



Mastergradsoppgave i fiskerifag – studieretning oppdrettsbiologi (60 stp.)

**Veksthormon og kortisol stimulerer
sjøvannstoleranse hos både anadrom og
ikke-anadrom røye (*Salvelinus alpinus*)**

av

Roger Johan Pettersen

Mai 2007

Institutt for akvatisk biologi – Norges fiskerihøgskole
Universitetet i Tromsø

Forord

Den praktiske delen av denne studien er gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø i perioden desember 2005 – mars 2006. Takk til forskningstekniker Nethe Andersen for god røkting av fisken, tilrettelegging og hjelp når vi trengte det. Helge K. Johnsen og Eirik Frøyland skal også ha takk for hjelp med planlegging og gjennomføring av hormonimplantering og prøveuttak. Alle prøver er analysert på lab'en på Norges fiskerihøgskole. Takk til Tanja L. Hanebrekke for opplæring og hjelp med ATPase-analysene. Judith Wolkers skal ha honnør for etablering av assay og gjennomføring av western blot for kotransportøranalysene.

En spesiell takk til veileder og sjefspilot Even H. Jørgensen for et godt tilrettelagt mastergradsprosjekt, god veiledning og gode råd og innspill.

Takk til Lars Botngård for et bra samarbeid i Kårvika og på Nfh. Og på fritida!!

Gutta boys på kontoret må også nevnes - takk for en hyggelig tid! Og takk til Ragnar for hjelp med å holde motet oppe når det har gått trått.

Takk til deg Maria for at du er den du er.

Roger Johan Pettersen

Tromsø, mai 2007

Sammendrag

Økende daglengde om våren stimulerer utvikling av sjøvannstoleranse hos anadrom røye. Kortisol og veksthormon (GH) er to nøkkelhormoner i den endokrine stimuleringen av hypoosmoregulatorisk kapasitet, og de to hormonene er vist å ha en synergistisk effekt på stimulering, rekruttering og differensiering av kloridceller av sjøvannstypen med assosierte transportproteiner og enzymer. Vi har i denne studien vist at både anadrom (Hammerfeststamme) og ikke-anadrom (Altevannsstamme) røye utvikler en forbedret sjøvannstoleranse etter implantering av kortisol ($31 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), og at denne effekten forsterkes dersom kortisol administreres sammen med GH ($11 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$). Sjøvannstester 14 og 28 dager etter hormonimplantering avdekket en signifikant forbedret hypoosmoregulatorisk kapasitet i form av lavere plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon hos gruppene som hadde fått implantert kortisol og GH+kortisol samtidig. Hormonimplantering har ikke gitt en tilsvarende markert stimulering av Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet og mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -kotransportør, men analysene viser en generell, signifikant effekt av hormonbehandlingen. Behandlingen har gitt en tilnærmet like god forbedring av sjøvannstoleransen hos begge stammene, men Altevannsrøya har vist en signifikant dårligere sjøvannstoleranse både før og etter hormonbehandling sammenliknet med fisk fra Hammerfeststammen. Dette gjenspeiles også i analysene av Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet og mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -kotransportør. Studien viser for første gang at ikke-anadrom, ”landlocked” røye utvikler en forbedret sjøvannstoleranse dersom den får et adekvat endokrint stimuli og konkluderer med at manglende sjøvannstoleranse hos ikke-anadrom røye i tidligere studier skyldes at det hypoosmoregulatoriske apparat ikke er stimulert. Studien gir ikke svar på hvorfor Altevannsrøya har en dårligere sjøvannstoleranse enn Hammerfestrøye.

Nøkkelord

Salvelinus alpinus, ikke-anadrom, sjøvannstoleranse, GH, kortisol, Na^+, K^+ -ATPase, $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -kotransportør

Innledning	1
Røye, <i>Salvelinus alpinus</i>	1
Generelt om Parr-smolt transformasjon hos laksefisk.....	2
Endokrin kontroll.....	3
Parr-smolt transformasjon hos Røye.....	4
Problemstilling og målsetting.....	5
Materiale og metode	7
Forsøksmateriale.....	7
Forsøksoppsett og forsøksbetingelser.....	8
Kar, vannforsyning og fotoperiode.....	8
Etablering av forsøksgrupper.....	8
Sjøvannstester.....	9
Hormonimplantering.....	10
Prøvetaking.....	10
Analyser.....	11
Plasma osmolalitet og klorid.....	11
Na ⁺ ,K ⁺ ,2Cl ⁻ kotransportør i gjellevev.....	11
Enzymaktivitet Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	12
Avvik fra forsøksprotokoll.....	14
Fisk tatt ut av datamaterialet på grunn av kjønnsmodning.....	14
Lengde, vekt og kondisjonsfaktor.....	14
Analyse av Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-aktivitet.....	14
Statistiske analyser.....	15
Resultater	17
Lengde, vekt og kondisjonsfaktor.....	17
Plasma klorid og osmolalitet etter sjøvannstest.....	18
Hammerfeststamme.....	18
Altevannsstamme.....	20
Na ⁺ ,K ⁺ ,2Cl kotransportør i gjellevev.....	22
Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase-aktivitet i gjellevev.....	24
Diskusjon	25
Konklusjon.....	32
Referanser	33
Appendix	39

Innledning

Røye, *Salvelinus alpinus*

Røya har den nordligste utbredelsen blant laksefiskene, og er også den nordligst levende av alle ferskvannslevende fiskearter. Røya har en sirkumpolar utbredelse bestående av både anadrome og residente, ikke-anadrome populasjoner (Johnson 1980, Klemetsen et al 2003). Røya antas ikke å ha noen nordlig utbredelsesgrense, verken som anadrome eller ikke-anadrome livsformer, og leveområdene kjennetegnes ved lave temperaturer og store årstidsvariasjoner i forhold til vanntemperaturer, daglengde og næringstilgang (Johnson 1980). Typiske habitat for røye er oligotrofe eller ultraoligotrofe vassdrag (Klemetsen et al. 2003), og det er estimert at det totalt eksisterer rundt 50 000 bestander av røye. Av disse finner vi rundt 30 000 i Norge (Maitland 1995). Utbredelsesområdet har også vært nøye sammenfallende med isdekket under den siste istid (Johnson 1980; Klemetsen et al. 2003), og man antar at røya har eksistert over hele dette området etter nedsmeltingen av isen. Sannsynligvis har økte temperaturer, eutrofiering av vassdrag og konkurranse fra andre arter ført til at røya ikke lenger eksisterer i de sørlige delene av dette området (Klemetsen et al. 2003).

Anadrome populasjoner finnes hovedsakelig i den nordlige delen av utbredelsesområdet, mens man i sør utelukkende finner residente, ikke-anadrome bestander av røye. Det antas at økte temperaturer i de sørlige områdene har ført til at anadromi som livsstrategi har blitt forlatt, og i Norge går denne grensen i Nordland fylke ved ca 65° N (Johnson 1980). Røyebestandene lengst sør i Europa er lokalisert i høyereliggende fjellvann og består utelukkende av ikke-anadrome populasjoner (Johnson 1980).

Et særtrekk for røye er de anadrome bestandenes årlige, relativt kortvarige beitevandring ut i sjøen om sommeren (Johnson 1980; Gross et al. 1988). Både umodne og kjønnsmodne individer vandrer ut, og disse beitevandringen har gjerne en varighet på 1-2 måneder i Nord-Norge (Berg & Berg 1993). Dårlig næringstilgang og lave vanntemperaturer under overvintringene i ferskvann har medført at den anadrome røya har utviklet en livsstrategi der næringsinntaket i stor grad begrenser seg til disse beitevandringene sommerstid (Klemetsen et al. 2003). Enkelte individer kan doble kroppsvekten i løpet av en slik beitevandring (Jørgensen et al. 1997). Studier fra Senja i Nordland har vist at utvandringen starter i tiden rundt isløsning, og individer som har gjennomført tidligere sjøvandring går ut først. Hovedtyngden av fisken vandrer ut i perioden fra tidlig mai til midten av juni, og tilbakevandringen finner hovedsakelig sted i løpet av juli (Berg & Berg 1989).

Generelt om Parr-smolt transformasjon hos laksefisk

De anadrome laksefiskene tilbringer en viss tid i ferskvann før fisken vandrer ut i havet. I forkant av dette endrer fisken karakter fra en stasjonær, bunnlevende og kamuflasjefarget parr til en sølvfarget, strømlinjeformet og pelagisk levende *smolt* (Hoar 1988). Parr-smolt transformasjonen, ofte omtalt smoltifisering, involverer både morfologiske, fysiologiske og atferdsmessige endringer. Parr-smolt transformasjonen regnes også for å være preadaptiv, noe som innebærer at disse prosessene så og si er gjennomført før selve utvandringen til havet for å sette fisken i stand til å leve og vokse i et marint miljø (Boeuf 1993).

Fysiologisk innebærer overgangen fra ferskvann til sjøvann en omveltning i forhold til osmo- og ioneregulering, og utvikling av sjøvannstoleranse representerer i så måte en markert og helt avgjørende fysiologisk adaptasjon. Hos fisk som lever i ferskvann er kroppsvæskene hyperosmotisk i forhold til omgivelsene, og fisken må derfor kompensere for osmotisk drevet innfluks av vann, samtidig som fisken taper salter til omgivelsene over gjellene. Dette reguleres blant annet gjennom en betydelig produksjon av sterkt fortynnet urin, konservering av elektrolytter og et aktivt opptak av ioner over gjeller og tarm (Hoar 1988; Marshall & Grosell 2006). I sjøen er fisken derimot hypoosmotisk sammenliknet med omgivelsene, og dette medfører at fisken passivt dehydreres da elektrolyttkonsentrasjonen i kroppsvæskene bare holder rundt en tredjedel av konsentrasjonen i sjøvannet (Hoar 1988; Marshall & Grosell 2006). For å kompensere for dette drikker fisken sjøvann. I tarmen foregår et aktivt opptak av NaCl slik at vannmolekylene kan absorberes over tarmveggen, hvorpå de absorberte saltmolekylene skilles ut ved hjelp av aktiv transport over gjellene (Na^+ , Cl^-) og nyrene (Mg^{2+} , Ca^{2+} , SO_4^{2-}) (Hoar 1988; Evans et al. 2005; Marshall & Grosell 2006).

Utvikling av sjøvannstoleranse inkluderer differensiering og utvikling av osmoregulatoriske organer som gjeller, tarm, nyre og urinblære (Hoar 1988). Gjellene er det viktigste organet for både det aktive opptaket av ioner i ferskvann, og for den aktive utskillelsen av NaCl i sjøvann (Evans et al. 2005; Marshall & Grosell 2006). Gjellenes kloridceller har en sentral rolle i forhold til ekskresjon av NaCl i sjøvann, og kloridcellene øker i både størrelse og antall under smoltifiseringen (Hoar 1988; McCormick 2001; Evans et al. 2005). I kloridcellene spiller enzymet Na^+, K^+ -ATPase en nøkkelrolle i sekresjonen av NaCl, da den bidrar til å opprettholde Na^+ - og K^+ -gradientene over den basolaterale membranen. Disse gradientene driver den aktive transporten av ioner ut over gjellemembranen, og ATPase-aktivitet er et mye brukt mål på utvikling av hypoosmoregulatorisk kapasitet hos laksefisk (McCormick 2001; Evans et al. 2005;

Marshall & Grosell 2006). I den etter hvert etablerte modellen av sjøvannskloridcellen driver natriumgradienten transporten av natrium, kalium og to kloridioner inn i cellen via det basolaterale transportenzymet $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør. Kloridionene skilles ut fra kloridcellen gjennom en apikal kloridkanal, mens natriumionene pumpes tilbake og blir drevet ned den elektrokjemiske gradienten og ut gjennom "leaky junctions" mellom kloridcellene og nabocellene (accessory cells) (McCormick 2001; Evans et al. 2005; Marshall & Grosell 2006).

Men også andre osmoregulatorisk aktive organer og vev utvikles og differensieres under smoltifiseringen. Transportkapasitet for opptak av ioner og vann over tarmen øker og legger til rette for drikking av sjøvann (Hoar 1988; Nielsen et al. 1999). I nyrene senkes filtrasjonsraten og reabsorpsjonen av vann øker, slik at vanntap over nyrene reduseres til et minimum (Hoar 1988).

Endokrin kontroll

Tidsrommet for parr-smolt transformasjonen er svært forutsigart (Hoar 1988). Den endokrine reguleringen og igangsettingen av parr-smolt transformasjonen synes å være styrt av en årlig (circannual), endogene rytme (Eriksson & Lundqvist 1982; Duston & Saunders 1990; Clarke & Hirano 1995). Studier har videre vist at denne rytmen hos laksefisk i hovedsak er fasejustert/ "entrained" av den årlige variasjonen i fotoperiode (daglengde) (Duston & Saunders 1990; Clarke & Hirano 1995). Økt daglengde om våren er den viktigste ytre faktoren som styrer igangsetting av smoltifiseringen; den blir derfor kalt en "zeitgeber" (McCormick et al. 1998). Det antas at informasjon om fotoperiode medieres gjennom endringer i utskillelsen av melatonin fra pinealkjertelen (Hoar 1988; Boeuf & Falcón 2001). Vanntemperatur påvirker også smoltifiseringsprosessen, og økt temperatur vil føre til en hurtigere smoltutvikling. Temperatur antas derimot ikke å være en *zeitgeber* i seg selv (McCormick et al. 2002).

Den endokrine kontrollen og igangsettingen av parr-smolt transformasjonen er intrikat, og involverer en rekke hormoner. GH og kortisol anses for å være de viktigste hormonene i utviklingen av sjøvannstoleranse hos laksefisk, og plasmakonsentrasjonene av begge hormonene øker i forkant av, og under, parr-smolt transformasjonen (Hoar 1988; McCormick 1996; Björnsson et al. 2002). GH og kortisol har dessuten vist seg å ha en synergistisk effekt i forhold til utvikling hypoosmoregulatorisk kapasitet, antall og størrelse av kloridcellene, samt ATPase-aktiviteten og mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ -kotransportører i gjellene hos laksefisk (f. eks. Madsen 1990; McCormick 1996; Shrimpton & McCormick 1998; McCormick 2001; Pelis & McCormick 2001). En antatt mekanisme bak denne additive effekten er at GH oppregulerer kortisolreseptorene i

gjellene og dermed øker gjellenes sensitivitet for kortisol (Shrimpton et al. 1995; Shrimpton & McCormick 1998).

Tyroksin (TH) har også en nøkkelrolle i parr-smolt transformasjonen, blant annet i forhold til sølvfarging, migrasjon, økt aktivitetsnivå, vekst og metabolisme (Hoar 1988). Studier på stillehavslaks (*Oncorhynchus kisutch*) har vist at økte nivåer av TH er assosiert med utvikling av sjøvannspreferanse hos laksefisk, samt endret atferd og økt svømmeaktivitet (Hoar 1988; Iwata et al. 1990). Administrering av TH i Stillehavslaks har gitt en økt sjøvannspreferanse, og denne effekten forsterkes dersom TH administreres sammen med GH (Iwata et al. 1990). Selv om resultatene i studier av TH og osmoregulering er motstridende, antyder de fleste resultatene at TH i seg selv ikke påvirker ioneopptak eller –sekresjon (Boeuf 1993; McCormick 2001). Hos laks er det imidlertid vist at T₃ (trijodtyronin) øker antall kortisolreseptorer (Shrimpton & McCormick 1998), og denne effekten forsterkes dersom T₃ administreres sammen med GH (McCormick 2001).

Parr-smolt transformasjon hos Røye

Siden røya kun oppholder seg en relativt kort periode i sjøen hver sommer, samt at den gjerne tilbringer den første fasen av sjøoppholdet i brakkvann, har det vært stilt spørsmålsteget ved hvorvidt røya gjennomgår en fullverdig parr-smolt transformasjon tilsvarende den man finner hos andre laksefisk (McCormick & Saunders 1987). En rekke studier har imidlertid vist at også røya gjennomgår sesongmessige svingninger i hypoosmoregulatorisk kapasitet med en forbedret sjøvannstoleranse i forkant av utvandring til sjøen om våren (Finstad et al. 1989; Arnesen et al. 1992; Nilssen et al. 1997; Jørgensen & Arnesen 2002; Jørgensen et al. 2007).

Imidlertid synes den forbedrede sjøvannstoleransen å være av en forbigående karakter, og det ser ut til at den hypoosmoregulatoriske kapasiteten avtar etter hvert som røya vandrer tilbake til ferskvann (Nilssen et al. 1997). Studier har videre bekreftet at også fisk som har gjennomført tidligere næringsvandring til sjø gjennomgår en ny utvikling av sjøvannstoleranse i likhet med ”førstegangsvandrerere” (Aas-Hansen et al. 2005).

Tidligere implanteringsstudier på røye ved Norges fiskerihøgskole har vist at administrering av kortisol gir en forbedret sjøvannstoleranse og oppregulert Na⁺,K⁺-ATPase-aktivitet (Aas-Hansen 2004). Imidlertid har administrering av GH i disse studiene ikke gitt konsistente resultater, men dette kan skyldes en uegnet forsøksprotokoll (*op cit*). Implanteringsstudier på andre laksefisk har

imidlertid påvist økt Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet av både GH og kortisol (f. eks. Richman & Zaugg 1987; Bisbal & Specker 1991; Boeuf et al. 1994; Pelis & McCormick 2001).

Problemstilling og målsetting

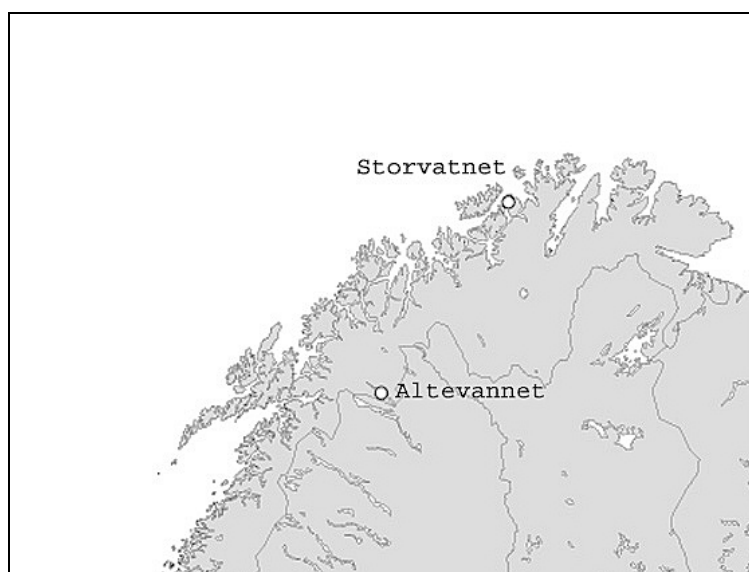
På tross av lang tids isolasjon og bortfall av anadromi som livsstrategi, har studier like fullt påvist en viss, men på langt nær full, hypoosmoregulatorisk kapasitet også i residente, ikke-anadrome bestander av røye (Schmitz 1992; Staurnes et al. 1992). Et annet, komparativt studie med anadrom og resident røye viste en mangelfull og begrenset utvikling av sjøvannstoleranse hos den ikke-anadrome populasjonen (Eliassen et al. 1998). I motsetning til den anadrome røya overlevde ikke fisken fra den ikke-anadrome populasjonen overføring til sjøvann. Utviklingen av et hypoosmoregulatorisk apparat kan antas å representere en unødvendig energetisk kostnad i en ikke-anadrom røyebestand som er geografisk isolert fra sjøen, og det er derfor rimelig å anta at denne prosessen skulle være nedregulert. På den andre siden er det nå vist enkelte euryhaline fiskarter har stamceller i gjellene som kan utvikle seg til kloridceller av både ferskvanns- og sjøvannstypen avhengig av stimulering (Wong & Chan 1999). En annen studie sannsynliggjør videre at ferskvannskloridceller kan omdannes til kloridceller av sjøvannstypen hos euryhalin fisk som overføres fra ferskvann til sjøvann (Hiroi et al. 1999). Hvorvidt også stenohaline arter kan utvikle sjøvannstoleranse om de får de riktige stimulatoriske signaler (for eksempel GH og kortisol) er ennå ikke klarlagt. Dersom det viser seg at stamcellene i gjellene kan differensieres til både ferskvanns- og sjøvannskloridceller avhengig av regulatorisk stimuli, kan imidlertid dette antas å være mulig.

Vi har i denne studien ønsket å undersøke hvorvidt administrering av GH og kortisol fører til en stimulering av sjøvannstoleranse hos ikke-anadrom røye. Vi har studert utviklingen av sjøvannstoleranse og det tilhørende enzymapparatet etter administrering av kortisol og GH hos henholdsvis en anadrom og en ikke-anadrom røyebestand fra Nord-Norge (figur 1). Den ikke-anadrome bestanden som ble valgt har vært i ferskvann og isolert fra sjøen i flere tusen år.

Materiale og metode

Forsøksmateriale

Forsøket ble gjennomført ved Havbruksstasjonen i Tromsø i Kårvika (Ringvassøya, Troms) i perioden februar - mars 2006. Det ble benyttet fisk fra to ulike stammer i forsøket, henholdsvis ikke-anadrom røye fra Altevann i Troms (heretter også omtalt *Altevannsstamme*) og anadrom sjørøye med opphav fra Storvatnet ved Hammerfest (omtalt *Hammerfeststamme*).



Figur 1. Geografisk plassering av stammene benyttet i studien

Totalt 180 fisk innsamlet fra Altevann ble hentet hos Villmarksfisk AS (Bardu, Troms) den 20. desember 2005. Altevannsrøya var 4-5 år gammel og fanget ved hjelp av ruser med åte i perioden februar - mai samme år (opplysning fra Dagfinn Lysne, Villmarksfisk AS). Fisken hadde da en vekt på ca 50 gram. Etter overføring til anlegget hos Villmarksfisk hadde fisken vært holdt i sirkulære kar under kontinuerlig lys og med en vanntemperatur på 8-9°C (opplysning fra Dagfinn Lysne). Fisken ble fraktet i plastsekker med oksygenatmosfære til Havbruksstasjonen i Tromsø, hvor den ble overført til sirkulære kar med vanntemperatur og fotoperiode satt til henholdsvis 5°C og kort dags lysbetingelse (daglengde heretter angitt som antall timer lys (L):antall timer mørke (D); L:D 8:16). Fisken ble i denne perioden fôret med et kommersielt laksefôr fra Skretting, men fôringen ble avsluttet ved forsøksstart den 13. februar 2006. Av de 180 individene ble 100 stk benyttet videre i forsøket. Fisken ble sortert etter øyemål og den største og minste

fisken fra Altevannsstammen ble sortert ut slik at størrelsesfordelingen skulle være mest mulig homogen i behandlings- og kontrollgruppene.

Hammerfestrøya var fra Havbruksstasjonens egen produksjon og basert på stamfisk som ble strøket høsten 2003. Eggene ble inkubert ved 4 °C og klekket i januar/februar 2004. Yngelen ble startfôret ved 6 °C under kontinuerlig belysning, og ble holdt under disse betingelsene fram til høsten 2004, hvorpå fisken ble overført naturlig lys- og temperaturregime. Fisken hadde vært fôret med laksefôr fra skretting fra startfôring og fram til forsøksstart 13. februar 2006.

Stasjonens stamfisk har sin opprinnelse i vill sjørøye fra Storvatnet i Hammerfest, innfanget i 1990. Det ble til sammen benyttet 101 individer fra Hammerfeststammen i forsøket.

Forsøksoppsett og forsøksbetingelser

Kar, vannforsyning og fotoperiode

Forsøket ble utført i et eget forsøksrom ved Havbruksstasjonen. Fotoperiode var kontrollert og satt til L:D 8:16 gjennom hele forsøket. Karene som ble benyttet var sirkulære kar med et volum på 500 liter. For å oppnå en ønsket tetthet av fisk i karet ($\sim 35 \text{ kg} \cdot \text{m}^3$ vannvolum) ble vannstanden senket slik at vannvolumet ble holdt på ca 350 liter. Vanntemperaturen var kontrollert og justert til 5°C gjennom hele forsøksperioden. Ved hjelp av vertikale sprederør ble det opprettet en sirkulær vannstrøm i karet, og vanntilførsel ble holdt mellom 6.5 og 10 liter min^{-1} . Oksygenmetning i avløpsvannet ble jevnlig kontrollert, og vanntilførsel justert dersom nødvendig for å opprettholde en oksygenmetningsgrad på minimum 90%.

Etablering av forsøksgrupper

13. februar 2006 ble fisken som skulle brukes i forsøket bedøvd (Benzocaine, 50 ppm) og tilfeldig fordelt i fire ulike behandlingsgrupper (se for øvrig tabell 1 og 2). De ulike behandlingsgruppene ble merket med "Floy tags" (FTF-69, Floy Tag and Manufacturing, Seattle, USA) av ulike farge som ble sydd fast under basalplaten i forkant av ryggfinnen. For å skille stammene fra hverandre ble fisken merket ved hjelp av en tatoeringspenn (Pan Jet Needleless Injector, Wright Dental, Dundee, England. Blekk: Alcian blue, BDH Chemicals, Poole, England.). Fisken ble merket mellom brystfinnene eller mellom bukfinnene for å angi henholdsvis Altevannsstamme og Hammerfeststamme.

For begge stammene ble det etablert tre behandlingsgrupper og en kontrollgruppe. Behandlingsgruppene fikk implantert henholdsvis kortisol, veksthormon (GH) eller kortisol + GH (se eget avsnitt). Kontrollgruppa fikk en ”sham-implantering” av olje-/fettblandingen på samme måte som behandlingsgruppene. Alle fire behandlingsgruppene ble deretter fordelt på to kar for sjøvannstester henholdsvis 14 og 28 dager etter behandlingsstart (tabell 2). Fisken ble fordelt i de to karene på en slik måte at alle behandlingsgruppene fra begge stammene var representert i hvert enkelt kar. Hver behandlingsgruppe bestod av 11 individer (med ett unntak, se tabell 1), slik at det totalt var 88 og 89 fisk i hvert kar. Ved det enkelte prøveuttaket ble all fisk i det aktuelle karet tatt ut. Behandlingsgruppene ble holdt i samme kar for å unngå at eventuelle ulike miljøparametre mellom enkelte kar skulle påvirke behandlingsgruppene ulikt. I tillegg ble en ubehandlet kontrollgruppe (n=12, ikke ”sham”-implantert) fra begge stammene overført til et tredje kar for sjøvannstest og nullprøveuttak ved forsøksstart.

Tabell 1. Fordeling av fisk i de ulike karene presentert som antall fra hver stamme per behandlingsgruppe. Stamme er forkortet AV og HF, og angir henholdsvis Altevannsstamme og Hammerfeststamme.

Behandlingsgruppe	Nulluttak		14 dager		28 dager	
	AV	HF	AV	HF	AV	HF
Kontroll	12	12	11	11	11	11
Kortisol	-	-	11	11	11	11
GH	-	-	11	12	11	11
GH + kortisol	-	-	11	11	11	11

Sjøvannstester

Ett døgn før det enkelte prøveuttaket ble ferskvannstilførselen til karet stengt av og erstattet med sjøvann. Temperaturen ble justert til 5 °C og vanntilførsel satt til 6.5 l min⁻¹ (samme vanntilførsel og temperatur som før overføring til sjøvann). Sjøvannet hadde en salinitet på 32-33 ppm. Etter 24 timer i sjøvann ble fisken så håvet hurtig ut av karet og avlivet ved hjelp av en overdose benzocaine (150 ppm). Plasma- og gjelleprøver ble deretter tatt ut som beskrevet i eget avsnitt.

Tabell 2 – Forsøksdesign, datoer ved igangsetting og prøveuttak

Dato	Beskrivelse
13.02.2006	Etablering av forsøksgrupper og hormonimplantering
14.02.2006	Start sjøvannstest 1, kontrollgrupper/nulluttak (kar 1). Uttak neste dag
30.02.2006	Start sjøvannstest 2, 14-dagers uttak (kar 2). Uttak neste dag
14.03.2006	Start sjøvannstest 3, 28-dagers uttak (kar 3). Uttak neste dag

Hormonimplantering

Implantering av kortisol ble utført i samsvar med tidligere pilotforsøk utført på røye ved Norges fiskerihøgskole for kartlegging av riktig dose (som gir ”fysiologiske” nivåer) og blandingsforhold olje/fett for tilstrekkelig varighet av forhøyede kortisolnivåer (upubliserede resultater). Både kortisol og veksthormon ble administrert intraperitonalt løst i en 1:1 blanding av sesamolje og kokosfett. Bovint veksthormon (Posilac, Monsanto, St. Louis, MO, USA) ble levert i en sinksuspensjon som ble tilsatt olje-/fettblandingen under omhyggelig omrøring og deretter oppbevart kjølig. Kortisol (hydrokortison, Sigma) ble løst i etanol og deretter ført over i olje-/fettblandingen. Etanolen ble dampet av ved hjelp av nitrogenatmosfære før løsningen ble satt kjølig fram til implantering. Før implantering ble olje- og hormonløsningen varmet forsiktig opp til flytende form i vannbad ved 30 °C under omrøring. Løsningene ble administrert ved hjelp av 1 ml sprøyter som ble holdt oppvarmet i vannbadet. Injiseringen ble gjort like bak bukfinnen, og sprøytespissen ble ført såvidt gjennom bukveggen for å unngå å skade inder organer. På grunn av lavere temperatur etter injiseringen vil olje-/fettblandingen stivne til en vokslignende masse i fiskens buk.

Behandlingsgruppene kortisol og kortisol + GH fikk injisert 0.3 ml av kortisol-/oljeløsningen, tilsvarende 4.2 mg kortisol per individ. Tilsvarende fikk gruppene GH og kortisol + GH implantert 0.2 ml av veksthormon-/oljeløsningen. Dette tilsvarte en dose på 1.5 mg veksthormon per individ. Dose ble av praktiske grunner ikke justert individuelt i forhold til kroppsvekt. Hormoninjiseringene representerte en gjennomsnittlig dose på henholdsvis ca. 31 µg kortisol · g fisk⁻¹ og ca. 11 µg GH · g fisk⁻¹. Fisk i behandlingsgruppen GH + kortisol fikk de to hormonløsningene implantert enkeltvis. Kontrollgruppen fikk tilsvarende administrert 0.3 ml av olje-/fettblandingen uten hormontilsetning.

Prøvetaking

Etter avlaving ble blodprøver tappet fra kaudalvenen ved hjelp av 2 ml hepariniserte vacutainere (BD diagnostics, Franklin Lakes, NJ, USA) og satt på is. Prøvene ble innen 30 minutter sentrifugert ved 2700 · g i ti minutter, før plasma ble pipettert ut og frosset ned ved -80 °C. Venstre gjelle (alle gjellebuer) ble klippet ut, pakket inn i aluminiumsfolie og øyeblikkelig frosset ned i flytende nitrogen. Til sist ble vekt og lengde på all fisk ble registrert, før buken ble åpnet og kjønn og kjønnsmodningsstatus ble vurdert visuelt. Ved eventuell kjønnsmodning ble fisken tatt ut av datamaterialet (se for øvrig eget avsnitt; avvik fra forsøksprotokoll). Kondisjonsfaktor (K) ble beregnet i henhold til likningen $K = W \cdot L^{-3} \cdot 100$ (W = vekt i gram, L = lengde i cm).

Analyser

Plasma osmolalitet og klorid

Plasmaprøvene ble tint på is og grundig ”vortexet” før analyse. Kloridkonsentrasjonen i plasma ble bestemt ved hjelp av en kloridtitrator (Corning 925, CIBA Corning Diagnostics, Essex, England) som ble kalibrert mot en 100 mMol standard. Apparatet ble deretter sjekket mot standarden for hver tiende prøve for å kvalitetsikre resultatene.

Plasma osmolalitet ble analysert ved hjelp av et Fiske One-Ten osmometer (Fiske Associates, Massachusetts, USA). Instrumentet ble testet mot en 290 mOsm kg⁻¹ standard ved oppstart og for hver tiende prøve som kvalitetssikring.

Både plasma klorid og osmolalitet ble analysert i to paralleller. Ved avvik større enn henholdsvis 3 mmol (klorid) og 5 mOsm kg⁻¹ (osmolalitet) ble analysen gjentatt. I fremstilling og analyser av resultatene er gjennomsnittet av verdiene for hver enkelt prøve benyttet.

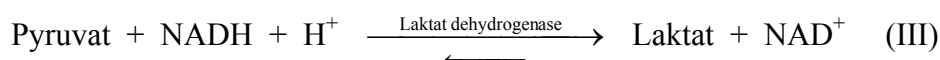
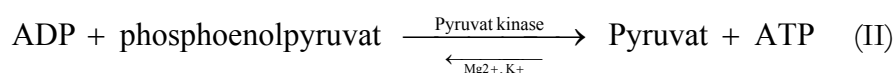
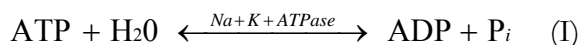
Na⁺,K⁺,2Cl⁻ kotransportør i gjellevev

Alle analyser av Na⁺,K⁺,2Cl⁻-kotransportør ble utført av avdelingsingeniør Judith Wolkers ved Norges fiskerihøgskole. På grunn av kapasitetsbegrensninger ble kun fisken fra 14-dagersuttaket analysert i denne studien.

Mengde Na⁺,K⁺,2Cl⁻ kotransportør i gjellevev ble målt ved hjelp av western blotting, modifisert etter metode beskrevet i Pelis et al. (2001) og Tipsmark et al (2002). T4 monoklonalt antistoff, utviklet mot humant tykktarms Na⁺,K⁺,2Cl⁻ kotransportør, ble brukt som primært antistoff for Na⁺,K⁺,2Cl⁻ kotransportør i gjellevev fra røye. T4 antistoffet, utviklet av Dr. Christian Lytle og Dr. Bliss Forbush III, ble mottatt fra Developmental Studies Hybridoma Bank. Antistoffet er utviklet under beskyttelse av National Institute of Child Health and Human Development og oppbevart av Universitetet i Iowa, Iowa, USA. I analysen ble det brukt en konsentrasjon på 0.58 µg antistoff ml⁻¹. Som sekundært antistoff ble brukt peroksidase-merket geit antimus IgG (Kirkegaard & Perry laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA) ved en konsentrasjon på 0.15 µg ml⁻¹. Kvantifisering av bandene ble gjort ved hjelp av Chemi Imager og AlphaEase software (Alpha Innotech, San Leandro, CA, USA).

Enzymaktivitet Na^+, K^+ -ATPase

Analyse av Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet ble gjennomført i henhold til metode beskrevet av blant annet McCormick (1993), Schrock et al (1994) og Strand (2000). Hydrolyse av ATP til ADP i cellene er enzymatisk koplet til oksidasjonen av NADH til NAD^+ . Analysen bestemmer reaksjonshastigheten for omdanningen/hydrolyseringen av ATP til ADP og P_i , ved at man måler den påfølgende oksidasjonen av NADH til NAD^+ i henhold til reaksjonslikningene under:



I denne analysen tilsettes homogenisert gjellevev en reaksjonsløsning, ”assay mixture” (heretter forkortet AM). Reaksjonsløsningen består de enzymene, substratene og saltene som er nødvendige for å oppnå den påfølgende oksideringen av NADH etter at ATP er hydrolysert til ADP. Omdanninga av NADH til NAD^+ i prøven er direkte registrerbar ved hjelp av plateleser som endring i absorbans ved bølgelengde 340 nm.

Oksidasjonen av NADH til NAD^+ i vevsprøvene måles henholdsvis med og uten tilsetning av en spesifikk ATPase-hemmer (oubain), og differansen mellom disse beregnes. Ved hjelp av proteinmålinger og en standardkurve som viser sammenhengen mellom mengde ADP i vevsprøven og oksidasjonen av NADH i AM-mediet, kan enzymaktiviteten beregnes. Na^+, K^+ -ATPase-aktiviteten angis som omsetning av ADP per mg protein per time (se for øvrig appendiks).

Før analysene ble det forberedt en reaksjonsløsning (”assay mixture”) som beskrevet i vedlegg 1. Alle løsninger, gjelleprøver og mikroplater ble oppbevart på is fram til avlesning. Standardkurve for omsetting av ADP ble bestemt ved å lage standarder på henholdsvis 0, 5, 10 og 20 nmol $\text{ADP} \cdot 10 \mu\text{l}^{-1}$. Disse ble applisert på mikroplate i tre paralleller á 10 μl og tilsatt 200 μl reaksjonsløsning per brønn, og deretter straks avlest i plateleseren (Spectramax plus³⁸⁴, Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA, USA) ved 340 nm i ti minutter med intervaller på 30 sekunder. Endring i absorbans som følge av oksidasjon av NADH til NAD^+ flater raskt ut (2-3 minutter),

og ved å plote OD^1 -verdier fra siste avlesning mot konsentrasjonen av ADP, får man en negativ lineær kurve. Stigningstallet benyttes senere for å beregne den spesifikke Na^+,K^+ -ATPase-aktivitet i prøvene (se appendix).

Gjellevevsprøvene ble klargjort ved at gjellevev tilsvarende 3-4 filamenter ble brukket løs fra de enda frosne helgjellene, overført til eppendorfrør og tilsatt 100 μ l SEI-buffer og 25 μ l SEID og satt på is (se for øvrig annet avsnitt i dette kapitlet; avvik fra forsøksprotokoll). Prøvene ble øyeblikkelig homogenisert ved hjelp av en "Pellet pestle motor" (Kimble/Kontes, Vineland, NJ, USA) i ca 10 sekunder før de ble sentrifugert i kjølesentrifuge ved 3200 $\cdot g$ i to minutter. Fra homogenatet ble 4 x 10 μ l overført til mikroplate og tilsatt reaksjonsløsning, hvorav to brønner ble tilsatt en reaksjonsløsning som inneholdt oubain for å hemme Na^+,K^+ -ATPase-aktiviteten i de to brønnene. Mikroplaten ble satt i plateleseren (340 nm bølgelengde, 10 minutter avlesning, 30 sekunders intervaller, 25 °C,) og oksidasjonen av NADH ble registrert ved endring i absorbans. Oksidasjonsraten ble bestemt i Softmax Pro 5 (Molecular Devices Corp) ved å tilpasse en regresjonslinje til den lineære delen av kurven.

Proteininnholdet i prøvene ble analysert kolorimetrisk samme dag ved hjelp av et "BCA Protein Assay Reagent Kit" (Pierce, Rockford, IL, USA). Reaksjonsløsning og standarder i området 0-20 μ g protein (albumin) $\cdot 10 \mu$ l⁻¹ ble tillaget som beskrevet i appendix. For hver mikroplate som ble analysert ble det utarbeidet en egen standardkurve over sammenhengen mellom absorbans (OD) og proteininnhold i prøven for hver mikroplate som ble analysert. Homogenatet fra enzymanalysene ble applisert i triplikat til mikroplaten med 10 μ l til hver brønn og tilsatt 200 μ l reaksjonsløsning. Mikroplaten ble ristet forsiktig for hånd i ca 10 sekunder og satt til inkubering i varmeskap ved 37 °C i 60 minutter. Prøvene ble deretter satt i plateleser og absorbans ble avlest ved 540 nm bølgelengde. Utarbeiding av standardkurve og utregning av proteininnhold ble utført i Softmax Pro 5. Dersom proteininnholdet oversteg 20 μ g $\cdot 10 \mu$ l⁻¹ ble prøven fortynnet og kjørt på nytt.

¹ OD; Optical density. Verdi for mengde lys som absorberes i mediet ved en gitt bølgelengde

Avvik fra forsøksprotokoll

Fisk tatt ut av datamaterialet på grunn av kjønnsmodning

All fisk ble undersøkt for kjønnsmodningsgrad under prøveuttakene. Tidligere studier har påvist redusert sjøvannstoleranse og Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet hos kjønnsmoden fisk sammenliknet med umoden (Staurnes et al. 1994; Le François & Blier 2003), og vi valgte derfor å ta disse individene ut av datamaterialet. Til sammen dreide det seg om 22 individer, alle fra Altevannsstammen.

Lengde, vekt og kondisjonsfaktor

Kondisjonsfaktor kunne ikke beregnes for nulluttaket. Dette skyldes at lengde og vekt ikke ble registrert på samme dag (grunnet feil med vekt), slik at disse data ikke er paret for hver fisk. Gjennomsnittlig lengde og vekt er imidlertid regnet ut på vanlig måte.

Analyse av Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet

Ved prøveuttakene ble ett gjellefilament tatt ut og overført til SEI-buffer i et eppendorf-rør. Imidlertid viste det seg at prøvene inneholdt for små vevsmengder til å oppnå adekvate resultater i analysen av ATPase-aktivitet. For å få gjennomført analysen ble det derfor tatt ut gjellevev fra de frosne helgjellene som ble tatt ut ved prøveuttakene (se eget avsnitt). Da disse helgjellene ikke kunne tines på grunn av senere analyse av $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør ble det brukt av filamentvev fra disse som ble overført til eppendorf-rør og tilsatt SEI-buffer og SEID-løsning før homogenisering.

Grunnet problemer under analysene, måtte dessverre resultatene fra flere mikroplater forkastes. Dette, sammen med bortfall av kjønnsmodne individer, førte til et redusert antall observasjoner i enkelte av gruppene, blant annet hele gruppen fra nulluttaket.

Tabell 3. Viser antall observasjoner (n) som inngår i de presenterte resultater av henholdsvis plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon, $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør og Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet. Antall observasjoner er i enkelte grupper redusert da kjønnsmodne individer er tatt ut av datagrunnlaget. Problemer med analysene har også ført til at noen individer har falt ut.

Behandlingsgruppe	Nulluttak		14 dager		28 dager	
	AV	HF	AV	HF	AV	HF
Antall observasjoner i resultater; plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon						
Kontroll	8	12	11	11	9	11
Kortisol	-	-	8	11	6	11
GH	-	-	6	12	9	11
GH + kortisol	-	-	8	11	7	11
Antall observasjoner i resultater; $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør i gjellevev						
Kontroll	-	-	11	9	-	-
Kortisol	-	-	6	10	-	-
GH	-	-	6	11	-	-
GH + kortisol	-	-	8	10	-	-
Antall observasjoner i resultater; Na^+, K^+-ATPase-aktivitet						
Kontroll	0	0	10	11	10	11
Kortisol	-	-	6	11	7	11
GH	-	-	5	11	10	11
GH + kortisol	-	-	5	11	9	11

Statistiske analyser

De statistiske analysene ble utført i Statistica 6.1 (Stat Soft, Tulsa, OK, USA). Resultatene ble analysert ved hjelp av en multivariat ANOVA (General Linear Model). Med denne testen var det mulig å vurdere hvorvidt *tid* som uavhengig variabel, i tillegg til stamme og behandlingsgruppe, har hatt effekt på de avhengige variablene (henholdsvis plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon, mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør og Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet). Ved påvist effekt av behandling ble det benyttet en Tukey HSD post-hoc test for å finne eventuelle parvise, signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene. Alle data, unntatt mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør, er presentert som gjennomsnitt \pm standardfeil (SEM) i resultatene. Mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør er fremstilt som mengde i % av Hammerfest kontrollgruppe (figur 5).

Data for lengde, vekt og kondisjonsfaktor ble analysert med stamme og behandlingsgruppe som uavhengige variabler ved hjelp av en toveis ANOVA for å se om det var forskjell i størrelse og kondisjon mellom stammene og behandlingsgruppene. Ved signifikant effekt ble det utført en Tukey HSD post-hoc test.

I alle de statistiske analysene er hvert prøvetidspunkt (henholdsvis 0, 14 og 28 dager) behandlet separat for å påvise eventuelle forskjeller mellom stammer og behandlingsgrupper ved det aktuelle prøvetidspunktet. Der hvor analysene har påvist effekt av *tid* som uavhengig variabel (signifikant forskjeller mellom kontrollgruppene ved de ulike prøveuttakene), er dette presentert i resultatkapitlet.

Alle verdier for plasma osmolalitet, kloridkonsentrasjon, mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør og Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet ble logtransformert før de statistiske analysene. Dette ble gjort for å redusere eventuelle skjevfordelinger i datasettene. ATPase-data ble lagt til 2 før logtransformering for å oppnå gyldige transformeringer. Den statistiske behandlingen av mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør ble utført på absoluttverdier av målt sverting av membranen fra elektroforesen, men i presentasjonen av resultatene er verdiene regnet om i % av Hammerfest kontroll som nevnt over.

Krav til signifikans ble satt til $p \leq 0.05$ i alle testene.

Resultater

Lengde, vekt og kondisjonsfaktor

Lengde- og vektregistreringene viser at Altevannsrøya generelt var noe større og i bedre kondisjon enn fisken fra Hammerfeststammen. Samtidig var det en viss forskjell i størrelse og kondisjon også mellom enkelte behandlingsgrupper (tabell 4). Både lengde, vekt og kondisjonsfaktor ble analysert med stamme og behandlingsgruppe som uavhengige variabler. På grunn av manglende registreringer ved nulluttaket mangler data for lengde, og dermed også kondisjonsfaktor, for dette uttaket.

Analyse av lengdedata viste imidlertid at verken stamme eller behandlingsgrupper kom ut signifikant forskjellig verken ved 14- eller 28-dagersuttaket. Den generelle vektforskjellen mellom Hammerfest- og Altevannsrøya kom ut signifikant (ANOVA, $F=4.5$, $p<0.05$) ved dag 14, mens det ved dag 28 ikke ble påvist noen signifikant forskjell mellom stammene ($F=3.7$; $p<0.1$). Videre post hoc-tester avdekket imidlertid ikke parvise, signifikante forskjeller i vekt mellom behandlingsgrupper innen stammene ved 14-dagersuttaket. Kondisjonsfaktor var signifikant høyere hos Altevannsrøya sammenliknet med fisk fra Hammerfeststammen ved både 14- og 28-dagersuttaket (henholdsvis $F=38.6$; $p<0.001$ og $F=103.3$; $p<0.001$). Også mellom behandlingsgrupper ble det funnet signifikante forskjeller i kondisjonsfaktor (Tuckey HSD, $p<0.05$), men ingen behandlingsgrupper innen samme stamme kom forskjellig ut. Med andre ord kom behandlingsgruppene kun ut forskjellig sammenliknet med enkelte behandlingsgrupper av den andre stammen.

Tabell 4. Vekt og kondisjon hos ulike stammer og behandlingsgrupper. Data er presentert som gjennomsnittsverdier \pm SEM. K-faktor er ikke beregnet for kontroll-/nulluttak på grunn av manglende lengderegistreringer.

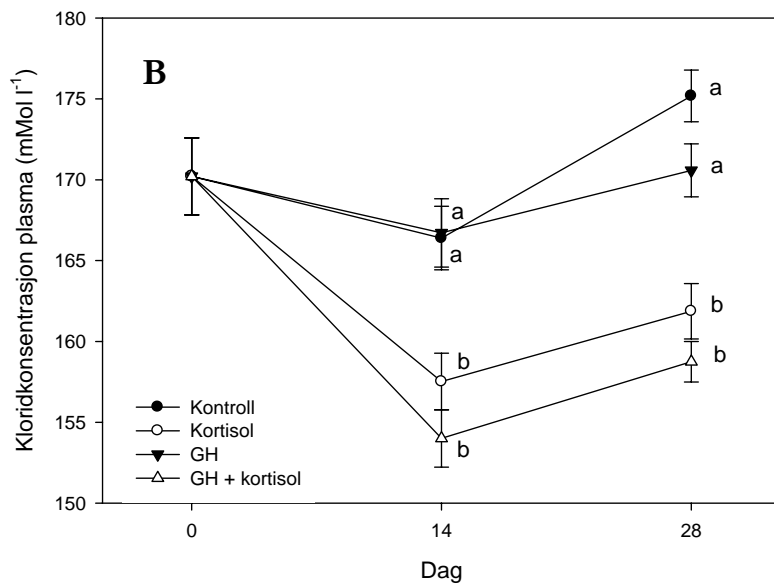
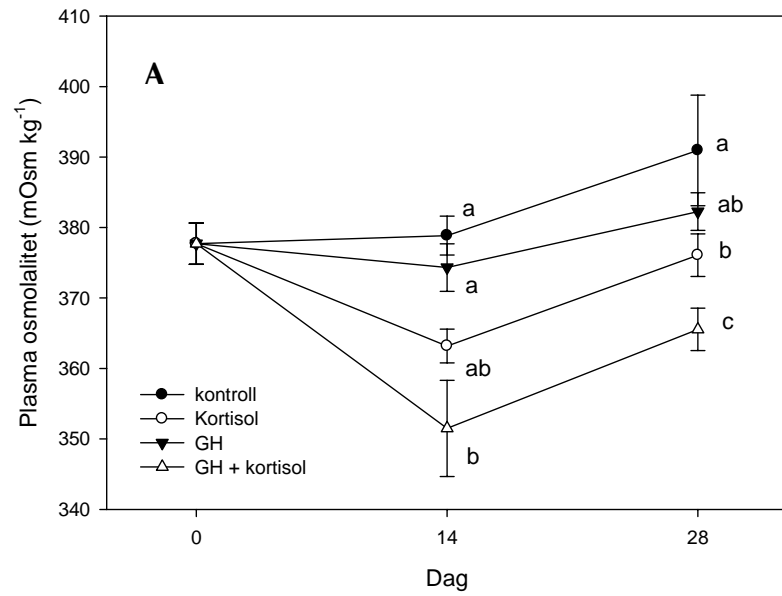
Stamme/behandling	Nulluttak		14 dager		28 dager	
	Vekt (g)	K-faktor	Vekt (g)	K-faktor	Vekt (g)	K-faktor
<i>Altevannsstamme</i>						
Kontroll	126.0 \pm 9.2	-	159.3 \pm 21.7	0.97 \pm 0.03	147.9 \pm 16.9	0.99 \pm 0.04
Kortisol	-	-	159.8 \pm 21.5	0.96 \pm 0.03	132.7 \pm 22.3	0.93 \pm 0.04
GH	-	-	129.0 \pm 17.7	0.97 \pm 0.04	164.7 \pm 17.5	1.03 \pm 0.03
GH + kortisol	-	-	155.8 \pm 16.3	0.99 \pm 0.06	145.4 \pm 21.9	0.95 \pm 0.04
<i>Hammerfeststamme</i>						
Kontroll	112.1 \pm 9.3	-	139.9 \pm 12.2	0.88 \pm 0.02	121.7 \pm 5.6	0.85 \pm 0.01
Kortisol	-	-	123.9 \pm 9.3	0.83 \pm 0.02	119.2 \pm 3.8	0.79 \pm 0.01
GH	-	-	114.7 \pm 5.8	0.84 \pm 0.01	131.1 \pm 8.4	0.83 \pm 0.01
GH + kortisol	-	-	123.7 \pm 9.3	0.84 \pm 0.02	128.4 \pm 13.1	0.79 \pm 0.01

Plasma klorid og osmolalitet etter sjøvannstest

Hammerfeststamme

Resultatene fra ANOVA-analysene bekreftet at hormonbehandling hadde hatt en signifikant effekt på plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon etter sjøvannstest både ved dag 14 og dag 28 (F-verdier i området 7.3-24; $p < 0.001$ i alle analysene). Sjøvannstestene viste at hormonbehandling med GH + kortisol gav en signifikant forbedret hypoosmoregulatorisk kapasitet sammenliknet med kontrollgruppen (Figur 2). Både plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon etter sjøvannstestene var signifikant lavere etter behandling med GH + kortisol sammenliknet med kontrollgruppene (Tuckey HSD, $p < 0.01$), og dette gjelder både for 14- og 28-dagersuttaket. Også behandling med kortisol alene har gitt en signifikant forbedring av sjøvannstoleranse (Tuckey HSD, $p < 0.05$), med unntak av plasma osmolalitet ved dag 14. Behandling med GH alene hadde ingen signifikant effekt på hypoosmoregulatorisk evne hos røye fra Hammerfeststammen (figur 2).

Variansanalysene viser imidlertid at også tid som uavhengig variabel har influert resultatene for den anadrome Hammerfestrøya. Med andre ord har kontrollfiskens toleranse overfor sjøvannstestene variert gjennom forsøket. Det har vært en signifikant økning i både plasma osmolalitet ($F=7.0$; $p < 0.01$) og kloridkonsentrasjon ($F=4.4$; $p < 0.05$) i kontrollgruppen etter sjøvannstestene gjennom forsøket.



Figur 2: Plasma osmolalitet (A) og kloridkonsentrasjon (B) hos Hammerfestroye (gjennomsnitt \pm SEM) etter sjøvannstest ved dag 0, 14 og 28 etter hormonimplantering. Signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene ved et gitt tidspunkt er angitt med ulike bokstaver.

Altevannsstamme

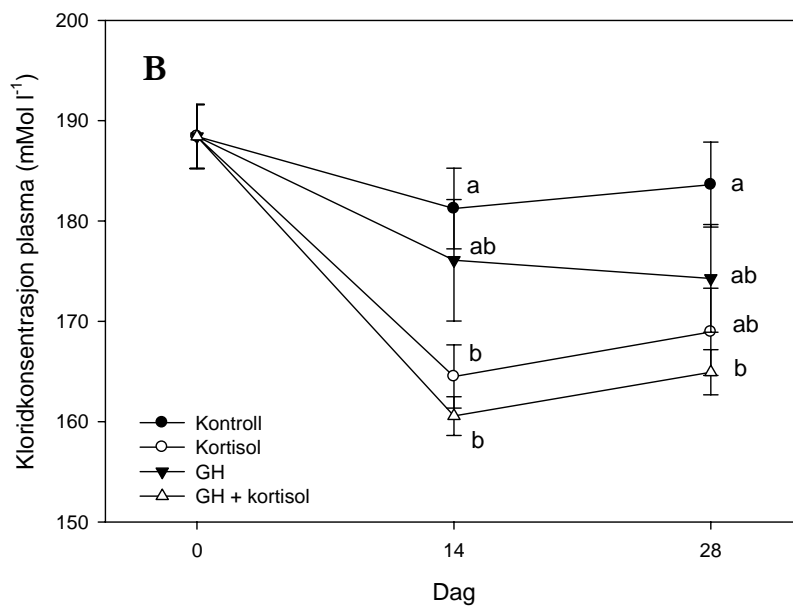
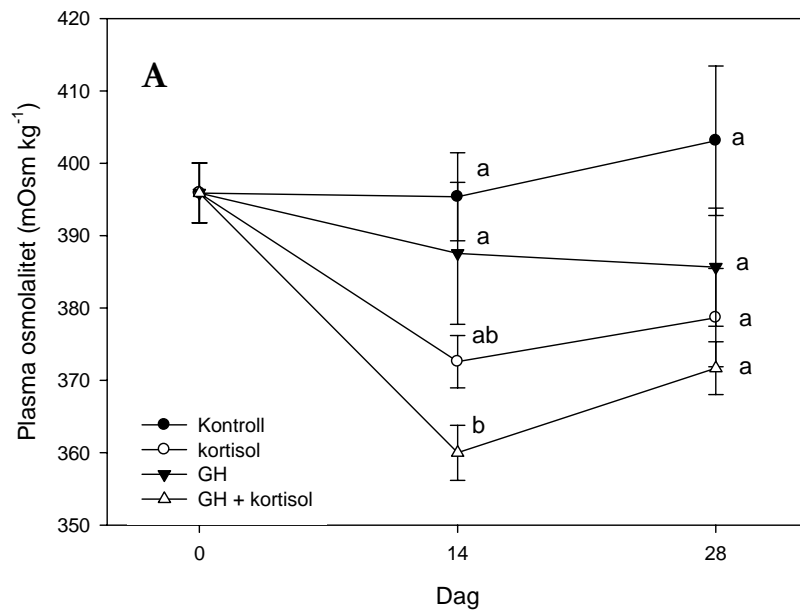
Også den ikke-anadrome Altevannsroya har respondert på hormonbehandlingen og utviklet en forbedret hypoosmoregulatorisk kapasitet (figur 3). Altevannsroya viser den samme tendensen med hensyn til plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon etter sjøvannstestene som Hammerfestroya. Sammenliknet med fisk fra Hammerfeststammen har imidlertid Altevannsroya en noe dårligere sjøvannstoleranse enn den anadrome Hammerfestroya, både før og etter hormonimplantering.

De statistiske analysene viser at hormonbehandlingen har hatt en signifikant generell effekt (ANOVA) på sjøvannstoleranse ved dag 14, både målt som plasma osmolalitet ($F=8.0$; $p<0.001$) og kloridkonsentrasjon ($F=7.1$; $p<0.01$) etter sjøvannstest. Post hoc-testene avdekket at behandlingsgruppen GH + kortisol hadde en signifikant forbedret sjøvannstoleranse sammenliknet med kontrollgruppa ved dag 14 ($p<0.01$).

Etter 28 dager kunne vi påvise effekt av behandling kun målt som plasma kloridkonsentrasjon ($F=3.4$, $p<0.05$). I den påfølgende post-hoc testen kom behandlingsgruppen GH + kortisol ut signifikant forskjellig fra kontrollgruppen ved dette uttaket ($p<0.05$). ANOVA av plasma osmolalitet kom ikke signifikant ut ($F=2.8$; $p=0.06$).

Også hos Altevannsroya er det behandlingsgruppa GH + kortisol som viser best toleranse overfor sjøvannstesten, men også fisken behandlet med kun kortisol antyder en forbedret toleranse. I kortisolgruppa finner vi imidlertid kun en signifikant forskjell målt som plasma kloridkonsentrasjon ved dag 14 (Tukey HSD, $p<0.05$). Som hos Hammerfestroya ble det ikke observert signifikante effekter av implantering av GH alene, men både plasma osmolalitet og klorid konsentrasjon var konsistent lavere hos GH-behandlet fisk sammenliknet med "sham"-behandlet kontrollfisk.

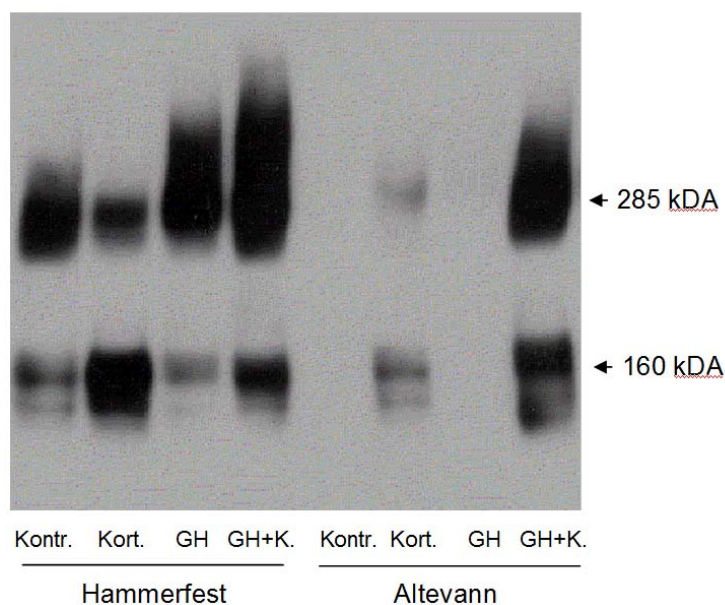
I motsetning til hos Hammerfestroya har det ikke vært signifikante endringer i plasma kloridkonsentrasjon eller osmolalitet hos kontrollgruppene etter sjøvannstest i løpet av forsøket.



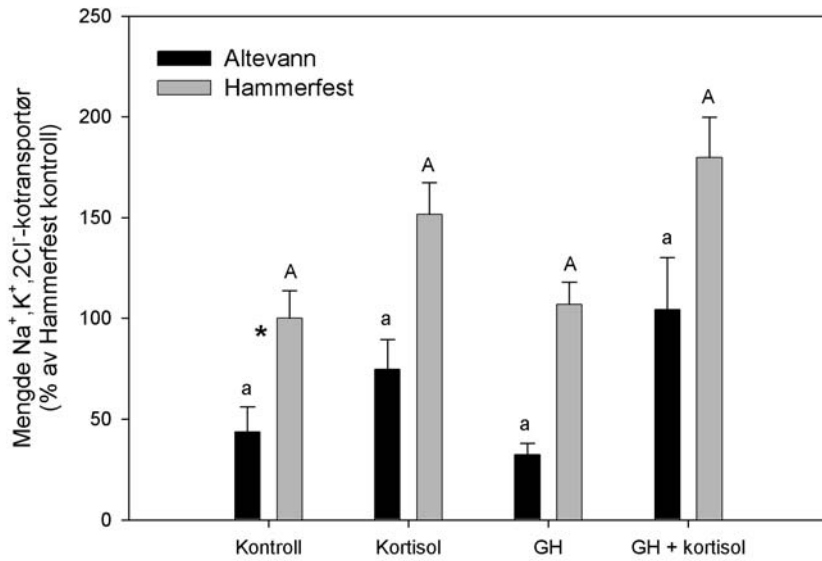
Figur 3: Plasma osmolalitet (A) og kloridkonsentrasjon (B) hos Altevannsrøye (gjennomsnitt \pm SEM) etter sjøvannstest ved dag 0, 14 og 28 etter hormonimplantering. Signifikante forskjeller mellom behandlingsgruppene ved et gitt tidspunkt er angitt med ulike bokstaver.

Na⁺,K⁺,2Cl⁻ kotransportør i gjellevev

Western blot av gjellevev fra røye avdekket immunoreaktive band ved henholdsvis 160 og 285 kDA (figur 4). De statistiske analysene (ANOVA) avdekket en signifikant effekt av både stamme (F= 35.6; p<0.001) og behandling (F=4,5; p<0.01). Ut fra resultatene (figur 4 og 5) kan det synes som om kortisol har ført til en økning i antall kotransportører hos begge stammene, og at denne effekten har blitt forsterket når kortisol har vært administrert sammen med GH. På tross av at svertingen av immunoreaktive band hos enkeltfisk antydte store forskjeller mellom behandlingsgruppene i antall kotransportører (figur 4), ble det ikke påvist signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innenfor hver enkelt stamme ved statistiske analyser (Tuckey HSD) av det samlede materialet (figur 5). Na⁺,K⁺,2Cl⁻ kotransportør er kun analysert for uttaket 14 dager etter hormonimplantering.



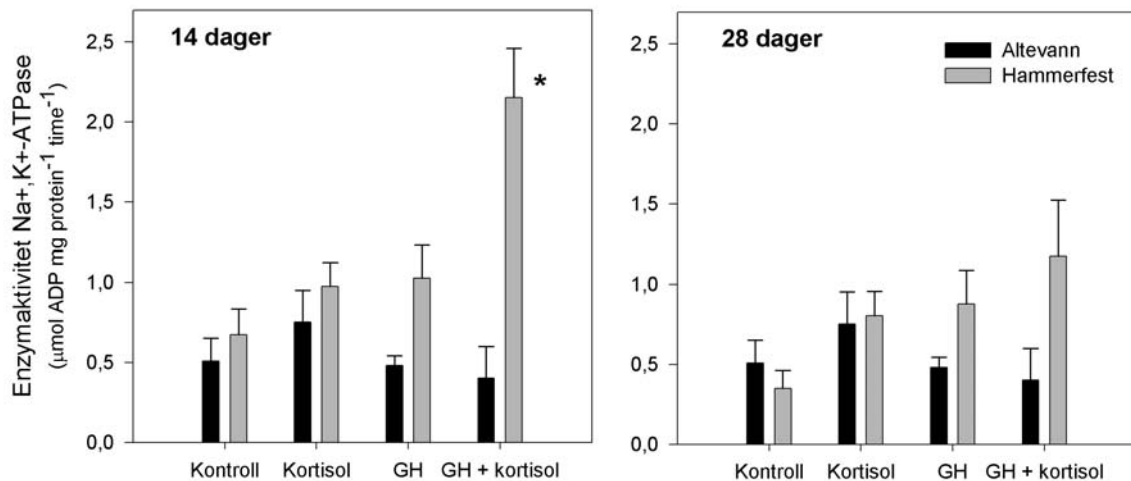
Figur 4: Representativt western blot av gjelle Na⁺,K⁺,2Cl⁻ kotransportør fra åtte individer av henholdsvis Hammerfeststamme og Altevannsstamme 14 dager etter hormonimplantering. Immunoreaktive band ble funnet ved 160 og 285 kDA. (Kontr = kontrollgruppe/"sham"; Kort = kortisol, GH = veksthormon; GH+K = Veksthormon + kortisol administrert samtidig)



Figur 5. Mengde $\text{Na}^+, \text{K}^+, 2\text{Cl}^-$ kotransportør hos ubehandlet (kontroll) og hormonbehandlet røye fra Altevanns- og Hammerfeststamme 14 dager etter implantering av henholdsvis kortisol, GH og GH + kortisol. Det er ikke påvist signifikante forskjeller mellom behandlingsgrupper innen samme stamme. Mengde kotransportør er signifikant lavere i kontrollgruppen hos Altevannsstammen sammenliknet med kontrollgruppen hos Hammerfeststammen (markert med *). Resultatene er presentert som gjennomsnittlig mengde i % av mengde kotransportør hos Hammerfest kontroll \pm SEM. De statistiske analysene er utført på absoluttverdier før omregning til % av Hammerfest kontroll.

Na⁺,K⁺-ATPase-aktivitet i gjellevev

Resultatene fra ATPase-analysene er presentert i figur 6. Den statistiske behandlingen påviste en generell forskjell (ANOVA) både mellom de to stammene ($F=20,2$; $p<0.001$) og mellom behandlingsgruppene ($F=2.8$, $p<0.05$) ved 14-dagersuttaket, mens det etter 28 dager kun ble påvist forskjeller mellom behandlingsgruppene ($F=3.3$; $p<0.05$). I post hoc-testene kom Hammerfestrøya som hadde fått implantert GH + kortisol signifikant forskjellig ut fra alle andre behandlingsgrupper ved dag 14, med en signifikant høyere enzymaktivitet enn alle de andre gruppene. De parvise sammenlikningene (Tuckey HSD) ved dag 28 påviste ingen signifikante forskjeller, men hos Hammerfestrøya så man en trend mot en økt ATPase-aktivitet i behandlingsgruppen GH + kortisol sammenliknet med kontrollgruppen ($p=0.09$).



Figur 6: Na⁺,K⁺-ATPase aktivitet i gjelleprøver henholdsvis 14 og 28 dager etter hormonimplantering. Kun Hammerfestrøye behandlet med GH + kortisol hadde en signifikant forhøyet ATPase-aktivitet 14 dager etter implantering (markert med *).

Diskusjon

Det er i dag klart at anadrom røye gjennomgår en parr-smolt transformasjon som tilsvarer den vi finner hos andre laksefisk (Klemetsen et al. 2003; Jørgensen et al. 2007), og en rekke studier har etter hvert vist at anadrom røye utvikler en gradvis forbedring av sjøvannstoleranse før næringsutvandringen til sjøen om våren (f. eks. Finstad et al. 1989; Arnesen et al. 1992; Halvorsen et al. 1993; Aas-Hansen et al. 2005). Denne parr-smolt transformasjonen er endokrint igangsatt ved økende daglengde om våren, og regnes for å være en *preadaptiv* tilpassing slik at fisken settes i stand til å leve og vokse godt i sjøen (Boeuf 1993).

Våre resultater viser at den anadrome røya (Hammerfeststammen) utvikler sjøvannstoleranse ved administrasjon av kortisol, og at denne effekten forsterkes når kortisol tilføres sammen med GH. Disse observasjonene er i samsvar med tidligere implanteringsstudier på røye (Øyvind Aas-Hansen, Fiskeriforskning AS, upubliserte data) og andre laksefisk (f. eks. Madsen 1990; Boeuf et al. 1994), og harmonerer ellers med den generelle kunnskapen man har om den endokrine reguleringen av smoltifisering hos laksefisk (Hoar 1988; Clarke & Hirano 1995). GH og kortisol er hormoner nært assosiert med utviklingen av sjøvannstoleranse under parr-smolt transformasjonen, og tilsvarende effekter av disse to hormonene er også funnet under sjøvannstilpassingen hos euryhaline arter (Sakamoto & McCormick 2006).

Implantering av GH stimulerer både størrelse på, og antall kloridceller i gjellene, og gir en økning i Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet i gjellevev hos laksefisk (f. eks. Sakamoto et al. 1993; McCormick 2001; Sakamoto et al. 2001). Kortisol har vært vist å stimulere Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet, og antas å ha en cytotogen effekt på utvikling og differensiering av kloridceller i gjellene (Evans et al. 2005). Forsøk på blant annet atlantisk laks de siste årene viser også at både GH og kortisol gir en oppregulering av antall $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ kotransportører i sjøvannskloridcellene (Pelis & McCormick 2001; Pelis et al. 2001).

GH og kortisol har en synergistisk effekt i forhold til utvikling av sjøvannstoleranse, dannelselse og differensiering av sjøvanns kloridceller, Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet og mengde $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ kotransportør (Madsen 1990; McCormick 2001). Tidligere studier har vist at implantering av GH gir en oppregulering av kortisolreseptorene i gjellene (Shrimpton et al. 1995; Shrimpton & McCormick 1998a), og det er videre påvist en klar sammenheng mellom tetthet av kortisolreseptorer i gjellene, og effekten av kortisol på stimulering av Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet

(Shrimpton & McCormick 1999). En sannsynlig forklaring på den synergistiske interaksjonen mellom GH og kortisol kan derfor være at GH stimulerer generell celledeling, med et økt antall stamceller i gjellene som kan påvirkes av kortisol som resultat, samtidig som reseptortetthet og sensitivitet for kortisol øker (McCormick 2001). Denne modellen er konsistent med tidligere studier av utvikling i plasmakonsentrasjoner av GH og kortisol, samt Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet hos anadrom røye (Aas-Hansen et al. 2005; Jørgensen et al. 2007). Hos den ville, veteranmigranten studert i arbeidet av Aas-Hansen et al. (2005) var plasmanivået av GH høyt i begynnelsen av april, omtrent to måneder før utvandring til sjø fant sted, mens plasmanivået av kortisol økte i den påfølgende fase frem til utvandring. I det andre arbeidet med oppdrettet røye (Jørgensen et al. 2007) ble det vist at nivået av GH i plasma økte i april og holdt seg høyt gjennom hele parr-smolt transformeringen, mens plasma kortisol økte kraftig i løpet av de siste tre ukene av denne prosessen. Økningen i plasma kortisol var tett fulgt av en markert økning i gjellens Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet. Disse resultatene støtter den skisserte modellen hvor GH stimulerer prolifering og rekruttering av stamceller, hvorpå den påfølgende økningen i plasma kortisol stimulerer differensieringen av stamcellene til en kloridcelle av sjøvannstypen, samt Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet i disse cellene.

GH og kortisol er vist å spille en viktig rolle også i stimulering av sjøvannstoleranse og utvikling av et hypoosmoregulatorisk apparat også hos en rekke euryhaline arter i tillegg til laksefisk (Mancera & McCormick 1998; McCormick 2001). I en nylig review av Sakamoto og McCormick (2006) foreslås det at den endokrine reguleringen av det osmoregulatoriske apparatet i stor grad skjer gjennom en koordinert kontroll av prolifering, differensiering og apoptose i gjellepitelet (se også McCormick 2001). Det er vist at enkelte kloridceller av ferskvannstypen kan endre morfologi og omdannes til en kloridcelle av sjøvannstypen ved overføring av ål (*Anguilla japonica*) til sjøvann (Wong & Chan 1999). Samtidig degenereres noen av ferskvannscellene og det dannes nye kloridceller av sjøvannstype gjennom rekruttering og differensiering av stamceller (*op. cit.*). I en liknende studie av kloridceller i plommesekkmembran hos yngel av tilapia (*Oreochromis mossambicus*) er det påvist en tilsvarende plastisitet i morfologi hos denne celletypen (Hiroi et al. 1999). Overføring til sjøvann førte til at de fleste kloridcellene endret karakter til en sjøvanns kloridcelle som ble omgitt av nydannede støtteceller (Hiroi et al. 1999). Tilsvarende studier har så langt vi kjenner til ikke vært gjennomført på laksefisk, men det hadde vært interessant å få avdekket hvorvidt de enkelte kloridcellene oppviser en tilsvarende plastisitet også hos laksefisk under parr-smolt transformasjonen.

Nytt i denne studien er at vi har vist at også ikke-anadrom, ”landlocked” røye utvikler en forbedret hypoosmoregulatorisk kapasitet gjennom administrasjon av GH og kortisol, og så langt vi kjenner til har det ikke vært gjennomført tilsvarende implanteringsstudier på ikke-anadrome stammer av røye (eller andre laksefisk) tidligere. Det er heller ikke kjent at denne typen forsøk har vært gjort på andre arter av stenohalin ferskvannsfisk. Resultatene i mitt studium viser at Altevannsrøya responderer på en endokrin stimulering relevant for parr-smolt transformasjon, og vi har observert en signifikant effekt av implantering av kortisol + GH (samtidig) i forhold til plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjon etter sjøvannstest. Også kortisol administrert alene synes å ha gitt en forbedret sjøvannstoleranse, men denne effekten er i motsetning til hos Hammerfeststammen ikke statistisk signifikant hos Altevannsrøya. Sammenlikner man plasma osmolalitet og kloridkonsentrasjoner etter sjøvannstestene hos Hammerfest- (figur 2) og Altevannsrøye (figur 3), ser vi at hormonimplanteringene har hatt en tilnærmet lik effekt i de respektive behandlingsgruppene hos begge stammene med hensyn til forbedringen av den hypoosmoregulatoriske evnen. Hammerfestrøya har generelt bedre sjøvannstoleranse enn Altevannsrøya, både før og etter hormonbehandling, og har ved alle målinger lavere nivåer av elektrolytter i plasma etter sjøvannstest når man sammenlikner de respektive behandlingsgruppene.

Det samme mønsteret ser man også igjen når man studerer utviklingen i kotransportør tetthet etter hormonimplantering (figur 5). Økt sjøvannstoleranse gjennom utvikling og differensiering av kloridceller involverer blant annet en oppregulering av $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ kotransportør og $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ i kloridcella (McCormick 2001; Evans et al. 2005). Resultatene viser at Hammerfestrøya har en større kotransportør tetthet i gjellevevet enn Altevannsrøya hos alle behandlingsgruppene. På tross av et tydelig mønster og en utvikling i mengde $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ kotransportør som også er i tråd med forbedringen i sjøvannstoleranse, ble det kun funnet en signifikant, generell effekt av hormonbehandling og stamme. Det kunne ikke påvises signifikante parvise forskjeller mellom behandlingsgruppene innad i stammene.

På tross av at hormonbehandlingene har hatt en klar effekt på sjøvannstoleransen hos begge stammene, har vi ikke funnet tilsvarende, klare effekter på $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ -aktivitet (figur 6). Sett i lys av den signifikant forbedrede sjøvannstoleransen hos begge stammene, hadde vi forventet en mer markert og tydelig økning også i $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ -aktivitet. Årsaken til at dette ikke ble funnet er usikker, men kan muligens skyldes avvik fra analyseprotokollen som beskrevet tidligere (se material og metode; avvik fra forsøksprotokoll). $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATPase}$ -analysene i denne studien

har vært preget av stor variabilitet og lite konsistente resultater, noe vi antar i alle fall delvis kan tilskrives det modifiserte og ikke ensartede vevsuttaket fra helgjelleprøvene. Imidlertid har man også i enkelte tidligere studier manglet en klar sammenheng mellom endringer i sjøvannstoleranse og utvikling av Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet, og Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet er heller ikke nødvendigvis et tilfredsstillende mål på smoltifiseringsstatus alene (Boeuf 1993). For eksempel viste Richman og Zaugg (1987) at implantering av henholdsvis kortisol og GH hos stillehavslaks (*Oncorhynchus kisutch*) gav en signifikant økning i Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet, men uten dette hadde effekt på Na^+ -konsentrasjonen i plasma etter sjøvannstest. Tilsvarende observerte Johnsen og kolleger (2000) en forbedret sjøvannstoleranse hos en gruppe Hammerfestrøye uten at man kunne finne en tilsvarende økning i Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet. Disse resultatene er imidlertid ikke konsistente med andre rapporterte, sammenliknbare studier, og står dessuten i kontrast til den etablerte modellen av gjellens osmoreguleringsapparat i sjøvann (McCormick 2001; Evans et al. 2005). I henhold til denne modellen er ionefluxen ut over den apikale membranen i sjøvannskloridcella avhengig av de elektrokjemiske gradientene som skapes og opprettholdes av aktiviteten i ionepumpen Na^+, K^+ -ATPase (Evans et al. 2005; Marshall & Grosell 2006).

Tidligere studier av sjøvannstoleranse hos ikke-anadrom røye har rapportert en viss forbedring i sjøvannstoleranse om våren (Schmitz 1992; Staurnes et al. 1992; Schmitz 1995). Imidlertid har forbedringen i sjøvannstoleranse vært begrenset sammenliknet med anadrome populasjoner, og studiene har vist at disse stammene ikke har kapasitet til å opprettholde vann- og elektrolytt-homeostase på en adekvat måte i sjøvann (Staurnes et al. 1992; Schmitz 1995; Eliassen et al. 1998). I en sammenlikning av hypoosmoregulatorisk kapasitet mellom Hammerfeststammen og en ikke-anadrom, isolert røyebestand fra Skjomen i Nordland, observerte man en økning i antall kloridceller og Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet typisk for parr-smolt transformasjonen i begge stammene (Eliassen et al. 1998). De fysiologiske responsene hos den ikke-anadrome stammen fra Skjomen var imidlertid betydelig mindre markert enn hos Hammerfestrøya. Den ikke-anadrome stammen tålte i motsetning til Hammerfeststammen ikke overføring til sjøvann, og man observerte en massiv dødelighet hos Skjomenrøya etter overføringen til sjøvann (*op. cit.*). På tilsvarende måte sammenliknet Nilsen og kolleger (2003) smoltutvikling og sjøvannstoleranse hos henholdsvis en anadrom og en ikke-anadrom, ”landlocked” stamme av atlantisk laks (*S. salar*). På tross av en gradvis forbedring av hypoosmoregulatorisk kapasitet fram til mai/juni, hadde ikke fisken kapasitet til å overleve et lengre opphold i sjøvann, og sammenliknet med den anadrome stammen oppnådde disse individene en maksimal Na^+, K^+ -ATPase gjelleaktivitet på bare 50% av de observerte verdiene hos individene i den anadrome stammen (Nilsen et al. 2003).

Parr-smolt transformasjonen involverer en årlig oppbygging av et hypoosmoregulatorisk apparat, men for en ikke-anadrome røyebestand vil imidlertid utviklingen av sjøvannspreferanse og hypoosmoregulatorisk kapasitet representere en mistilpassing i forhold til miljøet den lever i. Det er observert en betydelig økning i metabolsk aktivitet under smoltifiseringen, noe som tyder på at parr-smolt transformasjonen er energetisk kostnadskreven (Maxime et al. 1989; Leonard & McCormick 2001). Disse observasjonene må imidlertid ses i sammenheng med den generelle, stimulerende effekten kortisol og GH har på energiomsetningen (Boeuf 1993), sannsynligvis som en preadaptiv tilpassing til et pelagisk levesett og et generelt høyere aktivitetsnivå (Leonard & McCormick 2001). En nedregulering av disse prosessene vil i så måte antakelig være gunstig for overlevelsessevnen i et marginalt miljø, og over tid er det sannsynlig at disse responsene vil reduseres i omfang. Vi har i denne studien ønsket å få avdekket om den reduserte sjøvannstoleransen man har observert hos ikke-anadrome røyestammer skyldes mangel på et adekvat, endokrint input, eller hvorvidt dette skyldes en generelt nedregulert evne til å respondere på de endokrine signalene som igangsetter parr-smolt transformasjonen og utvikling av hypoosmoregulatorisk evne.

Denne studien bekrefter at den ikke-anadrome Altevannsrøya responderer på endokrine stimuli assosiert med parr-smolt transformasjonen. Dette antyder at den relativt sett reduserte forbedringen av sjøvannstoleranse observert hos ikke-anadrom røye kan henge sammen med en mangelfull endokrin igangsetting av prosesser involvert i parr-smolt transformasjonen. Det faktum at Altevannsrøya og Hammerfestrøya relativt sett responderer tilnærmet likt på den samme hormonbehandlingen, kan legges til grunn for en antagelse om at ikke-anadrom røye har en ikke tilstrekkelig stimulering av det vi kjenner som parr-smolt transformasjonen, og dermed kun utvikler en mangelfull hypoosmoregulatorisk evne om våren sammenliknet med sjøvandrende røye.

Imidlertid ser vi at Altevannsrøya generelt har en noe dårligere sjøvannstoleranse enn Hammerfestrøya, både ved forsøksstart og etter hormonbehandling. Hva som ligger til grunn for dette, og hvorfor Altevannsrøya ikke utvikler en like god sjøvannstoleranse som Hammerfestrøya etter den samme hormonbehandlingen, er ikke mulig å svare på ut fra denne studien. Det er mulig at en mangelfull utvikling av sjøvannstoleranse hos ikke-anadrom røye kan skyldes en nedregulert sensitivitet for GH og kortisol i gjellene, for eksempel gjennom redusert reseptortilgjengelighet eller –affinitet, og dermed en nedsatt utvikling av strukturer og

enzymapparat assosiert med etableringen av et hypoosmoregulatorisk apparat. Man kan også spekulere i om en eventuell nedregulering av denne responsen kan finne sted nedstrøms i signalkjeden, for eksempel i aktivering av respektive ”second messengers” eller reseptortetthet og -affinitet i cellens nukleus, uten at vi har grunnlag for å vurdere dette mer inngående. Det er heller ikke, så vidt meg bekjent, andre studier hvor dette har blitt undersøkt.

Studier av ”stunted” smolt hos stillehavslaks (*O. kisutch*) har vist at disse individene har en redusert binding av GH til reseptorer i lever og gjellevev sammenliknet med adekvat sjøvannstilpasset smolt (Fryer & Bern 1979; Gray et al. 1992). Det er påvist svært høye plasmakonsentrasjoner av GH hos ”stunted” smolt både hos stillehavslaks (Bolton et al. 1987; Varnavsky et al. 1992) og atlantisk laks (Björnsson et al. 1988), og det antas at den økte plasmakonsentrasjonen skyldes redusert feedback mediert via IGF-I fra lever som følge av manglende GH-reseptor binding (Björnsson 1997). Selv om ”stunting” som fenomen først og fremst er relatert til et lavt næringsinntak, involverer dette uansett en mulig sammenheng mellom nedsatt sensitivitet for GH og en mangelfull parr-smolt transformasjon. I den tidligere diskuterte studien av sjøvannstoleranse hos ikke-anadrom røye fra Skjomen i Nordland (Eliassen et al. 1998), viste det seg at Skjomenrøya hadde et høyere plasmanivå av GH enn det man fant hos den godt sjøvannstilpassede Hammerfestrøya (Helge K. Johnsen, Norges fiskerihøgskole, pers. kom.). Selv om man skal være forsiktig med å trekke en slik sammenlikning for langt, er det ikke utenkelig at redusert reseptortilgjengelighet eller affinitet for GH kan spille en rolle i forhold til manglende hypoosmoregulatorisk kapasitet hos ikke-anadrom røye under naturlige forhold. På den annen side rimer en slik konklusjon dårlig med det faktum at hormonbehandlingen gav en like sterk respons på hypoosmoregulatorisk evne hos Altevannsrøya som hos Hammerfestrøya i mitt studium. På den annen side kan det ikke utelukkes at plasmanivåene av kortisol og veksthormon etter implantering har vært så høye at dette har kompensert for redusert reseptortilgjengelighet.

For laksefisk er det kjent at alder, og særlig størrelse har betydning i forhold til sjøvannstoleranse, muligens på grunn av et mer fordelaktig forhold mellom kroppsmasse og overflate hos større fisk (Hoar 1988; Clarke & Hirano 1995), og det er vist at størrelse har betydning for sjøvannstoleransen også hos røye (Arnesen et al. 1992; Nilssen & Gulseth 1998). I denne studien var fisken fra Altevannsstammen både større og i bedre kondisjon enn Hammerfestrøya. Alt annet likt, skulle man derfor anta at Altevannsrøya skulle oppvise en forbedret sjøvannstoleranse sammenliknet med Hammerfeststammen.

Totalt 22 av 100 fisk av Altevannsstammen ble klassifisert som kjønnsmodne ved prøveuttakene og dermed tatt ut av datamaterialet. Kjønnsmodning hos laksefisk er generelt assosiert med en redusert sjøvannstoleranse (Clarke & Hirano 1995), og studier har påvist en redusert hypoosmoregulatorisk kapasitet og Na^+, K^+ -ATPase-aktivitet også hos kjønnsmoden røye (Staurnes et al. 1994; Le François & Blier 2003). Implanteringsstudier på røye har også vist en redusert sjøvannstoleranse etter administrering av androgener assosiert med kjønnsmodning hos laksefisk (Schmitz & Mayer 1993). Det ble ikke funnet kjønnsmodne individer hos Hammerfeststammen. Altevannsrøya (4-5 år) var eldre enn Hammerfestrøya (2 år), og i noe bedre kondisjon (tabell 4) sammenliknet med sistnevnte. Altevannsrøya hadde vært holdt under kontinuerlig lys og ved høy temperatur siden den ble fanget inn i mai 2005 og fram til den ble overført til Havbruksstasjonen i desember samme år, og hadde vokst betydelig i denne perioden (se også materiale og metode). Det er i så måte ikke uventet at vi fant noen kjønnsmodne individer i denne gruppen, men vi regner ikke med at dette har påvirket resultatene i særlig grad siden de kjønnsmodne individene er tatt ut av datamaterialet. Etter overføring til Havbruksstasjonen ble fisken satt under kort dags lysbetingelse (L:D 8:16), og fisken fikk dermed et ”vintersignal” i åtte uker før behandlingen ble igangsatt. Det kan imidlertid spekuleres i hvorvidt dette kan ha hatt innflytelse på Altevannsrøyas endogene rytmer på en slik måte at dette har påvirket responsen på hormonimplantering i en annen retning enn hos Hammerfestrøya. Shrimpton og McCormick (1998b) har vist at både reseptorkonsentrasjon og reseptoraffinitet for kortisol i gjellene hos parr og smolt av atlantisk laks varier i løpet av året. I denne studien observerte man en kraftig økning i antall kortisolreseptorer og reseptoraffinitet fra oktober til april hos både parr og smolt, før nivåene igjen falt i mai (*op. cit.*). Dersom disse resultatene er overførbare til røye er det mulig at sesongmessige endringer i sensitivitet har påvirket resultatene i mitt studium. Ideelt sett hadde det vært ønskelig at all fisk i forsøket hadde hatt en lik forhistorie, men dette var ikke mulig å få til.

Vi kjenner ikke til at det er gjennomført studier på utvikling i plasmanivå av GH og kortisol hos ikke-anadrom røye om våren, men det ville vært interessant å sammenlikne hormonnkonsentrasjoner av for eksempel TH, GH og kortisol hos henholdsvis anadrom og ikke-anadrom røye i forkant av og under parr-smolt transformasjonen. I en nylig studie (Jørgensen et al. 2007) er det vist at anadrom røye ved simulert, naturlig fotoperiode har en utvikling i plasma GH og kortisol som er konsistent med det vi finner hos atlantisk laks (Hoar 1988) og stillehavslaks (Clarke & Hirano 1995). Som en naturlig forlengelse av disse forsøkene hadde det

derfor vært ønskelig å gjennomføre tilsvarende studier av hormonprofilene også hos ikke-anadrom røye for å finne ut om den har hormonendringer om våren som stimulerer sjøvannstoleranse. Det hadde vært fordelaktig om en slik studie også hadde omfattet reseptorer for GH/IGF-I og kortisol i gjellene, slik at en eventuell nedregulering på reseptornivå kan avdekkes. Vi antar dette kunne gitt et viktig bidrag til forståelsen av hvilke mekanismer som ligger bak Altevannsrøyas relativt sett dårligere sjøvannstoleranse sammenliknet med Hammerfestrøya.

Det ville også være interessant å få gjennomført en tilsvarende studie på en rent stenohalin ferskvannsfisk. Selv om Altevannsrøya har vært isolert fra sjøen i flere tusen år, antas det at vassdraget ble befolket fra vest av en anadrom røye etter siste istid (Klemetsen 1984), og resultatene fra mitt studium kan i så måte ikke generaliseres til også å gjelde ”ekte” ferskvannsfisk. Med bakgrunn i resultatene fra denne studien, kombinert med den rapporterte plastisiteten i kloridcellenes morfologi og funksjon, kan det antas at også stenohalin ferskvannsfisk kan utvikle deler av et hypoosmoregulatorisk reguleringsapparat gitt et adekvat regulatorisk stimuli.

Konklusjon

Oppsummert viser denne studien at kortisol stimulerer hypoosmoregulatorisk kapasitet hos både den anadrome Hammerfeststammen og den ikke-anadrome Altevannsrøya. Administrering av GH og kortisol samtidig viser at de to hormonene har en synergistisk effekt i forhold til utviklingen av sjøvannstoleranse hos begge stammene. Hammerfestrøya viser imidlertid en generelt bedre sjøvannstoleranse enn den ikke-anadrome Altevannsrøya, både før og etter hormonimplantering. Studiet gir ikke noe svar på hvorfor den ikke-anadrome Altevannsrøya hypoosmoregulerer dårligere enn den anadrome Hammerfestrøya. Studiet gir heller ikke svar på om den positive, synergistiske effekten av GH og kortisol på hypoosmoregulatorisk evne hos Altevannsrøye reflekterer at den sannsynligvis er en vestlig innvandrer av anadrom røye, eller hvorvidt dette viser at også stenohalin ferskvannsfisk har evnen til å utvikle sjøvannstoleranse, gitt et adekvat regulatorisk stimuli.

Referanser

- Aas-Hansen, Ø. (2004). Smoltification in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*: regulatory mechanisms and integrated effects of nutritional status and PCBs. *Dr. scient. thesis*. Tromsø, University of Tromsø
- Aas-Hansen, Ø., M. M. Vijayan, H. K. Johnsen, C. Cameron & E. H. Jørgensen (2005). Resmoltification in wild, anadromous Arctic char (*Salvelinus alpinus*): a survey of osmoregulatory, metabolic and endocrine changes preceding annual seawater migration. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **62**: 195-204.
- Arnesen, A. M., M. Halvorsen & K. J. Nilssen (1992). Development of hypoosmoregulatory capacity in arctic char (*Salvelinus alpinus*) reared under either continuous light or natural photoperiod. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **49**: 229-237.
- Berg, O. K. & M. Berg (1989). Sea growth and time of migration of anadromous Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from the Vardnes river, in northern Norway. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **46**: 955-960.
- Berg, O. K. & M. Berg (1993). Duration of sea and freshwater residence of Arctic char (*Salvelinus alpinus*), from the Vardnes River in northern Norway. *Aquaculture* **110**: 129-140.
- Bisbal, G. A. & J. L. Specker (1991). Cortisol stimulates hypo-osmoregulatory ability in Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *The Journal of Fish Biology* **39**: 421-432.
- Björnsson, B. T. (1997). The biology of salmon growth hormone: from daylight to dominance. *Fish Physiology and Biochemistry* **17**: 9-24.
- Björnsson, B. T., V. Johansson, S. Benedet, I. E. Einarsdottir, J. Hildahl, T. Agustsson & E. Jönsson (2002). Growth hormone endocrinology of salmonids: regulatory mechanisms and mode of action. *Fish Physiology and Biochemistry* **27**: 227-242.
- Björnsson, B. T., T. Ogasawara, T. Hirano, J. P. Bolton & H. A. Bern (1988). Elevated growth hormone levels in stunted atlantic salmon, *Salmo salar*. *Aquaculture* **73**: 275-281.
- Boeuf, G. (1993). Salmonid smolting: a pre-adaptation to the oceanic environment. In *Fish Ecophysiology*. p. 105–135. C. J. Rankin and F. B. Jensen (ed.). London, Chapman & Hall
- Boeuf, G. & J. Falcón (2001). Photoperiod and growth in fish. *Vie Milieu* **51**: 247-266.
- Boeuf, G., A. M. Marc, P. Prunet, P. Y. Le Bail & J. Smal (1994). Stimulation of parr-smolt transformation by hormonal treatment in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **121**: 195-208.
- Bolton, J. P., G. Young, R. S. Nishioka, T. Hirano & H. A. Bern (1987). Plasma growth hormone levels in normal and stunted yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Journal of experimental zoology* **242**: 379-382.
- Clarke, W. C. & T. Hirano (1995). Osmoregulation. In *Physiological ecology of Pacific salmon*. C. Croot, L. Margolis and W. C. Clarke (ed.). Vancouver, UBC Press

- Duston, J. & R. L. Saunders (1990). The entrainment role of photoperiod on hypoosmoregulatory and growth-related aspects of smolting in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian journal of zoology* **68**: 707-715.
- Eliassen, R. A., H. K. Johnsen, I. Mayer & M. Jobling (1998). Contrasts in osmoregulatory capacity of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.), strains from northern Norway. *Aquaculture* **168**: 255-269.
- Eriksson, L.-O. & H. Lundqvist (1982). Circannual rhythms and photoperiod regulation of growth and smolting in Baltic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture* **28**: 113-121.
- Evans, D. H., P. M. Piermarini & K. P. Choe (2005). The multifunctional fish gill: Dominant site of gas exchange, osmoregulation, acid-base regulation, and excretion of nitrogenous waste. *Physiological Reviews* **85**: 97-177.
- Finstad, B., K. J. Nilssen & A. M. Arnesen (1989). Seasonal changes in sea-water tolerance of Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* **159**: 371-378.
- Fryer, J. N. & H. A. Bern (1979). Growth hormone binding to tissues of normal and stunted juvenile coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. *Journal of fish biology* **15**: 527-533.
- Gray, E. S., K. M. Kelley, S. Law, R. Tsai, G. Young & H. A. Bern (1992). Regulation of hepatic growth hormone receptors in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology* **8**: 243-252.
- Gross, M. R., R. M. Coleman & R. M. McDowall (1988). Aquatic productivity and the evolution of diadromous fish migration. *Science* **239**: 1291.
- Halvorsen, M., A. M. Arnesen, K. J. Nilssen & M. Jobling (1993). Osmoregulatory ability of anadromous Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), migrating towards the sea. *Aquaculture and Fisheries Management* **24**: 199-211.
- Hiroi, J., T. Kaneko & M. Tanaka (1999). *In vivo* sequential changes in chloride cell morphology in the yolk-sac membrane of Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*) embryos and larvae during seawater adaptation. *The Journal of experimental biology* **202**: 3485-3495.
- Hoar, W. S. (1988). The physiology of smolting salmonids. In *Fish Physiology*. p. 275-343. W. S. Hoar and D. J. Randall (ed.). London, Academic press
- Iwata, M., K. Yamauchi, R. S. Nishioka, R. Lin & H. A. Bern (1990). Effects of thyroxine, growth hormone and cortisol on salinity preference of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Marine behaviour and physiology* **17**: 191-201.
- Johnson, L. (1980). The arctic charr, *Salvelinus alpinus*. In *Charrs. Salmonid fishes of the genus Salvelinus*. E. K. Balon (ed.). The Hague, Dr. W. Junk bv Publishers
- Jørgensen, E. H., Ø. Aas-Hansen, S. Moriyama, M. Iwata & J. E. T. Strand (2007). The parr-smolt transformation of Arctic charr is comparable to that of Atlantic salmon. *Aquaculture*: in press.

- Jørgensen, E. H. & A. M. Arnesen (2002). Seasonal changes in osmotic and ionic regulation in Arctic charr, *Salvelinus Alpinus*, from a high-and a sub-arctic anadromous population. *Environmental biology of fishes* **64**: 185-193.
- Jørgensen, E. H., S. J. S. Johansen & M. Jobling (1997). Seasonal patterns of growth, lipid deposition and depletion in anadromous Arctic charr. *Journal of fish biology* **51**: 312-326.
- Klemetsen, A. (1984). The Arctic charr speciation problem as seen from northern Norway. In *Biology of the Arctic Charr*. p. 65-77. L. Johnson and B. L. Burns (ed.). Winipeg, University of Manitoba press
- Klemetsen, A., P. A. Amundsen, J. B. Dempson, B. Jonsson, N. Jonsson, M. F. O'Connell & E. Mortensen (2003). Atlantic salmon *Salmo salar* L., brown trout *Salmo trutta* L. and Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.): a review of aspects of their life histories. *Ecology of Freshwater Fish* **12**: 1-59.
- Le François, N. R. & P. U. Blier (2003). Reproductive events and associated reduction in the seawater adaptability of brook charr (*Salvelinus fontinalis*): evaluation of gill metabolic adjustments. *Aquatic Living Resources* **16**: 69-76.
- Leonard, J. B. K. & S. D. McCormick (2001). Metabolic enzyme activity during smolting in stream- and hatchery-reared Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **58**: 1585-1593.
- Madsen, S. (1990). The role of cortisol and growth hormone in seawater adaptation and development of hypoosmoregulatory mechanisms in sea trout parr (*Salmo trutta trutta*). *General and Comparative Endocrinology* **79**: 1-11.
- Maitland, P. S. (1995). World status and conservation of the Arctic charr *Salvelinus alpinus* (L.). *Nordic journal of freshwater research* **71**: 113-127.
- Mancera, J. M. & S. D. McCormick (1998). Osmoregulatory actions of the GH/IGF axis in non-salmonid teleosts. *Comparative biochemistry and physiology - biochemistry and molecular biology* **121**: B43-B48.
- Marshall, W. S. & M. Grosell (2006). Ion transport, osmoregulation, and acid-base balance. In *The physiology of fishes, 3rd ed.* p. 177-230 (ed.). Boca Raton, CRC press
- Maxime, V., G. Boeuf, J. P. Pennec & C. Peyraud (1989). Comparative study of the energetic metabolism of Atlantic salmon (*Salmo salar*) parr and smolts. *Aquaculture* **82**: 163-171.
- McCormick, S. D. (1993). Methods for nonlethal gill biopsy and measurement of Na⁺, K⁺-ATPase activity. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **50**: 656-658.
- McCormick, S. D. (1996). Effects of Growth Hormone and Insulin-like Growth Factor I on Salinity Tolerance and Gill Na⁺,K⁺-ATPase in Atlantic Salmon (*Salmo salar*): Interaction with Cortisol. *General and Comparative Endocrinology* **101**: 3-11.
- McCormick, S. D. (2001). Endocrine Control of Osmoregulation in Teleost Fish. *American Zoologist* **41**: 781-794.

- McCormick, S. D., L. P. Hansen, T. P. Quinn & R. L. Saunders (1998). Movement, migration, and smolting of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **55**: 77-92.
- McCormick, S. D. & R. L. Saunders (1987). Preparatory physiological adaptations for marine life of salmonids: osmoregulation, growth and metabolism. *American Fisheries Society Symposium* **1**: 211-229.
- McCormick, S. D., J. M. Shrimpton, S. Moriyama & B. T. Bjornsson (2002). Effects of an advanced temperature cycle on smolt development and endocrinology indicate that temperature is not a zeitgeber for smolting in Atlantic salmon. *Journal of Experimental Biology* **205**: 3553-3560.
- Nielsen, C., S. S. Madsen & B. T. Bjornsson (1999). Changes in branchial and intestinal osmoregulatory mechanisms and growth hormone levels during smolting in hatchery-reared and wild brown trout. *Journal of fish biology* **54**: 799-818.
- Nilsen, T. O., L. O. E. Ebbesen & S. O. Stefansson (2003). Smolting in anadromous and landlocked strains of Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture* **222**: 71-82.
- Nilssen, K. J. & O. A. Gulseth (1998). Summer seawater tolerance of small-sized Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, on Svalbard. *Polar Biology* **20**: 95-98.
- Nilssen, K. J., O. A. Gulseth, M. Iversen & R. Kjøl (1997). Summer osmoregulatory capacity of the world's northernmost living salmonid. *American Journal of Physiology- Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* **272**: 743-749.
- Pelis, R. M. & S. D. McCormick (2001). Effects of growth hormone and cortisol on Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter localization and abundance in the gills of Atlantic salmon. *General and Comparative Endocrinology* **124**: 134-143.
- Pelis, R. M., J. Zydlewski & S. D. McCormick (2001). Gill Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter abundance and location in Atlantic salmon: effects of seawater and smolting. *American Journal of physiology - Regulatory, integrative and comparative physiology* **280**: 1844-1852.
- Richman, N. H. & W. S. Zaugg (1987). Effects of cortisol and growth hormone on osmoregulation in pre- and desmoltified coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *General and Comparative Endocrinology* **65**: 189-98.
- Sakamoto, T. & S. D. McCormick (2006). Prolactin and growth hormone in fish osmoregulation. *General and Comparative Endocrinology* **147**: 24-30.
- Sakamoto, T., S. D. McCormick & T. Hirano (1993). Osmoregulatory actions of growth hormone and its mode of action in salmonids: A review. *Fish Physiology and Biochemistry* **11**: 155-164.
- Sakamoto, T., K. Uchida & S. Yokota (2001). Regulation of the ion-transporting mitochondrion-rich cell during adaptation of teleost fishes to different salinities. *Zoological Science* **18**: 1163-74.
- Schmitz, M. (1992). Annual variations in rheotactic behaviour and seawater adaptability in landlocked arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **49**: 448-452.

- Schmitz, M. (1995). Seasonal changes in hypoosmoregulatory ability in landlocked and anadromous populations of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*, and Atlantic salmon, *Salmo salar*. *Environmental biology of fishes* **42**: 401-412.
- Schmitz, M. & I. Mayer (1993). Effect of androgens on seawater adaptation in Arctic char, *Salvelinus alpinus*. *Fish Physiology and Biochemistry* **12**: 11-20.
- Schrock, R. M., J. W. Beeman, D. W. Rondorf & P. V. Haner (1994). A microassay for gill sodium, potassium-activated ATPase in juvenile pacific salmonids. *Transactions of the American Fisheries Society* **123**: 223-229.
- Shrimpton, J. M., R. H. Devlin, E. McLean, J. C. Byatt, E. M. Donaldson & D. J. Randall (1995). Increases in gill cytosolic corticosteroid receptor abundance and saltwater tolerance in juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) treated with growth hormone and placental lactogen. *General and Comparative Endocrinology* **98**: 1-15.
- Shrimpton, J. M. & S. D. McCormick (1998). Regulation of gill cytosolic corticosteroid receptors in juvenile Atlantic salmon: Interaction effects of growth hormone with prolactin and triiodothyronine. *General and Comparative Endocrinology* **112**: 262-274.
- Shrimpton, J. M. & S. D. McCormick (1998a). Regulation of gill cytosolic corticosteroid receptors in juvenile Atlantic salmon: Interaction effects of growth hormone with prolactin and triiodothyronine. *General and Comparative Endocrinology* **112**: 262-274.
- Shrimpton, J. M. & S. D. McCormick (1998b). Seasonal differences in plasma cortisol and gill corticosteroid receptors in upper and lower mode juvenile Atlantic salmon. *Aquaculture* **168**: 205-219.
- Shrimpton, J. M. & S. D. McCormick (1999). Responsiveness of gill Na⁺/K⁺-ATPase to cortisol is related to gill corticosteroid receptor concentration in juvenile rainbow trout. *Journal of Experimental Biology* **202**: 987-95.
- Staurnes, M., T. Sigholt, O. Gulseth & R. Eliassen (1994). Effects of maturation on seawater tolerance of anadromous Arctic char. *Transactions of the American Fisheries Society* **123**: 402-407.
- Staurnes, M., T. Sigholt, G. Lysfjord & O. A. Gulseth (1992). Difference in the seawater tolerance of anadromous and landlocked populations of arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **49**: 443-447.
- Strand, J. E. T. (2000). Smoltifisering hjå oppdrettslaks og fyrste generasjon avkom etter villaks ved låg og høg ferskvasstemperatur. *Cand. scient. thesis*. Tromsø, Universitetet i Tromsø
- Tipsmark, C. K., S. S. Madsen, M. Seidelin, A. S. Christensen, C. P. Cutler & G. Cramb (2002). Dynamics of Na⁺,K⁺,2Cl⁻ cotransporter an Na⁺,K⁺-ATPase expression in the brancial epithelium of brown trout (*Salmo trutta*) and Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Journal of Experimental Biology* **293**: 106-118.
- Varnavsky, V. S., T. Sakamoto & T. Hirano (1992). Stunting of wild coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in seawater: patterns of plasma thyroid hormones, cortisol, and growth hormone. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **49**: 458-461.

Wong, C. K. C. & D. K. O. Chan (1999). Chloride cell subtypes in the gill epithelium of Japanese eel *Anguilla japonica*. *American Journal of physiology - Regulatory, integrative and comparative physiology* **277**: 517-522.

Appendix

I. BLANDINGSFORHOLD OG LØSNINGER BRUKT UNDER ANALYSE AV Na^+, K^+ -ATPase-AKTIVITET.

SEI-buffer

	Konsentrasjon (mM)	Mengde (g)
Sucrose	150	26.67
NA2EDTA	10	1.86
Imidazol	50	1.70

Kjemikaliene ble løst i 475 ml dH_2O og pH justert til 7.3 ved hjelp av HCl. Volum deretter justert til 500 ml ved å tilsette dH_2O .

0.5% SEID

0.1 g Natriumdeoksykholat ble løst i 20 ml SEI-buffer

Imidazol-buffer (IB-buffer)

1.702 g imidazol ble løst i 475 ml dH_2O på pH justert til 7.5 med HCl. Volumet ble deretter justert til 500 ml ved å tilsette dH_2O .

	Konsentrasjon (mM)	Mengde (g)
NaCl	189.0	5.52
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.5	1.07
KCL	42.0	1.57

Saltløsning

	Konsentrasjon (mM)	Mengde (g)
NaCl	189.0	5.52
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10.5	1.07
KCL	42.0	1.57

Kjemikaliene ble løst i 500 ml IB-buffer.

PEP (Phosphoenolpyruvat)

0.491 g phosphoenolpyruvat i 100 ml IB-buffer. Overført til reagensrør i løsninger á 5 ml som ble oppbevart ved -80°C .

Oubain

0.382 g oubain ble løst i 50 ml IB-buffer under omrøring i kokende vannbad og under avtrekk. Bemerk at oubain er svært lysfølsomt og må beskyttes mot lys.

Na-Acetatbuffer

0.463 g Na-Acetat ble løst i 100 ml dH_2O . pH ble justert til 6.8.

ADP-standard

0.0489 g ADP ble løst i 25 ml Na-Acetatbuffer. Overføres til eppendorfrør (300 μl i hvert rør) som lagres ved -80°C . For utarbeiding av standardkurve over sammenhengen mellom ADP-konsentrasjon og oksidasjon av NADH ble det laget en fortynningsrekke:

nmol ADP 10 μl^{-1}	IB-buffer (μl)	ADP standard (μl)
0	200	0
5	175	25
10	150	50
20	100	100

Assay medium (AM)

Volum beregnet for analyse av to mikroplater

Løsninger	Volum/vekt
Startvolum IB-buffer	20 ml
Pyruvat kinase (PK)	24 μl
Lactat dehydrogenase (LDH)	31 μl
NADH	5 mg
PEP	5 ml
ATP	0.0145 g

PK og LDH pipetteres over i eppendorfrør og sentrifugeres ved 12000 rpm i 8 min.

Supernatanten fjernes før pelleten resuspenderes i litt IB-buffer og tilsettes meddiat. NADH løses i litt IB og tilsettes. PEP tines og overføres til løsningen. ATP veies ut, løses i IB og tilsettes på samme måte. Volumet sluttjusteres til 35 ml med IB-buffer.

Bruksløsninger, AM og AM-Oubain

	AM	AM-oubain
AM-medium	17.5 ml	17,5 ml
Oubain	-	1.25 ml
IB	1.25 ml	-

II PROTEINANALYSE

Det ble gjort klar en working solution ved å blande 20 ml av reagens A + 400 μ l av reagens B (50:1). Standardkurve ble utarbeidet for hver mikropalte ved hjelp av følgende fortynningsrekke av proteinstandarden (BSA, albumin, 2 mg ml⁻¹):

μg protein 10 μl⁻¹	BSA std. (μl)	ADP standard (μl)
0	0	100
5	25	75
10	50	50
20	100	0

III BEREGNING AV SPESIFIKK ATPase-AKTIVITET

Den spesifikke Na⁺,K⁺-ATPase-aktiviteten ble beregnet ved hjelp av likningene under:

$$1) \frac{\text{Reaksjonshastighet (mOD } \mu\text{l}^{-1} \text{ min}^{-1})}{\text{Stigningstall (mOD nmol ADP}^{-1})} = \text{nmol ADP } \mu\text{l}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$2) \frac{\text{nmol ADP } \mu\text{l}^{-1} \text{ min}^{-1}}{\text{Mengde protein (mg protein } \mu\text{l}^{-1})} = \text{nmol ADP mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$$

$$3) \text{nmol ADP mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1} \cdot 60 \text{ min time}^{-1} \cdot 1000 = \mu\text{mol ADP mg protein}^{-1} \text{ time}^{-1}$$