

PLGA nanopartikler som vaksinebærere

Av

Karina Lundvang Sævareid



Mastergradsoppgave i Fiskehelse

(60 stp)

Institutt for marin bioteknologi

Norges fiskerihøgskole

Universitetet i Tromsø

Juni 2009

Forord

Fem år som student i Tromsø er ubønnhørlig forbi.

Først av alt vil jeg rette en stor takk til mine veiledere Jarl Bøgwald og Roy A. Dalmo for muligheten til å jobbe med denne oppgaven og god veiledning underveis.

En takk er også på plass til resten av "nanograppa" for hjelp med alle mulige utfordringer jeg har møtt på laben, særlig til Zoubing, vår egen PCR guru, for uvurderlig hjelp med å løse real-time mysteriet for meg!

Takk også til Havbruksstasjonen i Tromsø for at jeg har fått utføre mitt forsøk der og at dere tok godt vare på fisken mellom prøveuttakene.

Og til Stein Tore Solem for serum, sekundærantistoff og et vell av kunnskap til ELISA analyseringen.

Videre vil jeg rette en takk til alle på IMAB. Dere tilbyr et godt og trivelig arbeidsmiljø for oss masterstudenter! Gutta på kontoret fortjener også en kjempetakk, jeg hadde ikke overlevd disse lange dagene uten kaffe og sladder☺

Heldigvis er dog studietiden mer enn bare studier, og til alle dere som har bidratt med å fylle fritiden med lek og moro, friluftsliv og en og annen fest., en stor takk. Særlig jenteligaen på IMAB! Sisteåret hadde ikke vært det samme uten dere!

Og selvfølgelig en takk til mamma og pappa for mental og økonomisk støtte underveis og ikke minst en oppdragelse. Jeg hadde nok ikke vært her jeg er i dag uten dere!

Og sist, men ikke minst en stor stor takk til Børge Nilsen Fredriksen, vandrende kunnskapskilde og hobbypsykolog. Uten deg hadde ikke denne oppgaven blitt rare greiene!

Sammendrag

Fiskeoppdrett er i dag en av Norges største og viktigste eksportnæringer. Dette er en suksesshistorie som ikke ville vært mulig uten vaksiner. Etter gjennombruddet med utviklingen av velfungerende vaksiner mot sentrale sykdommer på 80- og 90- tallet har ekspansjonen i næringen vært enorm og det sjøsettes i dag over 200 millioner smolt årlig. Men selv om de fleste bakteriesykdommer hos laksefisk i dag er under kontroll er bekjempelsen av virussykdommer fremdeles en stor utfordring. I dette forsøket ble en vaksine basert på PLGA nanopartikler administrert intraperitonealt til Atlantisk laks (*Salmo salar*). Det er ikke kjent hvorvidt partikulære vaksinebærere som PLGA kan inducere økt antistoffrespons hos fisk etter intraperitoneal injeksjon, ei heller om PLGA basert vaksine induserer transkriptresponser for ulike T-celle differensiering i fisk. For å undersøke dette ble det laget en PLGA NP basert vaksine der et haptenisert protein (TNP-LPH) og β -glukan (lamiran) ble benyttet som hhv antigen og adjuvans. Som kontroller ble antigen og adjuvans også administrert hver for seg og sammen fortynt i PBS og i kombinasjon med Freund's complete adjuvans (FCA). Etter 1 måned ble det administrert en boostinjeksjon bestående av kun TNP-LPH fortynt i PBS.

Spesifikk antistoffrespons mot haptenisert protein ble målt vha enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) fra serum 1, 2 og 3 måneder etter immunisering samt 1 og 2 måneder etter boostinjeksjon. Analysene vha ELISA viste ingen signifikant forskjell mellom de ulike gruppene. Etter forsøk på å optimalisere protokollen for gjennomføring av ELISA var resultatet uendret da en forventet høy spesifikk antistoffrespons i den positive kontrollen ble det konkludert med at det lå metodiske årsaker til grunn.

Indikatorer på innat, cellulær og humoral immunrespons ble undersøkt ved å kvantitere mRNA-uttrykket av hhv IFN γ , T-bet og GATA-3 fra hodenyre og milt 1-8 dager etter immunisering. Det ble detektert en økning av IFN γ i hodenyre 2 dager etter immunisering, ved de øvrige tidspunkter ble det ikke detektert noen økning i mRNA transkripter. For GATA-3 og T-bet ble det ikke detektert signifikante økninger av mRNA transkripter.

Innhold

1	Innledning	1
1.1	Vaksinering i lakseoppdrett	1
1.1.1	Prinsippet bak vaksinering	3
1.1.2	Bivirkninger ved vaksinering	4
1.2	PLGA nanopartikler som vaksinebærere	5
1.2.1	PLGA- og PLA-molekylet	6
1.2.2	Preparering av PLGA nanopartikler (NP) og mikropartikler (MP)	6
1.2.3	PLGA partikler som bærere av medikamenter/antigener	7
1.2.4	Opptak av PLGA partikler i makrofager og dendrittiske celler	8
1.2.5	PLGA nanopartikler som vaksinebærere.....	9
1.2.6	Forsøk på fisk.....	10
1.3	Immunsystemet.....	11
1.3.1	Det medfødte immunforsvar	12
1.4	Det adaptive immunforsvar.....	15
1.4.1	Cellemediert immunrespons.....	16
1.4.2	Humoral immunrespons.....	18
1.4.3	Th1/Th2 modulerende cytokiner og vaksiner	19
1.5	Hensikt med oppgaven	20
2	Materialer og metoder.....	21
2.1	Forsøksdyr.....	21
2.2	Antigen og immunstimulant.....	21
2.3	Preparering og karakterisering av PLGA nanopartikler	22
2.4	Immunisering og prøveuttak	23
2.5	Indirekte ELISA	25
2.6	Kvantitativ PCR	27

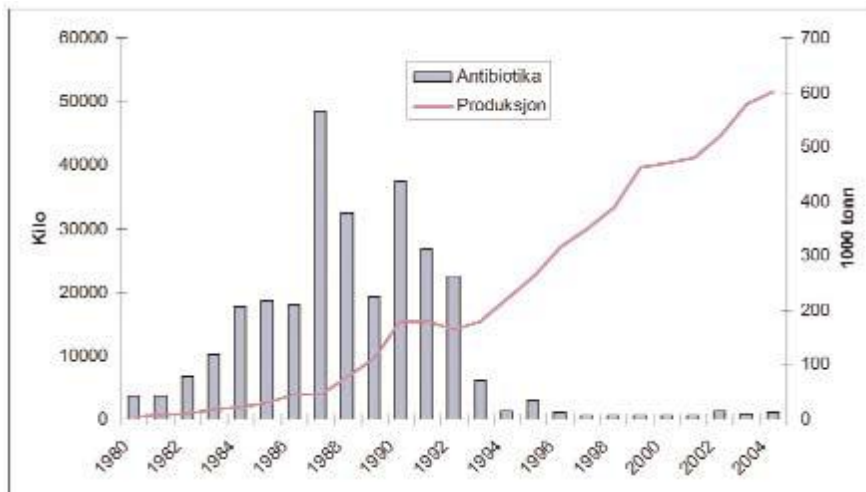
2.6.1	RNA-isolering.....	27
2.6.2	cDNA syntese.....	28
2.6.3	RealTime RT-PCR	29
2.7	Statistikk	31
3	Resultater	32
3.1	Karakterisering av nanopartikler	32
3.2	Prøveuttak og patologi	33
3.3	ELISA	34
3.4	PCR.....	37
4	Referanser	55

1 Innledning

Fiskeoppdrett er i dag en av Norges største og viktigste eksportnæringer. Omtrent 230 millioner smolt ble sjøsatt i 2008, en økning på ca 23 millioner fra året før (Haug, Bakketeig, Knutsen, Opstad, & Agnalt, 2009). Uten velfungerende vaksiner mot alvorlige sykdommer ville ikke dette være mulig og gode vaksiner er en forutsetning for videre oppdrettsvirksomhet (Berg, 2006). I en del fjorder er det mange oppdrettsanlegg og til dels meget tett mellom anleggene hvilket gir gode muligheter for oppblomstring og spredning av infeksjøs mikroorganismer (patogene organismer). Infeksjøs sykdommer som forekommer sporadisk i naturen kan også forekomme i oppdrettsanlegg og med så stor fisketetthet som det er i en merd kan dette føre til potensielt stor dødelighet (Gudding, Lillehaug, & Evensen, 1999). Mange virale fiskepatogener er i tillegg i stand til å forårsake persistente bærertilstander hos verten. Persistent infiserte individer skiller ut virus til omgivelsene og fungerer dermed som et konstant smittereservoir for andre fisk og kan føre til forøket dødelighet over lengre tid og potensielt dårlig vekst hos bærerfisken. Lave verdier av virus blir oftest isolert fra nyret hos fisk og det viser seg at noen virus, for eksempel infeksjøs pankreas nekrose virus (IPNV) kan replikere i og frigjøres fra makrofager i hodenyre uten å være cytolytiske, dvs drepe vertens celler (L. H. Johansen & Sommer, 1995). God fiskehelse er dermed ikke bare et spørsmål om dyrevelferd, men er også viktig for økonomisk bærekraftig oppdrettsnæring.

1.1 Vaksiner i lakseoppdrett

Da oppdrettsnæringen for alvor begynte å vokse på midten av 80-tallet satte også sykdomsproblematikken inn for alvor. Først ute var kaldtvannsvibriose, forårsaket av *Vibrio salmonicida* som forårsaket massive tap og stort forbruk av antibiotika i 1986-87. Antibiotikaforbruket nådde da sin topp med opp mot 50 tonn i 1987. Med utviklingen av vaksinen mot kaldtvannsvibriose (*V. Salmonicida*) gikk forbruket kraftig ned frem til furunkulose, forårsaket av bakterien *Aeromonas salmonicida* subspecies *salmonicida*, ble innført i norske farvann med en smolttransport fra Skottland og forårsaket en furunkulose epidemi tidlig på nittitallet. Etter at også denne sykdommen ble effektivt bekjempet med vaksine har antibiotikaforbruket holdt seg lavt mens produksjonen har fortsatt å øke (figur 1.1).



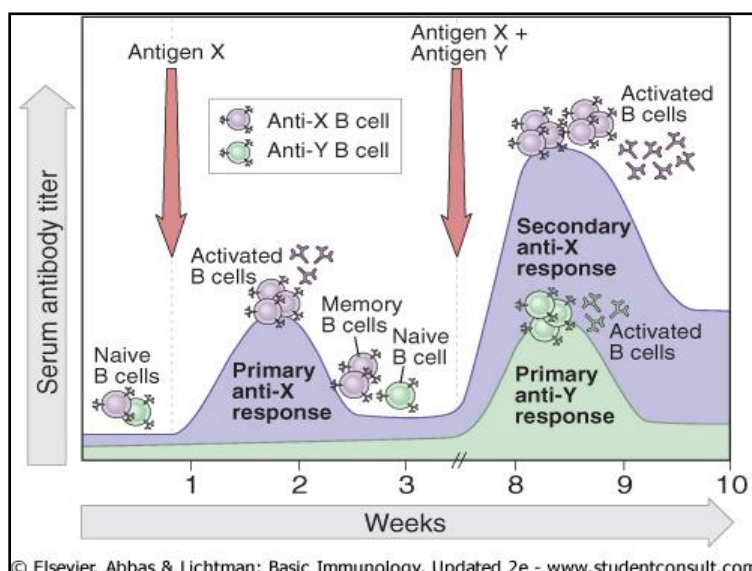
Figur 1.1. Forbruket av antibiotika i forhold til produksjonen av oppdrettsfisk i Norge fra 1980 til 2004. (ssb.no)

Ved vaksinerer trigg immunforsvaret vha beskyttende antigener. På den måten oppnår en spesifikk beskyttelse og hukommelse mot den sykdommen vaksinen er ment å gi beskyttelse mot (Berg, 2006). Tre forskjellige metoder benyttes til vaksinerer av fisk: injeksjon, dypp/bad og oral. Til laksefisk benyttes i all hovedsak injeksjonsvaksinerer, som gis intraperitonealt (i bukhulen). Det er den eneste metoden som i dag gir tilstrekkelig god og langvarig beskyttelse samt den eneste metoden der en kan benytte adjuvans (se lenger ned). Dypp/bad-vaksinerer gir god beskyttelse mot noen sykdommer, men effekten er kortvarig og det vil i mange tilfeller være behov for revaksinerer (T. Poppe & Bergh, 1999). I torskoppdrett er det behov for å vaksinerer yngel da torsk (*Gadus morhua*) er en marin art som lever hele livet i sjøvann og dermed er utsatt for smittepress hele livssyklusen. I tillegg er torsken lite utviklet ved klekking og gjennomgår en lang larveperiode før metamorfose (Kjorsvik, Vandermeeren, Kryvi, Arnfinnson, & Kvenseth, 1991). I larveperioden har torsken et lite utviklet immunsystem dermed er beskyttelsen en oppnår ved vaksinerer i tidlige livsstadier kortvarig (Schroder, Villena, & Jorgensen, 1998). Det er derfor vanlig å vaksinerer ved torsk dypp eller bad ved 1 og 10 gram og vaksinerer ved injeksjon når fisken er >30 gram (T. Poppe & Bergh, 1999; Schroder, Mikkelsen, Bordal, Gravningen, & Lund, 2006). For laksefisk er situasjonen en annen, da laksefisk har lavere fekunditet og larvene har et godt utviklet immunforsvar ved klekking (Magnadottir, Lange, Gudmundsdottir, Bogwald, & Dalmo, 2005). I tillegg er laksefisk anadrome arter som lever sine tidlige livsstadier i ferskvann, mens de patogenene som forårsaker de vanligste tapsbringende sykdommene finnes i sjøvann. Det er derfor vanlig å gi kun en injeksjonsvaksine til laksefisk når fisken er ca

30 gram (T. Poppe & Bergh, 1999). Oral vaksinering er i oppdrettssammenheng det klart letteste å gjennomføre og også det beste for fisken i og med at en slipper håndteringsstress. Dessverre er oral administrering av vaksine forbundet med stort forbruk av vaksine (Lillehaug, 1989) og effekten er ikke like god som ved injeksjon (Hart, Wrathmell, Harris, & Grayson, 1988)

1.1.1 Prinsippet bak vaksinering

Måten en trigger immunsystemet ved vaksinering på er ved å presentere spesifikke antigener til verten for at disse skal bli gjenkjent av vertens B- og T-lymfocytter. Etter vaksinering vil det også produseres såkalte hukommelsesceller som ved et nytt møte med det aktuelle antigenet vil være i stand til å sette i gang en raskere og mer effektiv eliminasjon av den patogene organismen (figur 1.2) (Abbas & Lichtman, 2006). Det er flere måter å presentere antigener for verten på ved vaksinering, det vanligste i fiskeoppdrett er bakteriner. Bakteriner er *vaksine laget av bakterier som er inaktivert av varme eller kjemikalier på en slik måte at de antigene egenskapene beholdes, mens de sykdomsfremkallende egenskapene ødelegges* (T. Poppe & Bergh, 1999). Bakteriesykdommene klassisk vibriose, kaldtvannsvibriose, furunkulose og yersiniose, forårsaket av hhv *vibrio sp.*, *aeromonas sp.*, og *yersinia sp* er i dag effektivt kontrollert med bakterinvaksine (Berg, 2006).



Figur 1.2. Primær- og sekundær immunrespons til samme antigen gjenkjent av B-lymfocytter, cellene av den humorale delen av adaptivt immunforsvar (Abbas & Lichtman, 2006)

Det har imidlertid vist seg vanskeligere å produsere effektive vaksiner mot virussykdommer. Det vaksineres mot virussykdommen Infeksiøs Pankreas Nekrose (IPN) (forårsaket av IPN virus, IPNV) som en del av en multivalent vaksine men denne sykdommen er likevel en av de mest tapsbringende sykdommene i norsk lakseoppdrett (ssb.no). Dette indikerer at det er problematisk å trigge den humorale og cellemedierte grenen av immunforsvaret samtidig.

1.1.2 Bivirkninger ved vaksiner

Ved inaktivering mister bakteriene replikasjonsevnen. Det er nødvendig da en ønsker å stimulere immunforsvaret uten å påføre sykdom. Problemet er imidlertid at immunogene egenskaper hos bakterien som er nødvendige for å indusere en immunrespons hos verten også kan inaktiveres (Midtlyng, Reitan, & Speilberg, 1996). Vaksine mot vibriose og yersiniose gir god beskyttelse i vannbaserte vaksiner med minimal bivirkninger (Gudding, et al., 1999), men tilfredstillende beskyttelse mot furunkulose (*A. salmonicida* subspecies *salmonicida*) over tid oppnås kun ved bruk av vaksine med oljeadjuvant (Midtlyng, Reitan, Lillehaug, & Ramstad, 1996). Adjuvant er substanser som aktiverer antigen presenterende celler ved å indusere ekspresjon av kostimulatorer på APC og ved å stimulere APC til å sekreere cytokiner som aktiverer T-celler (Abbas & Lichtman, 2006). I tillegg til kostimulatoriske effekter sørger adjuvansen for retensjon av antigener ved injeksjonsstedet slik at en oppnår depoteffekt av og stimulering over et lengre tidsrom (T. Poppe & Bergh, 1999).

I dag benyttes oljeadjuvans i alle de vanlige vaksiner for laks. Dette har imidlertid vist seg å forårsake til dels alvorlige bivirkninger som sammenvoksninger i bukhulen og melaninavleiringer på organer og muskel (T. T. Poppe & Breck, 1997). Det antas at dette medfører ubehag for fisken, avhengig av graden av sammenvoksninger. Ved store sammenvoksninger er det ikke tvil om at ubehaget for fisken er dyrevelferdsmessig uakseptabelt, men i og med at størsteparten av fisken ikke har bivirkninger utenfor rammen av det akseptable veies de velferdsmessige konsekvensene som følger med sykdom som tyngre enn bivirkningene av vaksine (Berg, 2006). Likevel kan en ikke utelukke at noen fisk påføres uakseptable lidelser, og en må jobbe for å på sikt kunne ta i bruk vaksiner som medfører mindre bivirkninger. Det forskes derfor intenst på alternative vaksinestrategier.

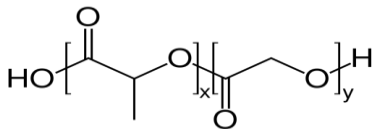
Levende, attenuerte vaksiner har potensielt mange fordeler, de har vist seg effektive i forsøk (Marsden, Vaughan, Fitzpatrick, Foster, & Secombes, 1998), er relativt enkel å produsere og det kreves små doser for å få tilfredsstillende respons. Likevel er det langt igjen før slike vaksiner eventuelt kan tas i bruk, da en enda ikke har god dokumentasjon over risikofaktorer som reversering til virulent form. En slik reversering vil kunne ha potensielt katastrofale følger med ukontrollert spredning av virulente patogener (Gudding, et al., 1999). En annen vaksineteknologi som har vist lovende resultater er DNA-vaksine, men også her er det langt igjen før slike vaksiner eventuelt kan tas i bruk. DNA vaksine går ut på å inkorporere gener som koder for antigener i plasmid DNA (pDNA) som dyrkes i bakterier administreres til verten ved injeksjon, vanligvis intramuskulært (Gillund, Dalmo, Tonheim, Seternes, & Myhr, 2008). pDNA vil da tas opp av vertens celler og genene som koder for antigenet transkriberes og translateres. DNA vaksiner er dermed meget effektiv mot virale infeksjoner da transkribering av antigener skjer inni vertens celler og dermed er i stand til å etterligne en virus infeksjon (Gudding, et al., 1999). Indusering av MHC klasse I cytotoxisk respons er vist i forsøk med flere eksperimentelle DNA vaksiner (Robertsen, 2008; Utke, et al., 2008). Innvendingene mot DNA vaksiner er blant annet skepsisen mot genmodifisering. Opptak av pDNA gir i prinsippet en genmodifisert organisme og må etter norske lover merkes som sådan. Dette er forbundet med mye skepsis blant forbrukere og følgelig lite lønnsomt for produsent. I tillegg kjenner en ikke de langsiktige miljøeffektene av DNA vaksiner. DNA er resistent mot nedbryting i naturen og horisontal genoverføring kan i teorien forekomme ved DNA fra feces og fôr fra oppdrettsfisk tas opp i andre organismer (Myhr & Dalmo, 2005). Vertikal overføring kan forekomme ved at rømt oppdrettsfisk gyter blant villfisk. Risikoen for autoimmunitet og reversering til virulens anses som små, men konsekvensene potensielt svært alvorlige (Gillund, et al., 2008).

1.2 PLGA nanopartikler som vaksinebærere

Bruk av biologisk nedbrytbare Poly (D-L-lactide-co-glycolic) acid (PLGA) og Poly (lactic) acid (PLA) nano- og/eller mikropartikler i vaksiner har i flere forsøk vist seg å være lovende (Lavelle, Jenkins, & Harris, 1997; Men, Tamber, Audran, Gander, & Corradin, 1997; Moore, et al., 1995; Tian, et al., 2008).

1.2.1 PLGA- og PLA-molekylet

PLGA er en polymer av sykliske av melkesyre og glykolsyre (*lactide* og *glycolide*), mens PLA kun består av melkesyre. PLGA syntetiseres ved at monomerene kobles suksessivt sammen med esterbindinger og danner et lineært molekyl (figur 1.3). PLA er et mer hydrofobt molekyl enn PLGA da dette molekylet har en metylgruppe mer per enhet. Både PLA og PLGA kan være strukturløse eller ha meget krystallin oppbygning, avhengig av sammensetningen av høyre/venstre stereoisomerer (D- og L-stereoisomerer) der homogen sammensetning (for eksempel poly (L-lactic acid) har den mest krystalline formen, mens poly(D,L-lactide-co-glycolide) er helt amorf (Jiang, Gupta, Deshpande, & Schwendeman, 2005). PLGA er godkjent av US Food and Drug Administration (FDA) da det har vist liten/ingen toksisk effekt, er biokompatibelt og nedbrytbart ved at esterbindingene hydrolyseres i kontakt med vann. I cellene brytes PLGA ned i Kreb's syklus i mitokondriene til avfallsproduktene CO₂ og H₂O. I det videre omtales kun PLGA om ikke annet er oppgitt.

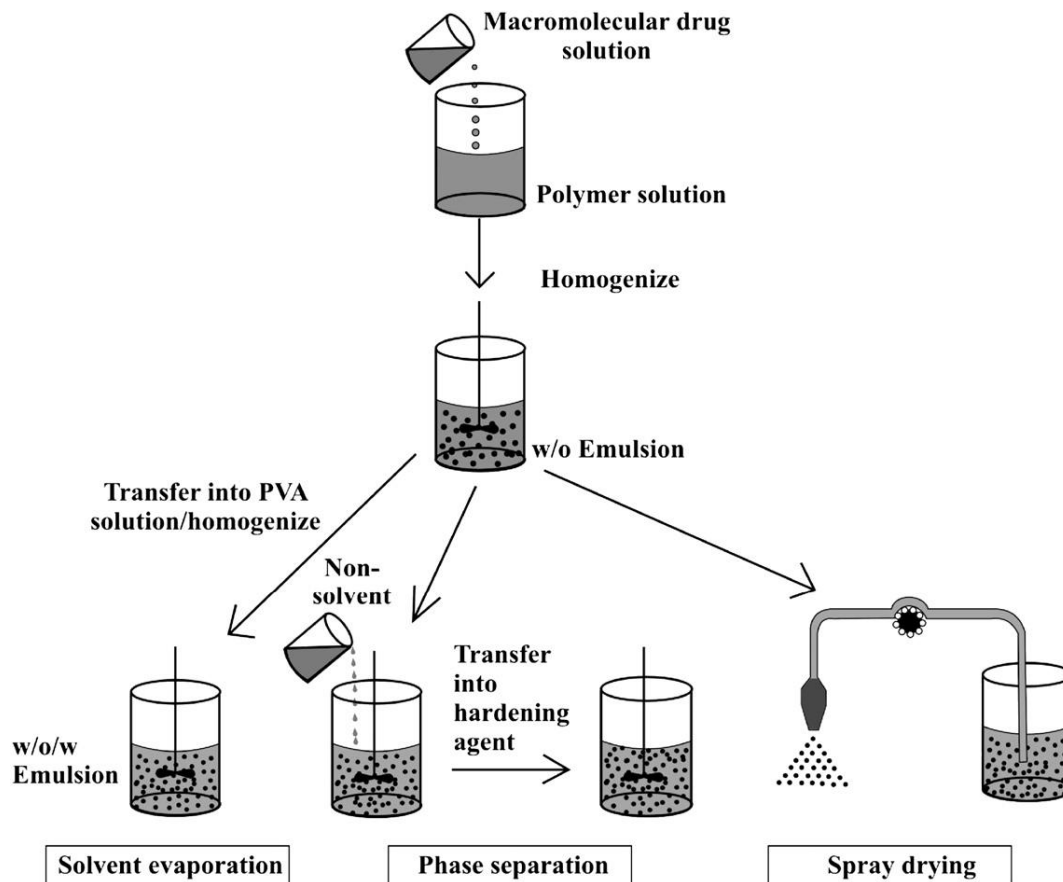


Figur 1.3. Strukturen til Poly (lactide-co-glycolide)acid (PLGA). X er antall enheter melkesyre og Y er antall enheter glykolsyre. Hentet fra www.pharmainfo.net

1.2.2 Preparering av PLGA nanopartikler (NP) og mikropartikler (MP)

PLGA og PLA partikler defineres som nanopartikler eller mikropartikler etter størrelse; partikler som er mindre en 1000 nm i diameter defineres som NP, mens partikler som er større enn 1000 nm i diameter regnes som MP (Mundargi, Babu, Rangaswamy, Patel, & Aminabhavi, 2008). Tre forskjellige metoder benyttes til preparering av PLGA NP og MP: vann-i-olje-i-vann (w/o/w) emulsjonsteknikk, fase-separasjonsteknikker og spraytørking (Freitas, Merkle, & Gander, 2004). I alle tre teknikkene lages først en vann-i-olje (w/o) emulsjon der peptidet/proteinet er løst i en vandig fase som tilsettes oljefasen hvor polymeret er løst. Emulsjonen dannes ved høyhastighets homogenisering eller sonikering (ultral lyd). Ved w/o/w-teknikken tilsettes en første emulsjon til en ny vandig fase under homogenisering for preparering av w/o/w emulsjonen etterfulgt av fordamping av organiske løsemidler. Ved fase separasjon tilsettes en "non-solvent" for induisering av koacervering, mens spraytørkingsteknikk er basert på atomisering av emulsjonen under en strøm av

varmluft. Partiklene dannes da som følge av intens løsemiddelevaporering (Mundargi, et al., 2008). Figur 1.4 viser skjematisk hovedprinsippene bak disse metodene.



Figur 1.4. Skjematisk oversikt over de tre metodene som brukes til å lage PLGA NP og MP. Hentet fra (Mundargi, et al., 2008).

1.2.3 PLGA partikler som bærere av medikamenter/antigener

Det har i lengre tid vært forsket mye på bruken av partikler (primært mikropartikler) i humanmedisin da disse er godt egnet for medisinerings der en har behov for langvarig virkning av for eksempel proteiner, peptider og legemidler som har for kort halveringstid *in vivo* til at de effektivt kan administreres oralt eller gjennom hud (Mundargi, et al., 2008). Ved å inkapsulere proteiner og peptider i nedbrytbare PLGA partikler kan en oppnå frigjøring av proteiner over tid og dermed langvarig virkning. Tiden det tar for nano- og mikropartikler av PLGA å brytes ned avhenger blant annet av molekylvekt, porøsitet, størrelse, overflateladning (zeta potensial) og forholdet mellom polymerets sammensetning av melkesyre og glykolsyre (L:G-forholdet) (Jiang, et al., 2005). Høyere molekylvekt og større melkesyreandel fører til lengre nedbrytningstid. Mer porøse partikler brytes ned hurtigere pga at vann trenger inn i porene og forårsaker hydrolyse, mens tette, harde partikler med

glatt overflate brytes saktere ned. Partiklenes morfologi bestemmes i stor grad av prepareringsprosedyren, men molekylvekt og L:G-forholdet har også innvirkning (Yushu & Venkatraman, 2006). Partiklenes morfologi bestemmes blant annet av homogeniseringshastighet, vann:olje forholdet i første emulsjon og PLGA (%) i oljefasen (Yushu & Venkatraman, 2006). Ved å justere disse faktorene kan en i teorien modifisere kinetikken antigenet frigjøres fra partiklene og ved å kombinere ulike formuleringer i en og samme injeksjon kan en også oppnå primær- og sekundær(boost)-injeksjon ved en enkelt injeksjon. Katare og medarbeidere har vist høy og langvarig antistofftiter i serum fra rotte (*Rattus norvegicus*) etter intramuskulær immunisering med tetanus toxoid inkapsulert i PLA partikler av forskjellig størrelse. Små mikropartikler (2-8 μm) viste høyeste antistoffrespons mens store mikropartikler (50-150 μm) viste lavest respons. Partikler som var 10-70 μm og partikler $<2 \mu\text{m}$ viste middels respons (Katare, Muthukumaran, & Panda, 2005).

Problemet med inkapsulering har imidlertid vært at integriteten til antigenet har vært til dels dårlig ivaretatt under prepareringen av partiklene, i tillegg til at det sure miljøet som dannes når polymeret hydrolyseres har negativ effekt på proteinstabilitet (Bittner, et al., 1998; Mundargi, et al., 2008). Et annet problem er inkapsuleringseffektiviteten av antigen. Effektiviteten kan være vanskelig å få opp på tilfredsstillende nivå (75-100%), slik at selv om partiklene er effektive som transportører/depot av antigenet samt at det kreves mindre antigen for å oppnå god respons (Shen et al 2006), går til dels store mengder antigen tapt grunnet lav inkapsuleringseffektivitet. Høy inkapsuleringseffektivitet er spesielt viktig ved inkapsulering av rekombinant produserte antigener. Det er dog vist at inkapsuleringseffekten og stabiliteten til protein kan økes betraktelig ved koinkapsulering av additiver (P. Johansen, et al., 1998). Johansen og medarbeidere viste at hydrofile substanser som trehalose hadde god effekt på inkapsuleringseffektiviteten, men i seg selv ikke hadde noen effekt på proteinstabilitet. Koinkapsulering av BSA viste seg å forlenge frigjøringsperioden hvilket bidro til økt boostereffekt (P. Johansen, et al., 1998).

1.2.4 Opptak av PLGA partikler i makrofager og dendritiske celler

Overflateladning, ofte omtalt som zeta-potensial, har også innvirkning på nedbrytningshastighet da mer hydrofobe molekyler vanskeligere lar seg bryte ned ved hydrolyse, men er en viktigere faktor med tanke på opptak i makrofager (Y. W. Yang & Hsu, 2008). På grunn av negativt ladete proteoglykaner og andre bindende proteiner på

overflaten til makrofager og dendritiske celler endocytteres kationiske molekyler lettere enn anioniske molekyler (Karlsson, Edfors-Lilja, & Bjornsson, 2000). PLGA tas uten hindring opp i mammalske dendritceller, de vanligste Antigen Presenterende Celler (APCs) hos mennesker (Yoshida & Babensee, 2004) noe som skjer ved endocytose (Y. W. Yang & Hsu, 2008). En kan manipulere opptaket ved å endre zeta-potensialet til partiklene og/eller coate dem med komponenter (f.eks poly etylen glykol, PEG) som kan inhibere endocytose (Esmaeili, et al., 2008). Å inhibere endocytose kan være aktuelt hvis en ønsker at partikler og antigener skal forefinnes i blodsirkulasjonen i et lengre tidsrom.

1.2.5 PLGA nanopartikler som vaksinebærere

Det har vist seg vanskelig å vaksinere mot intracellulære patogener hos fisk. Dette er fordi patogener kan gjemme seg intracellulært og fordi de også ofte replikerer i cytoplasma (Gudding, et al., 1999). Virus og en del bakterier, for eksempel *Renibacterium salmoninarum*, *Piscirickettsia salmonis* (T. Poppe & Bergh, 1999) og *Francisella sp.* (Olsen, et al., 2006) er eksempler på dette. For å bekjempe intracellulære patogener kreves det ofte en annen type immunologisk forsvar, det såkalte cellulære forsvaret som blant annet består av enzymer og oksygenradikaler. For å fremme et cellediært forsvar er ofte såkalte type 1 T-hjelpecelle respons og cytotoxiske responser sentrale (Janeway, 2005). Normal vaksinasjon ved bruk av oljeholdige vaksiner bidrar først og fremst til dannelse av antistoffer, men ikke til forsterking av det cellulære forsvaret (Salerno-Goncalves & Szein, 2006). Hensikten med å innføre nano- og mikropartikler i vaksinasjonssammenheng er at de har vist seg effektive i å inducere ikke bare robuste antistoffresponser, men også cytotoxiske responser (CD8 mediert, se side 16) samt Th1 responser (Hamdy, et al., 2007; Men, et al., 1997; Moore, et al., 1995; Parsa, Wang, Fuller, Langer, & Pfeifer, 2008; Shen, et al., 2006).

1.2.5.1 Om Th1 og Th2 i fisk

Det er fremdeles mye som er ukjent når det kommer til utviklingen av immunresponser hos fisk. Det er også stor variasjon mellom forskjellige arter, og kunnskap om en art kan ikke nødvendigvis overføres til en annen. Men enkelte gener som er funnet hos arter som står langt fra hverandre taksonomisk er i dag antatt å finnes hos de aller fleste om ikke alle fiskearter. Dette gjelder viktige cytokiner som en rekke interleukiner, tumor nekrose faktor (TNF) alfa og interferoner. Se review (Secombes, 2008). De fleste cytokinene som er involvert i det adaptive immunsystem er også påvist i fisk (Bird, Zou, & Secombes, 2006).

Effektorer av Th1 responser som IFN γ , IL-12 IL-18 og IL-2 er kjent. Av cytokiner som er kjent for å stimulere til differensiering til Th2 celler er et IL-4 lignende molekyl funnet, men det er ikke påvist at dette er en homolog til mammalsk IL-4, til det ser det ut som de sekvensielle forskjellene er for store. det er dog en mulighet for at dette molekylet utøver noen av de samme effektene som IL-4, dette styrkes av at GATA-3 er påvist i fisk og at det dermed ser ut som Th2 responser finnes i fisk (Secombes, 2008)

Forsøk med PLGA partikler på mammalske cellekulturer har vist lovende resultater, blant annet har et forsøk med rekombinant HIV-virus inkapsulert i PLGA mikropartikler vist både CD4⁺ og CD8⁺ T-celle respons (Moore, et al., 1995). Et annet forsøk med PLGA nanopartikler med inkapsulert ovalbumin (OVA) og monophosphoryl lipid (MPLA) viste kraftig økning av CD8⁺ T-celle respons *in vitro* og over 13 folds økning i klonal CD4⁺ ekspansjon *in vivo* (Hamdy, et al., 2007). Nivåene for opptak og presentasjon av løselige antigener i APC/dendritiske celler er vanligvis lave, men Shen og medarbeidere har vist T celle IL-2 sekresjon induert av PLGA inkapsulert ovalbumin ved 1000 ganger lavere konsentrasjon enn løst antigen og 10 ganger lavere konsentrasjon enn med antigen festet til overflaten av latex kuler (Shen, et al., 2006). Dette tyder på at PLGA inkapsulert antigen tas opp og presenteres mer effektivt til T-celler og dermed inducerer høyere IL-2 produksjon enn løselig antigen alene. Sammenlignet med bakteriell vektor som transportør av antigen-bærende plasmid DNA (pDNA) er PLGA mikropartikler vist å være opptil 30 ganger mer effektiv ved lave konsentrasjoner (Parsa, et al., 2008). Forskjellen her var mindre ved høye konsentrasjoner av pDNA.

1.2.6 Forsøk på fisk

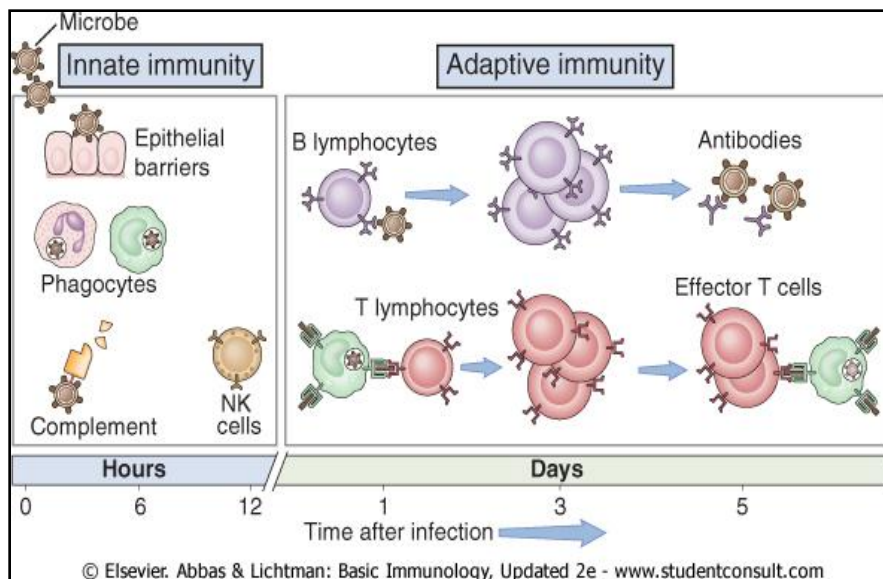
Det har vært forsket veldig lite på PLGA partikler som vaksinebærere i fisk. To forsøk er publisert så langt, begge med oral administrering av partiklene. I det ene forsøket ble proteinantigenet *human gamma globulin* (HGG) inkapsulert i PLGA mikropartikler og administrert oralt til regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Lavelle, et al., 1997). Dette forsøket viste at inkapsulerte proteiner passerte saktere gjennom tarmsystemet enn løselige proteiner. Det ble detektert større mengder intakt HGG lengst bak i tarmen og i blodet hos fisk immunisert med inkapsulert protein, men det ble også detektert en del fragmentert protein. Dette indikerte at inkapsuleringen trolig ikke var optimal og at en del protein var festet til overflaten av partiklene. Antistoffresponsen var ikke signifikant forskjellig mellom fisk immunisert med løselig protein og inkapsulert protein (Lavelle, et al., 1997). I et senere

forsøk, utført på Japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*), ble PLGA mikropartikler med inkapsulert pDNA som kodet for major capsid protein (MCP) hos lymphocystis disease virus administrert oralt (Tian, et al., 2008). Her ble det vist lovende resultater da antistoffresponsen i serum var forhøyet fra 1 uke til 24 uker med høyest respons etter 9 uker sammenlignet med fisk immunisert med nakent pDNA, som ikke viste noen antistoffrespons.

Det er også vist at *ex vivo* makrofager fra hodenyret hos atlantisk laks tar opp PLGA nanopartikler. Et opptaksstudium hvor nanopartikler merket med inkapsulert BSA-I¹²⁵ ble intraperitonealt injisert i parr av atlantisk laks (45 gram) viste at antigen/partikler var å finne i blod 6 timer etter injeksjon og at hodenyren var det organet som akkumulert mest antigen/partikler (personlig kommunikasjon, B.N. Fredriksen).

1.3 Immunsystemet

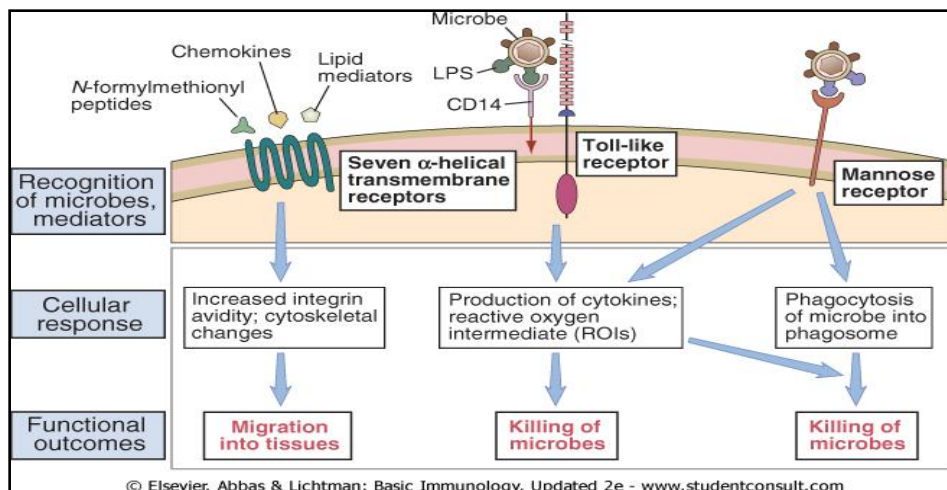
Immunitet defineres som organismens evne til å bekjempe infeksjøs sykdommer og de celler, vev og molekyler som medierer denne bekjempelsen kalles immunsystemet. Immunsystemets fysiologiske funksjon er å bekjempe infeksjøs sykdommer; å forhindre at patogene organismer kommer inn i kroppen og å bekjempe invaderende organismer (Abbas & Lichtman, 2006). En skiller hos høyerestående vertebrater vanligvis mellom det medfødte immunsystem (IIS) og det adaptive immunsystem (AIS) (Figur 1.5). De medfødte immunresponsene settes i gang før de adaptive og spiller i tillegg en viktig rolle både i aktiveringen av det adaptive forsvaret og i hjelpefunksjoner til de adaptive immunmekanismene (Magnadottir, 2006). Det medfødte immunforsvar hos fisk består av fysiske barrierer som skjell, mukus og epitel, cellulære komponenter som fagocytterende celler (monocytter/makrofager, neutrofiler) og naturlige drepeceller (NK celler) og humorale komponenter som lysosymer, agglutinin, naturlige antistoffer, cytokiner, kjemokiner og komponenter i komplementsystemet (tabell 1.1). Flere av disse humorale komponentene finnes også i slimlaget (Dixon & Stet, 2001; Kryvi & Totland, 1997; Magnadottir, 2006). Det adaptive immunforsvar består av B- og T-lymfocytter. Disse dannes hovedsakelig i de mest sentrale lymfoide organene hos fisk: Thymus og hodenyret og modning av lymfocytter skjer i thymus. Sentrale hematopoietiske organer er milt og hodenyre. særlig har hodenyre vist seg å være rikt på trombocytter, granulocytter og monocytter (Kryvi & Totland, 1997).



Figur 1.5. Det medfødte og adaptive immunforsvar (Abbas & Lichtman, 2006).

1.3.1 Det medfødte immunforsvar

Reseptorene i det medfødte forsvar kjenner igjen strukturer som er vanlige hos flere klasser av mikrober men som ikke forekommer blant pattedyr, såkalte "pathogen-associated molecular patterns" (PAMPs). Eksempler på slike strukturer er bakterielt LPS, terminal mannose residuer på glykoproteiner, dobbeltrådige RNA-molekyler og umetylerte CpG nukleotider. Dette er komponenter som er essensielle for mikrobens patogenitet og/eller overlevelse og gjør det dermed vanskelig for mikrobene å mutere for å unngå gjenkjennelse. Som følge av det er det medfødte immunforsvaret svært effektivt i bekjempelsen av patogener (Abbas & Lichtman, 2006; Ellis, 2001). Slike reseptorer kalles ved en fellesbetegnelse "pattern recognizing receptors" (PRRs) og finnes på overflaten av fagocytterende celler. Eksempler på PRRs er Toll-like receptor (TLR), N-formyl methionylreseptor og mannose reseptor (figur 1.6.) (Abbas & Lichtman, 2006). Gjenkjennelse av PAMPs av PRRs aktiverer makrofager til fagocytose og produksjon av cytokiner og kjemokiner. Cytokiner er små proteiner som sekreses av en rekke celler i forbindelse med en immunrespons og induserer celleresponser ved binding til spesifikke reseptorer. Cytokiner som stimulerer migrering av celler (særlig fagocytter og lymfocytter) til infiserte områder kalles kjemokiner (kjemoattraktant cytokiner) (Janeway, 2005). Disse kan igjen aktivere lymfocytter i det adaptive immunforsvar og ytterligere eskalere den medfødte immunresponsen gjennom positiv feedback systemer. Både egenproduserte og cytokiner fra andre typer celler kan ha denne effekten (Mantovani, et al., 2004).



Figur 1.6. Pathogen recognition receptors (PRRs) og deres virkemåte (Abbas & Lichtman, 2006)

NK celler er lymfocytter som cellene i det adaptive immunforsvar, men uttrykker hverken immunglobuliner eller T-celle reseptorer (TCR). I stedet uttrykker de karakteristiske overflatemolekyler som kjenner igjen vertens egne celler dersom disse er endret på grunn av en mikrobiell infeksjon og utøver cytotoxisk effekt overfor disse (Ortaldo & Hiserodt, 1989; Trinchieri, 1989). I tillegg til å drepe infiserte vertsceller produserer aktiverte NK celler store mengder cytokiner som aktiverer cellene i AIS og spiller dermed en viktig rolle i aktiveringen av adaptive immunresponser. Hvilede NK celler er konstant sirkulerende i blod og vev hos alle friske individ, og er "naturlig" funksjonelt aktive. Som følge av dette kan de respondere i løpet av minutter ved interaksjon med celler som uttrykker alternerte strukturer eller antistoffer på overflaten. Andre NK celfunksjoner, som produksjon av cytokiner og regulering av hematopoietiske og adaptive immunceller medieres også av hvilede NK celler. Denne evnen til å respondere uten preaktivering gjør at NK celler er svært aktive og viktige i førstelinjeforsvaret mot patogener (Trinchieri, 1989).

Tabell 1.1 Oversikt over komponenter i det medfødte immunforsvaret hos teleost fisk. Basert på (Abbas & Lichtman, 2006) og (Magnadottir, 2006)

Komponenter	Funksjon
Fysiske barrierer	
Skjell	Fysisk barriere
Mucus	Fysisk og kjemisk barriere
Cellulære komponenter	
NK-celler	Uttøver cytotoxisk effekt på infiserte celler som uttrykker MHC klasse 1 molekyler på overflaten. Syntetiserer og sekreterer IFN γ
Neutrofile celler	Fagocytose, cytokin produksjon og aktivering av andre fagocytterende celler
Monocytt/makrofager	Fagocytose, cytokinproduksjon, inflammatorisk respons, stimulering av T-lymfocytter
Humorale komponenter	
Komplement systemet	Opsonere mikrober for fagocytose, indusere apoptose i infiserte celler, osmotisk lysing av mikrober
Interferoner/Mx proteiner	Inhiberer virusreplikasjon, en rekke funksjoner i medfødte og adaptive immunresponser
Transferriner	Aktivering av makrofager, inhibitor av bakterielle vekstfaktorer. Binder jern
Lytiske enzymer	Fasilitere fagocytose ved å endre zeta-potensialet til mikrober.
Antibakterielle peptider	Bakteriostatisk og bakteriolytisk
Lectin	Aktivering av komplement
C-reaktiv protein	Opsonisering av mikrober, aktivering av komplement, indusering av cytokinproduksjon og frigjøring

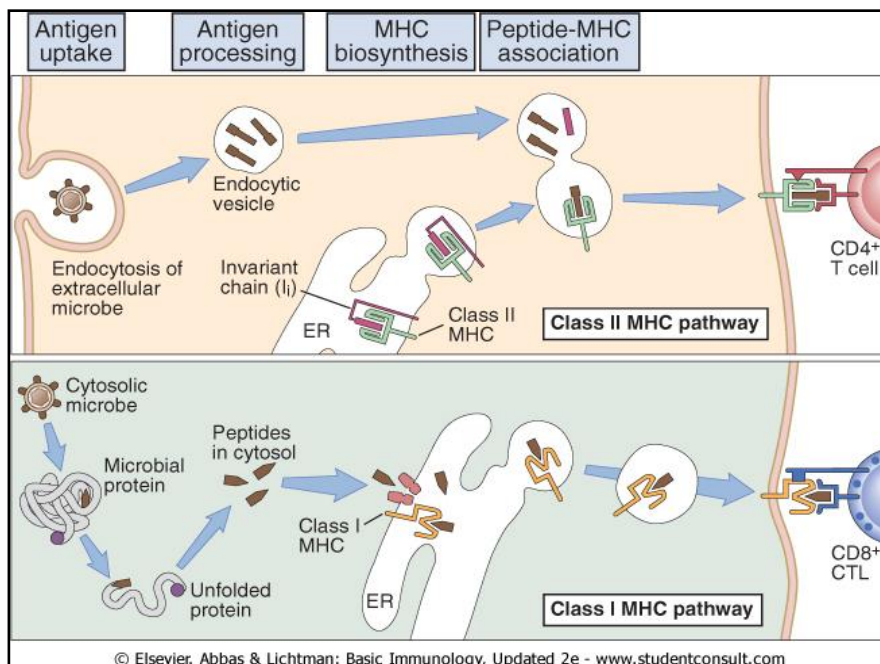
Medfødte immunresponser i fisk består av både konstitutive mekanismer som aktivering av NK-celler og responsive, induserbare mekanismer som interferon produksjon. Viktigheten av disse kan i stor grad illustreres ved tre karakteristikk: uspesifikk beskyttelse, rask respons og de er relativt temperaturuavhengige. For poikilotherme dyr som fisk er dette av spesielt stor betydning da spesifikke immunresponser er svært temperaturavhengige og dermed kan ta opptil flere uker å respondere selv ved optimale temperaturer. Tar vi i betraktning at mange patogener hos fisk forårsaker akutte sykdomsforløp og at fisken i mange tilfeller dør etter bare noen dager er ikke det vanskelig å forstå at medfødte immunresponser trolig er viktigere i fisk enn i pattedyr. (Ellis, 2001). Evolusjonsteori gir også plausible grunner til å forvente kraftige medfødte immunresponser hos fisk da adaptive immunsystemer som RAG (recombination activating gene) og lymfoide systemer ikke er observert hos kjeveløse fisk (Agnatha), men først hos kjevafisk (gnathostoma) (Flajnik, 1998). Likevel har både agnathaer og alle invertebrater et forsvar mot patogener og en kan dermed anta at det er det medfødte immunforsvar alene som bekjemper sykdommer. Ettersom teleoster er blant de første taxa med adaptivt immunforsvar kan en videre forvente at det medfødte immunforsvar fremdeles er meget sterkt. (Bayne & Gerwick, 2001)

1.4 Det adaptive immunforsvar

Det adaptive immunforsvar består hovedsakelig av to typer celler; B-lymfocytter og T-lymfocytter. Disse er morfologisk like men utøver svært forskjellige funksjoner og utgjør således to forskjellige grener av adaptivt immunforsvar, hhv humoral og cellemediert immunitet (Abbas & Lichtman, 2006). B-lymfocytter uttrykker og produserer immunoglobuliner (antistoffer) som er de funksjonelle bestanddelene i den humorale grenen av adaptiv immunitet. Antistoffer kan være spesifikke for en rekke forskjellige molekyler, inkludert polysakkarider og lipider. T-lymfocytter medierer det cellemedierte forsvar som bekjemper intracellulære patogener (Abbas & Lichtman, 2006). Reseptorene på T-lymfocytterne (TCR) kjenner kun igjen antigener som er peptider og aktiveres bare når disse presenteres av antigen presenterende celler (APC) (McBride & Fathman, 2002).

1.4.1 Cellemediert immunrespons

T-celler gjenkjenner peptider fra patogener presentert på MHC-molekyler på Antigen presenterende celler (APC). Assosiert med T-celle reseptoren (TCR) finnes også CD4 eller CD8 koreseptorer som kjenner igjen selve MHC-molekylet for å sikre at det er individets egen APC som presenterer peptidet. To typer MHC molekyler, MHC klasse I og MHC klasse II kjennes igjen av hhv CD8 og CD4 reseptorer. APC frakter mikrober til lymfoide organ der naive T-celler sirkulerer. Ved gjenkjenning av antigen samt stimulering mottagelse av andre signaler enten fra det medfødte immunsystemet eller fra mikrober differensierer naive T-celler til effektor T-celler og prolifererer. TCR har svak affinitet for sine antigener, og det er derfor nødvendig å forsterke bindingen av T-celler til APC. Dette gjøres av såkalte adhesjonsmolekyler, integriner (McBride & Fathman, 2002). På hvilende T-celler har integrinene lav affinitet til sine ligander, men når T-cellen stimuleres av kjemokiner produsert som følge av innat immunrespons konverteres integrinene til en høy-affinitets tilstand samtidig som de klumper seg sammen og dermed fører til sterk og langvarig binding til APC (Abbas & Lichtman, 2006). Selv om både CD4 positive ($CD4^+$) og CD8 positive ($CD8^+$) celler begge er T-celler og morfologisk like er effektor funksjonen til disse cellene svært forskjellige. $CD4^+$ celler kalles også T-hjelpeceller og har som funksjon å aktivere andre celler. Det er to typer $CD4^+$ celler: type 1 T-hjelpeceller (Th1) og type 2 T-hjelpeceller (Th2) som fungerer ved å aktivere hhv $CD8^+$ T-celler og B-celler. $CD8^+$ celler kalles også cytolytiske T-celler (CTL) og har som funksjon å lysere infiserte vertsceller (Mosmann & Coffman, 1989). Gener som koder for MHC hos fisk ble først isolert fra karpe i 1990 (Hashimoto, Nakanishi, & Kurosawa, 1990). Det viser seg imidlertid at organiseringen av disse genene skiller seg fra mammalske organismer der MHC er et sett gener linket sammen i et kompleks på samme kromosom (Campbell & Trowsdale, 1993). I teleost fisk er de ikke linket sammen i et kompleks, men finnes på flere forskjellige kromosomer og kalles derfor MH-reseptorer (Sato, et al., 2000).

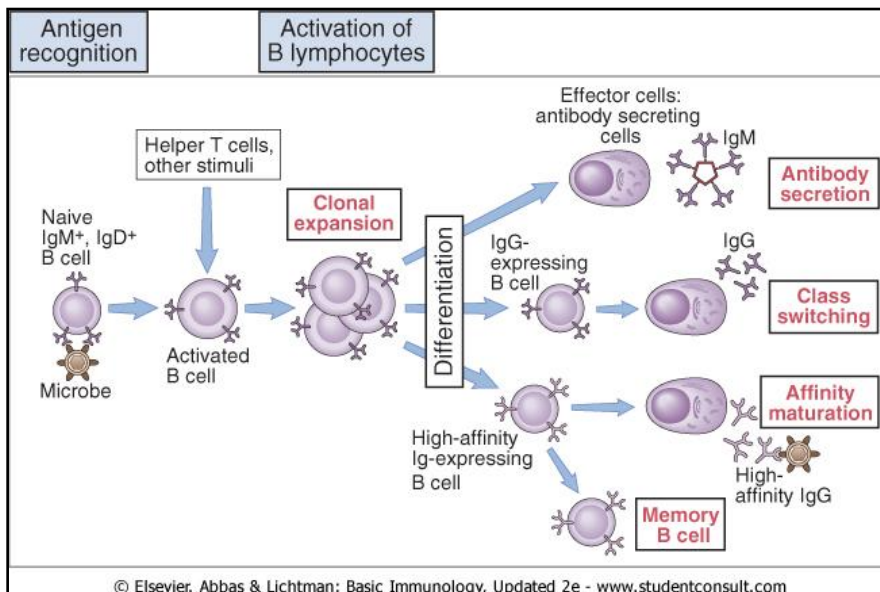


Figur 1.7. hovedprinsippene bak aktivering av CD4⁺ og CD8⁺ T-celler (Abbas & Lichtman, 2006)

Aktiverte CD4⁺ T-celler differensierer til enten Th1 hjelpeceller eller Th2 hjelpeceller. Disse har forskjellige funksjoner og sekreterer forskjellige cytokiner. Th1 celler sekreterer store mengder interferon γ (IFN γ) og lymfotoksin og styrker dermed bekjempelse av intracellulære patogener. IFN γ aktiverer makrofager og inhiberer proliferering av Th2 celler. Th2 celler bidrar til bekjempelse av ekstracellulære patogener gjennom sekresjon av B-lymfocytstimerende cytokiner. (Chakir, Wang, Lefebvre, Webb, & Scott, 2003) I tillegg er det vist at IFN γ inhiberer produksjon av interleukin 4 (IL-4), et viktig cytokin i differensieringen av Th2 hjelpeceller (O'Garra, 2000; Szabo, et al., 2000). T-bet stimulerer produksjon av IFN γ , både ved transaktivering av IFN γ genot og ved endogen produksjon av IFN γ , men har overraskende nok ikke direkte inhiberende effekt på IL-4 promoter transaktivering. (O'Garra, 2000) T-bet er vist å stimulere til differensiering av til Th1 celler, ikke bare i naive CD4⁺ celler og celler under utvikling til å bli Th2 celler, men også etablerte Th2 celler (Szabo, et al., 2000).

1.4.2 Humoral immunrespons

Det humorale immunforsvar består av B-lymfocytter. B-cellereseptorer (BCR) kalles immunoglobuliner (Ig) og finnes både membranbundet på naive B-celler (IgM og IgD) og løst i sirkulasjonen (IgG, IgA, IgE). Ig i sirkulasjonen kalles antistoffer. I møte med antigener prolifererer B-cellene og differensierer til effektor celler som sekreter store mengder antistoffer spesifikke for det antigenet som initierte B-celle responsen. Noen B-celler med meget høy affinitet til sine antigener vil differensiere til hukommelses celler (Rajewsky, 1996). Mens TCR bare kjenner igjen proteinantigener kjenner BCR igjen en rekke forskjellige antigener, også karbohydrater og lipider. Men proteinantigener alene induserer svak eller ingen immunrespons. Proteinantigener må prosesseres i APC og presenteres for Th2 celler som videre aktiverer B-celler. Slik B-celle respons sies derfor å være T-avhengig. Lipider og karbohydratantigener stimulerer B-celler uten Th2 celled hjelp og sies derfor å være T-uavhengig (Janeway, 2005).



Figur 1.8. oversikt over aktivering og differensiering av B-celler (Abbas & Lichtman, 2006).

1.4.3 Th1/Th2 modulerende cytokiner og vaksiner

Det er kjent fra studier i pattedyr at ulike vaksiner kan indusere ulike T-hjelpe responser. (Vaksine er en medisinsk suksesshistorie der effekten har vært kjent lenge før en begynte å kartlegge mekanismene bak.) Det ble tidlig vist at vaksine også kan indusere Th1 respons i utviklingen av vaksinen mot leishmaniose (D. M. Yang, et al., 1990). Det er også vist at *Incomplete Freund's adjuvans* (IFA) er en potent faktor for indusering av CTL respons (Valmori, et al., 1994). IFA er imidlertid ikke godkjent for humanvaksinering, så i et senere forsøk ble PLGA mikropartikler testet som alternativ adjuvans og vist å indusere CLT respons sammenlignbar med den av IFA (Men, et al., 1997). PLGA partikler er også benyttet i arbeidet med å utvikle vaksine mot HIV da proliferering av både CD8⁺ og Th1 type CD4⁺ celler etter immunisering med PLGA inkapsulert protein (Moore, et al., 1995). Det er senere vist at ved å endre form og mengde antigen i en DNA vaksine kan en manipulere proliferering av T-celler i forskjellige retninger (CTL, Th1, Th2) (Rush, Mitchell, & Garside, 2002). β -glukaner er kjent som en modulator av immunresponser, men hvorvidt β -glukan kan styre T-celle responser er mindre kjent (Dalmo & Bogwald, 2008)

En rekke cytokiner og transkripsjonsfaktorer spiller en rolle i hvilke immunresponser som settes i gang i møte med et antigen. To slike faktorer som er T-box transcription factor (T-bet) og GATA-3 som ser ut til å dirigere differensieringen av CD4⁺ T celler i retning av hhv Th1 og Th2 (O'Garra, 2000). T-bet stimulerer til differensiering av Th1 celler samtidig som differensieringen til Th2 celler inhiberes (Szabo, et al., 2000) og GATA-3 utøver motsatt effekt (Ferber, et al., 1999). Måten det skjer på er at transkripsjonsfaktorene stimulerer produksjon av cytokiner. T-bet stimulerer til produksjon av IFN γ , et sentralt cytokiner i differensieringen av naive CD4⁺ T-celler til Th1 type hjelpeceller, mens GATA-3 stimulerer produksjon av IL-4 og IL-5 som er viktige cytokiner i differensieringen til Th2 celler. I tillegg har både IFN γ og T-bet inhiberende effekt på produksjonen av IL-4 og IL-5, mens GATA-3 og IL-4 inhiberer produksjon av IFN γ (Szabo, et al., 2000).

Dermed kan en ved å måle transkripter av T-bet, GATA-3, IFN γ og IL-4 få et bilde av hvilke immunresponser som er satt i gang i en organisme etter immunisering (Chakir, et al., 2003)

1.5 Hensikt med oppgaven

Det er ikke kjent hvorvidt partikulære vaksinebærere som PLGA kan indusere økt antistoffrespons hos fisk etter intraperitoneal injeksjon, ei heller om PLGA basert vaksine induserer transkriptresponser for ulik T-celle differensiering i fisk. For å finne ut mer om disse forhold ble følgende hypotese laget:

”PLGA nanopartikler induserer økt antistoffproduksjon, samt øker ekspresjon av Th1 relaterte transkript etter immunisering.”

For å undersøke dette ble det laget en PLGA NP basert vaksine der et haptenisert protein (TNP-LPH) og β -glukan (lamiran) ble benyttet som hhv antigen og adjuvans. Som kontroller ble antigen og adjuvans også administrert hver for seg og sammen fortynnet i PBS og i kombinasjon med freunds complete adjuvans (FCA).

Spesifikk antistoffrespons mot haptenisert protein ble målt vha enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) fra serum 1, 2 og 3 måneder etter immunisering samt 1 og 2 måneder etter boostinjeksjon.

Indikatorer på innat, cellulær og humoral immunrespons ble undersøkt ved å kvantitere mRNA-uttrykket av hhv IFN γ , T-bet og GATA-3 fra hodenyre og milt 1-8 dager etter immunisering.

2 Materialer og metoder

2.1 Forsøksdyr

I forsøket ble det brukt uvaksinert parr av atlantisk laks, *Salmo salar*, fra Aqua Gen A/S, Hemne. Fisken ble levert som øyerogn og siden fertilisert ved Havbruksstasjonen i Tromsø der forsøket ble utført. Fra klekking til startfôring gikk fisken på konstant mørke (0:24) og temperatur 8 °C, deretter på sommerlys (24:0) og temperatur 14 °C. To mnd før forsøkets oppstart ble lysregimet endret til vinter (6:18) og temperatur senket til naturlig. Forsøkets varighet var 3 mnd. Gjennomsnittlig temperatur i mnd 1, 2 og 3 var hhv 6,8 °C, 3,3 °C og 7,0 °C. Temperaturen ble økt igjen til 7 °C i siste mnd av forsøket. Ved starten av forsøket var gjennomsnittlig vekt 29, 0 g. Fisken ble fôret med 2 mm Nutra parr fra skretting A/S etter appetitt. Fisken ble håndfôret. Størrelsen på karene var to hundre liter og strømhastigheten 5 l/min.

2.2 Antigen og immunstimulant

To hundre milligram limulus polyphemus hemocyanin (LPH) ble løst opp i 100 ml karbonatbuffer ved svak omrøring over natt ved 4 °C. Aggregater ble fjernet ved sentrifugering ved 2385 x g (Labofuge, Heraeus) i 10 min ved romtemperatur. Åtte ml 5 % 2,4,6-trinitrophenyl (TNP-sulfonsyre) ble tilsatt og reaksjonsblandingen ble inkubert i 4 timer ved romtemperatur. LPH-TNP ble dialysert 3 ganger mot 5 l fosfatbufret saline (PBS) for å fjerne ubundet TNP. Dialyseslangen ble deretter plassert i tørrstoff av polyetylenglykol (35 kDa) for å fjerne ca 90 % av bufferen vha diffusjon. Proteinkonsentrasjonen ble bestemt ved bruk av BIO-RAD DC-kit.

β -glukan (laminaran) var ferdig merket med fluorescein (FITC) og fått fra Roy Dalmo.

TNP-LPH og β -glukan ble merket med I^{125} for å kunne bestemme inkapsuleringseffekten i nanopartiklene etter formulering. I^{125} -merking var på forhånd utført av Børge Nilsen Fredriksen, stipendiat ved Institutt for marin bioteknologi ved Norges fiskerihøgskole.

2.3 Preparering og karakterisering av PLGA nanopartikler

Nanopartikler ble fremstilt ved bruk av dobbelt emulsjon-løsemiddelevaporeringsmetoden, også kalt vann-i-olje-i-vann ($W_1/O/W_2$) emulsjon. Metoden er blant annet beskrevet av (Ogawa, Yamamoto, Okada, Yashiki, & Shimamoto, 1988) som en metode for å inkapsulere leuprolide acetat, en agonist for gonadotropin-frigjørende hormon. I dette arbeidet ble det benyttet en modifisert protokoll etter arbeidet beskrevet av (Davda & Labhasetwar, 2002; Mittal, Sahana, Bhardwaj, & Kumar, 2007; Panyam, et al., 2003).

Oljefasen (O) ble tilberedt ved å løse 300 mg PLGA i 6 ml kloroform (5 % w/v). Ulike W_1 -faser ble tilberedt ved å løse TNP-LPH og beta-glukan i kombinasjon eller alene i 600 μ l 0,15 % PVA. Første emulsjon ble preparert ved å tilsette W_1 til oljefasen (O) og sonikere ved 35 % i 60 sek på isbad (Sonics Vibra cell VC750, 3mm tapered microtip). Emulsjonen (W_1/O) ble deretter overført til 15 ml 2 % PVA (W_2) og sonikert på isbad ved 35 % i 120 sek. Ti ml dH_2O ble tilsatt $W_1/O/W_2$ -emulsjonen for å fasilitere fordamping av det organiske løsemiddelet. Plastglasset ble dekket av perforert aluminiumsfolie og satt til omrøring med magnetrører på 600 rpm over natt for fullstendig fordamping av løsemiddelet.

Nanopartiklene ble pre-sentrifugert ved 500 x g i 8 minutter for å separere ut aggregater og store partikler (Avanti® j-26 XP centrifuge, BeckmanCoulter®, USA). For å fjerne PVA-rester i formuleringene, og samtidig unngå aggregering under vask, ble NP vasket tre ganger i dH_2O ved ulike sentrifugeringshastigheter (5000, 15 000 og 28 000 x g i 8 min). Etter siste vask ble NP-suspensjonen alikvotert i dramsglass, tilsatt trehalose (5mg/ml) i forhold 1:3 (trehalose:NP) og fryst ned ved -70 °C. Nanopartiklene ble frysetørket i 48 timer ved 0,001-0,005 hPa og -110 °C i frysefellen (ScanVac CoolSafe™). Frysetørket produkt ble lagret ved 4 °C fram til bruk.

Partiklenes størrelse ble målt ved hjelp av et dynamisk laser defraktometer (Submicron particle sizer model 370-s, Nicomp particle sizing systems, USA). Alt utstyr som ble brukt var vasket i partikkelfritt milli-Q vann ved badsonikering for å fjerne partikler. Ved måling ble partiklene fortynnet i partikkelfritt milli-Q vann. Milli-Q vann ble på forhånd rensert ved filtrering gjennom 0,22 μ m filter.

Loading og inkapsuleringseffektivitet av antigen og immunstimulant ble bestemt direkte i NPene ved å benytte en andel I^{125} -merket antigen eller immunstimulant i formuleringen.

Inkapsuleringseffektivitet og loading ble beregnet etter (1) og (2) hvor Ag og IS er hhv TNP-LPH og β -glukan.

Inkapsuleringseffekt (%) =

$$\frac{(\text{Vekt PLGA (mg)/vekt NP målt fra (mg)} \times (\text{Ag og/eller IS målt})) \times 100}{\text{Ag og/eller IS tilsatt emulsjonen (mg)}} \quad (1)$$

Loading (μg Ag og eller IS/mg NP) =

$$\frac{\text{Totalvekt av Ag og/eller IS i hele NP-formuleringen } (\mu\text{g})}{(\text{Totalvekt av PLGA (mg)} + \text{inkapsulert Ag og/eller IS(mg)})} \quad (2)$$

Et frigjøringsstudium (*antigen release*) av antigen fra NP ble utført over 50 dager ved inkubering av 8 mg NP i PBS tilsatt 0,02 % natriumazid (NaAz) ved 8°C. En temperatur på 8 °C (og ikke 37 °C som beskrives i andre artikler) ble valgt fordi det er naturlig temperatur for laksefisk. Studiet ble utført i 3 paralleller på NP som inneholdt antigen og antigen koinkapsulert med immunstimulant. Prøver ble tatt ut etter 1 time og 1, 5, 9, 15 og 50 dager inkubering. Åtti μl NP-suspensjon ble da spunnet ned ved 20 000 x g i 5 min. Seksti μl av supernatanten med frigjort protein ble overført til et nytt eppendorfrør og oppbevart ved -20 °C. Pelletten ble resuspendert i 60 μl PBS/NaAz og tilbakeført til de opprinnelige rørene for videre inkubering. Mengden frigjort protein ble målt vha BCA (Bicinchoninic Acid) metoden etter protokoll fra Pierce (BCA Protein Assay Reagent, No. 23223)

2.4 Immunisering og prøveuttak

Til immuniseringsforsøket ble det totalt brukt 180 atlantisk laks. Fisken ble delt inn i grupper og immunisert intraperitonealt etter inndelingen som er vist i tabell 1. Ved immunisering ble fisken bedøvd med 5 % Benzocaine. I forsøksgruppene A-F ble det benyttet 24 fisk i hver gruppe, og i kontrollgruppene G og H ble det brukt 12 og 24 fisk som hhv "negativ" og "positiv" kontroll. I gruppe IF, boostinjisert fisk fra gruppe F, og IH, boostinjisert fisk fra gruppe H ble det benyttet 20 fisk.

Injeksjonsvolum for vaksinene i de ulike gruppene var 200 µl. I gruppene hvor NP ble gitt i kombinasjon med antigen og/eller immunstimulant ble injeksjonen (her mg NP) justert med hensyn til loading av antigen og immunstimulant i NP slik at dosen tilsvarte 75 µg TNP-LPH og/eller 200 µg β-glukan. Antall milligram PLGA NP administrert til de ulike gruppene varierte dermed mellom 2,5 og 5,2 mg. Da inkapsuleringeffektiviteten av antigen og/eller immunstimulant ikke var lik i alle gruppene ble det administrert NP slik at antigendosen var 75 µg, samtidig som immunstimulandosen ble justert til 200 µg ved å tilsette ekstra til injeksjonen (ikke inkapsulert immunstimulant). I gruppen hvor NP ble administrert alene ble dosen satt til 5,0 mg. Fullstendig oversikt er gitt i tabell 2.2. Etter 30 dager ble 20 fisk fra gruppe F og 20 fisk fra gruppe H injisert med en homolog "boost" bestående av 75 µg TNP-LPH uten adjuvans/NP. Boost-fisken ble overført til et nytt kar og fisken finneklippet for å skille mellom gruppene.

Tabell 2.1. Grupper og antall fisk det ble gjort uttak fra til angitte tidspunkt (NP = Nanopartikkel, PBS = fosfatbufret saline, FCS = Freund's Complete adjuvans)

Tid (uttak)	A (NP)	B (TNP-LPH)	C (β-glukan)	D (NP/TNP-LPH)	E (NP/β-glukan)	F (NP/TNP-LPH/β-glukan)	G (Neg.kon (PBS))	H (Pos.kon (FCS/TNP-LPH/β-glukan))	I (Boost* av gruppe F og H)
24 t	6	6	6	6	6	6	3	6	0
48 t	6	6	6	6	6	6	3	6	0
4 d	6	6	6	6	6	6	3	6	0
8 d	6	6	6	6	6	6	3	6	0
1 mnd	7	7	7	7	7	7	7	7	0
2 mnd	7	7	7	7	7	7	7	7	20
3 mnd	7	7	7	7	7	7	7	7	20
Ant/gr	45	45	45	45	45	45	33	45	40
								Totalt antall fisk	388

Tabell 2.2. Mengde NP, TNP-LPH og β -glukan injisert i gruppe A, D, E og F. I gruppe E og F ble mengden β -glukan justert ved å tilsette β -glukan utenfor NP slik at totalmengden ble 200 μ g

Gruppe	NP	β -glukan	Herav inkapsulert β -glukan	TNP-LPH	Herav inkapsulert TNP-LPH	Totalt injeksjonsvolum
A	5,0 mg					200 μ l
D	5,2 mg			75 μ g	75 μ g	200 μ l
E	2,5 mg	200 μ g	50 μ g			200 μ l
F	4,5 mg	200 μ g	54,45 μ g	75 μ g	75 μ g	200 μ l

Blodprøvetaking i boostgruppene ble utført etter 2 og 3 måneder. I de øvrige gruppene ble det tatt organprøver, samt blodprøver. Organprøver ble tatt etter 24 timer, 48 timer, 3 dager og 8 dager. Ved prøvetaking ble fisken avlivet med dobbel dose benzocaine og det ble dissekert ut milt og hodenyre til rør med 1.5 ml RNA-later. Skalpellblader ble sterilisert mellom hvert organ i en gruppe og byttet mellom hver gruppe. Prøvene ble oppbevart et døgn i kjølerom ved 8 °C, deretter i fryser ved -20 °C fram til RNA-isolering.

Ved prøveuttakene etter 30, 60 og 90 dager ble det tatt blodprøver. Blodet ble tappet til vacutainer fra kaudalvenen og rørene oppbevart på is til de ble sentrifugert ved 2500 x g ved 4 °C. Serum ble oppbevart ved -20 °C.

2.5 Indirekte ELISA

For å måle konsentrasjonen av spesifikke antistoffer i fiskeserum ble indirekte Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) benyttet. Metoden baserer seg på at antistoffer i serum bindes spesifikt til "sine" antigener og det er dette prinsippet som benyttes i ELISA. I dette forsøket skulle antistoffresponen spesifikt for haptinsert (TNP) limulus polyphemus hemocyanin undersøkes i lakseserum etter injeksjon med ulike formuleringer (tabell 2.1).

I gruppene som hadde blitt fått TNP-LPH injisert alene eller i kombinasjon med NP eller β -glukan, dvs gruppene B, D, F og H, ble det tatt blodprøver for analyse av serum for

antistoffer spesifikke for TNP-LPH. Gruppe G (PBS) ble også analysert, samt at en pool av uninjisert fisk av samme generasjon/stamme ble inkludert som negativ kontroll på alle plater. Som referanseserum (positiv kontroll) ble det benyttet en pool av lakseserum fra tidligere forsøk med hapteniserte proteiner, utført av Dr. Stein Tore Solem, Norges fiskerihøgskole. På hver plate ble fire brønner benyttet til blankprøve. Serum ble analysert over fire fortynningspunkter; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400. Metoden ble optimalisert ved å teste forskjellige konsentrasjoner av coating, sekundærantistoff og tertiærantistoff på 12 punkts fortynningsrekker.

Indirekte ELISA ble utført ved å coate (dekke) brønnene i 96-brønnersbrett (F96 maxisorp Nunc™ immuno-plate) med 5 µg/ml TNP-LPH. Deretter ble lakseserum (laks-anti-TNP-LPH) tilsatt i ulike fortyninger. Lakseantistoffer vil da binde seg til TNP-LPH i brønnene. Ved å tilsettes et primærantistoff, kanin-anti-laks-Ig, som er produsert ved å immunisere kanin med lakseserum, vil det binde seg til Fc-regionen på lakseantistoffet (Janeway, 2005). Som sekundærantistoff ble geit-anti-kanin antistoffer konjugert med enzymet alkalisk fosfatase benyttet. Ved å tilsette substratet nitrofenylfosfat (fargeløst) vil alkalisk fosfatase spalte substratet til nitrofenyl (gult). Ved å måle fargeforandringen ved OD=405 nm, som vil være proporsjonal med antistoffkonsentrasjonen, bestemmer en forskjeller i antistoffresponsen mellom gruppene. En mer detaljert beskrivelse av protokollen er gjengitt i tabell 4.

Tabell 2.3. Konsentrasjoner og inkubasjonsstider til de forskjellige reagenser benyttet til gjennomføring av ELISA

	Fortynning	Inkubasjon
TNP-LPH (coating) i koblingsbuffer	5 µg/ml	Over natt ved 4 °C i fuktekammer
Tørrmelk i PBST (blokking)	0,01 g/ml	1.5 t ved RT i fuktekammer
Serum (primærantistoff) i PBST	1:50; 1:100; 1:200; 1:400	Over natt ved 4 °C I fuktekammer
Kanin@laks (sekundærantistoff) i PBST	1:800	2 t ved RT I fuktekammer
Geit@kanin (tertiærantistoff) i PBST	1:30 000	2 t ved RT I fuktekammer
P-nitrophenylfosfat (substrat) i substratbuffer	1 µg/ml	45 min ved RT I fuktekammer

Brønnene ble vasket 3 ganger i PBST (ScanWasher 400, Molecular Devices) etter hver inkubasjon, og avlest ved OD 405 nm 45 min etter at substratet ble tilsatt (SpectraMAX 190, Molecular Devices).

2.6 Kvantitativ PCR

Etter immunisering ble det tatt prøver av hodenyre og milt til analyse ved kvantitativ PCR etter 24 timer, 48 timer, 4 dager og 8 dager. Fra hver gruppe og til hvert tidspunkt ble det tatt prøver av 6 fisker.

2.6.1 RNA-isolering

RNeasy mini kit fra Qiagen ble benyttet i kombinasjon med metoden beskrevet av Chomczynski & Sacchi (1987). Isol RNA lysis reagent inneholder guanidin salt som ivaretar RNAets integritet mens celler lyseres og cellekomponenter løses opp. Arbeid med Isol ble utført i avtrekkskap og RNA-isoleringen ble utført med bruk av hansker og RNasefritt utstyr.

Organprøvene ble tint på is og ca 30 mg ble overført til 1 ml Isol og homogenisert med ultra turrax (T25 basic fra IKA® WERKE) ved 21 500 rpm i ca 1 min. Homogenisatet ble oppbevart i romtemperatur i 5-10 minutter og overført til eppendorfrør. Det ble tilsatt 200 µl kloroform som ved sentrifugering skiller homogenisatet i en organisk fase og en vandig fase. RNAet vil finnes utelukkende i den vandige fasen. Prøvene ble vortexet og oppbevart i romtemperatur i 3-5 minutter før de ble sentrifugert ved i 15 min ved 12 000 x g og 4 °C. Den øverste vannfasen ble så overført til et nytt eppendorfrør og tilsatt 600 µl 70 % etanol som faciliterer spesifikk binding av RNA til spin-kolonnens membran. Løsningen ble i to omganger overført til en spin-kolonne fra Rneasy mini kit, og herfra ble prosedyren til kittet fulgt (Cat.No 74106). Buffer RW1 og buffer RPE vasker membranen. Buffer RPE inneholder etanol som kan forstyrre nedstrøms reaksjoner under transkripsjon, så etter siste vask ble kolonnen overført til et nytt oppsamlingsrør for tørrsentrifugering i 1 min ved 20 000 x g som beskrevet i protokollen. RNA fra milt og hodenyre ble eluert i hhv 30 og 50 µl RNase-fritt vann. Etter eluering ble RNAet oppbevart på is fram til lagring ved -80°C.

Kvantitet og kvalitet av RNA ble bestemt ved at 1 µl total RNA ble målt på nano-drop® (ND-1000 Spektrofotometer ved 260 nm). A_{260}/A_{280} ratio, som er forholdet mellom RNA og proteinkontaminasjon, måtte være minimum 1,8 for at RNA ble ansett som rent. For en ytterligere kontroll av kvaliteten på RNAet ble tilfeldig valgte prøver undersøkt på agarosegel (1 % multiABgarose) hvor 2,5 µl templat RNA, 2,5 µl RNasefritt H₂O og 0,5 µl loading buffer (10 x Blue Juice loading buffer™) ble kjørt på 250 V i 12 min (Power pac 300, BioRad). Resultatet ble så avlest vha GeneGenius Bio Imaging System. Ved tilfredsstillende prøver vil en da se to prominente bånd, 18S og 28S rRNA.

2.6.2 cDNA syntese

Til syntetisering av cDNA ble QuantiTect® reverse transcription Kit fra Qiagen benyttet etter protokoll fra leverandør (Cat. No. 205313). Kitet inneholder DNA wipeout som fjerner genomisk DNA fra prøven før cDNA syntetiseres. RNA ble tint på is og RNA konsentrasjonen målt på nytt og fortynnet om nødvendig. cDNA syntesen ble utført i 0,2 ml 8-tube thermo strips med 500 ng RNA til hver reaksjon. Til inkubasjoner ved 42 °C og 95 °C ble GeneAmp PCRsystem 2700 benyttet. cDNA ble lagret ved -20 °C.

2.6.3 RealTime RT-PCR

Til Q-Real-Time-RT-PCR reaksjonen ble SYBR® Green Fast fra Applied Biosystems benyttet. SYBR Green er et fargestoff som binder til dobbeltrådig DNA og fluorescerer kraftig når det er bundet. Alle prøvene ble analysert for mRNA transkripter av IFN γ (revers: 5'-CTC CTG AAC CTT CCC CTT GAC-3' og fremover: 5'CGT GTA TCG GAG TAT CTT CAA CCA-3') T-bet (revers: 5'-CCC CTT GTT GTT GGT CAG CTT-3' og fremover: 5'-CTG GCG CTC ACT GGA TGA-3') og GATA-3 (revers: 5'-TCG TTT GAC AGT TTG CACATG ATG-3' og fremover: CCC AAG CGA CTG TCT-3'). Som referansegene ble elongation factor EF1A_A (revers: 5'-TCA GCA GCC TCC TTC TCG AAC TTC-3' og fremover: 5'-CAC CAC CGG CCA TCT GAT CTA CAA-3') benyttet.

Mastermix, primere og RNase fritt H₂O ble blandet på forhånd og tilsatt brønnene. cDNA-templat ble så tilsatt brønnene i duplikater. På hvert Brett ble det også inkludert to brønner med negativ kontroll, NTC (Non Template Control) og to brønner med intern positiv kontroll, en pool av egne tilfeldig valgte prøver. Platene ble dekket med plast og spunnet raskt ned (Heraeus Multifuge 1 S-R sentrifuge). Platene ble analysert i 7500 Fast RealTime PCR Systems fra Applied Biosystems. Følgende sykluser ble benyttet:

Tabell 2.5. Q-RT-PCR sykluser

Steg	Temperatur (°C)	Varighet	Antall sykluser
Enzyme aktivering	95	20 sek	Hold
Denaturering	95	3 sek	40
Anneal/Extend	60	30 sek	40

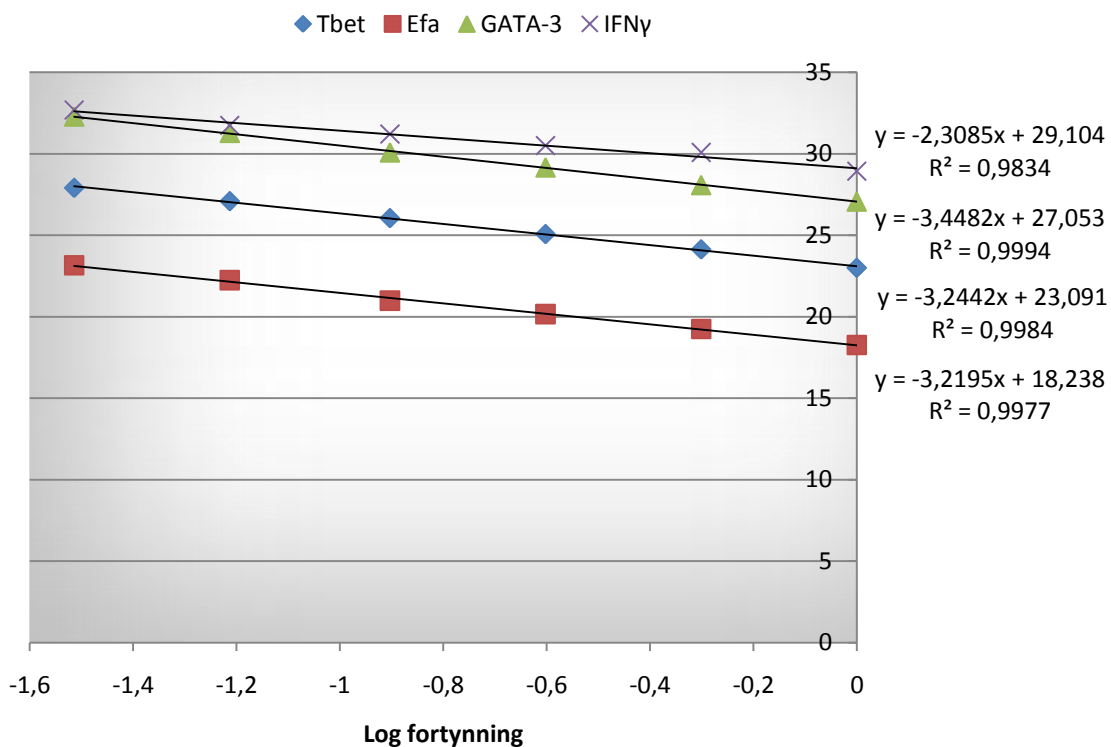
Antall ganger økning i mRNA transkripter i forhold til referansegen (Efa) ble regnet ut etter metode beskrevet av (Pfaffl, 2001).

Antall ganger økning=

$$E_{(\text{mål})}^{\Delta\text{Ct}(\text{kontroll-prøve})} / E_{(\text{referanse})}^{\Delta\text{Ct}(\text{kontroll-prøve})}$$

der E er effektiviteten til primeren, gitt ved

$$E = 10^{(-1/\text{stigningstall})}$$



Figur 2.1. Standardkurver for Tbet, Efa, GATA-3 og IFNγ. Til høyre vises formlene for kurvene $Y=ax + b$ der a er stigningstall for kurven. Det er denne verdien som benyttes i utregningen av effektiviteten til primeren. R^2 sier noe om hvor rett linjen som trekkes mellom punktene er, ved helt rett linje vil R^2 være lik 1,0. Verdien bør være over 0.995 for at standardkurven kan brukes.

Effektiviteten til primerne ble beregnet til:

Efa	2,045
Tbet	2,033
GATA-3	1,950
IFNγ	2,711

2.7 Statistikk

Elisa resultatene ble behandlet i excel. Gjennomsnitt og standardavvik for hver gruppe ble beregnet og signifikansen av forskjellene mellom gruppene ble beregnet med 95 % konfidensintervall.

PCR dataene ble bearbeidet og presentert vha SPSS 16.0 for windows.

3 Resultater

3.1 Karakterisering av nanopartikler

Formulering av nanopartikler ble utført etter modifikasjon i protokoller beskrevet av andre (Davda & Labhassetwar, 2002; Mittal, et al., 2007; Ogawa, et al., 1988; Panyam, et al., 2003).

I dette forsøket ble β -glukan og TNP-LPH inkapsulert enten i kombinasjon eller alene. Tomme nanopartikler ble også produsert. Tabell 3.1 angir størrelse, inkapsuleringseffektivitet og loading for de ulike formuleringene.

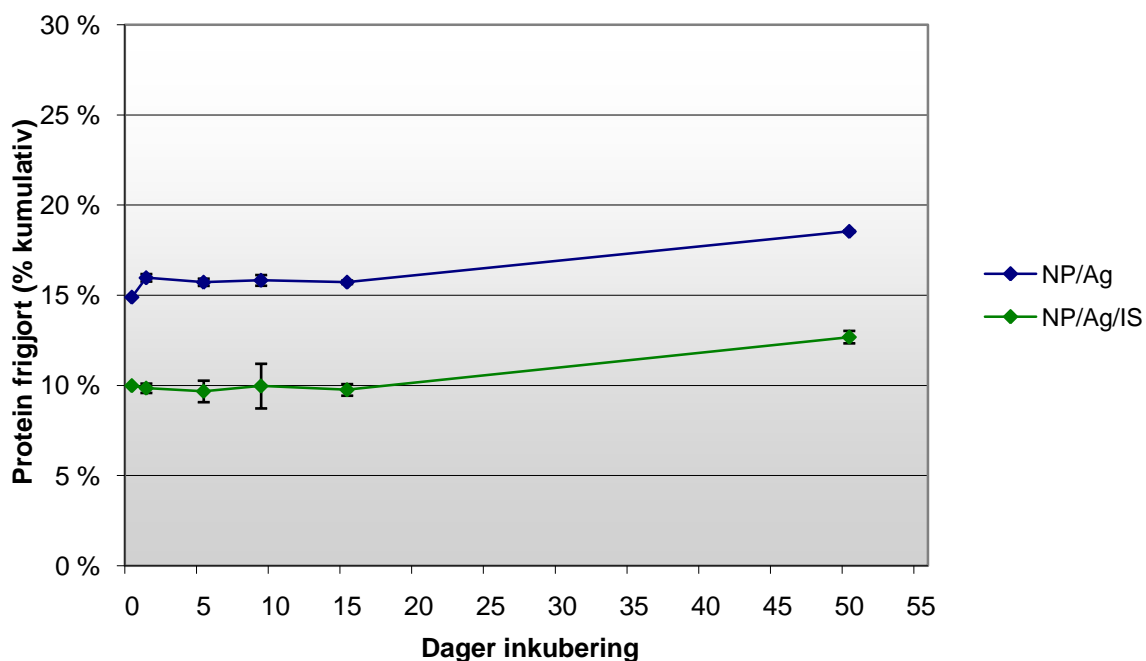
Tabell 3.1. Størrelse på NP, loading av TNP-LPH og β -glukan og inkapsuleringseffektiviteten. Gjennomsnittlig diameter er snittet av to målinger på 8 min med Nicomp Submicron particle sizer.

	Størrelse (diameter gj.snitt)	Loading ($\mu\text{g}/\mu\text{g}$ NP)		Inkapsulerings effektivitet (%)	
		TNP-LPH	β -glukan	TNP-LPH	β -glukan
NP	311,8 nm				
TNP-LPH	388,1 nm	14,5		57,2	
β -glukan	321,5 nm		20,0		69,0
TNP-LPH og β -glukan	376,4 nm	17,7	12,1	59,8	96,5

Størrelsen på partiklene ble målt vha Photon Correlation Spectroscopy (PCS). Gjennomsnittlig størrelse var minst for de tomme partiklene (311,8 nm), mens de partiklene som inneholdt TNP-LPH og/eller β -glukan var noe større (321,5-388,1 nm). Normalfordelingskurvene (ikke presentert) viser at det var mindre spredning i størrelse på de tomme partiklene (ca 80 % mellom 200 og 500 nm), mens NP med TNP-LPH alene eller med β -glukan viste større spredning i størrelse (ca 80 % mellom 100 og 500 nm for NP/ β -glukan, ca 80 % mellom 150 og 550 nm for NP/TNP-LPH og NP/TNP-LPH/ β -glukan). NP med β -glukan viste forskjellige normalfordelingskurver fra de forskjellige målingene. Det går også fram av

tabellen at når beta-glukan koinkapsuleres med protein økes inkapsuleringseffektiviteten, samtidig som proteinet ikke øker sin inkapsuleringseffektivitet.

Et frigjøringsstudium ble utført på partikler med TNP-LPH alene og i kombinasjon med β -glukan ved 8 °C. Studiet viste lav frigjøring av protein i løpet av hele studiet, med kumulativ frigjøring på kun 18,54 % fra NP med TNP-LPH og 12,68 % fra NP med TNP-LPH og β -glukan etter 50 dager. Dette tilsvarer en økning på 3,65 % for TNP-LPH og 2,70 % for NP med TNP-LPH og β -glukan fra første (1 t) til siste (50 dager) måling.



Figur 3.1. Frigjøringsstudium av TNP-LPH inkapsulert i PLGA NP. Partikkelsuspensjonen var inkubert ved 8 °C og ved hvert uttak ble partikkelrester resuspendert i NaAz og ført tilbake til røret for å ikke fjerne inkapsulert protein fra suspensjonen.

3.2 Prøveuttak og patologi

Det ble ikke observert makroskopiske tegn på sykdom i løpet av forsøksperioden, men tilveksten var dårlig. Det ble ikke observert noen sammenvoksninger av organer. Vaksinerester i bukhulen til de individene som hadde blitt immunisert med *Freunds Complete Adjuvans* (FCA) kunne observeres helt frem til avslutningen av forsøket (3 mnd). Fisken fra gruppe B (NP), D (TNP-LPH), F (NP/TNP-LPH/ β -glukan), G (PBS), H (FCA/TNP-LPH/ β -

glukan), IF og IH (boost) ble veid ved avslutning av forsøket. Fisken fra de øvrige gruppene var da allerede terminert da det ikke skulle tas blodprøver fra disse gruppene. Tabell 3.2 viser en oppsummering av observasjonene.

Tabell 3.2. Gjennomsnittlig vekst, standardavvik, antall individer og observasjoner av vaksinerester og sammenvoksninger av organer i de forskjellige gruppene ved avslutning av forsøket.

Gruppe	Vekt (gj.snitt)	St.avvik	Antall individer	Sammenvoksing av organer	Rester av vaksine
TNP-LPH	39,3	4,2	6	Ingen	Ingen
B-glukan	37,5	2,1	5	I 4 individer	Ingen
NP/TNP-LPH/ β -glukan	37,2	2,5	7	Ingen	Ingen
PBS	36,3	6,2	13	Ingen	Ingen
FCA/TNP-LPH/ β -glukan	41,4	5,3	7	I 2 individer	I 6 individer
NP/TNP-LPH/ β -glukan +Boost	41	3,1	10	Ingen	Ingen
FCA/TNP-LPH/ β -glukan + Boost	44,5	5,0	10	I 2 individer	I 7 individer

3.3 ELISA

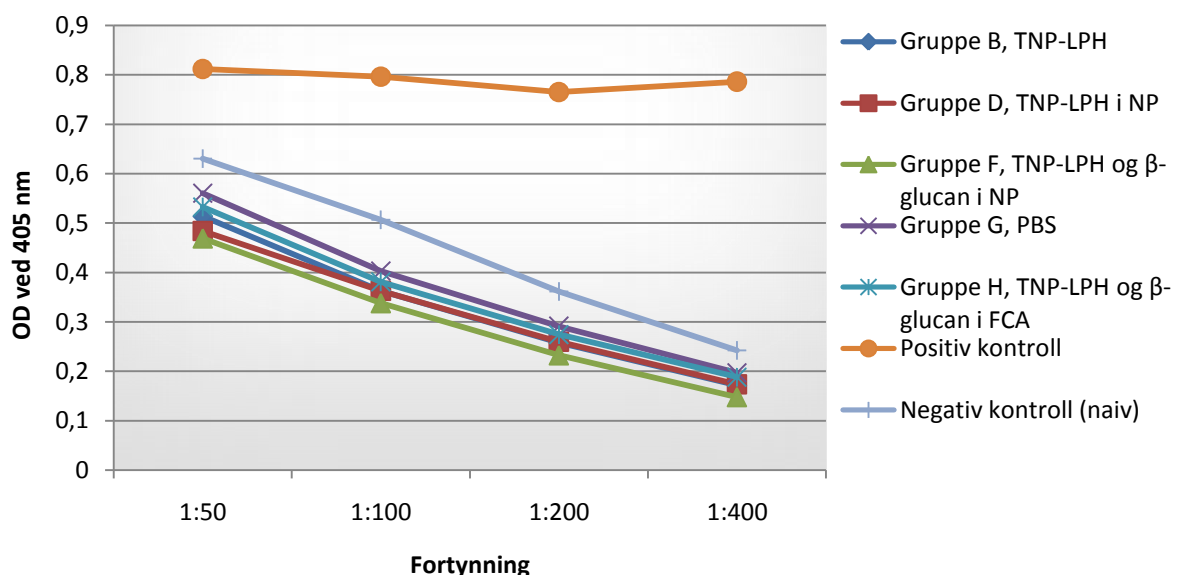
For å måle konsentrasjonen av spesifikke antistoffer i blodet til fisken ble indirekte Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) benyttet.

I gruppene som hadde fått TNP-LPH injisert alene eller i kombinasjon med NP eller β -glukan, dvs gruppene B, D, F og H, ble det tatt blodprøver for analyse av antistoffer spesifikke for TNP-LPH. Gruppe G (PBS) ble også analysert, samt at en pool av uninjisert fisk av samme generasjon/stamme ble inkludert som negativ kontroll på alle plater. Som referanseserum

(positiv kontroll) ble det benyttet en pool av lakseserum fra tidligere forsøk med hapteniserte proteiner, utført av Dr. Stein Tore Solem, Norges Fiskerihøgskole. Serum ble analysert over fire fortynningspunkter; 1:50; 1:100; 1:200; 1:400.

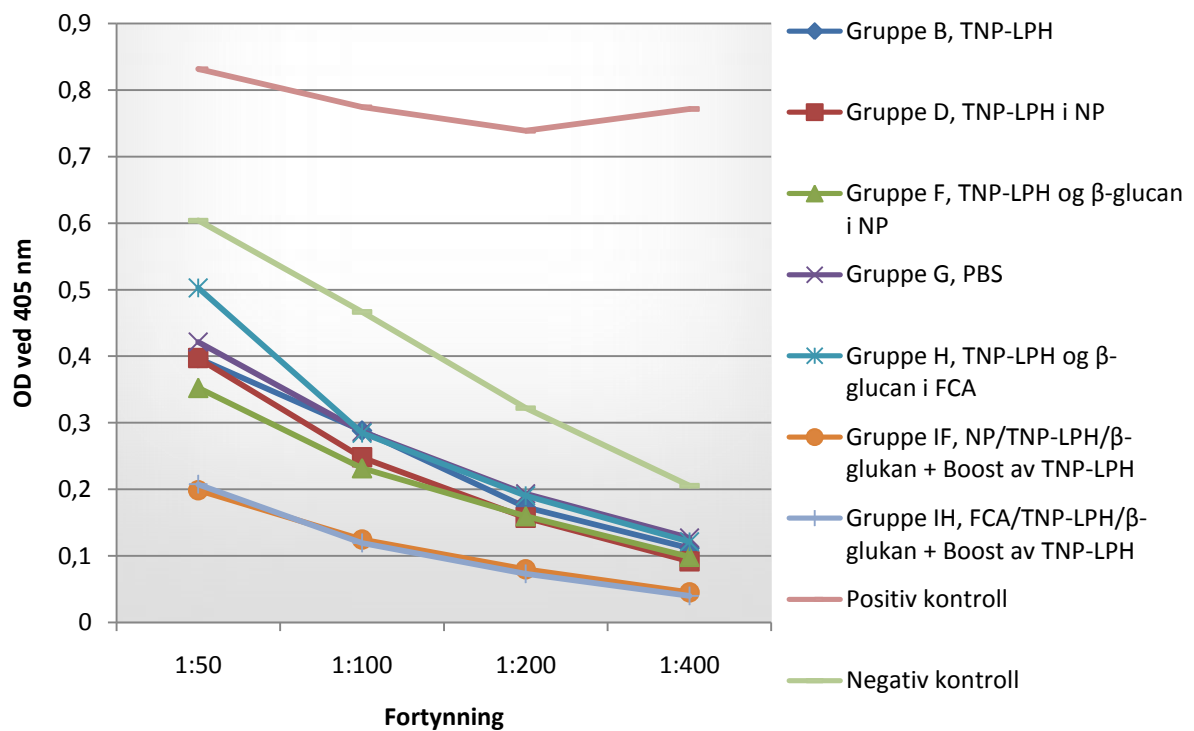
Antistoffresponser i serum fra de fire gruppene som hadde blitt immunisert med TNP-LPH, samt PBS injisert fisk ble analysert på individnivå. På hver plate ble det benyttet en pool av uninjisert fisk som negativ kontroll og en pool av lakseserum fra tidligere forsøk ble benyttet som positiv kontroll. Gjennomsnittet av hver gruppe ble regnet ut og sammenlignet. Individanalysene finnes i vedlegg 4. Målingene viste relativt lav respons og ingen signifikant forskjell mellom gruppene. Positiv kontroll hadde signifikant høyere OD på alle platene sammenliknet med de øvrige gruppene. Negativ kontroll var signifikant høyere enn alle de andre gruppene ved både 30, 60 og 90 dager.

Etter 30 dager viste målingene ingen signifikant forskjell mellom gruppene B, D, F, G og H (figur 3.2). Antistoffnivå fra negativ kontroll (naiv fisk) er signifikant høyere enn alle de andre gruppene (95 % konfidens).



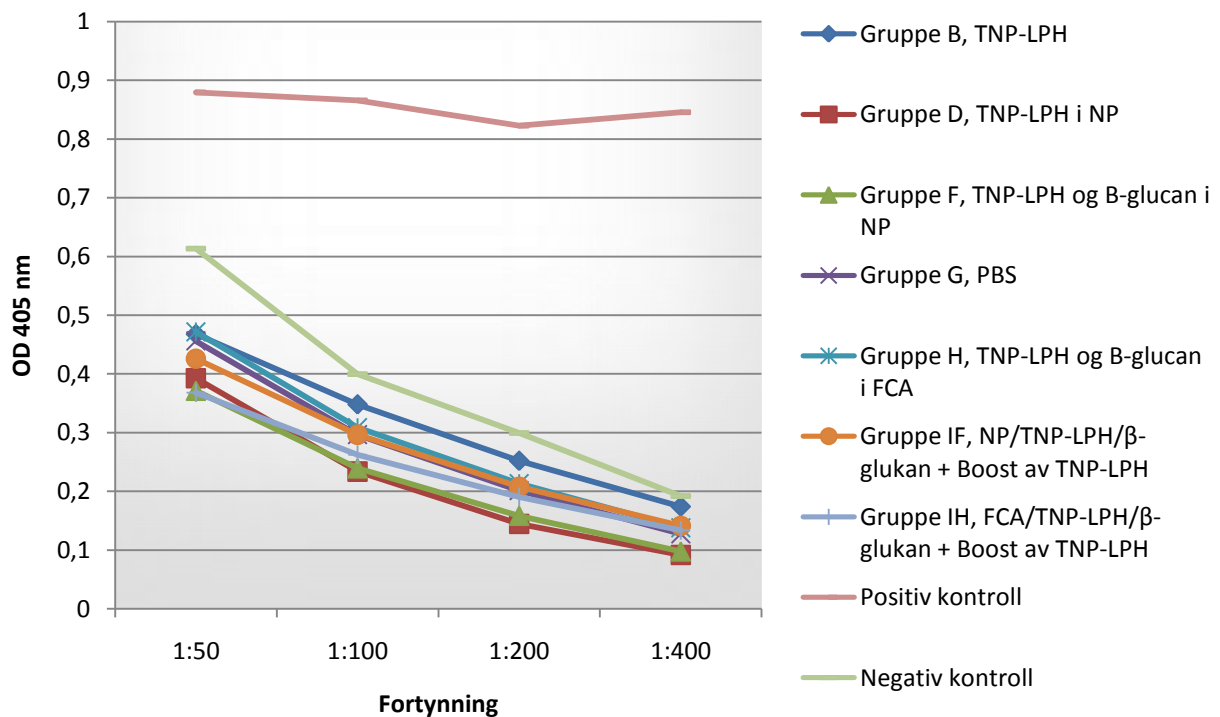
Figur 3.2. Antistoffrespons mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser gjennomsnitt av antistoffnivå fra individanalyser fra alle grupper etter 30 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uninjisert fisk. Gruppe B, D, F, G og H skiller seg ikke signifikant fra hverandre, mens negativ kontroll responderer signifikant høyere enn alle gruppene (95 % konfidens)

Etter 60 dager viser målingene ingen signifikant forskjell mellom gruppene B, D, F, G og H med unntak av første fortynning fra gruppe H som er signifikant høyere enn alle de andre gruppene. Antistoffnivå fra negativ kontroll (naiv fisk) er signifikant høyere enn alle de andre gruppene, og begge boostgruppene (IF og IH) er signifikant lavere enn de andre gruppene (figur 3.3., 95 % konfidens).



Figur 3.3. Antistoffrespons mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser gjennomsnitt i antistoffnivå fra individanalyser fra alle grupper etter 60 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk (naiv fisk). Gruppe B, D, F, G og H skiller seg ikke signifikant fra hverandre med unntak av gruppe H ved fortynning 1:50. Antistoffnivå fra naiv fisk signifikant høyere enn alle gruppene og begge boostgruppene er signifikant lavere (95 % konfidens).

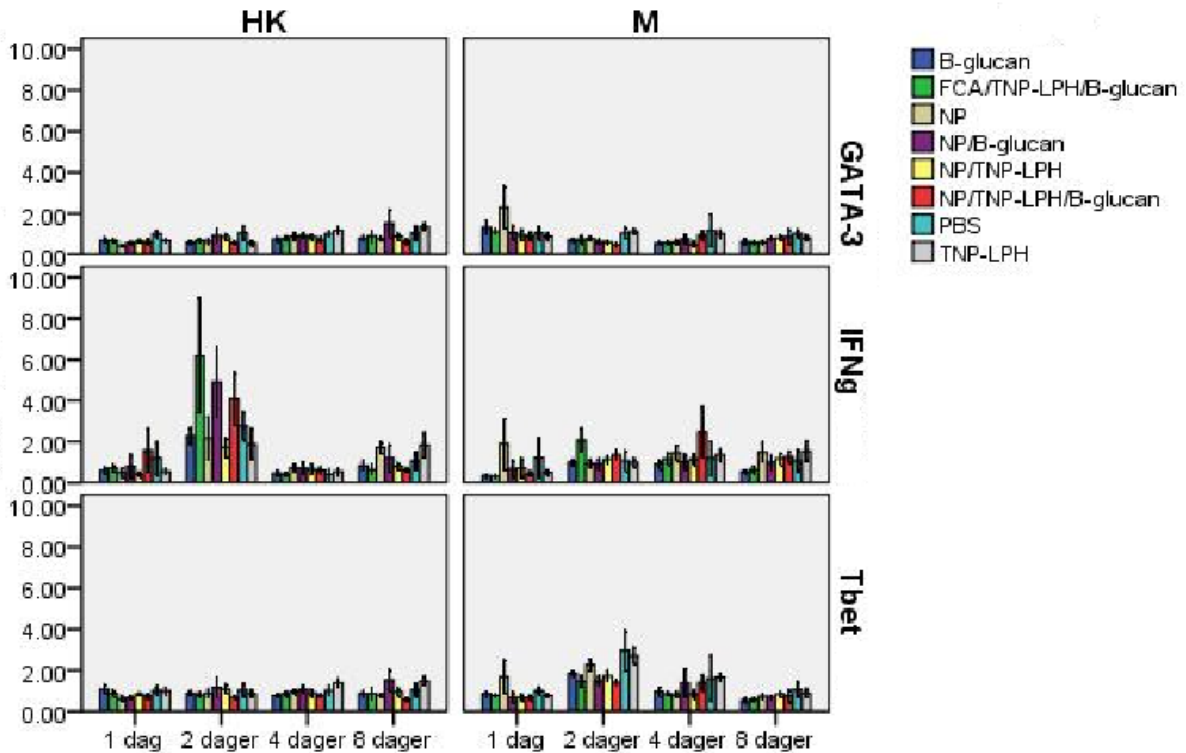
Etter 90 dager viste målingene større spredning, både mellom individer i hver gruppe og mellom gruppene. Målingene fra gruppe B er signifikant høyere enn gruppe D og F, IH og gruppe H ved fortynning 1:100. Målingene fra gruppe D er signifikant lavere enn gruppe G, H og begge boost gruppene (IF og IH). Antistoffnivå fra naiv fisk er signifikant høyere enn alle de andre gruppene (figur 3.4., 95 % konfidens).



Figur 3.4. Antistoffrespons mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser gjennomsnitt av antistoffnivå fra individualiseringer fra alle grupper etter 90 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk og negativ kontroll er en pool av uninjisert fisk (naiv fisk). Gruppe B er signifikant høyere enn gruppe D og F, gruppe D og F er signifikant lavere enn gruppe G, H og begge boostgruppene. Negativ kontroll responderer signifikant høyere enn alle gruppene (95 % konfidens).

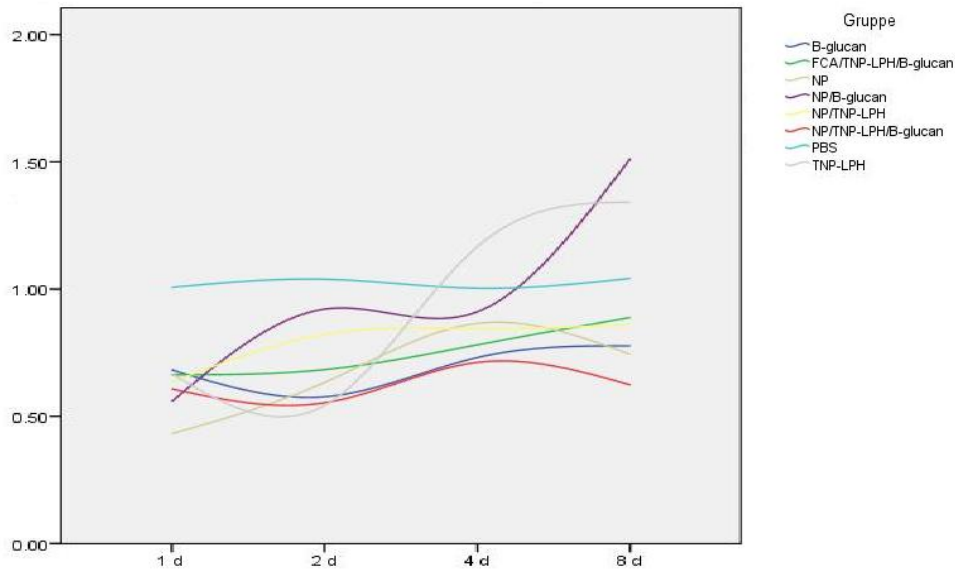
3.4 PCR

GATA-3 og T-bet er transkripsjonsfaktorer som dirigerer modning av naive Th celler i retning av hhv Th2 og Th1 type hjelper celler. I tillegg har begge inhiberende effekt på den andre. Måling av mRNA transkripter for disse faktorene gir derfor en god indikasjon på aktivering av humoral immunitet (Th2 celler) eller cellemediert immunitet (Th1 celler). IFN γ er et cytokin som er sentralt i akutfaserespons samt i aktivering av det adaptive immunforsvaret IFN γ produseres stort sett bare av NK celler og T-lymfocytter. Figur 3.5 viser en oversikt over antall ganger økning i mRNA transkripter av GATA-3, IFN γ og T-bet i forhold til referansegnet (elongation factor) i hodenyre og milt 1 til 8 dager etter immunisering.

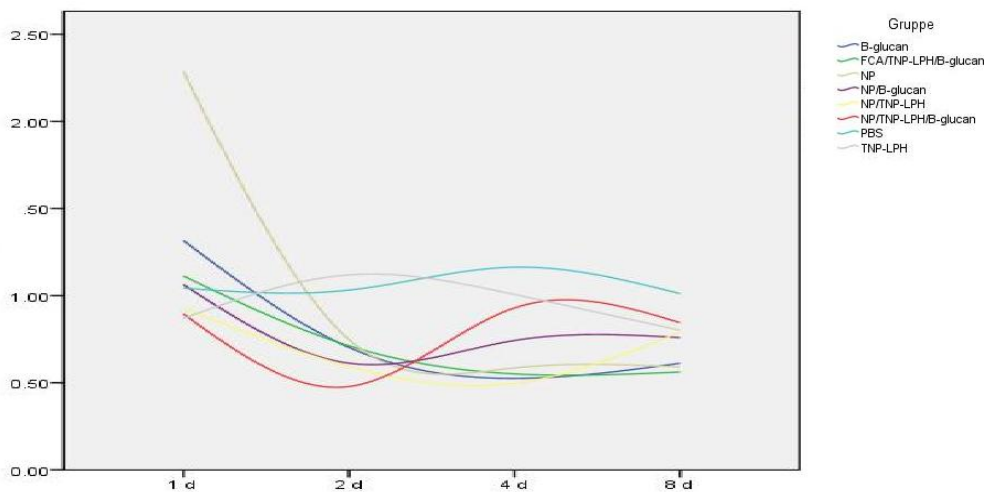


Figur 3.5. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning i mRNA-transkripter av GATA-3, IFN γ og Tbet i hodenyre og milt ved 1, 2, 4 og 8 dager etter immunisering. Barene viser standardavvik ($p < 0,05$).

Figur 3.6 – 3.11 sammenligner uttrykk av genene i hver gruppe relativt til hverandre. Y-aksen er tilpasset verdiene som er målt og er med andre ord ikke standardisert. GATA-3 er uttrykt under referansenivå i hodenyre i alle gruppene fram til dag 8 da vi så en svak økning i gruppe B (1.34 ganger økning på dag 8) og gruppe E (1.51 ganger økning på dag 8) (figur 3.6). I milt var GATA-3 ikke uttrykt over referansenivå med unntak av i gruppe A som viser 2,3 ganger økning i genuttrykk etter 1 dag (figur 3.7). Fra denne gruppen ved dette tidspunktet ble det bare gjort Q-RT-PCR på 4 miltprøver og standardavviket var 1,2.



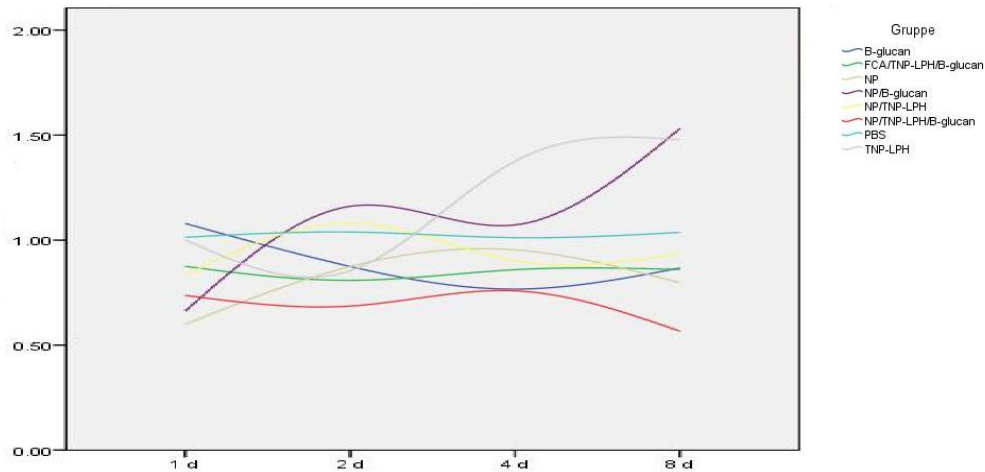
Figur 3.6. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3 mRNA-transkripter i hodenyre 1 til 8 dager etter immunisering. PBS injisert fisk var stabil gjennom hele forsøksperioden, mens både NP/β-glucan og TNP-LPH har en økning i løpet av forsøksperioden. De øvrige gruppene er lavere enn PBS injisert fisk gjennom hele perioden.



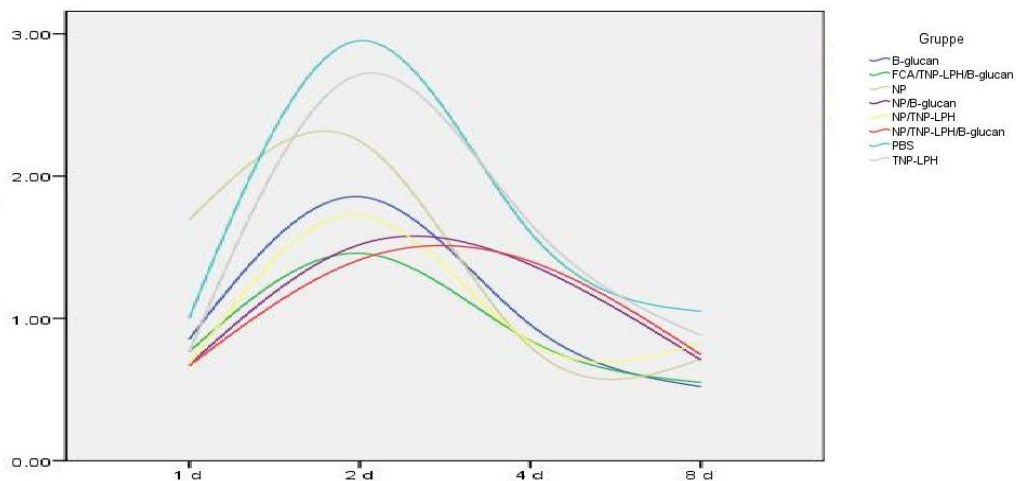
Figur 3.7. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3 mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering. PBS injisert fisk er stabil gjennom hele forsøksperioden mens NP har en nedgang fra dag 1 til dag 2. Denne gruppen inneholder bare organprøver fra 4 fisk ved 24 timer og standardavviket for denne målingen er høyt (Gj.snitt: 2,29, std.avvik: 1,22) De øvrige gruppene viser små endringer.

Uttrykket av T-bet i hodenyre var lavere enn referansegeneet gjennom hele forsøksperioden med unntak av gruppe B (1,48 ganger økning) og gruppe E (1,53 ganger økning) etter 8 dager (figur 3.8). I milt viste alle gruppene en økning etter 2 dager. Størst økning ble observert i

PBS injisert fisk (2,95 ganger økning etter 2 dager), TNP-LPH (2,71 ganger økning etter 2 dager) og NP (2,25 ganger økning etter 2 dager). Minst økning ble observert i NP/TNP-LPH/ β -glukan (2,41 etter 2 dager) og FCA/TNP-LPH/ β -glukan (2,46 etter 2 dager). I disse to gruppene er toppen noe forskjøvet i forhold til de andre (figur 3.9).

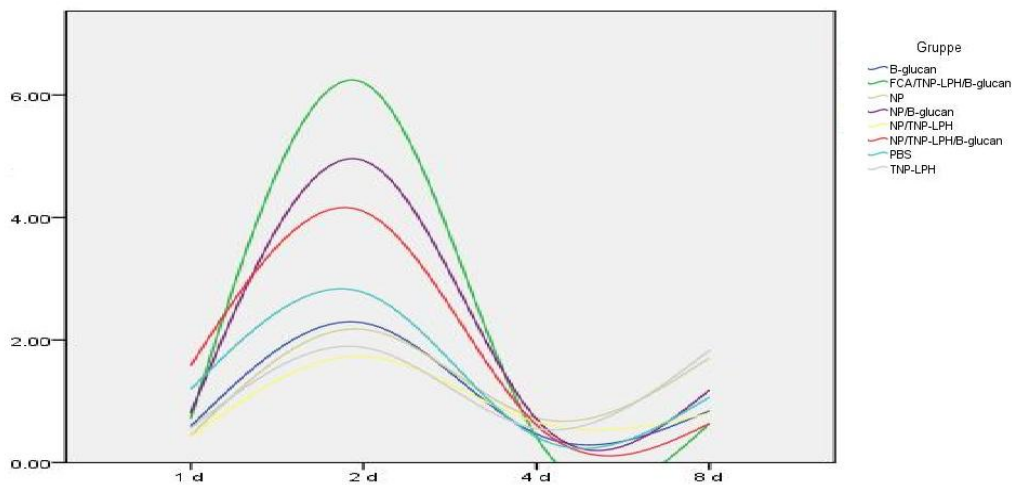


Figur 3.8. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av T-bet mRNA-transkripter i hodenyre 1 til 8 dager etter immunisering. PBS injisert fisk er stabil gjennom hele forsøksperioden, mens både NP/ β -glukan og TNP-LPH har en økning i løpet av forsøksperioden. De øvrige gruppene viser liten endring gjennom forsøksperioden

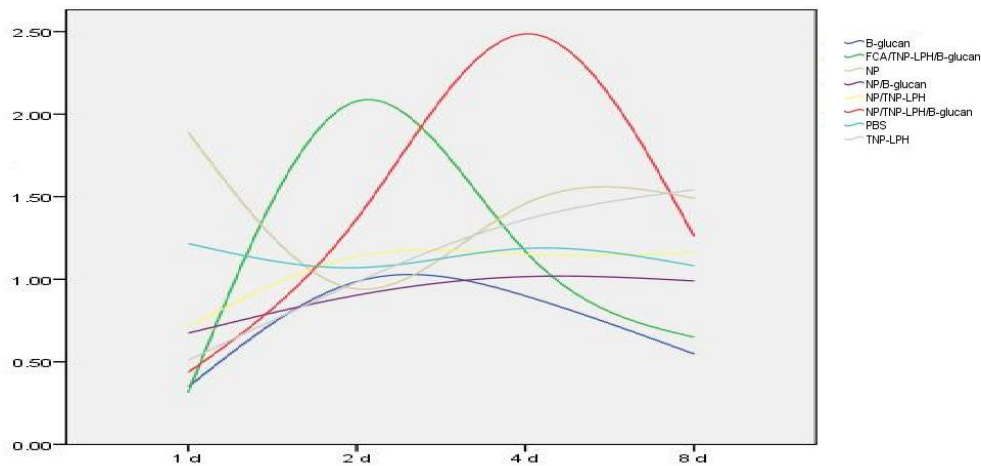


Figur 3.9. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av T-bet mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering. Alle gruppene viser en topp i respons etter 2 dager, PBS injisert fisk har høyest topp med TNP-LPH like under tomme NP har også høyere topp enn de øvrige gruppene.

Uttrykket av IFN γ i hodenyre økte i alle grupper etter to dager. Økningen var størst i FCA/TNP-LPH/ β -glukan (6,2 ganger økning etter 2 dager), NP/ β -glukan (4,93 ganger økning etter 2 dager) og NP/TNP-LPH/ β -glukan (4,1 ganger etter 2 dager). Mindre økning (1,73 – 2,78) ble observert i de øvrige gruppene, men alle er over referansegennivå etter to dager. Etter fire dager viser alle gruppene gennuttrykk under referansegennivå. FCA/TNP-LPH/ β -glukan viser kraftigst nedregulering (figur 3.10). I milt observeres også en økning, maksimal måling etter 2 dager for FCA/TNP-LPH/ β -glukan (2,08 ganger økning), og etter 4 dager for NP/TNP-LPH/ β -glukan (2,49 ganger økning) (figur 3.11).

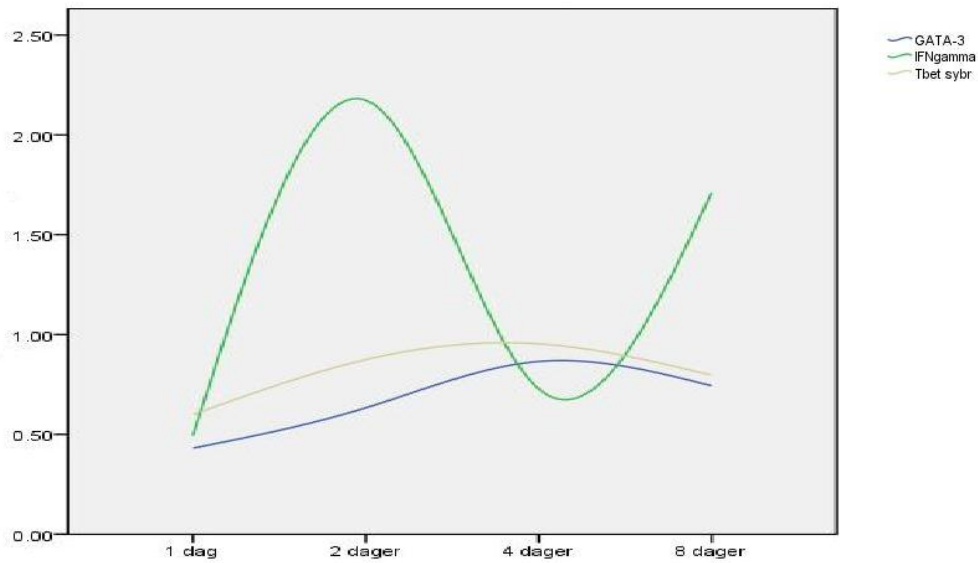


Figur 3.10. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av IFN γ mRNA-transkripter i hodenyre 1 til 8 dager etter immunisering. Alle gruppene viser en økning etter 2 dager, FCA/TNP-LPH/ β glukan (positiv kontroll) har kraftigst økning, mens β -glukan har størst økning av de eksperimentelle gruppene. NP/TNP-LPH viser minst endring gjennom forsøksperioden.

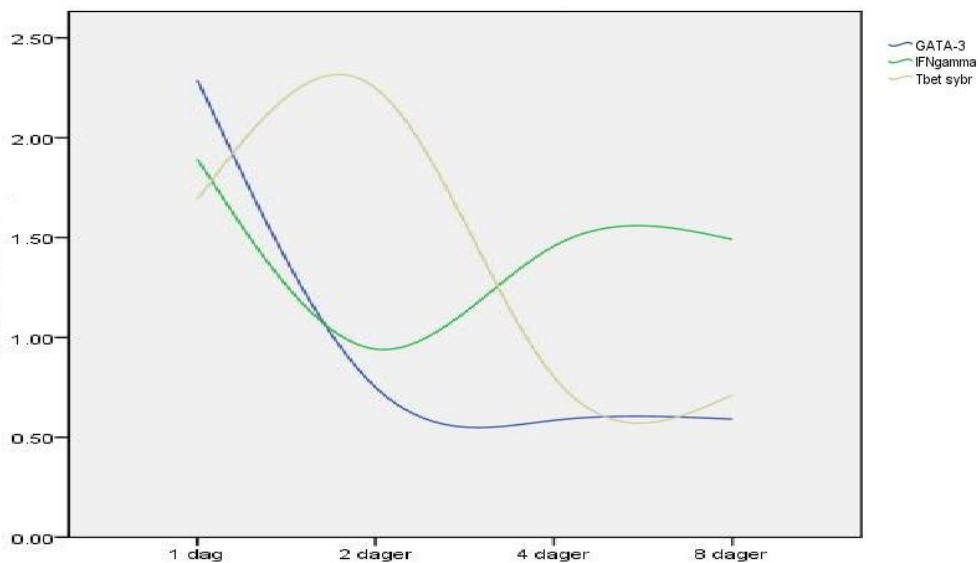


Figur 3.11. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av IFN γ mRNA-transkripter i milt 1til 8 dager etter immunisering. PBS injisert fisk er stabil gjennom hele forsøksperioden mens gruppe H (FCA) har en topp etter 2 dager og NP/TNP-LPH/ β -glukan har en større topp etter 4 dager. De øvrige gruppene viser kun små endringer gjennom forsøksperioden.

Figur 3.12 – 3.27 viser antall ganger økning av genene respektive hverandre i hver gruppe som en funksjon av tiden. Y-aksen er tilpasset tallene og er dermed ikke standardisert. I gruppe A (tomme NP) ble det observert en økning av IFN γ mrNA transkripter fra hodenyre etter to dager, så en nedgang etter fire dager før det økte igjen etter åtte dager. De to andre genene var stabilt like under referansegennivå gjennom hele forsøksperioden (figur 3.12). I milt var kurven nedgående for GATA-3 og IFN γ etter en dag, mens for T-bet ble det observert høyeste måling etter 2 dager. IFN γ økte igjen etter fire dager, men ikke like mye som i hodenyre (figur 3.13).



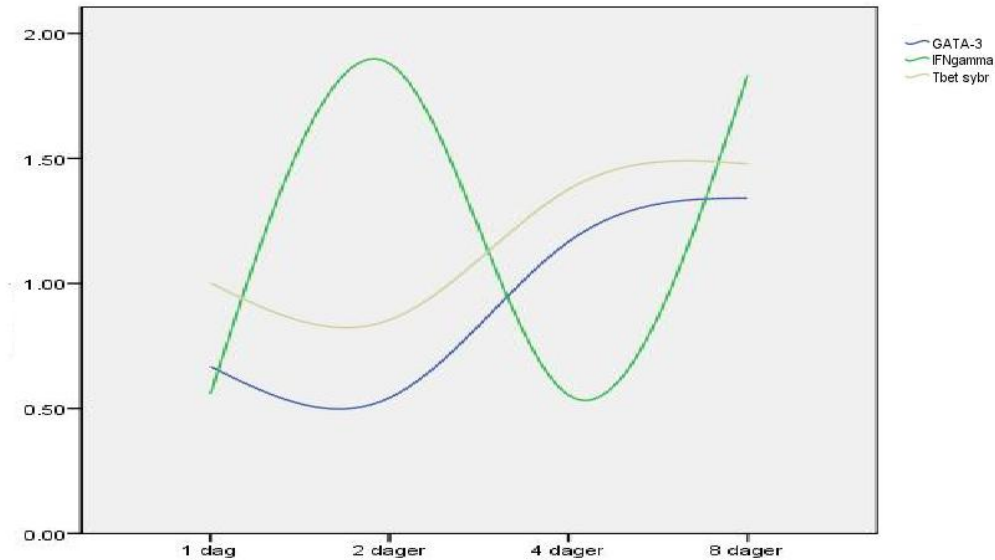
Figur 3.12. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i hodenyret 1 til 8 dager etter immunisering med tomme NP.



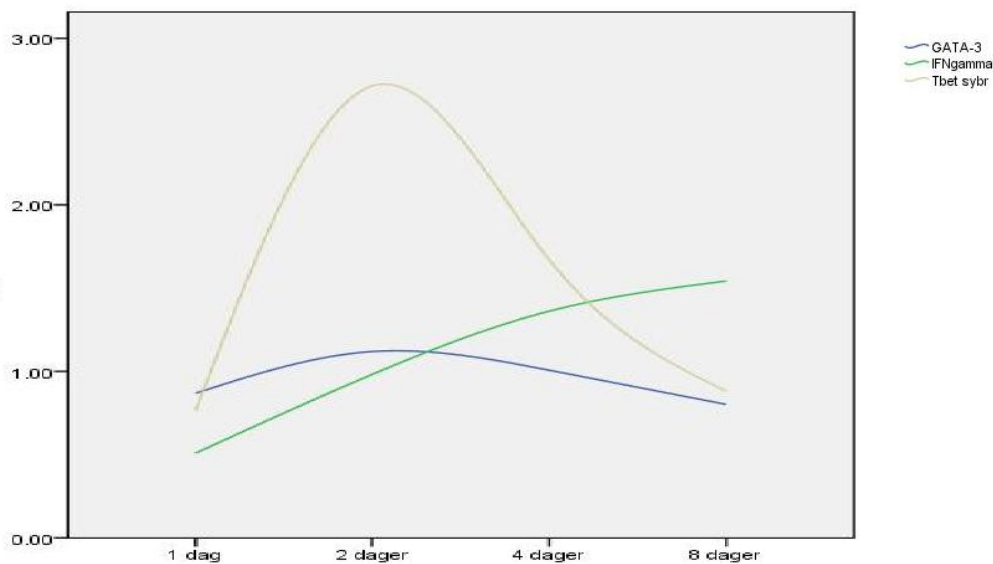
Figur 3.13. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering med tomme NP.

I gruppe B (TNP-LPH) ble det observert en økning av IFN γ mRNA transkripter fra hodenyre etter to dager, så en nedgang etter fire dager før det økte igjen etter åtte dager til samme nivå som etter to dager. Både T-bet og GATA-3 viser en mindre økning fra to dager til fire dager (figur 3.14). I milt var mRNA-transkriptene av GATA-3 og IFN γ lave gjennom hele

forsøksperioden med en økning for IFN γ mot slutten av forsøksperioden. For T-bet ble det observert en økning av mRNA-transkripter etter to dager etterfulgt av en nedgang til under referansegenivå etter åtte dager (figur 3.15).



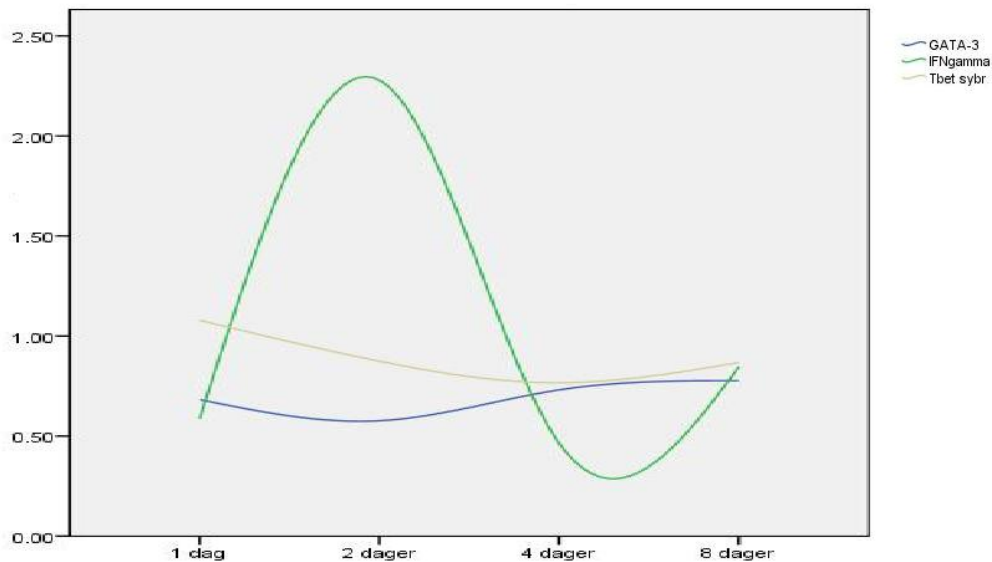
Figur 3.14. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i hodenyret 1 til 8 dager etter immunisering med TNP-LPH.



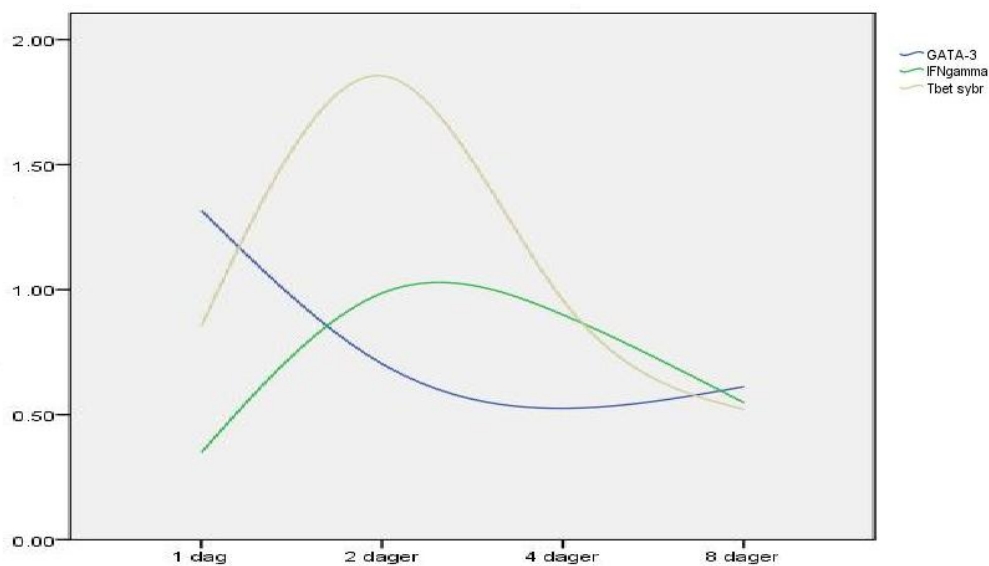
Figur 3.15. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering med TNP-LPH.

I gruppe C (β -glukan) ble det observert en økning av IFN γ transkripter i hodenyre etter to dager etterfulgt av en nedgang etter fire dager og en liten økning igjen etter åtte dager. T-

bet og GATA-3 viste målinger under referansegenntivå gjennom hele forsøksperioden (figur 3.16). I milt viste målingene høyest nivå av mRNA transkripter for T-bet etter to dager (figur 3.17).



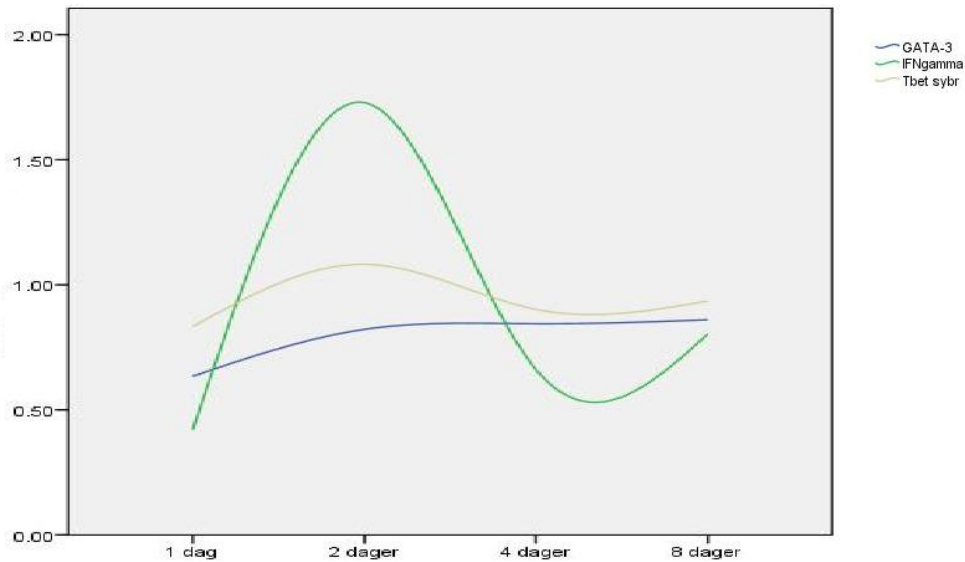
Figur 3.16. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i hodenyret 1 til 8 dager etter immunisering med β -glukan.



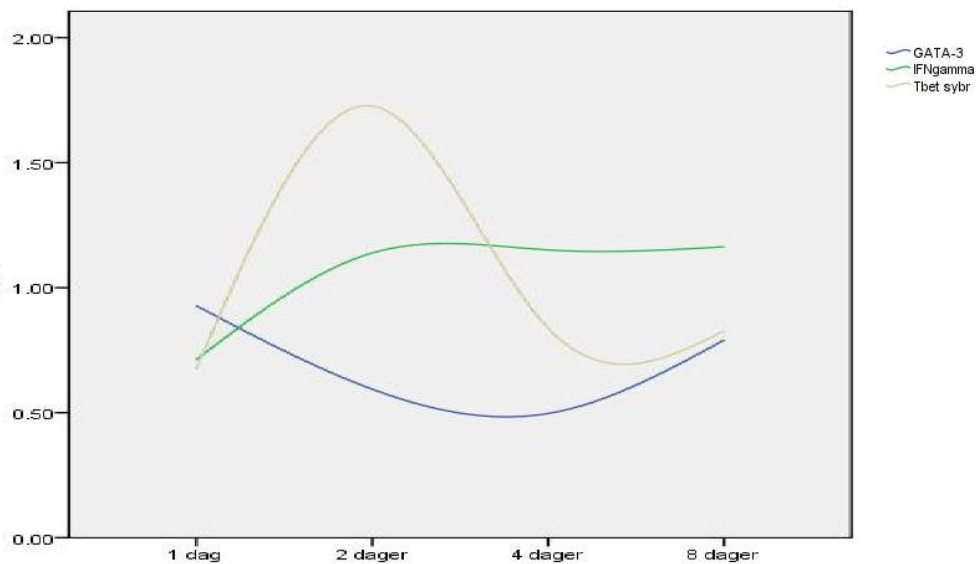
Figur 3.17. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering med β -glukan.

I gruppe D (NP/TNP-LPH-LPH) ble det observert en økning i mRNA transkripter av IFN γ i hodenyre etter to dager etterfulgt av en nedgang etter fire dager. De to andre var under

referansegennivå gjennom hele forsøksperioden (figur 3.18). I milt ble det observert en økning av T-bet mRNA transkripter etter to dager etterfulgt av en nedgang. IFN γ økte noe etter to dager, mens GATA-3 viste en nedgang fra 1 dag til fire dager (figur 3.19).



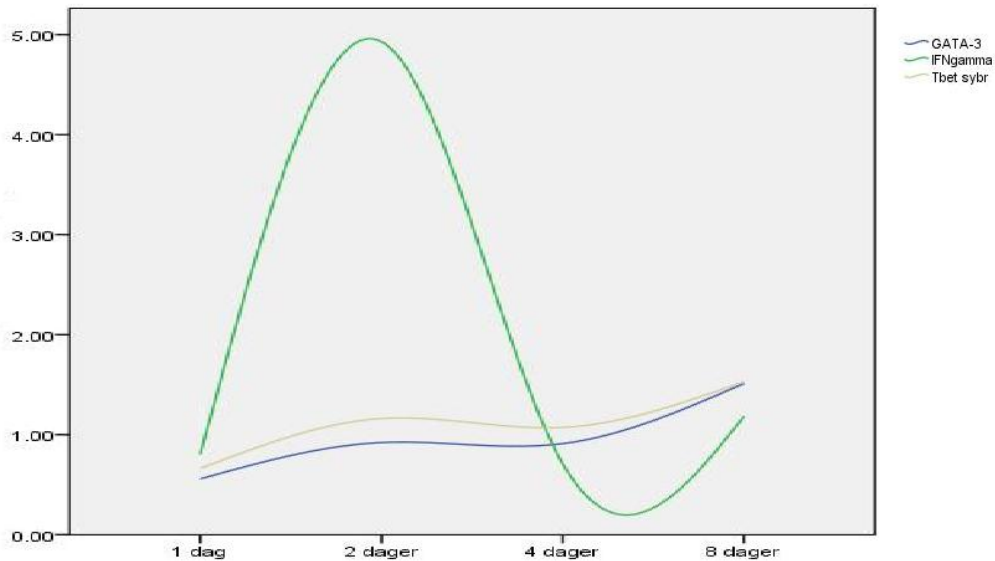
Figur 3.18. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i hodenyret 1 til 8 dager etter immunisering med NP/TNP-LPH.



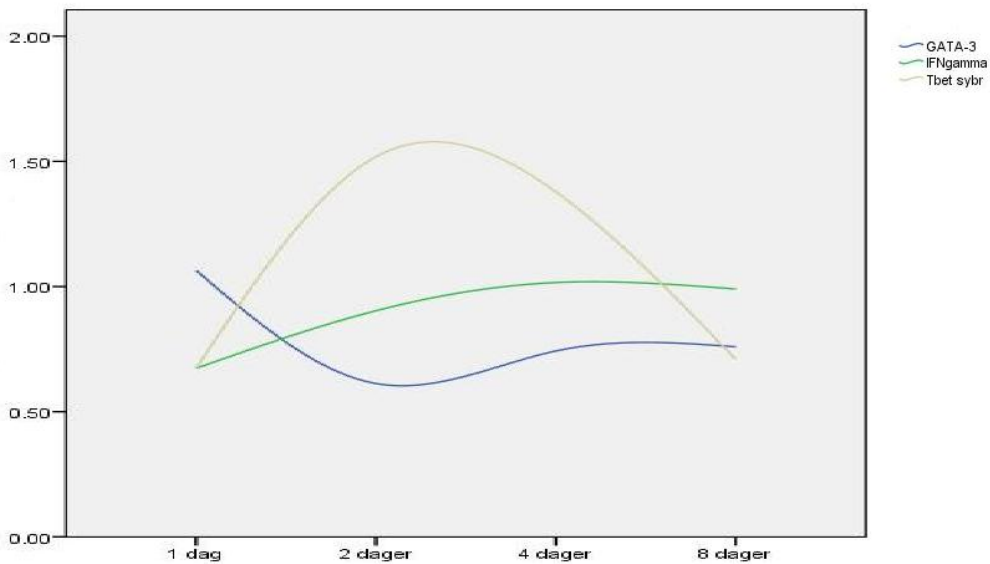
Figur 3.19. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering med NP/TNP-LPH.

I gruppe E (NP/ β -glukan) ble det observert en klar økning av IFN γ mRNA transkripter i hodenyre etter 2 dager etterfulgt av en nedgang til under referansegennivå etter 4 dager

(figur 3.20). I milt viste målingene en svak økning i mRNA transkripter av T-bet etter to dager før det gikk ned mot 8 dager (figur 3.21)



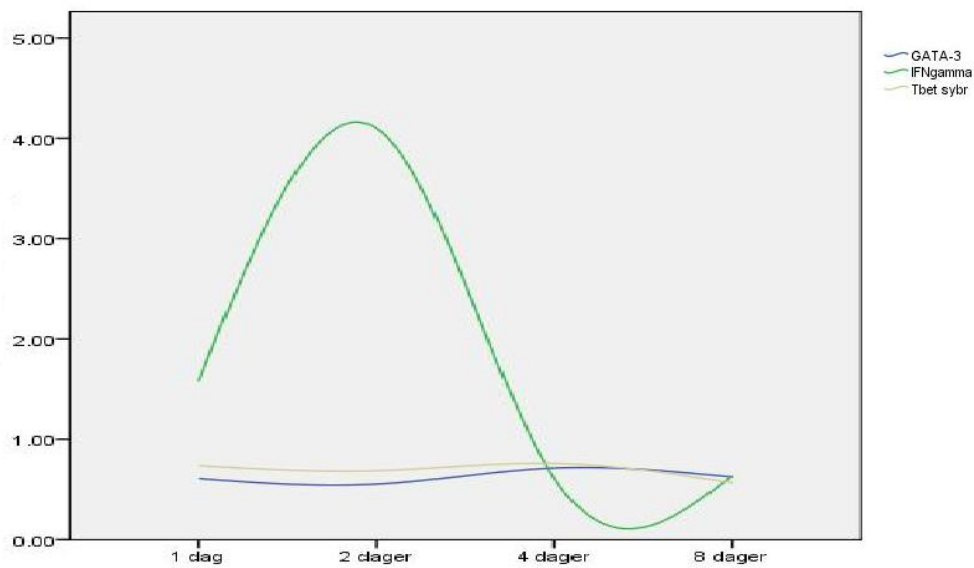
Figur 3.20. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i hodenyret 1 til 8 dager etter immunisering med NP/ β -glukan.



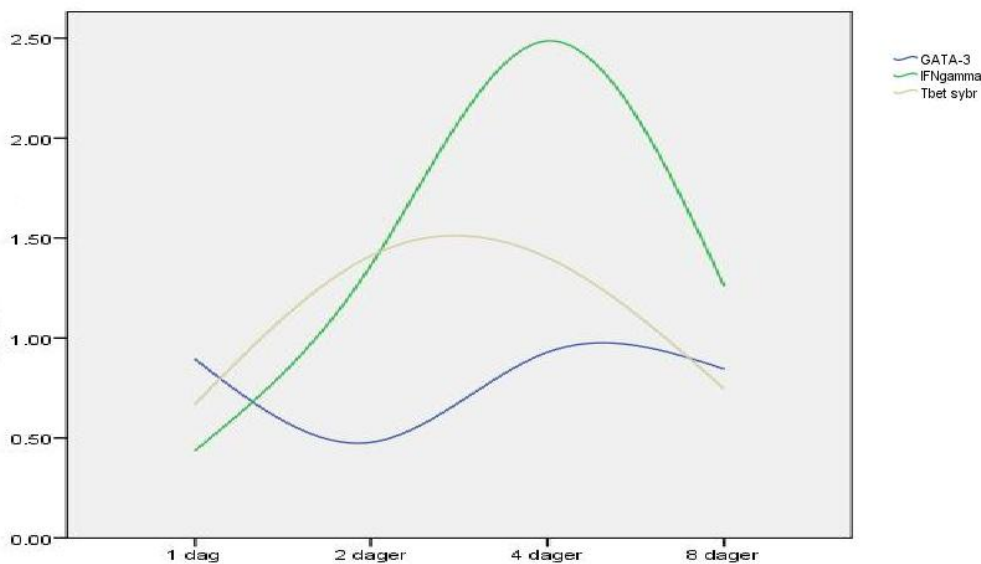
Figur 3.21. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering med NP/ β -glukan.

I gruppe F (NP/TNP-LPH/ β -glukan) ble det observert en klar økning av IFN γ mRNA transkripter i hodenyre etter 2 dager etterfulgt av en nedgang til under referanegenivå etter 4 dager mens T-bet og GATA-3 ikke viste noen forandring gjennom forsøksperioden

(figur 3.22). I milt ble en økning på ca halvparten av den observert i hodenyre etter 2 dager observert etter 4 dager for mRNA transkripter av IFN γ (figur 3.23).



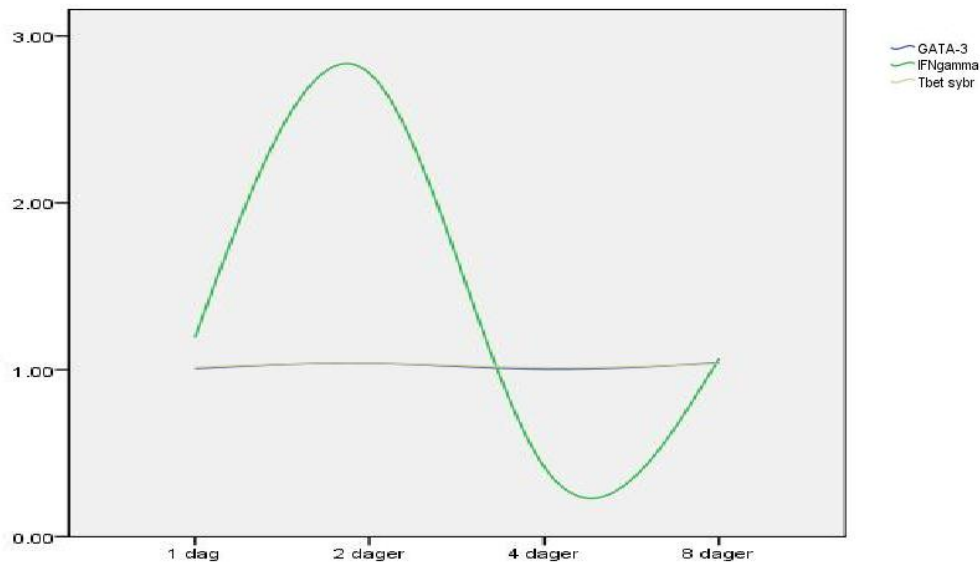
Figur 3.22. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i hodenyret 1 til 8 dager etter immunisering med NP/TNP-LPH/ β -glukan.



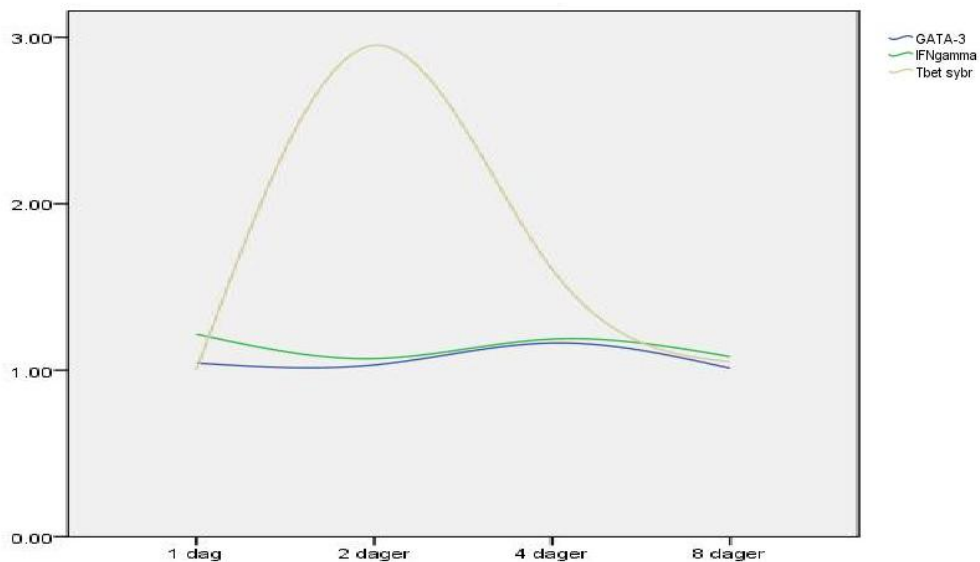
Figur 3.23. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering med NP/TNP-LPH/ β -glukan.

I gruppe G (PBS) ble det observert en klar økning av IFN γ mRNA transkripter i hodenyre etter 2 dager etterfulgt av en nedgang til under referanegennivå etter 4 dager mens T-bet og GATA-3 ikke viste noen forandring gjennom forsøksperioden (figur 3.24). I milt ble en økning

på ca 3 ganger observert for mRNA transkripter av T-bet mens IFN γ og GATA-3 ikke viste noen endring gjennom forsøksperioden (figur 3.25)



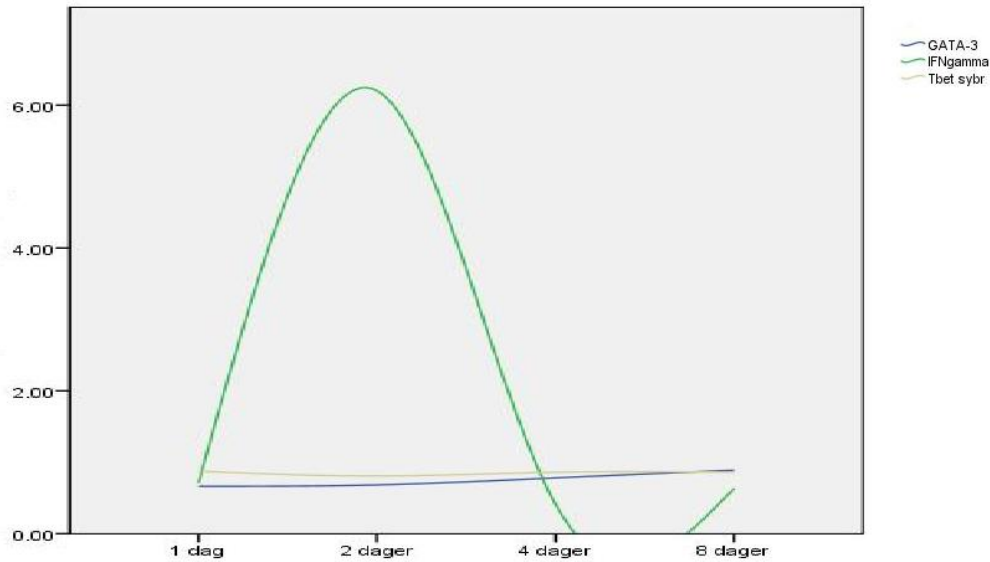
Figur 3.24. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i hodenyret 1 til 8 dager etter immunisering med PBS.



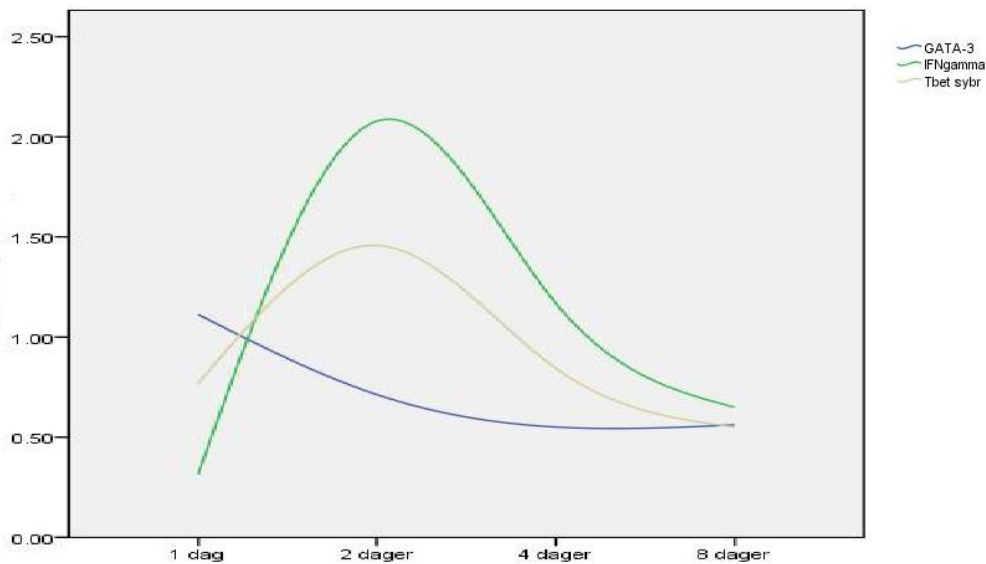
Figur 3.25. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i 1 til 8 dager etter immunisering med PBS.

I gruppe H (FCA/TNP-LPH/ β -glukan) ble det observert en klar økning av IFN γ mRNA transkripter i hodenyre etter 2 dager etterfulgt av en nedgang til under referanegennivå etter 4 dager mens T-bet og GATA-3 ikke viste noen forandring gjennom forsøksperioden

(figur 3.26). I milt ble det også observert en økning av IFN γ mRNA transkripter etter 2 dager etterfulgt av en nedgang etter 4 dager, men ikke like sterk som i hodenyre. T-bet økte også noe etter to dager etterfulgt av en nedgang mot 8 dager (figur 3.27)



Figur 3.26. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i hodenyre 1 til 8 dager etter immunisering med FCA/TNP-LPH/ β -glukan.



Figur 3.27. Real-time PCR. Figuren viser antall ganger økning av GATA-3-, T-bet- og IFN γ mRNA-transkripter i milt 1 til 8 dager etter immunisering med FCA/TNP-LPH/ β -glukan.

4 Diskusjon

Hittil har bruken av PLGA nanopartikler som leveringskonsept for vaksine hovedsakelig vært fokusert mot humanmedisin. Det foreligger kun to publikasjoner der PLGA er gitt til fisk, begge i form av oral administrering. I det ene forsøket ble et proteinantigen inkapsulert (Lavelle, et al., 1997) og det andre med en pDNA vektor inkapsulert (Tian, et al., 2008). Begge disse publikasjonene konkluderer med at PLGA partikler er et lovende konsept for levering av vaksine. Det er så langt ikke publisert noen forsøk der antigen inkapsulert i PLGA nanopartikler har blitt administrert til fisk ved i.p. injeksjon. Hypotesen som lå til grunn for dette forsøket var:

”PLGA nanopartikler induserer økt antistoffproduksjon, samt øker ekspresjon av Th1 relaterte transkript etter immunisering”

For å undersøke denne hypotesen ble serum analysert for spesifikke antistoffer mot TNP-LPH vha ELISA. Vev fra hodenyre og milt ble analysert vha kvantitativ revers transkriptase PCR, med den hensikt å kvantitere mRNA transkripter av cytokinet IFN γ og transkripsjonsfaktorene T-bet og GATA-3 som er vist å dirigere differensiering av naive CD4⁺ T-celler til hhv Th1 helper T-celler og Th2 helper celler (Ferber, et al., 1999; Szabo, et al., 2000).

4.1 Forsøksmodell og metoder

Det er ikke uvanlig med store individuelle variasjoner mellom fisk av samme art (Gerwick, Corley-Smith, & Bayne, 2007; Lovoll, Dalmo, & Bogwald, 2007). Bruk av 6 fisk i hver gruppe er derfor ansett som minimum for å ha et representativt utvalg. I dette forsøket viste målingene relativt liten variasjon mellom prøvene. RNA produktet var av god kvalitet og primerne hadde god effektivitet.

4.2 Antigen frigjøring

For å kvalitetssikre partiklene som ble brukt i dette forsøket ble det gjennomført et antigenfrigjøringsstudium. Resultatet av dette viste relativt lav, men rask ”burst” ved at 10 % og 15 % av proteinet fra partikler med hhv TNP-LPH/ β -glukan og TNP-LPH ble frigjort etter 1 time. Dette tyder på at denne mengden befant seg på utsiden av partiklene og/eller i porer. De

femten neste dagene ble det ikke registrert noe frigjøring fra partiklene, først ved målingen etter 50 dager ble det registrert en økning i kumulativ andel frigjort protein. Frigjøringsstudiet ble gjennomført ved å inkubere partiklene i PBS/NaAz pH7,4 som kan sammenlignes med det ekstracellulære rom i fisken. Dette indikerer at dersom en velger å lage partiklene for store for opptak i makrofager og transportering vekk fra injeksjonsstedet kan en oppnå vedvarende frigjøring av antigener i bukhulen over lengre tid lignende den depoteffekt en i dag har med oljeadjuvans. Det ble valgt å inkubere partiklene ved en temperatur som er naturlig for atlantisk laks (8 °C– 10 °C). Sammenlignet med andre studier ser en at både "burst" frigjøringen og den totale frigjøringen over det gitte tidsrom er lavere (Yushu & Venkatraman, 2006). Dette skyldes at i disse studiene ble partiklene inkubert ved 37 °C, noe som understreker at temperatur er en viktig faktor i frigjøringen av antigen fra partiklene. Ved injeksjon av PLGA partikler i fisk vil en, forutsatt at partikkelen befinner seg ekstracellulært, få en annen kinetikk i frigjøringen av antigenet på grunn av at laks er poikiloterm og oppdrettes i omgivelser med lavere temperaturer.

4.3 ELISA

Disse resultatene viste ingen forskjell mellom gruppene og i tillegg lav respons. Temperaturen i forsøksperioden var lav (6,8 °C, 3,3 °C og 7,0 °C i første, andre og tredje måned) og det kan være noe av forklaringen. Det er tidligere vist at fisk som lever i kaldt vann (8 °C) produserer mindre antistoffer enn fisk som lever i varmere vann (12 °C) (Alcorn, Murray, & Pascho, 2002). Men en skulle i så tilfelle forvente en forskjell i mellom gruppene. En annen forklaring kan være at det er uspesifikk binding av naturlige antistoffer. Det ble lenge ansett som problematisk å analysere fiske serum vha ELISA nettopp pga høy bakgrunns optisk tetthet (OD) av naturlige IgM (Kim, Nishizawa, & Yoshimizu, 2007). Men dette forsøket viste hvordan slik uspesifikk binding effektivt kan blokkeres vha forskjellige reagenser, blant annet skummet melk. I dette forsøket ble fettfri tørrmelk brukt. Det ble likevel forsøkt å fjerne eventuell uspesifikk binding ved å øke mengden tørrmelk i blokkeringsbufferen fra 1 % til 3 og 5 %, samtidig med at serum, sekundærantistoff og tertiærantistoff ble fortynnet i 0,5 og 1 % tørrmelk i PBST. Da dette ikke viste noen forskjell ble resultatene slik de er presentert i denne oppgaven stående. Det ble BSA og LPH (resultater ikke vist) antistoffet viste seg å ikke respondere spesifikt verken til TNP (haptenet) eller LPH. Det kan i teorien tenkes at

proteinet denaturerer i prepareringsprosessen av nanopartiklene. Men heller ikke det er en plausibel forklaring da også positiv kontroll responderer på samme nivå som de andre gruppene. I denne formuleringen (FCA/TNP-LPH/ β -glukan) har proteinet ikke vært i kontakt med kloroform, og ikke vært igjennom sonikering.

I teorien skal formuleringen som er administrert inducere en sterk immunrespons. Haptener er vist å inducere antistoffproduksjon hos laks (Killie & Jorgensen, 1994) og β -glukan er kjent for å være en potent adjuvant med effekter som økt mitogenitet, stimulering av hematopoetiske stamceller, aktivering av komplementkaskaden, og aktivering av lymfocytter, makrofager, dendrittceller, drepeceller, Th celler, og cytolytiske T-celler (Dalmo & Bogwald, 2008). Flere forsøk har vist økt immunrespons etter injeksjon med β -glukan, bl.a. viste Selvaraj og medarbeidere signifikant økning i totalt antall leukocytter og økt andel neutrofiler og monocytter 7 dager etter ip injeksjon og signifikant økning i superoxid anion produksjon økt motstand mot *Aeromonas hydrophila*. (Selvaraj, Sampath, & Sekar, 2005). På bakgrunn av disse faktorene ser det dermed ut som den mest sannsynlige forklaringen på den manglende antistoffresponsen er metodisk.

4.4 PCR

Resultater fra tidligere ex vivo forsøk har vist at nanopartikler tas opp i makrofager fra hodenyre fra laks etter meget kort tid (<15 min), og in vitro forsøk har også vist raskt opptak i både hodenyre og andre organer. En vet imidlertid lite om hvor lang tid det tar før partiklene brytes ned inni forskjellige organer. Det kan antas at cellulære prosesser bryter ned partiklene raskere enn hva som er tilfelle ekstracellulært. Men i og med at det ikke foreligger rapporter fra tidligere forsøk har vi ikke noe sammenligningsgrunnlag å basere forventningene til en eventuell immunrespons på.

Den eneste signifikante økningen i mRNA transkripter ble observert i hodenyre etter 2 dager med økningen av mRNA transkripter av IFN γ . Her ser vi størst økning i gruppe H (FCA/TNP-LPH/ β -glukan) hvilket er å forvente. NP/ β -glukan har den nest høyeste responsen hvilket også er naturlig i og med at β glukan er vist å være en potent adjuvant (Dalmo). Denne responsen ser ut til å være uspesifikk, da IFN gamma gjerne er noe av det første man ser økning av tidlig i en immunrespons. IFN produseres av NK celler og stimulerer til proliferering

og differensiering av T-lymfocytter som også produserer og skiller ut store mengder IFN i en positiv feedback loop. Det er tidligere vist akutfaserespons i flere fiskearter mellom 1 og 2 dager etter immunisering (Bayne & Gerwick, 2001). Adaptive immunresponser er temperaturavhengige og det kan gå opptil flere uker før en kan detektere adaptive immunresponser ved lave temperaturer (Ellis, 2001). Men det er vist at adaptive immunresponser trer i kraft før eller siden, også ved temperaturer så lave som 3 °C (Eggset, Mikkelsen, & Killie, 1997). det ble i dette forsøket også tatt ut prøver etter 15 og 30 dager, ved disse prøvetidspunktene kan det tenkes at det kan detekteres adaptive immunresponser ved økning i mRNA transkripter av enten GATA-3 eller T-bet.

5 Referanser

- Abbas, A. K., & Lichtman, A. H. (2006). *Basic immunology : functions and disorders of the immune system* (2nd ed.). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
- Alcorn, S. W., Murray, A. L., & Pascho, R. J. (2002). Effects of rearing temperature on immune functions in sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Fish & Shellfish Immunology*, *12*(4), 303-334.
- Bayne, C. J., & Gerwick, L. (2001). The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, *25*(8-9), 725-743.
- Berg, A. (2006). *Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk : effekter og bivirkninger*. Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Bird, S., Zou, J., & Secombes, C. J. (2006). Advances in fish cytokine biology give clues to the evolution of a complex network. *Curr Pharm Des*, *12*(24), 3051-3069.
- Bittner, B., Ronneberger, B., Zange, R., Volland, C., Anderson, J. M., & Kissel, T. (1998). Bovine serum albumin loaded poly(lactide-co-glycolide) microspheres: the influence of polymer purity on particle characteristics. *J Microencapsul*, *15*(4), 495-514.
- Campbell, R. D., & Trowsdale, J. (1993). Map of the Human Mhc. *Immunology Today*, *14*(7), 349-352.
- Chakir, H., Wang, H., Lefebvre, D. E., Webb, J., & Scott, F. W. (2003). T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J Immunol Methods*, *278*(1-2), 157-169.
- Dalmo, R. A., & Bogwald, J. (2008). beta-glucans as conductors of immune symphonies. *Fish & Shellfish Immunology*, *25*(4), 384-396.
- Davda, J., & Labhasetwar, V. (2002). Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells. *Int J Pharm*, *233*(1-2), 51-59.
- Dixon, B., & Stet, R. J. M. (2001). The relationship between major histocompatibility receptors and innate immunity in teleost fish. *Developmental and Comparative Immunology*, *25*(8-9), 683-699.
- Eggset, G., Mikkelsen, H., & Killie, J. E. A. (1997). Immunocompetence and duration of immunity against *Vibrio salmonicida* and *Aeromonas salmonicida* after vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) at low and high temperatures. *Fish & Shellfish Immunology*, *7*(4), 247-260.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology*, *25*(8-9), 827-839.
- Esmaeili, F., Ghahremani, M. H., Esmaeili, B., Khoshayand, M. R., Atyabi, F., & Dinarvand, R. (2008). PLGA nanoparticles of different surface properties: preparation and evaluation of their body distribution. *Int J Pharm*, *349*(1-2), 249-255.
- Ferber, I. A., Lee, H. J., Zonin, F., Heath, V., Mui, A., Arai, N., et al. (1999). GATA-3 significantly downregulates IFN-gamma production from developing Th1 cells in addition to inducing IL-4 and IL-5 levels. *Clin Immunol*, *91*(2), 134-144.
- Flajnik, M. F. (1998). Churchill and the immune system of ectothermic vertebrates. *Immunol Rev*, *166*, 5-14.
- Freitas, S., Merkle, H. P., & Gander, B. (2004). Ultrasonic atomisation into reduced pressure atmosphere--envisaging aseptic spray-drying for microencapsulation. *J Control Release*, *95*(2), 185-195.

- Gerwick, L., Corley-Smith, G., & Bayne, C. J. (2007). Gene transcript changes in individual rainbow trout livers following an inflammatory stimulus. *Fish Shellfish Immunol*, 22(3), 157-171.
- Gillund, F., Dalmo, R., Tonheim, T. C., Seternes, T., & Myhr, A. I. (2008). DNA vaccination in aquaculture - Expert judgments of impacts on environment and fish health. *Aquaculture*, 284(1-4), 25-34.
- Gudding, R., Lillehaug, A., & Evensen, O. (1999). Recent developments in fish vaccinology. *Vet Immunol Immunopathol*, 72(1-2), 203-212.
- Hamdy, S., Elamanchili, P., Alshamsan, A., Molavi, O., Satou, T., & Samuel, J. (2007). Enhanced antigen-specific primary CD4(+) and CD8(+) responses by codelivery of ovalbumin and toll-like receptor ligand monophosphoryl lipid A in poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanoparticles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, 81A(3), 652-662.
- Hart, S., Wrathmell, A. B., Harris, J. E., & Grayson, T. H. (1988). Gut Immunology in Fish - a Review. *Developmental and Comparative Immunology*, 12(3), 453-480.
- Hashimoto, K., Nakanishi, T., & Kurosawa, Y. (1990). Isolation of Carp Genes Encoding Major Histocompatibility Complex Antigens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87(17), 6863-6867.
- Haug, T., Bakketeig, I., Knutsen, J. A., Opstad, I., & Agnalt, A.-L. (2009). *Kyst og havbruk 2009 / elektronisk ressurs*. Bergen: Havforskningsinstituttet.
- Janeway, C. A. (2005). *Immunobiology : the immune system in health and disease* (6th ed.). New York: Garland Science.
- Jiang, W. L., Gupta, R. K., Deshpande, M. C., & Schwendeman, S. P. (2005). Biodegradable poly(lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(3), 391-410.
- Johansen, L. H., & Sommer, A. I. (1995). Multiplication of Infectious Pancreatic Necrosis Virus (Ipnv) in Head Kidney and Blood Leukocytes Isolated from Atlantic Salmon, *Salmo Salar* L. *Journal of Fish Diseases*, 18(2), 147-156.
- Johansen, P., Men, Y., Audran, R., Corradin, G., Merkle, H. P., & Gander, B. (1998). Improving stability and release kinetics of microencapsulated tetanus toxoid by co-encapsulation of additives. *Pharm Res*, 15(7), 1103-1110.
- Karlsson, M., Edfors-Lilja, I., & Bjornsson, S. (2000). Binding and detection of glycosaminoglycans immobilized on membranes treated with cationic detergents. *Anal Biochem*, 286(1), 51-58.
- Katare, Y. K., Muthukumar, T., & Panda, A. K. (2005). Influence of particle size, antigen load, dose and additional adjuvant on the immune response from antigen loaded PLA microparticles. *Int J Pharm*, 301(1-2), 149-160.
- Killie, J. E. A., & Jorgensen, T. O. (1994). Immunoregulation in Fish .1. Intramolecular-Induced Suppression of Antibody-Responses to Haptenated Protein Antigens Studied in Atlantic Salmon (*Salmo Salar* L). *Developmental and Comparative Immunology*, 18(2), 123-136.
- Kim, W. S., Nishizawa, T., & Yoshimizu, M. (2007). Non-specific adsorption of fish immunoglobulin M (IgM) to blocking reagents on ELISA plate wells. *Dis Aquat Organ*, 78(1), 55-59.
- Kjorsvik, E., Vandermeeren, T., Kryvi, H., Arnfinnson, J., & Kvenseth, P. G. (1991). Early Development of the Digestive-Tract of Cod Larvae, *Gadus-Morhua* L, during Start-Feeding and Starvation. *Journal of Fish Biology*, 38(1), 1-15.

- Kryvi, H., & Totland, G. K. (1997). *Fiskeanatomi*. Kristiansand: Høyskoleforl.
- Lavelle, E. C., Jenkins, P. G., & Harris, J. E. (1997). Oral immunization of rainbow trout with antigen microencapsulated in poly(DL-lactide-co-glycolide) microparticles. *Vaccine*, *15*(10), 1070-1078.
- Lillehaug, A. (1989). Oral Immunization of Rainbow-Trout, *Salmo-Gairdneri* Richardson, against Vibriosis with Vaccines Protected against Digestive Degradation. *Journal of Fish Diseases*, *12*(6), 579-584.
- Lovoll, M., Dalmo, R. A., & Bogwald, J. (2007). Extrahepatic synthesis of complement components in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Fish Shellfish Immunol*, *23*(4), 721-731.
- Magnadottir, B. (2006). Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology*, *20*(2), 137-151.
- Magnadottir, B., Lange, S., Gudmundsdottir, S., Bogwald, J., & Dalmo, R. A. (2005). Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, *19*(5), 429-439.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., & Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology*, *25*(12), 677-686.
- Marsden, M. J., Vaughan, L. M., Fitzpatrick, R. M., Foster, T. J., & Secombes, C. J. (1998). Potency testing of a live, genetically attenuated vaccine for salmonids. *Vaccine*, *16*(11-12), 1087-1094.
- McBride, J. M., & Fathman, C. G. (2002). A complicated relationship: fulfilling the interactive needs of the T lymphocyte and the dendritic cell. *Pharmacogenomics J*, *2*(6), 367-376.
- Men, Y., Tamber, H., Audran, R., Gander, B., & Corradin, G. (1997). Induction of a cytotoxic T lymphocyte response by immunization with a malaria specific CTL peptide entrapped in biodegradable polymer microspheres. *Vaccine*, *15*(12-13), 1405-1412.
- Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., Lillehaug, A., & Ramstad, A. (1996). Protection, immune responses and side effects in Atlantic salmon (*Salmo salar* L) vaccinated against furunculosis by different procedures. *Fish & Shellfish Immunology*, *6*(8), 599-613.
- Midtlyng, P. J., Reitan, L. J., & Speilberg, L. (1996). Experimental studies on the efficacy and side-effects of intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar* L) against furunculosis. *Fish & Shellfish Immunology*, *6*(5), 335-350.
- Mittal, G., Sahana, D. K., Bhardwaj, V., & Kumar, M. N. V. R. (2007). Estradiol loaded PLGA nanoparticles for oral administration: Effect of polymer molecular weight and copolymer composition on release behavior in vitro and in vivo. *Journal of Controlled Release*, *119*(1), 77-85.
- Moore, A., McGuirk, P., Adams, S., Jones, W. C., McGee, J. P., O'Hagan, D. T., et al. (1995). Immunization with a soluble recombinant HIV protein entrapped in biodegradable microparticles induces HIV-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes and CD4+ Th1 cells. *Vaccine*, *13*(18), 1741-1749.
- Mosmann, T. R., & Coffman, R. L. (1989). Th1-Cell and Th2-Cell - Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional-Properties. *Annual Review of Immunology*, *7*, 145-173.
- Mundargi, R. C., Babu, V. R., Rangaswamy, V., Patel, P., & Aminabhavi, T. M. (2008). Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *J Control Release*, *125*(3), 193-209.

- Myhr, A. I., & Dalmo, R. A. (2005). Introduction of genetic engineering in aquaculture: Ecological and ethical implications for science and governance. *Aquaculture*, 250(3-4), 542-554.
- O'Garra, A. (2000). Commitment factors for T helper cells. *Curr Biol*, 10(13), R492-494.
- Ogawa, Y., Yamamoto, M., Okada, H., Yashiki, T., & Shimamoto, T. (1988). A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly(lactic/glycolic) acid. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 36(3), 1095-1103.
- Olsen, A. B., Mikalsen, J., Rode, M., Alfjorden, A., Hoel, E., Straum-Lie, K., et al. (2006). A novel systemic granulomatous inflammatory disease in farmed Atlantic cod, *Gadus morhua* L., associated with a bacterium belonging to the genus *Francisella*. *Journal of Fish Diseases*, 29(5), 307-311.
- Ortaldo, J. R., & Hiserodt, J. C. (1989). Mechanisms of target cell killing by natural killer cells. *Curr Opin Immunol*, 2(1), 39-42.
- Panyam, J., Dali, M. M., Sahoo, S. K., Ma, W., Chakravarthi, S. S., Amidon, G. L., et al. (2003). Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles. *J Control Release*, 92(1-2), 173-187.
- Parsa, S., Wang, Y., Fuller, J., Langer, R., & Pfeifer, B. A. (2008). A comparison between polymeric microsphere and bacterial vectors for macrophage P388D1 gene delivery. *Pharm Res*, 25(5), 1202-1208.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29(9), e45.
- Poppe, T., & Bergh, Ø. (1999). *Fiskehelse og fiskesykdommer*. Oslo: Universitetsforl.
- Poppe, T. T., & Breck, O. (1997). Pathology of Atlantic salmon *Salmo salar* intraperitoneally immunized with oil-adjuvanted vaccine. A case report. *Diseases of Aquatic Organisms*, 29(3), 219-226.
- Rajewsky, K. (1996). Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature*, 381(6585), 751-758.
- Robertsen, B. (2008). Expression of interferon and interferon-induced genes in salmonids in response to virus infection, interferon-inducing compounds and vaccination. *Fish & Shellfish Immunology*, 25(4), 351-357.
- Rush, C., Mitchell, T., & Garside, P. (2002). Efficient priming of CD4+ and CD8+ T cells by DNA vaccination depends on appropriate targeting of sufficient levels of immunologically relevant antigen to appropriate processing pathways. *J Immunol*, 169(9), 4951-4960.
- Salerno-Goncalves, R., & Szein, M. B. (2006). Cell-mediated immunity and the challenges for vaccine development. *Trends in Microbiology*, 14(12), 536-542.
- Sato, A., Figueroa, F., Murray, B. W., Malaga-Trillo, E., Zaleska-Rutczynska, Z., Sultmann, H., et al. (2000). Nonlinkage of major histocompatibility complex class I and class II loci in bony fishes. *Immunogenetics*, 51(2), 108-116.
- Schroder, M. B., Mikkelsen, H., Bordal, S., Gravningen, K., & Lund, V. (2006). Early vaccination and protection juveniles against of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) juveniles against classical vibriosis. *Aquaculture*, 254(1-4), 46-53.
- Schroder, M. B., Villena, A. J., & Jorgensen, T. O. (1998). Ontogeny of lymphoid organs and immunoglobulin producing cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Developmental and Comparative Immunology*, 22(5-6), 507-517.
- Secombes, C. (2008). Will advances in fish immunology change vaccination strategies? *Fish Shellfish Immunol*, 25(4), 409-416.

- Selvaraj, V., Sampath, K., & Sekar, V. (2005). Administration of yeast glucan enhances survival and some non-specific and specific immune parameters in carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Aeromonas hydrophila*. *Fish & Shellfish Immunology*, *19*(4), 293-306.
- Shen, H., Ackerman, A. L., Cody, V., Giodini, A., Hinson, E. R., Cresswell, P., et al. (2006). Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles. *Immunology*, *117*(1), 78-88.
- Szabo, S. J., Kim, S. T., Costa, G. L., Zhang, X., Fathman, C. G., & Glimcher, L. H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell*, *100*(6), 655-669.
- Tian, J., Sun, X., Chen, X., Yu, J., Qu, L., & Wang, L. (2008). The formulation and immunisation of oral poly(DL-lactide-co-glycolide) microcapsules containing a plasmid vaccine against lymphocystis disease virus in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int Immunopharmacol*, *8*(6), 900-908.
- Trinchieri, G. (1989). Biology of Natural-Killer Cells. *Advances in Immunology*, *47*, 187-376.
- Utke, K., Kock, H., Schuetze, H., Bergmann, S. M., Lorenzen, N., Einer-Jensen, K., et al. (2008). Cell-mediated immune responses in rainbow trout after DNA immunization against the viral hemorrhagic septicemia virus. *Dev Comp Immunol*, *32*(3), 239-252.
- Valmori, D., Romero, J. F., Men, Y., Maryanski, J. L., Romero, P., & Corradin, G. (1994). Induction of a Cytotoxic T-Cell Response by Coinjection of a T-Helper Peptide and a Cytotoxic T-Lymphocyte Peptide in Incomplete Freund's-Adjuvant (Ifa) - Further Enhancement by Pre-Injection of Ifa Alone. *European Journal of Immunology*, *24*(6), 1458-1462.
- Yang, D. M., Fairweather, N., Button, L. L., McMaster, W. R., Kahl, L. P., & Liew, F. Y. (1990). Oral *Salmonella typhimurium* (AroA-) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. *J Immunol*, *145*(7), 2281-2285.
- Yang, Y. W., & Hsu, P. Y. J. (2008). The effect of poly(D,L-lactide-co-glycolide) microparticles with polyelectrolyte self-assembled multilayer surfaces on the cross-presentation of exogenous antigens. *Biomaterials*, *29*(16), 2516-2526.
- Yoshida, M., & Babensee, J. E. (2004). Poly(lactic-co-glycolic acid) enhances maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *J Biomed Mater Res A*, *71*(1), 45-54.
- Yushu, H., & Venkatraman, S. (2006). The effect of process variables on the morphology and release characteristics of protein-loaded PLGA particles. *Journal of Applied Polymer Science*, *101*(5), 3053-3061.

6 Vedlegg

6.1 Kjemikalier og reagenser

Tabell 5.1. Kjemikalier og reagenser

Navn	Produsent
Polyvinylalcohol (PVA) 87-89 % hydrolyzed	Sigma Aldrich
Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 (PLGA)	Sigma Aldrich
Kloroform	Merck
D-(+)-Trehalose dihydrate (Trehalose)	Sigma Aldrich
2,4,6-trinitrophenyl(TNP-(picril)sulfonsyre (P2297)	Sigma Aldrich
Limulus polyphemus haemocyanin LPH: H1757	Sigma Aldrich
Poly etylen glycol (PEG)	
Natrium metabisulfitt ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$, Mw = 190,10)	Merck
Diklorometan	Merck
Iodogen (1,3,4,6-tetrakloro-3 α , 6 α -DI-phenylglycouril, Mw = 432,1	Sigma Aldrich
Benzokain	ACD, SA, Belgia
Fosfat bufret saline (PBS)	Gibco
Bovine seum albumin (BSA)	Sigma Aldrich
KI	Merck
Tørrmelk (fettfri)	
Tween® 20	Fluka
RNAlater	Ambion
RNase Zap®	Sigma Aldrich
Rneasy Mini kit	Qiagen
Isol RNA lysis reagent	5Prime
10 x Blue Juice loading buffer™	Invitrogen
QuantiTect® Revers Transcription Kit	Qiagen
Fast Sybr® Green Mastermix	Applied Biosystems
BCA Protein reagent assay	Pierce Ltd
As GATA-3 primers (forward and reverse)	Eurofins MWG Operon
As T-bet primers (forward and reverse)	Eurofins MWG Operon
As IFN γ primers (forward and reverse)	Eurofins MWG Operon

As Efa1A Primers (forward and reverse)	Eurofins MWG Operon
FITC merket β -glukan	Norsk Hydro

6.2 Løsninger

Tabell 5.2. 5 % TNP løsning

Komponent	Volum/mengde
TNP (2,4,6-trinitrophenyl(TNP-(picril)sulfonsyre)	0,5 g
Karbonatbuffer (0,5 M)	10 ml

Tabell 5.3. Løsninger brukt ved ELISA

PBST	Koblingsbuffer (Karbonatbuffer)	Substratbuffer (Alkalisk fosfatase)
100 ml 10xPBS ELISA	1,59 g Na ₂ CO ₃	97 ml dietanolamin
900 ml dH ₂ O	2,93 g NaHCO ₃	900 ml dH ₂ O
500 μ l Tween	1000 ml dH ₂ O	100 mg MgCl ₂ 6H ₂ O
pH justeres til 7,3	pH justeres til 9,6	pH justeres til 9,8 med 6 M HCl

Tabell 5.4. 1 % agarose gel

Komponent	Volum/mengde
Multi ABgarose	1 g
TAE buffer (spesifiser!)	100 ml
Gel red (spesifiser!)	0,01 % (3 μ l ved bruk av 30 ml gel)

Tabell 5.5. DNA eliminerings reaksjon

Komponent	Volum/mengde
gDNA Wipeout buffer, 7x	2 μ l
Templat RNA	500 ng
RNase fritt vann	Varierende
Totalt volum	14 μl

Tabell 5.6. Mastermix til cDNA syntesen

Komponent	Volum
Quantiscript Revers Transkriptase	1 µl
Quantiscript RT buffer, 5x	4 µl
RT primer mix	1 µl
Totalt volum	6 µl

Tabell 5.7. Reaksjonsoppsett til PCR

Komponent	Volum til en reaksjon (20 µl)
Fast SYBR® Green MasterMix (2X)	10 µl
Fremover primer	1,25 µl
Revers primer	1,25 µl
RNase fritt H ₂ O	5,5 µl
cDNA templat	2 µl
Total volum	20 µl

6.3 Utstyr

Tabell 5.8. Utstyr til preparering og karakterisering av nanopartikler

Navn	Produsent
Sonics Vibra cell VC750, 3 mm tapered microtip	Sonics and materials Inc. USA
Avanti® j-26 XP centrifuge	BeckmanCoulter®, USA
Nalgene centrifuge tube, 30 ml	Nalgene, USA
ScanVac CoolSafe™ 110-4	Scanlaf A/S, Danmark
Submicron particle sizer model 370-s	Nicom particle sizing systems, USA
CW388 version 1.68 software	Nicom particle sizing systems, USA

Tabell 5.9. Utstyr til merking av protein med I¹²⁵

Navn	Produsent
PD kolonner	
Sprøyte	
Ellermann rør med lokk	
Blyboks	

Blyskjerm	
-----------	--

Tabell 5.9. Utstyr til immunisering og prøveuttak

Navn	Produsent
Plastipak™ steril sprøyte (1 ml)	Becton Dickinson
Microlance™ sprøytespisser (0,6 x 25 mm)	Becton Dickinson
Vacutainer precisionglide	Becton Dickinson
Vacutainer, 2 ml 13 x 75 mm	Becton Dickinson

Tabell 5.10. Utstyr til ELISA

Navn	Produsent
F96 maxisorp Nunc™ immuno-plate	Nunc™, Danmark
Scan Washer 400	Molecular devices, CA, USA
Spectra Max 190	Molecular devices, CA, USA
Soft Max pro software	Molecular devices, CA, USA

Tabell 5.11. Utstyr til RNA-isolering

Navn	Produsent
RNeasy® Mini Kit	Qiagen
Ultra turrax T25 Basic crusher	IKA® WERKE
14 ml polypropylene round bottom tube	Falcon, BD
Eppendorfrør	Plastibrand®, Tyskland
Eppendorf centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Tyskland
NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	NanoDrop® Technologies, DE, USA
ND-1000 Software	NanoDrop® Technologies, DE, USA
GeneGenius Bio Imaging System	Syngene, UK
Genesnap software	Syngene, UK

Tabell 5.12. Utstyr til cDNA syntese

Navn	Produsent
QuantiTect® Revers Transcription Kit	Qiagen
ABgene 0,2 ml Thermo-strip m/lokk	ABgene, UK
GeneAmp® PCR system 2700	Applied Biosystems

Biofuge pico	Heraeus, Tyskland
--------------	-------------------

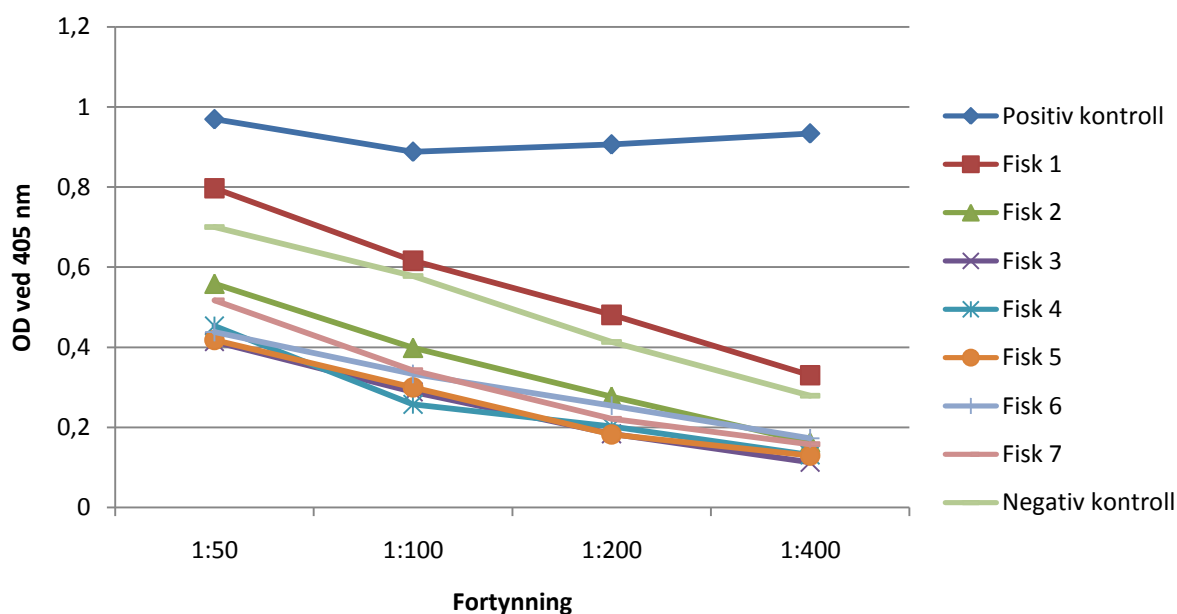
Tabell 5.13. Utstyr til Real-Time RT-PCR

Navn	Produsent
Microamp™ Fast optical 96 well Reaction plate	Applied Biosystems
Microamp™ optical adhesive films	Applied Biosystems
7500 Fast Real-time System	Applied Biosystems
Multifuge 1 S-R sentrifuge	Heraeus, Tyskland

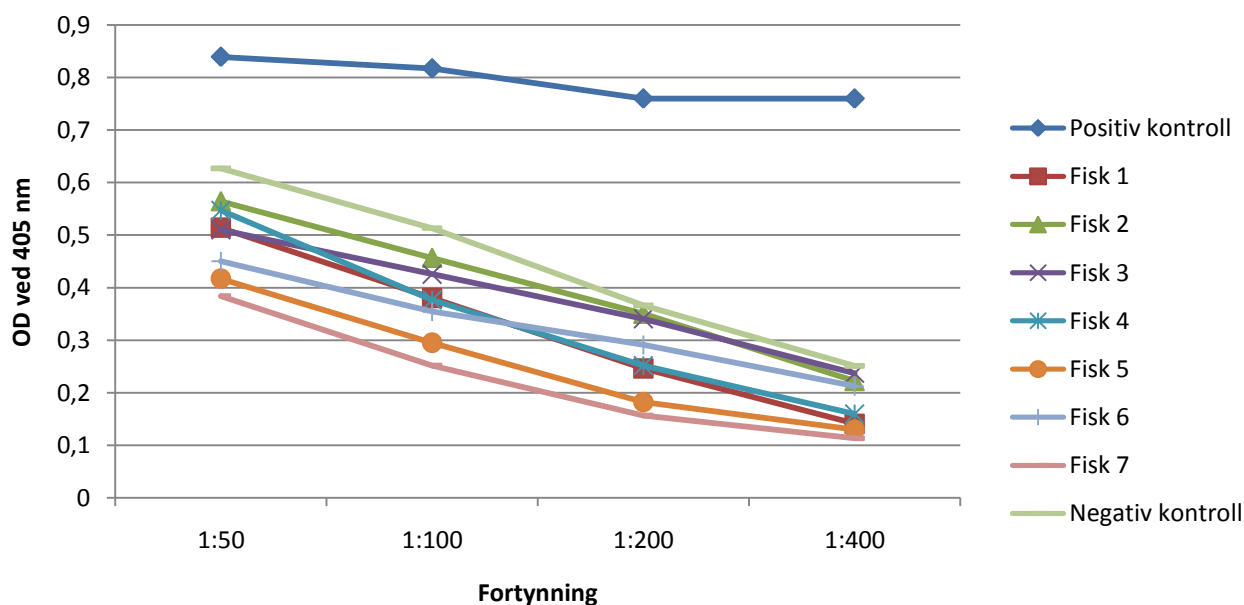
Tabell 5.14. Utstyr til release

Navn	Produsent
F96 maxisorp Nunc™ immuno-plate	Nunc™, Danmark
Spectra Max 190	Molecular devices, CA, USA
Soft Max pro software	Molecular devices, CA, USA

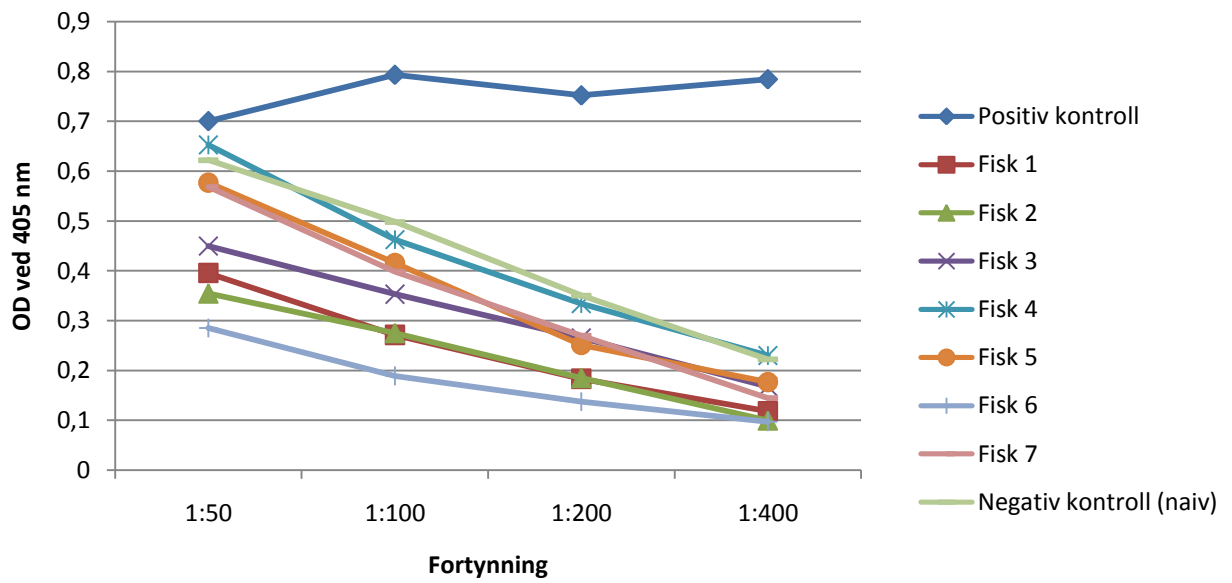
ELISA individanalyser



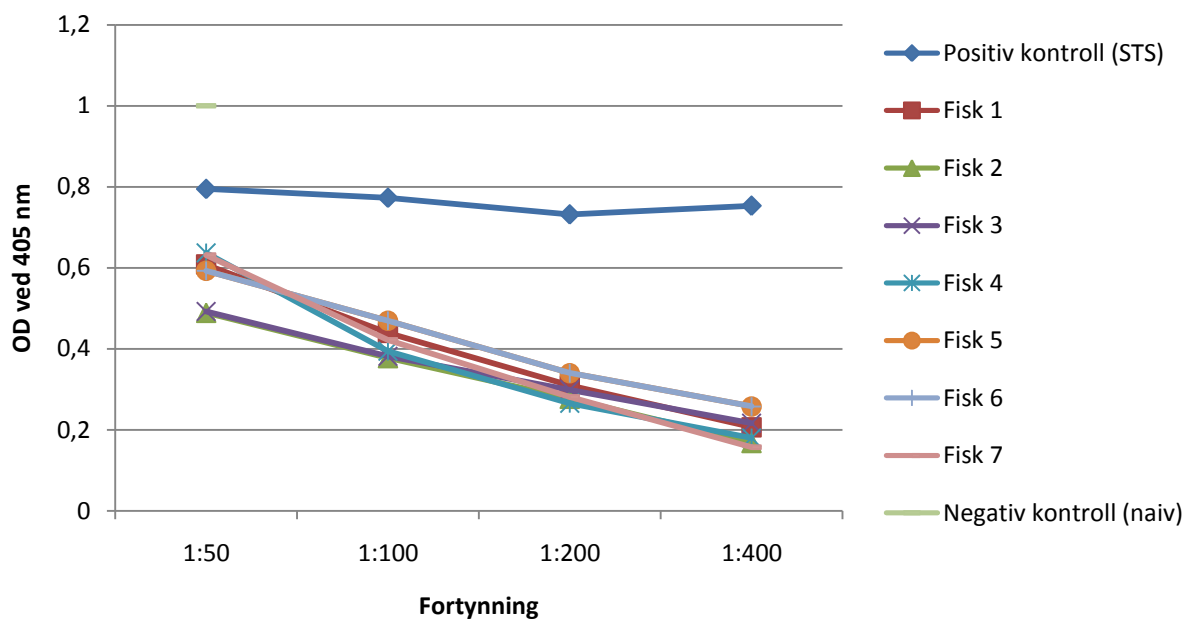
Figur 5.1. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med TNP-LPH etter 30 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



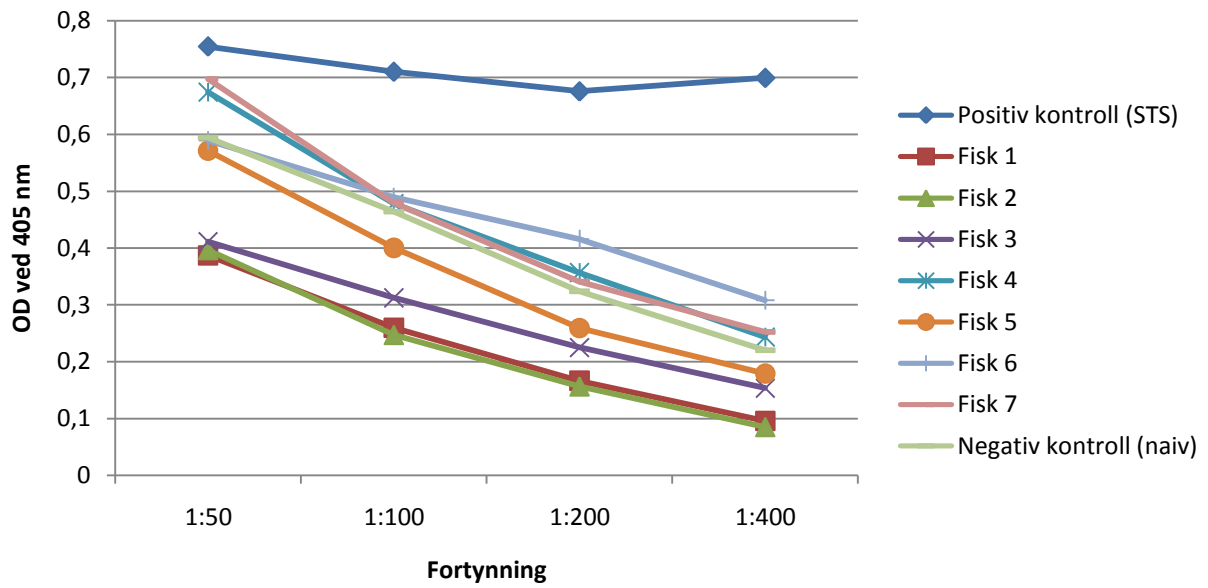
Figur 5.2. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med NP/TNP-LPH etter 30 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



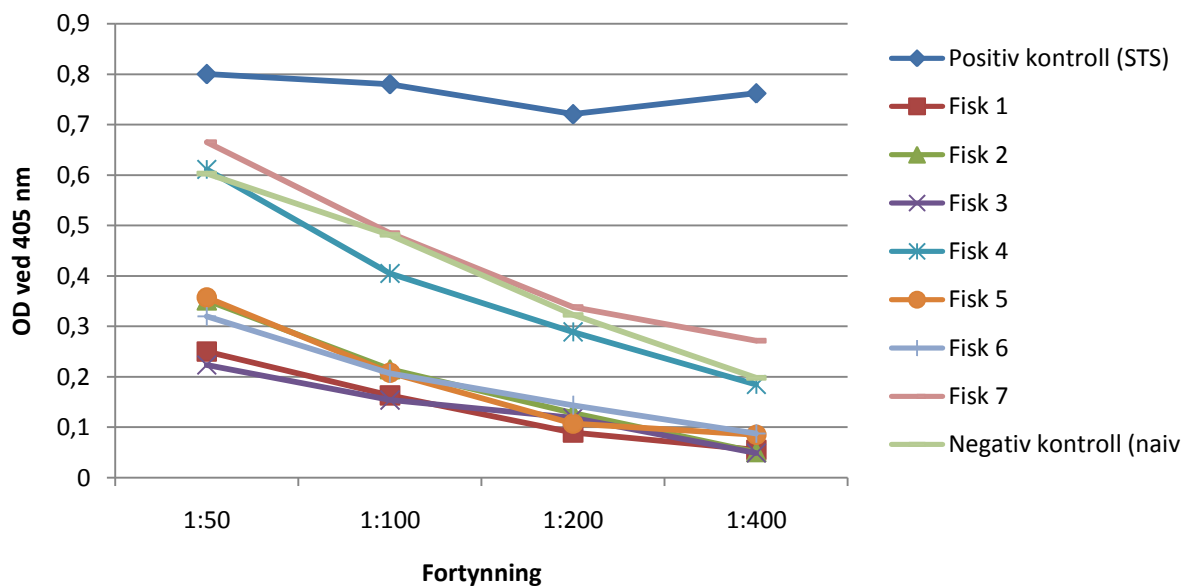
Figur 5.3. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med NP/TNP-LPH/ β -glukan etter 30 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uninjisert fisk.



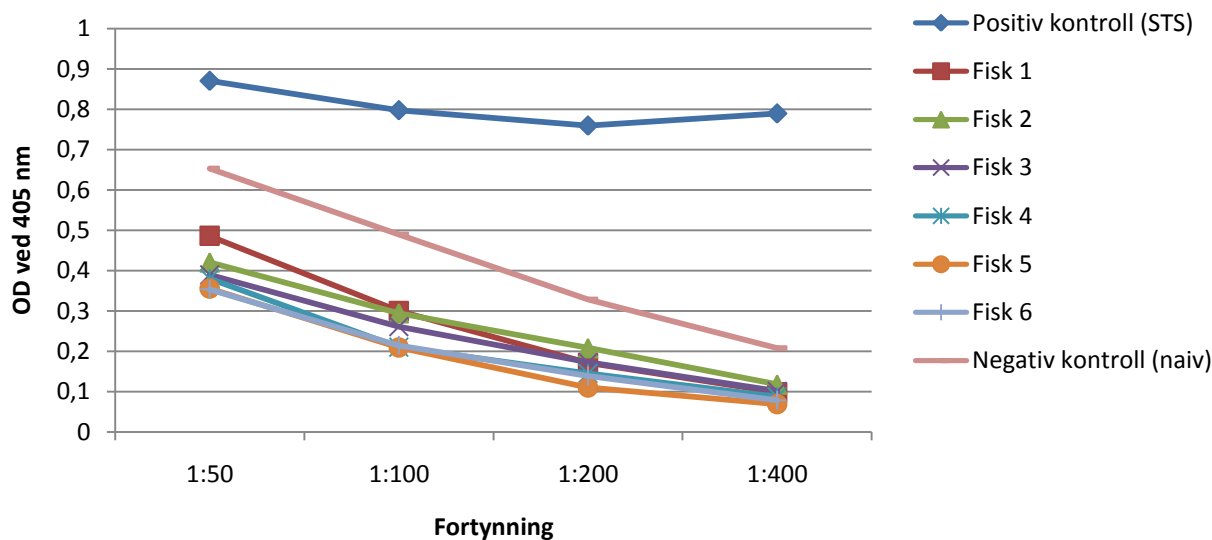
Figur 5.4. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene injisert med PBS etter 30 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uninjisert fisk.



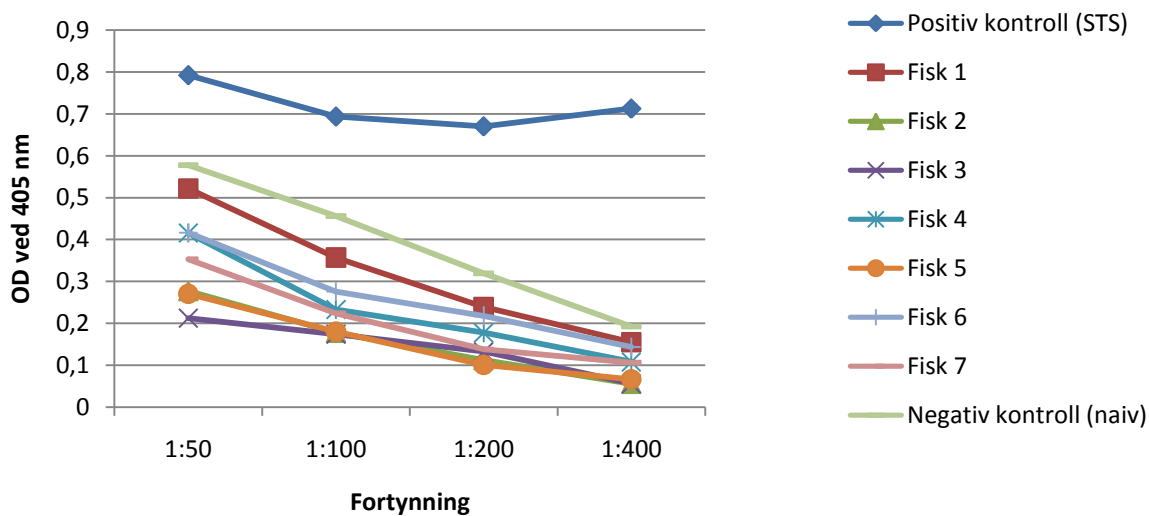
Figur 5.5. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med FCA/TNP-LPH/ β -glukan etter 30 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



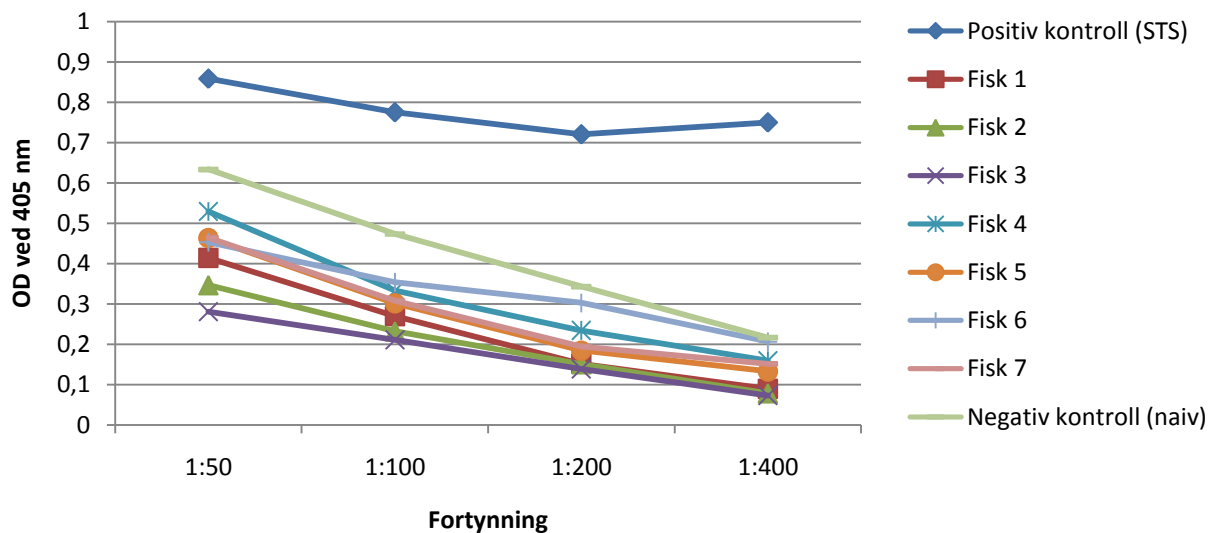
Figur 5.6. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med TNP-LPH etter 60 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



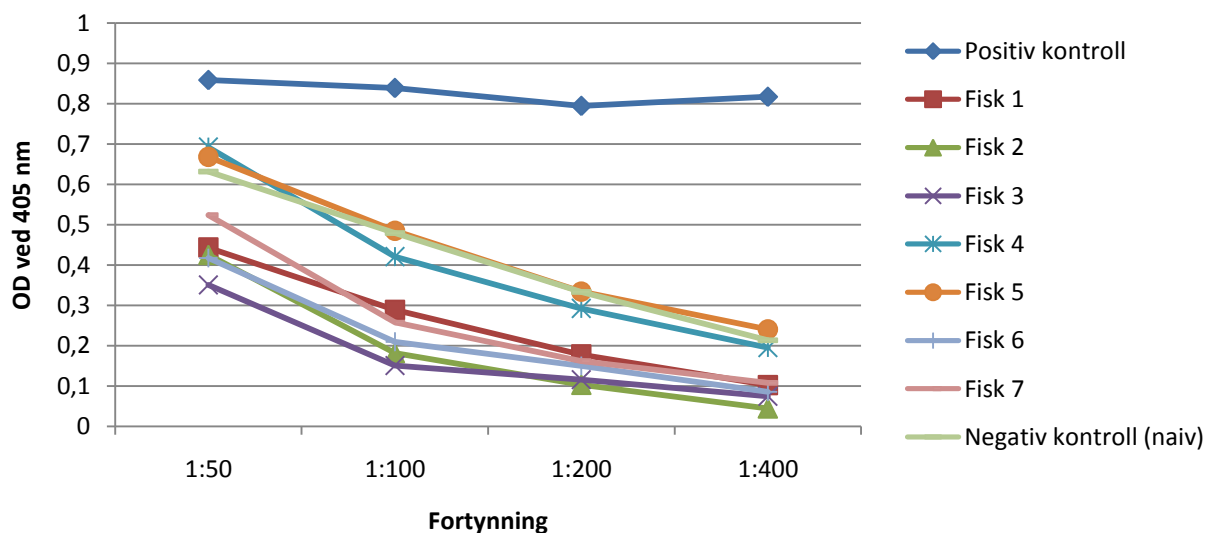
Figur 5.7. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med NP/TNP-LPH etter 60 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



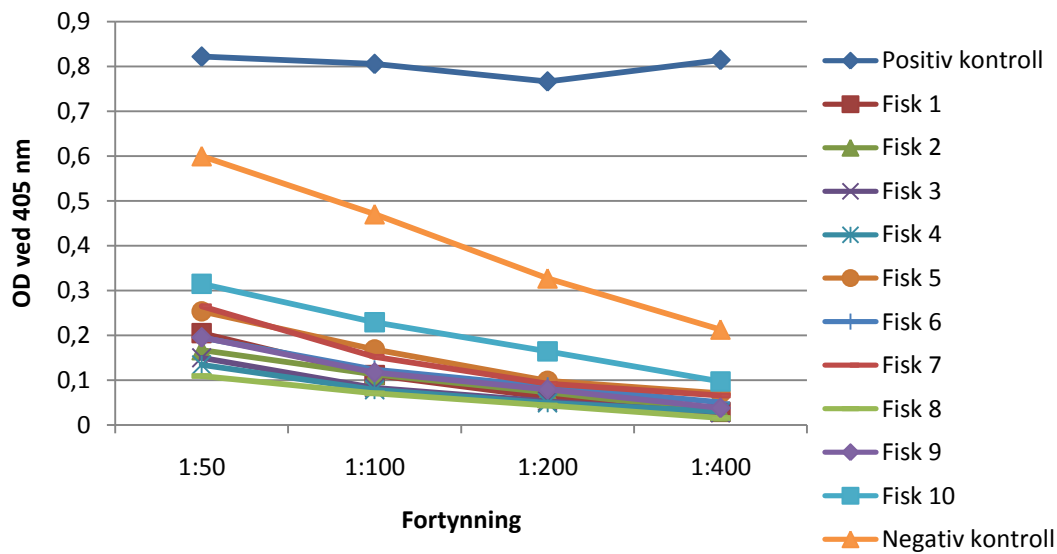
Figur 5.8. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med NP/TNP-LPH/β-glukan etter 60 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



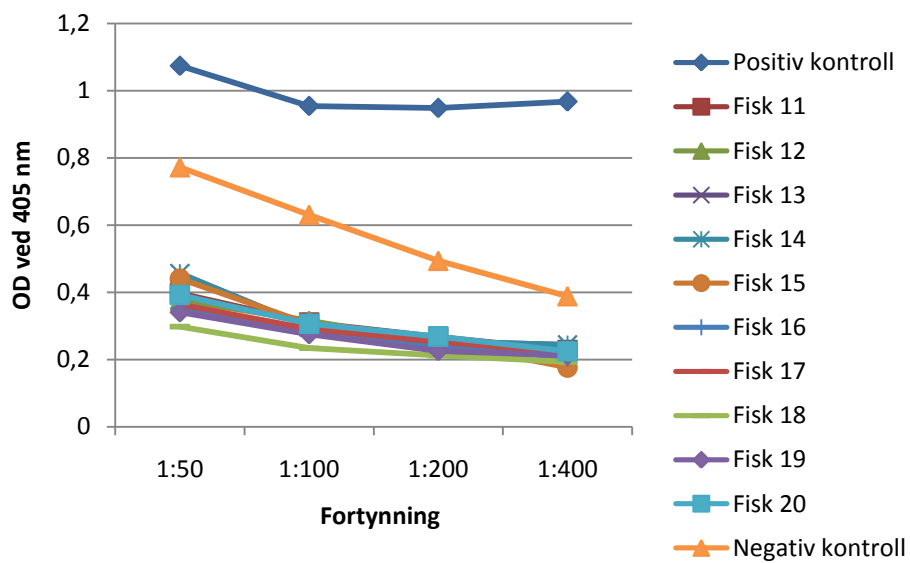
Figur 5.9. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene injisert med PBS etter 60 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uninisert fisk.



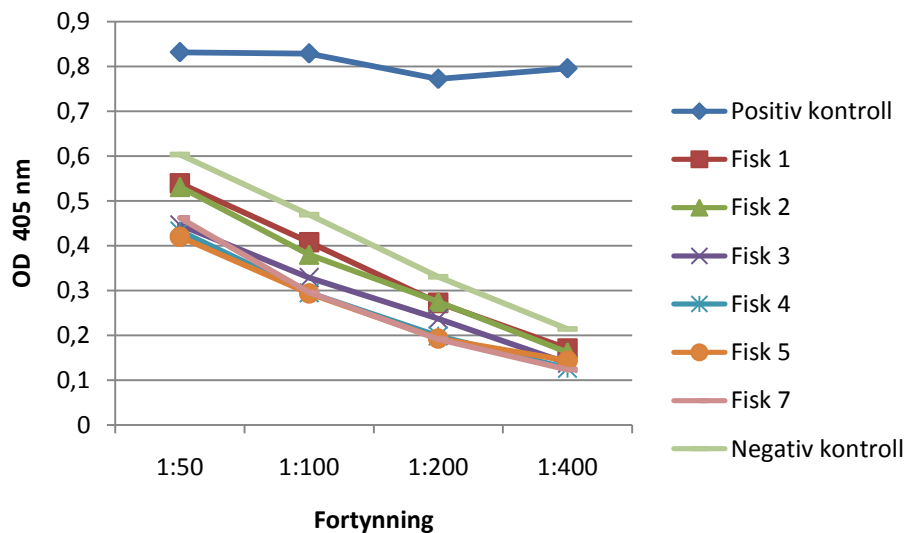
Figur 5.10. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med FCA/TNP-LPH/ β -glukan etter 60 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uninisert fisk.



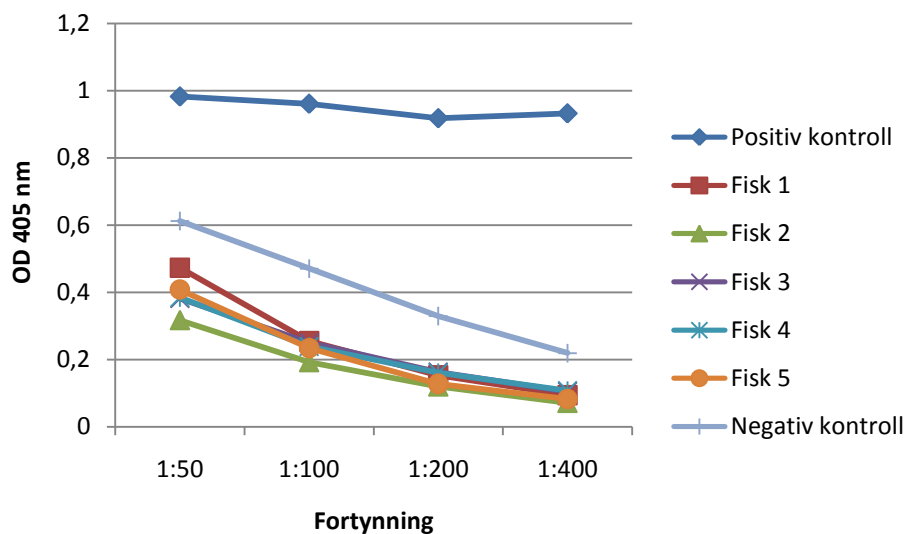
Figur 5.11. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med NP/TNP-LPH/ β -glukan + boost etter 60 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



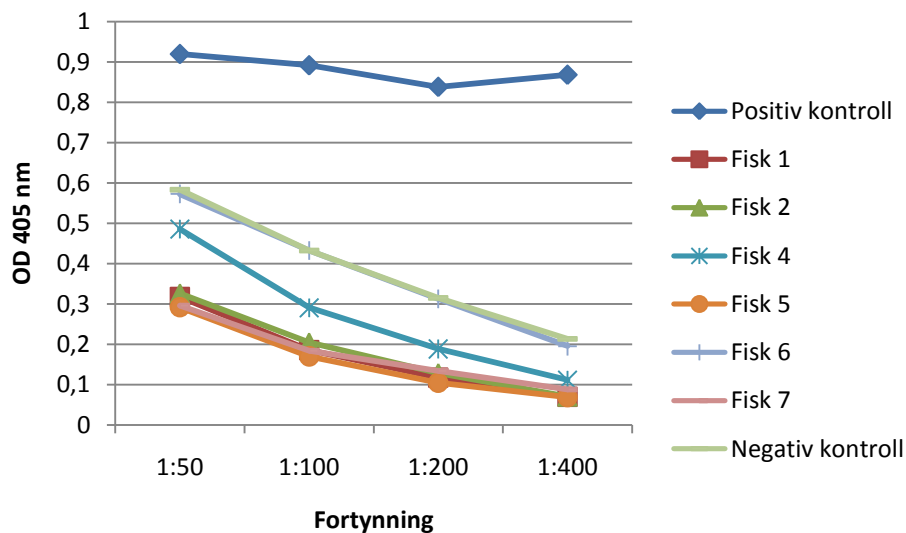
Figur 5.12. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med FCA/TNP-LPH/ β -glukan + boost etter 60 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



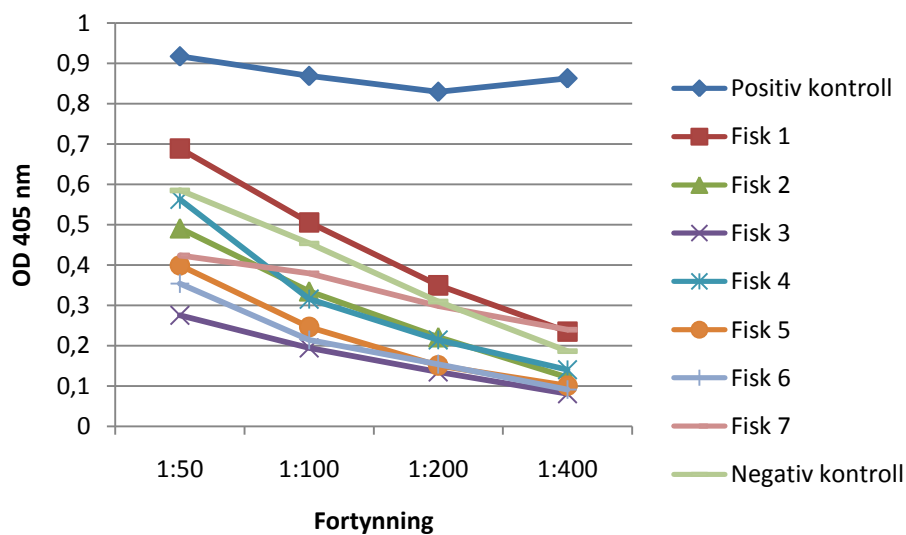
Figur 5.13. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med TNP-LPH etter 90 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



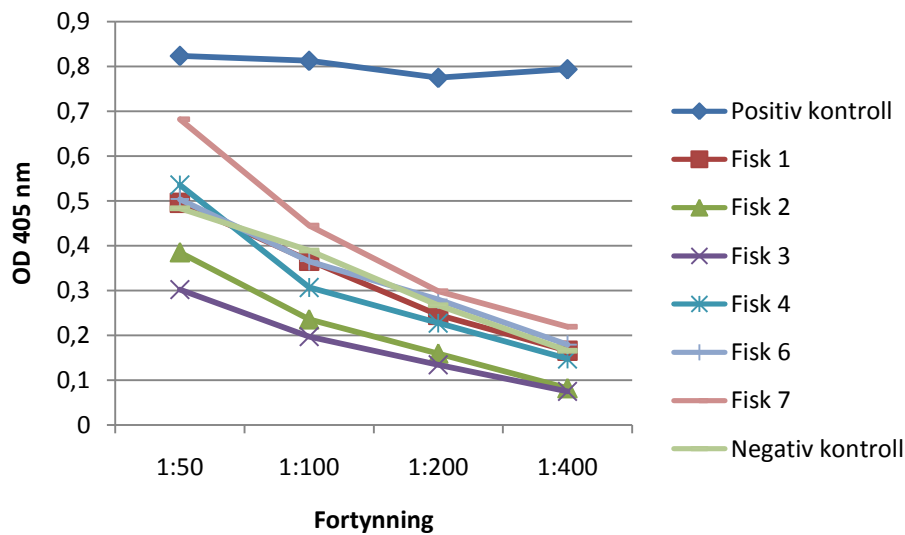
Figur 5.14. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med NP/TNP-LPH etter 90 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



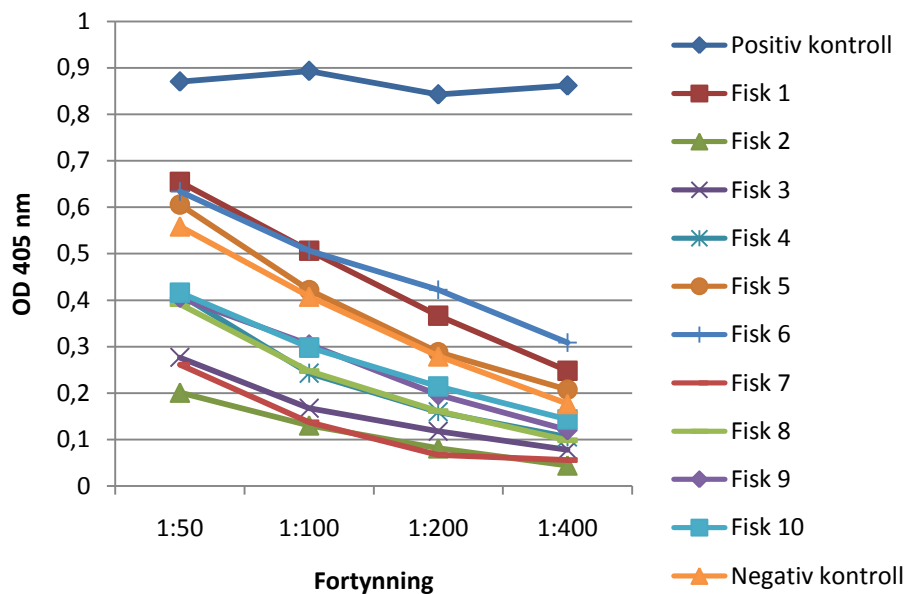
Figur 5.15. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med NP/TNP-LPH/β-glukan etter 90 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uninjisert fisk.



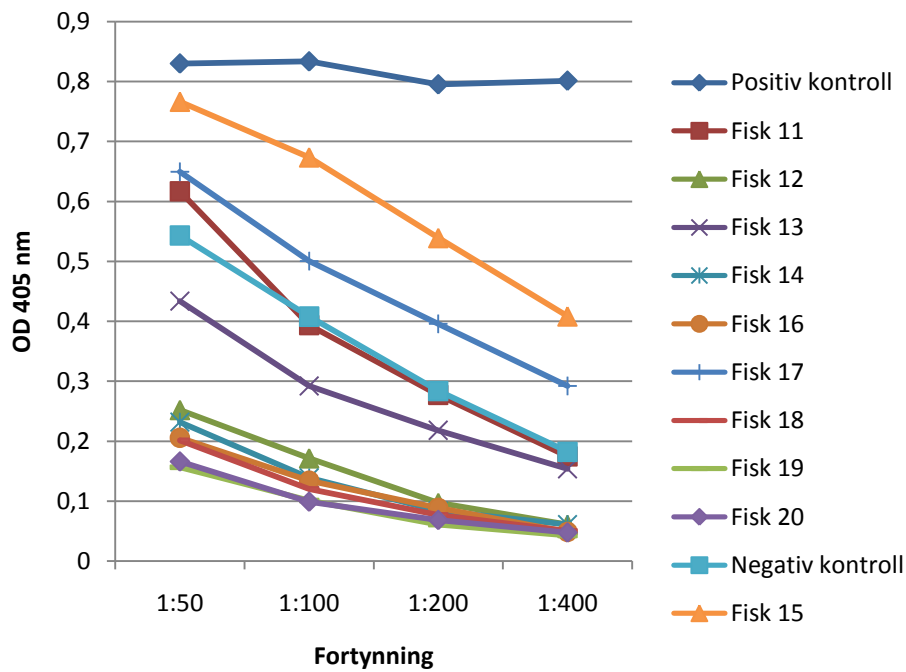
Figur 5.16. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene injisert med PBS etter 90 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uninjisert fisk.



Figur 5.17. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med FCA/TNP-LPH/ β -glukan etter 90 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



Figur 5.18. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med NP/TNP-LPH/ β -glukan + boost etter 90 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uinjisert fisk.



Figur 5.19. Antistoffnivå mot TNP-LPH undersøkt med ELISA. Figuren viser nivåene fra individene immunisert med FCA/TNP-LPH/ β -glukan + boost etter 90 dager. Positiv kontroll er en pool av serum fra tidligere forsøk (Dr. S.T. Solem) og negativ kontroll er en pool av uninjisert fisk.