

NORGES FISKERIHØGSKOLE

Polymere partikler som vaksinebærere i atlantisk laks (*Salmo salar*):

En studie av antistoffrespons og depoteffekt ved bruk av partikler med ulike størrelse, molekylvekt og L:G forhold.

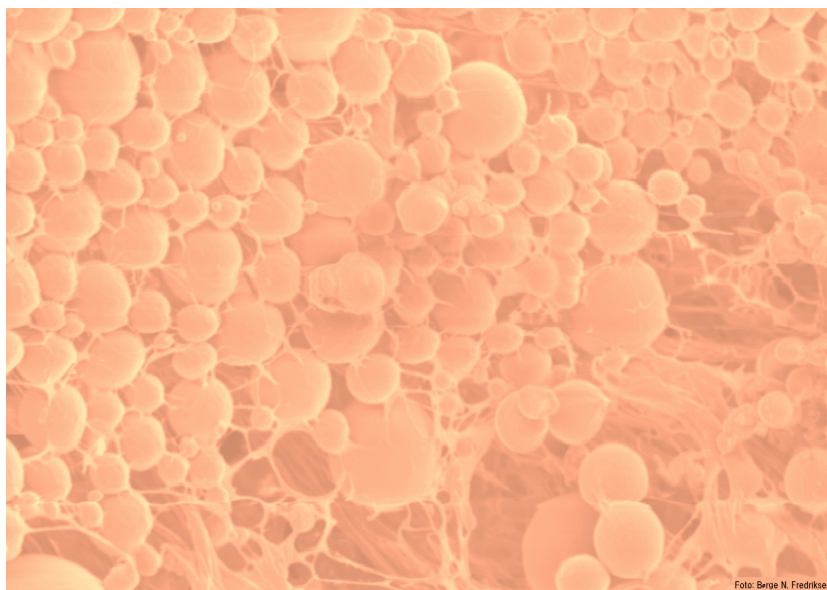
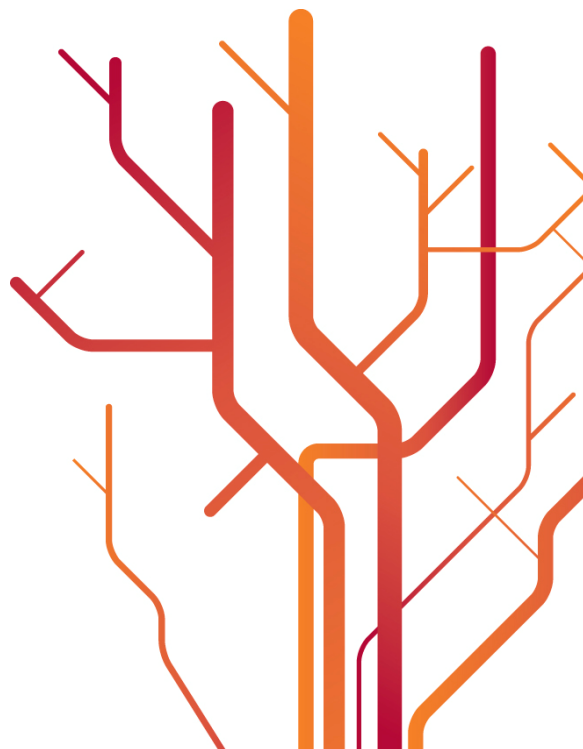


Foto: Berne N. Fradriksen

Jostein Grip

Mastergradsoppgave i fiskehelse (60 stp)

Mai 2011



Takk til

Denne masteroppgaven ble gjennomført ved fakultet for Biovitenskap, Fiskeri og Økonomi i Tromsø ved instituttet Norges Fiskerihøgskole, eller som da jeg begynte å studere; Institutt for Marin Bioteknologi ved Fakultetet Norges Fiskerihøgskole i Tromsø.

Takk til mine veiledere Roy Dalmo, Jarl Bøgwald og Børge N. Fredriksen for all hjelpen med skriving, retting, planlegging og motivasjon.

En spesiell takk fortjener sistnevnte av veileder treenigheten, som har måtte stri mest med meg. Med motiverende tilrop som *"Du pipetterer som en fyllik."* og *"Mangler du et kromosom eller!?"* har Børge motivert meg til å bite tennene sammen og holde ut til arbeidet for dagen/natten var ferdig. Har det vært problemer med oppgaven har jeg kunnet ringe Børge om han måtte befinne seg i Tromsø, Oslo, Finnmark eller USA uavhengig av tidspunkt på dagen og jeg har alltid fått hjelp med oppgaven. Retting av 30 sider har som oftest blitt gjennomført på under en dag med en klype motivasjon og et spark bakentil med på kjøpet.

Mer interessant er noe Børge fortalte meg med et smil om munnen en måned før innlevering som jeg synes fortjener å bli ordrett sitert: *"Jeg har aldri rettet oppgaven din uten promille."* (Fredriksen, 2011) Forhåpentligvis har oppgaven min ikke tatt større skader av dette, men det er ikke opptil meg å bedømme. Tusen takk for hjelpen med alt Børge!

Havbruksstasjonen i Tromsø fortjener også en stor takk! Ikke bare fordi forsøkene mine har blitt knirkefritt gjennomført ved fasilitetene i Kårvika, men også for å ha gitt meg en unik mulighet til å lære om oppdrett, fiskebiologi og fiskehelse som ansatt gjennom tre år.

Alle personene jeg har blitt kjent med gjennom 5 lange år Tromsø som har gjort Tromsø til et bedre sted fortjener en stor takk.

Sist, men ikke minst, en stor takk til mor og far som har støttet meg gjennom studiene og tidvis vært mer bekymret for studiene enn hva jeg har vært. Det gikk jo bra!

*"Fesk og potedes e vårres brød
sånn har det vorre ét å vær glad!"*

*Halvt ifra åker halvt ifra stø
sånn har det vorre fallri og ra."*
-Helge Stangnes

Sammendrag

Partikler av polymerene poly (lactide-co-glycolide) acid (PLGA) og poly (lactide) acid (PLA) har vist seg å være effektive som adjuvanter/antigen depot i musemodeller, hvor de bidrar til å fremprovosere en robust og vedvarende antistoffrespons. Fremdeles er PLGA/PLA-partiklenes egenskaper som adjuvans i atlantisk laks lite kjent.

Målet med dette studiet var å sammenlikne depotegenskapen til ulike PLGA/PLA-formuleringer, samt deres evne til å stimulere det adaptive (humorale) immunforsvaret til produksjon av spesifikke antistoffer. Til studiet har vi koinkapsulert et modellprotein (human gamma globulin, HGG) med β -glukan (laminaran) i formuleringer av PLGA og PLA med ulike fysio-kjemiske egenskaper (molekylvekt, partikkelstørrelse, melke:glykolsyre forhold).

Partiklenes depoteffekt i atlantisk laks ble undersøkt 7 og 36 dager etter intraperitoneal injeksjon ved bruk av I^{125} -merket HGG. Depot/biodistribusjon av HGG- I^{125} ble målt i organpakken (magesystem, lever, milt), muskel, nyren og i hele fisken. I perioden 4-16 uker etter immunisering ble fisken blodtappet i intervaller på 2 uker for måling av spesifikke antistoffer mot HGG ved bruk av indirekte ELISA.

In vitro inkubering av partikkelformuleringene viste at antigen ble frigjort raskere fra mikropartikler enn nanopartikler, samtidig var depoteffekten *in vivo* bedre for enkelte mikropartikkelformuleringer sammenliknet med nanopartikler. Akkumulering av antigen fra nanopartikler av polymer med høy molekylvekt ble observert i nyrene. Partikkelformuleringenes depoteffekt kunne ikke korreleres til nivået av HGG-spesifikke antistoffer. Funnene i dette studiet viser at partikkelformuleringene har ulike depotegenskaper og evne til å fremkalle antistoffrespons i atlantisk laks avhengig av polymerenes fysio-kjemiske egenskaper.

1. INTRODUKSJON 1

1.1 OPPDRETT	1
1.2 VAKSINER OG VAKSINERING AV FISK	1
1.2.1 ADMINISTRERINGSMETODER	2
1.2.1.1 Immersjonsvaksinering	2
1.2.1.2 Injeksjonsvaksinering	2
1.2.1.3 Oral Vaksinering	3
1.3 VAKSINETYPER	3
1.3.1 SUBENHET	3
1.3.2 ATTENUERTE	3
1.3.3 INAKTIVERTE PATOGENER	4
1.3.4 DNA-VAKSINE	4
1.4 IMMUNFORSVARET HOS FISK	5
1.4.1 IMMUNFORSVARETS OPPBYGGING	5
1.4.2 MEDFØDT IMMUNITET	6
1.4.3 ADAPTIV IMMUNITET	6
1.4.3.1 Humoralt forsvar	7
1.4.3.2 Cellulært forsvar	8
1.5 ADJUVANTIA.....	9
1.5.1 PLGA/PLA.....	10
1.6 PROBLEMSTILLING/AVGRENSING	13

2. MATERIAL OG METODE..... 14

2.1 REAGENSER, KJEMIKALIER OG KIT	14
2.2 I¹²⁵ MERKING AV B-GLUKAN OG HGG	15
2.3 PLGA/PLA PARTIKLER.....	16
2.3.1 FORMULERING AV NANO- OG MIKROPARTIKLER.....	16
2.3.2 BEREGNING AV PARTIKKELSTØRRELSE, ANTIGEN LOADING OG INKAPSULERING	17
2.4 UTSLIPPSSTUDIE	18
2.5 TO-CELLER.....	19
2.5.1 OPPTAKSSTUDIE AV NANOPARTIKLER I TO-CELLER.....	19
2.6 FORSØKSFISK, IMMUNISERING OG PRØVETAKING	20
2.7 IMMUNISERINGSSTUDIET	21
2.8 DOSE/RESPONS-STUDIE	21
2.9 DEPOTSTUDIE.....	22
2.10 ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA)	23
2.10.1 GJENNOMFØRING AV ELISA	23
2.11 STATISTIKK	25

3. RESULTATER 26

3.1 KARAKTERISERING AV PARTIKLENE	26
3.2 UTSLIPPSSTUDIE	27
3.3 OPPTAKSSTUDIE AV NANOPARTIKLER I TO-CELLER.....	28

3.4 IMMUNISERING: TIDSSTUDIE AV HUMORAL RESPONS	29
3.4.1 ANTISTOFFRESPONS UKE 4 OG 6	30
3.4.2 ANTISTOFFRESPONS UKE 8 OG 10	30
3.4.3 ANTISTOFFRESPONS UKE 12 OG 16	31
3.5 DOSE/RESPONS-STUDIET	32
3.6 DEPOTSTUDIET	33

4. DISKUSJON 38

4.1 UTSLIPPSSTUDIE	38
4.2 OPPTAK AV NANOPARTIKLER I TO-CELLER	40
4.3 IMMUNISERINGSSTUDIET	41
4.4 DOSE/RESPONS-STUDIET	42
4.5 DEPOTSSTUDIET	43
4.6 KONKLUSJON	44

5. REFERANSER..... 45

1. Introduksjon

1.1 Oppdrett

Norsk oppdrett i sjø fikk sin spede start i 1969 da selskapet Johan Lærum AS sjøsatte 70 000 laksesmolt utenfor Bergen (Johansen og Lindal, 2006). Oppdrett i gründer-perioden bestod av prøving og feiling, med potensielt store gevinster. Brødrene Ole og Sivert Grøntvedt startet oppdrettseventyret på Hitra. Da historien om 20 000 settefisk som ble føret opp på lodde og solgt for 60 kroner kiloen spredde seg, var det mange som kom til Trøndelag for å lære om oppdrett. Brødrene fungerte som læremestre for mange som i gründer-perioden ville ta del i oppdrettseventyret i Norge.

Den norske staten så muligheten til å bygge en ny industri og i 1970 ble *"Norske Fiskeoppdretters Forening"* stiftet godt støttet av *"Det kongelige Selskap for Norges Vel"*. Staten holdt kurs for personer som kunne tenke seg å starte med oppdrett og var med på å tilrettelegge forholdene for vekst i næringen.

Merdene var av lav kvalitet og ofte snekret av oppdretterne selv, føret var også egenprodusert og ofte av lav kvalitet. Manglende kunnskap om biologien bak oppdrett førte ofte til høye tap, i enkelt tilfeller kunne opptil 75 % av fisken dø. Så høyt tap av fisk ville nok ikke blitt godtatt i dag mhp dyrevelferd, men oppdrettsnæringa har kommet langt siden den spede oppstart.

Oppdretten i Norge har lært mye siden brødrene Grøntvedt startet i det små på 1970-tallet. Produksjonsvolumet har økt fra 100 tonn laks i 1970 (Johansen og Lindal, 2006) til 944 000 tonn laks i 2010 (Veterinærinstituttet, 2011), og oppdrett har dermed gått fra å være småskala privatgeskjeffer til en milliardnæring med eksport til store deler av verden. En av hovedfaktorene for økningen i produksjonsvolum har vært betydelig bedre sykdomskontroll.

1.2 Vaksiner og vaksinerings av fisk

Et av de første store sykdomsproblemene under oppstarten av oppdrettsnæringa var kaldtvannsvibriose som forårsakes av bakterien *Vibrio salmonicida*. Sykdommen ble først påvist i nærheten av Hammerfest i 1977, men forårsaket fra 1979 store tap i Hitra-området, hvilket ga opphav til navnet *"Hitrasyke"* (Poppe, 1999). Bakteriesykdommen ble behandlet med store mengder antibiotika som ble blandet inn i føret. Forbruket av antibiotika (hovedsakelig tetracycliner) nådde en topp i 1987 da mengden antibiotika i fiskeoppdrett var på nesten 50 tonn (Grave og Hansen, 2006). Det høye antibiotika forbruket var det eneste verktøyet oppdretterne hadde da det ikke fantes gode vaksiner på markedet.

På slutten av 1987 ble en vannbasert vaksine mot *Vibrio salmonicida* tatt i bruk og dermed sank forbruket av antibiotika, men det var flere andre sykdommer som herjet næringa. Furunkulose ble introdusert til Norge fra Skottland i 1985 ved transport av smolt og forbruket av antibiotika økte igjen. Vannbasert vaksine mot furunkulose viste seg å gi liten beskyttelse og det var først når oljebasert adjuvans ble tatt i bruk at man fikk en fullgod beskyttelse mot furunkulose (Midtlyng, 1996). Etter gjenoppdagelsen av oljevaksinene, som hadde vært i bruk av Kranz og medarbeidere i eksperimenter så tidlig som i 1964 (Havforskningsinstituttet, 2006), sank bruken av antibiotika fra i underkant av 40 tonn på begynnelsen av 90-tallet til 765 kg i 1997 (NORM/NORM-VET, 2008).

1.2.1 Administreringsmetoder

Det er vanlig å dele vaksinasjon av fisk inn i tre forskjellige administreringsmetoder; injeksjon, immersjon og oral vaksineringsmetode (Press og Lillehaug, 1995).

1.2.1.1 Immersjonsvaksineringsmetode

Dypp eller badvaksineringsmetode er vaksineringsmetoder hvor antigener blir tilsatt vann hvor fisken tar opp antigener fra omgivelsene. Bad og dyppvaksineringsmetode brukes nå i hovedsak på torsk og kveite mot *vibrio* infeksjoner i tidlige livsstadier. Ved badvaksineringsmetode oksygeneres vannet med oksygendiffusor, vanntilførselen stanses og vaksinen tilsettes i henhold til biomasse. Ved badvaksineringsmetode er vaksinen blandet 1:500 vaksine i vann og fisken bades i 60 minutter (Press og Lillehaug, 1995), mens under dyppvaksineringsmetode blandes vaksinene 1:10 i vann og fisken bades/dyppes 30 sekunder i løsningen (Intervet, 2008).

Fordelene ved disse vaksineringsmetodene er den begrensede mengden håndtering som er nødvendig for å gjennomføre vaksineringsmetoden og at vaksineringsmetoden muliggjør immunisering av langt mindre individer enn for injeksjonsvaksineringsmetode. Torsk kan for eksempel bad/dypp vaksineres ved 0,5 – 1 gram (*Ibid*), ved denne størrelsen er det umulig å massevaksinere fisk ved konvensjonell stikkvaksineringsmetode. Svakheten ved immersjonsvaksineringsmetode er at beskyttelsen ikke er like langvarig som injeksjonsvaksineringsmetode med oljeadjuvans.

1.2.1.2 Injeksjonsvaksineringsmetode

Intraperitoneal vaksineringsmetode av fisk er i norsk lakseoppdrett den mest vanlige metoden for vaksineringsmetode (Havforskningsinstituttet, 2006). Under vaksineringsmetode med stikkvaksiner pumpes fisken først fra oppbevaringsstank og bedøves, deretter injiseres fisken med vaksine før den igjen pumpes over til et oppvåkingskar og til slutt i en ny oppbevaringsstank.

Stikkvaksineringsmetode av laksefisk er anbefalt å gjennomføres ved en minimumsvekt på 25 g for laks og ved 30 g for torsk (Pharmaq, 2008a; Pharmaq, 2008b). Denne vaksineringsmetoden påfører fisken mye

stress på grunn av handtering, men gir til gjengjeld en langvarig beskyttelse sammenlignet med immersjonsvaksinering.

1.2.1.3 Oral Vaksinering

Det har spesielt på 1980 og 1990-tallet vært gjennomført en del studier på oral av fisk vaksinering samt administrering og transport av bioaktive komponenter gjennom mage-tarm kanalen (Agius *et al.*, 1983; Johnson og Amend, 1983; Nakamura *et al.*, 1990; Hertz *et al.*, 1991) med varierende resultater. Oral vaksinering utelukker stressende behandling, da fisken kun følger vanlig fôringsregime med vaksine blandet i fôret. Ulempen med denne typen administrering er den begrensede regulering av dosen ettersom fiskene spiser ulik mengde fôr. I tillegg til manglede dosekontroll krever orale vaksiner stor produksjon av antigen, noe som fører til høy produksjonskostnad for vaksine.

1.3 Vaksintyper

I prinsippet er det innen vaksinologi snakk om fire forskjellige typer vaksiner/antigen til bruk på fisk; subenhets vaksine, DNA-vaksine, vaksine basert på attenuerte patogener og inaktiverte patogener.

1.3.1 Subenhet

Subenhetvaksine kan produseres ved å dyrke patogene organismer med påfølgende isolering av spesifikt antigen som indusere immunitet hos verten. En annen metode, som eksempelvis brukes ved produksjon av Infeksiøs Pankreas Nekrose (IPN) vaksine, er rekombinant DNA-teknologi. Denne metoden gjør det mulig å produsere antigener som induserer immunitet ved hjelp av vektorer som overføres til *Escherichia coli* bakterie og dyrkes i medier (Madigan og Martinko, 2006). Metoden utelukker overføring av patogene organismer, som ved attenuerte vaksiner, da vaksinen kun inneholder komponenter av viruset eller bakterien.

1.3.2 Attenuerte

Attenuerte vaksiner nyttiggjør seg av levende, men svekkede mikroorganismer som injiseres i verten. Mikroorganismen blir dyrket over flere passasjer til virulensmekanismer forsvinner (Madigan og Martinko, 2006). Dyrkingen av mikroorganismen må gjøres på en slik måte at den attenuerte mikroorganismen fortsatt induserer immunitet ovenfor sitt patogene motstykke uten å framkalle klinisk sykdom. Bakdelen med denne metoden er at mikroorganismen kan få tilbake virulensmekanismene over tid.

Ved genmanipulering er det mulig å indusere attenuering på en mer kontrollert måte, hvilket minsker muligheten for at mikroorganismen utvikler virulensmekanismer. Fordelene med denne typen vaksiner er at de kan aktivere cellulært forsvar og ikke bare et humoralt forsvar mot virus og

intracellulære bakterier, da den invadere celler uten å gi sykdomssymptomer. Attenuerte vaksiner for bruk i oppdrett har ikke markedsføringstillatelse i Norge, men er tillat innen humanmedisin som i BCG vaksine (Folkehelseinstituttet, 2009).

1.3.3 Inaktiverte patogener

Vaksiner basert på inaktiverte patogener er ledende innen salg av vaksiner til laks. Bakterier og virus dyrkes opp, basert på optimale dyrkningsforhold, og inaktiveres med formaldehyd eller varmebehandling. Inaktivering av mikroorganismer med formaldehyd har vist seg å denaturere overflateproteinene mindre enn ved varmebehandling, og dermed gir bedre sykdomsbeskyttelse (Madigan og Martinko, 2006). Ulempen med vaksiner basert på inaktiverte patogener er at metoden er tids- og kostnadskrevende sammenlignet med eksempelvis subenhet- og DNA-vaksiner (*Ibid*).

1.3.4 DNA-vaksine

DNA-vaksiner nyttiggjør seg av kroppens egne celler til å produsere rekombinante proteiner (Liu, 2003; Madigan og Martinko, 2006). Gener fra mikroorganismen, som gir immunitet mot patogenet, klones inn i en plasmidvektor med en promotor som blir injisert i muskel på fisk, da forsøk har vist at myocytter tar opp plasmid i større grad enn andre celler (Restifo *et al.*, 2000). Når injisert DNA blir tatt opp i cellene kan det bli degradert eller transkribert fra DNA til RNA og translert fra RNA til proteiner (antigen) som kan indusere immunitet. Disse antigenene vil gi immunitet mot spesifikke patogener og vil i DNA-vaksinert fisk kontinuerlig bli presentert for immunsystemet. Ved immunisering med DNA-vaksine er det mulig å stimulere den cellulære i tillegg til den humorale delen av immunforsvaret, dette vil i praksis gjøre det mulig å gi en mer effektiv beskyttelse mot intracellulære patogener som virus og enkelte intracellulære bakterier (*Ibid*).

DNA-vaksine brukes ikke i Norge, men Novartis har markedsføringstillatelse i Canada for DNA-vaksine mot Infeksiøs Hematopoetisk Nekrose Virus (IHNV) (Vical, 2011). Muligheten for en framtidig markedsføringstillatelse er nok tilstede dersom myndighet, næring og forbrukere er villig. I 2009 ble Bioteknologinemnda bedt om å gjøre en vurdering av hvorvidt DNA-vaksinerte dyr skulle defineres som en genmodifisert organisme (GMO). Bioteknologinemnda ble bedt å ta stilling til problemstillinga på oppdrag av Direktoratet for Naturforvaltning og kom fram til følgende; "*Nemnda har her bare uttalt seg om DNA-vaksiner som ikke er ment å integrere eller replikere i dyret... Nemnda ønsker å muliggjøre utviklingen av DNA-vaksiner som kan være samfunnsnyttige i Norge og samtidig ikke utvanne GMO-begrepet.*" (Bioteknologinemnda, 2010).

1.4 Immunforsvaret hos fisk

Immunforsvaret begynner å bli bedre kartlagt enn hva det har vært tidligere og det har blitt gitt ut lærebøker innen immunologi også for fisk. Denne delen vil i hovedsak omhandle informasjon fra "Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System" av Abbas *et al* (2009) og "Fish Defenses" av Zaccane *et al* (2009) som omhandler hhv human immunologi og fiskeimmunologi.

For å kunne forstå hvordan vaksiner kan gi opphav til beskyttelse mot patogene mikroorganismer er det viktig å forstå de underliggende mekanismer som utgjør immunforsvaret til fisken. Det akvatiske miljøet gir en enklere spredningsvei for patogener enn hva som er tilfellet i atmosfæren. På landjorden må aerosoler med virus eller bakterieløsninger holde seg svevende lenge nok til å infisere en vert, eller overføres ved annen væske som kommer i kontakt med verter.

Som samtlige andre vertebrater innehar fisk både adaptivt og medfødt immunforsvar (Janeway og Medzhitov, 2002) for å beskytte seg mot det konstante smittepresset som et akvatisk miljø utgjør. I oppdrett blir store mengder fisk stuert sammen på relativt små arealer sammenlignet med hva som er tilfellet i det fri, dette stiller store krav til fiskens immunforsvar.

1.4.1 Immunforsvarets oppbygging

Tidligere ble det medfødte immunforsvaret ansett for kun å være et førstelinjeforsvar mot patogener som skulle oppholde spredningen av infeksjonen til det adaptive immunforsvaret hadde iverksatt en respons. Det har i senere tid vist seg at det medfødte immunforsvaret modulerer både kvaliteten og kvantiteten til den adaptive immunresponsen, dermed har "samarbeidet" mellom medfødt og adaptivt immunforsvar vist seg å være svært viktig for å bekjempe invaderende mikroorganismer (Guy, 2007). Forskning viser at fiskens immunsystem i stor grad ligner på immunforsvaret hos pattedyr, men med noen unntak (Zaccane *et al.*, 2009) hvor en av de mest opplagte forskjellene er fiskens mangel på lymfesystem og beinmarg (Kryvi og Totland, 1997; Poppe, 1999). Selv om teleoster ikke har lymfesystem eller beinmarg har de nyre, thymus, milt og mukosa assosiert lymfoid-vev som produserer lymfoide celler (Press og Evensen, 1999). Det er funnet lymfocytter i fisk som viser likhet med B- og T-celler, selv om underklassen av celler ikke er ferdig kartlagt er det funnet CD8 (Moore *et al.*, 2005) og CD4 (Moore *et al.*, 2009) homologer (Zaccane, Meseguer *et al.*, 2009). Det er funnet tre klasser med immunoglobuliner i fisk, IgM, IgD og IgZ/IgT/IgH (*Ibid*) og MHC klasse II og I (Sambrook *et al.*, 2005) hvilket tilsier at immunforsvaret til fisk i stor grad har like komponenter som for pattedyr.

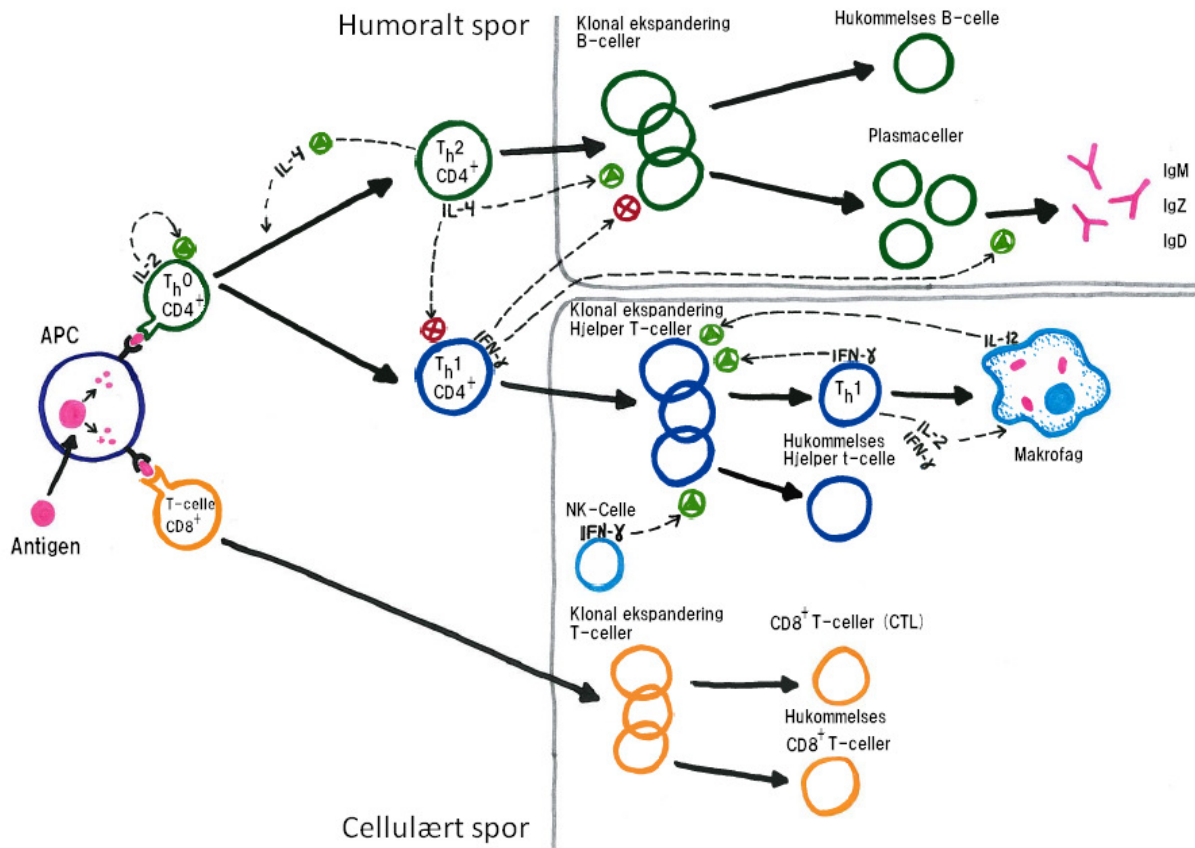
1.4.2 Medfødt immunitet

Det medfødte immunforsvaret består i korte trekk av mukus, epitelbarrierer, fagocytter, komplementfaktorer og naturlige drapsceller (Abbas og Lichtman, 2009). Medfødt immunforsvar gir en rask respons på patogener, da det gjenkjenner utvalgte strukturer også kjent som PAMP (*Pathogen-associated molecular patterns*) som er distinkt forskjellige fra eget vev. Strukturene som gjenkjennes av det medfødte immunforsvaret, som eksempelvis bakterielt lipopolysakkarid (LPS), peptidoglykaner, dobbeltrådet RNA og CpG, er assosiert med patogene mikrober. Reseptorer som kjenner igjen molekylære mønstre er mannose-, N-formyl methionyl- og toll-liknende reseptorer (Abbas og Lichtman, 2009). Fordelen med reseptorene er at de er tilstede før en eventuell infeksjon, men ulempen er at de har lavere spesifisitet.

1.4.3 Adaptiv immunitet

Adaptiv immunitet kan generelt deles inn i to deler; humoral og cellemediert immunitet (Abbas og Lichtman, 2009; Zaccone, Meseguer *et al.*, 2009). Humoral og cellemediert immunforsvar spiller en viktig rolle for bekjempelse av sykdom mot hhv ekstracellulære og intracellulære mikroorganismer. Både den humorale og den cellulære delen av immunforsvaret må generelt først bli aktivert av profesjonelle antigen presenterende celler (APC), før en respons mot patogener blir iverksatt. Prosessene som fører fram til den endelige aktiveringen av respektive immunceller er en kaskade av reaksjoner. Ved cellemediert eller humoral immunrespons fører kaskaden til hhv makrofagaktivering og cytotoksisk T-celle aktivering eller B-celle aktivering. Aktiveringen og reguleringen av det adaptive immunforsvaret er et nettverk av cytokinstimuleringer som balanserer hvilke deler som skal aktiveres. En generell oversikt over noen av de viktigste cytokinene og adaptive immuncellene med deres respektive funksjoner er gitt i Figur 1.

Introduksjon



Figur 1 Oversikt over prosessen som fører aktivering av humoralt- og/eller cellulært immunforsvar fra presentasjon av antigen ovenfor APC fram til effektor- og hukommelsesceller. Tilpasset fra (Abbas og Lichtman, 2009; Zaccone, Meseguer *et al.*, 2009)

1.4.3.1 Humoralt forsvar

Humoralt immunforsvar består bl.a. av antistoffer som kan nøytralisere og opsonisere patogener hvilket gjør det enkelt for makrofager å gjenkjenne inntrengeren. Kaskaden starter ved aktivering av en umoden B-celle, aktivert enten vha. APC, T-uavhengig aktivering (lipider og karbohydrater) eller ved stimuli fra T- hjelperceller ($CD4^+$).

Ved MHC klasse II stimulering kan $CD4^+$ -celler differensieres til flere forskjellige type celler, som eksempelvis T_H1 , T_H2 , T_H17 og T_{reg} (for enkelthetskyld blir kun T_H1 og T_H2 diskutert). Ved en T_H0 differensiering til T_H2 , vil en T_H1 respons nedreguleres slik at produksjonen av antistoff prioriteres framfor makrofagaktivering og *vice versa* ved aktivering av T_H1 -sporet. Denne balansen mellom T_H1 - og T_H2 -sporet gjør at responsen kan styres mot hhv cellulær eller humoral immunrespons.

Ved aktivering av T_H2 -sporet stimuleres umodne B-celler til en ekspansjons kloning som differensieres til effektorceller, også kjent som plasmaceller (opphav til IgM, IgZ og IgT/IgH). Immunglobulinene som blir produsert av plasmacellene har høy spesifisitet og vil sirkulere i blodet for å opsonisere patogener. Aktiverte makrofager enkapsulerer det opsoniserte patogenet og

destruerer det ved hjelp av enzymer, denne mekanismen fungerer dårlig på intracellulære mikrober da immunglobuliner kun har mulighet til å opsonisere ekstracellulært.

I tillegg til effektorcellene dannes hukommelsesceller som sirkulerer i blodet. Hukommelsescellene vil ved en infeksjon med samme patogen, på et senere tidspunkt, kunne aktivere en immunrespons raskere enn ved primær infeksjon.

1.4.3.2 Cellulært forsvar

Kaskaden som fører til aktivering av cellulær del av det adaptive immunforsvaret starter også med antigenpresentering av APC, men kan skje både ved MHC klasse I og II (Abbas og Lichtman, 2009; Zaccane, Meseguer *et al.*, 2009). Resultatet av presentasjon på MHC klasse 1 og 2, mhp cellulært spor, fører til aktivering av forskjellige mekanismer for cellulært forsvar.

Presentasjon på MHC klasse II fører som tidligere nevnt til priming av T_H0 . Priming av T_H0 kan gå i T_H1 - og T_H2 -sporet, hvor førstnevnte fører til ekspansjonskloning av hjelper T-celler i retning cellulær respons. T_H1 $CD4^+$ -celler nedregulerer humoral respons av B-celler ved $IFN-\gamma$ og driver immunresponsen mot cellulært spor. Ekspansjonen mot effektor $CD4^+$ -celler (T_H1) stimuleres blant annet av aktiverte T_H1 som fører til en positiv feedback ved $IFN-\gamma$, NK-celler ved $IFN-\gamma$ og IL-12 fra aktiverte makrofager. Aktiveringen av makrofager skjer ved hjelp av IL-2 og $IFN-\gamma$.

Ved presentasjon av et antigen på MHC klasse I stimuleres $CD8^+$ -celler. Aktivering av $CD8^+$ -celler fører til øking i antall celler ved kloning hvor celler så blir differensiert til cytotoksiske T-lymfocytter (CTL) og $CD8^+$ -hukommelseceller. Ved en intracellulær infeksjon vil celler presentere antigen på MHC klasse I som ved reseptorstimulering av en moden CTL iverksette en kaskade som fører til at cellen, sammen med patogener, blir destruert. Kaskaden som iverksettes innebærer at CTL adherer til cellen og overfører enzymer ved exocytose til infisert celle som fører til apoptose av målcellen.

Det adaptive immunforsvaret er mediert av lymfocytter og blir stimulert av patogener/antigen. Evnen til å tilpasse immunresponsen til spesifikke antigen og til å produsere hukommelsesceller skiller seg fra medfødt immunitet, som kjenner igjen enkelte molekylfamilier uten å kunne tilpasse seg med samme spesifisitet (Abbas og Lichtman, 2009). Immunologisk hukommelse, ved hjelp av "hukommelses B-celler", blir benyttet innen vaksinologi for å opprettholde en vedvarende immunrespons mot spesifikke antigener assosiert med patogene mikrober. Det finnes også "hukommelses T-celler" som aktiveres etter en infeksjon, men ved konvensjonell vaksinering med oljeadjuvans er det i hovedsak effektorceller for humoralt immunforsvar som blir aktivert.

1.5 Adjuvantia

Selve ordet "adjuvans" kommer fra det latinske ordet *adjuvare* som betyr å hjelpe, noe adjuvansen gjør ved å gi økt sykdomsbeskyttelse. Adjuvansen er et ikke-antigen stoff som sammen med antigen forsterker immunresponsen eller gir en vedvarende immunrespons som er sterkere enn komponentene gitt hver for seg (Biology, 2004).

Effektiv vaksinasjon av fisk forutsetter en jevn stimulering av immunforsvaret for å oppnå en optimal beskyttelse over tid. Stimuleringen av immunforsvaret over tid oppnås i vanlige emulsjonsvaksiner ved bruk av oljeadjuvans, som sørger for at antigen gradvis frigis inne i fisken. Antigenene som frigis gir en humoral immunitet så lenge antigenet er tilstede og kan medvirke til dannelsen av hukommelsesceller.

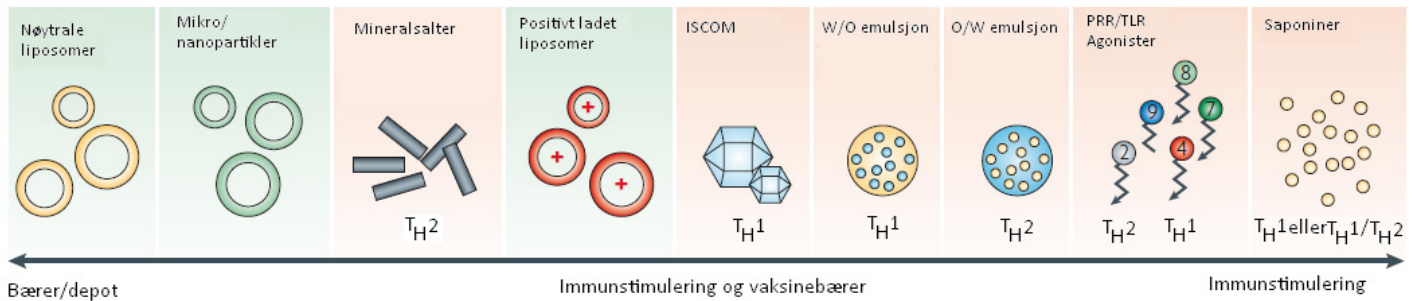
For å iverksette en immunrespons trenger immunceller signaler som rekrutterer immunceller til området hvor antigen befinner seg. APC tar opp antigenet og presenterer det videre til CD8⁺ eller CD4⁺ celler ved hhv MHC klasse I eller MHC klasse II. Kaskaden som iverksettes fører til aktivering av cellulært og humoralt immunforsvar med tilhørende differensiering til effektorceller og hukommelsesceller.

Vaksinering med antigen alene vil ikke gi en tilsvarende immunitet uten en adjuvans som fasiliterer rekruttering av immunceller og styrker immunresponsen. Adjuvans er anerkjent som en gruppe med kraftige immunmodulatorer, men virkemekanismene som fører til økt immunrespons er lite kjent (Schijns, 2000). Ved presentering av antigen til T- eller B-celler, ved hhv T-celle reseptorer og membranbundne B-celle immunoglobuliner, stimuleres cellene til klonal ekspansjon (signal 1). Samtidig trenger signal 1 en ko-stimulator (signal 2) for å iverksette en immunrespons og dermed unngå anergi. Etter oppdagelsen av signal 1 og 2 ble det funnet et tredje signal som aktiveres før disse to signalene; signal 0. Dette signalet, som navnet tilsier, sendes før signal 1 og 2, men aktiveres av PAMP-reseptorer som eksempelvis Toll-liknende reseptorer (Guy, 2007).

Vaksineadjuvans som brukes i oppdrett gir rekruttering av immunceller til injeksjonsstedet ved en lokal irritasjon. Adjuvanset kan generelt fungere på signal 0, 1 og 2 for å øke immunresponsen mot antigen og gi en varig immunitet (*Ibid*). En annen fordel med viskøse oljeadjuvans er det gradvise utsivet av antigen som legger grunnlag for depoteffekten (Schijns, 2000).

Det finnes mange forskjellige adjuvantia med varierende egenskaper som eksempelvis liposomer med forskjellig ladning, mikro/nanopartikler, mineralsalter, ISCOM (immunstimulerende komplekser), emulsjoner av vann i olje og olje i vann, TLR agonister etc. Disse adjuvantiane har sine fordeler og ulemper med tanke på immunstimulering kontra depot, og noen av de mest sentrale

adjuvantiaene er vist i Figur 2. Det finnes mange forskjellige adjuvantia, men det er kun et fåtall som brukes i vaksiner til fisk. Til vaksiner av laks brukes det hovedsakelig mineralolje som adjuvans.



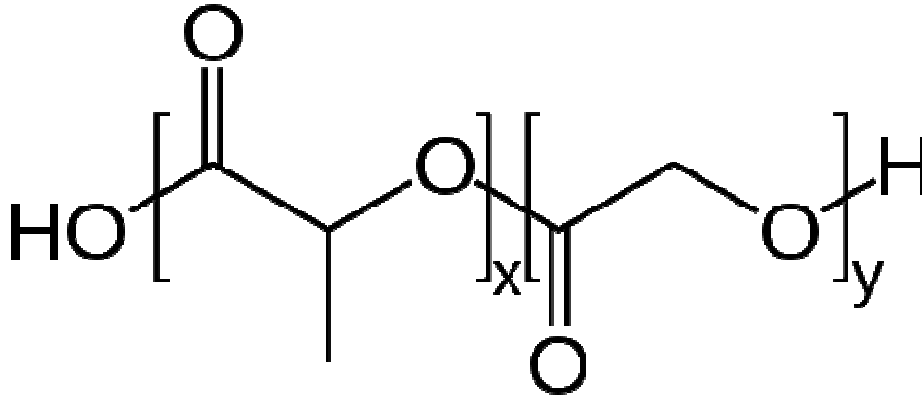
Figur 2 Oversikt over hovedgruppene adjuvans med hensyn på depot og immunstimulerende effekter. Adjuvanset som kan gi en målrettet immunstimulering mot T_H1 eller T_H2 er vist på rød bakgrunn. W/O, vann i olje; ISCOM, immunstimulerende komplekser; PRR, mønster gjenkjenningse reseptorer; TLR, Toll-lignende reseptorer. Modifisert etter Guy, 2006.

1.5.1 PLGA/PLA

PLGA, eller poly(lactic-co-glycolic acid), ble først utviklet som en alternativ nedbrytbar sytråd til bruk innen kirurgi på begynnelsen av 70-tallet. At polymeren var biokompatibelt, viste en beregnelig nedbrytningskinetikk, hadde lav produksjonskostnad og det faktum at polymeren allerede var godkjent til bruk innen humanmedisin gjorde at forskning på alternativ bruk kom raskt i gang (O'Hagan *et al.*, 1998). Bruk av polymeren som både vaksinebærer og som bærer av legemidler har blitt studert og har ledet fram til blant annet som kreftmedisinen Lupron Depot® (Abbott, 2011) og Zoladex (AstraZeneca, 2010).

PLGA polymeren består av en glykoldel og en melkesyre del (Figur 3). Esterbindingen i polymeren brytes ned ved hydrolyse til melkesyre og glykolsyre, og metaboliseres gjennom sitronsyresyklusen (Athanasίου *et al.*, 1996). Ettersom PLGA kan brytes ned til CO₂ og H₂O er polymeren svært egnet som vaksinebærer, da den ikke er toksisk i biologiske systemer.

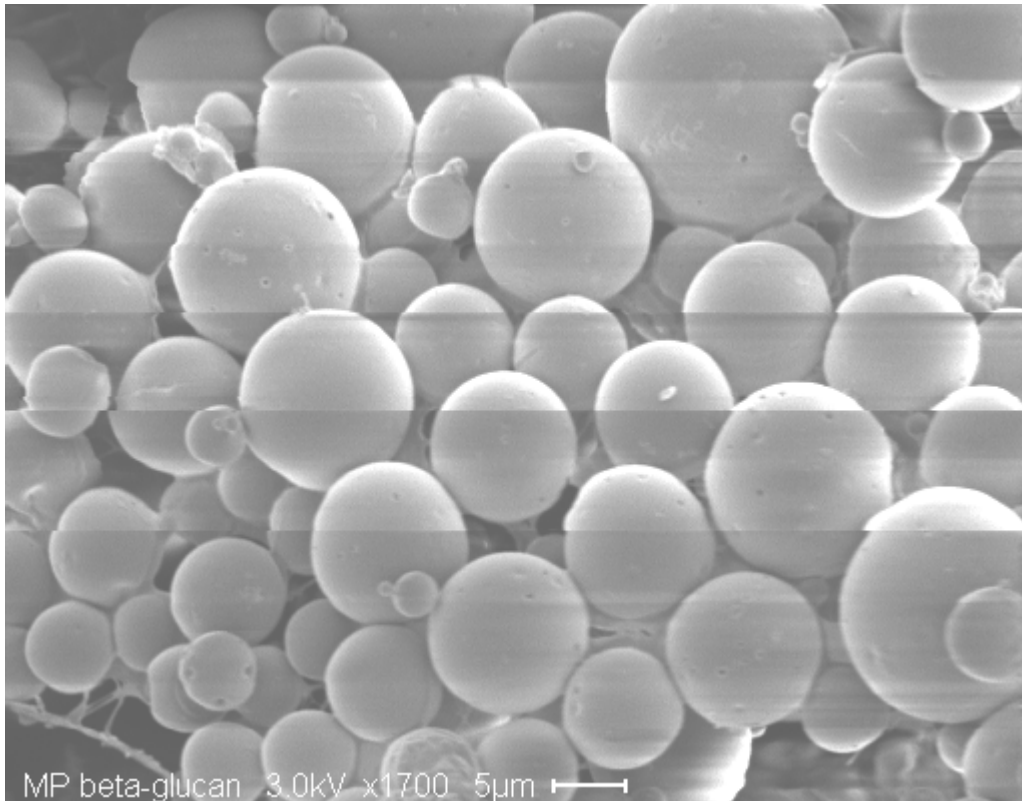
Polymeren kan designes til å inneha forskjellig andel melkesyre eller glykolsyre etter hvilke egenskaper som er ønskelig. Forsøk har vist at metaboliseringen av PLGA i mennesker tar lengre tid desto høyere andel melkesyre polymeren inneholder (O'Hagan, Singh *et al.*, 1998). I tillegg finnes det flere faktorer som er med på å bestemme utslippskinetikken fra PLGA-polymeren, blant annet zeta-potensialet (Ravi Kumar *et al.*, 2004), molekylvekt (Mittal *et al.*, 2007) og partikkel topografi og størrelse (Yushu og Venkatraman, 2006).



Figur 3 Poly(lactic-co-glycolic acid) polymer bestående av to monomerer; melkesyre og glykolsyre. Andelen av melkesyre og glykolsyre, hhv X og y, i polymeren kan varieres for å gi endre nedbrytningskinetikken. (Wikimedia)

Ettersom det er mulig å modifisere utslippskinetikken ved å justere eksempelvis forholdet mellom melke- og glykolsyre, burde det være mulig å lage en vaksine som gir både en primær stimulering av immunforsvaret og en "boost" stimulering ved én injeksjon. Ved å inkludere en polymerformulering som brytes tidlig ned sammen med en polymerformulering som brytes saktere ned vil det være mulig å få to stimuleringer i en injeksjon, i motsetning til dagens vaksinestrategier hvor en ofte er avhengig av to eller flere injeksjoner for å oppnå tilfredsstillende immunitet.

PLGA og oljeadjuvans er forskjellig på flere måter, både mhp depot og immunstimulering. Partikkelformuleringer med PLGA/PLA fungerer som en beholder som separerer innholdet fra omgivelsene (Figur 4), etter hvert som polymeren degraderes vil antigen frigis og stimulere immunforsvaret. Ved konvensjonelle vaksiner holder oljeadjuvans på antigen i en viskøs emulsjon som blir gradvis tilgjengelig.



Figur 4 Scanning elektronmikroskop (SEM) fotografi av palladium dekte poly(lactic-co-glycolic acid) mikropartikler. Foto B. N. Fredriksen.

Vaksineformuleringer som brukes i lakseoppdrett er basert på antigen eller inaktivert helvirus kombinert med oljeadjuvanset, slike vaksiner fører til aktivering av humoralt-spor hvilket gir økt sirkulering av antistoff. Dersom et virus infiserer en celle vil viruset bruke cellens egne mekanismer for å produsere nye virus og når cellen er infisert kan ikke antistoff binde seg til viruset. Vaksiner basert på oljeadjuvans kan gi en sykdomsbeskyttelse mot intracellulære patogener ved å binde seg til antigener før patogenet infiserer cellen, eller når cellen lyserer og slipper ut nye virus. Dermed er det mulig å holde mengden virus eller intracellulære bakterier under kontroll ved humoral immunitet. Ved bruk av PLGA partikler har studier vist at det er mulig å aktivere cellulær immunrespons ved CD8⁺-og CD4⁺-celler (Moore *et al.*, 1995; Shen *et al.*, 2006; Hamdy *et al.*, 2007). Vaksiner basert på partikler av PLA og PLGA har stort potensiale for å hjelpe til i kampen mot sykdommer i oppdrettsnæringen og gi en bedre beskyttelse mot både intracellulære og ekstracellulære patogener.

1.6 Problemstilling/avgrensing

Vaksinestrategier som brukes i oppdrett av atlantisk laks i Norge har ved hjelp av nettopp oljeadjuvans kun behov for én injeksjon gjennom hele produksjonssyklusen (Vandenberg, 2004). Oljebaserte adjuvans kan føre til sammenvoksing av organer, samt rekruttering av melanomakrofager i muskel som kan føre til nedklassifisering. Sammenvoksing av organer fører alene ikke til nedklassifisering dersom filéten er uskadet, men fisk som vaksineres med oljeadjuvans vokser mindre enn uvaksinert fisk (Midtlyng og Lillehaug, 1998; Sørum og Damsgård, 2004). Det vil være mulighet for økt fortjeneste og forhøyet dyrevelferd dersom oljeadjuvans fjernes fra vaksinen og blir erstattet av en adjuvans som gir lik eller bedre sykdomsbeskyttelse, men mindre bivirkninger.

Helt siden vaksinerer for alvor kom inn i lakseoppdrett med utviklingen av vibriose- og furunkulosevaksiner har oppdrettsnæringa hatt behov for stadig bedre vaksiner. Ekstracellulære patogener er i dag et mindre problem enn det var for 20 år siden. I dag er det i hovedsak virus som plager oppdrettsnæringa med tapsbringende sykdomsutbrudd. Tap av fisk er i dag ikke bare et økonomisk problem, men også i større grad et dyrevelferdsmessig problem.

Oppdrettsnæringen i Norge nærmer seg 1000 000 tonn produsert laks (Veterinærinstituttet, 2011) noe som byr på store utfordringer med tanke på profylakse. Våpenkappløpet mellom vaksineutviklere og patogener er en realitet, og det er stadig behov for nye verktøy i bekjempelsen av patogener.

Foukset i oppgaven har vært å undersøke hvilke faktorer som påvirker PLGA/PLA partiklers egenskaper mhp å indusere humoral respons. Ved immunisering av atlantisk laks (*Salmo salar*) med PLGA/PLA partikler; hvilke parametre har størst betydning for antistoffrespons og depoteffekt av følgende parametere:

- Størrelsen på partikler
- Polymerers molekylvekt
- Forholdet mellom melkesyre og glykolsyre (L:G)

I tillegg vil oppgaven redegjøre for om det er en sammenheng mellom depoteffekt, opptak av partiklene i makrofager og antistoffrespons.

2. Material og metode

2.1 Reagenser, kjemikalier og kit

Reagens/kjemikalie	Produsent
Framstilling av partikler	
Polyvinylakohol (PVA) 87-89 % hydrolysert	Sigma-Aldrich
Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 5-15kDa kDa	Sigma-Aldrich
Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 50:50 40-75 kDa	Sigma-Aldrich
Poly(D,L-lactide-co-glycolide) 75:25, 66-107 kDa	Sigma-Aldrich
Poly(D,L-lactide) 24-47 kDa	Sigma-Aldrich
Diklormetan	Merck
D-(+)-Trehalose dihydrat (Trehalose)	Sigma-Aldrich
1,3,4,6-tetrachloro-3 α , 6 α -DI-phenylglycouril, Mw = 432,1 (Iodogen)	Sigma-Aldrich
Etanol	Arcus Kjemi AS
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce LTD
PD-10 column (Sephadex™ G-25 M)	GE Healthcare
Human gamma globulin (HGG)	Sigma-Aldrich
β -glukan (<i>laminaria hyperborea</i>)	Pronova
NaI ¹²⁵	Perkin-Elmer Norge
Cellarbeid	
Trypsin 0,25 % Trypsin i PBS med 0,05 % Na ₃	EDTA
Føtalt kalveserum (FCS)	Gibco™
Ikke-essensielle aminosyrer (NEAA), 10 mM	Gibco™
MEM + GlutaMAX™-I medium	Gibco™
Pen Strep +10,000 Units/ml penicillin +10,000 μ g/ml streptomycin	Gibco™
Trypsin-EDTA Solution (1x) 100 ml	Sigma-Aldrich
ELISA	
DAKO 2 mg Ortho-Phenylenediamine (ODP)	Sigma-Aldrich
30 % H ₂ O ₂	Sigma-Aldrich
1M H ₂ SO ₄ (Fortynnet fra 18,8 M)	Merck
1. antistoff 4C10 mus-anti-laks Ig antistoff	Veterinærinstituttet
2. antistoff ECL™ anti mus IgG <i>horse raddish peroxidase</i> (HRP) fra sau	GE Health
Tween 20 (polyxyethylene-sorbitan monolaurate)	Fluka
Tørrmelk (fettfri)	Normilk, Levanger
PBS	
Andre kjemikalier	
Freunds Complete Adjuvant	Sigma-Aldrich

Material og metode

Coating buffer/ 0,1 M karbonatbuffer pH 9,6 (500 ml) 0,795 g Na ₂ CO ₃ 1,465 g NaHCO ₃ Destillert vann tilsettes til volumet er 500 ml.	PBST (1 L) 100 ml 10x PBS 900 ml destillert vann 0,5 ml Tween 20 (0,05 %)
Blokkeringsbuffer 5 % tørrmelk 2,5 g fettfri tørrmelk PBST etterfylles slik at det totale volumet blir 50 ml	Substratløsning til ELISA 4 stk O-phenylenediamine dihydrochloride 12 ml destillert vann 5 µl 30 % H ₂ O ₂ tilsettes rett før bruk.
1 % tørrmelk 0,5 g fettfri tørrmelk PBST etterfylles slik at det totale volumet blir 50 ml	Syrestopp ELISA - 1 M H₂SO₄ (1 l) 55 ml 95-97 % H ₂ SO ₄ . 945 ml destillert vann.

2.2 I¹²⁵ merking av β-glukan og HGG

I¹²⁵ merket HGG ble benyttet i depotstudiet for å spore distribusjonen av HGG i fisken. Radioaktiv merking av HGG med I¹²⁵ gjorde det mulig å spore distribueringen av antigen i fisken uten å skade celler eller antigen (Markwell og Fox, 1978).

Merking av β-glukan og HGG med I¹²⁵ ble utført ved isotoplab klasse B ved Universitetssykehuset i Nord-Norge avdeling Tromsø.

Før I¹²⁵-merkingen av β-glukan eller HGG ble PD 10-kolonnen drenert for lagringsvæske og mettet med 20 ml PBS med hhv 0.1 % β-glukan eller HGG og vasket en gang med 5 ml PBS. Iodogen (1,3,4,6-tetrachloro-3α, 6α-DI-phenylglycouril, Mw = 432,1) ble løst opp i diklormetan (DCM) til en konsentrasjon lik 0.156 mg/ml. Et lite glassrør ble vasket med aceton for å fjerne fett og eventuelle andre urenheter før 200 µl iodogenløsning ble tilsatt. DCM ble fordampet slik at iodogenet la seg i et jevnt lag på innsiden av glassrøret.

Iodogenrøret ble tilsatt 100 µl PBS, 150 µl β-glukan og 5 µl NaI¹²⁵ og inkubert i 2 timer. Reaksjonen ble stoppet ved å overføre løsningen til 90 µl stoppløsning (1:2 del med hhv natriummetabisulfitt (2 mg/ml) og Kaliumjodid (20 mg/ml)) og iodogenrøret ble både vasket med PBS og tilsatt 600 µl PBS og inkubert i 5 min.

Førtifem µl PBS, 50 µl HGG og 8 µl I¹²⁵ ble tilsatt iodogenrøret og inkubert i 20 min. Reaksjonen ble stoppet ved å overføre løsningen til 30 µl stoppløsning og etterfylt med 50 µl PBS. Iodogenrøret ble vasket med PBS, tilsatt løsningen og inkubert i 5 min.

De resterende frie I^{125} atomene ble fjernet med gelkromatografi ved å føre over løsningen til PD-kolonnen og tilsatt 1 ml PBS i ti omganger. Eluatet fra hver omgang ble samlet opp i TT-rør. Rørene ble kontrollert med gammateller for å finne hvilke rør som inneholdt høyest konsentrasjon med I^{125} merket β -glukan eller HGG.

2.3 PLGA/PLA partikler

Nano og mikropartikler ble framstilt ved bruk av en dobbel emulsjons- og løsemiddelevaporeringsmetode, som resulterer i en vann-i-olje-i-vann ($W_1/O/W_2$) emulsjon. Protokollen brukt i fremstillingen var en modifisert versjon av arbeidet beskrevet av Yushu og medarbeidere (2006). Nano- og mikropartikkelformuleringer ble preparert av PLGA og PLA som vist i Tabell 1. I de videre beskrivelsene benyttes nomenklaturet som er anvist i høyre kolonne av Tabell 1.

Tabell 1 Oversikt over polymerene benyttet i partikkelformuleringen. Høyre del av kolonnen viser polymerens sammensetting mhp melke:glykolsyre forholdet og molekylvekten av polymeren. Høy og lav molekylvekt er forkortet hhv HMv og LMv.

Polymer	Nomenklatur
PLGA 50:50 5-15 kDa	PLGA 50 LMv
PLGA 50:50 40-75 kDa	PLGA 50 HMv
PLGA 75:25 66-107 kDa	PLGA 75 HMv
PLA 24-47 kDa	PLA LMv

2.3.1 Formulering av nano- og mikropartikler

Antigen og immunstimulant ble løst opp i 800 μ l vannfase (W_1) som vist i Tabell 2. W_1 -fasen ble overført til oljefasen (O) bestående av 400 mg polymer løst opp i 8 ml kloroform (5 % w/v). De to fasene ble sonikert på 25 % styrke i 45 sek eller 35 % styrke i 45 sek for preparering av hhv mikro- eller nanopartikler (Sonics Vibra cell VC750, 3 mm tapered microtip).

Tabell 2 Innhold i de forskjellige fasene av W_1 -O- W_2 emulsjonen.

W_1	O	W_2
625 μ l Human Gamma Globulin (HGG) løst i dH ₂ O (60 mg/ml). 5 μ l β -glukan I^{125} merket. 200 μ l β -glukan (50 mg/ml) 20 μ l 4.0 % PVA.	400 mg polymer 8 ml kloroform	15 ml 2 % PVA

Nanopartiklene ble preparert ved å overføre W_1/O -emulsjonen til et begerglass med W_2 -fasen og blandet ved bruk av probesonikator på 35 % styrke i 1 minutt og 15 sek. Mikropartiklene ble fremstilt ved bruk av vevshomogenisator (Ultra TURRAX, T25 Basic, IKA®-Werke). W_1O -fasen ble blandet med W_2 ved 9 500 rpm i 35 sek. Partikkelformuleringene ble tilsatt 15 ml MilliQ vann for å fasilitere fordamping av kloroform. Begeret ble dekket med perforert aluminiumsfolie og satt til omrøring ved 300 rpm over natt.

For å fjerne PVA i suspensjonen ble partikkelformuleringene sentrifugert ved ulike hastigheter og resuspendert i dH_2O . Nanopartikler ble først sentrifugert ved 500 x g i 8 min (Multifuge 1 s-r Heraeus, Thermo Scientific) for å fjerne eventuelle aggregater. Supernatanten ble overført til nye sentrifugerør og sentrifugert ved 5000 x g i 8 min. Supernatanten ble videre sentrifugert ved 15 000 x g i 8 min og ved 25 000 x g. Pelletten fra sentrifugeringene ved 5000, 15 000 og 25 000 x g ble resuspendert, dette for å hindre aggregering av partiklene, og slått sammen. Mikropartikkelformuleringene ble vasket 2 ganger ved 500 x g og pelleten resuspendert i dH_2O . Partikkelformuleringene ble alikvotert i dramsglass og tilsatt trehalose (5 mg/ml) i 1:3 forhold. Dramsglassene ble hurtig fryst ned i flytende nitrogen for å hindre sedimentering og fryst ved $-80\text{ }^\circ\text{C}$ i minimum 3 timer. Partikkelformuleringene ble frysetørket i 48 timer ved tilnærmet 0.010 hPa (Scanvac CoolSafe™) og $-108\text{ }^\circ\text{C}$ i frysefellen.

2.3.2 Beregning av partikkelstørrelse, antigen loading og inkapsulering

Størrelsen på nanopartiklene ble målt med dynamisk laser defraktometer (Nincomp 370-s). Alt utstyr ble vasket med partikkelfritt milli-Q vann som var filtrert gjennom Acrodisc® PSF 0.2 μm sprøytefilter (Pall Life Sciences Laboratory Products). Partiklene ble suspendert i milli-Q vann og badsonikert i 3 min før målingen for å unngå partikkelaggregering.

Mikropartiklene ble lysmikroskopert (DM6000 B Leica) og størrelsen ble bestemt ved bruk av programvaren Leica Application Suite (Version 3.4.0 Leica Microsystems).

Inkapsulert β -glukan ble korrelert i henhold til hvor mye γ -stråling partiklene avga, mens inkapsuleringen av HGG ble målt ved bruk av BCA™ Protein Assay Kit (Pierce Protein Research Products).

For å finne antigenkonsentrasjonen ble partikkelformuleringen oppløst i 1M NaOH/0.5 % Sodium Dodecyl Sulfat (SDS). Løsningen ble nøytralisert med 1 M HCl og proteinkonsentrasjonen ble målt ved bruk av BCA-kit. Standardkurven ble laget av 50, 100, 250, 500 og 1000 µg *Bovine serum albumin* (BSA) som fulgte med settet.

Miks A og miks B fra kitet ble blandet i forhold 50:1. tjuefem µl av prøven eller standardene ble overført i 96-brønnersbrett og tilsatt 200 µl miks AB og inkubert i vannbad med lokk ved 60 °C i 30 min. Brettet ble kjølt ned til romtemperatur før OD₅₆₂ ble målt på Spectra Max 190 (Molecular devices) og konsentrasjonen i prøvene ble korrelert mot standardkurven. Inkapsuleringseffektiviteten og antigenloadingen ble beregnet ved hjelp av formel 1 og 2.

Formel 1 Beregning av inkapsuleringseffektivitet av HGG og β-glukan i PLA- og PLGA-partikler.

$$\left(\frac{\text{mg HGG} / \beta\text{-glukan i formulering}}{\text{mg HGG} / \beta\text{-glukan tilsatt } W_1 \text{ fase}} \right) \times 100 = \text{Inkapsuleringseffektivitet}(\%)$$

Formel 2 Beregning av HGG og β-glukan loading i PLA- og PLGA-partikler

$$\frac{\mu\text{g HGG og/eller } \beta\text{-glukan total}}{\text{mg PLGA polymer} + \text{mg inkapsulert HGG og/eller } \beta\text{-glukan}} = \text{Loading}(\mu\text{g} / \text{mg})$$

2.4 Utslippsstudie

12 mg nano og mikropartikler ble suspendert i 1 ml PBS tilsatt 0.02 % natriumazid (NaAz). Prøvene ble inkubert ved bruk av Rotator SB3 (Stuart®) på 7 rpm ved 8 °C. Forsøket ble gjennomført i tre parallelle rør (Tabell 3). Prøver ble tatt ved dag 4, 7, 15, 30, 45, 60, 75, 90 og 120 etter prøvestart. Prøvetaking ble gjort ved å ta av 150 µl av partikkelsuspensjonen fra hvert rør som ble sentrifugere på 15 000 g (Eppendorf centrifuge 5417 R) i 10 min. Hundre µl av supernatanten ble så overført til nye rør og fryst ned ved -20 °C. Pelleten ble resuspendert i 100 µl PBS med 0.02 % NaAz, tilsatt partikkelsuspensjonen og satt tilbake til inkubasjon. Prøvene ble analysert ved bruk av BCA-kit.

Tabell 3 Oversikt over formuleringer i releasestudiet in vitro.

Gruppe	Formulering
1	PLGA 50 LMv nano
2	PLGA 50 LMv mikro
4	PLGA 50 HMv nano
5	PLGA 50 HMv mikro
7	PLGA 75 HMv nano
8	PLGA 75 HMv mikro
10	PLA LMv nano
11	PLA LMv mikro

2.5 TO-celler

Alt arbeid med celler ble gjennomført sterilt i *laminar air flow*-benk. Benken og alt utstyret brukt i arbeidet ble desinfisert ved bruk av 70 % etanol for å hindre kontaminering. Dyrkingen av TO-celler ble gjennomført i 600 ml Nunclosterplate-kolber ved 20 °C på 0.54 % CO₂ metting (Wergeland og Jakobsen, 2001).

Passasjene med cellene ble splittet når cellene var 90-95 % konfluente. Vekstmediet (MEM+Glutamax™ med 7,5 % FCA + S/P) ble helt av kolbene og cellene ble vasket med 10 ml PBS, dette for å fjerne proteiner og divalente ioner som gir redusert effekt av trypsin. PBS ble helt av kolben og 3 ml 1x trypsin ble tilsatt for å løse cellene fra hverandre. Etter en virketid på 60 sek ble mesteparten av trypsinet helt av og cellene ble mikroskopert. Da cellene begynte å løsne etter ca 5 min ble kolben dunket for å løsne de resterende cellen. For å få en jevn cellesuspensjon ble cellene og trypsinen pipettert opp og ned til løsningen var homogen. Cellene ble så resuspendert i 30 ml vekstmedium og fordelt på to nye 600 ml kolber. Kolbene ble tilsatt 25 ml vekstmedium hver så det totale volumet i hver av kolbene ble 40 ml.

2.5.1 Opptaksstudie av nanopartikler i TO-celler

Hensikte med forsøket var å undersøke opptaket av nanopartikler i TO-celler for å finne ut som det er en sammenheng mellom størrelse, polymersammensetning og forhold melke:glykolsyre.

Protokollen for arbeidet er gjengitt, men opptaksstudiet ble gjennomført av Børge N. Fredriksen.

TO- celler ble sådd ut på 24-brønners brett (Nunclon™) med 100 000 celler pr brønn i vedlikeholdsmedium. Brettene ble satt til inkubasjon over natt ved 20 °C og 0.54 % CO₂ metting.

Vekstmediet ble pipettert av og cellene ble vasket med 1 ml PBS pr brønn. Nanoformuleringene med I¹²⁵-merket antigen HGG + β-glukan formuleringen ble tynnet ut i vekstmedie til konsentrasjoner på 200, 400 og 800 µg/ml og testet i fire paralleller. Cellene ble inkubert ved 20 °C og 0.54 % CO₂ metting i 2 timer. Vekstmediet ble pipettert av og cellene ble vasket 2 ganger med 0.5 ml PBS. Vekstmediet og PBS ble slått sammen og CPM ble målt på Cobra II Auto Gamma (Perkin-Elmer Packard)

2.6 Forsøksfisk, immunisering og prøvetaking

I alle forsøkene ble atlantisk laks (*Salmo salar* L.) levert av Aqua Gen A/S benyttet. Stammen er regnet som Infeksiøs Pankreas Nekrose (IPN) sensitiv og var gruppe 2 av 2009 generasjonen. Fisken ankom landanlegget ved Havbruksstasjonen i Tromsø AS som rogn og ble klekket etter 524 døgngader. Under plommesekkstadiet var lysregimet 0:24 (lys:mørke) i tre og en halv måned. Ved startføring ble lysregimet satt til 24:0 og temperaturen til 8 °C under hele forsøksperioden. Under forsøket gikk fisken på ferskvann.

Ved vaksinerings ble totalt 1559 Atlantisk laks (*Salmo salar*) med vekt mellom 29-36 g fordelt på tre ulike eksperimenter; immunisering-, dose/respons- og depotstudie. I alle eksperimentene ble forsøksfiskene bedøvet ved bruk av 1.5-2 ml Benzoak vet.(A.C.D. Pharmaceuticals) pr 10 liter vann før merking og vaksinerings. Gruppene ble merket med finnekllipping og Panjet (nålløs tatovering) med 2 % *alcian blue* i henhold til merkeskjema gitt ved Landanlegget. Volumet av vaksinedosene var på 100 µl pr fisk i samtlige forsøk. I grupper hvor HGG ble brukt alene eller i kombinasjon med β-glukan, ble fisken injisert med 200 µg β-glukan og/eller 100 µg HGG.

Før prøvetaking ble forsøksfiskene humannt avlivet med en dobbel dose bedøvelsesmiddel (4 ml Benzoak/10 l vann) og slag mot hodet. Fisken ble blodtappet fra *vena caudalis* ved bruk av 0.7 x 25 mm-kanyle (Becton, Dickinson and Company) og vacutainere med lithium heparin (Becton, Dickinson and Company). Blodet ble lagret på is under transport fra Havbruksstasjonen til laboratoriet ved UiT. Blodplasmaen ble separert fra helblodet ved å sentrifugere blodet på 2500 rpm ved 4 °C i 10 min (Multifuge 1 s-r Heraeus, Thermo Scientific). Blodplasmaen ble overført til cryorør og lagret ved – 20 °C for senere analyse.

2.7 Immuniseringsstudiet

Studiet ble gjennomført for å sammenlikne antistoffrespons mellom fisk injisert med nano- og mikropartikkelformuleringer og en konvensjonell vaksineolje (Freunds complete adjuvans). Forsøket ble gjennomført ved å immunisere 1020 fisk med ulike partikkelformuleringer, negativ kontroll og positiv kontroll, som vist i Tabell 4. Forsøksfisken ble delt inn i 17 grupper for uttak av 10 fisk/gruppe pr prøvetaking. Alle partikkelformuleringene inneholdt HGG som antigen og β -glukan som immunstimulant. Blodprøvetaking ble gjennomført uke 4, 6, 8, 10, 12 og 16 etter immunisering og prøvene ble analysert for spesifikke antistoffer mot HGG.

Tabell 4 Oversikt over formuleringer og tidspunkt for prøvetaking i immuniseringsstudiet. * indikerer spormengder β -glukan da noe β -glukan var inkapsulert i partiklene.

Gruppe	Polymer/Partikel størrelse	4	6	8	10	12	16	Totalt/gruppe	HGG	β -glukan
1	PLGA 50 LMv nano	10	10	10	10	10	10	60	x	x
2	PLGA 50 LMv mikro	10	10	10	10	10	10	60	x	x
3	PLGA 50 LMv nano & mikro	10	10	10	10	10	10	60	x	x
4	PLGA 50 HMv nano	10	10	10	10	10	10	60	x	x
5	PLGA 50 HMv mikro	10	10	10	10	10	10	60	x	x
6	PLGA 50 HMv nano & mikro	10	10	10	10	10	10	60	x	x
7	PLGA 75 HMv nano	10	10	10	10	10	10	60	x	x
8	PLGA 75 HMv mikro	10	10	10	10	10	10	60	x	x
9	PLGA 75 HMv nano & mikro	10	10	10	10	10	10	60	x	
10	PLA LMv nano	10	10	10	10	10	10	60	x	x
11	PLA LMv mikro	10	10	10	10	10	10	60	x	x
12	PLA LMV nano & mikro	10	10	10	10	10	10	60	x	x
13	Positiv kontroll (Freunds Complete)	10	10	10	10	10	10	60	x	
14	Negativ kontroll (PBS)	10	10	10	10	10	10	60		
15	Positiv kontroll + nanoparikler (PLA LMv)	10	10	10	10	10	10	60	x	*
16	Positiv kontroll + mikropartikler (PLA LMv)	10	10	10	10	10	10	60	x	*
17	Negativ kontroll (ingen adjuvant)	10	10	10	10	10	10	60	x	x
	Uttak pr uke	170	170	170	170	170	170	1020		

2.8 Dose/respons-studie

Forsøket ble delt inn i 21 grupper med 10 fisk i hver gruppe. Formuleringene (Tabell 5) ble administrert i doser på 10, 25, 50, 100 og 400 μ g antigen/injeksjon. I likhet med immuniseringsstudiet ble HGG og β -glukan brukt som henholdsvis antigen og immunstimulant. Etter 8 uker ble blod tappet, blodplasma ble isolert og analysert som beskrevet tidligere.

Tabell 5 Formulering og antall forsøksfisk i dose/respons-studiet. Hver dose representerer en gruppe.

Vaksineformulering	Dose ($\mu\text{g}/\text{injeksjon}$)					
	0 μg	10 μg	25 μg	50 μg	100 μg	400 μg
PLA LMv nanopartikler		10	10	10	10	10
PLA LMv mikropartikler		10	10	10	10	10
HGG og β -glukan i PBS		10	10	10	10	10
Positiv kontroll (Freunds Comp. Adj)		10	10	10	10	10
Negativ kontroll (PBS)	10					
	10	40	40	40	40	40
					Total	210

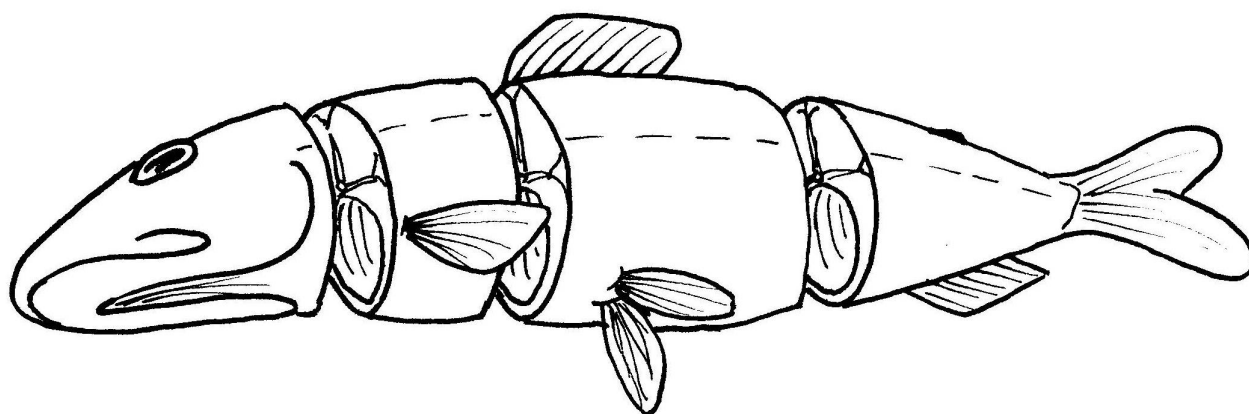
2.9 Depotstudie

For å sammenlikne depoteffekten til de ulike PLGA/PLA formuleringene mot en oljeformulering og en vandig vaksine, ble HGG merket med I^{125} , formulert og injisert i forsøksfisk. De ulike formuleringene administrert intraperitonealt i studiet var tilsvarende formuleringene gitt i *immuniseringsstudiet* med unntak av at kombinasjonsformuleringene (FCA/partikler og kombinasjonsformulering nano/mikro) som ble utelatt. For hver vaksinegruppe ble radioaktivitet tilsvarende 18-24k CPM injisert for antigensporing. Mengden CPM/injeksjon var avhengig av inkapsuleringseffektiviteten av antigen for den enkelte vaksinegruppe. Målinger av CPM fra blod og nyre ble gjort på Cobra II Auto Gamma (Perkin-Elmer Packard) og CPM målinger av organpakke, hode og muskel ble gjort på Auto-Gamma Scintillation Spectrometer (Packard). Prøvetaking ble gjennomført 7 og 36 dager etter immunisering.

Tabell 6 Oversikt over formuleringer og prøvetaking i depotstudiet.

Gruppe	Formulering	Dager etter forsøksstart			HGG	β -glukan
		0	7	36		
1	PLGA 50 LMv nano	5	5	5	x	x
2	PLGA 50 LMv mikro	5	5	5	x	x
4	PLGA 50 HMv nano	5	5	5	x	x
5	PLGA 50 HMv mikro	5	5	5	x	x
7	PLGA 75 HMv nano	5	5	5	x	x
8	PLGA 75 HMv mikro	5	5	5	x	x
10	PLA LMv nano	5	5	5	x	x
11	PLA LMv mikro	5	5	5	x	x
13	Positiv kontroll (Freunds Complete)	5	5	5	x	
14	Negativ kontroll (PBS)	3	3	3		
15	Negativ kontroll (ingen adjuvant)	5	5	5	x	x
	Total antall pr prøvetaking	53	53	53		
	Total antall fisk i forsøket	159				

Organpakken (hjerte, oesophagus, magesekk, pylorusblindsekker, galleblære, lever, midttarm baktarm og milt) ble tatt ut ved å kutte over oesophagus og bakre del av baktarm og overføre til 20 ml plastrør (Polyvials Zinsser Analytic). Hele nyren ble tatt ut og plassert i TT-rør. Hodet ble fjernet fra truncus og resten av abdomen ble delt opp i tre deler som vist på Figur 5 og plassert i separate 20 ml plastrør.



Figur 5 Illustrasjon av prøveinndeling under prøvetaking av hode og torso. Etter prøvetaking av blod, fjerning av nyre og organpakke ble fisken delt i fire deler og overført til 20 ml plastrør. (Illustrasjon G. Johannson)

2.10 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)

I delstudiene immunisering- og dose/responsstudiet ble den spesifikke antistoffresponen mot HGG målt ved bruk av ELISA (flytskjema, Figur 6).

2.10.1 Gjennomføring av ELISA

Analysen av blodplasmaen ved bruk av ELISA ble gjennomført i 96-brønnersbrett (Nunc-immuno plate) som ble dekt med HGG i konsentrasjon 5 µg/ml løst i 0.1 M karbonatbuffer med pH 9.6 med 100 µl/brønn, og satt til inkubasjon over natt ved 4 °C. Mellom hvert trinn ble brønnene vasket 3 ganger med PBST ved bruk av platevasker (Skan Washer 400, Molecular Devices) dersom ikke annet er spesifisert. Blokkeringen av uspesifikk binding av antistoffer til platen ble gjort ved bruk av 200 µl 5 % tørrmelk i PBST pr brønn ved romtemperatur i 2 timer.

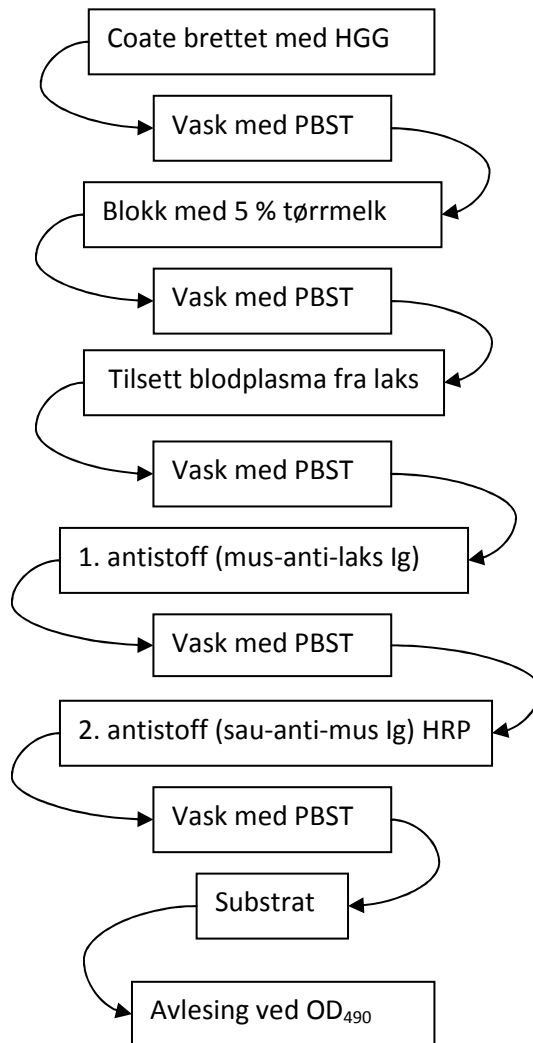
Plasmaprøvene fra forsøksfisken ble fortynnet 1:25 i PBST med 1 % tørrmelk etter

optimaliseringsforsøk. Intern kontroll for å korrelere resultatene mellom platene var høy og lav positiv fra FCA/HGG-gruppe i uke 12 fortynnet henholdsvis 1:50 og 1:200. Negativ kontroll var 1 % tørrmelk. Data ble normalisert mot en brettkontroll og negativ kontroll (0-punkt serum) ble subtrahert fra rådata for hver enkelt prøveresultat.

Prøvene fra blodplasmaen ble tynnet ut til 1:25, 1:50 og 1:100 i 1 % tørrmelk i PBST, tilsatt 100 µl/brønn og inkubert over natt ved 4 °C. Det primære antistoffet, 4C10 mus-anti-laks Ig antistoff, levert av Veterinærinstituttet ble tilsatt 100 µl/brønn i 1:30 fortynning i 1 % tørrmelk og inkubert 1 time i romtemperatur.

Sekundært antistoff, ECL™ anti mus IgG HRP artsspesifikk helantistoff fra sau (GE Health) ble tilsatt 100 µl/brønn i 1:6000 fortynning i 1 % tørrmelk/PBST og inkubert 1 time i romtemperatur.

Substrat ble laget ved å tilsette 2 mg Ortho-Phenylenediamine (ODP) tabletter (Sigma-Aldrich) til dH₂O (4 tabletter/ 12 ml dH₂O med 5 µl 30 % H₂O₂). Substratløsningen ble tilsatt 100 µl/brønn og inkubert 30 min i romtemperatur. Reaksjonen ble stoppet ved bruk av 50 µl 1M H₂SO₄ pr brønn. Analysen av fargeendringene ble gjort på Spectra Max 190 (Molecular devices) på OD₄₉₀ med programvaren SOFTmax PRO 4.3 (Molecular devices).



Figur 6 Fremgangsmåte for deteksjon av spesifikke antistoffer hos laks mot HGG (presentert i flytskjema).

2.11 Statistikk

Data fra samtlige forsøk ble bearbejdet i Microsoft Excel 2003 og satt opp som grafer og tabeller med standardavvik regnet av programmet. Toveis anova ble regnet i Microsoft Excel med signifikant forskjell ved $p < 0.05$ i opptaksstudiet i TO-celler, dose/respons-studiet og depotsstudiet. Statistikken i depotstudiet ble gjennomført mellom prøvetakingene for å sammenlikne signifikans av mengde antigen over tid.

3. Resultater

3.1 Karakterisering av partiklene

Nano- og mikropartikler ble størrelsesbestemt ved bruk av hhv Photon Correlation Spectroscopy (PCS) og lysmikroskopi. Målingene av mikro- og nanopartikler er gjengitt i hhv Tabell 7 og Tabell 8. Samtlige mikropartikkelformuleringer var 8.140 til 8.489 μm og lå innenfor en spredning på 0.349 μm , med unntak av PLA LMv som var 7.794 μm med standardavvik på 3.719 μm .

Tabell 7 Gjennomsnitt av størrelse på mikropartikler og tilhørende standardavvik oppgitt i mikrometer.

Formulering	Gjennomsnitt (μm)	Standardavvik μm
PLGA 50 LMv mikro	8,482	3,869
PLGA 50 HMv mikro	8,140	4,942
PLGA 75 HMv mikro	8,489	4,230
PLA LMv mikro	7,794	3,719

Måling av nanopartikkel formuleringene viste at polymeren med lav molekylvekt, PLGA LMv 50 (5-15kDa), ga de største nanopartiklene med 95 % av partiklene i størrelsesorden <1000 nm. PLGA 50 HMv (40-75 kDa) hadde partikler mellom 500 og 1000 nm. Polymerene med lavest andel glykolsyre, PLGA 75 HMv (66-107 kDa) og PLA LMv (24-47 kDa) var de minste partikkelen med størrelse på under 500 nm.

Tabell 8 Måling med PCS av nanopartikler

Formulering	Størrelse nm
PLGA 50 LMv nano	<1000
PLGA 50 HMv nano	<500-1000
PLGA 75 HMv nano	< 500
PLA LMv nano	< 500

Inkapsuleringen er en prosentvis angivelse av mengde β -glukan eller HGG som inkapsuleres i indre vannfase (W_1). Loadingen er mengden β -glukan eller HGG i indre vannfase i ett mg partikler. Yield, eller partikkelavkastingen, er prosentvis mengde partikler i forhold til hvor mye polymer som ble benyttet til preparering av partiklene. Utregning av loading og inkapsulering for HGG og β -glukan ble gjennomført i Microsoft Excel, resultatene er gjengitte i Tabell 9.

Med hensyn på størrelse viser nanopartiklene høyere inkapsuleringseffektivitet og loading av både HGG og β -glukan enn mikropartiklene av tilsvarende polymersammensetning, med unntaket av

Resultat

PLGA 75 HMv. Mikroformuleringen PLGA 75 HMv viste høyere inkapsulering og loading av HGG på hhv 3,6 og 5,5 prosentpoeng enn nanoformulering.

Tabell 9 Resultat av inkapsulering og loading av β -glukan og HGG.

Formulering	β -glukan		HGG		
	Inkapsulering (%)	Loading (μ g/mg)	Inkapsulering (%)	Loading (μ g/mg)	Yield (%)
PLGA 50 LMv nano	64,7 %	15,1	60,9 %	68,3	77,2 %
PLGA 50 LMv mikro	45,9 %	10,8	50,1 %	58,3	80,0 %
PLGA 50 HMv nano	66,3 %	15,5	66,0 %	73,9	84,7 %
PLGA 50 HMv mikro	38,4 %	8,9	41,4 %	47,6	100,6 %
PLGA 75 HMv nano	60,2 %	14,1	45,0 %	50,6	79,2 %
PLGA 75 HMv mikro	40,8 %	9,5	48,6 %	56,1	93,1 %
PLA LMv nano	65,0 %	15,3	55,4 %	60,7	71,0 %
PLA LMv mikro	42,3 %	9,9	35,7 %	41,4	95,6 %

3.2 Utslippsstudie

Studiet ble gjennomført for alle formuleringene i tre paralleller med nano- og mikropartikler over 120 dager. Hensikten med studiet var å se på utslippskinetikken til partiklene ved 8 °C

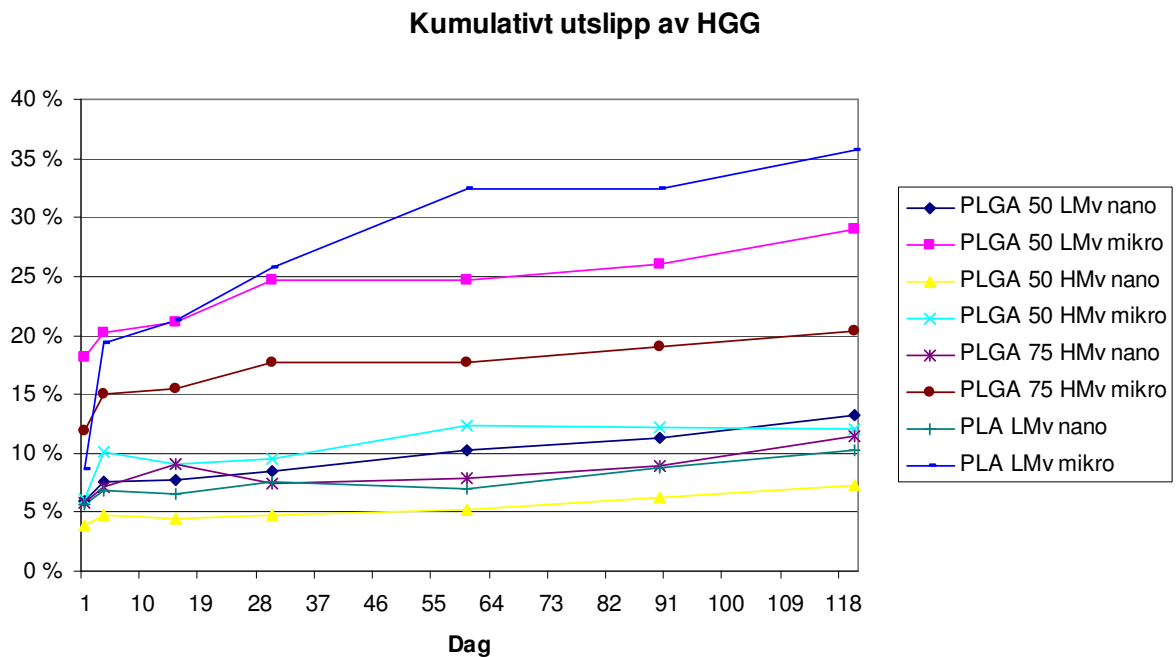
Samtlige partikkelformuleringer ga utslipp av HGG, men mengden protein partiklene slapp ut varierte avhengig av størrelse og sammensetning av polymer.

Samtlige nanopartikkelformuleringer ga lavere prosentvis utslipp av protein enn mikropartikler av tilsvarende polymersammensetning over 120 dager, med unntak av PLGA 50 LMv NP (Figur 7). Kumulativt frigjorde PLGA 50 LMv NP 13 % av inkapsulert HGG, hvilket er 1 prosentpoeng høyere enn PLGA 50 HMv som frigjorde minst HGG av MP formuleringene.

Av mikropartikkelformuleringene ga PLA LMv høyest kumulative utslipp etterfulgt av PLGA 50 LMv, PLGA 75 HMv og PLGA 50 HMv med utslipp på hhv 36 %, 29 %, 20 % og 12 %.

Høyest kumulative utslipp av nanopartikkelformuleringene viste PLGA 50 LMv, etterfulgt av PLGA 75 HMv, PLA LMv og PLGA 50 HMv med hhv 13 %, 11 %, 10 % og 7 % utslipp av HGG.

Høyest forskjell fra dag 4 til 120 (etter "burst"-utslipp) med tanke på HGG utslipp, viste PLA LMv mikro med en differanse på 16 prosentpoeng. Nest høyest utslipp av HGG hadde PLGA 50 LMv mikro etterfulgt av PLGA 50 LMv nano med hhv 9 og 6 prosentpoeng.



Figur 7 Utslipp av HGG fra partikler inkubert ved 8 °C *in vitro* i PBS (pH = 7.4). Målinger vist er snitt av tre paralleller.

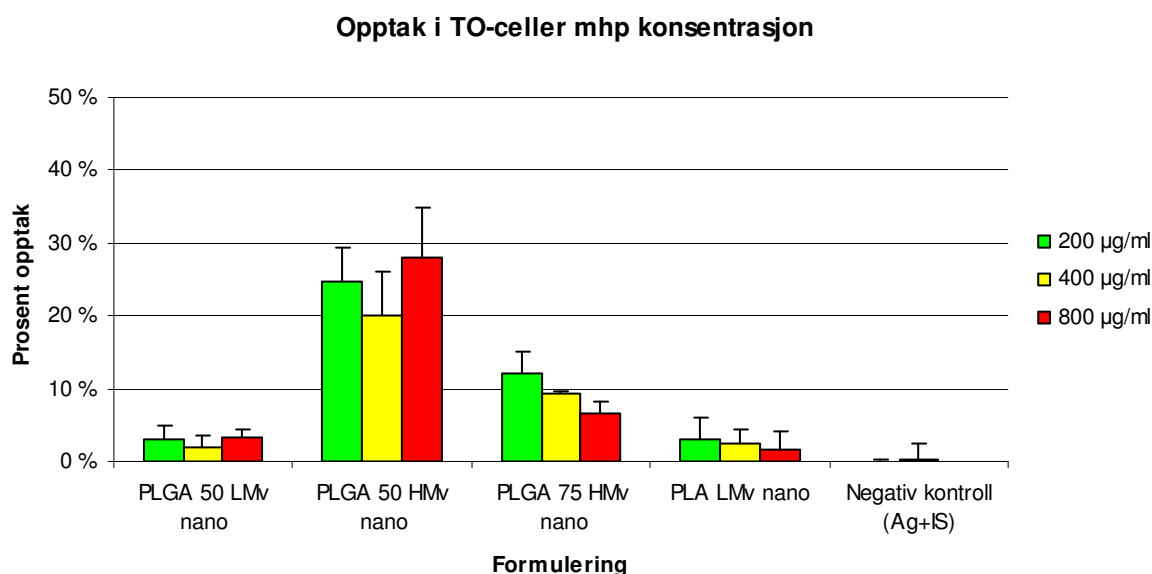
Ved å undersøke relativt utslipp fra partiklene er det mulig å finne ut når HGG slippes ut av partiklene. Samtlige mikropartikler hadde et relativt høyt utslipp av protein ved dag 4 (5 % til 20 %) sammenlignet med nanopartikler (3 - 5 %).

Samtlige partikkelformuleringer hadde et startutslipp under 20 %, hvor PLGA LMv mikro og PLGA 75 HMv mikro hadde høyest utslipp av HGG med hhv 18 % og 12 %, mens de øvrige gruppene hadde et startutslipp under 10 %.

Nanopartiklene hadde et stabilt økende utslipp av HGG fra dag 4 til dag 120, hvor økningen var under 5.74 % for samtlige NP grupper. Mikropartiklene viste større variasjon mhp utslipp av HGG med en økning fra dag 4 til 120 på under 16 %

3.3 Opptaksstudie av nanopartikler i TO-celler

Opptaksstudie i TO-celler ble gjennomført over 2 timer hvor opptaket av radioaktivitet ble målt indirekte. CPM i vekstmediet og i PBS som ble brukt til vasking av cellene ble subtrahert fra utgangspunktet for å bestemme opptaket i cellene. Forskjellen, mhp opptak i celler, mellom dosene innad i gruppene var ikke signifikant forskjellige ved 200, 400 og 800 µg/ml doser (Figur 8).



Figur 8 Opptak av nanopartikler i TO-celler over 2 timer ved 200, 400 og 800 µg/ml. Forsøket ble gjennomført med fire paralleller.

Samtlige formuleringer, uavhengig av dose, medførte opptak under 30 % i cellene. Av formuleringene ga PLGA 50 LMv, PLA LMv og negativ kontroll et gjennomsnittlig opptak på under 2.8 %. Celler gitt nanopartikler av PLGA 50 HMv og PLGA 75 HMv viste høyest opptak med hhv 24.3 % og 9.3 %. Ingen statistisk signifikant forskjelle ble observert innad i gruppene mellom dosene 200, 400 og 800 µg .

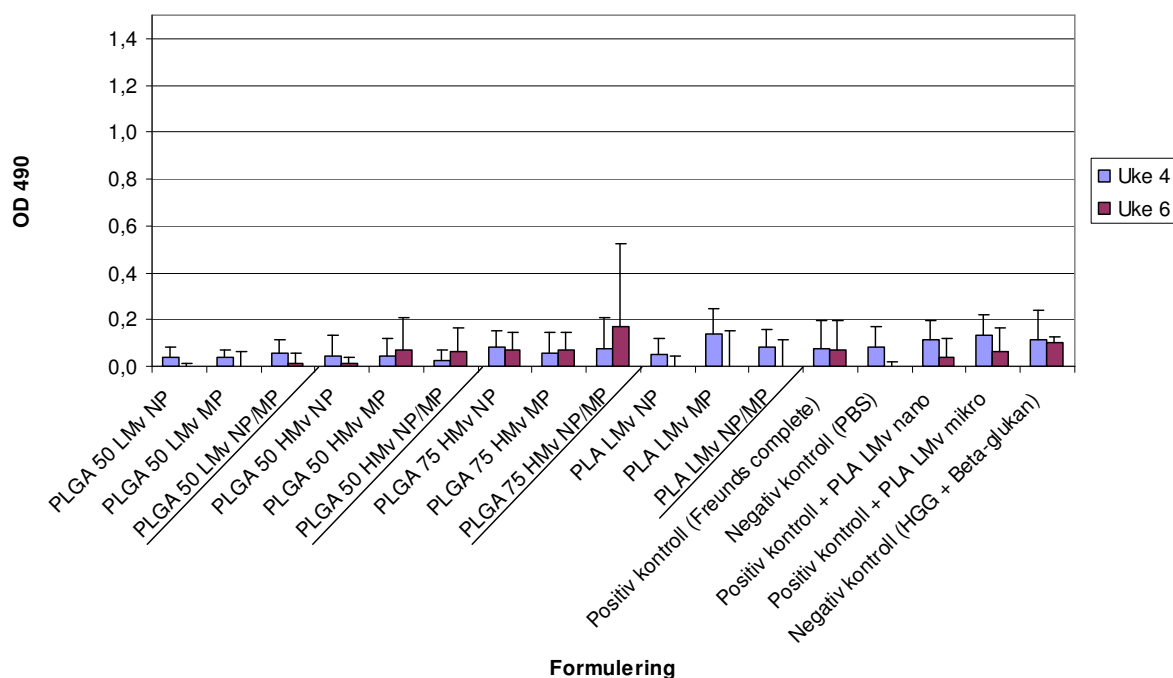
3.4 Immunisering: Tidsstudie av humoral respons

Blodplasma ble analysert for innhold av spesifikke antistoffer mot HGG ved bruk av ELISA. Blodprøver ble tatt av forsøksfisken 4, 6, 8, 10, 12 og 16 uker etter injeksjon med uttak av 10 fisk pr gruppe ved hvert tidspunkt. Data ble normalisert mot en brettkontroll og negativ kontroll (0-punkt serum) for hver enkelt prøveresultat. Resultatene fra prøvetakningene er presentert i grafer hvor uke 4 og 6, 8 og 10, og 12 og 16 vises sammen, dette for at forskjellene mellom gruppene blir mer fremtredende.

Ved fortykning på 1:25 havnet samtlige av prøveresultatene på OD_{490} under 4.0 som er innenfor følsomheten til måleutstyret (pers. med. Børge N. Fredriksen)

3.4.1 Antistoffrespons uke 4 og 6

Samtlige grupper hadde lave antistoffresponser både ved uke 4 og 6 etter immunisering (Figur 9). Alle vaksinegrupper viste OD₄₉₀ verdier under 0,2, noe som var tilsvarende lik OD₄₉₀ verdier for i PBS-injisert kontrollfisk.



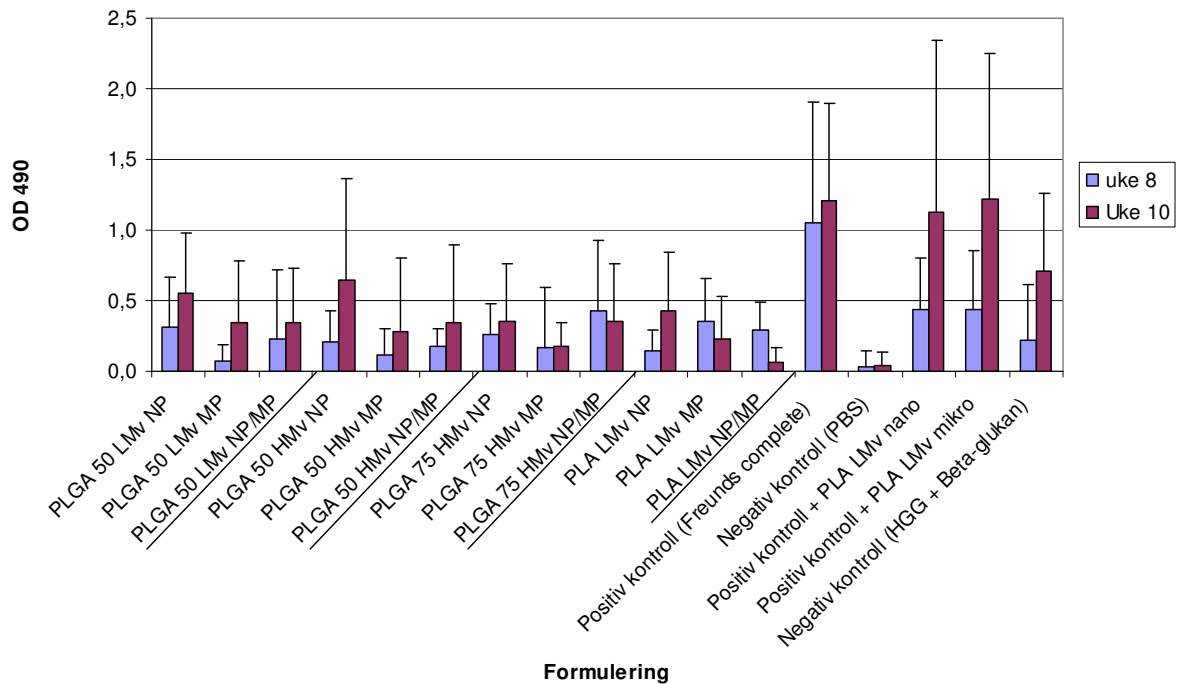
Figur 9 Relativ andel spesifikke antistoff mot HGG i plasma, 4 og 6 uker etter injisering med vaksineformuleringer (n=10). Plasma fortynt 1:25. Samtlige formuleringer viste OD₄₉₀ verdier på under 0,2. Partikkelformuleringene og FCA inneholdt HGG som antigen.

3.4.2 Antistoffrespons uke 8 og 10

Immunresponsen etter 8 og 10 uker var høyere enn etter uke 4 og 6. Av prøvene tatt i uke 8 og 10 viste de fleste prøvene, med unntak av PLGA 75 HMv NP/MP, PLA LMv MP og PLA LMv NP/MP, høyest antistoffrespons i uke 10. Sterkest spesifikk immunrespons hadde formuleringene med nanopartikler. Av NP formuleringene ga PLGA 50 LMv NP og PLGA 50 HMv NP, med OD₄₉₀-verdier på henholdsvis 0.56 og 0.64, høyest respons. Kombinasjonsformuleringene med både NP og MP viste ikke noen økt antistoffrespons (synergieffekt) sammenliknet med formuleringene administrert alene. Disse kombinasjonsformuleringene viste OD₄₉₀-verdier som var tilnærmet gjennomsnittet av gruppene injisert med nano- og mikropartikler alene.

Resultat

I gruppene hvor FCA ble administrert, enten med HGG (positiv kontroll) eller med nano (positiv kontroll + PLA nano) - eller mikropartikler (positiv kontroll + PLA mikro), var OD₄₉₀-verdiene høyere enn verdiene for partikkelvaksinene eller de negative kontrollene (1.207 for FCA/HGG). I likhet med partikkelformuleringene ble det i FCA gruppene observert høyere OD-verdier ved uke 10 etter immunisering enn ved uke 8.



Figur 10 Relativ andel spesifikke antistoff mot HGG i plasma, 8 og 10 uker etter injisering med vaksineformuleringer (n=10). Plasma fortyntnet 1:25. Partikkelformuleringene og FCA inneholdt HGG som antigen.

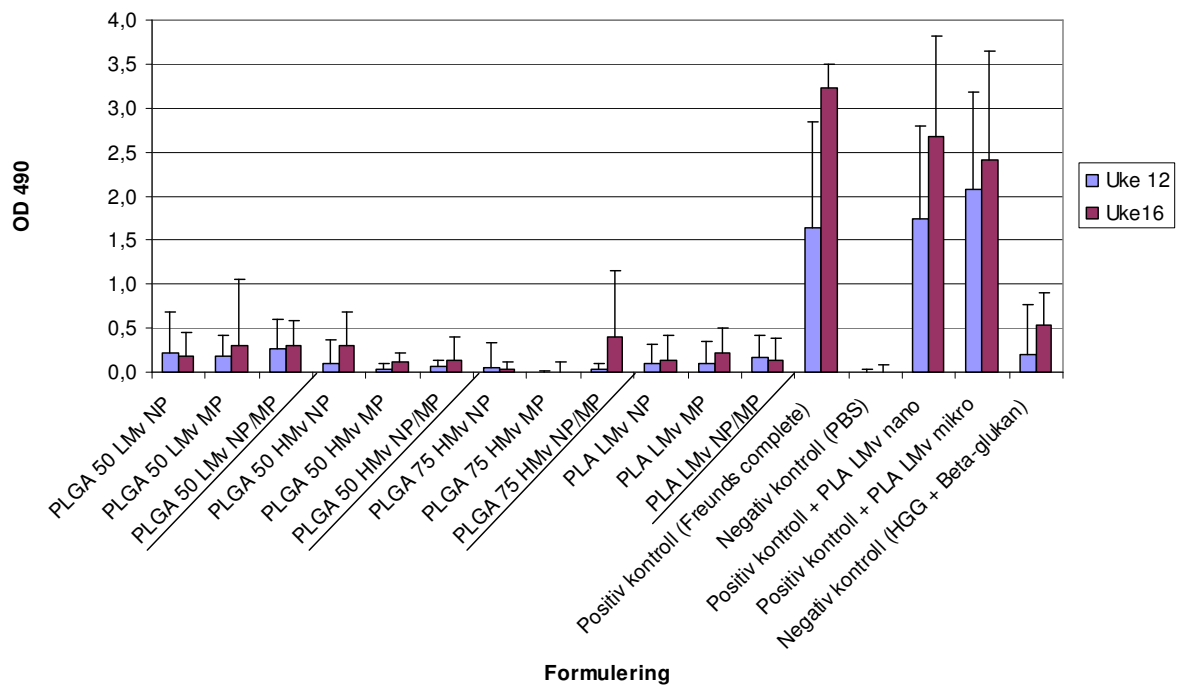
3.4.3 Antistoffrespons uke 12 og 16

12 uker etter injisering var de positive kontrollene høyere, mhp spesifikk antistoffrespons mot HGG, enn i uke 10 med OD₄₉₀-verdier på under 1.3 og over 1.5 i hhv uke 10 og 12 (Figur 11). Fisk i de positive kontrollgruppene viste i uke 16 OD₄₉₀-verdier på over 2.0. FCA formuleringen, som viste lavest spesifikk respons mot HGG av de positive kontrollgruppene i uke 12 med OD₄₉₀ på 1.64, var høyere enn samtlige positive kontroller i uke 8 og 10. De høyeste antistoffresponsene i de positive kontrollgrupper ble observert 16 uker etter immunisering.

Immunresponsen mot HGG i samtlige grupper injisert med NP- og MP-formuleringer hadde OD₄₉₀-verdier på under 0,5. Med unntak av PLGA 75 høy MV MP som ikke viste respons i noen av ukene og PLGA 50 høy MV NP og PLA lav MV NP/MP, viste de resterende partikkelformuleringene høyest

Resultat

respons i uke 16. Negativ kontroll (HGG + β -glukan) viste også høyere respons i uke 16 sammenlignet med uke 12. Immunresponsen i negativ (HGG + β -glukan) kontrollgruppe i uke 16 var høyere enn for samtlige partikkelformuleringer i uke 12 og 16.



Figur 11 Relativ andel spesifikke antistoff mot HGG i plasma, 12 og 16 uker etter injisering med vaksineformuleringer (n=10). Plasma fortynnet 1:25. Partikkelformuleringene og FCA inneholdt HGG som antigen.

3.5 Dose/respons-studiet

Hensikten med studiet var å sammenlikne antistoffrespons mot HGG mellom fisk injisert med nano- og mikropartikkel (HGG + β -glukan), FCA med HGG (positiv kontroll) og PBS (HGG + β -glukan negativ kontroll). Blodplasma ble analysert for innhold av spesifikke antistoffer mot HGG ved bruk av ELISA.

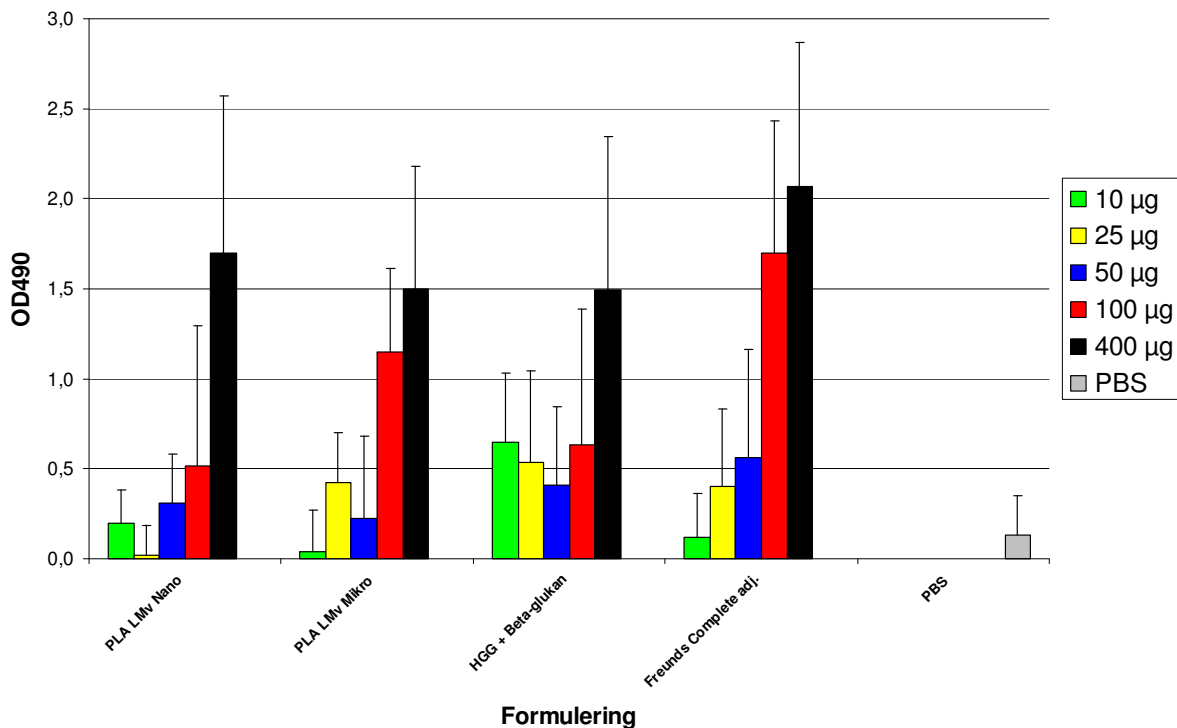
Formuleringene ble administrert i doser på 10, 25, 50, 100 og 400 μ g antigen/injeksjon. PLA-partiklene inneholdt HGG og β -glukan som henholdsvis antigen og immunstimulant. Data ble normalisert mot en brettkontroll og negativ kontroll (0-punkt plasma) for hvert enkelt prøveresultat. Spesifikk Immunrespons mot HGG er grafisk framstilt i Figur 12.

FCA formuleringene ga en økt immunrespons fra 50 til 100 μ g dose, men ikke mellom 100 og 400 μ g

Resultat

dose. Samtlige vaksineformuleringene med viste en økning i immunrespons fra 50 µg til 400 µg dose sammenlignet med PBS-kontroll. Nanopartikkelformuleringen viste en statistisk signifikant forskjell mellom dosene fra 100 til 400 µg. Til sammenligning viste mikropartikkelformuleringen en signifikant forskjell mellom 50 og 100 µg dose, men ikke mellom 100 og 400 µg dose.

Samtlige av formuleringene viser samme trend med en økende spesifikk immunrespons mot HGG ved bruk av økt dose 8 uker etter injeksjon.



Figur 12 Grafisk framstilling av relativ antistoffrespons mot HGG i forhold til dose. Forsøket ble gjennomført med 10 individer/gruppe.

3.6 Depotstudiet

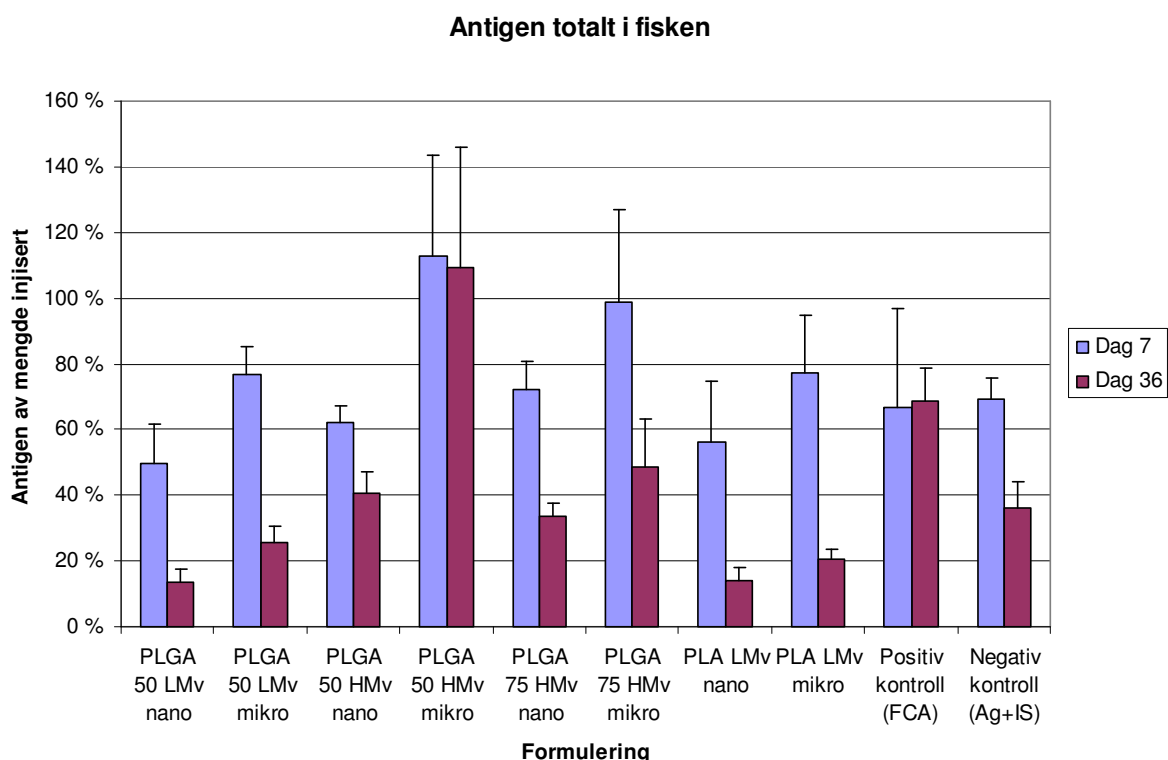
Depoteffekten av de ulike vaksineformuleringene ble i dette studiet analysert ved måling av gammastråling fra HGG merket med I^{125} . Prøver fra blod, organpakke, nyre, hode og muskel ble analysert individuelt for å bestemme distribusjonen av vaksinene i fisken. I det følgende presenteres resultatene av CPM målingene i prosent av injisert dose. Tallene er normalisert i henhold til fysisk halveringstid på I^{125} som er 60.1 dager.

De største mengdene antigen var igjen i fisken etter 7 dager (Figur 13) etter injeksjon av de aller fleste formuleringene. Ved dag 7 og 36 etter injisering inneholdt positiv kontroll (FCA)

Resultat

hhv 67 og 69 % av administrert dose. PLGA 50 HMv mikropartikkelformulering ga ved dag 7 og 36 en stabil mengde antigen med hhv 113 og 109 % av injisert dose. Samtlige andre formuleringer viste en minkende mengde radioaktiv markør.

Det ble observert signifikante forskjeller mellom gruppene mhp mengde antigen i helfisk på dag 7 sammenlignet med dag 36, med unntak av tre grupper. Gruppene som ikke viste signifikant forskjeller mellom dag 7 til 36 var PLGA 50 HMv mikro, PLGA 75 HMv mikro og FCA formuleringen.



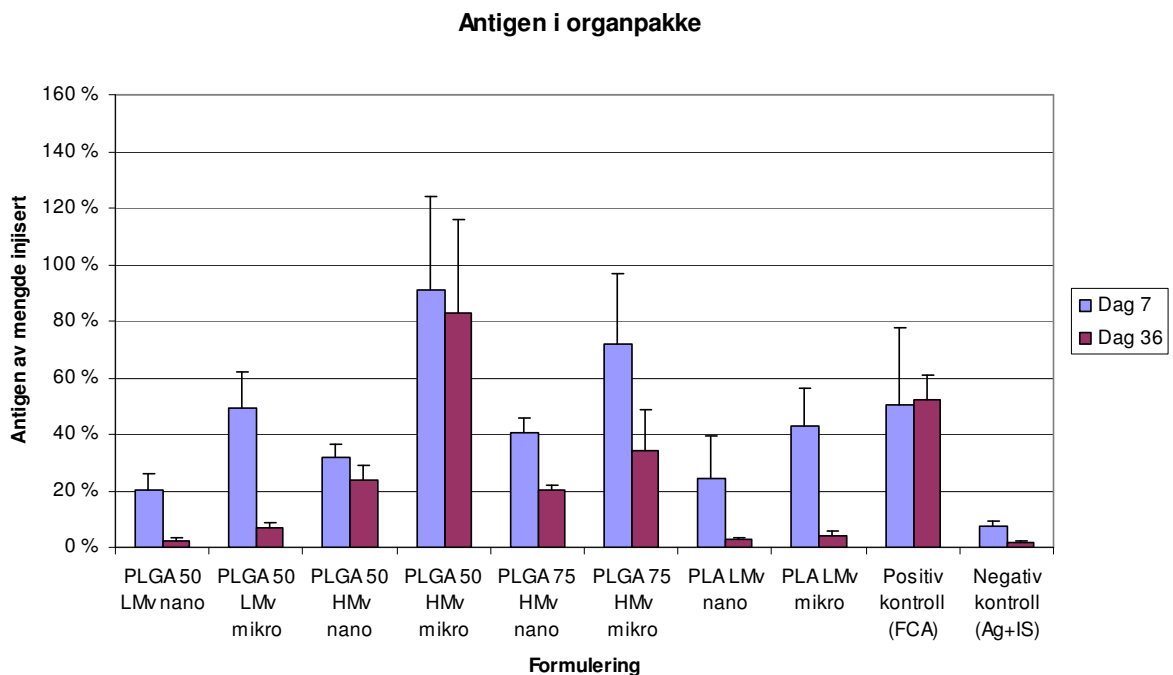
Figur 13 Andel antigen i fisk, 7 og 36 dager etter injisering vist i prosent av total injisert mengde. Forsøket ble gjennomført med 5 individer/gruppe.

Med hensyn på depotteffekt i organpakken var det tre grupper som skilte seg ut; positiv kontroll, PLGA 50 HMv mikro og PLGA 50 HMv nano. Positiv kontroll (FCA) viste på dag 7 og dag 36 at hhv 51 og 52 % av antigen var å finne assosiert med organpakken, dette utgjorde 75 % av antigenet i fisken ved begge prøvetidspunktene (Figur 14). Formuleringen PLGA 50 HMv mikro ga som resultat at hoveddelen av antigenmengden fra injiseringen var i organpakken (81 og 76 %) ved hhv dag 7 og dag 36. Formuleringen PLGA 50 HMv nano viste

Resultat

en liten nedgang i mengde antigen i organpakke 7 og 36 dager etter prøvetaking fra hhv 31.78 % til 23.61 %. PLGA 50 HMv nanopartikler ga en nedgang i mengde antigen fra 51 til 58 % assosiert med organpakke enn i helfisk på hhv dag 7 og dag 36.

Signifikante forskjeller mellom enkelte av gruppene mhp depoteffekt av antigen mellom dag 7 og 36 ble observert. Gruppene PLGA 50 HMv mikro, PLGA 75 HMv mikro og positiv kontroll FCA viste ikke signifikant forskjell mellom dag 7 og 36.

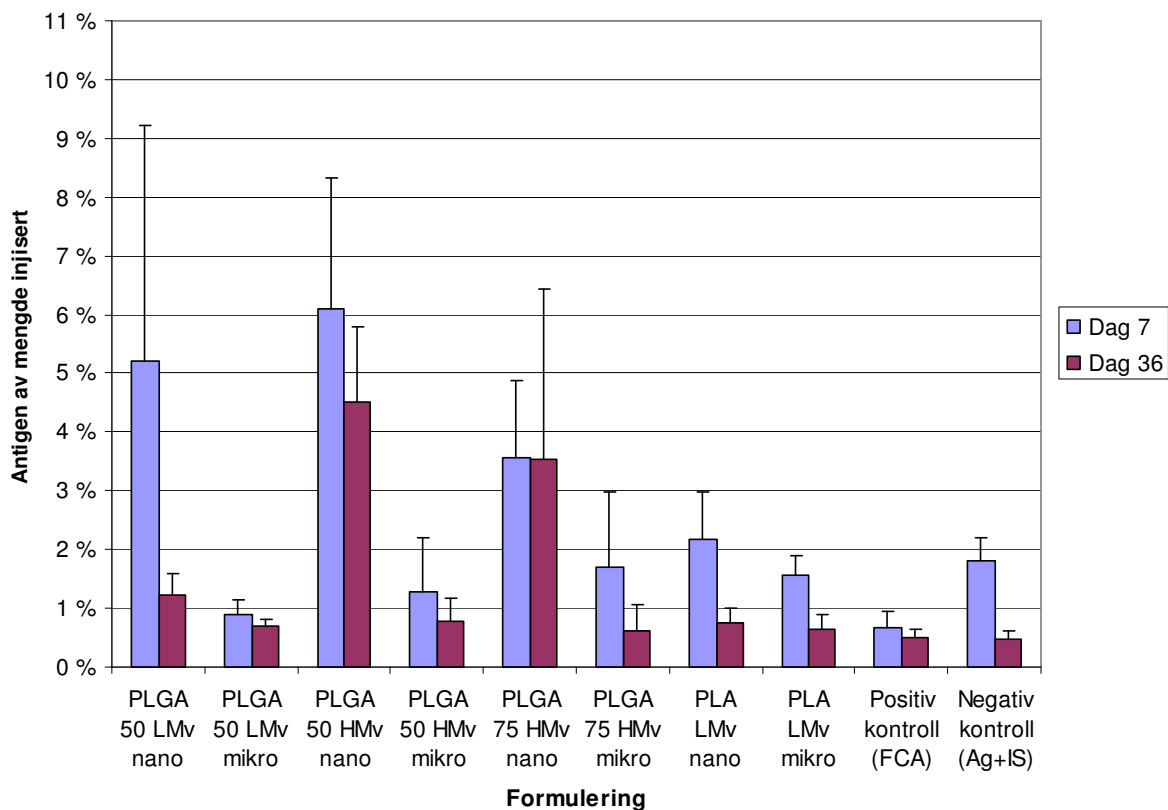


Figur 14 Prosentvis mengde av total injisert vaksineformulering i organpakke 7 og 36 dager etter injisering. Forsøket ble gjennomført med 5 individer/gruppe.

Distribusjonen av antigen i nyre var forskjellig avhengig av formulering (Figur 15). Tre grupper viste tilstedeværelse av antigen rundt eller over 4 % av injisert dose; PLGA 50 LMv nano, 50 HMv nano og PLGA 75 HMv nano. Formuleringene PLGA 50 LMv nano (dag 7 = 5.20 %), PLGA 50 HMv nano (dag 7 = 6.11 %) nano og PLGA 75 HMv nano (dag 7 = 3.55) viste en reduksjon fra dag 7 til dag 36 på hhv 3.97, 1.61 og 0.01 prosentpoeng.

Signifikant forskjell mellom enkelte av gruppene mhp depot fra dag 7 til 36 av antigen ble observert med unntak av gruppene PLA LMv nano, PLA LMv mikro, positiv kontroll FCA og negativ kontroll (Ag+IS) viste en statistisk signifikant forskjell mellom dag 7 og 36.

Antigen i nyre

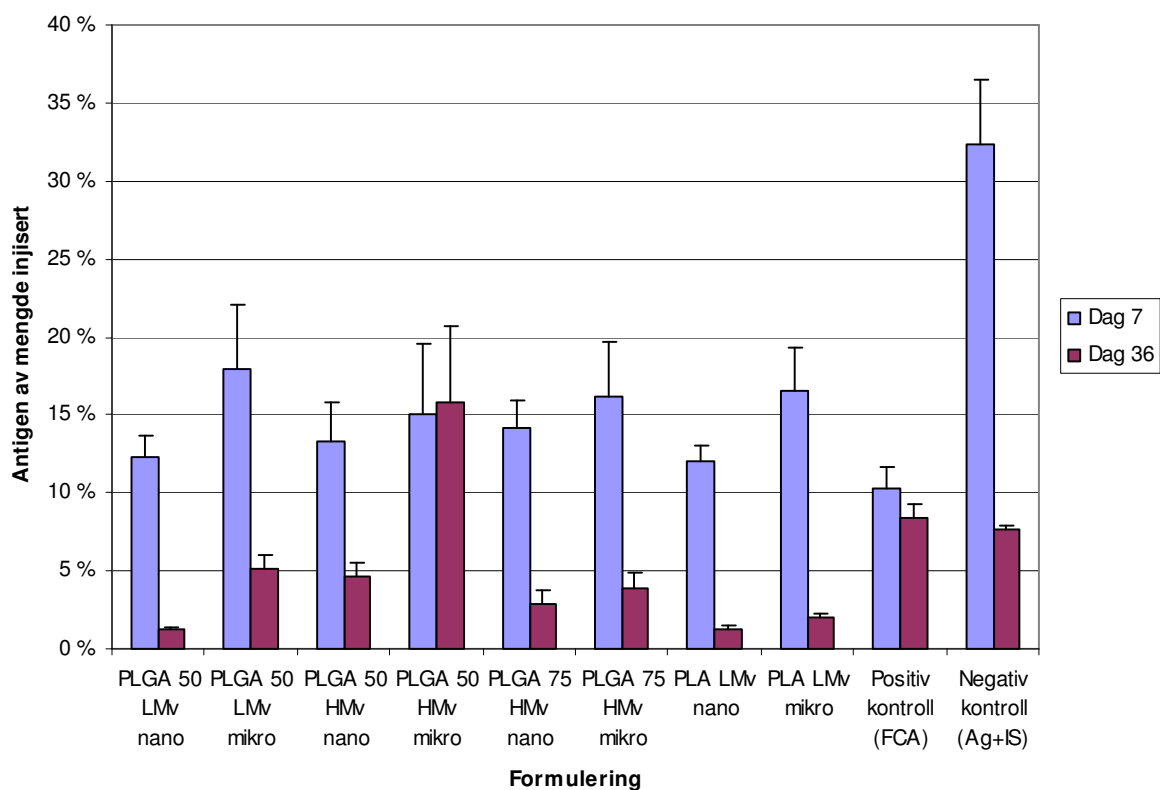


Figur 15 Prosentvis mengde av total injisert vaksineformulering i nyre, 7 og 36 dager etter injisering. Forsøket ble gjennomført med 5 individer/gruppe.

Distribusjonen av antigen i muskel viste fra samtlige formuleringer, med unntak av to, en tydelig lavere mengde antigen fra dag 7 til dag 36 (Figur 16). PLGA 50 HMv mikro og FCA formuleringen ga liten differanse i mengde antigen i muskel på dag 7 og dag 36 med differanse på hhv 0.75 og 1.83 prosentpoeng. Av samtlige formuleringer viste negativ kontroll høyest mengde antigen i muskel 7 dager etter injisering med 32.36 %, men sank med 24.6 prosentpoeng til 7.6 % på dag 36. Det ble observert signifikant forskjell mellom dag 7 og 36 med unntak av PLGA 50 HMv mikro og FCA.

Resultat

Antigen i muskel



Figur 16 Prosentvis mengde av total injisert vaksineformulering i muskel, 7 og 36 dager etter injisering. Forsøket ble gjennomført med 5 individer/gruppe.

4. Diskusjon

Produksjon av atlantisk laks har vært gjennom mye prøving og feiling gjennom mange år. Teknologiske begrensinger med dårlige konstruksjoner av merder, biologiske utfordringer og sykdomsproblematikk har vært noen av problemene i oppdrettsnæringa. Norge har vært velsignet med naturgitte forhold for produksjon av en eksklusiv fiskeart som har høstet høy kilospris på internasjonale marked. Samtidig har Norge klart å holde laksesykdommer under kontroll ved hjelp av god profylakse, hvor en av hovedgrunnene til oppdrettssuksessen har vært gode vaksiner som har beskyttet mot store økonomiske og biologiske tap.

Ved å studere mekanismene som ligger bak sykdomsfremkallende patogener er det mulig å utvikle antigen som aktiverer immunforsvaret til fisken mot spesifikke patogener. For å aktivere immunforsvaret må antigenet administreres sammen med en adjuvans. Konvensjonelle vaksiner med oljeadjuvans gir ofte ikke fullstendig beskyttelse, særlig mot virus, noe som PD-sonen på vestlandet er et eksempel på. Det er et stort behov for nye vaksineadjuvanter som kan gi økt sykdomsbeskyttelse mot et mangfold av patogener, både intracellulære og ekstracellulære.

Forsøk med PLGA-baserte vaksiner har gitt lovende resultater innen humanmedisin med aktivering av både humoral og cellulær del av det adaptive immunforsvaret (Moore, McGuirk et al., 1995; Shen, Ackerman et al., 2006; Hamdy, Elamanchili et al., 2007). PLGA/PLG-partikler forskes på som en mulig erstatning for flere vaksineringer med konvensjonell vaksine (Johansen *et al.*, 2000). Innen fiskeoppdrett ville en vaksine som kunne gi en primærvaksinering samt en boost-vaksinering, uten ekstra handtering, gitt økt dyrevelferd ved muligheter for forbedret sykdomsbeskyttelse.

4.1 Utslippsstudie

Målet med studiet var å studere utslippskinetikken de forskjellige formuleringene ga under temperaturforutsetninger som er sammenlignbare med miljøet til atlantisk laks. Mikro- og nanopartikler (ingen blandingsformuleringer) ble inkubert ved 8 °C i PBS med 0.02 % natriumazid (NaAz) over 120 dager.

Studier av utslippskinetikk har vist at PLGA/PLA-partikler har en utslippsprofil med tre faser; primæruslipp "burst" hvor overflate- og poreassosiert antigen slippes ut, forsinkelsesfase uten utslipp og et sekundært utslipp ved hydrolyse av polymeret til monomerer (Faisant *et al.*, 2002). Tidligere forsøk har vist at det er en positiv korrelasjon mellom temperatur og utslippshastigheter fra PLGA- og PLA-partikler, men ved temperaturer fra 20 til 50 °C (Aso *et al.*, 1994). Tidligere studier av

utslippskinetikken til PLGA- og PLA-partikler har hovedsakelig vært gjennomført innen humanmedisin ved 37 °C (Alonso *et al.*, 1993; Yang *et al.*, 2000; Panyam *et al.*, 2003; Mittal, Sahana *et al.*, 2007) og det foreligger generelt lite informasjon om egenskapene til PLGA- og PLA-partikler ved lavere temperaturer. Det har blitt gjennomført noen forsøk med PLGA/PLA-partikler på fisk (O'Donnell *et al.*, 1996; Lavelle *et al.*, 1997; Tian *et al.*, 2008; Behera *et al.*, 2010; Tian og Yu, 2011), men hovedsakelig som vaksinebærere for oral vaksinerings.

Dersom volumet på en kule økes minker arealet til volum ratioen proporsjonalt. Partikkelstørrelsen har i forsøkt blitt vist å ha betydning for utslippskinetikken, da mindre og flere partikler gir større areal, selv om dosen som administreres er den samme (Yushu og Venkatraman, 2006). Mittal og medarbeidere (2007) viste eksperimentelt *in vivo* at økt polymermolekylvekt ga tregere nedbrytingen av polymer og dermed et saktere utslipp av inkapsulert østrogen. Forsøket viste også en korrelasjon mellom mengde melkesyre i polymer mot nedbryting, hvor høy andel melkesyre i polymeret ga saktere utslipp av østrogen.

Skillet mellom nanopartikler og mikropartikler var svært tydelig i utslippsstudiet med tanke på kumulativ utslipp etter 120 dager, da samtlige mikropartikkelformuleringer viste høyere utslipp av HGG enn nanopartikkelformuleringer.

Ved utslipp av inkapsulert HGG er det forventet at et polymer med høy molekylvekt og høy andel av melkesyre gi tregere utslipp sammenlignet med et polymer som inneholder en lavere andel melkesyre og lavere molekylvekt. Under utslippsstudiet gjennomført i denne oppgaven ga PLA LMv (24-47 kDa) høyere kumulativt utslipp sammenlignet med PLGA 50 LMv (5-15 kDa). Resultatene i oppgaven motstrider tidligere studier av faktorer som påvirker utslippskinetikken, hvilket tyder på at det kan være andre faktorer som spiller inn. Degraderingshastigheten av PLGA- og PLA-partikler har i større grad vist seg å være avhengig av mengden PVA assosiert med partiklene enn selve størrelsen i andre studier (Panyam, Dali *et al.*, 2003). I denne oppgaven ble ikke mengden PVA assosiert med partiklene målt og det er derfor ikke mulig å kunne si noe med sikkerhet om denne faktoren spilte inn på utslippshastigheten, selv om det er svært trolig. Undersøkelser av overflatemorfologien har i studier vist at partikler med stor andel porer gir høyere "burst" effekt og frigir innholdet raskere enn partikler uten porer (Yushu og Venkatraman, 2006). Dersom PLA LMV hadde høy andel med porestrukturer på overflaten vil dette kunne være med på å forklare den raske nedbrytingen.

Som tidligere nevnt har det vært gjennomført mange utslippsforsøk ved 37 °C, mens studiet av PLGA/PLA-partikler mhp utslippskinetikk i denne oppgaven ble gjennomført ved 8 °C. For å kunne sammenligne relevansen av tidligere studier burde det blitt gjennomført to parallelle studier ved 8 og 37 °C. En temperaturforskjell på 29 °C kan være av stor betydning for utslippet av HGG. Som Aso og medarbeidere (1994) viste, var det en korrelasjon mellom temperatur og nedbrytningshastigheten fra 37 til 50 °C.

Mikropartikler ble observert å generelt ha raskere utslipp av HGG til tross for lavere overflateareal. Samtlige partikler ga utslipp av HGG i to faser ved 8 °C med et raskt utslipp fra dag 0 til 4 og et mer langsomt, men mer stabilt utslipp fra dag 15 til avslutningen av studiet ved dag 120. Det ble ikke observert noen sammenheng mellom polymervekt og forholdet melke:glykolsyre mht til utslipp fra partiklene.

4.2 Opptak av nanopartikler i TO-celler

Hensikten med studiet var å studere effekten av polymervekt og forholdet melke:glykolsyre på opptak i TO-celler. TO-celler er en makrofagliknende cellelinje isolert fra hodenyre på atlantisk laks (Wergeland og Jakobsen, 2001).

Forsøk på opptak av PLGA/PLA-partikler i TO-celler har ikke tidligere blitt publisert og det er generelt gjennomført lite forskning på PLGA/PLA som vaksinebærere til fisk, spesielt som i.p vaksine. Et studie utført på HUVEC-celler viste at det var en sammenheng mellom dose og opptak (Davda og Labhasetwar, 2002). I dette studiet ble det ikke vist noen sammenheng mellom dose og opptak, da det ikke var noen signifikant forskjell på opptak innad i polymergruppene mhp dose. Dosene på 200, 400 og 800 µg/ml viste alle tilnærmede like verdier hvilket tyder på en metning i opptak. Ved lavere doser er det mulig at det er mulig å finne en proporsjonalitet mellom dose og opptak.

Tidligere opptaksstudier av PLGA partikler, da i andre cellelinjer enn TO-celler, har vist variasjoner mhp opptak og optimal partikkelstørrelse (Lutsiak *et al.*, 2002; Prior *et al.*, 2002; Hirota *et al.*, 2007). Partiklene som ble brukt i dette studiet var <1000 nm med varierende forhold mellom melke:glykolsyre. PLGA 50 HMv ga høyest opptak etterfulgt av PLGA 75 HMv. Forsøk har vist at det er en sammenheng mellom molekylvekt og nedbrytningstid (Mittal, Sahana *et al.*, 2007), men det har ikke vært fokusert på opptak i cellelinjer i forhold til molekylvekt. Derimot har forsøk vist at zeta-potensialet (elektrokinetisk potensiale) i partiklene påvirker opptaket i makrofager (Kwon *et al.*, 2005) noe som er en sannsynlig forklaring på forskjellen mellom PLGA 75 HMv og PLA LMv da de har

samme størrelse. Melke:Glykol syre forholdet var ikke av betydning i dette studiet da PLGA 50 LMv viste tilsvarende lav opptak som PLA LMv.

TO-celler har egenskaper som en også finner hos makrofager fra hodenyre i atlantisk laks som er et viktig immunologisk organ med hensyn på antigenprosessering (Zaccone, Meseguer *et al.*, 2009). Ved sammenligning mellom opptak i TO-celler og opptak i nyre på depotstudiet er det en korrelasjon i trendene. PLGA 50 HMV nano viser høyest opptak i opptaksstudiet og i nyre på depotsstudiet etterfulgt av PLGA 75 HMV nano.

4.3 Immuniseringsstudiet

De humorale responsene etter vaksinerings/immunisering av atlantisk laks er svært heterogene. Forsøksfisk er ofte genetisk beslektet i form av de er avkom av samme foreldre, men variasjonene i responsene etter immunisering er likevel ofte betydelig. Av den grunn vil resultatene som diskuteres fra immuniseringsstudiet baseres på trender mellom gruppene og ikke på diskrete verdier.

Prøvene som ble tatt i uke 4 og 6 viste lav spesifikk immunrespons mot HGG i samtlige formuleringer, noe som var forventet da det kan ta 4-6 uker å iverksette antistoffrespons hos laks selv ved optimale temperaturer (Ellis, 2001). Prøvetakningene som fulgte fram til avslutning av studiet viste at partikkelformuleringene generelt ga maksimal antistoffrespons mot HGG i uke 8 og 10 som gradvis avtok mot uke 12 og 16. Derimot, 12 og 16 uker etter immunisering hadde grupper som ble injisert med FCA-formuleringer fortsatt svært høy og mer robust/vedvarende antigenrespons sammenlignet med partikkelformuleringene. Studier på rotter med PLGA-mikropartikler som vaksinebærer har vist en topp i antistoffrespons mot antigen etter 8 uker (O'Hagan *et al.*, 1991; Katare *et al.*, 2005). En av de mest markante forskjellen mellom studier av PLGA/PLA på rotter og dette forsøket er temperaturforskjellen på ca 29 °C, som spiller en viktig rolle for metabolismen. Åtte uker etter immunisering vil forskjellen mellom fisk og rotter vært 1624 døgngader, ved 2072 og 448 døgngader for hhv rotte og fisk. Denne temperaturforskjellen mellom endoterm og poikiloterm kan at antistoffer ble utviklet tiddliger i forsøket til O'Hagan og medarbeidere (1991) og Katare og medarbeidere (2005).

Partikkelformuleringer induserer MHC klasse I presentasjon ved at partikkelen slipper ut i lysosomet og videre over lysosom-membranen som gjennom en kaskade aktiverer MHC klasse I presentasjon i makrofager (Schliehe *et al.*, 2011). I tillegg til MHC klasse I presentasjon av antigen induseres T_H1-sporet som igjen aktiverer makrofager (Newman *et al.*, 1998). En av grunnene til at partikkelformuleringene viste en dårligere spesifikk antistoffrespons mot HGG kan være at formuleringene i større grad aktiverer T_H1-sporet og dermed dirigerer T_H1/ T_H2 balansen i retning

cellulært forsvar (T_H1). Dette kan begrense produksjonen av B-celler og dermed antistoffresponser som vist i forsøk med rotter (Vordermeier *et al.*, 1995). I oppgaven ble ikke transkripsjonsfaktorer forbundet med T_H1 respons undersøkt, men økt T_H1 respons kan være en av årsakene til manglende antistoffrespons. Denne oppgaven var ikke designet for å besvare denne problemstillingen.

Det ble observert en høy antistoffrespons i uke 8 og 10 som sank mot uke 12 og 16. Studiet viste ingen synergistisk effekt i grupper injisert med både nano- og mikropartikkelformuleringer av samme polymer. Forsøk gjort på rotter av Katare og medarbeidere (2005) viste høyest immunrespons mot partikler med gjennomsnittlig størrelse rundt 2 μm og lavere respons mot partikler $<2 \mu\text{m}$ og 10-70 μm . Det har ikke blitt gjort tilsvarende forsøk på fisk for å finne den optimale størrelsen på partikler ved injeksjon. Immunresponsen mot HGG etter injisering med blandingsformuleringer er tilnærmet medianen av formuleringen gitt hver for seg, hvilket er naturlig da mengden NP injisert ble halvert.

Det var ikke noen signifikant forskjell i temporal antistoffrespons til tross for forskjellig molekylvekt, størrelse og melke:glykolsyre forhold som beskrevet i andre artikler (O'Hagan, Singh *et al.*, 1998).

Det ble ikke observert noen forskjell i immunrespons med hensyn på polymerens melkesyre:glykolsyre forholdet i likhet med opptaksstudiet. Disse funnene tilsier at det er en eller flere andre faktorer og egenskaper ved partiklene som spiller inn på deres evne til å fremkalle antistoffresponser. Faktorer som kan nevnes er (1) partiklenes sammensetning (PVA assosiert med partikkelen (Panyam, Dali *et al.*, 2003), poredannelse (Yushu og Venkatraman, 2006) eller zeta-potensiale (Ravi Kumar, Bakowsky *et al.*, 2004)) og (2) partiklenes evne til å interagere med immunceller (forsterke immunresponsen) (Katare, Muthukumaran *et al.*, 2005).

4.4 Dose/respons-studiet

In vitro forsøk har vist at inkapsulert antigen leveres mer effektivt til antigen-prosessering og presentasjon sammenliknet med antigen administrert i løsning (O'Hagan, Singh *et al.*, 1998). Dette gjør at man kan oppnå samme immunrespons ved å bruke mindre antigen. Hensikten med vårt forsøk var å teste denne hypotesen mht adaptive (humorale) responser i atlantisk laks. Fisk ble derfor immunisert med doser på 10, 25, 50, 100 og 400 μg antigen/injeksjon med påfølgende analyse av blodplasma etter 8 uker. Resultatene viste at trendene var den samme på alle formuleringene, uavhengig av om antigen ble administrert i løsning, i en olje-adjuvans eller i PLA-partikler, med økt antistoffrespons ved økt dose. Ingen av formuleringene viste en metning mhp humoral immunrespons ved doser på fra 50 til 400 μg dose. Ved doser lavere enn 50 μg ga PLA LMV nano, PLA LMV mikro, PBS/HGG/ β -glukan og FCA lavere eller tilsvarende respons som PBS (negativ kontroll) og det ble ikke

funnet indikasjoner på at PLA partikler er en mer effektiv vaksinebærer/adjuvans mht antistoffrespons sammenliknet med FCA eller antigen injisert med PBS. Derimot, den oljebaserte vaksinen (FCA) viste like god antistoffrespons sammenliknet med partikkelformuleringen hvilket viser potensialet PLGA/PLA-partikler har som vaksinebærere i atlantisk laks. Studiet tyder på at det var en sammenheng mellom dose og spesifikk antistoffrespons mot HGG i PLGA/PLA partikler, hvilket har tidligere blitt vist innen humanmedisin på rotter med antigen fra *Mycobacterium tuberculosis* (Vordermeier, Coombes *et al.*, 1995).

4.5 Depotsstudiet

En viktig egenskap med adjuvaner er deres evne til å forlenge tilstedeværelse av antigen og beskytte mot degradering. Depoteffekten bidrar dermed til en forlenget eksponering av antigenet til immunceller. I dette forsøket ble depotstudiet gjennomført for å identifisere egenskaper hos partiklene (polymerens molekylvekt, partiklenes størrelse og melkesyre:glykolsyre forhold) som favoriserer antigendepot.

Med hensyn på depoteffekt i helfisk var det fire formuleringer som utmerket seg med god depoteffekt fra dag 7 til 36; positiv kontroll (FCA), PLGA 50 HMv mikro, PLGA 50 HMv nano og PLGA 75 HMv nano.

FCA og PLGA 50 HMv mikro hadde tilnærmet lik mengde antigen i helfisk ved sammenligning av dag 7 og 36. Med hensyn på biodistribusjon av antigen viste begge formuleringene en retensjon av antigen hovedsaklig i organpakke og noe mindre oppsamling i muskel. Antigennivå i FCA- og PLGA 50 HMv mikro injisert fisk var lavere i nyre sammenliknet med PLGA 50 HMv nano som viste høyest nivå av antigen i nyre både ved dag 7 og 36. Nanopartikler har vist å gi god retensjon i biodistribusjonsstudier i perifere organer fra injeksjonsstedet i mus (Saxena *et al.*, 2006), men det forligger ingen studier gjort på distribusjon av PLGA/PLA i fisk. Generelt kan mindre partikler lettere passere over biologiske membraner og i større grad bli tatt opp av celler, mens partikler over 10 μm kan gi depoteffekt på injeksjonsstedet (Horisawa *et al.*, 2002). Det var en tydelig sammenheng mellom opptak i nyre og studiet gjort på opptak i TO-celler i denne oppgaven, noe som kan indikere at disse partiklene blir tatt opp av makrofager og dermed akkumulere i nyren *in vivo*.

I dette forsøket har vi vist hvordan de ulike formuleringene bidrar til ulik depot/biodistribusjon basert på størrelse og polymer. Resultatene fra antistoffresponsen kan ikke knyttes til depotstudiet, dvs det er tilsynelatende ingen sammenheng mellom antistoffnivå og evnen vaksineformuleringene har til å forårsake depot, da de store forskjellene i depot ikke reflekteres i antistoffresponsene. I det videre

arbeidet kan det være interessant undersøke hvilken betydning akkumulering av antigen i nyren kan ha for cellulære responser, f.eks på et mRNA-transkripsjonsnivå ved bruk av Q-PCR.

4.6 Konklusjon

Mengden antigen ble *in vitro* friggitt raskere fra mikropartikler sammenlignet med nanopartikler over en periode på 120 dager, med høyest kumulativt utslipp av HGG fra PLA LMv mikropartikler. Det ble ikke observert noen sammenheng mellom melke:glykolsyre forholdet under utslippsstudiet i forsøk gjennomført i denne oppgaven.

TO- celler viste en metning i opptak av nanopartikler ved doser på 200 µg partikler ml⁻¹. Det ble ikke observert en korrelasjon mellom opptak av nanopartikler i TO-celler og molekylvekt av polymeren. Høyest opptak av nanopartikkelformulering i TO-celler ble observert for gruppen administrert PLGA 50 HMv.

Depoteffekten ved bruk av PLGA 50 HMv mikropartikler ble observert å være tilsvarende eller bedre enn oljebasert adjuvans. PLGA 50 HMv mikro ga best depoteffekt sammenlignet med nanopartikler, men PLGA 50 HMv nano- og PLGA 75 HMv nanoformulering ga høyere opptak av antigen til nyre. PLGA 50 HMv nano- og PLGA 75 HMv nanoformulering viste også tilsvarende høye opptak i TO-celler.

Korrelasjon mellom administrert dose PLGA/PLA-partikler og spesifikk antistoffrespons mot HGG ble observert etter prøvetaking 8 uker etter injisering.

Som postulert i artikkelen til (Behera, Nanda *et al.*, 2010) viste PLGA gode resultater ved vaksinerings av den tropiske arten *Labeo rohita*. Forsøkene gjennomført i denne oppgaven tyder på at det også er svært gode muligheter for å utvikle en vaksine med bruk av PLGA/PLA-partikler til bruk på atlantisk laks, men det er behov for ytterligere studier for å videreutvikle PLGA/PLA-partikler som vaksinekonsept. PVA assosiert med PLGA/PLA-partikler, overflatetopografi og zetapotensiale bør i videre studier undersøkes for å finne sammenheng med effekt på humoral og cellulær immunrespons i fisk.

5. Referanser

- Abbas, A. K. og A. H. Lichtman (2009). Basic Immunology - Functions and Disorders of the Immune System. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Abbott. (2011). "Lupron Depot 7,5 mg." Retrieved 04.05, 2001, from <http://www.rxabbott.com/pdf/lupron4month30mg.pdf>.
- Agius, C., M. T. Horne og P. D. Ward (1983). "Immunization of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson, against vibriosis: comparison of an extract antigen with whole cell bacterins by oral and intraperitoneal routes." Journal of Fish Diseases **6**(2): 129-134.
- Alonso, M. J., S. Cohen, T. G. Park, R. K. Gupta, G. R. Siber og R. Langer (1993). "Determinants of Release Rate of Tetanus Vaccine from Polyester Microspheres." Pharmaceutical Research **10**(7): 945-953.
- Aso, Y., S. Yoshioka, A. Li Wan Po og T. Terao (1994). "Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(D,L-lactide) microspheres." Journal of Controlled Release **31**(1): 33-39.
- AstraZeneca (2010). Pakkningsvedlegg [Felleskatalogen.no](http://www.felleskatalogen.no). A. U. Ltd. Macclesfield, Cheshire, England., AstraZeneca.
- Athanasίου, K. A., G. G. Niederauer og C. M. Agrawal (1996). "Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers." Biomaterials **17**(2): 93-102.
- Behera, T., P. K. Nanda, C. Mohanty, D. Mohapatra, P. Swain, B. K. Das, P. Routray, B. K. Mishra og S. K. Sahoo (2010). "Parenteral immunization of fish, *Labeo rohita* with Poly D, L-lactide-co-glycolic acid (PLGA) encapsulated antigen microparticles promotes innate and adaptive immune responses." Fish & Shellfish Immunology **28**(2): 320-325.
- Biology, D. o. (2004). Dictionary of Biology. Oxford, Oxford university press.
- Bioteknologinemnda. (2010). "Anbefaling vedrørende regulering av DNA-vaksinerte dyr." from http://www.bion.no/filarkiv/2010/07/2010_06_03_brev_til_DN_anbefalinger_vedroer_ende_regulering_av_DNA-vaksinerte_dyr.pdf.
- Davda, J. og V. Labhasetwar (2002). "Characterization of nanoparticle uptake by endothelial cells." International Journal of Pharmaceutics **233**(1-2): 51-59.

- Faisant, N., J. Siepmann og J. P. Benoit (2002). "PLGA-based microparticles: elucidation of mechanisms and a new, simple mathematical model quantifying drug release." European Journal of Pharmaceutical Sciences **15**(4): 355-366.
- Folkehelseinstituttet. (2009). "Smittevern boka." Retrieved 28.04, 2011, from http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_6039&MainArea_5661=6039:0:15,4492:1:0:0:::0:0&MainLeft_6039=6041:68717::1:6043:1:::0:0.
- Guy, B. (2007). "The perfect mix: recent progress in adjuvant research." Nature Reviews Microbiology **5**(7): 505-517.
- Hamdy, S., P. Elamanchili, A. Alshamsan, O. Molavi, T. Satou og J. Samuel (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.
- Havforskningsinstituttet (2006). Dyrevelferdsmessige konsekvenser av vaksinasjon av fisk - effekter og bivirkninger. A. Berg, Ø. Bergh, P. G. Fjelldal, J. E. Juell and A. Nerland.
- Hertz, Y., A. Tchelet, Z. Madar og A. Gertler (1991). "Absorption of Bioactive Human Growth-Hormone after Oral-Administration in the Common Carp (Cyprinus-Carpio) and Its Enhancement by Deoxycholate." Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology **161**(2): 159-163.
- Hirota, K., T. Hasegawa, H. Hinata, F. Ito, H. Inagawa, C. Kochi, G. I. Soma, K. Makino og H. Terada (2007). "Optimum conditions for efficient phagocytosis of rifampicin-loaded PLGA microspheres by alveolar macrophages." Journal of Controlled Release **119**(1): 69-76.
- Intervet (2008). Pakkningsvedlegg Norvax Vibriose-Marine vet. http://europharma.no/fiskehelse/datablad/vaksine/Norvax_Vibriose-Marin.pdf.
- Intervet. Boxmeer, Nedreland, Intervet.
- Janeway, C. A. og R. Medzhitov (2002). "Innate immune recognition." Annual Review of Immunology **20**: 197-216.
- Johansen, G. og M. Lindal (2006). Laksefeber, Orkana.
- Johansen, P., Y. Men, H. P. Merkle og B. Gander (2000). "Revisiting PLA/PLGA microspheres: an analysis of their potential in parenteral vaccination." European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics **50**(1): 129-146.

- Johnson, K. A. og D. F. Amend (1983). "Efficacy of *Vibrio anguillarum* and *Yersinia ruckeri* bacterins applied by oral and anal intubation of salmonids." Journal of Fish Diseases **6**(5): 473-476.
- Katare, Y. K., T. Muthukumaran og A. K. Panda (2005). "Influence of particle size, antigen load, dose and additional adjuvant on the immune response from antigen loaded PLA microparticles." International Journal of Pharmaceutics **301**(1-2): 149-160.
- Kryvi, H. og G. K. Totland (1997). Fiskeanatomi. Kristiansand, Høyskoleforlaget.
- Kwon, Y. J., S. M. Standley, S. L. Goh og J. M. J. Fréchet (2005). "Enhanced antigen presentation and immunostimulation of dendritic cells using acid-degradable cationic nanoparticles." Journal of Controlled Release **105**(3): 199-212.
- Lavelle, E. C., P. G. Jenkins og J. E. Harris (1997). "Oral immunization of rainbow trout with antigen microencapsulated in poly(-lactide-co-glycolide) microparticles." Vaccine **15**(10): 1070-1078.
- Liu, M. A. (2003). "DNA vaccines: a review." Journal of Internal Medicine **253**(4): 402-410.
- Lutsiak, M. E. C., D. R. Robinson, C. Coester, G. S. Kwon og J. Samuel (2002). "Analysis of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) nanosphere uptake by human dendritic cells and macrophages in vitro." Pharmaceutical Research **19**(10): 1480-1487.
- Madigan, M. og J. Martinko (2006). Brock Biology of Microorganisms. San Francisco, Pearson.
- Markwell, M. A. K. og C. F. Fox (1978). "Surface-Specific Iodination of Membrane Proteins of Viruses and Eukaryotic Cells Using 1,3,4,6-Tetrachloro-3-Alpha,6-Alpha-Diphenylglycoluril." Biochemistry **17**(22): 4807-4817.
- Midtlyng, P. J. (1996). "A field study on intraperitoneal vaccination of Atlantic salmon (*Salmo salar*L.) against furunculosis." Fish & Shellfish Immunology **6**(8): 553-565.
- Midtlyng, P. J. og A. Lillehaug (1998). "Growth of Atlantic salmon *Salmo salar* after intraperitoneal administration of vaccines containing adjuvants." Diseases of Aquatic Organisms **32**.
- Mittal, G., D. K. Sahana, V. Bhardwaj og M. N. V. Ravi Kumar (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., P. McGuirk, S. Adams, W. C. Jones, J. Paul McGee, D. T. O'Hagan og K. H. G. Mills

- (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.
- Moore, L. J., J. M. Dijkstra, E. O. Koppang og I. Hordvik (2009). "CD4 homologues in Atlantic salmon." Fish & Shellfish Immunology **26**(1): 10-18.
- Moore, L. J., T. Somamoto, K. K. Lie, J. M. Dijkstra og I. Hordvik (2005). "Characterisation of salmon and trout CD8 alpha and CD8 beta." Molecular Immunology **42**(10): 1225-1234.
- Nakamura, O., M. Kobayashi, Y. Suzuki, K. Aida og I. Hanyu (1990). "Transport of Orally-Administered Rabbit IgG into Blood-Circulation of Goldfish." Nippon Suisan Gakkaishi **56**(11): 1749-1753.
- Newman, K. D., J. Samuel og G. Kwon (1998). "Ovalbumin peptide encapsulated in Poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) microspheres is capable of inducing a T helper type 1 immune response." Journal of Controlled Release **54**(1): 49-59.
- NORM/NORM-VET (2008). Usage of Antimicrobial Agents and Occurrence of Antimicrobial Resistance in Norway. NORM/NORM-VET. Tromsø/Oslo.
- O'Donnell, G. B., P. Reilly, G. A. Davidson og A. E. Ellis (1996). "The uptake of human gamma globulin incorporated into poly (D,L-lactide-co-glycolide) microparticles following oral intubation in Atlantic salmon, *Salmo salar* L." Fish & Shellfish Immunology **6**(7): 507-520.
- O'Hagan, D. T., D. Rahman, J. P. Mcgee, H. Jeffery, M. C. Davies, P. Williams, S. S. Davis og S. J. Challacombe (1991). "Biodegradable Microparticles as Controlled Release Antigen Delivery Systems." Immunology **73**(2): 239-242.
- O'Hagan, D. T., M. Singh og R. K. Gupta (1998). "Poly(lactide-co-glycolide) microparticles for the development of single-dose controlled-release vaccines." Advanced Drug Delivery Reviews **32**(3): 225-246.
- Panyam, J., M. A. Dali, S. K. Sahoo, W. X. Ma, S. S. Chakravarthi, G. L. Amidon, R. J. Levy og V. Labhasetwar (2003). "Polymer degradation and in vitro release of a model protein from poly(D,L-lactide-co-glycolide) nano- and microparticles." Journal of Controlled Release **92**(1-2): 173-187.
- Pharmaq (2008a). Pakkningsvedlegg Alpha Jekt Micro 6 injeksjonsvæske, emulsjon. Vaksine

- til atlantisk laks (*Salmo salar*). www.pharmaq.no. Pharmaq. Skøyen, Pharmaq. Pharmaq (2008b). Pakkningsvedlegg Alpha Marine Vibject injeksjonsvæske, emulsjon til torsk (*Gadus morhua*). www.pharmaq.no. Pharmaq. Skøyen, Pharmaq.
- Poppe, T. T. (1999). Fiskehelse og fiskesykdommer. Oslo, Universitetsforlaget.
- Press, C. M. og Ø. Evensen (1999). "The morphology of the immune system in teleost fishes." Fish & Shellfish Immunology **9**(4): 309-318.
- Press, C. M. og A. Lillehaug (1995). "Vaccination in European salmonid aquaculture: A review of practices and prospects." British Veterinary Journal **151**(1): 45-69.
- Prior, S., B. Gander, N. Blarer, H. P. Merkle, M. L. Subira, J. M. Irache og C. Gamazo (2002). "In vitro phagocytosis and monocyte-macrophage activation with poly(lactide) and poly(lactide-co-glycolide) microspheres." European Journal of Pharmaceutical Sciences **15**(2): 197-207.
- Ravi Kumar, M. N. V., U. Bakowsky og C. M. Lehr (2004). "Preparation and characterization of cationic PLGA nanospheres as DNA carriers." Biomaterials **25**(10): 1771-1777.
- Restifo, N. P., H. Ying, L. Hwang og W. W. Leitner (2000). "The promise of nucleic acid vaccines." Gene Therapy **7**(2): 89-92.
- Sambrook, J., F. Figueroa og S. Beck (2005). "A genome-wide survey of Major Histocompatibility Complex (MHC) genes and their paralogues in zebrafish." BMC Genomics **6**(1): 152.
- Schijns, V. E. J. C. (2000). "Immunological concepts of vaccine adjuvant activity - Commentary." Current Opinion in Immunology **12**(4): 456-463.
- Schliehe, C., C. Schliehe, M. Thiry, U. I. Tromsdorf, J. Hentschel, H. Weller og M. Groettrup (2011). "Microencapsulation of inorganic nanocrystals into PLGA microsphere vaccines enables their intracellular localization in dendritic cells by electron and fluorescence microscopy." Journal of Controlled Release **In Press, Corrected Proof**.
- Shen, H., A. L. Ackerman, V. Cody, A. Giodini, E. R. Hinson, P. Cresswell, R. L. Edelson, W. M. Saltzman og D. J. Hanlon (2006). "Enhanced and prolonged cross-presentation following endosomal escape of exogenous antigens encapsulated in biodegradable nanoparticles." Immunology **117**(1): 78-88.
- Sørnum, U. og B. Damsgård (2004). "Effects of anaesthetisation and vaccination on feed intake and growth in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)." Aquaculture **232**(1-4): 333-341.

- Tian, J., X. Sun, X. Chen, J. Yu, L. Qu og L. Wang (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*)."
International Immunopharmacology **8**(6): 900-908.
- Tian, J. og J. Yu (2011). "Poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles as candidate DNA vaccine carrier for oral immunization of Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) against lymphocystis disease virus." Fish & Shellfish Immunology **30**(1): 109-117.
- Vandenberg, G. W. (2004). "Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality?"
Animal Health Research Reviews(5): 301-304.
- Veterinærinstituttet (2011). Helsesituasjonen hos laksefisk 2010.
- Vical. (2011). "Apex[®]-IHN." Retrieved 26.04, 2011, from
<http://www.vical.com/products/infectious-disease-vaccines/Apex-IHN/default.aspx>.
- Vordermeier, H. M., A. G. A. Coombes, P. Jenkins, J. P. McGee, D. T. O'Hagan, S. S. Davis og M. Singh (1995). "Synthetic delivery system for tuberculosis vaccines: immunological evaluation of the M. tuberculosis 38 kDa protein entrapped in biodegradable PLG microparticles." Vaccine **13**(16): 1576-1582.
- Wergeland, H. I. og R. A. Jakobsen (2001). "A salmonid cell line (TO) for production of infectious salmon anaemia virus (ISAV)." Diseases of Aquatic Organisms **44**(3): 183-190.
- Yang, Y. Y., T. S. Chung, X. L. Bai og W. K. Chan (2000). "Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method." Chemical Engineering Science **55**(12): 2223-2236.
- Yushu, H. og S. Venkatraman (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.
- Zaccone, G., J. Meseguer, A. García-Ayala og B. G. Kapoor (2009). Fish Defenses.