

Endringer i CO₂ fører til fysiologiske forstyrrelser som kan gi økt sannsynlighet for utfelling av nyrestein hos laks og regnbueørret

Marius Takvam¹, Chris Wood², Colin Brauner², Harald Kryvi¹ and Tom Ole Nilsen¹

¹Institutt for Biovitenskap, Universitetet i Bergen, Bergen, Norway

²Institutt for Zoology, Universitetet i British Columbia, Vancouver, Canada

NephroReduce

FHF-prosjekt: Risikofaktorer i norske settefiskanlegg relatert til utvikling av nefrokalsinose hos atlantisk laks og regnbueørret – Reduksjon og forebyggende tiltak.

Les mer ved å skanne QR-koden under:



Å opprettholde normale pH-nivå i kroppsvæsker (syre-base balanse) er essensielt for alle dyr og representerer en av de mest grunnleggende og regulerte fysiologiske prosessene hos vertebrater. Evolusjonært har fisk utviklet et fleksibelt system for å regulere pH, hvor de bruker hydrogen (H⁺), ammonium (NH₄⁺), hydroksid (OH⁻), bikarbonat (HCO₃⁻), ammoniakk (NH₃), fosfat (HPO₄³⁻) og karbondioksid (CO₂) for å tilpasse seg ulike endringer i miljø. CO₂ og NH₃ er sluttprodukter av fiskens forbreining av fett, proteiner og karbohydrater. HCO₃⁻ og CO₂ har viktige roller i et naturlig buffersystem der forholdet mellom konsentrasjonen av HCO₃⁻ og løst CO₂ er sentrale i å regulere pH i blod. Høyt forhold mellom HCO₃⁻/CO₂ gir høy pH, mens lavt forhold mellom disse gir lavere pH. Til tross for at gjeller er hovedorganet for pH regulering, spiller nyren en svært viktig, ofte oversett rolle i syre-base regulering. I denne artikkelen skal vi å forklare nyrens funksjon og rolle i syre-base regulering og hvordan den komplimenterer

gjellens rolle ved endringer av CO₂ og O₂ konsentrasjon i vannet. I denne konteksten har HCO₃⁻ en viktig buffer rolle ved forsuring av blod (reduert pH) grunnet forhøyet nivåer av CO₂ og/eller O₂ (kalt respiratorisk acidose: 'respiratorisk forstyrrelse'). Imidlertid kan variasjon i en eller begge disse miljøparameterne forårsake uheldige fysiologiske effekter for fisken. Avslutningsvis ønsker vi å sette dette i næringsrelevant kontekst hvor vi peker på ulike risikofaktorer i intensiv settefiskproduksjon og hvordan slike risikofaktorer kan henge sammen med den økende problematikken rundt nyrestein (nefrokalsinose) fra de siste fiskehelsesrapportene (2020-2023). Økt forståelse av nyrens rolle i syre-base regulering hos oppdrettsfisk gir muligheter til å gjøre viktige justeringer i produksjonen. Slik kan næringen bedre møte fiskens fysiologiske behov og dermed redusere utbredelse av nefrokalsinose.

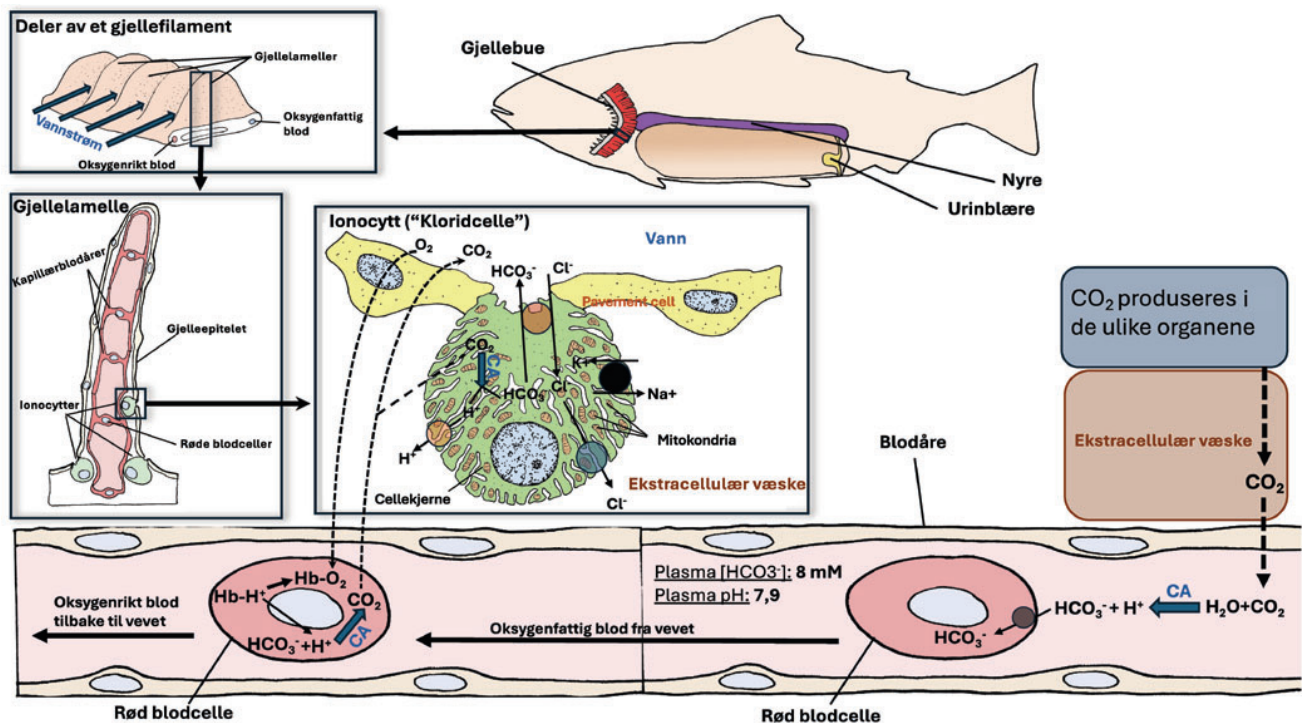
Det har tidligere blitt lagt frem flere hypoteser rundt risikofaktorer for utvikling

av nefrokalsinose. Disse inkluderer høyt konstant CO_2 (hyperkapnia) og/eller i kombinasjon med superoksygenering ($>110\%$ O_2 ; hypoksi). Kombinasjon av økt salinitet i vannet, lavt innhold av magnesium eller vitamin E samt høyt innhold av selenium og vitamin A i dietten har også blitt lagt frem som potensielle risikofaktorer for utvikling av nefrokalsinose. De underliggende årsakene til patogenesen og etiologien for utvikling av nefrokalsinose hos fisk er i beste fall spekulative, men syre-base forstyrrelser antas å være en sentral patofysiologisk årsak. I vår nylig publisert artikkel på syre-base regulering i fiskenyren fremla vi en alternativ hypotese om de utløsende mekanismene bak dannelse av nyrestein. Basert på nåværende

kunnskap antar vi at rask endring fra høy til lav CO_2 gir den første triggeren for utfelling av nyrestein hos fisk. Slike raske endringer ser vi er frekvent under flytting av fisk i settefiskanlegg. Det er kjent at i mange tilfeller observeres de første nyresteinene histologisk allerede hos fisk på 5–7 gram. Nefrokalsinose forekommer i både gjennomstrømningsanlegg (FTS) og resirkuleringsanlegg (RAS) der det brukes både fersk- og brakkvann. Nefrokalsinose blir ofte mer alvorlig når fisken nærmer seg 80–100 gram. Fellesnevnerne er at rask reduksjon i CO_2 forekommer i nærmest alle anlegg undersøkt til nå. Vi ser at anlegg med spesielt store endringer fra høy til lav CO_2 over tid kan gi svært alvorlige tilfeller av nefrokalsinose. Slike endringer i kombinasjon med økt salttrykk

via miljøet (fra vann eller fôr) og bruk av kalsiumbaserte buffere (i RAS) vil følgelig kunne gi uheldige akkumulative effekter hos fisken i etterkant av slike reduksjoner i CO_2 .

I denne artikkelen vil vi først forklare funksjonen til gjeller og nyrer under normale forhold og ved en respiratorisk acidose (høy CO_2 og/eller O_2). Deretter vil vi gå nærmere inn på nyrens rolle under raske endringer fra høy til lav CO_2 , samt forklare hvorfor dette skaper uheldige fysiologiske endringer lokalt i nyrene og dermed gir gode forhold for utfelling av ulike typer nyrestein. Avslutningsvis vil vi snakke om straktiltak og mer langsiktige tiltak som vi tror kan forebygge og redusere forekomsten av nyrestein.



Figur 1: Gjellene har en viktig rolle i å fjerne CO_2 og transportere syre- og base ekvivalenter.

CO_2 produsert via metabolske prosesser blir tilført blodet når det passerer gjennom metabolske vev. Når CO_2 har entret blodet, katalyserer enzymet Carbonic Anhydrase (CA) i de røde blodcellene raskt omdannelsen av CO_2 til HCO_3^- . Normale pH-verdier i blodplasma ligger rundt 7,9 mens konsentrasjonen av HCO_3^- normalt ligger rundt 8 mM. Etter at blodet ankommer gjelleepitelet letter CA også omdannelsen av HCO_3^- tilbake til CO_2 , slik at CO_2 raskt diffunderer gjennom celledemembranene til pavement celler og ut i vannet, mens O_2 diffunderer fra vann til blod. Når O_2 diffunderer inn i de røde blodcellene, frigjøres H^+ -ioner fra hemoglobinet (Hb), noe som fremmer ytterligere hydrering av HCO_3^- i de røde blodcellene og utskillelse av CO_2 . Motsatt strøm/retning av vann- og blod i gjellene sikrer en effektiv utveksling av CO_2 og O_2 over gjellene. Klorid celler tar normalt opp natrium (Na^+) fra det omgivende vannet i bytte mot syre ekvivalenter, og Cl^- fra vannet i bytte mot basiske ekvivalenter med omtrent samme hastighet slik at pH i blodet ikke påvirkes og normale konsentrasjoner av Na^+ og Cl^- i blodplasmaet opprettholdes. Under syre-base-forstyrrelser kan fisken endre utvekslingshastighetene til basiske- og syre ekvivalenter for å gjenopprette normal pH. Du finner $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ bytteren (rød sirkel), H^+ pumpen (oransje sirkel), Na^+/K^+ ATPase (NKA; svart sirkel) og Cl^- kanal (blå sirkel) i selve ionocytten. CA er alltid merket med mørkeblå farge.

Syre-base regulering i fisk

Syre-base balanse representerer utskillelse av H^+ eller NH_4^+ , begge syrlige ekvivalenter, mens utskillelse av OH^- eller HCO_3^- representerer utskillelse av base-ekvivalenter. Respiratoriske gasser som CO_2 og NH_3 påvirker definitivt pH i kroppsvæskene (CO_2 forsurer, mens NH_3 alkaliserer). I klassisk syre-base terminologi anses disse imidlertid ikke som syre- eller base-ekvivalenter, men som «respiratoriske faktorer» som påvirker syre-base balansen. Under normale forhold vil typisk pH i kroppsvæsker (eksempelvis i blod) hos laksefisk ligge på 7,9 og normal konsentrasjon av HCO_3^- være omtrent 8 mM. Ved pH 7,9 vil syre-base ekvivalenter i fiskens kroppsvæsker hovedsakelig foreligge som NH_4^+ og HCO_3^- (generelt >95%).

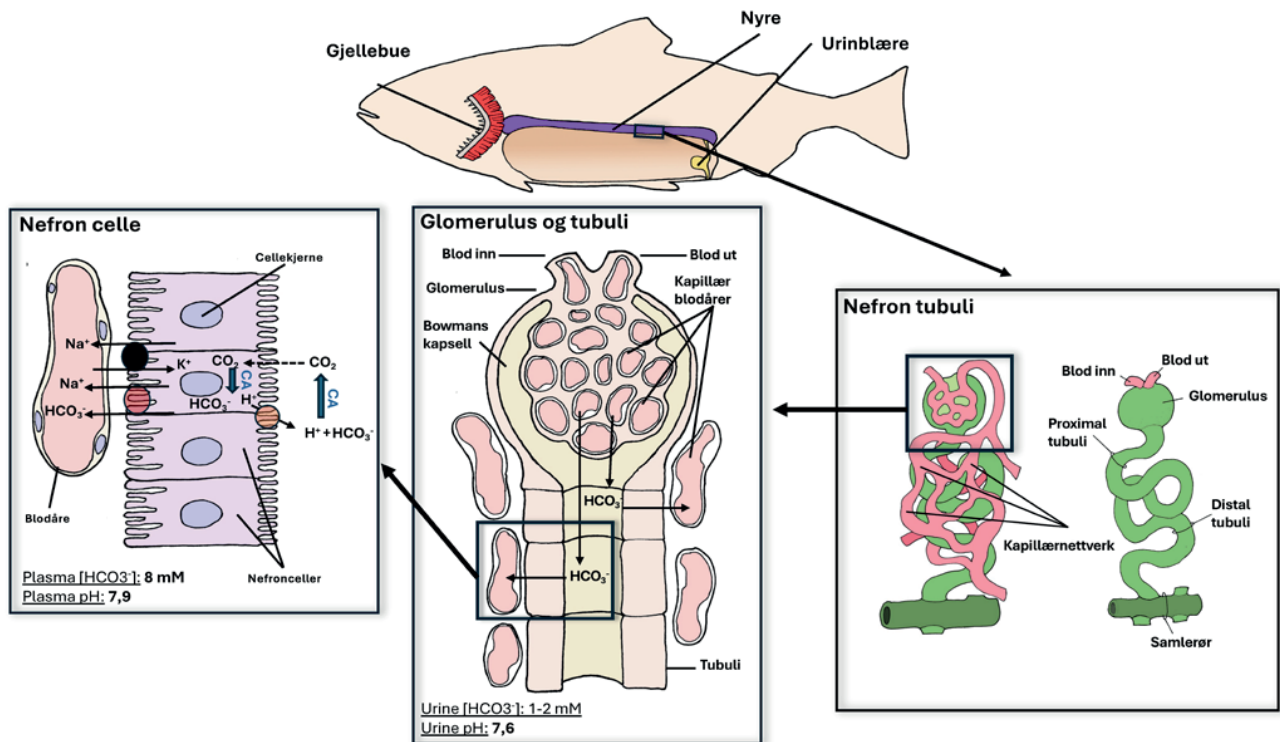
CO_2 produseres kontinuerlig via ulike metabolske prosesser i fiskens vev, og

må transporteres av blodet til gjeller hvor det effektivt kan fjernes. Denne transporten muliggjøres av et helt spesielt enzym i fiskens røde blodceller, Carbonic Anhydrase (CA), som konverterer CO_2 til HCO_3^- . Slik hydrering av CO_2 skjer når CO_2 skiller ut i blodbanen fra mange metabolske vev og organer (Se Figur 1). I tillegg vil en annen variant av CA enzymet omdanne HCO_3^- tilbake til CO_2 , en prosess kalt HCO_3^- dehydrering i gjelleepitelet (Figur 1). Både CO_2 -hydrering og HCO_3^- -dehydrering er viktige og kan enkelt beskrives slik: $CO_2 + H_2O \leftrightarrow H^+ + HCO_3^-$. Disse omdanningsreaksjonene vil fortsatt foregå uten tilstedeværelse av CA enzymet, men vil være altfor saktegående i forhold til blodets sirkulasjonshastighet.

Gjeller

Den generelle forståelsen for hvordan fisk skiller ut CO_2 over gjellene er godt definert. Prosessen starter med rask diffusjon av

CO_2 over gjelleepitelet og ut i vannet mens O_2 diffunderer inn. Tilstrekkelig fjerning av CO_2 er avhengig av HCO_3^- -dehydrering i røde blodceller, og drives av CA i gjellene (se beskrivelse over og Figur 1). Samtidig vil H^+ ioner (hydrogen) frigis fra hemoglobin (Hb) i de røde blodcellene slik at oksygen kan binde til Hb, som videre promoterer CO_2 fjerning (Figur 1). Når blodcellene transporteres gjennom gjellens kapillærer, vil CA i gjelleepitelet drive dehydrering av HCO_3^- til CO_2 . Ettersom CO_2 lett diffunderer gjennom cellemembraner vil CO_2 lett bevege seg over membranen til de enkle støttecellene (pavement celler) som utgjør mesteparten (ca. 90 %) av gjellens epitelvev. På denne måten vil fisk kunne kvitte seg med CO_2 akkumulert via metabolske prosesser. I tillegg til å skille ut CO_2 har gjellene også en viktig rolle i å transportere syre- og base ekvivalenter via spesialiserte celler kalt ionocytter eller kloridceller. Disse cellene utgjør ca. 10 % av gjellens epitelvev, og har mange



Figur 2: Nyrens nefroner er viktig for filtreringen av blod, produsere urin og reabsorbere HCO_3^- .

Når pre-urinen beveger seg gjennom proximale og distale tubuli, tar nyren effektivt opp nesten all HCO_3^- i pre-urinen og returnerer HCO_3^- til blodet, noe som resulterer i en HCO_3^- konsentrasjon på 1-2 mM, samt pH rundt 7,6 i urin. CA-enzymet katalyserer også dehydrering av HCO_3^- til CO_2 , slik at det kan diffundere inn i nefronets celler. Når CO_2 har kommet inn i nefronets celler sørger CA også for hydreringen tilbake til HCO_3^- , som deretter kan returneres til blodet, som dermed bidrar til å opprettholde plasma HCO_3^- rundt 8 mM, samt stabilisere blod pH rundt 7,9. Nyrene kan også øke reabsorpsjonshastigheten av bidrar dersom blodets pH blir for lav. Du finner H^+ - pumpen (oransje sirkel), HCO_3^-/Na^+ transporter (rød sirkel) og Na^+/K^+ ATPase (NKA; svart sirkel). CA er alltid merket i mørkeblå farge.

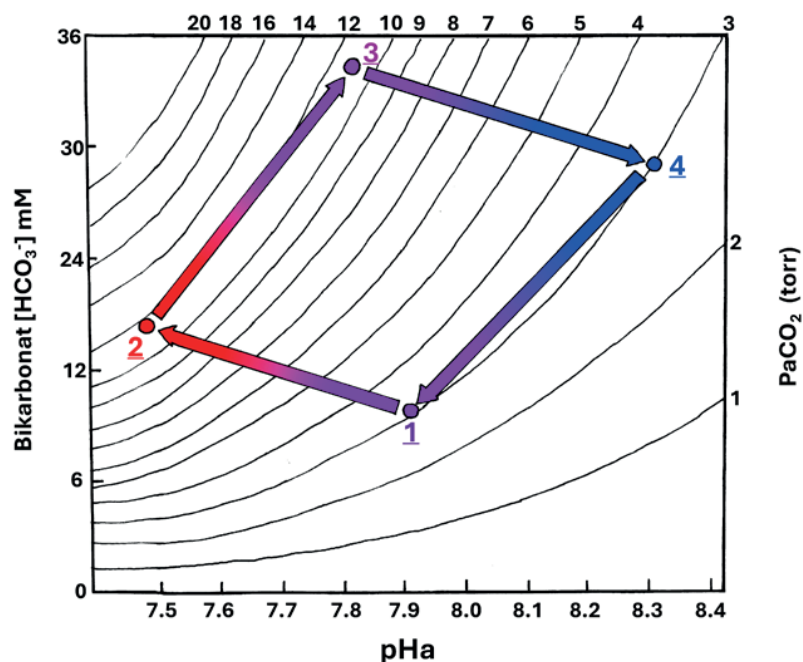
mitokondrier som forbruker mye ATP for å skaffe energi til ionetransport (**Figur 1**). Ionocytter vil vanligvis ta opp natrium (Na^+) fra det omgivende vannet i bytte mot syre-ekvivalenter (H^+) og klorid (Cl^-) i bytte mot base-ekvivalenter (HCO_3^-) med omtrent samme hastighet (**se oversikt Figur 1**). På denne måten vil pH i blodet ikke påvirkes, og normale konsentrasjoner av Na^+ og Cl^- i blodplasma opprettholdes. Dersom blodets pH blir for lavt, eksempelvis under en respiratorisk acidose, så må fisken skille ut flere syre-ekvivalenter (H^+) og beholde mer av de basiske ekvivalentene (HCO_3^-). Dette medfører økt konsentrasjon av HCO_3^- i blodplasma for å reetablere korrekt ratio mellom HCO_3^- og oppløst CO_2 -konsentrasjon i plasma og dermed gjenopprette blodets pH til 7,9. Samtidig reduseres hastigheten til fiskens opptak Cl^- -opptak for å senke sekresjonen av HCO_3^- . Dette øker også hastigheten for opptak av Na^+ noe slik at mer H^+ skilles ut. Som et resultat stiger konsentrasjonen av HCO_3^- i

blodplasma kraftig, Cl^- -nivået faller også kraftig mens Na^+ øker noe. Vi skal senere forklare hvorfor disse prosessene er så viktige når fisken utsettes for høy CO_2 og/eller høy O_2 , der de må kompensere for en respiratorisk acidose fra miljøet. Men la oss først se hvordan nyrene komplimenterer gjellene for å opprettholde syre-base balansen.

Nyrer

Generelt vil nyrene kontinuerlig filtrere blod gjennom de mange tusen aktive nefroner, de funksjonelle enhetene som regulerer syre og base-, salt- og vannbalansen under det første steget av urin produksjon (**se Figur 2**). Enkelt forklart vil nivåene av HCO_3^- , oppløst CO_2 og pH være identisk i plasma og pre-urin. Dette er fordi at under normale forhold vil nefronene filtrere igjennom alt som finnes i plasma med unntak av blodceller og proteiner. Når pre-urinen

videre beveger seg igjennom de ulike seksjonene av nefronene (kalt proximal og distal tubuli) har nyrene en svært viktig rolle for å opprettholde stabile pH-nivå i blodet. Dette gjør nyren ved at nefronene reabsorberer (tar opp) store deler av HCO_3^- fra pre-urinen og tilbakefører dette til blodet (**Figur 2**). Enzymet CA vil også i nyrene sørge for omdanning av HCO_3^- til CO_2 som diffunderer inn i cellene til nefronet. Når CO_2 er vel inne i cellene kan CA omdanne CO_2 tilbake til HCO_3^- som da kan returneres til blodet via spesialiserte transportere (**figur 2**). For å illustrere dette poenget med et eksempel, ved normal filtrasjonsrate i regnbueørret vil det grovt sett bli filtrert $48 \mu\text{mol kg/h}$ HCO_3^- (pre-urin) som effektivt vil bli reabsorberte igjennom nefronene slik at omtrent ingenting kan observeres i den endelige urinen. Dette høres kanskje ikke mye ut, men om nyrene skulle stoppe å ta opp HCO_3^- ville hele bufferkapasiteten i blodet (basiske ekvivalenter) være tapt i løpet av bare 8 timer! Derfor har nyrene en svært viktig men ofte undervurdert rolle for å opprettholde HCO_3^- -nivåene på 8 mM og dermed sikre stabil pH i blodet på rundt 7,9 og urin pH på rundt 7,6 (**Figur 2**). Når blodets pH blir for lavt, eksempelvis under respiratorisk acidose, vil nyren øke reabsorbsjonsraten av HCO_3^- ved hjelp av de samme mekanismene.



Figur 3: Davenport-diagram som viser endringer av HCO_3^- , pH og partialtrykk av CO_2 (PaCO_2 mmHg) i blod visualiseres.

Oppdrettsfisken kan oppleve forhøyede CO_2 -konsentrasjoner, for eksempel ved respiratorisk og metabolsk acidose eller i vannet. Dersom vannets pCO_2 ligger rundt 10–12 mmHg (ca 30–40 mg/l), så vil blodets pH raskt synke til omtrent 7,53 (stadium 2; rød farge). Fisken trenger da ca. 3 dager for å kompensere ved å øke konsentrasjonen av plasma HCO_3^- , der blodets HCO_3^- -nivåer kan nå 30–35 mM (stadium 3; lilla farge). Dersom CO_2 -nivået plutselig synker, som ved overføring til nye kar, så vil PaCO_2 -nivåene synke raskt mens blodets bufferkapasitet (HCO_3^-) fortsatt vil være høy, og dermed vil pH i blod og pre-urin raskt øke til 8,3–8,4 (stadium 4; blå farge) og dermed skape optimale forhold for kjernedannelse og utfelling av nyrestein. Om lag 2–3 dager seinere vil fisk returnere til normale pH nivåer (Stadium 1; lilla farge).

Fysiologiske responser under høy CO_2 - og O_2 -nivå i landbaserte oppdretts-systemer

CO_2 er nesten 30 ganger mer oppløselig i vann sammenlignet med O_2 , og dette vil følgelig påvirke gassutveksling over gjellene hos fisk. Når fisken vokser seg større i karene vil fisketettheten øke, og O_2 -forbruket bli større, som igjen fører til en mye høyere produksjon av CO_2 som vil akkumulere i vannmiljøet. CO_2 er utfordrende å fjerne fra vannet ettersom det dissosierer i vann til H^+ og HCO_3^- . Ved typiske pH-nivå (vanligvis over 6) vil det meste av totalt løst CO_2 gå over til HCO_3^- i karene. CO_2 produsert og utskilt av fisken (via metabolske prosesser; se første seksjon) vil derfor gå over til HCO_3^- i vannet (svært sakte ettersom det ikke finnes CA i vannet). Dette må degassingssystemet først konvertere tilbake til CO_2 før det kan fjernes. En slik dehydreringsprosess er saktegående og mye tregere enn

Vitenskapet

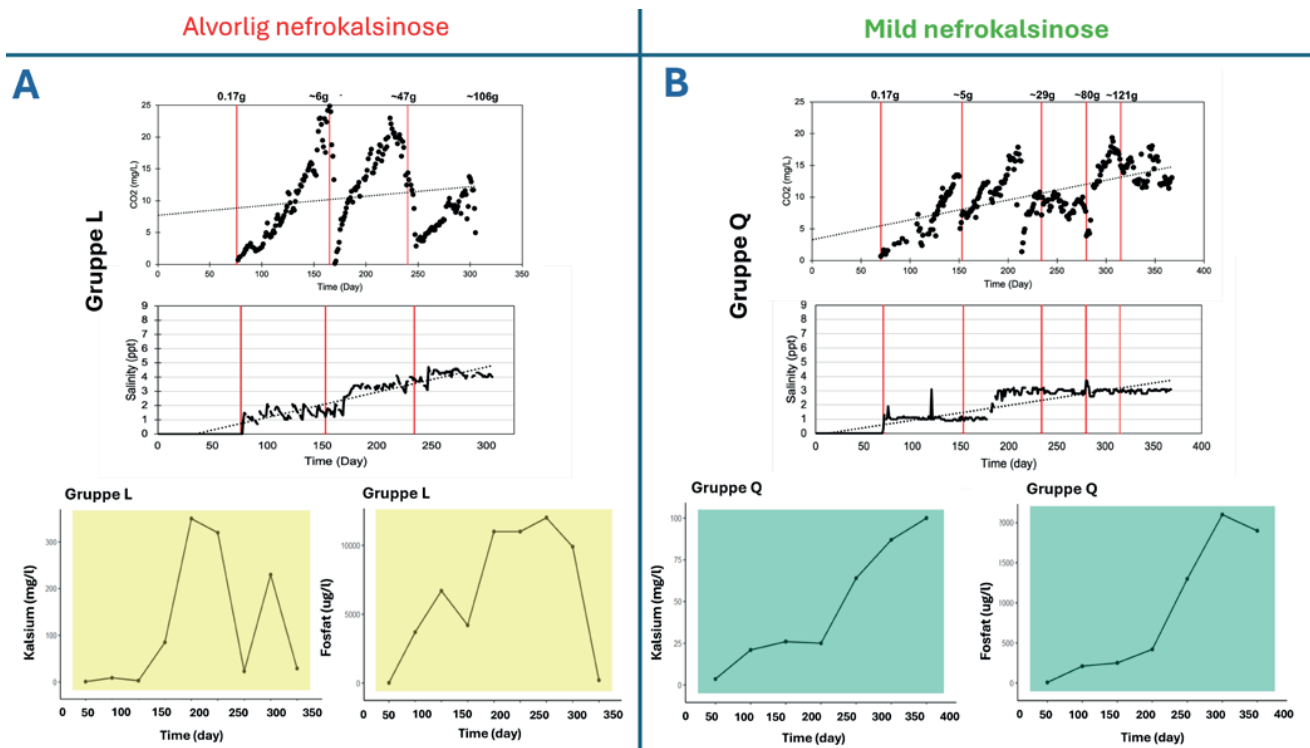
dehydreringsprosessen over gjellene med CA. Dette betyr at fjerning av CO₂ fra vannet alltid vil gå tregere enn CO₂ produsert via metabolske prosesser under intensive oppdrettsforhold. Derfor, vil ikke dette systemet være effektivt nok til fjerne CO₂ uavhengig om det er RAS, FTS eller Hybridsystem (HFS).

Flere anlegg erfarer CO₂-nivå mellom 18–25 mg/l under den siste perioden før fisk overføres til nye kar, men høyere nivå rundt 25–30 mg/l er dokumentert ved pumping, trenging og overføring av fisk. Dersom høye CO₂-nivå oppstår kombinert med forhøyede O₂-nivåer i karene kan dette ha ytterligere negative effekter på fisken. Det er ikke uvanlig at oppdrettere øker O₂-nivået i karene før, under og etter en overføring. I perioder med forhøyende O₂-nivåer (f.eks. 110-120%, ofte kalt hyperoksi) vil respirasjonsfrekvensen i gjeller avta og de små blodkapillærene har en tendens til å trekke seg sammen.

Dette vil redusere gjellenes kapasitet til å skille ut CO₂ ved at mindre vann beveger seg over gjellene, og gir en mindre gjelleoverflate for diffusjon av CO₂. Fisken har da en tendens til å beholde metabolsk produsert CO₂, noe som forverrer økningen av CO₂ i blodet som følge av høy CO₂ i det omgivende vannet. Resultatet blir da en enda sterkere respiratorisk acidose når forhøyet O₂ (hyperoksi) kombineres med høyt CO₂ i vannet (hyperkapnia). Fisk kan kompensere ved å øke HCO₃⁻ konsentrasjonen i blodplasma og dermed sakte gjenopprette korrekt forhold mellom mengde HCO₃⁻ og løst CO₂ i plasma for å bringe blodets pH tilbake til omtrent 7,9. Fisken oppnår en slik økning av HCO₃⁻ konsentrasjon hovedsakelig ved å redusere hastigheten til opptak av Cl⁻ og akselerere hastigheten av Na⁺ opptak via gjellenes ionocytter (se **gjelleavsnitt** på sidene foran). Dette refereres til som det klassiske Cl⁻/HCO₃⁻-skiftet, og er godt beskrevet i litteraturen. På dette

tidspunktet må nefronene i nyren øke hastigheten på reabsorpsjon av HCO₃⁻ fra pre-urin, ellers ville ekstra HCO₃⁻ fra plasma gå tapt i den utskilte urinen (se **nyreavsnitt** på sidene foran). Eksperimentelt er det vist at når plasmakonsentrasjonen av HCO₃⁻ økes ved injeksjon direkte i blodet, så resulterer dette i en 2,5 ganger økning i nyrens reabsorpsjonshastighet. Lignende økninger er observert under klassisk kompensasjon ved respiratorisk acidose. Den totale kapasiteten i gjeller og nyren til å øke HCO₃⁻ konsentrasjonen i blodplasma har en øvre grense på ca. 30–35 mM hos laksefisk, mens normale nivåer ligger rundt ca. 8 mM.

En frisk fisk som opplever høy CO₂ vil gjennomgå en respiratorisk acidose etterfulgt av en kompensasjonsperiode der gjenoppretting av normal pH i blodet tar opptil 3 dager, avhengig av størrelsen respirasjonsforstyrrelsen, i dette tilfellet nivået av CO₂. Generelt gir dette en risk



Figur 4: Vannkvalitetsparametere i kommersielle RAS-anlegg som har fisk med alvorlig (A) og mild (B) grad av nefrokalsinose. Anlegg med alvorlig nefrokalsinose (A) viser større svingninger av CO₂ i vannet enn anlegg med fisk som har mild nefrokalsinose (B). Gruppe L med alvorlig nefrokalsinose viser en 100-ganger økning i vannets kalsiumnivåer sammenlignet med kun 20-ganger økning i kalsiumnivå i vann hos Gruppe Q med mild nefrokalsinose, til tross for lignende saltinnhold mellom begge anleggene. Også totalt fosforinnhold i oppdrettsvannet er høyere i anlegg med alvorlig nefrokalsinose og kan være så mye som 1000 ganger høyere på slutten av produksjonen. Her har også Gruppe L har omtrent 5 ganger høyere fosforinnhold sammenlignet med Gruppe Q. For CO₂ og salinitet er overføringstidspunktet markert med røde streker.

reduksjon i plasmaklorid, liten økning i natrium, samt kraftig økning i plasma HCO_3^- som tidligere forklart. Dynamikken under syre-base forstyrrelser kan ofte illustreres ved hjelp av et klassisk Davenport diagram, som tillater visualisering av endringer i plasma HCO_3^- , pH og deltrykket av CO_2 (PaCO_2 ; torr) i blodet samtidig (**Figur 3**). Under en respiratorisk acidose endres flere faktorer som er nødvendige for utfelling av nyrestein: **(1)** økt HCO_3^- konsentrasjoner i plasma, **(2)** mobilisering av Ca^{2+} og fosfat fra skjelett til blod og urin, samt **(3)** økt metabolsk produksjon av ammoniakk (NH_4^+) med tilhørende økning av NH_4^+ i plasma og urin. Under en respiratorisk acidose øker plasma HCO_3^- konsentrasjonen for å minimere reduksjon i blodets pH, mens pH i urin viser en nedgang fra 7,6 til 7,3, samt at nivået av urinbufferne NH_4^+ og fosfat øker for å motvirke reduksjon av pH i urinen. Videre mobiliseres Ca^{2+} fra skjell/bein. Da gjenstår kun en siste **(4)** faktor for utfelling

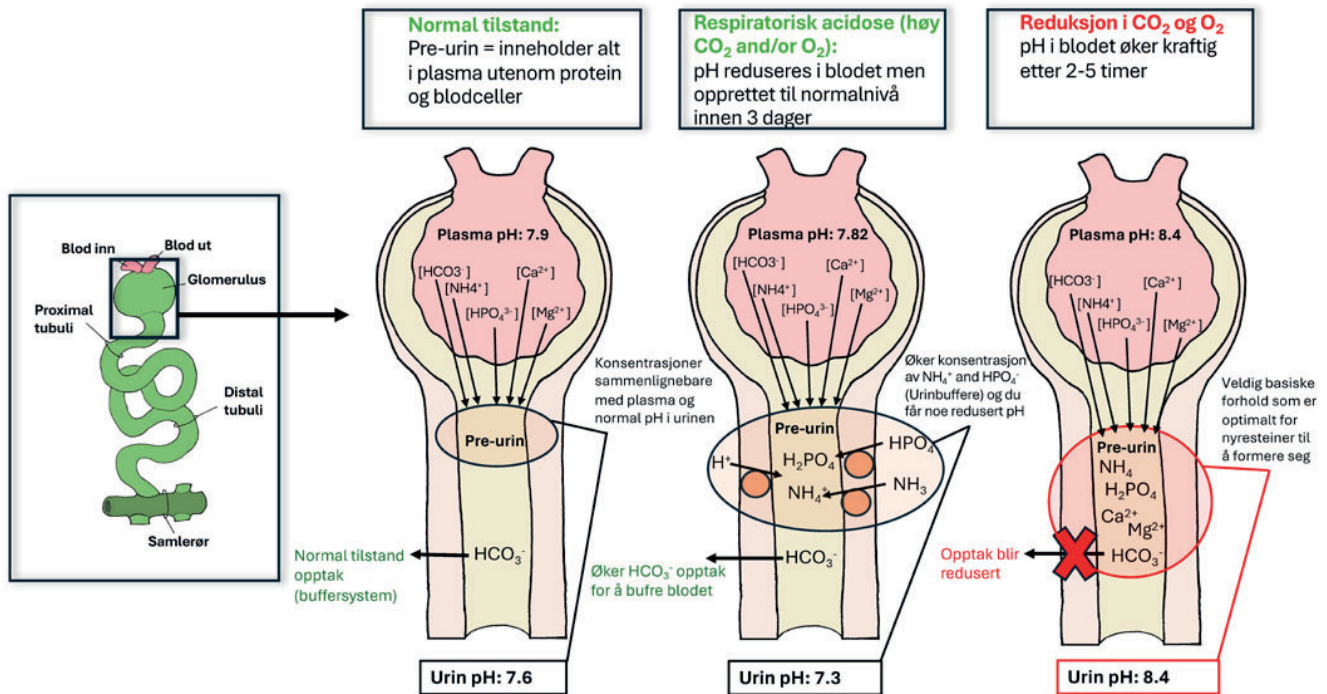
av nyrestein, nemlig påfølgende forhøyet pH i plasma og urin. En slik økning i pH oppstår først når fisken overføres direkte fra vann med høyt CO_2 -nivå til vann med lavt CO_2 (**se Figur 3, punkt 3 til 4**), samtidig som alle de tre første faktorene fortsatt er gjeldende i plasma og urin. Dermed skapes optimale forhold for dannelse av nyrestein. Det har vært begrenset fokus rettet mot raske reduksjoner i CO_2 , noe som er overraskende gitt at slike endringer er vanlige ved håndtering og flytting av fisk i anleggene (**se Figur 4**).

Potensiell utløsende mekanismer og risikofaktorer i forbindelser med nefrokalsinose

I anlegg flyttes fisk raskt fra kar med høy biomasse og CO_2 -nivåer til nye kar med lave biomasse og CO_2 -nivå. Vannets O_2 nivåer kan også være lavere. Gjennom dialog og samarbeid med industripartnere i NephroReduce prosjektet sees en trend

der det vanligvis påvises nefrokalsinose 1–2 uker etter flytting av fisk. Imidlertid tror vi at den innledende presipiteringen av nyrestein oppstår umiddelbart etter overføring. Betydelige endringer i vannkvalitet, særlig reduksjon i CO_2 , som oppstår under overføring til nye kar blir ofte oversett som mulig årsak til dannelse av nyrestein (**se figur 4**).

Ved overføring til nye kar med lavere CO_2 og/eller O_2 vil fisk i løpet av noen minutter ikke lenger være i en respiratorisk acidose (hypercarbia) ettersom CO_2 nå raskt kan diffundere ut over gjellene. Imidlertid vil HCO_3^- i blodplasma forbli høyt i flere timer etter overføring da HCO_3^- skilles saktere ut over gjeller og nyrer. Dette innebærer at forholdet mellom HCO_3^- konsentrasjon og løst CO_2 i blodplasmaet nå er meget høyt, og dermed drives blodets pH opp. Under slike betingelser har vi målt blodets pH til å ligge rundt 8,1, men vi mistenker at umiddelbart etter flytting så kan blodets



Figur 5: Gunstige forhold for utfelling av nyrestein.

Under normal steady-state betingelser er pH og ionekonsentrasjoner i plasma og pre-urin lik. Under respiratorisk acidose skjer en liten reduksjon pH i blod og urin, hvor nyrene øker reabsorpsjonshastigheten av HCO_3^- og konsentrasjonen av urinbufferne (NH_4^+ , H_2PO_4^-), slik at blodets pH gjenopprettes og forhindrer at pH i urinen synker ytterligere. Når fisk opplever et raskt og tilstrekkelig fall i CO_2 , øker pH i blod og pre-urin dramatisk i løpet av få timer, mens bufferkapasiteten forblir høy, og dermed skapes svært gunstige forhold for utfelling av nyrestein.

pH-verdier bevege seg opp mot 8,4-8,6. Dette gjenspeiles i pre-urin, der pH vil være like høy samtidig som konsentrasjon HCO_3^- også forblir høy. Dermed vil forhøyet pH, HCO_3^- , Ca^{2+} , Mg^{2+} , fosfat og ammoniakk i pre-urin skape gode betingelser for utfelling av nyrestein. De høye pH-verdiene vil promotere og øke raten for aggregering av ulike type nyresteiner, og dermed vil utvikling av nyrestein allerede ha startet, sannsynligvis bare få timer etter at fisk er overført til nye kar. Likevel, kan det ta uker før dette blir tydelig ved bruk av makroscoring, en vanlig metode brukt på settefiskanlegg. **Figur 5** viser hvordan CO_2 -endringer i omgivelsene påvirker pH i fiskens blod og urin. Det konkluderes med at, i motsetning til under normalt stabilt (**Figur 5A**; **pH 7,6**) og høye (**Figur 5B**; **pH 7,3**) CO_2 -nivå, så vil raske endringer fra høy til lav CO_2 skape gunstige pH-verdier i pre-urin som øker sannsynligheten for utfelling av Ca^{2+} /fosfat baserte nyrestein, eksempelvis karbonatapatitt, men også Mg^{2+} baserte nyrestein, eksempelvis struvitt (**Figur 5C**; **pH 8,4**)

Risikofaktorer og avbøtende tiltak knyttet til CO_2/O_2 under overføring

De fleste studier har fokusert på konstant forhøyet CO_2 -nivå (hyperkapnia) og/eller høye O_2 -nivå (hyperoksi), med varierende resultat. I noen studier rapporteres påvisning av nefrokalsinose, mens andre ikke ser utvikling av nefrokalsinose. Imidlertid er det viktig å merke seg at konstant høye CO_2 -nivåer ofte reduserer vekst og fiskevelferd. Fisk som lider av nyrestein kan oppleve negativ innvirkning på transportmekanismene i nyrens nefroner (**se Figur 2 og 5**), og potensielt medføre en opphopning av viktige bestanddeler som utgjør nyrestein, som igjen kan medføre økt pH i pre-urin. I NephroReduce prosjektet har vi undersøkt raske endringer i CO_2 og utforsket umiddelbare tiltak for å minimere situasjoner som øker sannsynligheten for dannelse av nyrestein. Observasjoner fra kommersiell produksjon indikerer at anlegg med god kontroll på CO_2 -nivå før overføring av fisk har lavere og mildere utbredelse av nyrestein (**Figur 4B**) sammenlignet med anlegg som har betydelige svingninger i CO_2 (**Figur 4A**) (basert på histologisk scoringssystem). Det første umiddelbare tiltaket vil derfor

være reduksjon av biomasse, eller overføring av fisk tidligere sammenlignet med dagens praksis. Alternativt må oppdrettssystemets kapasitet til å fjerne CO_2 økes (med dagens teknologi) eller forbedres gjennom implementering av mer effektiv og ny teknologi slik at en kan redusere de høye CO_2 -nivåene som ofte oppstår under de siste ukene før overføring av fisk. Et annet tiltak som diskuteres med prosjektpartnerne er muligheten for å øke CO_2 -nivå i karene som fisken skal overføres til. Slik kan CO_2 -nivået senkes gradvis over flere dager for å minimere stor og rask reduksjon i CO_2 og den assosierte pH økningen i urinen. Vi anbefaler en mer nøye overvåking av CO_2 - og O_2 -nivåer før, under og etter håndtering og overføring av fisk innad i anlegget. Forhøyet O_2 -nivå før, under og etter overføring kan, i kombinasjon med økende CO_2 -nivå over tid, medføre uheldige effekter på fisken. Derfor bør O_2 -nivåene forbli stabile og ikke overstige 90-95% før, under og etter overføring. Vi har observert at CO_2 -nivåene kan øke betraktelig under pumping, trenging og flytting i anlegget, så målinger av CO_2 og O_2 vil være svært viktig å kartlegge i de ulike anleggene. Ettersom fisk overføres til kar med praktisk talt neglisjerbare CO_2 -nivå (0-2 mg/l), så vil størrelsesområdet av CO_2 reduksjonen (5-35 mg/l) som er nødvendig for å unngå økt pH i blod og pre-urin være et sentralt fokus fremover.

Risikofaktorer og avbøtende tiltak relatert til ionekomposisjon i vannet

Økende bruk av salinitet i vann eller fôr kan ha akkumulerende effekter når fisk flyttes til nye kar. Salinitet (parts per million; ppt) har tidligere blitt identifisert som en risikofaktor. Økt bruk av salinitet kan gi økt tilgang på salter (inkludert kalsium, magnesium og fosfor), som følgelig vil være svært lite gunstig under perioder med økende pH i urinen. Derfor, bør operatører være noe varsom hva gjelder bruk av brakkevann (5-12 ppt) og/eller overgangsfôr (høyere konsentrasjon av salter) i uken etter overføring til nye tanker. Det er også viktig å nevne at bruk av kalsiumbaserte buffere (relevant for RAS) vil kunne øke kalsiumkonsentrasjoner i vannet. Mer tilgang på kalsium vil følgelig kunne påvirke presipitering

av nyrestein, ettersom kalsium er en viktig komponent i flere typer nyrestein. Observasjoner gjort på ulike anlegg viser at kalsiumnivåene kan øke 20 ganger (**Figur 4B**) og i ekstreme tilfeller 100 ganger (**Figur 4A**), til tross for at salinitet i vannet er relativt stabil (**se Figur 4**). Også fosfat konsentrasjonene kan øke flere 1000 ganger i løpet av produksjonen (**Figur 4**). I **figur 4** ser dere et eksempel fra to populasjoner i kommersiell produksjon. Gruppe L opplever drastisk variasjon CO_2 -reduksjon i kombinasjon med 3 ganger høyere kalsiumnivå og 5 ganger høyere fosfatnivå sammenlignet med gruppe Q som opplever mindre variasjon i CO_2 og lavere kalsium og fosfatnivå. Vi er nå i gang med en større metaanalyse som ser på vannkvalitet og førkomposisjon i flere ulike populasjoner i kommersielle anlegg fra egg til smolt (100-150 gram), så andre risikofaktorer kan fremkomme seinere i prosjektet. Fremover vil det være viktig for selskapene å ha mer fokus på vannkvalitetsanalyser i hver eneste tank, med spesielt fokus på ulike ioner (med spesielt hensyn på kalsium, magnesium, fosfor), ammonium (NH_4^+), hardhet (CaCO_3), pH og alkalinitet. Dette vil gi personell på anleggene langt bedre oversikt og forståelse for endringer i vannkvalitet. Dette er spesielt viktig når fisk flyttes til nye tanker ettersom det her skjer drastiske endringer i vannkvalitet fra en tank til en annen. I dag blir slike endringer sjeldent overvåket og dermed er slike endringer sannsynligvis kraftig underrapportert.

Potensial for fremtidig avbøtende tiltak

På lang sikt jobber vi med målrettede behandlinger gjennom miljø- eller kosttilskudd for å redusere urin pH i dagene etter overføring. Det rapporteres at fisk utvikler mindre nyrestein etter overføring til fullt sjøvann (34-36 ppt). Fisk i sjøvann har generelt lavere pH i urin sammenlignet med fisk i ferskvann, noe som potensielt kan bidra til oppløsning av nyrestein og dermed lavere sannsynlighet for utvikling av nyrestein. I NephroReduce prosjektet er vi i gang med å teste om et tilstrekkelig marint signal reduserer pH i urin slik at en unngår, eller reduserer grad av nefrokalsinose. I tillegg kan

målrettede behandlinger via diett muligens hjelpe med å redusere urinens pH. Slike fôrformuleringer må i så fall kunne gis i perioden før overføring, eller kun kort tid etter overføring da utfelling av nyrestein sannsynligvis oppstår allerede noen få timer etter fisken er overført. Potensiell effekt av slike fôrformuleringer vil måtte overvåkes nøye gjennom bruk av gjentatt røntgen og/eller ultralyd på levende individer over tid for å vurdere behandlingseffekt hos fisk med mild, moderat og alvorlig nefrokalsinose. Målrettet utvikling og bruk av teknologi som ultralyd sammen med kunstig intelligens (AI) kan være nyttige verktøy for sortering av stort antall levende fisk. Målsettingen i NephroReduce prosjektet er å øke forståelsen av nyrens rolle i ione- og syre-base regulering, samt identifisere risikofaktorer assosiert med utvikling av nefrokalsinose, slik at en kan redusere innslag av nefrokalsinose i fremtiden. Dette vil kunne ha en svært positiv påvirkning på fiskehelse og -velferd. Med det økte fokuset på lengre produksjonstid på land (produksjon av storsmolt/post-smolt), vil tiltak for å redusere nefrokalsinose-problematikken være viktigere enn noen gang, ettersom fisk vil tilbringe langt større andel av livet sitt på land •

Referanser

Takvam, M., Wood, C. M., Kryvi, H., & Nilsen, T. O. (2023). *Role of the kidneys in acid-base regulation and ammonia excretion in freshwater and seawater fish: implications for nephrocalcinosis*. *Frontiers in Physiology*, 14, 1226068.

Shartau, R. B., Damsgaard, C., & Brauner, C. J. (2019). *Limits and patterns of acid-base regulation during elevated environmental CO₂ in fish*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 236, 110524.

Wheatly, M. G., Höbe, H., & Wood, C. M. (1984). *The mechanisms of acid-base and ionoregulation in the freshwater rainbow trout during environmental hyperoxia and subsequent normoxia. II. The role of the kidney*. *Respiration physiology*, 55(2), 155-173.

Wood, C. M., Milligan, C. L., & Walsh, P. J. (1999). *Renal responses of trout to chronic respiratory and metabolic acidoses and metabolic alkalosis*. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 277(2), R482-R492.

Brauner, C. J., Shartau, R. B., Damsgaard, C., Esbaugh, A. J., Wilson, R. W., & Grosell, M. (2019). *Acid-base physiology and CO₂ homeostasis: regulation and compensation in response to elevated environmental CO₂*. In *Fish physiology* (Vol. 37, pp. 69-132). Academic Press.

www.brimer.no

BRIMER

Clean water solutions
- Protected for life

The advertisement features a teal background. At the top left, the website 'www.brimer.no' is displayed in white text on a dark red rectangular background. In the center, four hands are shown from different angles, cupping a circular inset image of a modern fish farm with rows of tanks. Below the hands, the word 'BRIMER' is written in large, white, bold, sans-serif capital letters. Underneath the name, the tagline 'Clean water solutions - Protected for life' is written in a smaller white font. To the right of the tagline is a square QR code.