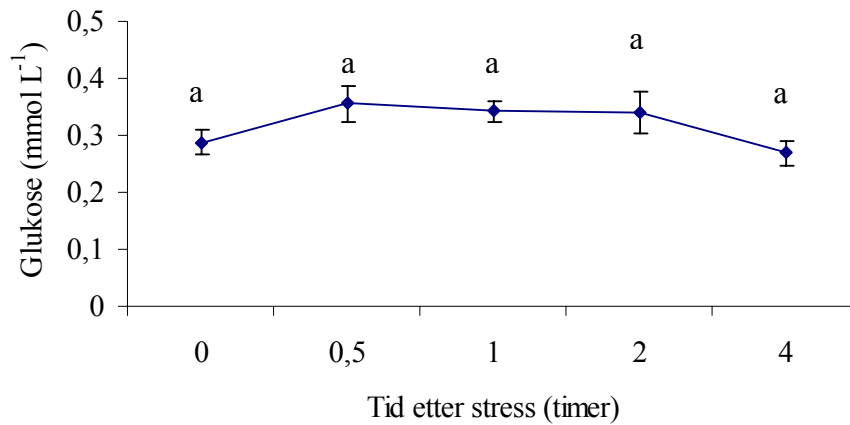
#### 3.2.1. Stressforsøk 1

ANOVA testen viste at det var signifikante effekter av tid ( $F = 9,609$ ;  $p < 0,05$ ), men ikke av kar (behandlingsduplikater;  $F = 0,175$ ,  $p > 0,05$ ) på plasma kortisol. Duplikatene ble derfor slått sammen i post-hoc testen og i presentasjonen av data. Post-hoc testen viste at gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon av kortisol var signifikant lavere hos flekksteinbit som ble avlivet 30 min etter at de hadde blitt utsatt for stressor (tomt kar i 10 min) enn hos de som ble tatt direkte fra stamkaret (Fig. 5). Deretter var det liten endring frem til og med 2 timer etter stressbehandling, men så en signifikant økning mellom 2 og 4 timer. Plasmanivået av kortisol var ikke signifikant forskjellig hos flekksteinbit som ble avlivet 4 timer post-stress og de som ble tatt direkte fra stamkaret.



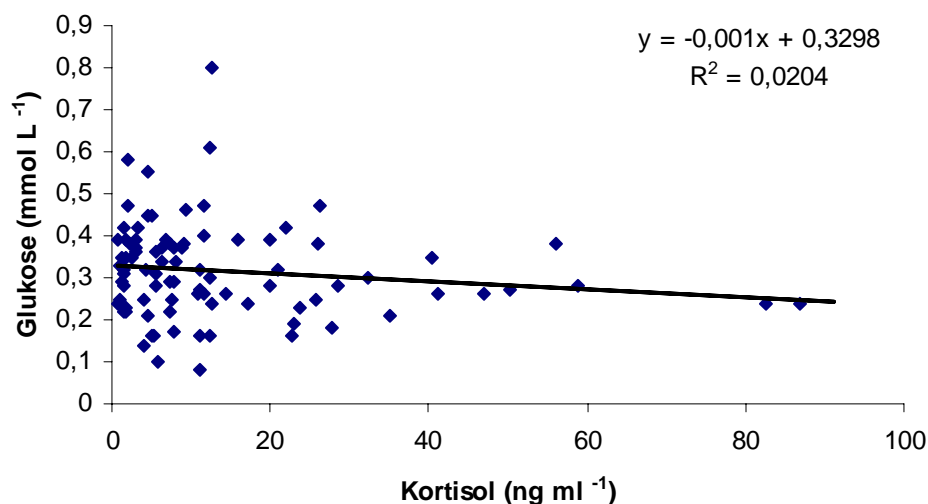
Figur 5: Konsentrasjonen av kortisol i plasma hos flekksteinbit ved ulike tidspunkt før (0 timer,  $n=21$ ) og etter stressbehandling (0,5 timer;  $n=19$ ; 1 time,  $n=20$ ; 2 timer  $n=18$ ; 4 timer,  $n=19$ ). Ulike bokstaver angir tidspunkter med signifikante forskjeller i kortisolnivå. Verdiene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SE.

ANOVA testen viste at det ikke var signifikante effekter av tid ( $F = 1,966$ ;  $p > 0,05$ ), og heller ikke av kar (behandlingsduplikater,  $F = 1,436$ ;  $p > 0,05$ ) på plasma glukose. Duplikatene ble derfor slått sammen i presentasjonene av data (Fig. 6).



Figur 6: Konsentrasjon av glukose i plasma hos flekksteinbit ved ulike tidspunkt før (0 timer,  $n=21$ ) og etter stressbehandling (0,5 timer,  $n=19$ ; 1 time,  $n=20$ ; 2 timer,  $n=18$ ; 4 timer,  $n=19$ ). Ulike bokstaver angir tidspunkter med signifikante forskjeller i glukosenivå. Verdiene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SE.

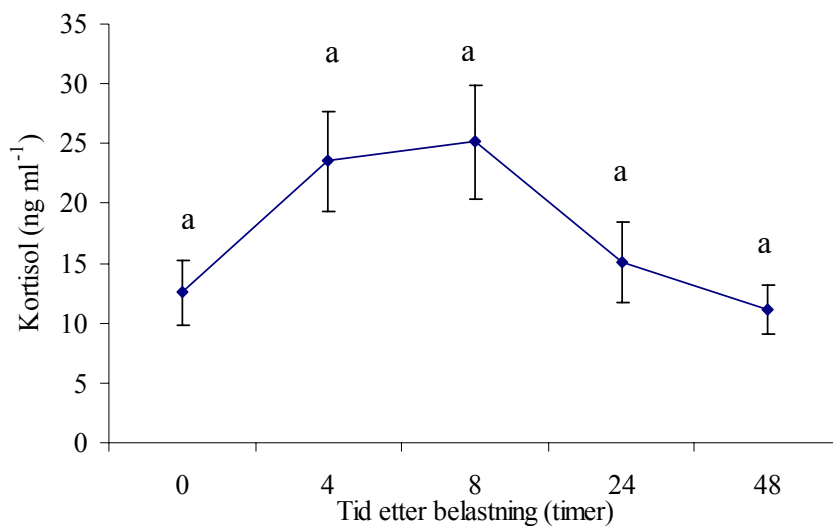
En test om det var sammenheng mellom kortisol og glukose i forsøk 1 viste ingen signifikant sammenheng ( $F = 1,79$ ;  $p > 0,05$ ).



Figur 7: Plasmakonsentrasjon av kortisol plottet mot konsentrasjonen av glukose i forsøk 1.

### 3.2.2. Stressforsøk 2

ANOVA testen viste at det var en signifikant effekt av tid ( $F = 2,77$ ;  $p < 0,05$ ), men ikke av kar (behandlingsduplikater;  $F = 3,56$ ,  $p > 0,05$ ) på plasma kortisol. Duplikatene ble derfor slått sammen i post-hoc testen og i presentasjonene av data (Fig. 8). Post- hoc testen viste imidlertid ingen signifikante forskjeller mellom tidspunktene, når disse var parvis testet. På grunnlag av den innledende ANOVA testen, antar vi at gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon av kortisol økte mellom tidspunkt 0 timer (pre-stress;  $12,57 \text{ ng ml}^{-1}$ ) og 4 timer etter stressbehandlingen ( $23,51 \text{ ng ml}^{-1}$ ), hvorefter den avtok frem til 48 timer post-stress. Etter to døgn var kortisolnivået likt nivået som ble målt pre-stress.

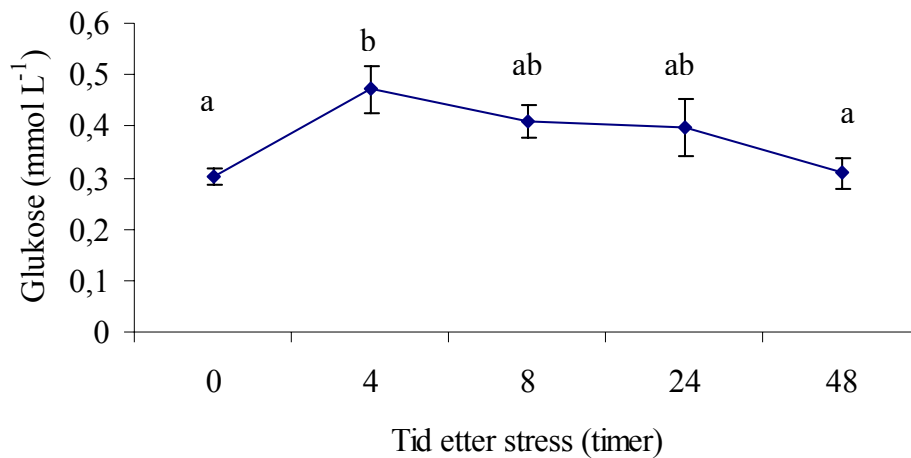


Figur 8: Konsentrasjon av kortisol i plasma hos flekksteinbit ved ulike tidspunkt før (0 timer,  $n=22$ ) og etter stressbehandling (4 timer,  $n=22$ ; 8 timer,  $n=22$ ; 24 timer,  $n=23$ ; 48 timer,  $n=19$ ). Ulike bokstaver angir tidspunkter med signifikante forskjeller i kortisolnivå. Verdiene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SE.

ANOVA testen viste at det var signifikante effekter av tid ( $F = 4,05$ ;  $p < 0,01$ ), men ikke av kar (behandlingsduplikater;  $F = 0,224$ ;  $p > 0,05$ ) på plasma glukose i dette forsøket.

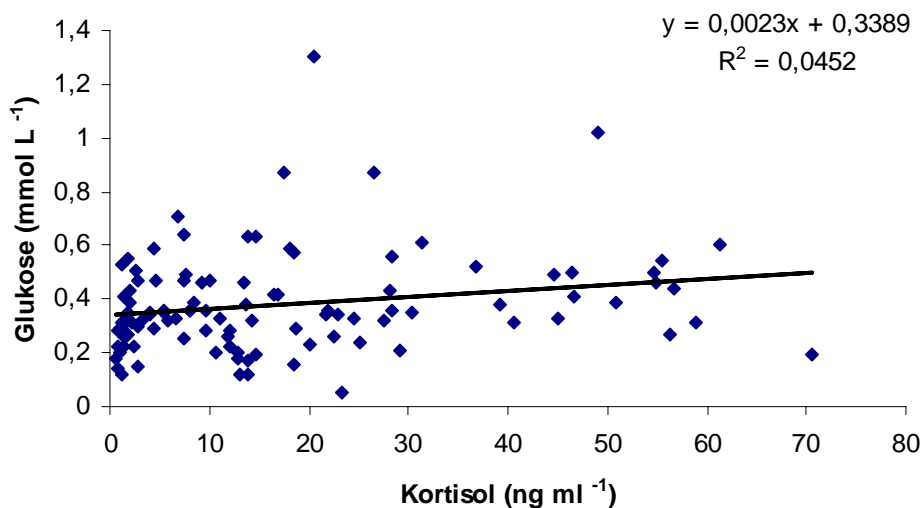
Duplikatene ble derfor slått sammen i post-hoc testen og i presentasjonene av data (Fig 9).

Denne testen viste at gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon av glukose økte signifikant mellom tidspunkt 0 timer (pre-stress;  $0,30 \text{ mmol L}^{-1}$ ) og 4 timer etter stressbehandling ( $0,47 \text{ mmol L}^{-1}$ ). Deretter sank glukosenivået gradvis frem til 48 timer post-stress, hvor nivået var lik nivået som ble målt pre-stress.



Figur 9: Konsentrasjon av glukose i plasma hos flekksteinbit ved ulike tidspunkt før (0 timer, n=22) og etter stressbehandling (4 timer, n=22; 8 timer, n=22; 24 timer, n=23; 48 timer, n=19). Ulike bokstaver angir tidspunkter med signifikante forskjeller i glukosenivå. Verdiene representerer gjennomsnitt ± SE.

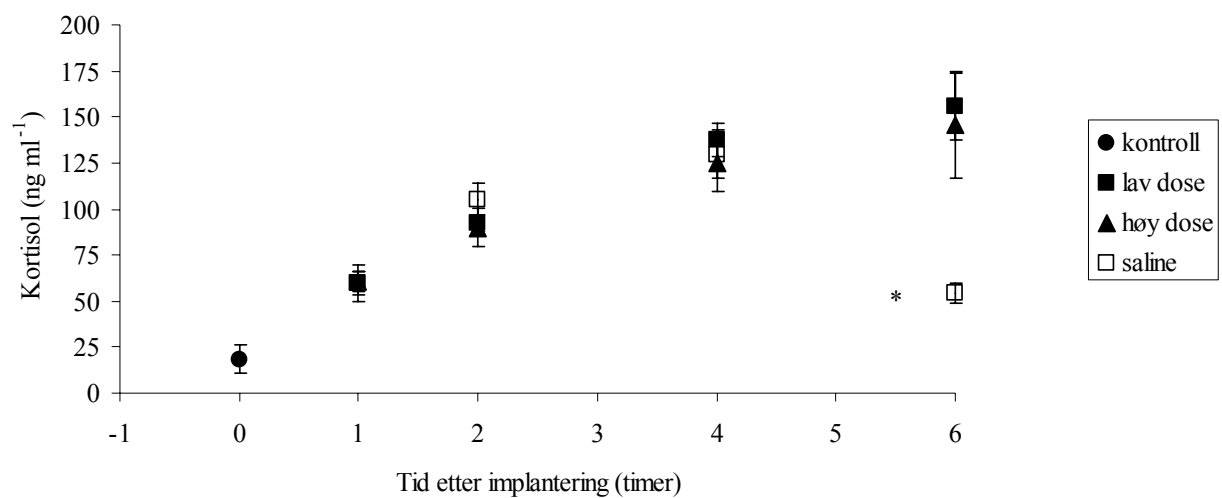
En test på om det var sammenheng mellom kortisol og glukose i forsøk 2 viste en signifikant sammenheng ( $F = 4,87$ ;  $p < 0,05$ ).



Figur 10: Plasmakonsentrasjon av kortisol plottet mot konsentrasjon av glukose i forsøk 2.

### 3.3. ACTH injeksjon 1

ANOVA testen viste at de var signifikante effekter av behandling ( $F = 3,67$ ;  $p < 0,05$ ) og tid ( $F = 21,2$ ;  $p < 0,05$ ) og interaksjonen behandling x tid ( $F = 3,87$ ;  $p < 0,05$ ) på plasma kortisol (Fig. 11). Gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon av kortisol økte etter behandling, men var ikke signifikant forskjellig mellom de ulike behandlingene 1, 2 og 4 timer etter behandling. Post-hoc test viste at plasma kortisolnivå i salinegruppen var signifikant lavere enn i begge ACTH gruppene, 6 timer etter behandling.

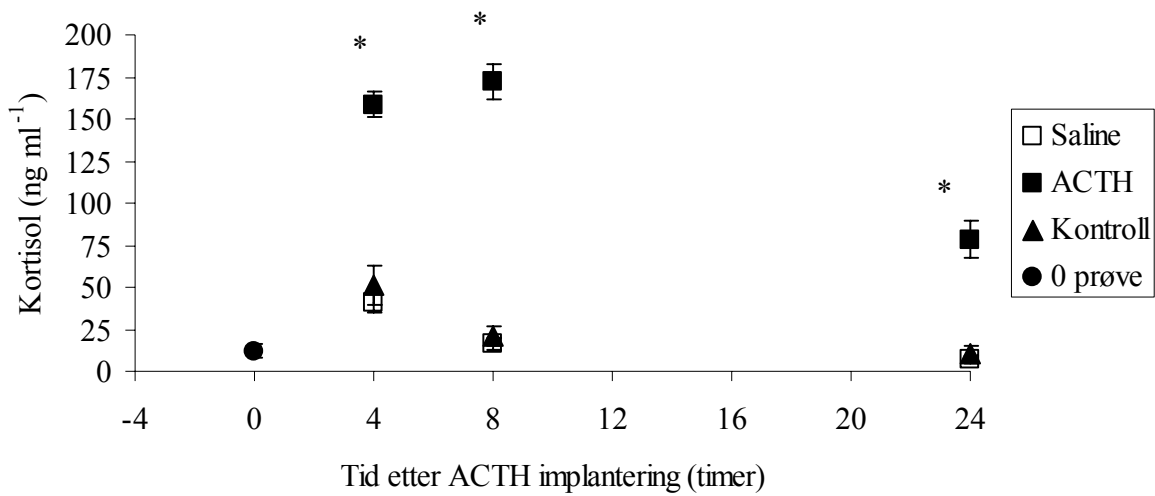


Figur 11: Konsentrasjon av kortisol i plasma hos flekksteinbit ved ulike tidspunkt før (tidspunkt 0=kontroll) og etter implantering av lav og høy dose ACTH, samt saline. Tidspunkt med signifikante forskjeller i kortisolnivå er angitt med \*. Verdiene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SE.

### 3.4. ACTH injeksjon 2

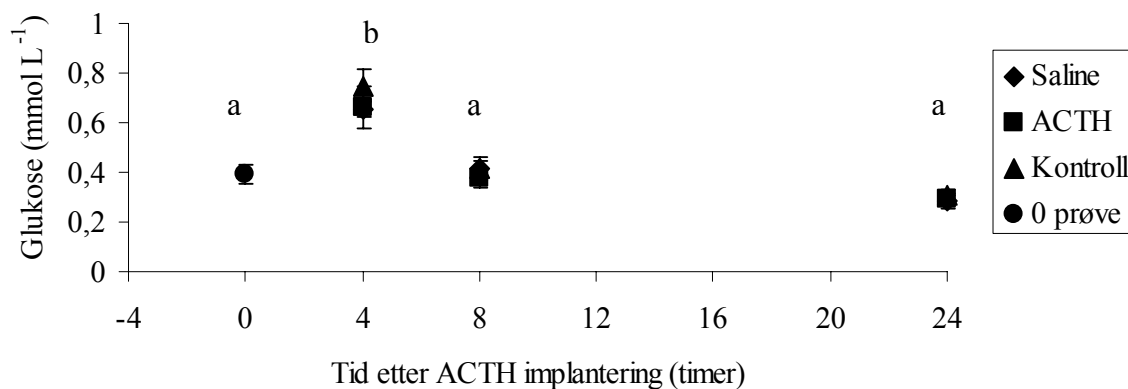
ANOVA testen viste at det var signifikante effekter av behandling ( $F = 103,78$ ;  $p < 0,05$ ), tid ( $F = 35,24$ ;  $p < 0,05$ ) og interaksjonen mellom behandling x tid ( $F = 4,22$ ;  $p < 0,05$ ).

Post-hoc testen viste ingen signifikante forskjeller mellom tidspunktene i ACTH gruppen og heller ingen signifikante forskjeller mellom kontroll og saline ved de ulike tidspunktene (Fig. 12). Den ACTH behandlede gruppen hadde signifikant høyere plasma kortisolnivåer enn saline- og kontrollgruppen 4, 8 og 24 timer etter behandling.



Figur 12: Konsentrasjon av kortisol i plasma hos flekksteinbit ved ulike tidspunkt før (tidspunkt 0) og etter implantering av ACTH og saline i tillegg til ubehandlede kontroller ved hvert tidspunkt. Tidspunkter med signifikante forskjeller i kortisolnivå mellom ACTH gruppen og saline/kontrollgruppene er angitt med \*. Verdiene representerer gjennomsnitt ± SE.

ANOVA testen viste at det var signifikante effekter av tid ( $F = 62,22$ ;  $p < 0,05$ ), men ingen signifikante effekter av behandling ( $F = 0,98$ ;  $p > 0,05$ ) eller interaksjonen behandling x tid ( $F = 0,29$ ;  $p > 0,05$ ) på plasma glukose mellom 4, 8 og 24 timer etter behandling. Post-hoc testen viste at plasma glukosekonsentrasjon var signifikant høyere 4 timer etter behandling enn ved de andre tidspunkter (Fig. 13).



Figur 13: Konsentrasjon av glukose i plasma hos flekksteinbit ved ulike tidspunkt før (tidspunkt 0) og etter implantering av ACTH og saline i tillegg til ubehandlede kontroller ved hvert tidspunkt. Ulike bokstaver angir tidspunkter med signifikante forskjeller i glukosenivå. Verdiene representerer gjennomsnitt  $\pm$  SE.



## 4. DISKUSJON

I dette studiet har vi undersøkt fysiologiske responser på en antatt sterk, akutt stressor (10 minutter med vanntomt kar) hos flekksteinbit (*Anarhichas minor* Olafsen). Flekksteinbiten responderte på denne stressoren med en økning i kortisolnivå (primær respons) i plasma etter 4 timer. Vi fant en signifikant økning i glukosenivået (sekundær respons) etter 4 timer. I tidligere forsøk det vært målt en økning av kortisol- og glukosenivå hos laksefisk etter eksponering til en akutt stressor. Hos slike fisker har man imidlertid funnet en mye raskere og høyere økning i plasma kortisolnivåene enn i våre forsøk med flekksteinbit. Studiet viste videre at flekksteinbiten har en høy kortisolrespons på økte ACTH nivåer i blod, og det er antatt at den svært lave kortisolresponsen på stressoren reflekterer at denne arten er lite følsom for stressorer i fangenskap.

### 4.1. Kortisol (primær respons)

Riktig plasmanivå av stresshormoner kan være vanskelig å måle da samplingsprosedyre (*per se*) kan ha innvirkning på resultatet. Ved stressbelastningen som handtering og blodprøvetaking representerer vil blodets kortisolkonsentrasjon øke etter aktivering av HHI-aksen. I tidligere forsøk med laksefisk har det blitt vist at kortisolnivå i blodet begynner å øke ca. 3 minutter etter at fisken er forstyrret (Sumpter et al. 1985), noe som medfører at blodprøven bør være tatt (eller fisken avlivet) før det er gått 3 minutter for å måle basalt kortisolnivå hos fisk. I mange sammenhenger er det imidlertid nødvendig å bedøve fisk i forbindelse med blodprøvetaking, noe som oftest medfører at det tar lengre tid enn 3 minutter før blodprøven er tatt. Dette vil kunne medføre at fiskens blodnivå av kortisol er påvirket av selve samplingsprosedyren, og at en ikke måler det riktige kortisolnivå (dvs. det nivået fisken hadde før den ble forstyrret). I vårt pilotforsøk så vi at en prosedyre som innebar bedøvelse og blodprøvetaking opp til 20 min etter at fisken ble håvet ut av karet bare unntaksvis gav en liten økning i plasma kortisolnivå sammenlignet med fisken som ble avlivet innen to minutter med slag i hodet (Fig. 4). Vi kunne dermed gå ut fra at en samplingsprosedyre som innebærer bedøvelse, i seg selv ikke påvirket plasmakonsentrasjon av kortisol i en slik grad at bedøvelse ikke kunne brukes under de senere stressforsøk med flekksteinbit. Bakgrunnen for denne vurderingen var at det er vanskelig å avlive flekksteinbit ved slag i hodet på grunn av en særdeles sterk skalle, og at avlivning ved bedøvelse etisk sett er å foretrekke. Fisken i stressforsøk 1 og 2, samt i ACTH forsøkene ble derfor avlivet i en sterk Benzocaine-løsning.

Plasmakonsentrasjoner av kortisol hos fisk som ikke er stresset varierer mellom arter, men er generelt målt til å være under 30-40 ng ml<sup>-1</sup> (Wedemeyer et al. 1990). Det oppgives imidlertid at det basale kortisolnivået bør være under 5 ng ml<sup>-1</sup> (Pickering & Pottinger 1989) hos fullstendig ustresset fisk, men nivået er vanligvis litt høyere hos fisk i oppdrett på grunn av at det er vanskelig å fjerne alle stressorer. Gjennomsnittlig plasmakonsentrasjon av kortisol i den ikke stressede flekksteinbiten som ble brukt i vårt forsøk var på 15,43 ng ml<sup>-1</sup> (18,75 ng ml<sup>-1</sup> til 11,92 ng ml<sup>-1</sup>). Det har tidligere ikke blitt gjort noe studie på stress hos flekksteinbit og man vet derfor ikke hva nivået av plasma kortisol er hos helt utstresset flekksteinbit. Det målte nivået i kontrollfisken er likt det en måler hos laksefisk under gode oppdrettsbetingelser og dette tyder på at den var lite stresset.

Handteringen i stressforsøk 1 førte til en reduksjon i plasma kortisolnivå ved uttaket 30 minutter etter at fisken var utsatt for stressoren, uten at det lar seg gjøre å finne en fornuftig forklaring på denne nedgangen. Deretter skjedde det en svak økning i plasma kortisolnivå, med en gjennomsnittlig maksimumsverdi på 32,42 ng ml<sup>-1</sup> 4 timer etter stressbelastning (Fig. 5). Økningen var svak og nivået 4 timer etter stressbelastning var ikke signifikant høyere enn nivået målt i kontrollfisken før den ble utsatt for en stressor. På grunnlag av resultatene i forsøk 1, hvor vi så en tendens til økning i plasma kortisolnivå på slutten av måleperioden (4 timer), gjorde vi et til forsøk med en lengre måleperiode. I stressforsøk 2 fikk vi en signifikant effekt av tid (ANOVA test) på plasma kortisolnivåene, noe som kan tolkes som en økning 4 timer etter stressbelastning (Fig. 8). Økningen var svak og nivået 4 timer (23,51 ng ml<sup>-1</sup>) etter at den var handtert var ikke signifikant høyere enn nivået målt i fisken som ble avlivet før stressbelastning (15,43 ng ml<sup>-1</sup>) i henhold til post-hoc testen. Resultatene tolkes imidlertid slik at det faktisk var en kortisolrespons på stressoren i dette forsøket.

Stressresponsen i flekksteinbit var annerledes enn i tidligere studerte arter hvor det er vanlig å se en maksimumsverdi av kortisol 0,5-1 time etter stressbelastning hos laksefisk (Donaldson, 1981; Barton & Iwama 1991; Vijayan & Moon 1992; Randall & Perry 1992; Thomas & Perry 1992). Men det finnes unntak fra denne generelle trenden. Vijayan og Moon (1994) fant at det tok 4 timer etter stressbelastning før sirkulerende kortisol nådde maksimalt nivå hos sea raven (*Hemipterus americanus*), en sedentarisk, bentisk marin art.

I tillegg til den langsomme kortisolresponsen i flekksteinbit var det målte maksimumsnivået av kortisol også meget lavt sammenlignet med det som er funnet i laksefisk. Hos disse artene

blir det normalt målt en 20-30 gangers økning etter stressbelastning (Strange & Schreck 1978; Barton & Schreck 1986), med maksimalnivåer av plasma kortisol som ofte overstiger 200 ng ml<sup>-1</sup> (Pickering & Pottinger 1989). Lav kortisolrespons på stressbelastning er imidlertid også registrert i 6 ulike antarktiske fiskearter med forskjellig livsstrategi (hovedsakelig sedentarisk og bentisk), hvor kortisolnivået lå mellom  $1,33 \pm 0,58$  ng ml<sup>-1</sup> til  $44,85 \pm 25,00$  ng ml<sup>-1</sup> etter relativt lang tids (30 min til 1 time) tråling og handtering (Whiteley & Egginton 1999). Høyere kortisolnivåer enn 200 ng ml<sup>-1</sup> etter stressbelastning har imidlertid også blitt sett i noen ikke salmonide arter som for eksempel i Gizzard shad (*Dorosoma shad*), Comon carp (*Cyprinus carpio*), Crappie (*Pomoxis* sp), Mummichog (*fundulus heteroclitus*) (Davis & Parker 1986; Leatch et al. 1980). Selv om den inaktive fiskearten sea raven (*Hemitripterus americanus*) i likhet med flekksteinbiten hadde en langsom økning i plasma kortisolnivå, ble det i denne arten funnet et maksimumsnivå av plasmanivå av kortisol på over 200 ng ml<sup>-1</sup>.

Vi antar at flekksteinbiten kan sammenlignes med sea raven. Dette ut fra deres nokså like levesett, og at de begge er betegnet som stasjonære fiskearter (Scott & Scott 1988; Pethon 1998). Årsaken til den langsomme kortisolresponsen i sea raven er heller ikke kjent. I tidligere studier har den blitt beskrevet som en art med lav aktivitet og metabolisme (Milligan & Farell 1986; Foster & Moon 1987). Dette kan tyde på at sea raven har et lavt energilager i naturlige omgivelser. Stress hos fisk krever energi (Vijayan & Moon 1992). I stressstudiet gjort på sea raven (Vijayan & Moon 1994) antydet forskerne at arten kan ha modifisert en neuroendokrin mekanisme for frigjøring av kortisol og katekolaminer, sammenlignet med laksefisk. Muligens har også flekksteinbiten utviklet en slik mekanisme, og at dette kan ha betydning for den langsomme økningen i plasma kortisolnivå. Videre studier er nødvendig for å avklare dette.

Flekksteinbiten i vår studie hadde en lav økning i plasma kortisolnivå. Temperaturen i vårt forsøk lå på mellom 3,5-4,0 °C. I studier gjort på røye (*Salvelinus alpinus* L.) som har sin optimale veksttemperatur på rundt 14-17 °C (Larsson et al. 2005) ble det benyttet nokså lik temperatur som i vårt forsøk. Her så forskerne en kraftig respons i plasma kortisolnivå med verdier over 150 ng ml<sup>-1</sup> (Jørgensen et al. 2001). Dette kan gi indikasjoner på at det ikke er den lave temperaturen i sjøvannet som gjør kortisolresponsen i flekksteinbiten så lav. Hos røye kom maksimal kortisolrespons allerede etter en time etter stressbelastning, på tross av en lav vanntemperatur (Jørgensen et al. 2001) og det er derfor heller ikke sannsynlig at vanntemperaturen brukt i forsøket med flekksteinbit var årsak til den langsomme økningen i

plasma kortisol. Flekksteinbit er en kaldtvannsart, med en optimaltemperatur for vekst på ca. 6 °C (Imsland et al. 2006).

Nivået av plasma kortisol hos flekksteinbiten i vårt forsøk hadde falt til prestressnivå ca 12 timer etter handtering (Fig. 8). I laksefisk er det i tidligere studier vist at plasmakonsentrasjon av kortisol når prestressnivåer 24 til 48 timer etter stressbelastning (Pickering & Pottinger 1989). Forsøkene viste dermed at plasmanivået av kortisol økte som følge av handtering, men økningen var svak og langsom sammenlignet med de mest studerte artene. Plasmanivåene av kortisol var også forholdsvis fort tilbake til pre-stress nivåer sammenlignet med det som er funnet hos andre arter. Årsakene til den lave kortisolresponsen etter handteringen hos flekksteinbit er ikke kjent. Det er imidlertid av interesse å finne ut om den lave responsen skyldes at fisken ikke oppfatter nedtappingen av kar som en stressor, eller om den fysiologisk ikke er i stand til å respondere kraftig på stress på grunn av lav sensitivitet i et eller flere av leddene i HHI -aksen.

Hypotalamus–hypofyse–interrenal–aksen (HHI-aksen) er en meget viktig komponent i stressresponsen hos fisk (Donaldson 1981; Barton & Iwama 1991). I teleoster er det vist at kortisol produseres i steroidogene celler i fornyret etter stimulering av adrenokortikotropt hormon (Wendelaar Bonga 1997). Ved å injisere ACTH i flekksteinbit kunne vi finne ut om dette hormonet faktisk utgjør et potent stimulator av kortisolproduksjon i interrenale celler hos denne arten, eller om den lave responsen på kortisol i handteringsforsøket kunne ha sin årsak i dette leddet i HHI -aksen. Plasma kortisolnivå etter ACTH injeksjonen vil kunne si oss om flekksteinbiten kan ha en svak respons på ACTH stimulering, for eksempel på grunn av nedregulerte ACTH reseptorer. Tidligere forskning har vist at *in vivo* injeksjon av ACTH har ført til kraftig økt kortisolproduksjon blant annet i yellow perch (*Perca flavescens*) (Girard et al. 1998).

Resultatet (Fig. 11) etter ACTH injeksjon 1 viste ingen signifikante forskjeller mellom de ulike behandlingsgruppene 1,2 og 4 timer etter injeksjon. Kortisolnivået i salinegruppen var imidlertid signifikant lavere enn i ACTH gruppene 6 timer etter injisering. Årsaken til den høye kortisolresponsen også i salinegruppen kan ha vært at vi i dette forsøket holdt de ulike behandlingsgruppene i samme kar. ACTH kan dermed ha diffundert over i vannet og dermed stimulert til kortisolproduksjon også i salinegruppen. Det er nylig vist i forsøk med regnbueørret at en viss mengde fritt, ikke konjugert, kortisol frigis via gjellene, og at

kortisolanalyser i vannprøver faktisk kan erstatte blodprøver i kartleggingen av basale og stressrelaterte kortisolnivåer hos fisk (Ellis et al. 2004). Disse resultatene støtter vår antagelse om at stimulering av plasma kortisol i salinegruppen skyldes "lekkasje" av ACTH fra den ACTH behandlede fisken. At nivåene i salinegruppen var lavere enn i ACTH gruppene etter 6 timer, kan i så fall tyde på at vannkonsentrasjonen av ACTH da var kraftig redusert. På grunnlag av disse resultatene gjennomførte vi et til forsøk med injeksjon av ACTH, men i dette forsøket ble behandlingsgruppene holdt i separate kar. Resultatet (Fig. 12) viste at ACTH gruppen hadde en kraftig kortisolrespons (som i ACTH forsøk1), mens injeksjonen av saline ikke ga en vesentlig forhøyning av kortisol sammenlignet med den ubehandlede gruppen. I ACTH gruppen så vi en maksimumsverdi på 172,02 ng ml<sup>-1</sup> 8 timer etter injeksjon, noe som representerer en 11 gangers økning i plasma kortisolnivå, og som er mer likt det en tidligere har funnet i laksefisk. Vi kan etter dette forsøket gå ut fra at den lave kortisolresponsen etter handtering ikke skyldes en uvanlig lav respons på ACTH, og at fisken bare i liten grad "lar seg stresse" av handtering i fangenskap. Fisk i oppdrett blir rutinemessig behandlet i ulike gjøremål. De vil derfor trolig kunne venne seg til handtering, håving og andre gjøremål som kreves i oppdrettssammenheng. De lave kortisolresponsene etter stressoren kan være en indikasjon på at stressoren ikke var spesielt sterk, men tilsvarende behandling har gitt en sterk kortisolrespons hos andre arter (Jørgensen et al. 2001; Jørgensen et al. 2002). Dette er en ytterligere indikasjon på at flekksteinbit har en lav stressrespons på handtering i fangenskap. Dette stemmer godt overens med den "tillitsfulle" og rolige atferden hos denne arten i fangenskap.

Oftest velger forskere å bruke kortisol i plasma som parameter på stressresponser hos fisk blant annet på grunn av dens relativt lette målbarhet. En annen hormonell respons på stress hos fisk er sekresjon av katekolaminer, primært adrenalin (Mazeaud et al. 1977).

Katekolaminer produseres hovedsakelig i kromaffine celler i fornyret. Kromaffine celler stimuleres direkte med sympatiske ganglier (Nilsson 1984) og forhøyning av nivået i plasma skjer mye raskere enn kortisol. I et studie gjort på den antarktiske fisken polar torske (*Boreogadus saida*) ble det funnet en sterk respons i katekolaminnivå og en svakere respons av kortisolnivå etter ulik stressbelastning (Whiteley et al. 2006). Dette kan gi indikasjoner på at selv om det målte plasma nivået av kortisol i flekksteinbiten var lav etter handtering kan man ikke utelukke at den har en kraftig adrenalinrespons på stress.

## 4.2. Glukose (sekundær respons)

Hos fisk har kortisol effekt på karbohydrat-, protein- og lipidmetabolisme (Wendelaar Bonga 1997). Kortisol stimulerer glukoneogenese som er produksjon av glukose fra andre kilder enn karbohydrater, vanligvis proteiner (Mommsen et al. 1999). Også andre faktorer enn kortisol regulerer glukosenivået. Økt katekolaminnivå etter ulike former for stressbelastning gir en rask mobilisering av glukose fra glykogenlagre i lever (Weber & Shanghavi 2000). I dette studiet har vi fokusert på å undersøke kortisolresponsen og dens forventede rolle i glukosemobilisering. Våre resultater kan gi indikasjoner på at plasma kortisol også i flekksteinbit har en effekt på glukoneogenesen. I forsøk 2 fant vi en signifikant sammenheng mellom kortisol og glukose etter korrelasjonsanalyse. Katekolaminer kan imidlertid ha hatt en betydning i denne sammenhengen, uten at dette kan diskuteres i denne sammenhengen.

Flekksteinbiten er betraktet som en relativt inaktiv fiskeart, idet den er beskrevet som stasjonær (Pethon 1998). Det finnes også lignende fiskearter som det har vært gjort stressforsøk med, f. eks sea raven. Mye av forskningen på stressreaksjoner i fisk har vært utført på laksefisk, som er en aktivt svømmende art (Pethon 1998). Glukosenivået i plasma hos flekksteinbit i våre forsøk viste i gjennomsnitt  $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$  når fisken var ustresset. I sea raven fant man et gjennomsnittlig glukosenivå på  $1,2 \text{ mmol L}^{-1}$  under tilsvarende forhold (Vijayan & Moon 1994). Dette tyder på at flekksteinbit har et enda lavere hvilenivå av glukose enn i sea raven som har en atferd som ligner flekksteinbiten. Glukosenivået i laksefisk er markert høyere enn i begge de nevnte artene, idet de i tidligere studier er funnet å være nær  $4 \text{ mmol L}^{-1}$  (Wedemeyer et al. 1990; Jørgensen et al. 2001).

Årsaken til det relativt lave glukosenivået i ustresset flekksteinbit er ikke kjent. I et tidligere studie gjort av Silkin og Silkina (2004) hvor forskerne sammenlignet fysiologiske responser på hypoksi i tre forskjellige arter med ulik livsstrategi fant man at rock perch (*Scorpaena porcus* L) som er en lite mobil art hadde et glukosenivå på  $1,15 \pm 0,06 \text{ mmol L}^{-1}$  før stressbelastning. Sea carp (*Diplodus annularis* L) som er en art som lever i kystnære strøk, og som er noe mer aktiv, hadde et hvilenivå av plasma glukose på  $4,87 \pm 0,21 \text{ mmol L}^{-1}$ . Jack mackerel (*Trachurus mediterraneus ponticus* L) som er en aktiv svømmende art, hadde et hvilenivå av plasma glukose på  $5,32 \pm 9,27 \text{ mmol}^{-1}$  (Silkin & Silkina 2004). Det har vært antydning at det høye nivået av plasma glukose i de mobile fiskeartene mest sannsynlig er nødvendig for å dekke metabolske krav i hjernen. De lite mobile artene har et større lager av glykogen i hjernen enn de aktivt svømmende. Dette har man ment kan henge sammen med

mindre behov for glukose i plasma hos de mest inaktive, idet hjernens behov for ernæring er dekket av glykogenlageret (Silkin & Silkina 2004).

Våre forsøk ble gjort i januar, mars og mai. Årstid kan ha betydning for glukosenivået hos flekksteinbit, idet fisk kan være i en form for lavenergistatus om vinteren. I et studium gjort av Nuria de Pedro et al. (2005) fant en at glukosenivået i ustresset tench (*Tinca tinca* L.) varierte mellom årstider, med høyeste verdi av plasma glukose sommerstid og laveste verdi av plasma glukose vinterstid. Det kan derfor ikke utelukkes at det lave glukosenivået i plasma hos flekksteinbit i dette forsøket delvis kan skyldes at fisken var i en vintermodus, uten at dette på noen måte vil bety at flekksteinbiten om sommeren har plasma glukosenivåer som er i nærheten av det en finner hos for eksempel laksefisk.

Handteringen i stressforsøk 1 (Fig. 6) førte ikke til en signifikant økning plasma glukose fra 0 til 0,5 time ( $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$  til  $0,356 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $p > 0,05$ ). Handtering i stressforsøk 2 førte til en signifikant økning i plasma glukosenivå mellom 0 og 4 timer ( $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$  til  $0,471 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ ) etter stressbelastning (Fig. 9). Injeksjon av ACTH førte til en signifikant økning i plasmaglukosenivå mellom 0 og 4 timer ( $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$  til  $0,66 \text{ mmol L}^{-1}$ ,  $p < 0,05$ , Fig. 13).

Den prosentvise endringen etter stressbelastning er ikke helt ulik det en ser i andre arter som for eksempel i laksefisk, hvor den typiske økningen er rundt 50 % (Jørgensen et al. 2001; Jørgensen et al. 2002). Den prosentvise økningen av plasma glukose i vårt forsøk var etter en halv time på 19 %, etter 4 timer på 55 %, og fire timer etter ACHT injeksjonen var økningen i plasmaglukoseverdi 40,7 %.

Flekksteinbit reagerer normalt på ACTH med produksjon av kortisol, og dette viser at HHI akselen fungerer. Våre resultater kan gi indikasjoner på at plasma kortisol også i flekksteinbit har en effekt på glukoneogenesen. Siden både kortisol og glukosenivået var økt først etter fire timer, er det rimelig å anta en sammenheng mellom kortisol - og glukoseøkningen. I forsøk 2 så vi etter korrelasjonsanalyse en sammenheng mellom kortisol og glukose, en slik sammenheng ble ikke sett i forsøk 1.

## **5. KONKLUSJON**

Handtering og tømning av kar førte til aktivering av primære og sekundære stressresponser hos flekksteinbit med en svak økning i plasma kortisol fire timer etter stressbelastning. Denne responsen førte til en økning i plasma glukose. Økningen i plasma kortisol var mye svakere og langsommere (maksimum etter 4 timer) enn det som en vanligvis finner i andre studerte arter, men gav allikevel en økning i plasma glukosenivå som er adaptivt i forhold til å handtere en stressor. På grunn av en normal respons på injisert ACTH (11 gangers økning i plasma kortisol), er det konkludert at det sannsynligvis ikke er en fysiologisk årsak til den lave kortisolresponsen, men heller at flekksteinbit blir lite stresset av forstyrrelse i fangenskap. Et svært lavt plasma glukosenivå hos flekksteinbit reflekterer sannsynligvis denne artens normale atferd, med et svært lavt aktivitetsnivå.



## 6. LITTERATURLISTE

- Barton, B. A. & Iwama, G. K. (1991)** Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases* 1, 3-26.
- Barton, B. A., Schreck, C.B., Ewing, R. D., Hemmingsen, A. R. & Patino, R. (1985)** Changes in plasma cortisol during stress and smoltification in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *General and Comparative Endocrinology* 59, 468-471.
- Billard, R., Bry, C. & Gillet, C. (1981)** Stress, environment and reproduction in teleost fish. In: *Stress and fish*, Pickering, A. D. (ed.) Academic Press, London, 367 s.
- Chan, D. K. O & Woo, N. Y. S. (1978)** Effects of cortisol on the metabolism of eel (*Anguilla japonica*). *General and Comparative Endocrinology* 35, 205-215.
- Chrousos, G. P. & Gold, P. W (1992)** The concepts of stress and stress system disorders- overview of physical and behavioural homeostasis - overview of physical and behavioural homeostasis. *Jama -Journal of the American Medical Association* 267, 1244-1252.
- Davis, K. B & Parker, N. C (1986)** Plasma corticosteroid stress response of 14 species of warmwater fish to transportation. *Transaction of the American Fisheries Society* 115, 495-499.
- de Pedro, N., Guijarro, A. L., Lopez-Patino, M. A., Martinez-Alvarez, R. & Delgado, M. J. (2005)** Daily and seasonal variations in haematological and blood biochemical parameters in the Tench, *Tinca tinca* Linnaeus, 1758. *Aquaculture Research* 36, 1185-1196.
- Donaldson, E. M. (1981)** The pituitary-interrenal axis an an indicator of stress in fish. In: *Stress and fish*, Pickering, A.D. (ed) Academic Press, London, 367 s.
- Donaldson, E. M. & Hunter, G. A. (1983)** Induced final maturation, ovulation, and spermatation in cultured fish. In: *Fish Physiology* volume 9, part B, Hoar, W.S., Randall, D. J., Donaldson, E. M. (ed.) Academic Press, New York..
- Ellis, T., James, J. D., Stewart, C. & Scott, A. P. (2004)** A non-invasive stress assay based upon measurement of free cortisol released into the water by rainbow trout. *Journal of Fish Biology* 65, 1233-1252.
- Falk-Petersen, I. B. & Hansen, T. K. (2001)** Organ differentiation in newly hatched wolffishes. *Journal of Fish Biology* 59, 1465 -1482.
- Falk-Petersen, I. B., Hansen, T. K., Fieler, R. & Sunde, L. M. (1999)** Cultivation of the spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen) - A new candidate for coldwater fish farming. *Aquaculture Research* 30, 711-718.
- Fiskeri og havbruksnæringens landsforening:**  
<http://www5.nho.no/havbruksnett/steinbit/FHL%20folder%20Flekksteinbit.pdf>.  
Hentet 2007.30.09.
- Foss, A., Røsnes, B. A. & Øiestad, V. (2003 a)** Graded environmental hypercapnia in juvenile spotted wolffish (*Anarhichas minor* Olafsen): effects on growth, food conversion efficiency and nephrocalcinosis. *Aquaculture* 220, 607-617.
- Foss, A., Vollen, T. & Øiestad, V. (2003b)** Growth and oxygen consumption in normal and O<sub>2</sub> supersaturated water, and interactive effects of O<sub>2</sub> saturation and ammonia on growth in spotted wolffish(*Anarhichas minor* Olafsen). *Aquaculture* 224, 105-116.
- Foss, A., Evensen, T. H., Vollen, T. & Øiestad, V. (2003 c)** Effects of chronic ammonia exposure on growth and food conversion efficiency in juvenile spotted wolffish. *Aquaculture* 228, 215-224.

- Foster, G. D., & Moon, T. W. (1987)** Metabolism in sea raven (*Hemitripterus americanus*) hepatocytes- the effect of insulin and glucagons. *General and Comparative Endocrinology* 66, 102-115.
- Girard, C., Brodeur, J. C. & Hontela, A. (1998)** Responsiveness of the interrenal tissue of yellow perch (*Perca flavescens*) from contaminated sites to an ACTH challenge test in vivo. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 55, 438-450.
- Imslund, A. K., Foss, A., Sparboe, L. O. & Sigurdsson, S. (2006)** The effect of temperature and fish size on growth and feed efficiency ratio of juvenile spotted wolffish *Anarhicas minor*. *Journal of Fish Biology* 68, 1107-1122.
- Jørgensen, E. H., Vijayan, M. M., Aluru, N. & Maule, A. G (2002)** Fasting modifies Aroclor 1254 impact on plasma cortisol, glucose and lactate responses to handling disturbance in Arctic charr. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* 132, 235-245.
- Jørgensen, E. H., Balm, P. H. M, Christiansen, J. S., Plotitsyna, N. & Ingebrigtsen, K. (2001)** Influence of o' p-DDD on the physiological response to stress in Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Aquatic Toxicology* 54, 179-193.
- Kristianlund, I. (1985)** Innføring i statistikk. Bedriftsøkonomens forlag A/S, Oslo, 447 s.
- Larsson, S., Forseth, T., Berglund, I., Jensen, A. J., Naslund, I., Elliott, J. M., Jonsson, B. (2005)** Thermal adaptation of Arctic charr: experimental studies of growth in eleven charr populations 6 from Sweden, Norway and Britain. *Freshwater Biology* 50, 353-368.
- Leach, G. J, Taylor, M. H. (1980)** The role of cortisol in stress induced metabolic changes in *Fundulus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology* 42, 219-227.
- Leach, G. J. & Taylor, M. H. (1982)** The effects of cortisol treatment on carbohydrate and protein metabolism in *Fundus heteroclitus*. *General and Comparative Endocrinology* 48, 76-83.
- Lidman, U., Dave, G., Johansson-Sjöbeck, M. L, Larsson, A. & Lewander, K. (1979)** Metabolic effects of cortisol in the European eel (*Anguilla anguilla* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology a - Physiology* 63 A, 339-344.
- Mazeaud, M.M., Mazeaud, F. & Donaldson, E. M. (1977)** Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transaction of the American Fisheries Society* 106, 201-212.
- Mazur, C. F. & G. K. Iwama (1993)** Handling and crowding stress reduces number of plaque-forming cells in Atlantic salmon. *Journal of Aquatic Animal Health* 5, 98-101
- McClane, A. J. (1978)** Saltwater Fishes of North America. New York, 283s.
- Milligan, C. L. & Farell, T.P. (1986)** Extracellular and intracellular acid-base status following strenuous activity in the sea raven (*Hemitripterus americanus*). *Journal of Comparative Physiology B- Biochemical systemic and Enviromental Physiology* 156, 583-590.
- Moksness, E. (1994)** Growth rates of the common wolffish, *Anarhicas lupus* L., and spotted wolffish, *A. minor* Olafsen, in captivity. *Aquaculture and Fisheries Management* 25, 363-371.
- Mommsen, T. P., Vijayan, M. M. & Moon, T. W. (1999)** Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 9, 211-268.
- Nelson, J.S. (1994)** Fishes of the world. New York.
- Nilsson, S. (1984)** Adrenergic control systems in fish. *Marine Biology Letters* 5, 127-146.

- Olsen, Y. A., Reitan, L. J. & Røed, K. H. (1993)** Gill Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase activity, plasma cortisol level, and non-specific immune response in Atlantic salmon (*Salmo salar*) during parr-smolt transformation. *Journal of Fish Biology* 43, 559-573.
- Pethon, P. (1998)** Aschehougs Store Fiskebok. Aschehoug, Oslo, 447.
- Pickering, A. D (1992)** Rainbow trout husbandry: management of the stress response. *Aquaculture* 100, 125-139.
- Pickering, A. D & Pottinger, T. G. (1989)** Stress responses and disease resistance in salmonid fish: Effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish physiology and Biochemistry* 7, 253-258.
- Quinn, G. P. & Keough, M. J. (2002)** *Experimental Design and Data Analysis for Biologists*. Cambridge, Cambridge University Press, United Kingdom, 537 s.
- Randall, D. J. & Perry, S. F. (1992)** Catecholamines. In: *Fish physiology* vol.12b, Hoar, W.S., Randall, D. J., Farrell, A. P. (ed.), San Diego.
- Scott, M. & Scott, W.B. (1988)** *Atlantic fishes of Canada*, Toronto, 731 s.
- Selye, H. (1936)** A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*, London 138, 32 s
- Silkin, Yu. A & Silkina, E. N (2004)** Effect of hypoxia on physiological-biochemical blood parameters in some marine fish. *Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology* 41, 527-532.
- Storer, H. H. (1967)** Starvation and the effects of cortisol in the goldfish. *Comparative Biochemistry Physiology* 20, 939-948.
- Sumpter, J. P., Pickering, A.D. & Pottinger, T.G. (1985)** Stress-induced elevation of plasma  $\alpha$ -MSH and endorphin in the brown trout, *Salmo trutta* L. *General and Comparative Endocrinology* 59, 257-265.
- Thomas, S. & Perry, S. F. (1992)** Control and consequences of adrenergic activation of red blood cell Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange on blood –oxygen and carbon-dioxide transport in fish. *Journal of Experimental Zoology* 263, 160-175.
- Tilseth, S. (1990)** New marine fish species for cold – water farming. *Aquaculture* 85, 235-245.
- Vijayan, M. M & Moon, T. W. (1992)** Acute handling stress alters hepatic glycogen metabolism in food-deprived rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*. 49, 2260-2266.
- Vijayan, M.M. & Moon, T.W. (1994)** The stress responses and the plasma disappearance of corticosteroids and glucose in a marine teleost, the sea raven. *Canadian Journal of Zoology* 72, 379-386.
- Weber, J. M. & Shanghavi, D. S. (2000)** Regulation of glucose production in rainbow trout: role of epinephrine in vivo and in isolated hepatocytes. *American Journal of Physiology- Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 278, R956-R963.
- Wedemeyer, G. A. & McLeay, D. J. (1981)** Methods for determining the tolerance of fishes to environmental stressors. In: *stress and fish*, Pickering, A. D. (ed.) New York, 367.
- Wedemeyer, G. A., Barton, B. A. & McLeay, D. J. (1990)** Stress and acclimation. In *Methods for Fish Biology*, Schreck C.B, Boyle P.B. (ed.) Bethesda, 684 s.
- Wendelaar Bonga, S. (1997)** The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, 591-625.
- Whiteley, N. M & Egginton, S. (1999)** Antarctic fishes have a limited capacity for catecholamine synthesis. *Journal of Experimental Biology* 202, 3623-3629.
- Whiteley, N. M., Christiansen, J. S. & Egginton, S. (2006)** Polar cod, *Boregadus saida* (Gadidae) show an intermediate stress response between Antarctic and temperate fishes. *Comparative Biochemistry and Physiology- a Molecular & Integrative Physiology* 145, 493-501.
- Young, G., Björnsson, B. T., Prunet, P., Lin, R.J & Bern, H. A. (1989)** Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): Plasma prolactin, growth

hormone, thyroid hormones, and cortisol. *General and Comparative Endocrinology* 74, 334-345.

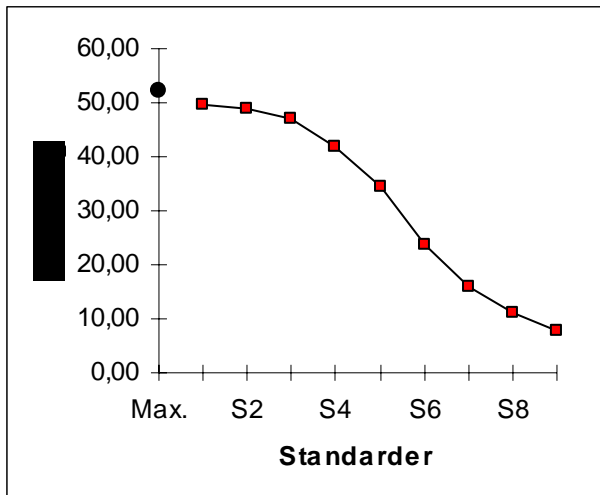
**Zar, J. H. (1999)** *Biostatistical Analysis*. 4 Edn., New Jersey, 663 s.

**Øiestad, V. (1999)** Shallow raceways as a compact, resource maximizing farming procedure for marine fish species. *Aquaculture Research* 30, 831-840

## 7. APPENDIKS

### 7.1. Kortisolanalyse

Standardkurven i RIA analysen er en sigmoid kurve og verdiene fra tellingen av radioaktivitet må ligge innenfor den lineære delen av kurven for at de skal kunne aksepteres.



Figur 14: Eksempel på standardkurve for bruk i RIA analyse. I dette tilfellet vil verdien som havner innenfor S3-S7 fra telling av radioaktivitet i plasmaprøver være godkjente. Total bound (TB; totale mengden radioaktivt steroid bundet til antistoff i fravær av ikke radioaktivt steroid) er angitt med punktmerke på y-aksen.

### 7.2. Glukoseanalyse

Tabell 1: Tabellen viser reagensmiddel for bruk i glukoseanalysen.

<u>Innhold</u>	<u>Konsentrasjoner i testen</u>
Buffer	
Pipes	100 mmol/l, pH 7.6
ATP	4 mmol/l
NAD <sup>+</sup>	3 mmol/l
Magnesium ioner	15 mmol/l
Sodium azid	
Enzyme reagenser	
Hexokinase	≥50 U/ml
G-6-PHD	≥150 U/ml
Sodium azide	
Standard	
Glukose	5,55 mmol/l (100mg/dl)

## 7.3. Statistikk

### 7.3.1. Regresjonsanalyse

Tabell 2: Tabellen viser resultater etter regresjonsanalyse for å sjekke forholdet mellom fiskevekt og plasma kortisol i forsøk 1 og 2.

Forsøk 1:

Tidspunkt 0 timer

Ingen sammenheng,  $F= 0,129$ ,  $p > 0,05$  (n=21)

Tidspunkt 1: 0,5 time

Ingen sammenheng,  $F= 0,03$ ,  $p > 0,05$  (n=19)

Tidspunkt 2: 1 time

Ingen sammenheng,  $F= 0,386$ ,  $p > 0,05$  (n=20)

Tidspunkt 3: 2 timer

Ingen sammenheng,  $F= 0,002$ ,  $p > 0,05$  (n=18)

Tidspunkt 4: 4 timer

Ingen sammenheng,  $F= 0,004$ ,  $p > 0,05$  (n=19)

Forsøk 2:

Tidspunkt 0 timer

Ingen sammenheng,  $F= 0,883$ ,  $p > 0,05$  (n=22)

Tidspunkt 1: 4 timer

Ingen sammenheng,  $F= 1,46$ ,  $p > 0,05$  (n=22)

Tidspunkt 2: 8 timer

Ingen sammenheng,  $F= 1,41$ ,  $p > 0,05$  (n=22)

Tidspunkt 3: 24 timer

Ingen sammenheng,  $F= 0,23$ ,  $p > 0,05$  (n=23)

Tidspunkt 4: 48 timer

Ingen sammenheng,  $F= 0,0007$ ,  $p > 0,05$  (n=19)

### 7.3.2 Post- hoc tester, stressforsøk 1 og 2, samt ACTH injeksjon 1 og 2.

Tabell 3: Tabellen viser Post hoc test, forsøk 1, effekt av tid på plasma kortisolnivå.

Unequal N HSD; variable Log cortisol forsøk 1 (Kortisol handteringsstress) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS= 0,20386, df=91,000						
Cell No.	Tid forsøk 1	{1},99151	{2},570777	{3}, 78783	{4}, ,67181	{5}1,3552
1	0		0,026636	0,589783	0,218958	0,103641
2	1	0,026636		0,528226	0,962126	0,000123
3	2	0,589783	0,528226		0,938398	0,001970
4	3	0,218958	0,962126	0,938398		0,000268
5	4	0,103641	0,000123	0,001970	0,000268	

Tabell 4: Tabellen viser post hoc test, forsøk 1, effekt av tid på plasma glukosenivå.

Unequal N HSD; variable Log Gluk + 1 forsøk 1 (Kortisol handteringsstress) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS= 0,00120, df=78,000						
Cell No	Tid forsøk 1	{1} ,10873	{2} ,12891	{3}, 12705	{4}, 12502	{5} ,10225
1	0		0,474484	0,512555	0,675526	0,980302
2	1	0,474484		0,999894	0,997812	,,201042
3	2	0,512555	0,999894		0,999846	0,212311
4	3	0,675526	0,997812	0,999846		0,349937
5	4	0,980302	0,201042	0,212311	0,349937	

Tabell 5: Tabellen viser post hoc test, forsøk 2, effekt av tid på plasma kortisolnivå

Unequal N HSD; variable Log cortisol forsøk 2 (Kortisol handteringsstress) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS= 0,24037, df=98,000						
Cell No	Tid forsøk 2	{1} ,84244	{2}, 1,1714	{3} 1,1250	{4} ,89819	{5} ,82188
1	0		0,179182	0,318427	0,995699	0,999944
2	4	0,179182		0,997903	0,352423	0,189491
3	8	0,318427	0,997903		0,543150	0,321511
4	24	0,995699	0,352423	0,543150		0,989095
5	48	0,999944	0,189491	0,321511	0,989095	

Tabell 6: Tabellen viser post hoc test, forsøk 2, effekt av tid på plasma glukosenivå.

Unequal N HSD; variable Log gluc + 1 forsøk 2 (Kortisol handteringsstress)						
Approximate Probabilities for Post Hoc Tests						
Error: Between MS= ,00230, df=95,000						
Cell No.	Tid forsøk 1	{1}	{2}	{3}	{4}	{5}
		,11321	,16377	,14731	,13842	,11501
1	0		0,008262	0,152971	0,437113	0,999964
2	4	0,008262		0,800115	0,431724	0,019170
3	8	0,152971	0,800115		0,974777	0,239385
4	24	0,437113	0,431724	0,974777		0,562253
5	48	0,999964	0,019170	0,239385	0,562253	



Tabell 7: Tabellen viser post hoc test, ACTH forsøk 1, effekt av tid og behandling på plasma kortisolnivå.

Cell no	Unequal N HSD; variable Log cort (ACTH forsøk 1) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS= ,02895, df= 98,000													
	Behandling	Tid	{1} 1,7297	{2} 1,9610	{3} 2,1301	{4} 2,1742	{5} 1,7704	{6} 1,9286	{7} 2,1027	{8} 2,0354	{9} 1,7515	{10} 2,0064	{11} 2,0838	{12} 1,7177
1	ACTH LD	1		0,112800	0,000162	0,001115	0,999994	0,286486	0,001787	0,006236	1,000000	0,021397	0,000705	1,000000
2	ACTH LD	2	0,112800		0,538836	0,574664	0,349059	0,999999	0,879480	0,997894	0,287082	0,999983	0,900251	0,254365
3	ACTH LD	4	0,000162	0,538836		0,999999	0,000559	0,268863	1,000000	0,983901	0,000570	0,895778	0,999979	0,001085
4	ACTH LD	6	0,001115	0,574664	0,999999		0,004557	0,352250	0,999873	0,958300	0,002362	0,860170	0,998793	0,000718
5	ACTH HD	1	0,999994	0,349059	0,000559	0,004557		0,638206	0,009057	0,033985	1,000000	0,096695	0,004443	0,999987
6	ACTH HD	2	0,286486	0,999999	0,268863	0,352285	0,638206		0,661311	0,960156	0,547477	0,996857	0,665947	0,470689
7	ACTH HD	4	0,001787	0,879480	1,000000	0,999873	0,009057	0,661311		0,999720	0,004298	0,992505	1,000000	0,003010
8	ACTH HD	6	0,006236	0,997894	0,983901	0,958300	0,033985	0,960156	0,999720		0,028687	1,000000	0,999967	0,032990
9	Saline	1	1,000000	0,287082	0,000570	0,002362	1,000000	0,547477	0,004298	0,028687		0,079290	0,004086	1,000000
10	Saline	2	0,021397	0,999983	0,895778	0,860170	0,096695	0,996857	0,992505	1,000000	0,079290		0,997020	0,080220
11	Saline	4	0,000705	0,900251	0,999979	0,998793	0,004443	0,665947	1,000000	0,999967	0,004086	0,99702		0,006094
12	Saline	6	1,000000	0,254365	0,001085	0,000718	0,999987	0,470689	0,003010	0,032990	1,000000	0,080220	0,006094	

Tabell 8: Tabellen viser post hoc test, ACTH forsøk 2, effekt av tid og behandling på plasma kortisolnivå.

Cell no	Unequal N HSD; variable Log cort (ACTH forsøk 2) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS= ,10650, df= 80,000										
	Behandling	Tid	{1} 2,1939	{2} 2,2266	{3} 1,8397	{4} 1,5474	{5} ,1,0377	{6} ,46159	{7} ,1,5723	{8} 1,2085	{9} ,85282
1	ACTH	4		1,000000	0,226880	0,003100	0,000132	0,000132	0,000503	0,000132	0,000132
2	ACTH	8	1,000000		0,137672	0,000197	0,000132	0,000132	0,000272	0,000132	0,000132
3	ACTH	24	0,226880	0,137672		0,480453	0,000136	0,000132	0,600981	0,001479	0,000168
4	Saline	4	0,000310	0,000197	0,480453		0,007596	0,000132	1,000000	0,341695	0,011779
5	Saline	8	0,000132	0,000132	0,000136	0,007596		0,002723	0,004150	0,960521	0,986621
6	Saline	24	0,000132	0,000132	0,000132	0,000132	0,002723		0,000132	0,000192	0,496496
7	Kontroll	4	0,000503	0,000272	0,600981	1,000000	0,004150	0,000132		0,251428	0,007777
8	Kontroll	8	0,000132	0,000132	0,001479	0,341695	0,960521	0,000192	0,251428		0,624084
9	Kontroll	24	0,000132	0,000132	0,000168	0,011779	0,986621	0,496496	0,007777	0,624084	

Tabell 9: Tabellen viser post hoc test, ACTH injeksjon 2, effekt av behandling på plasma glukosenivå ved 4 timer.

Unequal N HSD; variable log gluc (ACTH forsøk 2) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS= ,00235, df=36,000					
Cell no.	Behandling	{1} ,14203	{2} ,21603	{3} ,21811	{4} ,23969
1	Før behandling		0,013328	0,006572	0,000519
2	ACTH	0,013328		0,999754	0,730456
3	Saline	0,006572	0,999754		0,753445
4	Kontroll	0,000519	0,730456	0,753445	

Tabell 10: Tabellen viser post hoc test, ACTH injeksjon 2, effekt av behandling på plasma glukosenivå ved 8 timer.

Unequal N HSD; variable log gluc (ACTH forsøk 2) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS= ,00150, df=37,000					
Cell no.	Behandling	{1} ,14203	{2} ,13756	{3} ,14829	{4} ,14934
1	Før behandling		0,995679	0,981324	0,974443
2	ACTH	0,995679		0,945176	0,929042
3	Saline	0,981324	0,945176		0,999926
4	Kontroll	0,974443	0,929042	0,999926	

Tabell 11: Tabellen viser post hoc test, ACTH injeksjon 2, effekt av behandling på plasma glukosenivå ved 24 timer.

Unequal N HSD; variable log gluc (ACTH forsøk 2) Approximate Probabilities for Post Hoc Tests Error: Between MS= ,00089, df=39,000					
Cell no.	Behandling	{1} ,14203	{2} ,11079	{3} ,10796	{4} ,11596
1	Før behandling		0,082249	0,049912	0,221019
2	ACTH	0,082249		0,996087	0,979906
3	Saline	0,049912	0,996087		0,931225
4	Kontroll	0,221019	0,979906	0,931225	