

Er HPI-aksens respons på akutt stress hos pre-smolt av Atlantisk laks påvirket av kortvarig, ukentlig kulde- og handteringsstress under egg- og plommesekkstadiet

—
Charlotte Helen Gustavsen

Masteroppgave i fiskeri- og havbruksvitenskap

Studieretning: Havbruk (60 stp)

November 2015

Innhold

1. Innledning.....	7
1.1 Stress respons i fisk	7
1.2 Hypotalamus - hypofyse - interrenal akse (HPI).....	8
1.2.1 Hypotalamus	10
1.2.2 Hypofysen.....	10
1.2.3 Interrenalt vev (hodenyren)	10
1.3 Plasma kortisol- og glukoserespons	10
1.4 Glukokortikoid reseptor	11
1.5 Utvikling av HPI-aksen under embryogenesen	12
1.6 Hensikt.....	12
2. Material og Metode	13
2.1 Fisk og forsøksfasiliteter.....	13
2.2 Forsøksdesign	13
2.3 Kortisol analyse	15
2.4 Glukose.....	18
2.5 Analyser av genuttrykk i hypofyse og hodenyre	18
2.6 Databehandling og statistikk.....	20
3. Resultater	21
3.1 Plasma kortisol konsentrasjon	21
3.2 Plasma glukose konsentrasjon	22
3.3 Genuttrykk av Steroidogenic Acute Regulatory Protein (<i>star</i>)	23
3.4 Uttrykk av 3 genvarianter av proopiomelanocortin	24
3.5 Uttrykk av to genvarianter av glukokortikoidreseptor	26
3.6 Lengde, vekt og kondisjonsfaktor	26
4. Diskusjon	27
5. Konklusjon	30
6. Referanseliste.....	31

Forord

Denne oppgaven er avslutningen på min mastergrad i Fiskeri- og Havbruksvitenskap ved Universitetet i Tromsø.

Først og fremst vil jeg gi en enorm takk til min veileder Even Jørgensen, jeg er utrolig takknemlig for all din hjelp, kunnskap, tålmodighet, og forståelse. Vil også takke Helge Tveiten og Chandra Ravuri, for god opplæring og hjelp til analyser på laboratoriet.

En super takk til min søster Lone for all hjelp, spesielt på lab som førte til at jeg ble fortere ferdig med analyser så jeg kunne reise til Japan et semester.

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

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

Tromsø, 2. desember 2015

Charlotte Helen Gustavsen

Sammendrag

Det er blitt foreslått at eksponering av stressor på tidligere livsstadier hos fisk kan være gunstig for utviklingen senere, dette fordi det kan redusere følsomhet for stressorer i respons på kortisol. Dette i likhet med responsen på maternalt glucocorticoid innhold i egg, som induerte den samme reduksjon i følsomheten av HPI-aksen respons på stress hos ungfisk. Dermed kan både håndteringen av avkom tidlig i utviklingen bli foreslått som en effektive modulatorer i respons på stress. På den andre siden kan eksponering til stress og høye glucocorticoidnivåer i en tidlig livsfase påvirke utviklingen av hormonelle akser og derved svekke fiskens evne til senere i livet å mobilisere disse aksene ved behov.

Forsøket besto av fire behandlingsgrupper hvor det ble undersøkt effekten av tidlig eksponering av stressfaktorer på tidligere livsstadier hos Atlantisk laks (*salmo Salar*). Fisken ble utsatt for akutt stress i form av 1 min kulde (0°C) - og 1 min lufteksponering på ulike stadier i tidlig i utviklingen (øyerognstadiet til startfôring), og etter behandling holdt ustresset. Etter 6 måneder, da fisken hadde nådd et pre-smolt stadiet ble den utsatt for samme akutt stressor som tidligere og det ble tatt plasma- og vevsprøver 0, 1 og 3 timer etter eksponering for akutt stressor, for å undersøke plasma kortisol- og glukosenivåer og genuttrykk av Steroidogenic Acute Regulatory Protein (*star*) i hodenyre og glukokortikoid reseptor (*gr1* og *gr2*) og proopiomelanocortin (*pomca1*, *pomca2* og *pomcb*) i hypofysen (som alle er hoved komponenter i responsen på stress hos fisk). Dette for å undersøke om det var noen forskjeller mellom behandlingsgruppene i deres respons på denne stressoren.

Resultatene viser til en mulig nedregulering av HPI-aksens negative feedback signalisering i gruppen som ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og frem til klekking. Denne gruppen hadde et økt genuttrykk av både *star*, *pomca1* og *pomca2* og en forsinkelse i reduksjon av plasmakortisolkonsentrasjon ved T₃ i forhold til de andre behandlingsgruppene. Det ble også påvist en mulig effekt i behandlingsgruppen som fikk kulde- og handteringsstress under plommesekkstadiet og behandlingsgruppen utsatt for kulde- og handteringsstress fra øyeeggstadiet til startfôring, disse gruppene hadde et signifikant redusert genuttrykk av *pomca1* og *poma2* i forhold til di andre behandlingsgruppene. Kontrollgruppen viste til et signifikant økning i genuttrykk av *pomca1*, *poma2* og *pomcb* fra T₀ til T₃.

Resultatene i denne undersøkelsen indikerer at eksponering til stressorer under embryogenesen og tidlig post-klekking vil ha langsiktige virkninger på komponenter i den hormonelle aksen som mobiliseres ved stress i senere livsstadier.

1. Innledning

Stress kan sies å være en respons på forstyrrelse av den homeostatisk likevekt i et individ utsatt for stress, indre og/eller ytre stimuli (kjemisk, fysisk eller biologisk), som defineres som stressorer (Selye, 1950;Wedemeyer, 1996;Wendelaar Bonga, 1997;Wendelaar Bonga, 2011). På kort sikt fungerer hovedsakelig stressresponsen slik at den er til fordel for dyret. Blir en organisme/individ utsatt for fare eller utfordringer, vil den økte produksjonen av katekolaminer og kortisol øker hjertefrekvensen og blodtilførselen til musklene og øke prosesser som gir mer energi. Mindre akutte kroppsfunksjoner inkludert vekst, immunsystemet, reproduksjon og fordøyelsen blir «satt på vent». En negativ stressrespons er langvarig og / eller gjentatte stressfaktorer (uker, måneder) som resulterer i en kronisk stress tilstand der individet ikke lengre er i stand til å opprettholde/gjenopprette homeostase vil dette kunne føre til redusert evne til reproduksjon, vekst og overlevelse, og effekten er dermed malignt for fisken (Schreck, 2010;Sterling, 2012).

1.1 Stress respons i fisk

I oppdrettsnæringen blir fisk eksponert for utfordrende situasjoner som kan gi opphav til stress. Stressorer i akvakultur kan være suboptimal / dårlig vannkjemi, gjentatt håndtering, vaksinerings, sykdom, underernæring, transport og predatorer (Chrousos, 1998;Madaro et al., 2015). Stressorer forårsaker to endokrine responser (fig1); En adrenerg respons som fører til økte konsentrasjoner av adrenalin og noradrenalin i blodplasma, og en respons hvor aktivering av hypothalamus - hypofyse (pituitary) – interrenal (HPI) akselen fører til økte konsentrasjoner av kortisol i blodplasma (Wendelaar Bonga, 2011).

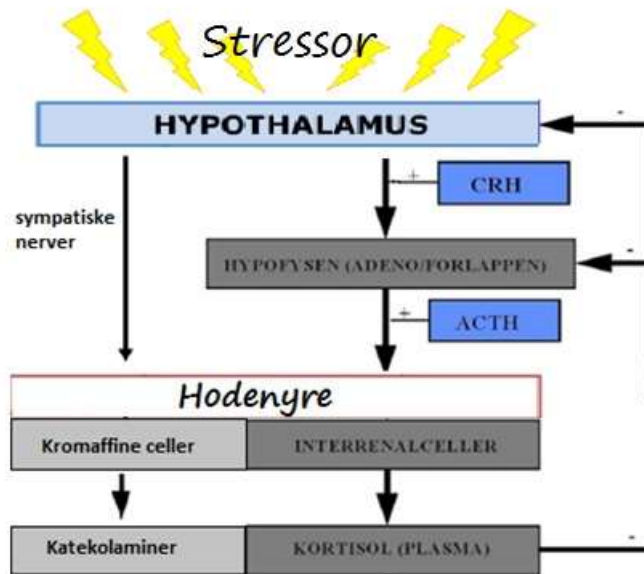


Fig. 1. Figuren viser de to endokrine responsene. Figuren er tilpasset etter Bernier et al. (2009) og Wendelaar Bonga (2011)

1.2 Hypotalamus - hypofyse - interrenal akse (HPI)

Utskillelsen av katekolaminer skjer hurtigere enn utskillelsen av kortisol (Saligaut et al., 1999). Man bruker ikke katekolaminer som indikator på primære stressresponser, i og med at adrenalin og noradrenalin har såpass kort biologisk halveringstid som 10 minutter i fiskeblod (Wendelaar Bonga, 2011). Følgende avsnitt beskriver elementer av teleost HPI-aksen, samt den neuroendokrine og endokrine responsene som involverer hypothalamus, hypofyse og hodenyrens interrenal vev.

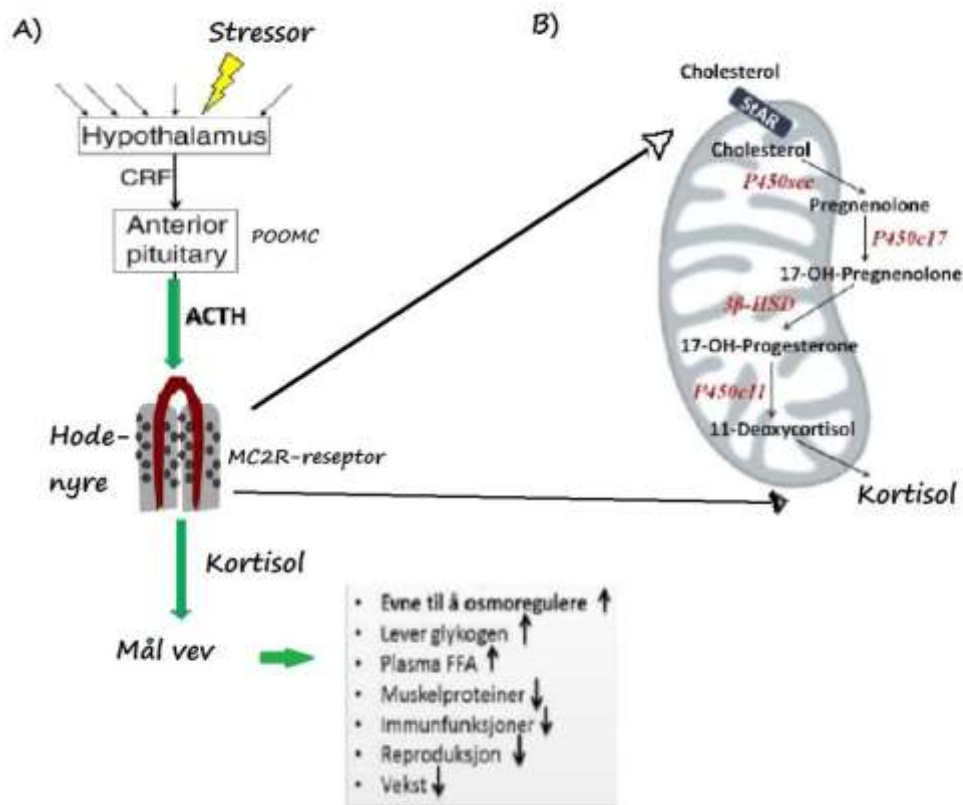


Fig. 2. Forenklet oversikt over hypothalamus-hypofyse-interrenal (HPI) akse anatomi og signalkaskade. A) Når en stressor er oppfattet i hypothalamus vil spesifikke neuroner i nukleus preoticus (NPO) syntetisere og utskille peptid-neurohormonet corticotropic releasing factor (CRF); CRF transportertes til den anteriore delen av hypofysen via aksoner og frigjøres fra synapser som er lokalisert nær et område som inneholder kortikotrope celler som stimuleres å skille ut adrenokortikotropt hormon (ACTH) til sirkulasjonen. I interrenal celler stimulerer ACTH kortisol syntese via melanocortin type 2 reseptor (MC2R) signalering. Ved å nå mål vev, formidler kortisol sine genomiske effekter via glukokortikoid og mineralokortikoid reseptorer (GR og MR, henholdsvis. På Fig2 B, presenteres kortisol biosynteseveien. Når kolesterol transporteres til den indre mitokondriemembranen ved å steroidogenisk akutt regulatorisk protein(StAR), blir det igjennom en serie av enzymatiske reaksjoner syntetisert kortisol og dens utslipp i sirkulasjon. Nederst på figuren vises responsen i fisken på kortisol ↑ indikerer at en prosess blir stimulert og ↓ indikerer at en prosess blir inhibert. Figuren er modifisert fra Mommsen et al. (1999), Alsop og Vijayan (2009) og Wendelaar Bonga (2011).

1.2.1 Hypotalamus

Aktivisering av HPI-aksen begynner i hypothalamus, en del av hjernen som mottar og integrerer veier gitt fra det sentrale og perifere nervesystem. Det første trinnet i HPI aksens aktivisering fører til stimulering av neuropeptidet kortikotropin-frigjørende faktor (CRF). CRH stimulerende celler er dokumentert i hypothalamiske nucleus preopticus (NPO) og i nucleus tuberis (NLT) i kongelaks (*Oncorhynchus tshawytscha*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), gullfisk (*Carassius auratus*) og 'white sucker' (*Catostomas commersoni*) (Bernier et al., 2009). CRF stimulerer utskillelse av adrenokortikotrop hormon (ACTH) i adenohipofysen (forlappen av hypofysen) som i sin tur regulerer utskillelsen av kortisol. (Wendelaar Bonga, 1997; Mommsen et al., 1999; Bernier et al., 2009). CRF-produserende nevroner i NPO, er kjent for å spille en sentral rolle i stressmeditert ACTH sekresjon (Flik et al., 2006).

1.2.2 Hypofysen

Hypofysens kortikotrope celler produserer ACTH fra en forløper peptid proopiomelanocortin (POMC) (Mommsen et al., 1999; Wendelaar Bonga, 1997). Laksefisk har flere kopier av POMC gener, POMCA1, POMCA2 og POMCB, som oppsto gjennom genom duplisering (Salbert et al., 1992). Det er ikke kjent hvilke av disse som er opphav til stressrelatert ACTH produksjon.

1.2.3 Interrenalt vev (hodenyren)

Binding av ACTH til melanocortin-reseptor 2 (MC2R) i hodenyren fører til aktivisering av kortisol-biosyntese-veien (Aluru og Vijayan, 2008). ACTH-binding til MC2R aktiverer adenylat cyclase og cAMP signalkaskade som fører til initiering av kolesterol levering til den indre mitokondrie-membran, etterfulgt av en serie av enzymatiske reaksjoner (Fig. 2B) (Vijayan et al., 2010).

1.3 Plasma kortisol- og glukoserespons

Kortisol respons på akutt stressfaktorer den komponenten som vanligvis brukes som indikator på stress hos fisk. Akutt eksponering til en stressor forårsaker en forbigående økning i plasmakonsentrasjoner av kortisol, etterfulgt av en nedgang til basale nivåer over en 24 timers periode (Vijayan et al., 2010). Plasmanivået av kortisol er representert nettoeffekten av produksjon, metabolisering/klarering, og hormonell innvirkning. Det er vanligvis bestemt av en kombinasjon av flere faktorer, blant annet bindingsproteiner, målvev reseptorer, opptak og katabolisme (Mommsen et al., 1999; Vijayan et al., 2010).

Dessuten er det vanskelig å måle pre-stress nivåer av katekolaminer fordi responsen starter umiddelbart når fisken skal prøvetas, mens kortisolresponsen er såpass sen at en rekker å ta en blodprøve før det skjer en økning av kortisol i blodet. En økning i plasmaglukose i forbindelse med stress generes først via en katekolamin - mediert glykolyse, og ved senere stadier via en kortisol mediert glukoneogenese (Pankhurst, 2011). Plasmaglukose er en mye brukt indikator på sekundære stressresponser (Mommsen et al., 1999). Fysiologisk stressresponser er energikrevende (Barton, 2002), forutsetter at energi mobiliseres for å unngå de negative effektene stressorer kan føre til, samtidig som andre vitale og energikrevende prosesser opprettholdes (Cook et al., 2012). Studier viser at kortisol øker forbrenningen i leveren, stimulerer proteinnedbrytning som, gjennom glukogeneresen, omdannes til glukose. Denne metabolske prosessen er en sentral del av gjenopprettelsen av homeostase etter stress, i og med at glukose er det foretrukne drivstoff, spesielt for gjeller og hjerne, som jobber ekstra under stress (Mommsen et al., 1999; Aluru og Vijayan, 2008; Iversen og Eliassen, 2014).

1.4 Glukokortikoid reseptor

Genomisk signalisering av kortisol og dens 'negativ feedback' er mediert av intracellulære kortikosteroid reseptorer, glucocorticoid (GR) og mineralocorticoid (MR), som er ligand-avhengig transkripsjonsfaktorer (Aluru og Vijayan, 2009). Funksjonen til MR er lite studert og vil ikke bli omhandlet her. Glucocorticoid reseptorer er identifisert i gjeller, tarm, lever, nyre, hjertet, gonader, leukocytter, erythrocytter, skjelettmuskulatur og milt. Det er også identifisert GR, i hypotalamus og hypofysen (Bernier et al., 2009). Det er blitt klonet og sekvensert en MR og to GR (GR1 og GR2) i flere arter beinfisk, med unntak av sebrafisken, som kun har en enkel GR i sitt genom (Bernier et al., 2009). I korte trekk, klassisk GR signalering blir initiert ved binding av kortisol til cytosolisk GR. Ved binding, blir molekylære enheter som er forbundet med GR i cytoplasma frigjort. Aktiverte GR former i cytoplasma, og etter translokasjon inn i kjernen, binder den seg til en glucocorticoid respons element innenfor en promoter region av et glucocorticoid-responsive-genet som fører til endringer i genekspresjon (Prunet et al., 2006). Nedregulering av kortisol sekresjon av de negative tilbakekoblingsmekanismer er en viktig komponent i HPI-aksen funksjoner (Alderman et al., 2012). Forlenget økning av glucocorticoider kan føre til skadelige virkninger, inkludert undertrykkelse av reproduksjon, immunrespons, og vekst (Wendelaar Bonga, 1997; Norris,

2000). Dette nevroendokrin feedback loop innebærer kortisol hemming av hypothalamus CRF og hypofysen ACTH sekresjon.

1.5 Utvikling av HPI-aksen under embryogenesen

Det eksisterende kortisol som er i egget under utvikling hos laksefiskembryo (i like het med andre teleoster) er av maternalt opphav. Det skjer en svak økning i embryonalt produsert kortisol omkring klekking som respons til stress (Barry et al., 1995a). Utviklingen av en fullt funksjonell hypothalamus-hypofyse-interrenal (HPI) akse er imidlertid ikke ferdig før i de første ukene etter klekking (Pottinger og Mosuwe, 1994; Barry et al., 1995b; Stephens et al., 1997).

Hos pattedyr vet man at et individs evne til å respondere på stress kan påvirkes av prenatal stress (Xiong og Zhang, 2013). Det er funnet en reduksjon i både glucocorticoidreseptorer (GR) og melanokortinreseptorer (MR) i hypothalamus, som forårsaker både forlenget og økt stressrespons på grunn av manglende negativ feedback (Henry et al., 1994). Utviklingen av endokrine akser kan direkte påvirkes av høye eller lave hormonnivåer eller av epigenetiske mekanismer. Endringer i epigenomet er en mekanisme hvor individets fenotype endres på transkripsjonsnivå, og denne endringen kan være permanent (McCarrey, 2012). Også miljøpåvirkning tidlig i livet regulerer kromatinorganiseringen og dermed genuttrykket som kopieres fra celle til celle gjennom celledelingen, og til neste generasjon gjennom kjønncellene (Li og Leatherland, 2013). I fiskeegg kan et forhøyet kortisolkonsentrasjon være en følge av stress og høyt kortisolnivå i hunnfisken under vitellogenese, mens stress på grunn av miljøpåvirkninger i perioden før klekking kan føre til embryonalt produsert stress (Auperin og Geslin, 2008). Hvordan dette påvirker utviklingen av HPI-aksen og fiskens evne til å håndtere stress senere i livet er lite undersøkt.

1.6 Hensikt

På denne bakgrunn ble det i dette studiet undersøkt om gjentatte eksponeringer av kulde- og håndteringstress i en tidlig livsfase (gjennom embryogenesen fra øyerognstadiet til slutten av plommesekestadiet) hos atlantisk laks, kan redusere eller endre fiskens ytelse og potensial til å takle stressorer senere i livet. Dette ble gjort ved å måle plasma kortisol- og glukosenivåer og genuttrykk av *star* i hodenyre og *gr1*, *gr2*, *pomca1*, *pomca2* og *pomcb* i

hypofysen hos lakseungene etter de hadde vært utsatt for en episode med kulde- og handteringsstress 6 mnd. etter startfôring.

Hypotese: Stress under embryogenesen og tidlig post-klekking stadier vil ha langsiktige virkninger på endokrin status og stress mestrings evnen hos Atlantisk laks.

2. Material og Metode

2.1 Fisk og forsøksfasiliteter

Fisken som ble brukt i dette forsøket ble overtatt fra et prosjekt gjennomført på Nofima, Tromsø, der fisken hadde blitt påført kulde- og håndteringstress på egg- og plommesekkstadiet ved Havbruksstasjonen i Tromsø (HiT). Kulde- og handteringsstress ble påført ved egg/plommesekkkyngel ble håvet inn fra sitt stamkar, hvor vannet holdt en temperatur ved 7°C, og holdt i isvann i et minutt, hvoretter den ble holdt i håven i luft i et minutt, og deretter satt tilbake i sitt stamkar. Etter klekking den 23. april, 2013 ble plommesekkkyngelen holdt ved 7°C og kontinuerlig lys (LD 24:0) frem til startfôring ble igangsatt (2. mai, 2013). Derfra, og frem til forsøksstart ble fisken holdt på 10°C, kontinuerlig lys og fôret i overskudd etter tabell med kommersielt laksefôr (Skretting AS). Dødeligheten gjennom startfôringen var mindre enn 1 % og ikke forskjellig mellom behandlingsgruppene (pers. med. Helge Tveiten, Nofima).

2.2 Forsøksdesign

Det var fire ulike behandlingsgrupper som ble eksponert for kulde – og handteringsstress (Fig. 3). Behandlingsgruppe 1 ble utsatt for kulde- og lufteksponering fra øyerognstadiet til klekking, behandlingsgruppe 2, fra klekking til startfôring og behandlingsgruppe 3 fra øyerognstadiet og til startfôring. Kontroll gruppen ble holdt ustresset gjennom hele forsøket (Fig. 3). Behandlingene induserte ingen dødelighet i noen av gruppene (pers. med. Helge Tveiten, Nofima).

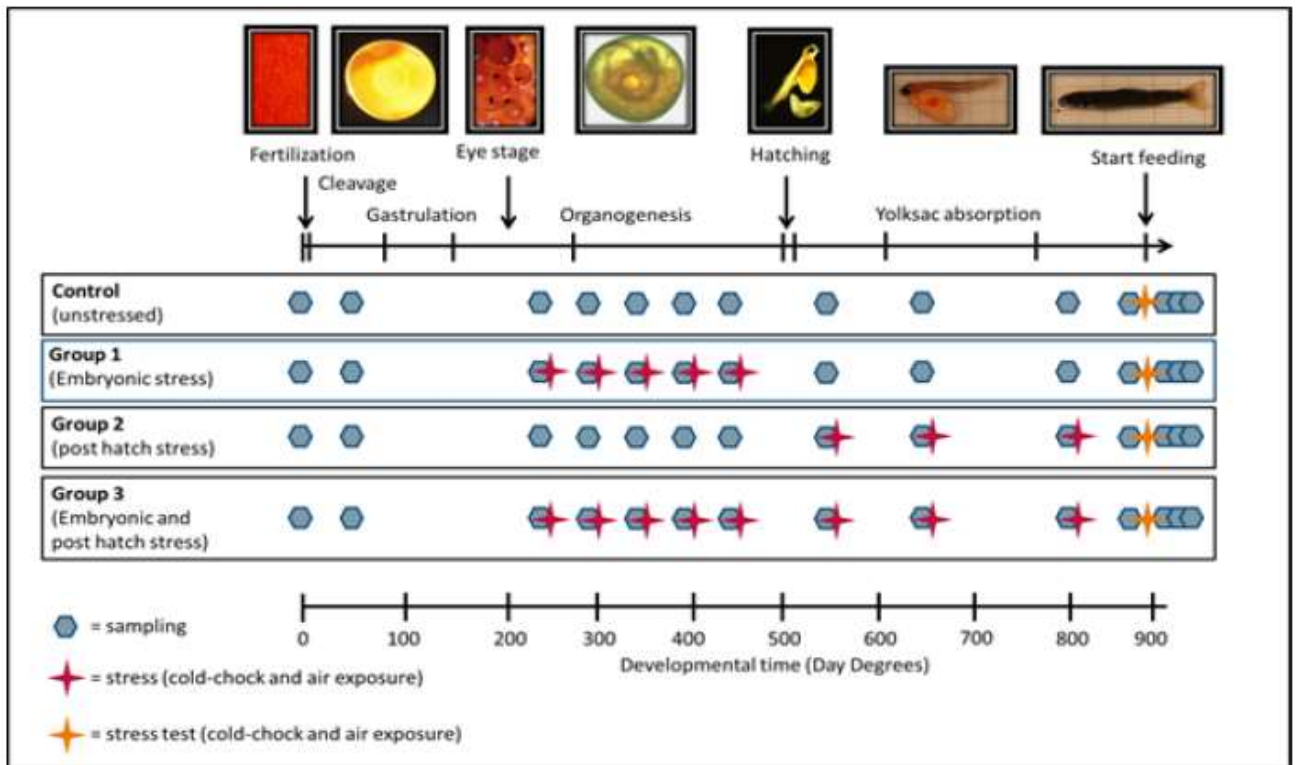


Fig. 3. Skjematiske oversikt av kulde- og handteringsstress påført i behandlingsgruppene. Røde stjerner representerer tidspunkt for kulde- og lufteksponering i de ulike gruppene.

Stressbelastning av pre-smolt og prøvetaking

Etter startfôring ble fisken fordelt på 8 kar (500) på HiT slik at hver behandlingsgruppe var duplisert. Prosjektet som denne avhandlingen representerer ble utført i perioden 14-21. november 2013. Ved start av forsøket ble 40 fisk eller mer ble tatt fort fra ett av karene med to håver. Ti av disse ble satt direkte i en overdose av Benzocaine mens resten ble satt direkte i is vann (0°C) i ett minutt. Deretter ble fiskene som hadde blitt eksponert til isvann fordelt i 3 andre kar med vann av samme temperatur som stamkaret, så ble det tatt en blodprøve fra de 10 fiskene som ble avlivet umiddelbart (0 time, ustresset). Deretter ble 10 fisk i hvert av de andre karene avlivet i Benzocaine, og tatt blodprøve av etter en time, tre timer og 24 timer. Etter blodprøve taking og måling/veining av kroppslengde- og vekt ble hypofysen og hodenynren dissekert ut i sin helhet, og satt i 1,5ml eppendorfrør. Disse ble umiddelbart frosset i flytende nitrogen og oppbevart på -80°C frem til genekspresjonsanalyser. Blodprøvene ble sentrifugert ved 5000 RPM i 10 minutter ved 3 °C, og plasma ble deretter pipettert fra hver prøve og overført til ferdig merkede 1,5 ml eppendorfrør og lagret på -80°C inntil analyse av kortisol og glukose konsentrasjon. Dette

gav et totalt antall fisk fra hver av de fire behandlingsgruppene pr tidspunkt på 20 (10 fra hver duplikat). Tidspunktene for prøvetaking ved 0, 1 og 3 timer er heretter henholdsvis T_0 , T_1 og T_3 . gruppen prøvetatt etter 24 timer er utelatt (se nedenfor).

Feil kilder

I perioden under prøvetaking var det dårlig vær og det oppsto over noen timer flere strømbrudd ved HiT, noe en vet gir en stressrespons hos fisken. Da dette skjedde var fire av gruppene i fasen mellom T_3 og T_{24} etter påført akutt stress derfor ble alle T_{24} utelatt fra forsøket. En av duplikatgruppe fra behandlingsgruppen som ble utsatt for kulde og lufteksponering ved øyerognstadiet frem til klekking ble også utsatt for strømbrudd og brått mørke og denne gruppa ble også utelatt.

2.3 Kortisol analyse

Analysene av kortison ble utført ved Norges Fiskerihøgskole, Universitetet i Tromsø. Kortisolanalysene ble utført ved hjelp av Radioimmunoassay (RIA) i henhold til protokoll utarbeidet fra Schulz (1985) og validert av Tveiten et al. (2010).

RIA er en immunologisk analysemetode som kan brukes for kvantifisering av hormoner i blant annet plasmaprøver. Denne metoden går i prinsippet ut på at antigen (Kortisol) binder seg til antistoff med høy spesifisitet til antigenet, i konkurranse med en kjent mengde med radioaktivt merket antigen. Det vil etter hvert oppstå en likevekt i reaksjonen hvor frie antigen kan separeres fra bundet antigen, og ved hjelp av en scintillasjonsteller, måle β – stråling i en prøve (det radioaktive ^3H , tritium) i cmp (counts per minute) og bestemme hvor mye radioaktivt antigen som er bundet til antistoffet ved hjelp av en standardkurve.

Det var totalt 320 prøver som ble analysert fordelt på 14 assay. Hvis prøvene hadde for høye eller for lave verdier til at de traff standardkurven, ble de fortynnet og analysert på nytt. Fortynninger som ble brukt var 3x, 15x og 30x.

Eter ekstraksjon

Steroidene ble ekstrahert fra plasma ved bruk av dietyleter (DEE) før hormonanalysen. 300 μl plasmaprøve ble tatt ut og overført til 16x125 mm glassrør. Det ble deretter tilsatt 4 ml

DEE i hvert av rørene, og disse ble satt til røring i 4 minutter på 1200 rpm med kork, overflyttet til stativ og fikk stå i ro i tre minutter. Etter røring ble rørene senket i flytende nitrogen inntil vannfasen av prøvene var frosset. DEE – fasen med de fettløselige steroidene ble deretter dekantert til 12x75 mm glassrør. Rørene med DEE fasen ble så satt i vannbad (45 °C) i ca. 20 minutter, hvorefter ble de satt tørt og blåst av med N₂ gass til lukten av dietyleter var borte, slik at glassrørene kun inneholdt fettdråper med steroider. Prøven ble så tilsatt 450µl (3x fortytning) RIA buffer (1L: 1,0 g gelatin, 4,38 g NaH₂PO₄ + H₂O, 21,84 g Na₂HPO₄, 9 g NaCl, 1 ml Na-azid (5 %), i MilliQvann) 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 2 ml eppendorfrør og oppbevart ved -20 °C til analysen ble gjennomført.

Antistoff

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

Radiaktivt stoff Tracer (3H)

Radioaktivt kortisol, var merket med tritium (3H), som er en radioaktiv isotop av hydrogen med halveringstid på 12,3 år. Det radioaktivt merkede kortisol løst i etanol, ble oppbevart i kjøleskap ved 4 °C som mellomstock-løsning. 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 opp mot 4500cpm/50µl for analyse av kortisol. For kontroll av radioaktivitet ble 600 µl RIA-buffer, 50 µl av løsningen (3H), og 7 ml telleveske (Ultima Gold XR scintillasjonsveske) tilsatt i to tellerør. Rørene ble forseglet, vortexet og målt for β-stråling i scintillasjonsteller (Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer, Illinois).

Standardkurve

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

Dextran coated charcoal (DCC)

Løsningen har som hensikt å absorbere frie antigen som ikke er bundet til antistoff i analysevæsken. 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. Deretter (hvis den hadde stått en stund) ble den rørt på is i 15 minutter med magnetrører.

RIA

Det ble utført totalt 14 RIA. Plasmaprøvene fra 0h ble kjørt på 3x fortytning, 1h og 3h på 15x og 30x fortytning. Totalt 80 rør ble merket på forhånd, og rørene ble deretter tilsatt løsningene som var tillaget i henhold til tabell x, med to paralleller av hver. Rørene ble deretter forsiktig ristet, dekket med aluminiumsfolie og inkubert ved 4 °C over natten i kjøleskap.

Tab. 1. Viser tilsetninger til de ulike prøvene i et assay. TC, Total count, TB, Total bound, NSB, Non spesific bound, STD, standardløsninger, Prøver.

	Buffer	Standard	Prøve	[³ H]	Antistoff
TC	600	-	-	50	-
TB	100	-	-	50	200
NSB	300	-	-	50	-
Std.1-9	50	50	-	50	200
Prøve 1-29	-	-	100	50	200

Etter minst 16 timer inkubasjon tid ble 300 µl DCC tilsatt alle rørene for å binde opp det frie antigenet. Etter 5 min ble løsningene sentrifugert (5 minutter, 4200 rpm). Resultatet er en utfelling av kullet med det frie antigenet, slik at supernatanten kan dekanteres over i tellerør. Deretter ble det tilsatt 7 ml Ultima Gold RX telleveske som gjør avlesing av radioaktiviteten i løsningen mulig ved hjelp av scintillasjonteller for β- stråling (Tri-Carb 2900TR, Perkin Elmer, Illinois). Resultatene fra målingene ble lagt inn i et regneark (Excel) og verdier og figurer ble konstruert ut fra standardkurven fra disse resultatene.

2.4 Glukose

Glukose ble bestemt med Freestyle Freedom Lite (Abbott Diabetes care Ltd, Oxon, UK). Bærbare instrumenter for måling glukose er blitt validert og sammenlignet de med etablerte laboratorieteknikker av Wells og Pankhurst (1999). De konkluderte med at bærbare instrumenter for måling av blodglukose kunne brukes for å vurdere relative glukoseresponser til stressfaktorer.

2.5 Analyser av genuttrykk i hypofyse og Hodeneyre

Real-Time Reverse-Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT- qPCR) er et av de mest brukte verktøyene innen molekylærbiologi for deteksjon og kvantifisering av DNA eller RNA, og baseres på bruk av det varmestabile enzymet DNA polymerase, sekvensspesifikke oligonukleotider (primere) og thermal cycling (oppvarming og nedkjøling i PCR-maskin). I dette forsøket ble det gjennomført kvantifisering av transkriptene til *star* i Hodeneyre og *gr1*, *gr2*, *pomca1*, *pomca2* og *pomcb* i hypofysen

Metoden fungerer ved å benytte et fluorescerende fargestoff til deteksjon av mengde gentranskript gjennom en syklisk amplifisering av en bestemt gensekvens. Måling av fluorescens utføres etter hver syklus, og øker ved en økning i genuttrykk (LifeTechnologies, 2012). En Real-time PCR syklus er inndelt i 3 trinn; 1) denatureringsfasen: hvor dobbeltrådig DNA (dsDNA) splitter til enkeltrådig DNA (ssDNA) ved bruk av høy temperatur (95°C), 2) amplifiseringsfasen: reduksjon i temperatur (60°C) fører til at spesifikke primere og komplimenterære baser bindes til DNAtråden, og 3) ekstensjonsfasen: hvor DNAPolymerase syntetiserer ny DNAtråd.

Isolering av RNA og cDNA syntese

Isolering av RNA ble utført i henhold til RNeasy® Plus Universal Handbook (QIAGEN, 2010). RNeasy Plus Universal Mini Kit (Qiagen, Alameda, CA, USA) ble brukt for rensing av totalt RNA fra organprøveneprovne. Det ble isolert RNA fra 24 prøver fra hver av behandlingsgruppene, totalt 96 prøver. Sentrifugerør (2ml) ble merket og tilsatt 5 mml stålkule. Organprøvene som skulle analyseres ble plassert i de respektive rør. 900 µl QIAzol Lysis Reagent ble tilsatt i hvert rør, og rørene plassert i TissueLyser II i 2 minutter ved 25 Hz for å homogeniseres. Lysatene ble så pipettert over i 1,5 ml mikrosentrifugerør og plassert

på benken i 5 minutter. Det ble tilsatt 100 µl gDNA Eliminator Solution i rørene for å fjerne genomisk DNA (gDNA), og tilsatt 180 µl kloroform, forseglet og vortexet i 15 sekunder, og deretter inkubert i romtemperatur i 2-3 minutter, før de ble sentrifugert ved 4 °C i 15 min ved 10000 RPM. Den transparente øvre vannfasen, som inneholder ribonukleinsyrer, ble pipettert (500 µl) over fra rørene til nye, merkede mikrosentrifugerør, tilsatt 500 µl 70 % etanol, og blandet ved å pipettere opp og ned. 700 µl av prøven ble deretter overført til RNeasy Mini spin column, plassert i et 2 ml samlerør, og sentrifugert ved 10 000 RPM i 15 sekunder ved romtemperatur. Gjennomstrømmingsløsningen ble kastet, og prosessen ble repetert med det som var igjen av prøven.

RNeasy spin columns ble skyllet med 700 µl og 500 µl av RWT og RPE buffer. Skylling med 500 µl RPE buffer ble igjen tilsatt, med påfølgende sentrifugering (10 000 rpm, 2 min) og fjerning av gjennomstrømmingsløsningen. RNeasy Mini spin columns ble deretter kjørt i sentrifugen (full hastighet, 1 min) for fjerning av eventuelle rester av RPE bufferen. Tilslutt ble RNeasy Mini spin columns overført til 1,5 ml eppendorfrør, tilsatt 50 µl RNase-fritt vann direkte på membranen, og sentrifugert (1 000 rpm, 1 min) for å ekstrahere RNA. RNA-konsentrasjonen ble målt med ND-2000 spectrophotometer (NanoDrop® , Wilmington, Delaware, USA). Nanodrop måler absorbans av bølgelengde til nukleinsyrekonsentrasjon (A260) og proteinkonsentrasjon (A280), og ratioen mellom disse ved RNA skal være nærmest mulig 2,0. Prøvene ble deretter fryst ved – 80 °C i påvente av videre analysering.

Genomisk DNA ble fjernet ved bruk av TURBO DNA-free™ Kit (Life Technologies, USA)

cDNA var syntetisert ved bruk av iScript™ Advanced cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA). Reaksjonsvolumet var 20 µl pr prøve.

Real-time RT-qPCR

Hard-Shell® Low Profile Thin Wall 96-well Skrited PCR Plates (Bio-Rad, CA, USA) ble brukt for amplifisering med qPCR. Reaksjonsvolumet i hver brønn var 20 µl, med en konsentrasjon på 40 µg cDNA. Volum av SYBR-green og primer mix (250nM) var henholdsvis 10 og 1 µl, 4 µl cDNA og 5 µl vann. Platen ble forseglet, sentrifugert i 20 sekunder og analysert med CFX Connect™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA)

(Tab.2). I forsøket ble det kjørt 1 plate per behandlingsgruppe + primer for å ikke forveksle mellom gruppene, totalt 8 plater.

Tab. 2. Temperatur protokoll for CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories Inc., California, USA) brukt i real-time RT-qPCR.

Steg	Temperatur	Tid
1	50°C	10 min
2	95°C	5 min
3	95°C	10 sek
4	60°C	30 sek
5	Plateavlesning, Steg 3 - 5 gjentas 39 ganger	
6	95°C	10 sek
	Smeltekurve: temperatur går fra 65 (0,5sek) - 95 (0,5sek).	
7	Plateavlesning	

2.6 Databehandling og statistikk

Alle data er presentert med gjennomsnitt \pm standardfeil av gjennomsnitt (SEM). Statistisk sammenligninger av plasmakortisol og plasmaglukose konsentrasjonen og av alle genuttrykkene mellom de ulike tidspunkter og alle behandlingsgrupper ble utført vha. Analyses of Variance (ANOVA), som benyttes for å finne ut om det er signifikante effekter av en behandling (i dette tilfellet kulde- og handteringsstress på egg – og plommesekkstadiet) på et resultatsett. Videre ble det brukt en post hoc test (Tukey's Honest-Significant-Difference Test) for å utføre en parvis sammenligning av gruppenes gjennomsnittverdier ved de ulike tidspunkt for å se i mellom hvilke grupper den signifikante forskjellen er. All data ble log-transformert for å øke normaliteten før statistisk analyse. Forskjeller ble regnet for å være signifikante ved p- verdier mindre enn 0,05.

3. Resultater

3.1 Plasma kortisol konsentrasjon

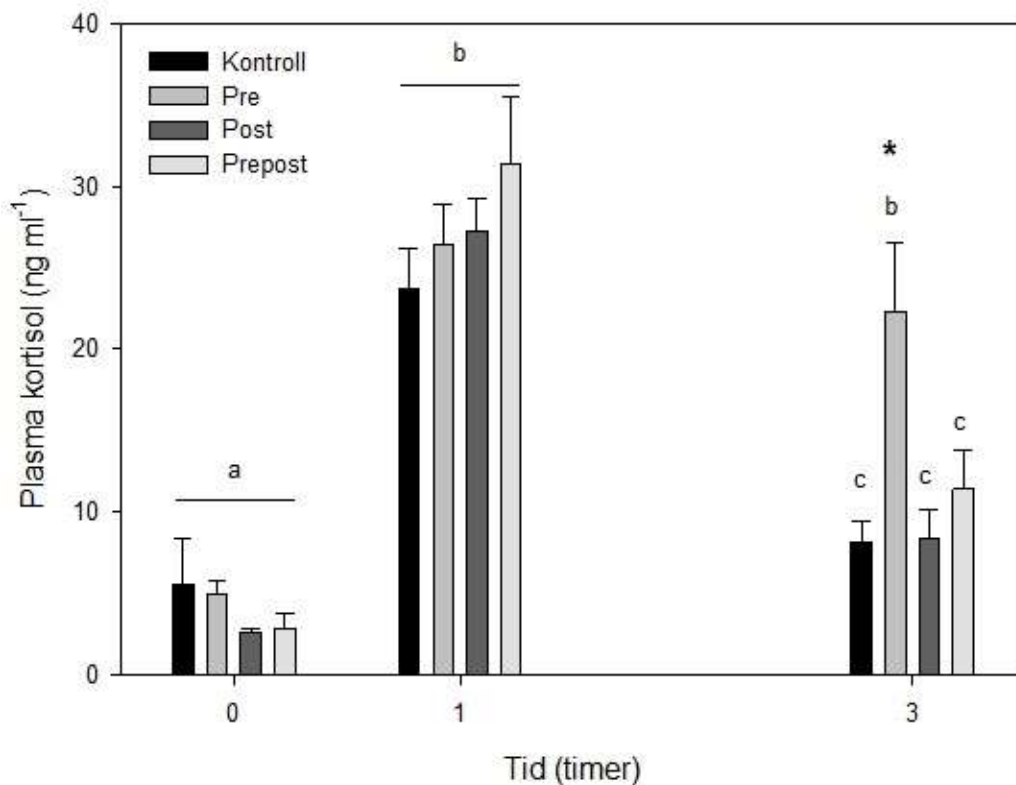


Fig. 4. Plasma kortisol konsentrasjon før (T_0) og etter (T_1 og T_3) handtering hos lakseparr som i egg- og plommesekkstadiet ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking (pre, $n = 20$), mellom klekking og startfôring (post, $n = 10$) og gjennom hele perioden fra øyerogn til startfôring (prepost, $n = 20$), samt lakseunger som ikke hadde blitt stresset (kontroll, $n = 20$). Data er gitt som gjennomsnitt \pm SEM. Ulike bokstaver angir signifikante forskjeller mellom tidspunkt for hver enkelt behandlingsgruppe mens stjerne angir gruppe som var signifikant forskjellig fra de andre innenfor et tidspunkt.

Det var ingen forskjeller innenfor samplingstidspunkter mellom behandlingsgruppene i plasma kortisol konsentrasjon før handtering og en time etter handtering (Fig. 4), men gruppen gitt kulde- og handteringsstress fra øyerognstadiet til klekking hadde en høyere plasma kortisol konsentrasjon enn de andre behandlingsgruppene 3 timer etter handtering ($p < 0,05$). Alle behandlingsgruppene hadde en høyere plasma kortisol konsentrasjon en time etter handtering enn før handtering ($p < 0,001$). Hos kontrollgruppen, og gruppene som

hadde blitt gitt en kulde- og handteringstress fra klekking til startfôring og fra øyerognstadiet til startfôring, var det en nedgang i plasma kortisolkonsentrasjon mellom 1 og 3 timer etter handtering ($p < 0,01$), mens det ikke var en nedgang i plasma kortisolkonsentrasjon hos gruppen som hadde blitt gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking. Alle behandlingsgruppene hadde en høyere plasma kortisolkonsentrasjon ved T_3 enn ved T_0 ($p < 0,001$).

3.2 Plasma glukose konsentrasjon

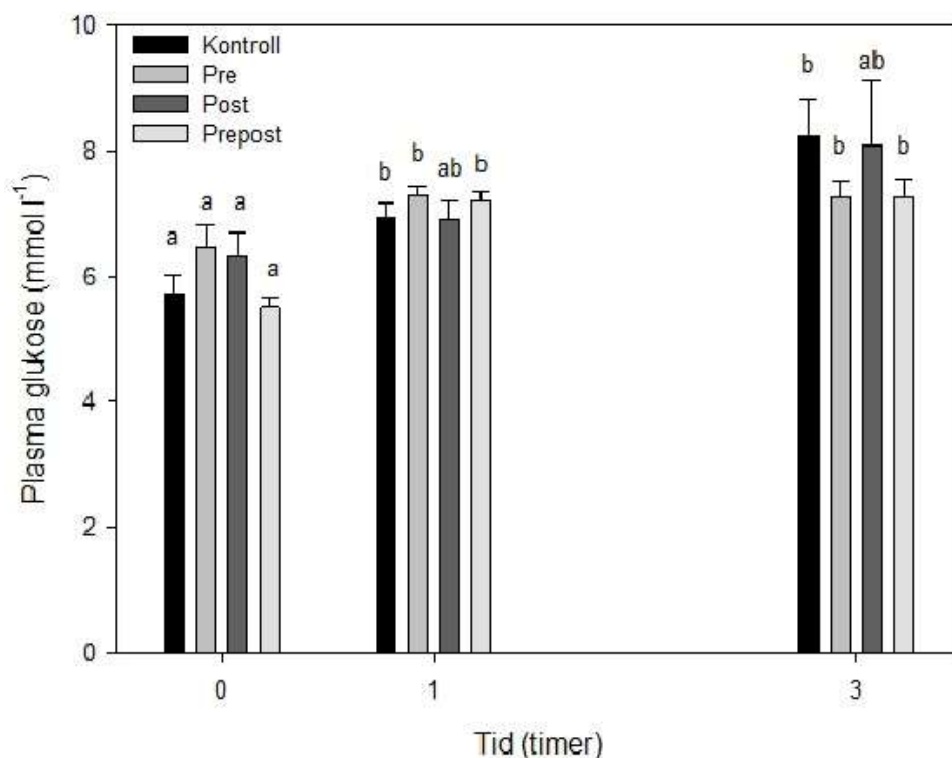


Fig. 5. Plasma glukose konsentrasjon før (T_0) og etter (T_1 og T_3) handtering hos lakseparr som i egg- og plomesekkstadiet ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking (pre, $n = 20$), mellom klekking og startfôring (post, $n = 10$) og gjennom hele perioden fra øyerogn til startfôring (prepost, $n = 20$), samt lakseunger som ikke hadde blitt stresset (kontroll, $n = 20$). Data er gitt som gjennomsnitt \pm SEM. Ulike bokstaver angir signifikante forskjeller mellom tidspunkt for hver enkelt behandlingsgruppe.

Det var ingen forskjeller mellom behandlingsgruppene i plasma glukose konsentrasjon innenfor hvert samplingstidspunkt (Fig.5). Hos kontrollgruppen, og hos gruppene gitt kulde- og handteringsstress henholdsvis mellom øyerognstadiet og klekking, og mellom

øyerognstadiet og til startfôring, var det en økning i plasma glukose konsentrasjon mellom T_0 og T_1 ($p < 0,05$) men deretter ingen økning frem til T_3 . Hos gruppen som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom klekking og startfôring var det ingen forskjell mellom samplingstidspunkter i plasma glukose konsentrasjon.

3.3 Genuttrykk av Steroidogenic Acute Regulatory Protein (*star*)

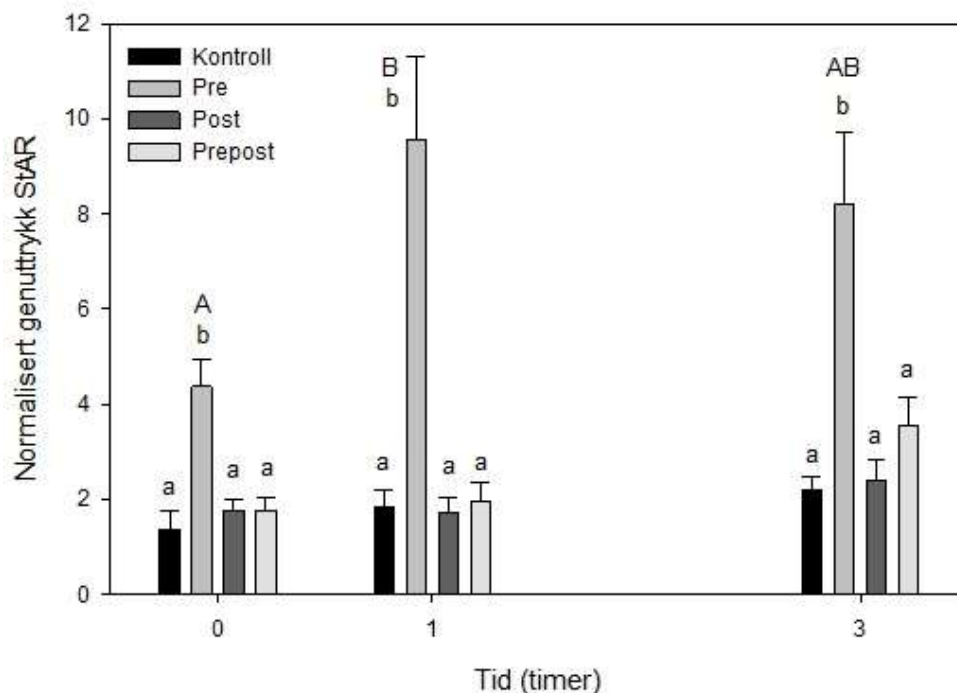


Fig. 6. Normalisert genuttrykk av Steroidogenic Acute Regulatory Protein (*star*) i hodenyre før (T_0) og etter (T_1 og T_3) handtering hos lakseparr som i egg- og plommesekkstadiet ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking (pre), mellom klekking og startfôring (post) og gjennom hele perioden fra øyerogn til startfôring (prepost), samt lakseunger som ikke hadde blitt stresset (kontroll). Data er gitt som gjennomsnitt \pm SEM, $n = 8$. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller innenfor hvert tidspunkt mellom behandlingsgruppene mens ulike store bokstaver angir forskjeller mellom tidspunkt innenfor behandlingsgruppen.

Det var ingen forskjeller i uttrykk av *star* mellom kontrollgruppen og de to gruppene som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom klekking og startfôring og mellom øyerognstadiet og startfôring, hverken innenfor hvert tidspunkt eller mellom tidspunkter innen hver gruppe (Fig.6). Gruppen som hadde blitt gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking hadde et signifikant høyere uttrykk av *star* enn de andre gruppene ved alle

tidspunkt ($p < 0,01$), og et høyere genuttrykk en time etter handtering enn etter tre timer ($p < 0,05$).

3.4 Uttrykk av 3 genvarianter av proopiomelanocortin

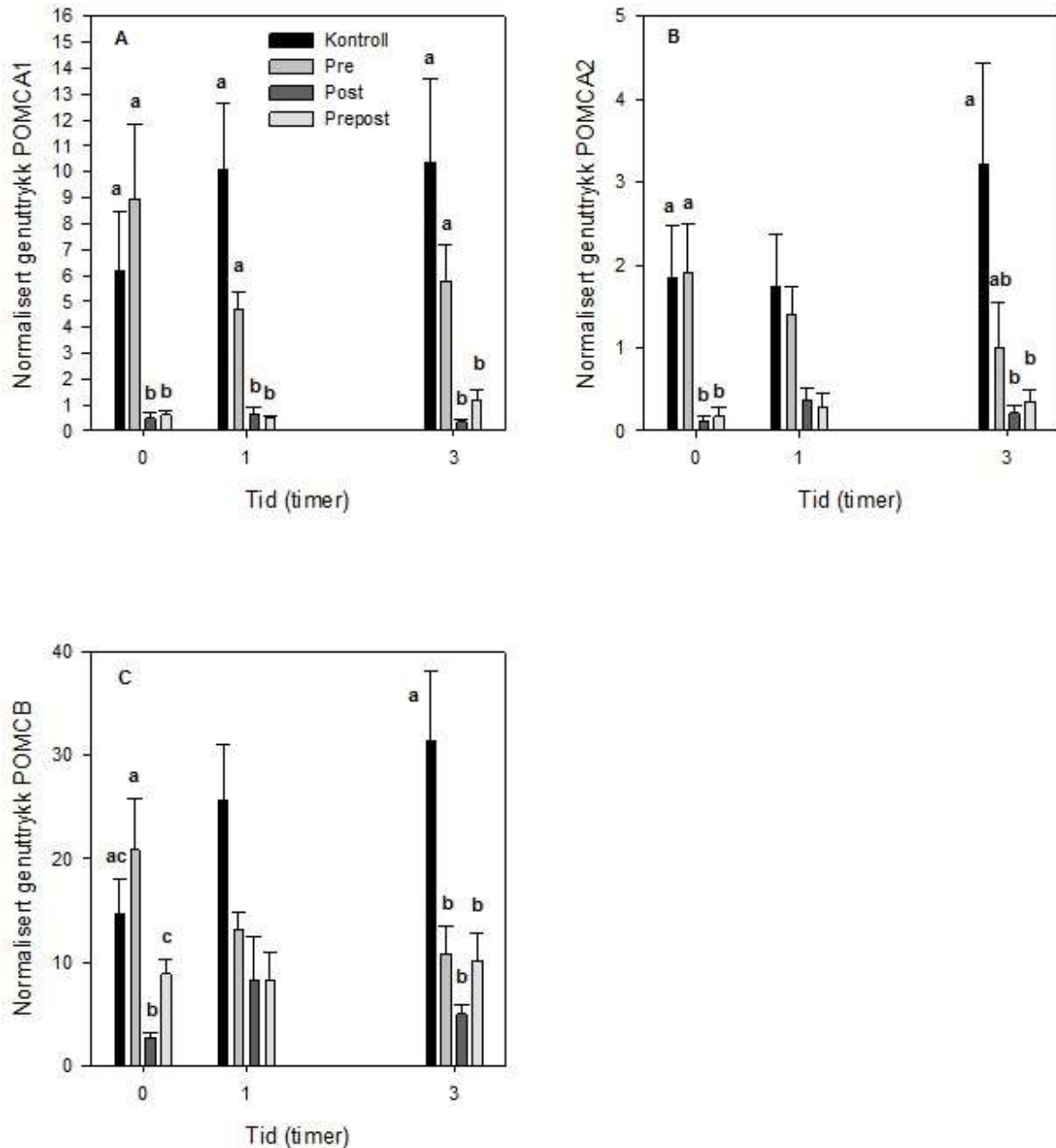


Fig. 7. Normalisert uttrykk av 3 genvarianter av proopiomelanocortin (A: *pomca1*; B: *pomca2* og C: *pomcb*) i hypofyse før (T_0) og etter (T_1 og T_3) handtering hos lakseparr som i egg- og plommesekestadiet ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking (pre), mellom klekking og startfôring (post) og gjennom hele perioden fra øyerogn til startfôring (prepost), samt lakseunger som ikke hadde blitt stresset (kontroll). Data er gitt

som gjennomsnitt \pm SEM, $n = 6-8$. Ulike små bokstaver angir signifikante forskjeller innenfor hvert tidspunkt mellom behandlingsgruppene.

Det var ingen forskjeller i genuttrykk mellom tidspunkter hverken for noen av gruppene eller for noen av genene. For *pomca1* (Fig. 7A) var det et gjennomgående bilde av høyere genuttrykk i kontrollgruppen og gruppen som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking enn i gruppene som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom klekking og startfôring og mellom øyerognstadiet og startfôring ved alle samplingstidspunkt ($p < 0,01$). For *pomca2* (Fig. 7B) var det også et signifikant høyere genuttrykk i kontrollgruppen og gruppen som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking enn de som ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom klekking og startfôring og mellom øyerognstadiet og startfôring ved tidspunkt T_0 ($p < 0,01$), og en tendens ($p < 0,1$) til de samme forskjellene en time etter handtering. Tre timer etter handtering var genuttrykk i kontrollgruppene høyere enn i gruppene som ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom klekking og startfôring og mellom øyerognstadiet og startfôring ($p < 0,05$) mens genuttrykk i gruppen som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking var intermediert og ikke signifikant forskjellig fra genuttrykkene i de andre gruppene. For *pomcb* (Fig. 7C) var det også et signifikant høyere genuttrykk i kontrollgruppen og gruppen som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking kontroll og pre enn i gruppen som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom klekking og startfôring ($p < 0,01$), mens genuttrykket i gruppen som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og startfôring var signifikant høyere enn i gruppen som hadde blitt gitt kulde- og handteringsstress mellom klekking og startfôring ($p < 0,01$), ikke signifikant forskjellig fra genuttrykk i kontrollgruppene, og signifikant lavere enn genuttrykk i gruppen som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking ($p < 0,05$). En time etter handtering var det en tendens til et høyere genuttrykk i kontrollgruppen enn i de andre gruppene ($p < 0,1$), mens det tre timer etter handtering var et høyere genuttrykk i kontrollgruppen enn i de andre behandlingsgruppene ($p < 0,05$).

3.5 Uttrykk av to genvarianter av glukokortikoidreseptor

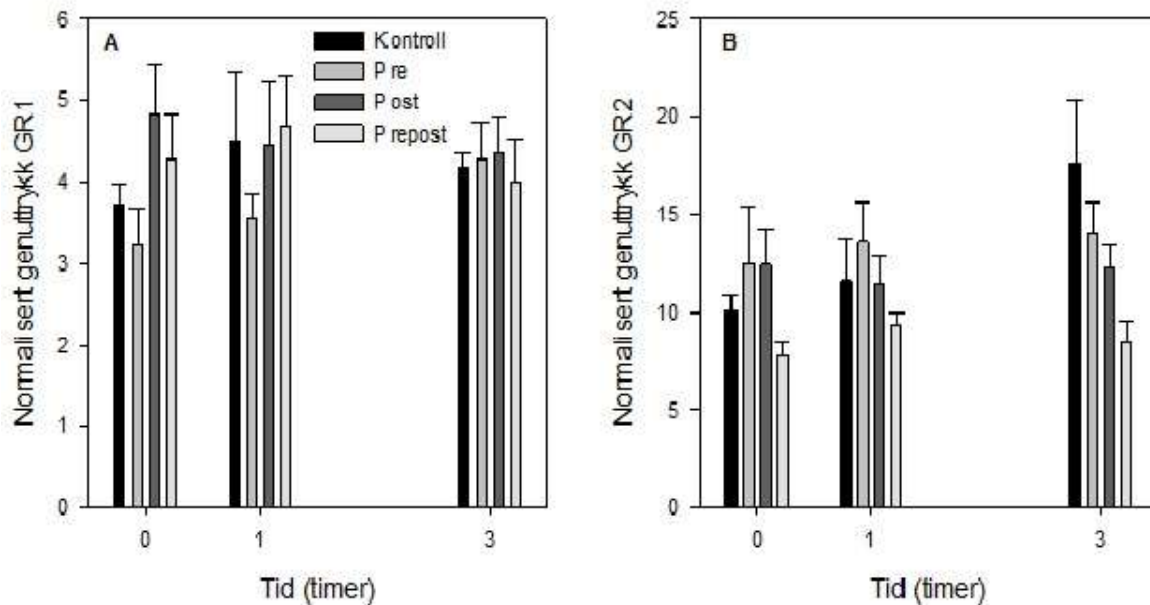


Fig. 8. Normalisert uttrykk av to genvarianter av glukokortikoidreseptor (A: *gr1*; B: *gr2*) i hypofyse før (T_0) og etter (T_1 og T_3) handtering hos lakseparr som i egg- og plommesekkstadiet ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og klekking (pre), mellom klekking og startføring (post) og gjennom hele perioden fra øyerogn til startføring (prepost), samt lakseunger som ikke hadde blitt stresset (kontroll). Data er gitt som gjennomsnitt \pm SEM, $n = 6-8$.

Det var ingen forskjeller i uttrykk av *gr1* (Fig. 8A) og *gr2* (Fig. 8B) hverken mellom behandlingsgruppene innenfor hvert samplingstidspunkt, eller mellom tidspunkter innen hver behandlingsgruppe.

3.6 Lengde, vekt og kondisjonsfaktor

Tab. 3. Antall, samt vekt, lengde og kondisjonsfaktor på pre-smolt av atlantisk laks brukt i stressforsøket. Data er gitt som gjennomsnitt \pm SEM. Stjerne angir gruppe som var signifikant forskjellig fra de andre gruppene.

	N	Vekt (g)	Lengde (cm)	Kondisjonsfaktor
Kontroll	80	41,3 (\pm 0,7)	15,4 (\pm 0,07)	1.12 (\pm 0,01)
Pre	80	41,3 (\pm 0,6)	15,4 (\pm 0,06)	1,12 (\pm 0,01)
Post	80	41,5 (\pm 0,6)	15,5 (\pm 0,06)	1,12 (\pm 0,01)
prepost	80	43,9 (\pm 0,7)*	15,9 (\pm 0,08) *	1,09 (\pm 0,01)

Det var ingen forskjeller i vekt og lengde mellom kontrollgruppen og de to gruppene som ble gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet til klekking og under startføring

(Tab.3). Gruppen som hadde blitt gitt kulde- og handteringsstress mellom øyerognstadiet og startfôring var signifikant tyngre ($p < 0,05$) og lengere ($p < 0,05$) enn de andre behandlingsgruppene. Kondisjons faktoren viste ikke noen signifikant forskjell mellom noen av gruppene.

4. Diskusjon

Gjentatt og kronisk eksponering for stressfaktorer har blitt vist å ha skadelige effekter på mange aspekter av en organismes fysiologi, herunder endringer i nervesystemets funksjon, metabolisme, vekst og utvikling, reproduktiv funksjon og immunsystem funksjoner (Mazeaud et al., 1977). Effekten av direkte eksponering for kortikosteroider tidlig i livet er blitt beskrevet hos pattedyr. Catalani et al. (1993) observerte at rotter fikk reduserte «fysiologisk» følsomhet for stress i avkom hos mødre som hadde drukket kortikosterone, noe som antas å skyldes at kortikosteroner kan påvirke hypothalamus-pituitary-binyre utvikling hos avkom. Andre studier viser til at stress under utvikling av HPI-aksen har fysiologiske effekter på et seinere tidspunkt i livet (Auperin og Geslin, 2008; Barry et al., 1995b; Li et al., 2010). Både følsomhet av stress aksen og volum av kortisol produsert er påvirket av genetiske, utviklingsmessige og miljømessige faktorer, så vel som intensiteten og varigheten av de stressfaktorer (Barton et al., 2002; Vijayan et al., 2010). Innen akvakultur praksis begynner eksponeringen av stressorer tidlig i utviklingen ved rutinemessig samling og håndtering av egg.

Effekt av behandling

Det basale plasma kortisolnivået (T_0) i alle forsøksgruppene lå nært det som er blitt angitt i litteraturen hvor ustresset laksefisk bør være 5 ng ml^{-1} (Pickering et al., 1986), dermed kan en anta at fiskens ved T_0 var ustresset. Fiskens maksimums plasma kortisolkonsentrasjon ble vist ved T_1 (etter en time) som stemmer overens med funn i tidligere studier (Donaldson, 1981; Barton og Iwama, 1991; Randall og Ferry, 1992; Vijayan og Moon, 1992). Sammenlignet med plasma kortisolnivåer på 40 til 200 ng ml^{-1} som ofte er målt hos laksefisk etter akutt stress (Barton og Iwama, 1991), kan det konkluderes med at stressoren fisken undergikk ikke var særlig sterk.

Behandlingsgruppen som hadde fått kulde- og handteringsstress fra øyerognstadiet frem til klekking, viste signifikant høyere nivå av plasma kortisol ved T₃ enn de andre gruppene, noe som kan ha sammenheng med at det var også signifikant høyere genuttrykk av *star* i denne behandlingsgruppen fra T₀ til T₃, som vil bidra til en økt transport av kolesterol inn i mitokondriemembranen, hvor det vil bli konvertert til kortikosteroider inkludert kortisol. Dette kan reflektere en nedregulering av HPI-aksens negative feedback signalisering i gruppen som ble utsatt for kulde- og handteringsstress mellom øyerognstress frem til klekking. Behandlingsgruppen som har blitt stresset gjennom plommesekkstadiet og gruppen stresset fra øyerognstadiet og til startføring viser til en mer redusert stress respons, men sammenliknet med kontrollen kan man ikke konkludere at disse to behandlingsformene har hatt noen innvirkning på plasma kortisol produksjonen etter stress.

Det ble ikke funnet noen behandlingseffekter i mellom forsøksgruppene i plasma glukose, noe som kan vise til at alle behandlingsgruppene hadde en god glukosemobilisering, noe som støtter kortisolresultatene og gir en generell konklusjon om at behandlingene disse lakseungene var utsatt for på egg- og plommesekkstadiet ikke hadde konsekvenser for deres evne til å håndtere stressorer senere i livet. Det økte kortisolnivået ved T₃ hos gruppen som ble stresset mellom øyerognstadiet frem til klekking var tilsynelatende ikke korrelert med et økt plasma glukosenivå. Samtidig vet en ikke hvor langvarig det høye kortisolnivået hadde vært da fisken ble prøvetatt; om det hadde vært langvarig nokk til å gi en glukoserespons.

Det ble funnet et gjennomgående, og oftest, signifikant høyere uttrykk av *pomca1*, *pomca2* og *pomcb* i gruppen som ble stresset mellom øyerognstadiet og klekking enn i de andre to stress behandlede gruppene. Genuttrykkene av *pomca1*, *pomca2* og *pomcb* i denne gruppen var lik uttrykkene i kontrollgruppen ved T₀. Men i motsetning til kontrollgruppen ble uttrykket av disse genene nedregulert etter å ha blitt utsatt for en akutt stressor i gruppen som ble stresset mellom øyerognstadiet og klekking. Det var også et gjennomgående høyere uttrykk av alle *pomc* genene fra T₀ til T₃ i kontrollgruppen enn i de som ble stresset på egg- og plommesekkstadiet, uten at dette reflekteres på plasma kortisol konsentrasjonen. Det er vanskelig å si hva som er årsaken til forskjellen mellom behandlingsgruppene i uttrykket av *pomc* genene, men det kan naturligvis ikke utelukkes at dette er en faktisk effekt av stressbehandlingen de fikk i egg- plommesekkfasen. Det er også vanskelig å peke på årsaken til at alle gruppene kom nokså likt ut i plasma kortisolnivåer både før og etter stress. I

hypofysen er *pomc* uttrykket både i kortikotrope celler (pars distalis) og melanotrope celler (pars intermedia). I pars distalis blir *pomc* omdannet til ACTH og beta-endorfin, og i pars intermedia til alfa-MSH og beta-endorfin (Takei og Loretz, 2006). Siden det ble isolert mRNA fra hele hypofysen, vet man derfor ikke hvor det målte *pomc* var produsert. *Pomc* både fra pars distalis og pars intermedia har de rette komponentene som trengs for å produsere ACTH og alfa-MSH, og dermed er det en mulighet for at det analyserte *pomc* ikke har gått til produksjon av ACTH. Man vet heller ikke med sikkerhet hvilke av *pomc* er med i stressresponsen. Lepage og Winberg (1998) fant et økt uttrykk av *pomc* som et resultat av kronisk stress forårsaket av sosiale interaksjoner. Om en tar dette i betraktning så kan det se ut som kontrollgruppen og gruppen stresset mellom øyerognstadiet og klekking er mer utsatt for stress enn de to andre gruppene som har blitt utsatt for stress på stadiet hvor HPI-aksen er kommet lenger i utviklingen.

Det ble ikke funnet noen behandlingseffekter i genuttrykk av *gr1* og *gr2* i hypofyse på tross av en tydelig kortisolrespons ved T₁. Det er tidligere påvist en oppregulering av *gr*-mRNA i lever, hodenyren, gjeller, hud og hypothalamus ved økte plasma kortisolnivåer (Shrimpton og Randall, 1994; Sathiyaa og Vijayan, 2003; Terova et al., 2005; Piato et al., 2011; Teles et al., 2013). Madaro et al. (2015) observerte også en oppregulering *gr*-mRNA i hypofysen hos kronisk stresset fisk. En mulighet for at *gr* ikke responerte i forsøket selv om det var en tydelig økning i plasma kortisol kan være at stressoren ikke var kraftig nokk eller at grad av *gr* respons etter eksponering av akutt/kronisk stressfaktorer er vev-spesifikk.

Det viste til signifikant forskjell i vekt og lengde i behandlingsgruppen som var utsatt for kulde- og handteringsstress gjennom øyerognstadiet og startfôring i forhold til de andre behandlingsgruppene. Dette kan være fordi fisken har redusert følsomhet for stressor i respons på kortisol, eller det kan ha oppstått endring i epigenetiske mekanismer under utviklingen av HPI-aksen (McCarrey, 2012) som respons på behandlingen på egg- og plommesekkstadiet, dermed bruker fisken mindre energi på å opprettholde homeostatisk likevekt i respons på stress og mer energi kan gå til vekst. I studier på rotter er det observert at svake gjentatte stressorer kan ha positiv effekt på deres avkom (Meaney et al., 1985, 1991).

5. Konklusjon

Resultatene i dette forsøket både støtter og avviser vår hypotese om at stress under embryogenesen vil påvirke funksjonen til HPI-aksen senere i livet. På den ene siden syntes det å være klart at det var effekter av tidlig stress på gennuttrykk av flere komponenter i HPI-aksen mens det på den andre siden ikke ble funnet tydelige effekter på de ulike funksjonelle, fysiologiske endepunkter, plasmanivåene av kortisol og glukose. Det kan synes som om at effektene som er målt på gennivå er kompensert for mht. å oppnå en fullverdig kortisolrespons ved stress, men det er svært vanskelig ut fra gjeldende kunnskap, å utlede de kompensasjonsmekanismer som eventuelt har virket. Det må også understrekes at fiskene i dette forsøket ble utsatt for en svak stressor (i.e. svak økning i plasma kortisolnivåer etter eksponering til stressor) og at eventuelle effekter av tidlig stress ville vist seg dersom fisken hadde blitt utsatt for en mer alvorlig stressor.

Resultatene fra lengde og vekt, kan være med å støtte at eksponering av stressor under egg- og plommesekestadiet har hatt en stimulerende virkning på utviklingen til fisken.

6. Referansliste

- Alderman, S. L., McGuire, A., Bernier, N. J. & Vijayan, M. M. 2012. Central and peripheral glucocorticoid receptors are involved in the plasma cortisol response to an acute stressor in rainbow trout. *General and comparative endocrinology*, 176(1), s. 79.
- Alsop, D. & Vijayan, M. M. 2009. Molecular programming of the corticosteroid stress axis during zebrafish development. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 153(1), s. 49-54.
- Aluru, N. & Vijayan, M. M. 2008. Molecular characterization, tissue-specific expression, and regulation of melanocortin 2 receptor in rainbow trout. *Endocrinology*, 149(9), s. 4577-88.
- Aluru, N. & Vijayan, M. M. 2009. Stress transcriptomics in fish: A role for genomic cortisol signaling. *General and Comparative Endocrinology*, 164(2-3), s. 142-150.
- 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. *General and Comparative Endocrinology*, 158(3), s. 234-9.
- Barry, T. P., Malison, J. A., Held, J. A. & Parrish, J. J. 1995a. Ontogeny of the cortisol stress response in larval rainbow trout. *General and Comparative Endocrinology*, 97(1), s. 57-65.
- Barry, T. P., Ochiai, M. & Malison, J. A. 1995b. In Vitro Effects of ACTH on Interrenal Corticosteroidogenesis during Early Larval Development in Rainbow Trout. *General and Comparative Endocrinology*, 99(3), s. 382-387.
- Barton, B. A. 2002. Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42(3), s. 517-25.
- 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., Morgan, J. D. & Vijayan, M. M. 2002. Physiological and condition-related indicators of environmental stress in fish. I: Adams, S. M. (red.) *Biological indicators of aquatic ecosystem stress* Bethesda: American Fisheries Society, s. 111-148.
- Bernier, N. J., Flik, G. & Klaren, P. H. M. 2009. Chapter 6 Regulation And Contribution Of The Corticotropic, Melanotropic And Thyrotropic Axes To The Stress Response In Fishes. *Fish Physiology*, 28, s. 235-311.
- Catalani, A., Marinelli, M., Scaccianoce, S., Nicolai, R., Muscolo, L. A., Porcu, A., Koranyi, L., Piazza, P. V. & Angelucci, L. 1993. Progeny of mothers drinking corticosterone during lactation has lower stress-induced corticosterone secretion and better cognitive performance. *Brain Research* 624(1-2), s. 209-15.
- Chrousos, G. P. 1998. Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response. The 1997 Hans Selye Memorial Lecture. *Ann NY Acad Sci*, 851, s. 311-35.
- Cook, K. V., O'Connor, C. M., McConnachie, S. H., Gilmour, K. M. & Cooke, S. J. 2012. Condition dependent intra-individual repeatability of stress-induced cortisol in a freshwater fish. *Comparative biochemistry and physiology. Part A, Molecular & integrative physiology*, 161(3), s. 337.
- Donaldson, E. M. 1981. The pituitary-interrenal axis an an indicator of stress in fish. I: Pickering, A. D. (red.) *Stress and fish*. London: Academic Press, s. 367.

- Flik, G., Klaren, P. H. M., Van den Burg, E. H., Metz, J. R. & Huising, M. O. 2006. CRF and stress in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 146(1), s. 36-44.
- Henry, C., Kabbaj, M., Simon, H., Le Moal, M. & Maccari, S. 1994. Prenatal stress increases the hypothalamo-pituitary-adrenal axis response in young and adult rats. *J Neuroendocrinol*, 6(3), s. 341-5.
- Iversen, M. H. & Eliassen, R. A. 2014. The effect of allostatic load on hypothalamic–pituitary–interrenal (HPI) axis before and after secondary vaccination in Atlantic salmon postsmolts (*Salmo salar* L.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 40(2), s. 527-538.
- Lepage, O. & Winberg, S. 1998. Elevation of brain 5-HT activity, POMC expression, and plasma cortisol in socially subordinate rainbow trout. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 274(3), s. 645-654.
- 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. *Molecular Reproduction and Development*, 77(10), s. 922-931.
- 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 and Fisheries*, 14(4), s. 528-553.
- Madaro, A., Olsen, R. E., Kristiansen, T. S., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, T. O., Flik, G. & Gorissen, M. 2015. Stress in Atlantic salmon: response to unpredictable chronic stress. *Journal of Experimental Biology*, 218(16), s. 2538-2550.
- Mazeaud, M. M., Mazeaud, F. & Donaldson, E. M. 1977. Primary and Secondary Effects of Stress in Fish: Some New Data with a General Review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106(3), s. 201-212.
- McCarrey, J. R. 2012. The epigenome as a target for heritable environmental disruptions of cellular function. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 354(1-2), s. 9-15.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Bodnoff, S.R., Iny, L.J., Sapolsky, R.M. 1985. The effects of postnatal handling on the development of the glucocorticoid receptor systems and stress recovery in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 9, 731–734.
- Meaney, M.J., Aitken, D.H., Bhatnagar, S., Sapolsky, R.M. 1991. Postnatal handling attenuates certain neuroendocrine, anatomical, and cognitive dysfunctions associated with aging in female rats. *Neurobiology of Aging* 12, 31–38.
- Mommsen, T., Vijayan, M. & Moon, T. 1999. Cortisol in teleosts: dynamics, mechanisms of action, and metabolic regulation. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 9(3), s. 211-268.
- Norris, D. O. 2000. Endocrine Disruptors of the Stress Axis in Natural Populations: How Can We Tell? *American Zoologist*, 40(3), s. 393-401.
- Pankhurst, N. W. 2011. The endocrinology of stress in fish: An environmental perspective. *General and Comparative Endocrinology*, 170(2), s. 265-275.
- Piato, Â. L., Capiotti, K. M., Tamborski, A. R., Oses, J. P., Barcellos, L. J. G., Bogo, M. R., Lara, D. R., Vianna, M. R. & Bonan, C. D. 2011. Unpredictable chronic stress model in zebrafish (*Danio rerio*): behavioral and physiological responses. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(2), s. 561.
- Pickering, A. D., Pottinger, T. G. & Sumpter, J. P. 1986. Independence of the pituitary–interrenal axis and melanotroph activity in the brown trout, *Salmo trutta* L., under

- conditions of environmental stress. *General and Comparative Endocrinology*, 64(2), s. 206-211.
- Pottinger, T. G. & Mosuwe, E. 1994. The corticosteroidogenic response of brown and rainbow trout alevins and fry to environmental stress during a "critical period". *Gen Comp Endocrinol*, 95(3), s. 350-62.
- Prunet, P., Sturm, A. & Milla, S. 2006. Multiple corticosteroid receptors in fish: From old ideas to new concepts. *General and Comparative Endocrinology*, 147(1), s. 17-23.
- Randall, D. J. & Ferry, S. F. 1992. 4 Catecholamines. I: W.S. Hoar, D. J. R. & Farrell, A. P. (red.) *Fish Physiology*. Academic Press, s. 255-300.
- Salbert, G., Chauveau, I., Bonnec, G., Valotaire, Y. & Jegu, P. 1992. One of the two trout proopiomelanocortin messenger RNAs potentially encodes new peptides. *Molecular Endocrinology*, 6, s. 1605-1613.
- Saligaut, C., Linard, B., Breton, B., Anglade, I., Bailhache, T., Kah, O. & Jegu, P. 1999. Brain aminergic systems in salmonids and other teleosts in relation to steroid feedback and gonadotropin release. *Aquaculture*, 177(1-4), s. 13-20.
- Sathiyaa, R. & Vijayan, M. M. 2003. Autoregulation of glucocorticoid receptor by cortisol in rainbow trout hepatocytes. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 284(6), s. 1508-1515.
- Schreck, C. B. 2010. Stress and fish reproduction: the roles of allostasis and hormesis. *Gen Comp Endocrinol*, 165(3), s. 549-56. doi: 10.1016/j.ygcn.2009.07.004.
- Schulz, R. 1985. Measurement of five androgens in the blood of immature and maturing male rainbow trout, *Salmo gairdneri* (Richardson). *Steroids*, 46(2-3), s. 717-26.
- Selye, H. 1950. Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal*, 1 (4667).
- Shrimpton, J. M. & Randall, D. J. 1994. Downregulation of corticosteroid receptors in gills of coho salmon due to stress and cortisol treatment. *Am J Physiol*, 267(2 Pt 2), s. R432-8.
- Stephens, S. M., Brown, J. A. & Frankling, S. C. 1997. Stress responses of larval turbot, *Scophthalmus maximus* L., exposed to sub-lethal concentrations of petroleum hydrocarbons. *Fish Physiology and Biochemistry*, 17(1-6), s. 433-439.
- Sterling, P. 2012. Allostasis: A model of predictive regulation. *Physiology & Behavior*, 106(1), s. 5-15.
- Takei, Y. & Loretz, C. A. 2006. Endocrinology. I: Claiborne, D. H. E. a. J. B. (red.) *In The Physiology of Fishes* 3utg. Boca Raton: CRC Press, s. 271-318.
- Teles, M., Tridico, R., Callol, A., Fierro-Castro, C. & Tort, L. 2013. Differential expression of the corticosteroid receptors GR1, GR2 and MR in rainbow trout organs with slow release cortisol implants. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 164(3), s. 506-511.
- Terova, G., Gornati, R., Rimoldi, S., Bernardini, G. & Saroglia, M. 2005. Quantification of a glucocorticoid receptor in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) reared at high stocking density. *Gene*, 357(2), s. 144-151.
- Tveiten, H., Bjorn, P. A., Johnsen, H. K., Finstad, B. & McKinley, R. S. 2010. Effects of the sea louse *Lepeophtheirus salmonis* on temporal changes in cortisol, sex steroids, growth and reproductive investment in Arctic charr *Salvelinus alpinus*. *Journal of Fish Biology*, 76(10), s. 2318-41.
- Vijayan, M. M., Aluru, N. & Leatherland, J. F. 2010. Stress response and role of cortisol. I: Leatherland, J. F. W., P. T. K., (red.) *Fish Diseases and Disorders*. New York: CABI Publishing, s. 182-201.

- 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(11), s. 2260-2266.
- Wedemeyer, G. 1996. *Physiology of fish in intensive culture systems*. Springer Science & Business Media.
- Wells, R. M. G. & Pankhurst, N. W. 1999. Evaluation of Simple Instruments for the Measurement of Blood Glucose and Lactate, and Plasma Protein as Stress Indicators in Fish. *Journal of the World Aquaculture Society*, 30(2), s. 276-284.
- Wendelaar Bonga, S. E. 1997. The stress response in fish. *Physiological Reviews*, 77, s. 591-625.
- Wendelaar Bonga, S. E. 2011. HORMONAL RESPONSES TO STRESS | Hormone Response to Stress. *I: Farrell, A. P. (red.) Encyclopedia of Fish Physiology*. San Diego: Academic Press, s. 1515-1523.
- Xiong, F. & Zhang, L. 2013. Role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in developmental programming of health and disease. *Front Neuroendocrinol*, 34(1), s. 27-46.