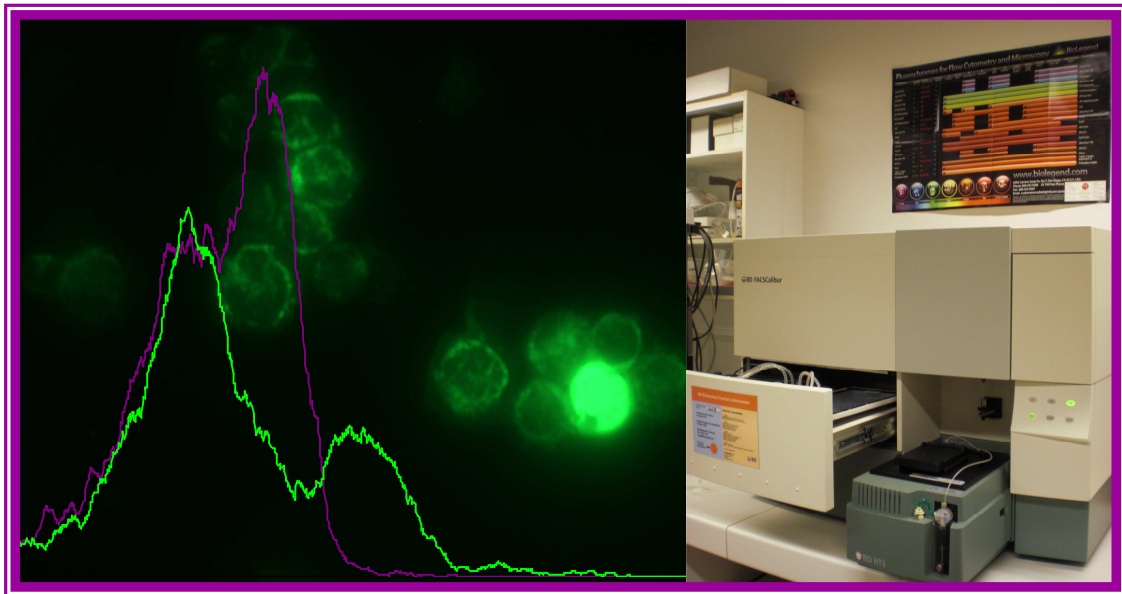


Respiratory burst assay for leukocytes fra Atlantisk laks
(*Salmo salar* L.) og Atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.)



Av

Cathrine A. K. Kalgraff

Master i Fiskehelse



Institutt for biologi
Universitetet i Bergen

2009

Forside: Til høyre: FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson). Til venstre: Grafer fra flow cytometrianalyser av DHR-tilsatte stimulerte (grønn) og ustimulerte (lilla) torsk leukocytter lagt på bakgrunn av fluorescensmikroskopi av RHO-positive lakseleukocytter.

Førord

Denne masteroppgaven i fiskehelse ble utført ved Fiskeimmunologigruppen, Institutt for Biologi ved Universitetet i Bergen. Oppgaven er knyttet til to NFR prosjekter: ”Studies of salmon phagocytic cells – key cells in cellular immune responses. Transcriptional analyses and functional characterization”, og ”Francisella infection in Atlantic cod – A study of pathogen and host immune cell interaction”.

En ekstra stor takk går til mine to veiledere, Dr. Eirin Fausa Pettersen og professor Heidrun I. Wergeland, for uvurderlig hjelp og støtte i løpet av utformingen av masteroppgaven min. Dere gjorde det siste året av mastergradutdannelsen min utfordrende, spennende, og ikke minst lærerik!

En stor takk rettes også til Paul Løvik og Gyri Haugland for praktisk rettleiding, tips og hjelp på laben.

I tillegg vil jeg takke mine medstudenter, Anette Furevik, Ellen S. Berg og Siri F. Ørstavik, for hyggelig samarbeid, og mer eller mindre relevante samtaler og morsomme påfunn på laben, kontoret og ellers i hverdagen. Dere gjorde studenttilværelsen min munter og minnerik!

I løpet av min tid som student ved Universitetet i Bergen har jeg møtt mange hyggelige og inspirerende personer. Tusen takk for at dere alle har vært med på å gjøre studietiden interessant og innholdsrik!

Til slutt vil jeg takke familie og venner for forståelse, oppmuntring, og god hjelp og støtte gjennom studietiden. Tusen takk for etterlengtede og kjekke avkoblinger fra mine ellers så intense og travle dager som student i Bergen!

Bergen, juni 2009

Cathrine A. K. Kalgraff

Sammendrag

Fagocytose er en viktig funksjon i det uspesifikke immunforsvaret hos fisk, og medvirker til at leukocytter kan drepe infiserende patogener. Leukocytters evne til å ta opp, drepe og bryte ned fagocytterte patogener, er blant annet basert på oksygenavhengig og oksygenuavhengig produksjon av ulike toksiske stoffer. Den oksygenavhengige produksjonen av de toksiske reaktive oksygenstoffene (ROS) og reaktive nitrogenstoffene (RNS), medfører en økning i leukocyttenes oksygenopptak, og benevnes som respiratory burst.

Hensikten med denne oppgaven var å utvikle et respiratory burst assay for leukocytter fra Atlantisk laks (*Salmo salar* L.) og Atlantisk torsk (*Gadus morhua* L.) for å undersøke respiratory burst aktiviteten til isolerte leukocytter fra blod (PBL) og hodenyre (HKL). I denne oppgaven ble det arbeidet med å optimalisere stimulering av respiratory burst aktivitet i leukocytter fra laks og torsk med phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), for deretter å tilsette dihydrorhodamine (DHR). DHR oksideres til fluorescerende rhodamine (RHO) ved respiratory burst aktivitet i leukocytterne. RHO-fluorescensen til de respiratory burst aktiverte leukocytterne ble målt ved flow cytometri.

Det utviklede assayet påviste respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk, skilte godt mellom aktive og inaktive celler, og gav reproducerbare resultater. Resultatene viste at respiratory burst aktiviteten til stimulerte leukocytter varierte noe mellom individer, og også mellom PBL og HKL. Forsøksoppsettet av respiratory burst assay tilpasset lakseleukocytter måtte endres noe ved optimalisering av oppsettet for torsk. Forskjellen på andel respiratory burst aktiverte leukocytter mellom laks og torsk var liten, men leukocytterne viste noe ulik grad av RHO-fluorescensintensitet.

Respiratory burst assayet ble også testet ut på leukocytter fra laks og torsk inkubert med bakterien *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*, som forårsaker sykdommen francisellose hos torsk. Resultatene gav indikasjoner på at bakterien delvis hemmet respiratory burst aktiviteten hos PMA-stimulerte leukocytter fra torsk, mens respiratory burst aktiviteten i PMA-stimulerte leukocytter fra laks ble ekstra aktivert.

Innholdsfortegnelse

1. Introduksjon	1
1.1. Immunologi i norsk fiskeoppdrett	1
1.2. Fiskens immunsystem	1
1.3. Fagocytose	4
1.4. Respiratory burst og oksidativ nedbrytning av fagocyttert materiale	6
1.4.1. Dannelsen av reaktive oksygenstoffer (ROS)	6
1.4.2. Dannelsen av reaktive nitrogenstoffer (RNS)	11
1.5. Stimulering av respiratory burst aktivitet hos fagocyttske celler	13
1.5.1. In vivo stimulering av fagocytter	13
1.5.2. In vitro stimulering av fagocytter	13
1.5.2.1. PMA (Phorbol ester, Phorbol 12-myristate 13-acetate)	14
1.5.2.2. POLY I:C (Poly inosinic:cytidylic acid)	15
1.5.2.3. LPS (Lipopolysakkarid)	16
1.6. Stimulering av leukocytter med bakterien <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	16
1.6.1. <i>Francisella</i> sp.	16
1.6.2. <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	17
1.7. Merking av leukocytter med respiratory burst aktivitet	18
1.7.1. DHR (Dihydrorhodamine 123)	18
1.7.2. PI (Propidium iodide)	20
1.8. Hemming av respiratory burst med DPI (Diphenyleneiodonium chloride)	21
1.9. Flow cytometrianalyse av respiratory burst aktivitet	21
1.10. Formål med oppgaven	23
2. Material og metode	24
2.1. Fisk	24
2.1.1. Atlantisk laks (<i>Salmo salar</i> L.)	24
2.1.2. Torsk (<i>Gadus morhua</i> L.)	24
2.2. Isolering av leukocytter fra laks og torsk	24
2.3. Telling av celler	25
2.4. Cytospinpreparat av leukocytter og farging med Diff-Quick	26
2.5. Flow cytometri	26
2.6. Flow cytometrianalyser av respiratory burst hos leukocytter fra laks og torsk ---	27
2.6.1. Respiratory burst assay på leukocytter fra laks	27
2.6.1.1. Forarbeid	27
2.6.1.2. Utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst assay	28
2.6.1.3. Endelig forsøksoppsett for respiratory burst assay på leukocytter fra laks	31
2.6.1.4. Kontrollforsøk	32

2.6.2. Respiratory burst assay på leukocytter fra torsk -----	36
2.6.2.1. Forarbeid-----	36
2.6.2.2. Utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst assay-----	36
2.6.2.3. Endelig forsøksoppsett for respiratory burst assay på leukocytter fra torsk-----	39
2.6.2.2. Kontrollforsøk -----	40
2.7. Fluorescensmikroskopi av respiratory burst stimulerte leukocytter fra laks og torsk merket med DHR-----	43
2.8. Stimulering av leukocytter fra laks og torsk med bakterien <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> -----	43
2.8.1. Dyrking av bakterien <i>Francisella philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> -----	43
2.8.2 Respiratory burst assay på leukocytter fra blod og hodenyre fra laks og torsk etter <i>in vitro</i> stimulering med <i>F. philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> -----	44
3. Resultater-----	46
3.1. Isolering av leukocytter fra laks og torsk -----	46
3.2. Telling av celler -----	46
3.3. Cytospinpreparater og farging med Diff-Quick -----	49
3.4. Flow cytometrianalyser av respiratory burst hos laks -----	50
3.4.1. Utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst assay på lakseleukocytter ----	50
3.4.2. Optimalisering av endelig forsøksoppsett for respiratory burst assay på lakseleukocytter-----	59
3.4.3. Kontrollprøver-----	63
3.5 Flow cytometrianalyser av respiratory burst hos torsk -----	69
3.5.1. Utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst assay på torskeleukocytter----	69
3.5.2. Optimalisering av endelig forsøksoppsett for respiratory burst assay på torskeleukocytter -----	78
3.5.3. Kontrollforsøk -----	81
3.6. Fluorescensmikroskopi av leukocytter fra laks og torsk tilsatt DHR-----	88
3.6.1. Lakseleukocytter -----	88
3.6.2. Torskeleukocytter-----	89
3.7. Analyse av respiratory burst aktivitet hos PBL og HKL fra laks og torsk inkubert med <i>F. philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> -----	91
3.7.1. Lakseleukocytter -----	91
3.7.2. Torskeleukocytter-----	93
4. Diskusjon -----	96
4.1. Respiratory burst assay for lakseleukocytter -----	96
4.2. Respiratory burst assay for torskeleukocytter-----	99
4.3. Kontrollforsøk i utarbeidingen av respiratory burst assay for leukocytter fra laks og torsk-----	101
4.4. Sammenligning av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk -----	103
4.5. Karakterisering av RHO-positive leukocytter -----	105

4.6. Hvor går grensen mellom RHO-negative og RHO-positive leukocytter?	107
4.7. Respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk inkubert med <i>F. philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	108
4.8. Konklusjon og fremtidsperspektiver	110
5. Referanser	112
6. Appendix	123
6.1. Oppskrifter til respiratory burst assay	123
6.1.1. Løsninger til isolering av leukocytter fra laks	123
6.1.2. Løsninger til isolering av leukocytter fra torsk	123
6.1.3. Løsninger til forsøk med leukocytter fra laks og torsk	124
6.1.4. Stimulanter til forsøk med leukocytter fra laks og torsk	125
6.1.5. Hemming av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk	126
6.1.6. Reagensløsninger av DHR og PI til forsøk med leukocytter fra laks og torsk	127
6.2. Oppskrifter ved bakterieinkubering av leukocytter fra laks og torsk	127
6.2.1. Dyrking av bakterien <i>F. philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i>	127
6.2.2. Eksempel på konsentrasjonsutregning ved justering av OD-verdi til bakterien <i>F. philomiragia</i> subsp. <i>noatunensis</i> ved formelen $X_1 \times Y_1 = X_2 \times Y_2$	128
6.3. Instrumentinnstillinger i flow cytometeret	129
6.3.1. Flow cytometrianalyser av lakseleukocytter	129
6.3.2. Flow cytometrianalyser av torskeleukocytter	129

1. Introduksjon

1.1. Immunologi i norsk fiskeoppdrett

Produksjonen av oppdrettslaks (*Salmo salar* L.) i Norge har de siste årene hatt en markant vekst fra rundt 440 000 tonn i år 2000, til rundt 740 000 tonn i år 2008 (Kjønhaug *et al.*, 2009; Statistisk sentralbyrå, 2009), og produksjonstallene er stadig stigende. I tillegg har interessen for nye fiskearter i oppdrett vokst, deriblant torsk (*Gadus morhua* L.). Andre arter har også blitt, eller er i ferd med å bli, prøvd ut som potensielle nye arter i oppdrett. En utfordring ved oppdrett av alle disse fiskeartene er sykdom. For å begrense økonomiske tap og opprettholde en etisk tolererbar tilstand til fisk i oppdrett, er fiskehelsen en viktig nøkkel til å kunne drive en bærekraftig og fremtidsrettet produksjon.

Kunnskap om fiskens immunsystem er viktig i bekjempelsen av sykdom. I løpet av de siste 20 årene er det ved hjelp av vaksinasjon blitt vanlig å manipulere frem immunitet mot visse patogener innen oppdrett. Vaksinasjon er trolig det viktigste enkelttiltaket for å forhindre sykdom.

I utvikling av vaksiner ligger det bak en mengde forskningsarbeid på funksjonene til immunsystemet hos de ulike fiskeartene. Flere studier har vist at immunsystemet hos fisk deler en rekke likheter med immunsystemet hos høyere vertebrater, deriblant pattedyr (Du Pasquier, 2001), men det gjenstår ennå mye forskning for å kunne klarlegge og skape full forståelse for de ulike immuncellene, de kjemiske stoffene og funksjonene som inngår i fiskens ulike immunreaksjoner.

1.2. Fiskens immunsystem

Fiskens immunsystem kan i likhet med høyere vertebraters immunsystem deles inn i det medfødte uspesifikke, og det tilegnede spesifikke immunsystemet. Det uspesifikke immunsystemet hos fisk er velutviklet i forhold til høyerestående vertebrater, og består av fysiske, kjemiske og cellulære komponenter som kan aktiveres raskt (Magnadottir, 2006; Whyte, 2007). Det spesifikke immunsystemet er derimot noe mindre utviklet hos fisk sammenlignet med høyere vertebrater, men innehar like fullt kjemiske og cellulære komponenter som bidrar til selektiv gjenkjennelse av patogener (Plouffe *et al.*, 2005). Forskjellen mellom betydningen av det uspesifikke og det spesifikke immunforsvaret ved

infeksjoner hos fisk, kan blant annet forklares av det evolusjonære spranget mellom fisk og pattedyr. Den poikiloterme fysiologien hos fisk bidrar også til at antistoffrepertoaret, cellemodningen og hukommelsen til cellene i det spesifikke immunsystemet er begrenset, i tillegg til at lymfocyttoproliferasjon går seint. Det uspesifikke immunsystemet hos fisk reagerer umiddelbart ved infeksjon, mens det spesifikke immunsystemet bruker opptil 12 uker før det er aktivert (Magnadóttir, 2006). Hos teleoster er det også vist at komplementsystemet, i motsetning til hos pattedyr, er aktivt også ved lave temperaturer (Boshra *et al.*, 2006; Whyte, 2007).

De cellulære komponentene både i det uspesifikke og spesifikke immunsystemet har egenskaper til å gjenkjenne patogener, fremmede substanser og fysiologisk endrede celler, og skille dem fra kroppens egne friske celler ("self-nonselv recognition"). De myeloide celletypene hos fisk består av monocytter i blod som modnes ved aktivering til makrofager i vev, ulike typer granulocytter (eosinofile, basofile og nøytrofile), trombocytter, erytrocytter, NCC ("nonspecific cytotoxic cells") (Secombes, 1996; Zapata *et al.*, 1996; Li *et al.*, 2007), og muligens dendrittiske celler (Lovy *et al.*, 2006; Lovy *et al.*, 2008).

Mengden av de ulike granulocytiske celletypene varierer mellom fiskeartene, men hos torsk og laks er flesteparten granulocytter polymorfonukleære nøytrofile. Eosinofile og basofile granulocytter kan være fraværende, eller til stede i et svært lavt antall (Rønneseth *et al.*, 2006). Nøytrofile granulocytter finnes oftest i blod og hematopoietiske organer, og er de første immuncellene til å migrere ut i infisert eller skadet vev (Segal, 2005). Hos laks utgjør de nøytrofile granulocytene cirka 36 % av immuncellene i blod (Pettersen *et al.*, 2000), mens i blod hos torsk er rundt 84 % av leukocytene nøytrofile granulocytter (Rønneseth *et al.*, 2007). I hodenyre hos laks utgjør de nøytrofile granulocytene 78 % (Rønneseth *et al.*, 2006), mens hos torsk er prosentandel nøytrofile granulocytter i hodenyre rundt 48 % (Rønneseth *et al.*, 2007).

Lite er kjent om de dendrittiske cellene, og det er blant annet usikkert om de er av myeloid eller lymfoid opprinnelse, eller begge deler. De dendrittiske cellene er kjent fra pattedyr å være blant de profesjonelle fagocytene, men funksjonen til de dendrittiske cellene hos fisk er fremdeles uklar (Pettersen *et al.*, 2008). NCC hos fisk er trolig en mer primitiv utgave av NK-cellene ("natural killer cells") en finner i immunsystemet hos pattedyr (Yoder, 2004). Det er vist i flere studier at NCC øker aktiviteten ved tilstedeværelse av spesifikke antigener fra bakterier, kreftceller, parasitter og soppceller (Ellis, 2001; Cuesta *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2008; Connor *et al.*, 2009).

Flere av leukocytene er antigenpresenterende celler (APC) som har evne til å presentere antigen for lymfocytter i det spesifikke immunforsvaret. Denne presentasjonen muliggjøres ved at antigen fra prosesserte patogener presenteres på celleoverflaten etter fagocytose, i sammenheng med MHC ("major histocompatibility complex") klasse I på målceller, eller MHC klasse II på APC. MHC-antigenkomplekset presenteres for lymfocytter i det spesifikke immunforsvaret, som kan reagere og stå for videre produksjon av antistoff og påfølgende immunitet (Watts and Amigorena, 2001; Kindt *et al.*, 2007a). I følge Cuesta *et al.* (2006), har monocytter/makrofager, melanomakrofager, T- og B-lymfocytter, epitelceller og dendritiske celler blitt foreslått som antigenpresenterende celler hos fisk, og samtidig ble nøytrofile granulocytter utpekt som mulige APC.

Funksjonene til de lymfoide celletypene hos fisk er lite kjent. Ved hjelp av ulike cellemarkører, monoklonale antistoff (MAbs), har B-lymfocytter blitt påvist fra flere fiskearter (Alvarez-Pellitero, 2008). B-lymfocytter blir produsert og modnes i hodenyren, som hos fisk trolig er homolog med pattedyrs beinmarg, hvor mestedelen av hematopoiesen skjer. I tillegg til å være et primært lymfoid organ, er hodenyren og resten av nyren, også et sekundært lymfoid organ, der presentasjon av patogen for leukocytene skjer (Fletcher and Secombes, 2001). Thymus er også klassifisert som et primært lymfoid organ, hvor T-lymfocytter blir produsert. Lite er kjent om T-lymfocytter fra fisk, men gener som koder for T-celle reseptor (TCR) er funnet, og i noen fiskearter er CD-markører som er kjent fra T-lymfocytter i pattedyr (CD3, CD4 og CD8 α) påvist. Dette tyder på at T-celler utgjør en cellulær komponent i immunsystemet også hos fisk (Cuesta *et al.*, 2006; Alvarez-Pellitero, 2008).

Det uspesifikke immunsystemet bruker PRRs ("pattern recognition receptors") til gjenkjenning av fremmede substanser, eller PAMPs ("pathogen-associated molecular patterns"), som er konserverte strukturer på ulike klasser mikroorganismer. De kjente Toll-like reseptorene (TLR) fra pattedyr utgjør også en stor gruppe PRRs hos fisk (Pasare and Medzhitov, 2004; Magnadottir, 2006; Alvarez-Pellitero, 2008; Connor *et al.*, 2009).

Immunreaksjoner ved gjenkjenning av patogener inkluderer komponenter av både det uspesifikke og det spesifikke immunforsvaret, og komponentene er gjensidig avhengige av hverandres funksjoner. En viktig funksjon i immunforsvaret er fagocytose (Aderem, 2003).

1.3. Fagocytose

I en immunreaksjon spiller fagocytterende celler en sentral rolle, og de fleste celler har til en viss grad fagocytterende evner. Hovedforskjellen mellom profesjonelle fagocytter og de ikke-profesjonelle fagocytterne, er at de profesjonelle fagocytterne har spesialiserte reseptorer. Disse reseptorene medfører et større repertoar av målpartikler, og en effektivisering av fagocytosereaksjonen (Aderem and Underhill, 1999; Esteban and Meseguer, 2006; Li *et al.*, 2007). Eksempler på slike reseptorer er PRRs, som gjenkjenner ulike endogene og eksogene ligander (PAMPs) hos pattedyr (Purcell *et al.*, 2006). Hos fisk utgjøres PRRs muligens av ulike toll-like reseptorer (Stafford and Belosevic, 2003), C-type lectin reseptorer (CLR) og mannose-reseptorer (Alvarez-Pellitero, 2008). Fra pattedyr er ulike toll-like reseptorer kjent, som blant annet TLR2 (gjenkjenner peptidoglycan på overflaten av G-positive bakterier), TLR4 (gjenkjenner LPS (lipopolysakkarid) i celleveggen til Gram-negative bakterier) og TLR6 (gjenkjenner zymosan i celleveggen til soppceller) (Beutler, 2004). Andre typer reseptorer på profesjonelle fagocytter er Fc-reseptorer, TNF α - og IL-reseptorer (proinflammatoriske cytokin-reseptorer), komplementreseptorer og MHC klasse I og II reseptorer som presenteres for, og aktiverer T-lymfocytter (Alvarez-Pellitero, 2008).

Hos fisk utgjør monocytter, makrofager og nøytrofile granulocytter de profesjonelle fagocytiske cellene i det uspesifikke immunforsvaret. I tillegg publiserte Li *et al.* (2007) resultater fra forsøk som viste at B-lymfocytter fra fisk også hadde effektive fagocytterende evner. Det er vanligvis makrofager som har den største evnen til å fagocyttere partikler, mens nøytrofile granulocytter er observert å være de første immuncellene på et infeksjonssted. De aktiverte nøytrofile granulocytterne, samt de infiserende partiklene, vil produsere kjemotaktiske stoffer som tiltrekker monocytter/makrofager og flere nøytrofile granulocytter til infeksjonsstedet (Matsuyama *et al.*, 1999; Neumann *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2007).

Fagocytose er en primitiv forsvarsmekanisme i alle flercellede organismer hvor patogenet blir tatt opp i cellen, drept og brutt ned. Deretter blir komponenter fra patogener (antigener) presentert på overflaten av de fagocytterende cellene. Ved en slik reaksjon frigis også flere kjemiske stoffer, blant annet cytokiner og chemokiner, som er med på å viderefordre immunreaksjonen mellom de ulike immuncellene (Magor and Magor, 2001). Opsonisering av antigener eller målceller ved hjelp av IgM (Immunoglobulin M) produsert av B-lymfocytter, eller produkt fra komplementsystemet, gjør at fagocytter enklere kan ta opp og bryte ned målpartikkelen. Opsoniner fungerer ved at de både bindes til antigenet og fagocytten. Fagocytterne har Fc-reseptorer som kan binde antistoff i Fc-regionen, som igjen er

bundet til antigen i Fab-regionen. Fagocytose kan også skje uten opsonisering ved at PRRs på fagocytten gjenkjenner PAMPs på patogener (Magnadottir *et al.*, 2005;Kindt *et al.*, 2007a;Kindt *et al.*, 2007b).

Fagocytose er en form for endocytose der store partikler, for eksempel cellerester, mikroorganismer, hele celler eller celleaggregater, og apoptotiske eller abnormale celler, blir tatt opp i endocytiske vesikler i fagocytiske celler (Neumann *et al.*, 2001). En fagocytosereaksjon kan deles inn i 3 faser; binding av partikkel til fagocytmembranen (1), opptak av partikkelen i et fagosom (2), og nedbrytning av partikkelen i fagosomet (3). Ved fagocytose av et patogen må fagocytten først gjenkjenne patogenet. Dette kan skje ved opsonisering, eller ved at PRRs på fagocytmembranen gjenkjenner PAMPs på patogenet. Etter gjenkjenning og binding av patogenet (1), vil fagocytmembranen ta opp patogenet i et fagosom ved at membranen danner pseudopodier som omkranser partikkelen. Når pseudopodiene har smeltet sammen rundt partikkelen er det dannet et fagosom i cytoplasma til fagocytten (2) (Secombes, 1996;Aderem, 2003). Denne fagosomdannelsen er avhengig av tilgang til cytoskjelettproteiner, særlig actin. Tiden det tar før patogenet blir tatt opp avhenger mellom annet av temperatur, inkuberingstid og antall patogener i forhold til fagocytter. Etter dannelse av fagosom skjer det en sammensmelting av granuler eller lysosomer, som inneholder nedbrytende stoffer, og fagosomet. De nedbrytende stoffene i lysosomene er enzymer som proteaser, nukleaser, fosfataser, esteraser og lipaser, og antimikrobielle peptider. Når fagosom og lysosom smelter sammen, frigis enzymene og de antimikrobielle peptidene i fagolysosomet, og dette fører til drap og nedbrytning av det fagocytterte patogenet (3). Tiden det tar før dannelse av det resulterende fagolysosomet avhenger av karakteristika til den fagocytterte partikkelen (Secombes, 1996). Det er vist at nøytrofile granulocytter fra pattedyr dreper og bryter ned partikler 30 til 60 minutter etter fagocytose (McCaffrey and Allen, 2006).

I tillegg til de nedbrytende enzymene og de antimikrobielle peptidene, har fagocytene også evner til å produsere reaktive stoffer ved hjelp av et enzymkompleks, NADPH oksidase, i fagolysosomets plasmamembran. Disse reaktive stoffene slippes ut i fagolysosomets cytosol, og bidrar til å drepe og bryte ned fagocytterte partikler. I denne reaksjonen øker fagocytens oksygenopptak, gjerne med over femti ganger, og benevnes derfor som ”respiratory burst”. Oksygenet som forbrukes i disse reaksjonene har ingenting med energidannelse å gjøre, men går inn i produksjon av antimikrobielle produkter der oksygenet blir redusert (Babior, 1984;Neumann *et al.*, 2001).

I fagocytter hos fisk kan patogendrap og nedbrytning av fagocyttert materiale utføres på to ulike måter; oksygenavhengig eller oksygenuavhengig. Etter drap og nedbrytning blir

det fagolysosomale innholdet i fagocytten frigjort ved eksocytose, der partiklene blir ført ut av cellen. Dannelsen av reaktive oksygenstoffer (ROS) og reaktive nitrogenstoffer (RNS) under respiratory burst er en oksygenavhengig drapsmekanisme, der de resulterende antimikrobielle stoffene inneholder oksygen. Fagocyttenes oksygenavhengige drapsmekanismer hos fisk er lite kjent, men fagocytter fra fisk innehar et stort antall enzymer og peptider som har baktericid virkning ved lysosomal sammensmelting med et fagosom. Eksempel på slike enzymer i lysosomer i fagocytter hos fisk er hydrolytiske enzymer som hydrolaser, kationiske proteiner som endrer cytoplasmatiske membraner, lysozym som bryter ned peptidoglykan og lactoferrin som binder jern og forhindrer vekst av bakterier. I tillegg finnes det flere fordøyelsesenzymmer i lysosomene med ulike antimikrobielle evner, som for eksempel nedbrytning av proteiner, RNA, fosfatholdige stoffer, lipider og karbohydrater. Disse antimikrobielle enzymene kan også sekreseres ved dreping av ekstracellulære patogener (Secombes, 1996;Grønstøl, 2004;Esteban and Meseguer, 2006).

1.4. Respiratory burst og oksidativ nedbrytning av fagocyttert materiale

Baldrige og Gerard (1933) publiserte for første gang resultater fra forsøk som viste at fagocytose hang sammen med en økning i oksygenopptaket til fagocytterende celler. Iyer *et al.*(1961) utførte studier som viste en sammenheng mellom økning av oksygenopptaket i fagocytterne, og dannelse av reaktive oksygenstoffer (ROS), og i 1964 ble enzymet NADPH oksidase (nicotinamide-adenine-dinucleotide-phosphate oxidase) funnet å være ansvarlig for dannelse av ROS (Rossi and Zatti, 1964). Senere ble også dannelsen av reaktive nitrogenstoffer (RNS) bevist å være en mekanisme som produserer oksiderende og antimikrobielle nitrogenholdige stoffer, både i sammenheng med og uten ROS. Mange studier har blitt gjort på respiratory burst hos pattedyr, og i de senere årene har studier som omhandler fagocytose og respiratory burst også blitt gjort på ulike fiskearter. Resultater viser at respiratory burst reaksjonen til fagocytter hos fisk likner respiratory burst reaksjonen til fagocytter hos pattedyr (Secombes, 1996;Neumann *et al.*, 2001).

1.4.1. Dannelsen av reaktive oksygenstoffer (ROS)

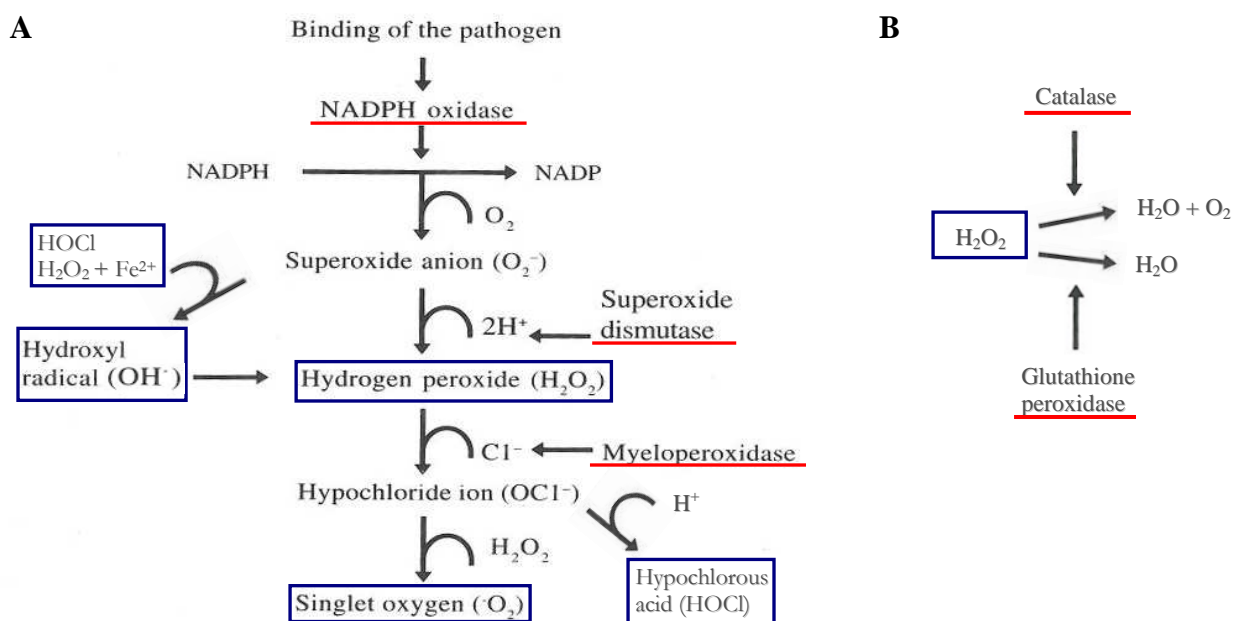
Ved respiratory burst blir oksygen tatt opp i fagocytten omdannet til antimikrobielle stoffer (ROS) ved hjelp av en serie enzymer. Nøytrofile granulocytter er potente produsenter

av ROS, og monocytter kan også danne store mengder reaktive oksygenstoffer, men mister gradvis denne evnen idet de modnes til makrofager (Neumann *et al.*, 2001). Andre celler enn fagocytter, som for eksempel fibroblaster, adipocytter, glatte muskelceller, epitelceller og osteoklaster, kan også produsere ROS. Disse cellene produserer mindre mengder ROS, trolig i sammenheng med mitokondriemembranene i cytoplasma. Det er også vist at ROS inngår i flere ulike biologiske funksjoner utenom fagocytose, og mye tyder på at produksjonen av ROS er svært signalavhengig (Chanock *et al.*, 1994; Lambeth, 2002; Robinson, 2008). ROS kan påvises både intra- og ekstracellulært i forsøk med pattedyr. Den intracellulære påvisningen av ROS skjer når plasmamembranen, hvor ROS produseres, inngår i dannelsen av et fagosom ved fagocytose. Den ekstracellulære påvisningen kan skje ved en ufullstendig fagocytose der fagosomene ikke smelter sammen og internaliseres fullstendig, slik at ROS slippes ut. I tillegg kan ROS dannes i cellemembranen og slippes ut ekstracellulært (Rinaldi *et al.*, 2007).

Det er beskrevet at en ROS-avhengig celledød hos nøytrofile granulocytter kan induseres ved respiratory burst for å frisette NETs ("neutrophil extracellular traps") ekstracellulært. NETs, som kan binde og drepe bakterier og sopp, blir frigitt når nøytrofile granulocytter dør i en celledød forskjellig fra apoptose (programmert celledød) og nekrose (Laskay *et al.*, 2008).

Figur 1 viser en oversikt over de kjemiske reaksjonene i respiratory burst. Det første steget i reaksjonen er reduksjon av oksygen (O_2) til superoksid anion (O_2^-) ved hjelp av enzymet NADPH oksidase. Dette enzymkomplekset finnes hos profesjonelle fagocytter, og pumper superoksid anion (O_2^-) inn i den fagocytiske vakuolen. I tillegg til å fungere som en generator av superoksid, blir det spekulert i om NADPH oksidase kan fungere som en aktivator for inaktive mikrobicide proteaser involvert i de oksygenavhengige patogen-drapsmekanismene (Segal, 2005; Segal, 2008; Cape and Hurst, 2009).

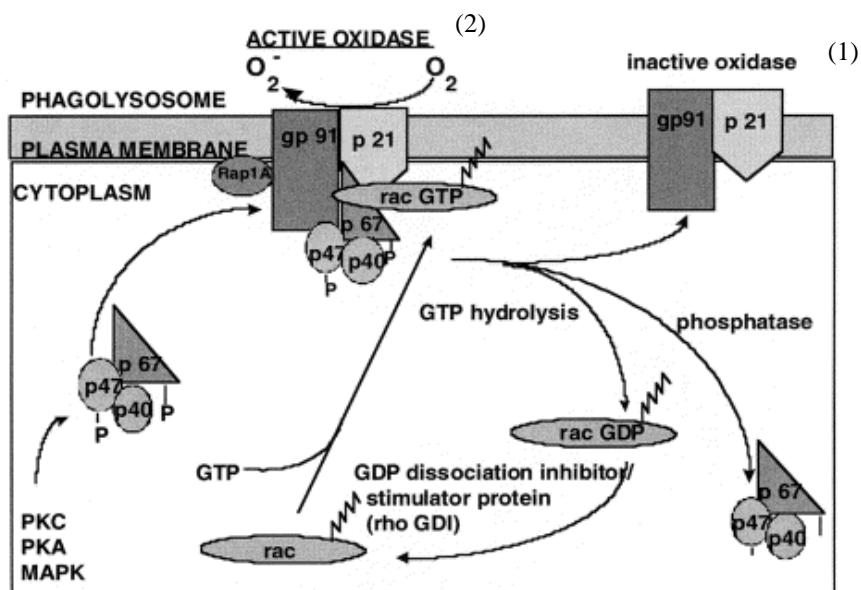
NADPH oksidase er plassert i fagosomets plasmamembran, og er satt sammen av flere proteinkomponenter. Bortsett fra cytokrom b-komponenten, som ligger konstant festet i plasmamembranen, ligger de andre enzymkomponentene fritt i cytosolet i ustimulerte fagocytter (Figur 2). Når fagocytten stimuleres, eksempelvis ved en infeksjon eller vevsskade, fosforyleres enzymkomponentene av proteinkinaser, og de forflyttes til cytokrom b-setet i plasmamembranen (Chanock *et al.*, 1994; Secombes, 1996; Neumann *et al.*, 2001; Cross and Segal, 2004; Esteban and Meseguer, 2006; Segal, 2008).



Figur 1: Oversikt over de kjemiske reaksjonene og de tilhørende enzymene ved danning av ROS fra oksygen. Involverte katalytiske enzymene er merket med rød strek, og antimikrobielle stoffer er merket med blå boks.

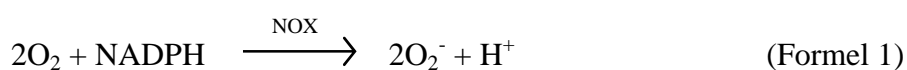
A: NADPH oksidase omdanner oksygenmolekyl til superoksidanion. O_2^- reagerer med to hydrogenkationer og blir omdannet til hydrogenperoksid (H_2O_2) ved hjelp av enzymet superoksid dismutase. Hydrogenperoksid kan videre reagere med klor og danne hypokloritt, eller hypoklorittsyre ($HOCl$), ved hjelp av enzymet myeloperoxidase. Hypokloritt (OCl^-) kan videre reagere med H_2O_2 og danne singletoksygen (1O_2), hydroksylradikal (OH^\cdot) og hydroksylanion (OH^-). Denne reaksjonen er katalysert av metallionene jern (Fe^{2+}) og kobber (Cu^{2+}) (Rosen *et al.*, 1995; Beutler, 2004).

B: Hydrogenperoksid (H_2O_2) omdannes til vann og oksygen i to ulike reaksjoner der enzymene glutation peroksidase og katalase fungerer som katalytter (Rosen *et al.*, 1995; Ortuño *et al.*, 2000). Modifisert figur fra Esteban og Meseguer (2006).

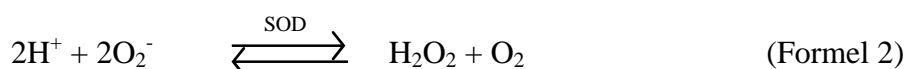


Figur 2: Plassering av bestanddelene til den inaktive (1) og aktive (2) utgaven av enzymet NADPH oksidase i fagocytiske celler fra pattedyr. Cytokrom b består av gp 91 og p 21, og er konstant festet i plasmamembranen til fagolysosomet. De andre cytosolkomponentene (p67, p47 og p40) blir fosforylert av protein kinaser (PKC (protein kinase C), PKA (protein kinase A) og MAPK (mitogen aktivert protein kinase)), og cytosolkomplekset flyttes til cellemembranen. Sammen med GTP-rac proteiner danner cytokrom b og cytosolkomplekset det aktive NADPH oksidase-enzymet (NOX). Aktiviteten til NOX reguleres av nivåer av GTP/GDP-binding og graden av fosforylerte cytosolkomponenter. Figur fra Neumann *et al.* (2001).

Når enzymet NADPH oksidase er samlet, blir det en katalysator i reduksjonsreaksjonen, der et elektron blir fjernet fra et oksygenmolekyl på bekostning av NADPH.

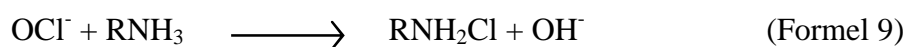
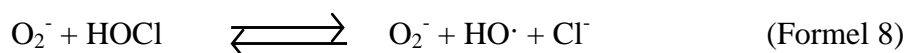
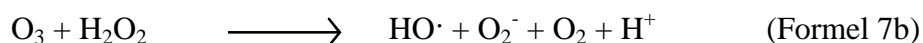
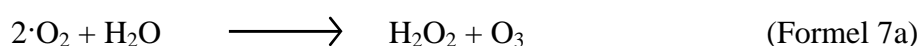
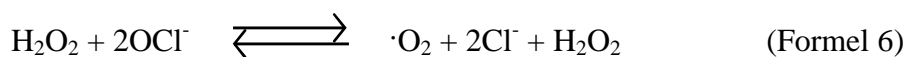
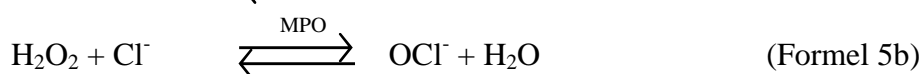
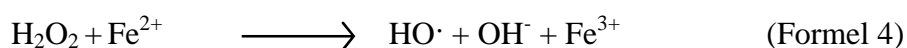
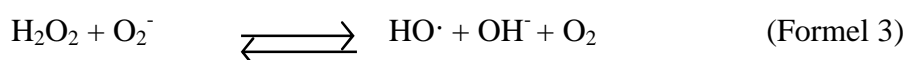


Superoksidanionene (O_2^-) som blir produsert (Formel 1) er ikke i seg selv antimikrobielle, men fungerer som substrat for videre produksjon av oksiderende hydrogenperoksid (H_2O_2) (formel 2), ved hjelp av enzymet superoksid dismutase (SOD) som katalysator (Beutler, 2004).



Hydrogenperoksid kan videre reagere på flere måter, og være substrat for produksjon av ulike stoffer (Formel 3, 4, 5a, 5b og 6). Blant annet kan hydrogenperoksid (H_2O_2) reagere med superoksidanion (O_2^-), og danne et hydroksylradikal ($\text{HO}\cdot$), et hydroksylanion (OH^-) og

et oksygenmolekyl (O_2) (Formel 3). Et hydroksylradikal ($HO\cdot$) og et hydroksylanion (OH^-), i tillegg til trivalent jernion (Fe^{3+}), dannes også når H_2O_2 reagerer med divalent jernion (Fe^{2+}) (Formel 4). I en reaksjon katalysert av enzymet myeloperoksidase (MPO) kan H_2O_2 også reagere med klor (Cl^-), og eventuelt hydrogen (H^+). Med hydrogen i reaksjonen blir det dannet hypoklorittsyre ($HOCl$) og vann (H_2O) (Formel 5a), og uten hydrogen blir det dannet hypokloritt (OCl^-) og vann (H_2O) (Formel 5b). H_2O_2 kan videre reagere med hypokloritt (OCl^-) og danne singletoksygen ($\cdot O_2$), klor (Cl^-) og hydrogenperoksid (H_2O_2) (Formel 6). $HOCl$ kan også reagere med superoksidanion, noe som resulterer i produksjon av blant annet hydroksylradikal ($HO\cdot$) (Formel 8). Hypokloritt (OCl^-) kan videre reagere med ammoniakk eller aminer (RNH_3), og danne kloramin (RNH_2Cl) og hydroksylanion (OH^-) (Formel 9) (Babior, 1984; Rosen *et al.*, 1995; Ortuño *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2001; Beutler, 2004; Klebanoff, 2005; Esteban and Meseguer, 2006; Robinson, 2008).



Stoffene produsert i respiratory burst reaksjonen har ulik grad av mikrobicidal og oksiderende virkning, blant annet ved nedbrytning av DNA og oksidasjon av lipider. Graden av toksisiteten til superoksid (O_2^-) er omdiskutert, men molekylet er svært ustabil og dismuterer hurtig til hydrogenperoksid (H_2O_2) spontant, eller katalysert av SOD (superoksid dismutase). H_2O_2 er et av de mest stabile produktene i respiratory burst reaksjonen (Mohanty *et al.*, 1997; Griendling and Harrison, 1999; Jones and Morice, 2000; Cross and Segal, 2004; Beutler, 2004; Pinhong *et al.*, 2007).

Hydrogenperoksid (H_2O_2) kan i seg selv drepe mikrober, men det kan også reagere videre og bidra til å danne flere stoffer, blant annet halider, med sterke mikrobicide evner. Disse reaksjonene er vist i formel 3 - 7 (Cross and Segal, 2004; Beutler, 2004). Hydrogenperoksid har også vist seg å kunne indusere apoptose i aktiverte fagocytter (Li *et al.*, 1997).

H_2O_2 kan også reagere med kloranion og danne OCl^- , som vist i formel 5b. Samtidig kan halidet HOCl , dannet i reaksjonen vist i formel 5a, videre også danne metabolitten OCl^- (hypokloritt), som er et sterkt mikrobicidalt stoff. Videre kan hypokloritt, sammen med H_2O_2 , danne singletoksygen ($\cdot\text{O}_2$) (Formel 6). Singletoksygen er svært reaktivt, og kan blant annet bryte dobbeltbindinger mellom karbonatomer (Babior, 1984; Beutler, 2004).

Det er også vist at singletoksygen ($2\cdot\text{O}_2$) kan reagere med vann (H_2O) og danne hydrogenperoksid (H_2O_2) og ozon (O_3) (Formel 7a). Hydrogenperoksid (H_2O_2) og ozon (O_3) kan videre reagere og blant annet danne hydroksylradikal ($\text{HO}\cdot$) og superoksidanion (O_2^-) (Formel 7b). Dannelsen av ozon og hydrogenperoksid vist i formel 7a er katalysert av antistoff.

HOCl kan også på egenhånd reagere med superoksidanion og danne hydroksylradikal (Formel 8). Hydroksylradikal som blir dannet under respiratory burst (Formel 3, 4, 7b og 8) er svært reaktivt, og har kraftig oksidasjonsevne (Rosen *et al.*, 1995; Beutler, 2004).

Som vist i formel 9 kan hypokloritt (HCl) danne kloraminer (RNH_2Cl) ved tilgang på ammoniakk eller aminer. Kloraminer har også mikrobicide oksidasjonsevner (Babior, 1984). I tillegg til å inngå i kloraminer, finnes nitrogen i RNS (reaktive nitrogenstoffer), som også er en del av de oksygenavhengige drapsmekanismene under respiratory burst.

1.4.2. Dannelsen av reaktive nitrogenstoffer (RNS)

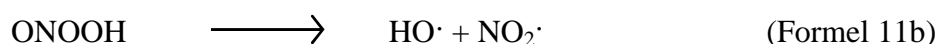
Respiratory burst har ingen klar rolle i produksjonen av nitrogenmonoksidradikal ($\text{NO}\cdot$), men superoksid som blir produsert under respiratory burst kan reagere med $\text{NO}\cdot$, og danne peroksynitritt (ONOO^-). I første steg av denne reaksjonen blir $\text{NO}\cdot$ dannet ved hjelp av "nitric oxide synthase" (NOS). Hos pattedyr har det blitt påvist flere isoformer av NOS, blant annet iNOS ("inducible NOS"), eNOS ("endothelial" NOS), nNOS ("neuronal NOS") og cNOS ("constitutive" NOS). Tilstedeværelse av NOS har blitt beskrevet fra flere fiskearter, blant annet niøye (*Lampetra planeri*), lungefisk (*Protopterus dolloi*), malle (*Ictalurus punctatus*), karpe (*Carassius carassius*) og Atlantisk laks (*S. salar*) (Campos-Perez *et al.*, 2000). Samtidig har mRNA som koder for iNOS blitt påvist hos gullfisk (*Carassius*

auratus), og gener som koder for iNOS ble funnet i gjelle- og hodenyrevev hos regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*). Alle NOS-isoformene, bortsett fra iNOS, fungerer trolig som katalysatorer i nitrogenmonoksiddannelse, i en reaksjon avhengig av Ca^{2+} og det kalsiumbindende proteinet calmodulin (CaM). I denne reaksjonen fungerer L-arginine ($\text{C}_6\text{H}_{14}\text{N}_4\text{O}_2$) som nitrogendonor, og det blir dannet $\text{NO}\cdot$. iNOS, som oftest er å finne i makrofager stimulert av cytokiner, danner $\text{NO}\cdot$ i en treigere reaksjon enn de andre NOS-isoformene (Laing *et al.*, 1996; Laing *et al.*, 1999; Campos-Perez *et al.*, 2000; Neumann *et al.*, 2001; Klebanoff, 2005; Palazzolo-Ballance *et al.*, 2007).

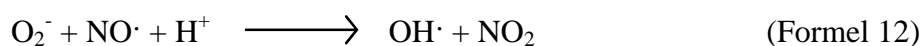
Videre kan superoksidanion fra respiratory burst reaksjonen reagere med nitrogenmonoksidradikal ($\text{NO}\cdot$), og det blir dannet peroksynitritt (ONOO^-), en reaksjon katalysert av NOS (Formel 10).



Peroksynitritt (ONOO^-) kan ved lav pH i fagolysosomet, videre bli protonisert av hydrogen (H^+), og danne peroksynitratsyre (ONOOH) (Formel 11a). Syren gjennomgår homolytisk kløyving, noe som resulterer i produktene hydroksylradikal ($\text{HO}\cdot$) og nitrogendioksid ($\text{NO}_2\cdot$) (Formel 11b) (Rosen *et al.*, 1995; Secombes, 1996; Beutler, 2004; Klebanoff, 2005).



Nitrogenmonoksid har vist cytotoxiske microbicide egenskaper, men virkningen er, på lik linje med H_2O_2 , avhengig av konsentrasjonen av stoffet. Det er vist for både H_2O_2 og $\text{NO}\cdot$ at de har bestemte cellulære mål, og at de fritt kan diffundere over cellemembranene. Peroksynitritt og hydroksylradikal dannet fra $\text{NO}\cdot$, og O_2^- eller H^+ , i reaksjonene vist i formel 10, 11a og 11b, har de kraftigste toksiske, mikrobicidale og parasiticide, egenskapene av RNS. Det kan også dannes hydroksylradikal ($\text{HO}\cdot$) og nitrogendioksid (NO_2) av O_2^- , $\text{NO}\cdot$ og H^+ , som i formel 12. Nitrogenmonoksid kan også inngå i dannelsen av andre kraftige toksiske stoffer som nitritt (NO_2^-), nitrogentrioksid (N_2O_3) og nitroniumion (NO_2^+). Nitritt kan blant annet reagere videre med hypoklorittsyre (HOCl), og danne nitrylklorid (NO_2Cl) og hydroksylanion OH^- (Formel 13). Nitrylklorid er i stand til å ødelegge strukturer til fenolringer (Rosen *et al.*, 1995; Secombes, 1996; Robinson, 2008; Cape and Hurst, 2009).



Fagocytene må stimuleres for igangsettelse av fagocytose, og for at det skal skje en påfølgende produksjon av ROS og RNS i respiratory burst reaksjonen. Denne stimuleringen kan komme fra flere hold, og inngå i omfattende interaksjoner mellom det spesifikke og uspesifikke immunsystemet. Funksjonene ved denne stimuleringen av fagocytter hos fisk er ennå ikke fullt ut kjent.

1.5. Stimulering av respiratory burst aktivitet hos fagocytiske celler

1.5.1. *In vivo* stimulering av fagocytter

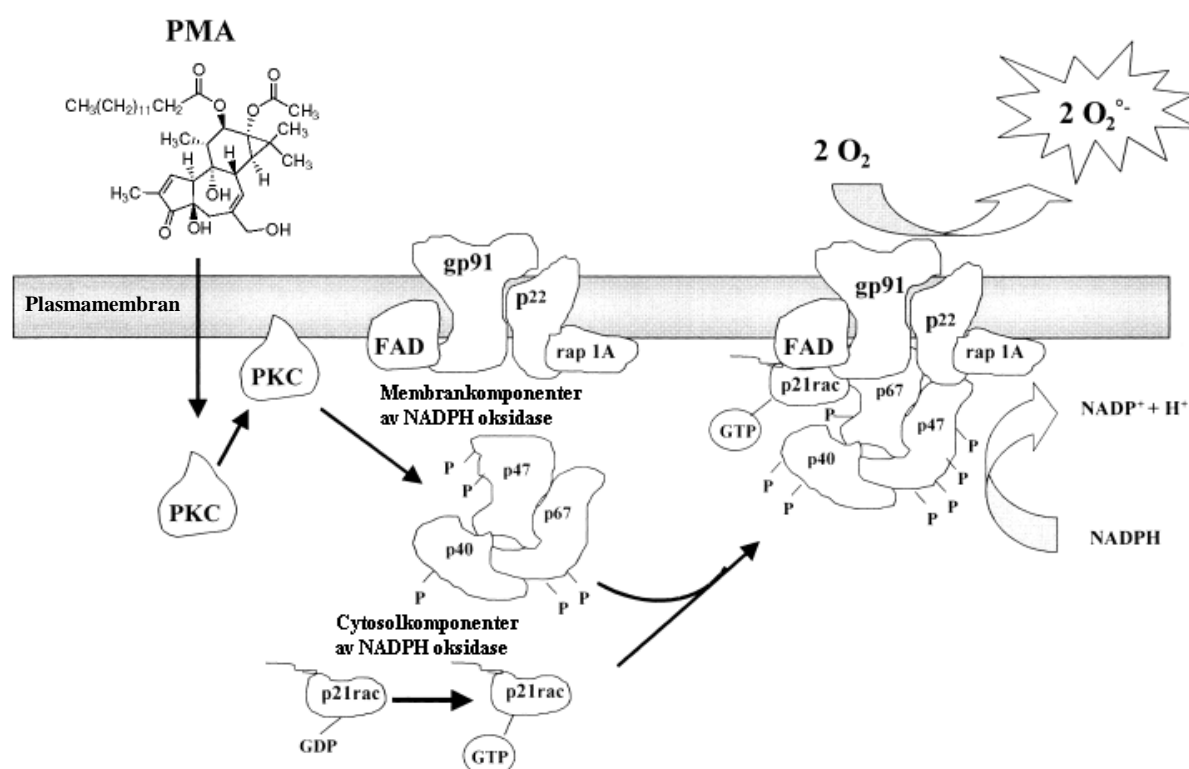
Fagocytter stimuleres *in vivo* ved hjelp av blant annet PRRs som reagerer med PAMPs, Fc-binding av et antistoff bundet til et antigen, og humorale stoffer som cytokiner (eksempelvis TNF α , IFN, og IL) og chemokiner, lysozyme, akutt-fase proteiner (for eksempel mannosebindende lektin), proteinkinaser, og komplementsystemet (Neumann *et al.*, 2001; Beutler, 2004; Magnadottir *et al.*, 2005; Magnadottir, 2006; Whyte, 2007; Alvarez-Pellitero, 2008). Av stoffene i komplementsystemet er det påvist to stoffer i karpe (*Cyprinus carpio*) (Kato *et al.*, 2004) og regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Rotllant *et al.*, 2004), som stimulerer respiratory burst; C3a anaphylatoxin og C5a anaphylatoxin (Boshra *et al.*, 2004). Det er blant annet vist at cytokinestimulerte nøytrofile granulocytter, og makrofager, danner mer ROS ved fagocytose av et patogen sammenlignet med naive, inaktive celler utsatt for samme patogen (Neumann *et al.*, 2001). I tillegg kan fagocytter aktiveres ved hjelp av naturlige antistoffer som identifiserer epitoper med tilnærmet lik struktur. Måcellene kan da blant annet være aldrende og apoptotiske celler, som blir tatt opp og brutt ned i fagocytterende celler (Whyte, 2007).

1.5.2. *In vitro* stimulering av fagocytter

Fagocytter kan stimuleres *in vitro* ved å tilsette ulike kjemiske stoffer som muligens fremkaller respiratory burst, med en påfølgende økt produksjon av ROS og RNS.

1.5.2.1. PMA (Phorbol ester, Phorbol 12-myristate 13-acetate)

PMA er en reseptoravhengig stimuleringsmetode brukt i mange studier av respiratory burst, både hos vertebrater og evertebrater. Denne reseptoravhengige stimuleringen aktiverer NADPH oksidase-enzymet over lang tid, så lenge det er en kontinuerlig kontakt mellom cellene og stimuli. Ved stimulering med PMA kan fosforyleringen av de ulike proteinkomponentene til NADPH oksidase være enten delvis eller komplett. Ved delvis fosforylering vil enkelte proteinkomponenter fosforyleres for så å bli defosforylert i en reversibel reaksjon. NADPH oksidase vil dermed ikke bli aktivert, og det vil ikke skje en økning i ROS produksjonen. I en komplett fosforylering, vist i figur 3, vil alle NADPH oksidase-enzymkomponentene fosforyleres og samles i plasmamembranen. Deretter vil produksjonen av ROS i fagocytene settes igang, i tillegg til at flere humorale stoffer, som IL-2, integrin og histamin, som forårsaker betennelsesreaksjoner hos andre leukocytter, blir frigjort (Chanock *et al.*, 1994; Eickhoff *et al.*, 2004). I studier nylig utført av Velard *et al.* (2009) viste resultater fra forsøk at utskillelsen av cytokiner og chemokiner økte hos PMA-stimulerte, polymorfonukleære leukocytter fra pattedyr.



Figur 3: Aktivering av NADPH oksidase-enzymet ved stimulering av fagocytter med PMA. Modifisert figur fra Morena *et al.* (2002).

I ulike studier utført med PMA-stimulering av fagocytter for å øke produksjonen av ROS, har forskjellige konsentrasjoner av PMA og inkuberingstider vært benyttet. Konsentrasjonen varierer fra 1 ng/ml til 10 µg/ml (Ortuño *et al.*, 2000; Moritomo *et al.*, 2003), og de fleste målinger er gjort innen 1 time inkubering med PMA. I tidligere forsøk med stimulering av leukocytter fra piggvar (*Psetta maxima*) (Castro *et al.*, 1999), japansk flyndre (*Paralichthys olivaceus*) (Cha *et al.*, 2008), havkaruss (*Sparus aurata*) (Mulero and Meseguer, 1998; Castro *et al.*, 1999; Esteban *et al.*, 2008), atlantisk laks (*Salmo salar*) (Egenberg, 2006), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) (Stafford *et al.*, 2001), torsk (*G. morhua*) (Steiro *et al.*, 1998) og gullfisk (*Carassius auratus*) (Katzenback and Belosevic, 2009), har konsentrasjoner på mellom 100 ng/ml og 1 µg/ml PMA vært brukt.

Eickhoff *et al.* (2004) viste at for høye konsentrasjoner av PMA kunne ha negativ virkning på fagocytoseaktiviteten hos leukocytter isolert fra hund.

1.5.2.2. POLY I:C (*Poly inosinic:cytidylic acid*)

POLY I:C er en syntetisk dsRNA polymer, og er kjent for å stimulere produksjonen av interferoner (INF) i primater og cellekulturer. På denne måten aktiverer POLY I:C den antivirale responsen til de ulike leukocytene (Eaton, 1990). Leukocytter isolert fra malle (*Ictalurus punctatus*), inkubert med enten dsRNA retrovirus eller POLY I:C, viste økt utskillelse av INF (Long *et al.*, 2004; Long *et al.*, 2006). INF viser stor variasjon i aminosyresammensetningen mellom ulike fiskearter, og viser likheter med både INF- α og INF- β fra type I INF kjent fra pattedyr. Sekvenshomologien mellom INF fra pattedyr og fisk er derimot lav. INF- γ har blitt klonet fra flere fiskearter, inkludert atlantisk laks (*S. salar*) og atlantisk torsk (*G. morhua*) (Furnes *et al.*, 2009). INF- γ tilhører type II INF hos pattedyr, og spiller trolig en rolle i immunresponsen mot bakterier og virus. NK-celler og T-lymfocytter produserer INF- γ som respons på MHC-presenterte antigener, og IL-12 og IL-18 produsert av APC. I tillegg er det vist at IFN- γ inducerer produksjonen av NO, som kan inngå i respiratory burst reaksjonen hos fagocytter (Stafford *et al.*, 1999).

Forsøksresultater publisert av W. D. Eaton (1990), viser at salmonider injisert med POLY I:C før virusmitte, viste påfølgende lavere virustiter, lavere mortalitet, og hemmet virusreplikasjon, i forhold til ustimulerte fisk. Samtidig viste Furnes *et al.* (2009) at transkripsjonsnivået av IFN- γ i torsk økte i hodenyre, mens det totale uttrykkningsnivået var høyest i milt, etter injeksjon med POLY I:C.

1.5.2.3. LPS (Lipopolysakkarid)

LPS er en mikrobiell polymer som stammer fra Gram-negative bakterier, og de gjenkjennes som PAMP av TLR4, som er en PRR på overflaten av fagocytiske celler. Det er vist at LPS stimulerer den polyklonale proliferasjonen hos salmonide lymfocytter, i tillegg til respiratory burst og fagocytisk aktivitet hos makrofager (Solem *et al.*, 1995; Salinas *et al.*, 2004).

Det er også vist at LPS stimulerer leukocytter til å produsere cytokiner. Hos leukocytter fra regnbueørret (*O. mykiss*) er det vist at ved stimulering med LPS vil produksjon av cytokinet TNF- α (tumornekrosefaktor- α) igangsettes, noe som fører til en aktivering av flere fagocytter (Zou *et al.*, 2002; Plouffe *et al.*, 2005). Som gjennomgått av Salinas *et al.* (2004), fant Clem *et al.* (1985), at maller (*I. punctatus*) stimulert med LPS økte utskillelsen av cytokinet IL-1 (interleukin-1). IL-1 er kjent for å videre tiltrekke og stimulere ulike leukocytter (Magor and Magor, 2001; Swain and Sahoo, 2006).

1.6. Stimulering av leukocytter med bakterien *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

1.6.1. *Francisella* sp.

Bakterier i slekten *Francisella* er Gram-negative, strengt aerobe, non-motile og fakultativ intracellulære pleomorfe coccobacilli (0,5 - 1,7 μm) (Mikalsen *et al.*, 2007; Ottem *et al.*, 2009). Det finnes mange arter innen slekten *Francisella*, og bakterien kan forårsake sykdom hos en rekke vertebrater og evertebrater (Mikalsen *et al.*, 2007). En kjent art er *F. tularensis*, som forårsaker sykdommen tularemi (harepest) hos gnagere, som også kan smitte mennesker. Denne arten er kjent for å vokse i vertens mononukleære fagocytter. Opptaket av bakterien i cellene skjer ved "looping"-fagocytose, trolig ved hjelp av stimuli fra karbohydratmolekyler på overflaten av bakterien (Clemens and Horwitz, 2007). Det er også indikert at bakterien blir opsonisert, og på denne måten stimulerer fagocytoseaktivitet hos fagocytene (Elkins *et al.*, 2007). Vakuolen som dannes rundt bakterien i fagocytens cytoplasma krymper, og den smelter sjelden sammen med lysosomer. Etter 14 timer inkubering kan 85 % av alle *F. tularensis* bakteriene påvises fritt i fagocytens cytoplasma. Den fullstendige livssyklusen til *F. tularensis* er derimot ikke fullstendig klarlagt (Clemens and Horwitz, 2007).

Ved fagocytose av *Francisella* sp. hos fagocytter fra pattedyr øker utskillelsen av flere cytokiner og chemokiner. Blant annet øker utskillelsen av INF- γ , TNF- α og ulike interleukiner. INF- γ er kjent for å stimulere produksjonen av iNOS og ROS i respiratory burst reaksjonen. Både TNF- α og interleukiner bidrar blant annet i motvirkning av intracellulære infeksjoner, og er med på å stimulere til ytterligere mer utskillelse av INF- γ . En økning av INF- γ og TNF- α stimulerer produksjonen av NO i fagocyttene. Det er usikkert om TLR4 gjenkjenner LPS fra *Francisella* sp. Det er derimot vist at TLR2 spiller en viktig rolle i gjenkjennelse av *Francisella* sp. hos makrofager fra pattedyr. Flere TLRs inngår i denne gjenkjennelsesreaksjonen (Elkins *et al.*, 2007).

Enkelte *Francisella* spp. er omsluttet av en kapsel. Denne kapselen er ikke immunogen eller toksisk, men fungerer trolig som en beskyttelse mot vertens humorale antimikrobielle stoffer produsert av komplementsystemet (Ellis, 1999; Elkins *et al.*, 2007). Det er derimot ikke vist at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* har en slik kapsel.

Nylig ble det påvist at *F. tularensis* kan hemme NADPH oksidase enzymets aktivitet hos nøytrofile granulocytter, og dermed medføre en lavere respiratory burst effekt. Funksjonene som disse bakteriene bruker er derimot ukjent, men kan involvere enzymet AcpA ("acid phosphatase") som produseres av bakterien (Schulert *et al.*, 2009). Disse resultatene støtter tidligere funn først beskrevet av Reilly *et al.* i 1996. Det er også vist at *F. tularensis* hemmer NADPH oksidase aktivering av PMA-stimulerte nøytrofile granulocytter fra pattedyr, og at en hemming av ROS dannelsen medfører frigjørelse av bakterien fra fagosomet (Reilly *et al.*, 1996; McCaffrey and Allen, 2006).

1.6.2. *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

En høyst aktuell bakterie fra slekten *Francisella* er påvist fra oppdrettet og villfanget torsk (*G. morhua*) med granulomer i indre organer. Tidligere har denne bakterien blitt gitt to navn; *Francisella piscicida* (Ottem *et al.*, 2007) og *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* (Mikalsen *et al.*, 2007). Nylig ble navnet *Francisella noatunensis* foreslått av Ottem *et al.* (2009). I denne teksten vil navnet *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* bli benyttet.

Francisellose hos oppdrettet og vill fisk er forårsaket av flere *Francisella* spp. Det har vært påvist *Francisella* spp. i både ferskvann og sjø, og bakterien forårsaket dødelighet hos flere ubeslektede fiskearter, som tilapia (*Oreochromis* spp.), three-line grunt (*Parapristipoma trilineatum*) og hybrid striped bass (*Morone chrysops* \times *M. saxatilis*) (Birkbeck *et al.*,

2007;Ottem *et al.*, 2009). I Chile i 2006 ble det funnet granulomatøs patologi i indre organer hos Atlantisk lakseparr (*S. salar*) i ferskvannsfasen. Patogenet ble funnet å være en *Francisella* sp., som hadde 99,8 % likhet i nukleotidsekvensen med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Det mistenkes at samme bakterie var ansvarlig for et lignende utbrudd i Chile i 1995, den gangen også hos lakseparr i ferskvannsfasen (Birkbeck *et al.*, 2007;Mikalsen *et al.*, 2009).

F. philomiragia subsp. *noatunensis* er rapportert å finnes i store mengder i milt og nyre før synlig patologi kan påvises i torsk (*G. morhua*) (Mikalsen *et al.*, 2009). Målculturene og livssyklusen til *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er derimot ikke kjent, men den har blitt funnet intracellulært i leukocytter fra torsk etter 3 timer *in vitro* smitte (Furevik, 2009).

Lamas og Ellis (1994) og Secombes (1996) omtalte at respiratory burst og produksjon av ROS og RNS hos leukocytter kan stimuleres ved inkubering med bakterier, og levende bakterier er ofte mer stimulerende enn døde.

Ved infeksjon av intracellulære bakterier i nøytrofile granulocytter, er det rapportert at noen bakterier kan forlenge levetiden til nøytrofile granulocytter. Hos pattedyr dør disse cellene etter 2 til 4 dager ved apoptose, og de blir fagocyttert av makrofager. Dette kan være en måte for intracellulære patogener å bruke nøytrofile granulocytter som skjul for å infisere og replikere i makrofager (Laskay *et al.*, 2008). Det er usikkert hvilke celler *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* infiserer, men *F. tularensis* er funnet i både nøytrofile granulocytter og makrofager.

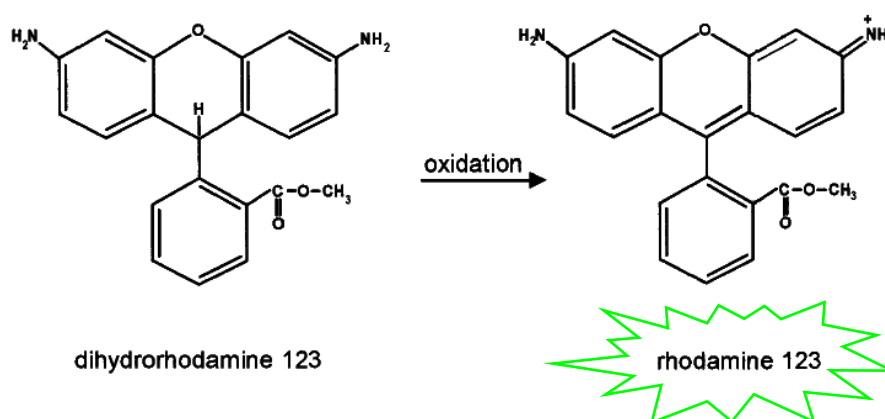
En annen kjent fakultativ intracellulær bakterie er *Renibacterium salmoninarum*, som er kjent for å forårsake BKD (bacterial kidney disease) hos salmonider (Densmore *et al.*, 1998). Denne bakterien har vist å benytte SOD og catalase for å motstå ROS, og aktiverer respiratory burst ved hjelp av antistoff, komplement og andre serum komponenter. På denne måten blir respiratory burst reaksjonen hos makrofagene brukt opp før *R. salmoninarum* blir fagocyttert (Ellis, 1999).

1.7. Merking av leukocytter med respiratory burst aktivitet

1.7.1. DHR (Dihydrorhodamine 123)

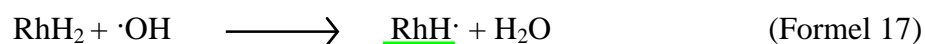
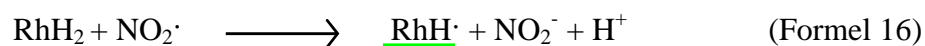
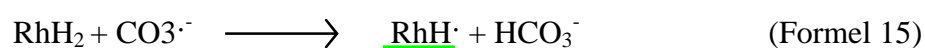
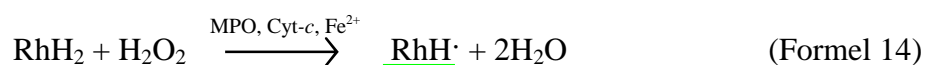
En mye brukt probe i påvisning av respiratory burst aktivitet ved hjelp av fluorescensmerking, er DHR (Dihydrorhodamine 123). DHR ble først benyttet i forsøk av Rothe *et al.*, publisert i 1988. DHR diffunderer passivt over cellemembraner, og kan oksideres

til kationisk RHO (Rhodamine 123), som avgir grønn fluorescens (Invitrogen, 2009a). DHR oksideres av produkter fra respiratory burst; H_2O_2 , og indirekte av $ONOO^-$, til fluorescerende RHO (Rhodamine 123) (Wardman, 2007; Folkes *et al.*, 2009). Oksidasjon av DHR ved H_2O_2 er avhengig av katalysering av myeloperoksidase, cytokrom c eller Fe^{2+} (Henderson and Chappell, 1993; Royall and Ischiropoulos, 1993). Figur 4 viser strukturen til DHR, og fluorescerende RHO (oksidert DHR).



Figur 4: Til venstre er den uoksiderte DHR molekylstrukturen, og til høyre den kationiske oksiderte DHR-formen, RHO, som avgir grønn fluorescens. Modifisert figur fra Crow (1997).

Den indirekte oksidasjonen av DHR til RHO ved $ONOO^-$, blir utført av avsatte radikalprodukter etter nedbrytning av $ONOO^-$, som består av $\cdot OH$, $CO_3^{\cdot -}$ og NO_2^{\cdot} (Glebska and Koppenol, 2003; Wardman, 2007). Oksidasjonen utført av H_2O_2 og de peroksynitritt-avledede radikalene er presentert i formel 14 – 17, der RhH_2 står for DHR, og RhH^{\cdot} for RHO (Sakurada *et al.*, 1992; Wardman, 2007; Folkes *et al.*, 2009).



For å verifisere at DHR-proben var avhengig av katalysatorer for å bli oksidert til fluorescerende RHO som i formel 14, tilsatte van Pelt *et al.* (1996), DHR og H_2O_2 i et cellefritt miljø, og målte fluorescensen i et spektrofotometer. Resultatene viste at oksidasjonen av DHR til RHO var mye høyere ved tilsetning av MPO, enn i prøver uten MPO.

Bruk av DHR for påvisning av produksjon av H_2O_2 og ONOO^- under respiratory burst aktivitet har vært gjort på leukocytter fra vertebrater, som mennesker (Prince and LapeNixon, 1995; Vowells *et al.*, 1995; vanPelt *et al.*, 1996; Szucs *et al.*, 1997; Richardson *et al.*, 1998; Walrand *et al.*, 2003; Bassoe *et al.*, 2003; Alvarez-Larran *et al.*, 2005; Avendano *et al.*, 2008), hund (Eickhoff *et al.*, 2004), storfe (Rinaldi *et al.*, 2007), mus (Handa *et al.*, 2004) og fisk, i tillegg til evertebrater, der Torreilles og Guérin angivelig i 1999 skal ha påvist produksjon av ONOO^- i hemolymfen hos muslingen *Mytilus gallaprovincialis* ved hjelp av DHR (Torreilles and Guerin, 1999).

I undersøkelser av respiratory burst egenskaper hos fisk har det tidligere blitt tilsatt DHR og målt RHO-fluorescens hos leukocytter fra flere fiskearter, blant annet regnbueørret (*O. mykiss*) (Stafford *et al.*, 2001), Atlantisk torsk (*G. morhua*) (Nikoskelainen *et al.*, 2006), gullfisk (*C. auratus*) (Grayfer *et al.*, 2008; Katzenback and Belosevic, 2009), havkaruss (*Sparus aurata* L.) (Ortuño *et al.*, 2000), japansk flyndre (*P. olivaceus*) (Cha *et al.*, 2008) og ayu sweetfish (*plecoglossus altivelis*) (Moritomo *et al.*, 2003).

1.7.2. PI (Propidium iodide)

Som tidligere omtalt (Kapittel 1.4.1.) har Laskay *et al.* (2008) funnet at ROS kan fremkalle celledød ved respiratory burst hos fagocytter. Celler som har mistet membranintegriteten kan merkes med fluorokromet PI (Propidium iodide), men celler som er i den tidlige apoptotiske fasen vil derimot ikke merkes (Darzynkiewicz *et al.*, 1992). Denne proben kan brukes til å skille mellom døde og levende celler, eventuelt også merket med andre fluorescerende prober (Steinkamp *et al.*, 1999).

De RHO-fluorescerende, og eventuelt PI-merkede, cellene kan observeres enkeltvis kvalitativt i fluorescensmikroskop, eller det kan gjøres mer kvantitative målinger i flow cytometer. Fluorescensmikroskopibilder av RHO-fluorescerende leukocytter er tatt fra mus (Handa *et al.*, 2004) og mennesker (Szucs *et al.*, 1997). Flow cytometrianalyser av DHR-tilsatte, RHO-fluorescerende leukocytter har blitt utført i mange forsøk, men flest på leukocytter fra pattedyr. Derimot har Ortuño *et al.* (2000), Stafford *et al.* (2001), Moritomo *et al.* (2003), Cha *et al.* (2008) og Katzenback og Belosevic (2009) gjennomført flow cytometrianalyser av RHO-fluorescens hos DHR-tilsatte leukocytter fra fisk. Det er ut fra disse forsøkene på pattedyr og fisk at DHR-merkingsmetoden (respiratory burst assay) for

respiratory burst aktiverte leukocytter fra laks (*S. salar*) og torsk (*G. morhua*) ble utarbeidet i denne oppgaven.

1.8. Hemming av respiratory burst med DPI (Diphenyleneiodonium chloride)

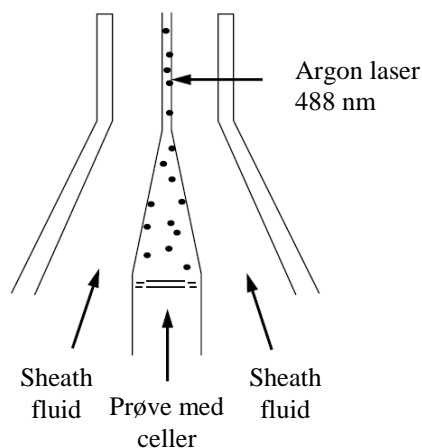
I følge flere publikasjoner kan respiratory burst reaksjonen hos fagocytter hemmes ved å tilsette DPI til leukocytene før stimulering (Henderson and Chappell, 1993; Odonnell *et al.*, 1993; Rinaldi *et al.*, 2007; Segal, 2008). Henderson *et al.* (1987) rapporterte at DPI hemmet 96 % av NADPH oksidase aktiviteten til leukocytter fra flere pattedyr tilsatt PMA. Senere viste Henderson og Chappell (1993), at DPI også hemmet blant annet katalysatorenzymeret NO syntase i dannelsen av RNS. Rinaldi *et al.* (2007) viste at 98 % av RHO-fluorescensen til PMA-stimulerte leukocytter fra storfe ble hemmet av DPI.

1.9. Flow cytometrianalyse av respiratory burst aktivitet

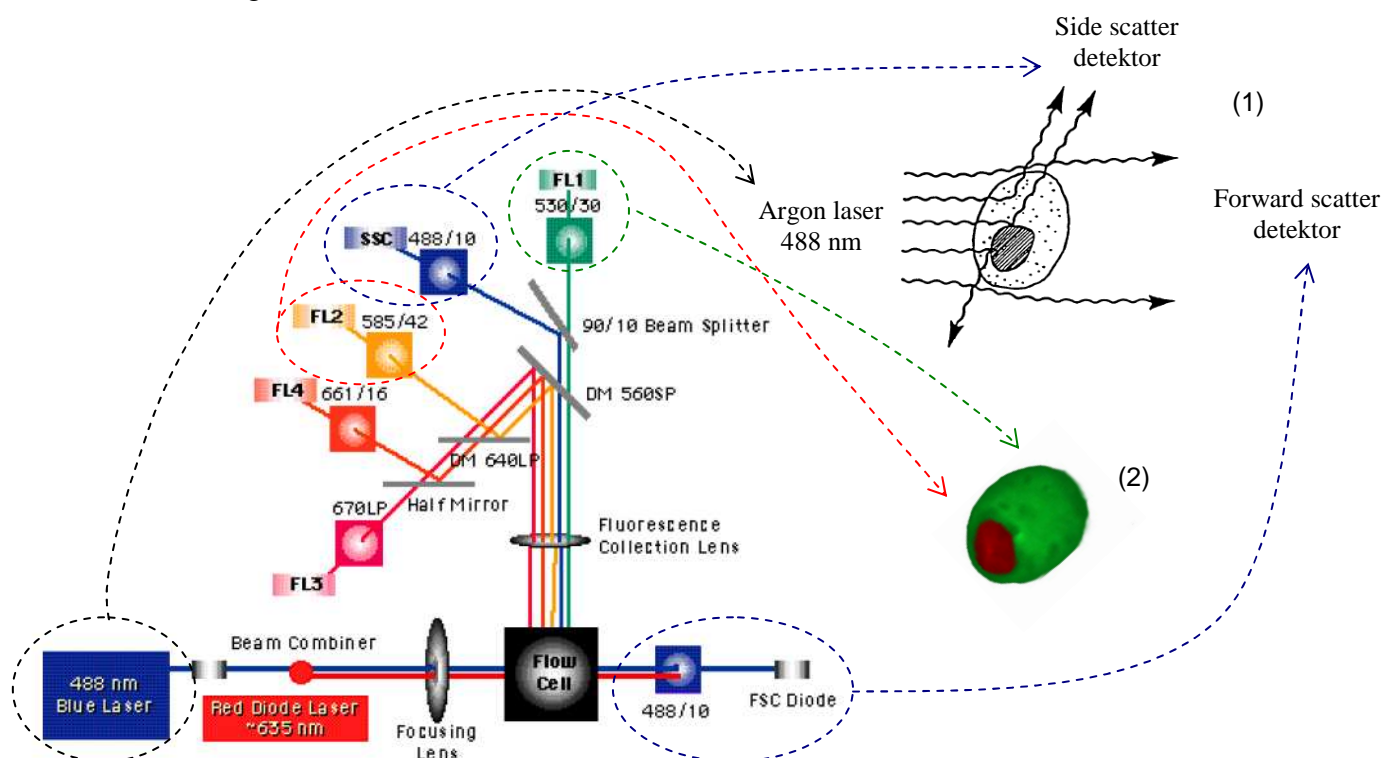
Ved hjelp av flow cytometri kan hurtige kvalitative og kvantitative målinger gjøres på et bestemt antall celler eller mikroskopiske partikler. Et flow cytometer kan ved hjelp av laserbasert teknologi omdanne impulser fra målte celler, eller andre partikler, til avlesbare samhandlede data i analyseprogrammer. På denne måten kan det skaffes informasjon om cellestørrelse, granularitet og fluorescensmerkede egenskaper (Radcliff and Jaroszeski, 1994).

Et flow cytometer består av fire systemer knyttet tett sammen. Det første systemet er et væskestrømsystem som transporterer cellene fra flow cytometri røret, via en strøm av "sheath fluid", som fører cellene enkeltvis gjennom en argonlaserstråle (488 nm), i det andre systemet i flow cytometeret (illumineringssystemet). Cellene eller partiklene i prøven samles i en rett linje foran laserstrålen i en prosess kjent som hydrodynamisk fokusering (Figur 5). Hvor fort cellene skal måles reguleres ved hjelp av innstillinger på væsketrykket i flow cytometeret. Når cellene eller partiklene blir laserbestrålt, spres lysstrålen, samtidig som fluorescerende markører, eller celler med autofluorescens, sender ut lys av en bestemt lengde. De spredte lysstrålene oppfattes av to detektorer i det tredje systemet i flow cytometeret; forward light scatter-detektor og side light scatter-detektor. Forward scatter-filteer oppfatter cellestørrelsen, mens side scatter-filteer registrerer granulariteten, med bakgrunn på hvordan lyset blir spredt (Figur 6). Samtidig kan fluorescens med ulik bølgelengde oppfattes i det tredje systemet i flow cytometeret ved hjelp av ulike filter (FL1 til FL4). Disse filtrene mottar og bearbeider

informasjon fra de illuminerte cellene. Flere fluorokromer kan tilsettes cellene og måles samtidig av de ulike filtrene, så lenge de eksiteres ved 488 nm, og emisjonsspektertoppene ikke ligger nær hverandre (Radcliff and Jaroszeski, 1994). Figur 6 viser grunnleggende oppbygging av et flow cytometer (BD, 2009).



Figur 5: Celler fra prøven blir trukket opp sammen med sheath fluid, og fortrinnsvis belyst enkeltvis av en argonlaser (488 nm), i en prosess kjent som hydrodynamisk fokusering. Modifisert figur fra (BD, 2009).



Figur 6: Måling av celler i flow cytometer. Etter at cellene har blitt belyst av argonlaseren, blir størrelsen oppfattet av forward scatter-detektoren, og granulariteten oppfattet av side scatter-detektoren (1). Eventuell grønn fluorescens avgitt fra RHO-positive celler fanges opp og registreres i FL1-detektoren, og eventuell rød fluorescens av PI-merket kjerne i døde celler registreres i FL2-detektoren (2). Modifisert figur fra BD, 2009.

De fluorescerende probene RHO (oksidert DHR) og PI, som ble brukt i denne oppgaven, hadde ulike eksiterings- og emisjonsspekter. RHO har høyest eksitering og emisjonsspekter ved henholdsvis 507 nm og 539 nm (Invitrogen, 2009a). Dette muliggjør en registrering av RHO-fluorescerende celler i FL1-filteet, som registrerer grønn fluorescensemisjon i lysspekterområdet på mellom 515 til 545 nm (Invitrogen, 2009b). Høyeste eksiterings- og emisjonsområde for PI er ved henholdsvis 536 nm og 617 nm (Invitrogen, 2009a), noe som gjør at FL2-filteet kan brukes ved registrering av fluorescens, da dette filteet tar opp oransjerød fluorescens i et område på 564 til 606 nm (Invitrogen, 2009b). FL3 og FL4 illustrert i figur 6 registrerer rød fluorescens (BD, 2009), men disse filtrene ble ikke brukt ved flow cytometrianalyser i denne oppgaven.

Det fjerde, og siste, systemet i flow cytometeret er datatilknyttet lagring av målinger og redigering av resultatene i et dataprogram (Radcliff and Jaroszeski, 1994). Resultatene kan siden analyseres i dataprogrammet med henspeiling på blant annet antall fluorescerende celler, fluorescensintensitet, cellestørrelse i forhold til granularitet, fluorescens i forhold til størrelse og granularitet, og en type fluorescens i forhold til en annen type fluorescens.

1.10. Formål med oppgaven

Hensikten med oppgaven er å utarbeide en prosedyre for merking og påfølgende måling av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk. Dette assayet omfatter å optimalisere stimulering av respiratory burst aktivitet i leukocytene, for deretter å påvise aktiviteten ved tilsetting av DHR, som omdannes til fluorescerende RHO i respiratory burst aktiverte leukocytter. I dette respiratory burst assayet kan en måle og analysere fluorescerende leukocytter ved hjelp av flow cytometri. På denne måten vil det være mulig å bestemme andelen leukocytter med respiratory burst aktivitet, og graden av aktivitet i leukocytene.

Respiratory burst assayet vil bli benyttet til å undersøke og sammenligne respiratory burst aktiviteten til leukocytter i blod og hodenyre fra laks og torsk. Samtidig vil assayet bli utprøvd på leukocytter fra laks og torsk etter *in vitro* inkubering med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, da laks og torsk viser ulike responser på denne bakterien *in vivo*.

Den fremtidige hensikten, utover denne oppgaven, er å skape bedre forståelse for immunsystemet til fisk, og videre utvikle metoder for å bekjempe sykdom hos fisk.

2. Material og metode

2.1. Fisk

2.1.1. Atlantisk laks (*Salmo salar* L.)

Lakseparer på rundt 20 gram ble overført den 17. april 2008 fra produsenten, Urke settefiskanlegg, til Industrielaboratoriet (ILAB) ved Høyteknologisenteret i Bergen. Parren ble holdt i ferskvann med temperatur på 6 °C frem til smoltifisering. I løpet av uke 46 samme år ble laksesmolten overført til kar (500 liter) med sjøvann (salinitet på 34 ‰) som holdt 8 °C, og postsmolten gikk under 24 timers belysning. Vanngjennomstrømningen var 1200 liter per time. Fisken ble holdt under standardiserte oppdrettsbetingelser og viste ingen tegn til sykdom eller nedsatt kondisjon. Laks som ble veid før bruk i forsøk var 155 ± 62 gram (N = 54).

2.1.2. Torsk (*Gadus morhua* L.)

Torskeyngel i størrelse 5 til 15 gram ble den 27. mars 2008 hentet til ILAB fra Sagafjord torskeanlegg på Stord. Torsken har under hele forsøksperioden gått under 24 timers lys i kar (500 liter) der sjøvannet (salinitet på 34 ‰) holdt en temperatur på 8 °C. Vanngjennomstrømningen var 1200 liter i timen. Fisken gikk under optimale oppdrettsforhold, og var frisk under forsøksperioden. Torsk som ble veid før bruk i forsøksperioden hadde en gjennomsnittsvekt på 265 ± 80 gram (N = 32).

2.2. Isolering av leukocytter fra laks og torsk

Fra laks og torsk ble det isolert leukocytter fra hodenyre (HKL) og blod (PBL) basert på tidligere publiserte metoder (Pettersen *et al.*, 1995; Pettersen *et al.*, 2000; Rønneseth *et al.*, 2007).

Ved hjelp av en 1 ml sprøyte ble det tatt ut 0,7 ml blod fra *vena caudalis*. For å forhindre koagulering ble blodet overført til vakuteinerrør med natrium heparin. Blodet ble så fortynnet med L-15 medium (se Appendix, Kapittel 6.3.1.), til henholdsvis 3 ml for laks, og 5 ml for torsk. De fortynnete blodprøvene ble oppbevart på is før sentrifugering.

Fra hver fisk ble vev fra hodenyre, 0,2 - 0,4 g for laks og 0,1 - 0,2 g for torsk, dissekert ut og overført til vakuteinerrør som inneholdt L-15 medium, 0,5 ml for laks og 2,0 ml for torsk. Deretter ble nyrevevet bearbeidet gjennom et Falcon 100 µm nylonfilter (Becton Dickinson) ved hjelp av to bøydasteurpipetter. Vekselvis ble det vasket med 0,5 ml L-15 medium 5 ganger, slik at nyreprøvene til sammen målte 3 ml for laks, og 5 ml for torsk. De fortynnede nyreprøvene ble holdt på is før sentrifugering.

De fortynnede blod- og nyreprøvene ble lagt på Percoll-gradienter av ulik tetthet i 10 ml sentrifugerør. Percoll-løsningene ble laget ved å blande ut ren Percoll™ (GE Healthcare) med autoklaverte saltløsninger av ulik molaritet (se Appendix, Kapittel 6.1.1. og 6.1.2.). Ved sentrifugering av blod- og nyreprøver fra laks, ble det lagt 3 ml Percoll-løsning med tetthet 1,060 g/ml, over 4 ml Percoll-løsning med tetthet 1,075 g/ml. De tilsvarende verdiene for blod- og nyreprøver fra torsk var 2,5 ml Percoll-løsning med tetthet 1,050 g/ml, over 3 ml Percoll-løsning med tetthet 1,070 g/ml. Over Percoll-gradientene ble det forsiktig ved hjelp av en pasteurpipette lagt 3 ml fortynnede blod- eller nyreprøver fra laks, eller 5 ml fortynnede blod- eller nyreprøver fra torsk. Ved sentrifugering ble det brukt en Allegra X-15R sentrifuge (Beckman Coulter) innstilt på 400 x g og 4 °C, hvor prøvene fra laks ble sentrifugert i 35 minutter, og prøvene fra torsk ble sentrifugert i 40 minutter.

Etter sentrifugering ble leukocyttfraksjonen i Percoll-gradientovergangen tatt ut ved hjelp av pasteurpipetter, og overført til nytt sentrifugerør. Deretter ble røret fylt opp med L-15 medium, og ble for leukocytter fra både laks og torsk sentrifugert i 10 minutter ved 200 x g og 4 °C. Supernatanten ble tømt av, og leukocytene resuspendert forsiktig i L-15 medium eller PBS 380 (PBS 380 mOsm, med heparin) (se Appendix, Kapittel 6.1.3.).

2.3. Telling av celler

Antall leukocytter per ml i leukocyttsuspensjonene ble målt elektronisk ved hjelp av en CASY celleteller (CASY® Model TT). I dataprogrammet CASY®excell 2.2 kunne de kvantitative og kvalitative målingene fra celletelleren, som antall celler, celleviabiliteten og aggregeringsfaktoren observeres. Celletellingen ble brukt kvantitativt ved justering av celledallet per ml i leukocyttsuspensjonen før videre bruk i forsøk, for eksempel ved cytopspinpreparering, og flow cytometrianalyser. Aggregeringsfaktoren og celleviabiliteten hadde også konsekvenser for de kvalitative resultatene av forsøkene, da det er fordelaktig med

en lav aggregeringsfaktor, og høy celleviabilitet for å få de mest korrekte og pålitelige resultatene.

Ved hver telling ble 25 µl celleduspensjon tilsatt i målebeger med 10 ml CASYton-løsning og blandet godt ut. Deretter ble prøven satt under målekapillæren og analysert.

2.4. Cytospinpreparat av leukocytter og farging med Diff-Quick

For å kvalitetssikre og identifisere ulike leukocytter i enkelte forsøk, ble det laget cytospinpreparater som ble farget med Diff-Quick (Dade Berhing AG, Medion Diagnostics), eller senere med ulike fluorescerende reagenser, omtalt i kapittel 2.7. Før fremstilling av cytospinpreparater ble leukocytter isolert som beskrevet i kapittel 2.2., og cellekonsentrasjonen ble justert til 1,2-1,4 x 10⁶ celler per ml for laks, og 2,5-3,0 x 10⁶ celler per ml for torsk. Cytospinpreparatene ble laget ved hjelp av en Shandon cytospin III cytosentrifuge, hvor det ble tilsatt 100 µl fra hver leukocyttuspensjon i hvert prøvekommer. Dette ble sentrifugert i 3 minutter ved 1000 rpm. Før Diff-Quick farging ble preparatene lufttørket mørkt i 24 timer. Etter farging og tørking ble leukocytene studert i et mikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss), og ulike celletyper og kvaliteten på disse kunne observeres, og avbildes med et kamera (DS-5M-U1, Nikon) tilknyttet mikroskopet.

2.5. Flow cytometri

Celleduspensjonene, justert til et bestemt celletall per ml, ble analysert i et FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) ved bølgelengde på 488 nm (argonlaser). Før måling ble cellene resuspendert ved hjelp av en vortexmaskin (MS2 minishaker, IKA[®]) (1400 rpm i 3 sek). Flow cytometeret målte 10 000 leukocytter i hver prøve, og resultatene ble analysert i dataprogrammet Cell Quest versjon 3.1 (Becton Dickinson). I en forhåndsopprettet protokoll ble resultatene fra hver analyse satt inn i FSC/SSC dot plot, og fluorescensintensiteten til de ulike leukocytene ble fremstilt i histogrammer eller dot plot.

Dataene ble overført til FCS express (versjon 3, De Novo Software) for videre bearbeiding av resultatene.

I forsøksperioden ble flow cytometeret kalibrert en gang i uken ved hjelp av fluorescerende kuler (Calibrite, Becton Dickinson).

2.6. Flow cytometrianalyser av respiratory burst hos leukocytter fra laks og torsk

Metoden brukt for å måle respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk ved hjelp av DHR, er basert på tidligere publiserte metoder (Richardson *et al.*, 1998; Ortuno *et al.*, 2000; Stafford *et al.*, 2001; Walrand *et al.*, 2003; Moritomo *et al.*, 2003; Rinaldi *et al.*, 2007; Cha *et al.*, 2008; Grayfer *et al.*, 2008; Katzenback and Belosevic, 2009). I tilpasningen av denne metoden for leukocytter fra laks og torsk ble det gjennomført flere forsøk der ulike faktorer ble justert og endret. En oversikt over utførte forsøk er satt opp i tabell 1 og 3. Ut fra disse forsøkene ble det forsøkt å utarbeide en standard metode for påvisning av respiratory burst hos leukocytter fra laks og torsk.

Før det ble gjort målinger på leukocytter fra laks og torsk tilsatt DHR, ble innstillingene på flow cytometeret justert ved bruk av DHR og PI-merkede og -umerkede leukocytter fra blod og hodenyre (se Appendix, Kapittel 6.3. for instrumentinnstillinger).

2.6.1. Respiratory burst assay på leukocytter fra laks

2.6.1.1. Forarbeid

Isolerte leukocytter fra hodenyre og blod, som beskrevet i kapittel 2.2., ble resuspendert i PBS 380.

For hvert forsøk ble det laget en ny DHR stock-løsning rett før bruk (se Appendix, Kapittel 6.1.6.). DHR proben ble oppbevart i mørke ved -20 °C, da den autooksidere ved lyseksponering og for høy temperatur (Henderson and Chappell, 1993; Invitrogen, 2009c). Prøver tilsatt DHR ble så mye som mulig oppbevart i mørke frem til flow cytometrianalyse.

DHR stock-løsning hadde i begynnelsen av forsøksperioden en konsentrasjon på 210 µM, da volumet i rørene ble 210 µl da DHR ble tilsatt. Konsentrasjonen ble senere justert til 206 µM DHR, da sluttvolumet til prøvene senere i forsøksperioden var 206 µl. PMA stock-løsning ble i begynnelsen laget med en konsentrasjon på 211 µg/ml. Senere ble konsentrasjonen justert til 206 µg/ml PMA (se Appendix, Kapittel 6.1.4.). PMA stock-løsningene ble oppbevart ved -20 °C (Sigma, 2009a), og tint rett før bruk.

I denne teksten vil sluttkonsentrasjonene av de ulike reagensene i prøvene være skrevet i parentes bak de tilsatte reagensene.

2.6.1.2. Utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst assay

I alle metodeutprøvningsforsøkene ble cellesuspensjoner av HKL og PBL justert til ønsket cellekonsentrasjon ved hjelp av CASY celleteller, enten 5×10^6 celler/ml eller 2.5×10^6 celler/ml, og oppbevart på is. Samtidig ble CASY-målingene benyttet til å kontrollere viabiliteten og aggregeringen til cellene. Etter justering av celletallet ble 200 μ l cellesuspensjon (5×10^6 , eller 1×10^6 celler/ml) tilsatt i hvert flow cytometri polystyrenrør (Falcon, Becton Dickinson).

I de første forsøkene ble cellesuspensjonene tilsatt 1, 5 eller 10 μ l 210 μ M DHR stock-løsning (1, 5 eller 10 μ M) direkte etter nedkjøling på is, og dette ble inkubert i 5 minutter. Respiratory burst aktivitet i leukocytene ble så stimulert ved å tilsette 1 μ l 211 μ g/ml PMA (1 μ g/ml), og ustimulerte kontroller ble tilsatt 1 μ l PBS 380.

I senere forsøk fikk cellene stå i romtemperatur (21 °C) i 10 minutter før tilsetting av reagenser. Følgende ulike oppsett for tilsetting av DHR og PMA ble prøvd ut:

I. Stimulering etter tilsetting av DHR:

Tilsatt DHR (1, 5 eller 10 μ M) og inkubert i 5 minutter før respiratory burst stimulering med PMA (1 μ g/ml). Flow cytometrianalyser utført 15, 30 og 45 minutter etter PMA-tilsetting.

II. Stimulering samtidig med tilsetting av DHR:

Tilsatt 5 eller 10 μ M DHR samtidig med respiratory burst stimulering med PMA (1 μ g/ml). Flow cytometrianalyser utført 15, 30 og 45 minutter etter DHR- og PMA-tilsetting.

III. Stimulering før tilsetting av DHR:

Respiratory burst stimulering ved inkubering med PMA (1 μ g/ml) i 5 eller 10 minutter, før tilsetting av DHR (5 eller 10 μ M). Flow cytometrianalyser utført 15, 30, 45 og 60 minutter etter DHR-tilsetting.

I hvert forsøk ble det analysert ustimulerte paralleller til de respiratory burst stimulerte prøvene, tilsatt 1 μ l PBS 380 i stedet for PMA. Etter hver reagenstilsetting ble cellesuspensjonene resuspendert ved bruk av en vortexmaskin (1400 rpm i ca 3 sek), slik at de små volumene tilsatt ble godt utblandet i prøvene. Alle inkuberings ble gjort mørkt, ved sakte vipping (4x/min) på vippemaskin (Rockomat, Tecnomara AG) i romtemperatur. Alle

forsøkene ble kjørt med parallelle prøver tilsatt samme reagenskonsentrasjoner. Tabell 1 viser fullstendig oversikt over utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst aktivitet påvisning hos leukocytter fra laks.

Ved et tidspunkt for flow cytometrimåling, ble celleduspensjonene satt på is etter siste inkubering, og analysert ved flow cytometri. Ved flere tidspunkt for flow cytometrianalyse ble prøvene inkubert i romtemperatur, og rett før første analyse ble prøvene tilsatt 200 µl PBS 380 i hvert rør for å unngå at flow cytometeret målte prøvene tørre. For hver enkelt prøve ble det målt 10 000 celler ved hver analyse.

Analysetidspunktene for flow cytometri ble målt med stoppeklokke, og startet (tid 0) fra og med første tilsetning i første prøve av den siste reagenstilsetningen (PMA i forsøk beskrevet i punkt I. og II., og DHR i forsøk beskrevet i punkt III.). I flow cytometriforsøk med flere måletidspunkt, ble de samme prøvene brukt ved hver flow cytometrianalyse. Prøver uten tilsatt DHR ble analysert med FL1 = 600 nm, mens ved tilsatt DHR ble prøvene analysert med FL1 = 365 nm (se Appendix, Kapittel 6.3.1.). Resultatene ble helhetlig vurdert i samme histogram, med FL1 langs X-aksen og celletall langs Y-aksen. De ustimulerte kontrollene tilsatt DHR ble brukt til å definere hvor fluorescerende ustimulerte leukocytter var, og disse ble regnet som negative celler uten respiratory burst aktivitet. En tillatt grense på 2 % RHO-positive ustimulerte leukocytter ble derimot satt. FSC/SSC dot plot ble også analysert for hver prøve. Ved videre analysering av data fra alle forsøk, ble små agranulære celler, små celler med høy granularitet, og avvikende store partikler målt i flow cytometeret, gatet vekk i analyseprogrammet FCS express.

Tabell 1: Flow cytometriforsøk med ustimulerte og stimulerte PBL og HKL fra laks tilsatt DHR. Konsentrasjonen av DHR- og PMA-stock-løsningene var henholdsvis 210 μM og 211 $\mu\text{g/ml}$, bortsett fra forsøksoppsett merket ^b og ^c i tabellen. Ved inkubering ble prøvene satt på vipping (4x/min) i mørke ved romtemperatur. Tid 0 er definert som tiden etter siste tilsetning av reagenser (PMA eller DHR), eller PBS 380.

Tid frem til flow cytometrianalyse



HKL/PBL	Celle-konsentrasjon	Cellesuspensjon per rør (μl)	Inkubering (min)	DHR (μl)	Inkubering (min)	PBS (μl) (ustimulerte celler)	PMA (μl) (stimulerte celler)	Inkubering (min)	DHR (μl)	Flow cytometri, måletidspunkt (min)
HKL og PBL	$5,0 \times 10^6/\text{ml}$	200	X ^a	1, 5 og 10	5	1	—	—	—	15
HKL og PBL	$5,0 \times 10^6/\text{ml}$	200	X ^a	1, 5 og 10	5	—	1	—	—	15
HKL og PBL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	X ^a	1, 5 og 10	5	1	—	—	—	15
HKL og PBL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	X ^a	1, 5 og 10	5	—	1	—	—	15
HKL og PBL	$5,0 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	1, 5 og 10	5	1	—	—	—	15
HKL og PBL	$5,0 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	1, 5 og 10	5	—	1	—	—	15
HKL og PBL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	1, 5 og 10	5	1	—	—	—	15
HKL og PBL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	1, 5 og 10	5	—	1	—	—	15
HKL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	5 og 10	5	1	—	—	—	15, 30 og 45
HKL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	5 og 10	5	—	1	—	—	15, 30 og 45
HKL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	5 og 10	—	1	—	—	—	15, 30 og 45
HKL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	5 og 10	—	—	1	—	—	15, 30 og 45
HKL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	—	—	1	—	5	5 og 10	15, 30, 45 og 60
HKL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	—	—	—	1	5	5 og 10	15, 30, 45 og 60
HKL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	—	—	1	—	5 og 10	5 ^c	30 og 45
HKL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	—	—	—	1 ^b	5 og 10	5 ^c	30 og 45
PBL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	—	—	1	—	5	5 ^c	30, 45 og 60
PBL	$2,5 \times 10^6/\text{ml}$	200	10	—	—	—	1 ^b	5	5 ^c	30, 45 og 60

^a Overført direkte fra is

^b PMA stock-konsentrasjon på 206 $\mu\text{g/ml}$

^c DHR stock-konsentrasjon på 206 μM

2.6.1.3. Endelig forsøksoppsett for respiratory burst assay på leukocytter fra laks

I løpet av forsøksperioden ble det kjørt flest forsøk på leukocytter isolert fra laks (N = 28) med følgende oppsett:

1. Leukocytter ble isolert fra blod og/eller hodenyre som beskrevet i kapittel 2.2., og resuspendert i PBS 380.
2. Cellekonsentrasjonen ble justert til $2,5 \times 10^6$ celler per ml, og celledensjonene ble oppbevart på is.
3. 200 μ l celledensning ble tilsatt i hvert flow cytometri rør, og inkubert mørkt i 10 minutter i romtemperatur med vipping (4x/min).
4. 1 μ l 206 μ g/ml PMA (1 μ g/ml) ble tilsatt to parallelle prøver for å stimulere leukocyttenes respiratory burst aktivitet, og 1 μ l PBS 380 ble tilsatt to parallelle ustimulerte kontrollprøver. Tilsetningene ble utblandet i prøvene med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek). Prøvene ble videre inkubert mørkt i 5 minutter i romtemperatur med vipping (4x/min).
5. 5 μ l 206 μ M DHR (5 μ M) ble tilsatt de stimulerede og ustimulerede leukocytterne, og prøvene ble resuspendert med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek). Dette tidspunktet regnes som tid 0.
6. Det var alltid en negativ kontrollprøve uten reagenstilsetninger med i hvert forsøk.
7. Flow cytometrimåling ble utført etter 30 minutter inkubering, mørkt i romtemperatur ved sakte vipping. Før flow cytometrimåling ble hver enkelt prøve resuspendert med vortexmaskin ved 1400 rpm i 3 sekunder.
8. Ved flow cytometrimåling ble 10 000 celler i hver prøve analysert. Flow cytometer innstillingene ble justert etter om prøvene var med eller uten DHR (se Appendix, Kapittel 6.3.1. for instrumentinnstillinger).

I hvert forsøk ble det kjørt flow cytometrianalyse på en kontrollprøve med leukocytter uten tilsatt DHR eller PMA. Dette for å kunne kontrollere at leukocytterne i de ulike forsøkene hadde tilnærmet like fysiologiske egenskaper til tross for at de stammet fra ulike individer. Dot plotene fra flow cytometri analysene av disse kontrollprøvene ble sammenlignet, og ved for store avvik fra gjennomsnittet ble resultatene fra forsøket forkastet.

2.6.1.4. Kontrollforsøk

I optimaliseringen av påvisningmetoden for respiratory burst ble det satt opp kontroller med leukocyttsuspensjoner fra både blod og hodenyre fra laks (Tabell 2). Se kapittel 6.3.1. for instrumentinnstillinger ved flow cytometrianalyse i kontrollforsøkene. Følgende kontrollforsøk ble utrettet:

Negativ leukocyt kontroll:

Ustimulerte leukocytter fra PBL og HKL uten DHR tilsatt ble analysert ved flow cytometri med innstillinger for DHR-tilsatt prøver etter 30 minutter inkubering i romtemperatur, mørkt og med vipping (4x/min).

Negativ PMA kontroll:

Kun PMA ble tilsatt PBL og HKL for å undersøke om PMA alene var fluorescerende, noe som kunne medføre feilaktige utslag på fluorescensresultatene ved flow cytometrianalyse. Leukocyttsuspensjoner ble inkubert i 10 minutter i romtemperatur. Deretter ble to parallelle kontrollrør tilsatt 1 µl 206 µg/ml PMA (1 µg/ml), og inkubert i 5 minutter. Så ble det tilsatt 5 µl PBS 380 i stedet for DHR, for å få samme volum (206 µl) og PMA konsentrasjon (1 µg/ml) som prøvene i standardforsøkene. Reagensene ble blandet ut i prøvene med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek). Prøvene ble inkubert i mørke i romtemperatur og med vipping (4x/min) i 30 minutter etter tilsetning av PBS 380, før flow cytometrianalyse.

Positiv DHR kontroll:

For å verifisere at DHR som antatt kunne oksideres til fluorescerende RHO i nærvær av H₂O₂, som produseres ved respiratory burst aktivitet, ble det satt opp positive kontrollprøver med leukocytter fra både blod og hodenyre tilsatt H₂O₂. Rør med 190 µl leukocyttiløsning (2,63 x 10⁶ celler per ml) etter inkubering i romtemperatur i 10 minutter, ble tilsatt henholdsvis 1 eller 6 µl PBS 380 for å oppnå sluttvolum på 206 µl før flow cytometrianalyse. Deretter ble det tilsatt 5 µl 206 µM DHR (5 µM), og prøvene ble videre inkubert i 5 minutter. Så ble 5 eller 10 µl 30 % H₂O₂ (0,73 eller 1,46 %) (Merck) tilsatt (regnet som tid 0). Prøvene ble resuspendert med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek) etter hver reagenstilsetning.

I forsøket var det to parallelle rør for hver konsentrasjon. Leukocytterne ble inkubert i 30 og 45 minutter før flow cytometrianalyse. Prøvene ble analysert i

flow cytometeret med innstillinger for prøver både med og uten tilsatt DHR.. Flow cytometri resultatene ble sammenlignet med et standard oppsett av respiratory burst assay med DHR-tilsetning på leukocytter fra samme fisk.

Hemming av respiratory burst:

Negative DHR kontrollprøver ble tilsatt DPI (Diphenyleneiodonium chloride, Sigma) for å hemme respiratory burst aktivitet i leukocytene. DPI har tidligere blant annet blitt brukt i undersøkelser av nøytrofile celler hos storfe, der DPI hemmet NADPH oksidase-enzymet i respiratory burst reaksjonen (Rinaldi *et al.*, 2007). Da H₂O₂ ikke dannes når DPI hemmer NADPH oksidase-enzymet, vil DHR ikke bli oksidert til fluorescerende RHO. Dersom DHR-proben fungerer som antatt, skal det teoretisk sett ikke kunne detekteres en økning i fluorescens i flow cytometrianalyse av fagocytter som tilsettes DPI og deretter stimuleres med PMA.

Konsentrasjonene av DPI brukt i kontrollforsøkene er basert på informasjon fra leverandør og konsentrasjoner brukt i andre studier (Rinaldi *et al.*, 2007), (Sigma, 2009b). Først ble det laget en stamløsning av DPI med konsentrasjon på 5 mM. Deretter ble det laget to løsninger med konsentrasjoner på 206 og 412 µM DPI (se Appendix, Kapittel 6.1.5.).

Forsøket besto av tre delforsøk, der den første delen var med et vanlig DHR-forsøksoppsett for leukocytter uten tilsatt DPI. I hvert av de to andre delforsøkene ble det brukt en DPI-konsentrasjon for hvert delforsøk. De tre delforsøkene besto alle av et negativt kontrollrør med leukocytter uten DHR og PMA, to parallelle rør med leukocytter tilsatt DHR og PBS 380 (ustimulerte), og to parallelle rør med leukocytter tilsatt DHR og PMA (stimulerte).

I de to delforsøkene som skulle hemmes med DPI, ble alle rørene tilsatt 10 µl DPI-løsning med en konsentrasjon på 206 µM i det ene, og 412 µM i det andre delforsøket. I det uhemmede delforsøket uten DPI, ble rørene tilsatt 10 µl PBS 380. Deretter ble 190 µl leukocyttuspensjon ($2,63 \times 10^6$ celler per ml) tilsatt i hvert flow cytometri rør i alle delforsøkene. Etter 10 minutter inkuberingstid i romtemperatur ble det tilsatt 1 µl PBS 380 eller 1 µl 206 µg/ml PMA, og prøvene ble videre inkubert i 5 minutter. Deretter ble det tilsatt 5 µl 206 µM DHR, og sluttvolumet i alle rørene ble 206 µl. Konsentrasjonen av PMA ble dermed 1 µg/ml, av DHR 5 µM, og sluttkonsentrasjonen av DPI i prøvene i de to respiratory burst hemmede delforsøkene ble henholdsvis 10 og 20 µM. Etter 30, 45 og 60 minutter ble prøvene analysert ved

flow cytometrianalyse. Da de tre ulike delforsøkene ble kjørt med leukocytter fra blod og hodenyre fra samme fisk, kunne resultatene sammenlignes og analyseres i forhold til hverandre i FCS express.

Celledødkontroll:

For å undersøke antall døde celler i prøvene ble det gjennomført kontrollforsøk med PBL og HKL tilsatt PI (propidium iodide, Sigma). Dette ble gjort for å verifisere at dot plotene ved analysering av resultatene ble gatet riktig, samtidig for å utelate data fra døde celler å feilaktig påvirke resultatene fra respiratory burst assyet for levende leukocytter. Merkemethoden med PI er basert på tidligere publisert arbeid av Darzynkiewicz *et al.* og Steinkamp *et al.*, som viste at PI kunne merke skadede og døde celler (Darzynkiewicz *et al.*, 1992; Steinkamp *et al.*, 1999). Etter standard forsøksoppsett med DHR, ble 4,12 μ l PI (100 μ g/ml) tilsatt prøvene etter 30 minutter inkubering i romtemperatur. Da volumet i prøvene var 206 μ l, ble sluttkonsentrasjonen av PI i prøvene 2 μ g/ml. Etter PI-tilsetning ble prøvene satt på is i 5 minutter, før de ble analysert ved flow cytometri. Fluorescens fra RHO (oksidert DHR) ble målt i FL1-filteret, mens fluorescens fra PI-proben ble målt i FL2-filteret.

For hvert kontrollforsøk ble det alltid utført et parallelt standard forsøksoppsett (Kapittel 2.6.1.3.) fra samme fisk. Dette ble gjort for å analytisk kunne sammenligne effektene av reagensene tilsatt i kontrollprøvene, med de opprinnelige effektene av DHR-merkede respiratory burst aktiverte leukocytter isolert fra samme fisk.

Tabell 2: Kontrollforsøk utført gjennom hele metodeutprøvingen for respiratory burst påvisning hos PBL og HKL fra laks. Det ble brukt en konsentrasjon på 206 μ M DHR (5 μ M), og en konsentrasjon på 206 μ g/ml PMA (1 μ g/ml). De tre nederste forsøksoppsettene ble tilsatt 4,12 μ l 100 μ g/ml PI (2 μ g/ml) 5 minutter før flow cytometrianalyse. Prøvene ble inkubert mørkt i romtemperatur, bortsett fra de negative kontrollene i første delen av metodeutprøvingens forsøkene, som ble inkubert mørkt på is. Under inkubering ble prøvene satt på vippebrett (4x/min). Tidspunkt for flow cytometrianalyse ble beregnet ut fra siste reagenstilsetning (tid 0).

Tid frem til flow cytometrianalyse



Celle-konsentrasjon	Cellesuspensjon per rør (μ l)	Inkubering, 10 min	Inkubering, 5 min	Tilsetning	Flow cytometri, måletidspunkt (min)	Merknader
$5,0 \times 10^6$ /ml	200	På is/romtemp.	—	—	15, 30, 45 og 60	Negativ kontroll
$2,5 \times 10^6$ /ml	200	På is/romtemp.	—	—	15, 30, 45 og 60	Negativ kontroll
$5,0 \times 10^6$ /ml	200	I romtemp.	1 μ l PMA	1 μ l PBS	30 og 45	Negativ PMA kontroll
$2,5 \times 10^6$ /ml	200	I romtemp.	1 μ l PMA	1 μ l PBS	30 og 45	Negativ PMA kontroll
$2,63 \times 10^6$ /ml	190	10 μ l 206 μ M DPI, romtemp.	6 μ l PBS	—	30 og 45	Respiratory burst hemming
$2,63 \times 10^6$ /ml	190	10 μ l 412 μ M DPI, romtemp.	6 μ l PBS	—	30 og 45	Respiratory burst hemming
$2,63 \times 10^6$ /ml	190	10 μ l 206 μ M DPI, romtemp.	1 μ l PBS	5 μ l DHR	30 og 45	Respiratory burst hemming
$2,63 \times 10^6$ /ml	190	10 μ l 412 μ M DPI, romtemp.	1 μ l PBS	5 μ l DHR	30 og 45	Respiratory burst hemming
$2,63 \times 10^6$ /ml	190	10 μ l 206 μ M DPI, romtemp.	1 μ l PMA	5 μ l DHR	30 og 45	Respiratory burst hemming
$2,63 \times 10^6$ /ml	190	10 μ l 412 μ M DPI, romtemp.	1 μ l PMA	5 μ l DHR	30 og 45	Respiratory burst hemming
$2,63 \times 10^6$ /ml	190	6 μ l PBS	5 μ l DHR	5 μ l 30 % H ₂ O ₂	30 og 45	Positiv DHR kontroll
$2,63 \times 10^6$ /ml	190	1 μ l PBS	5 μ l DHR	10 μ l 30 % H ₂ O ₂	30 og 45	Positiv DHR kontroll
$2,5 \times 10^6$ /ml	200	I romtemp.	—	—	30	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)
$2,5 \times 10^6$ /ml	200	I romtemp.	1 μ l PBS	5 μ l DHR	30	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)
$2,5 \times 10^6$ /ml	200	I romtemp.	1 μ l PMA	5 μ l DHR	30	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)

2.6.2. Respiratory burst assay på leukocytter fra torsk

2.6.2.1. Forarbeid

Leukocytter fra hodenyre og blod fra torsk ble isolert som beskrevet i kapittel 2.2., men leukocytterne ble resuspendert i PBS 380. I optimalisering av metode for respiratory burst assay på leukocytter fra torsk, ble fremgangsmåte for PBL og HKL fra laks, beskrevet i kapittel 2.6.1.3., benyttet som utgangspunkt.

2.6.2.2. Utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst assay

200 µl leukocyttsuspensjon med cellekonsentrasjon på $2,5 \times 10^6$ celler per ml ble inkubert 10 minutter i romtemperatur med vipping (4x/min). Deretter ble 1 µl PMA (1 µg/ml) tilsatt leukocytter i to parallelle rør for å stimulere respiratory burst aktivitet, og leukocytter tilsatt 1 µl PBS 380 i to parallelle rør fungerte som usimulerte kontroller. Etter 5 minutter inkubering i romtemperatur med vipping (4x/min), ble prøvene tilsatt 5 µl 206 µM DHR (5 µM), og inkubert i 30, 45 og 60 minutter før flow cytometrianalyse. Instrumentinnstillingene i flow cytometeret ble justert for torskeleukocytter både med og uten DHR- og PI- merking (se Appendix, Kapittel 6.3.2. for instrumentinnstillinger). I senere forsøk ble det oftest gjort målinger etter 15 og 30 minutter inkubering med DHR.

Det ble også prøvd ulike konsentrasjoner av PMA, og flere reagenser (LPS og POLY I:C), for stimulering av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra torsk:

- ◆ I prøvene ble det tilsatt 1 µl PMA med konsentrasjon på 20,6, 2,06 og 0,206 µg/ml, noe som gav en sluttkonsentrasjon av PMA på 0,1, 0,01 og 0,001 µg/ml (se Appendix, Kapittel 6.1.4.).
- ◆ POLY I:C (polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt, Sigma) stock-løsning ble laget med en konsentrasjon på 206 µg/ml (se Appendix, Kapittel 6.1.4.). 1 µl 206 µg/ml POLY I:C i prøvene gav en sluttkonsentrasjon på 1 µg/ml.
- ◆ LPS (lipopolysakkarid, 0111:B4 fra *Escherichia coli*, Sigma) stock-løsning ble laget med en konsentrasjon på 206 µg/ml (se Appendix, Kapittel 6.1.4.). 1 µl 206 µg/ml LPS i prøvene gav en sluttkonsentrasjon på 1 µg/ml.

Til hvert rør med leukocytter som skulle stimuleres, ble det tilsatt 1 μ l 20,6, 2,06 eller 0,206 μ g/ml PMA (0,1, 0,01 eller 0,001 μ g/ml), 1 μ l 206 μ g/ml LPS (1 μ g/ml) eller 1 μ l 206 μ g/ml POLY I:C (1 μ g/ml). Ustimulerte prøver ble tilsatt 1 μ l PBS 380. Hver reagenstilsetning og konsentrasjon ble tilsatt i to parallelle prøver. Etter tilsetning av stimulant eller PBS 380, ble prøvene inkubert mørkt i 5 minutter, før det ble tilsatt 5 μ l 206 μ M DHR (5 μ M) til hvert rør (tid 0). Ved hver reagenstilsetning ble celsuspensjonene resuspendert med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek), og under inkubering ble prøvene satt på vippebrett (4x/min). Etter 30 og 60 minutter inkubering med DHR ble prøvene analysert ved flow cytometri. Før flow cytometrianalyse ble det tilsatt 200 μ l PBS 380 for å unngå at prøvene ble målt tørre. Rett før flow cytometrianalyse ble prøvene resuspendert med en vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek). Tabell 3 gir en oversikt over forsøksoppsettene brukt under utarbeidingen av respiratory burst assay på leukocytter fra torsk.

Tabell 3: Utprøving av forsøksoppsett av respiratory burst assay på HKL og PBL fra torsk med PMA, POLY I:C og LPS som stimulanter. Måletidspunkt for flow cytometrianalyser er regnet ut fra når DHR ble tilsatt (tid 0).

Tid frem til flow cytometrianalyse



<i>HKL/PBL</i>	<i>Celle-konsentrasjon</i>	<i>Cellesuspensjon per rør (µl)</i>	<i>Inkubering (min)</i>	<i>PBS (µl); ustimulerte celler</i>	<i>Stimulering</i>	<i>Inkubering (min)</i>	<i>DHR^d (µl)</i>	<i>Flow cytometri, måletidspunkt (min)</i>
HKL og PBL	2,5 x 10 ⁶ /ml	200	10	1	—	5	5	15, 30, 45 og 60
HKL og PBL	2,5 x 10 ⁶ /ml	200	10	—	1 µl PMA ^a	5	5	15, 30, 45 og 60
HKL og PBL	2,5 x 10 ⁶ /ml	200	10	—	1 µl POLY I:C ^b	5	5	30 og 60
HKL og PBL	2,5 x 10 ⁶ /ml	200	10	—	1 µl LPS ^c	5	5	30 og 60

^a Sluttkonsentrasjon: 1, 0,1, 0,01 og 0,001 µg/ml

^b Sluttkonsentrasjon: 1 µg/ml

^c Sluttkonsentrasjon: 1 µg/ml

^d Sluttkonsentrasjon: 5 µM

2.6.2.3. Endelig forsøksoppsett for respiratory burst assay på leukocytter fra torsk

Under utprøving av forsøksoppsett for respiratory burst assay på leukocytter fra torsk, ble dette forsøksoppsettet funnet å være mest optimalt, og testet på PBL og HKL fra totalt 11 torsk:

1. Leukocytter ble isolert som beskrevet i kapittel 2.2., og resuspendert i PBS 380.
2. Cellekonsentrasjonen ble justert til $2,5 \times 10^6$ celler per ml, og cellesuspensjonene ble oppbevart på is.
3. 200 μ l leukocyttsuspensjon ble overført til flow cytometri rør og inkubert i romtemperatur i 10 minutter med vipping (4x/min).
4. 1 μ l 20,6 μ g/ml) PMA (0,1 μ g/ml) ble tilsatt i to parallelle prøver for å stimulere respiratory burst aktiviteten hos leukocytene, og 1 μ l PBS 380 ble tilsatt ustimulerte leukocytter i to parallelle prøver. Tilsetningene ble utblandet i prøvene med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek).
5. PMA- og PBS-tilsatte prøver ble inkubert mørkt i 5 minutter i romtemperatur med vipping (4x/min).
6. 5 μ l 206 μ M DHR (5 μ M) ble deretter tilsatt de stimulerede og ustimulerte leukocytene (tid 0), og utblandet i prøvene med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek).
7. I hvert forsøk var det alltid en negativ kontrollprøve uten reagenser tilsatt.
8. Prøvene ble inkubert mørkt i 15 minutter med vipping (4x/min) før flow cytometrianalyse. Før flow cytometrianalyse ble cellene resuspendert med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek).
9. 10 000 celler ble målt i hver prøve ved flow cytometrianalyse. Instrumentinnstillingene i flow cytometeret ble justert etter om prøvene var tilsatt DHR eller ikke (se Appendix, Kapittel 6.3.2. for instrumentinnstillinger).

2.6.2.2. Kontrollforsøk

I utviklingen av respiratory burst assay på torskeleukocytter, ble det som for lakseleukocytter, også utført kontrollforsøk (Tabell 4). Instrumentinnstillinger ved flow cytometeranalyse i kontrollforsøkene er angitt i appendix, kapittel 6.3.2. Følgende kontrollforsøk ble utrettet:

Negativ leukocyt kontroll:

Ustimulerte leukocytter fra PBL og HKL uten DHR tilsatt ble analysert ved flow cytometri med innstillinger for DHR-tilsatte prøver etter 15 minutter inkubering i romtemperatur, mørkt og med vipping (4x/min).

Negativ PMA kontroll:

1 µl 20,6 µg/ml PMA ble satt til 200 µl leukocyttsuspensjon i to parallelle prøver som på forhånd ble inkubert i romtemperatur i 10 minutter. Prøvene ble tilsatt 5 µl PBS 380, og sluttvolumet ble 206 µl. Ved hver tilsetning ble prøvene resuspendert med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek). Sluttkonsentrasjonen av PMA var 0,1 µg/ml i prøvene. Etter tilsetning av PBS 380, ble prøvene inkubert mørkt i romtemperatur med vipping (4x/min) i 15 minutter før flow cytometrianalyse. Ved flow cytometrianalyse av kontrollprøvene med PMA ble det kjørt målinger med instrumentinnstillinger for prøver med og uten DHR tilsatt.

Positiv DHR kontroll:

Som positiv DHR kontroller ble to parallelle prøver tilsatt H₂O₂. Da ble 5 µl PBS 380 eller 5 µl 206 µM DHR tilsatt etter 10 minutter inkubering av 190 µl leukocyttsuspensjon ($2,63 \times 10^6$ celler per ml) i romtemperatur. Etter 5 minutter inkubering ble 5 eller 10 µl 30 % H₂O₂ (0,73 eller 1,46 %) tilsatt i leukocyttsuspensjonene, og sluttvolumet ble justert til 206 µl med PBS 380. Løsningene ble inkubert mørkt i 15 minutter i romtemperatur før analyse ved flow cytometri.

Hemming av respiratory burst:

I negative DHR kontrollprøver ble DPI, som for laks (Kapittel 2.6.1.4.) brukt for å hemme respiratory burst aktiviteten i leukocytter fra torsk. I hvert flow cytometri rør ble det tilsatt 10 µl 412 DPI (20 µM), og deretter ble det tilført 190 µl

leukocytlløsning med cellekonsentrasjon på $2,63 \times 10^6$ celler per ml. Prøvene ble inkubert i 10 minutter i romtemperatur med vipping (4x/min). Så ble det tilsatt 1 μ l 20,6 μ g/ml PMA (0,1 μ g/ml) eller 1 μ l PBS, ettersom det skulle forsøkes å stimulere respiratory burst aktiviteten hos leukocytene eller ikke. Deretter ble det i den ene delen av kontrollforsøket tilsatt 5 μ l PBS, mens det i den andre delen ble tilsatt 5 μ l 206 μ M DHR (5 μ M) (tid 0). Etter hver tilsetning av reagenser ble prøvene resuspendert med vortexmaskin (1400 rpm i 3 sek). Cellene ble inkubert mørkt i 15 minutter med vipping (4x/min) før flow cytometrianalyse.

Celledødkontroll:

I alle forsøksoppsett og alle kontrollforsøk med leukocytter fra torsk ble det tilsatt propidium iodide (PI) i prøvene for å merke døde celler. Dette ble gjort for å se hvor de PI-positive leukocytene lå i FSC/SSC dot plotene, og for å ekskludere de døde cellene fra forsøksresultatene i analysene. Samtidig ble PI brukt som et kvalitativt verktøy for å se hvor mange celler døde i stimuleringsforsøkene med ulike konsentrasjoner av PMA. Sluttkonsentrasjonen av PI ble alltid justert til 2 μ g/ml. PI ble tilsatt etter ferdig inkubering regnet ut fra siste tilsetning av reagens (tid 0). Cellene ble inkubert mørkt i 5 minutter på is med vipping (4x/min) før flow cytometrianalyse.

Dersom det var nok celleløsning igjen etter flow cytometrianalyse, ble cellene målt i CASY celledetelleren for å kunne sammenligne celleviabiliteten med antall PI-merkede celler registrert i flow cytometeret.

For hvert kontrollforsøk ble det alltid utført et parallelt standard forsøksoppsett (Kapittel 2.6.2.3.) fra samme fisk. Dette ble gjort for å analytisk kunne sammenligne effektene av reagensene tilsatt i kontrollprøvene, med de opprinnelige effektene av DHR-merkede respiratory burst aktiverte leukocytter isolert fra samme fisk.

Tabell 4: Kontrollforsøk utført ved optimalisering av respiratory burst assay for PBL og HKL fra torsk. I de første forsøkene ble prøvene tilsatt 1 μ l 206 μ g/ml PMA (1 μ g/ml). Siden ble PMA-konsentrasjoner på 0,1, 0,01 og 0,001 μ g/ml prøvd ut. 1 μ l 206 μ g/ml POLY I:C og LPS (1 μ g/ml) ble også brukt. I alle forsøkene ble 5 μ l 206 μ M DHR (5 μ M) brukt. Ved hemming av DHR ble 10 μ l 412 μ M DPI (20 μ M) tilsatt prøvene. Ved merking av døde celler ble prøvene tilsatt 4,12 μ l 100 μ g/ml PI (2 μ g/ml). Måletidspunkt er regnet ut fra tilsetning av siste reagens (PMA, DHR, H₂O₂ eller PBS 380) i prøvene (tid 0).

Tid frem til flow cytometrianalyse



Celle-konsentrasjon	Celleløsning (μ l)	Inkubering, 10 min	Inkubering, 5 min	Tilsetning	Flow cytometri måletidspunkt (min)	Merknader
2,5 x 10 ⁶ /ml	200	—	—	—	15, 30, 45 og 60	Negativ kontroll
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	10 μ l PBS	1 μ l PMA	5 μ l PBS	15, 30, 45 og 60	Negativ PMA kontroll
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	6 μ l PBS	5 μ l DHR	5 μ l 30 % H ₂ O ₂	15	Positiv DHR kontroll
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	1 μ l PBS	5 μ l DHR	10 μ l 30 % H ₂ O ₂	15	Positiv DHR kontroll
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	10 μ l 412 μ M DPI	1 μ l PBS	5 μ l DHR	15	Respiratory burst hemming
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	10 μ l 412 μ M DPI	1 μ l PMA	5 μ l DHR	15	Respiratory burst hemming
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	10 μ l 412 μ M DPI	6 μ l PBS	—	15	Respiratory burst hemming
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	—	—	—	15	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	10 μ l PBS	1 μ l PMA	—	15	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)
2,5 x 10 ⁶ /ml	200	—	1 μ l POLY I:C	—	60	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)
2,5 x 10 ⁶ /ml	200	—	1 μ l LPS	—	60	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	10 μ l PBS	1 μ l PBS	5 μ l DHR	15	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)
2,63 x 10 ⁶ /ml	190	10 μ l PBS	1 μ l PMA	5 μ l DHR	15	Celledødkontroll, tilsatt PI (2 μ g/ml)

2.7. Fluorescensmikroskopi av respiratory burst stimulerte leukocytter fra laks og torsk merket med DHR

Cytospinpreparater med DHR-merkede leukocytter ble laget, basert på en tidligere publisert metode (Szucs *et al.*, 1997). Leukocytter fra hodenyre og blod hos laks og torsk ble isolert som ved flow cytometri forsøk (Kapittel 2.6.), og cellekonsentrasjonen ble justert til $2,5 \times 10^6$ celler per ml. Deretter ble det utført et respiratory burst assay for laks (Kapittel 2.6.1.3.) og torsk (Kapittel 2.6.2.3.), der 200 μ l celledøsning ble inkubert i romtemperatur i 10 minutter, før leukocytene ble stimulert med 1 μ l PMA (1 μ g/ml for lakseleukocytter, og 0,1 μ g/ml for torskeleukocytter). Cellene ble videre inkubert i 5 minutter i romtemperatur med vipping (4x/min). Så ble 5 μ l 206 μ M DHR (5 μ M) tilsatt, og cellene ble inkubert mørkt med vipping (4x/min) i romtemperatur i 30 minutter for lakseleukocytter, og 15 minutter for torskeleukocytter, før rørene ble satt på is. Til noen prøver med torskeleukocytter ble det etter tilsetning av DHR og inkubering i 15 minutter, tilsatt 4,12 μ l 100 μ g/ml PI (2 μ g/ml). Prøvene ble videre inkubert på is i 5 minutter.

Prøvene ble etter inkubering tilsatt 300 μ l PBS 380, som gav en cellekonsentrasjon på rundt 1×10^6 celler per ml. Cytospinpreparater ble laget som beskrevet i kapittel 2.4. Etter en tørketid på 1 time i mørke ble det forsiktig montert dekkglass på preparatene.

På preparater av torskeleukocytter ble det etter tilsetning av DHR og inkubering i 15 minutter, tilsatt 4,12 μ l 100 μ g/ml PI, slik at sluttkonsentrasjonen av PI ble 2 μ g/ml. Rørene ble inkubert 5 minutter på is før det ble laget cytospinpreparater.

Etter montering ble preparatene studert i et fluorescensmikroskop (Axioskop 2 plus, Zeiss), og det ble tatt bilder med et mikroskopkamera (DS-5M-U1, Nikon).

2.8. Stimulering av leukocytter fra laks og torsk med bakterien *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis*

2.8.1. Dyrking av bakterien *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*

Dyrking av bakterien *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er basert på metoder brukt i masteroppgave av Kolstø (2008).

Bakterien ble dyrket i Eugon Broth flytende medium (Becton Dickinson) tilsatt 2mM jernklorid (Fluka) og 50 μ g/ml ampicillin (Sigma) i erlenmeyerkolber ved 20 °C under risting

(150 rpm) (se Appendix, Kapittel 6.2.1.). Bakterier ble overført til ny hovedkultur for å holde OD_{600 nm}-verdi målt i et spektrofotometer (U-1100, Hitachi) mellom 1,5 og 1,8. Disse OD_{600 nm}-verdiene er definert som det tidspunktet da bakterien er i den øvre delen av den eksponentielle vekstfasen ut fra utarbeidet vekstkurve på bakterien (Kolstø, 2008; Furevik, 2009). Det ble brukt bakterier fra kulturer med OD_{600 nm}-verdier innenfor disse grensene i forsøk og ved overføring til ny kultur, for å være trygg på å få bakterier som var i samme stadie. I tillegg var trolig disse bakteriene mest fysiologisk like, og det ble unngått at svake eller døde bakterier ble overført til nye kulturer.

2.8.2 Respiratory burst assay på leukocytter fra blod og hodenyre fra laks og torsk etter *in vitro* stimulering med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*

Forsøk med bakterieinkubering av leukocytter fra laks og torsk, er basert på metode publisert i artikkel av Katzenback og Belosevic (2009), om stimulering av leukocytter fra gullfisk (*C. auratus* L.) med bakterien *Aeromonas salmonicida* A449, og påfølgende DHR-tilsetning. For påvisning av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk inkubert med bakterien *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, ble det benyttet respiratory burst assay med DHR-tilsetning utarbeidet i denne oppgaven (se Kapittel 2.6.1.3. og 2.6.2.3. for beskrivelse av respiratory burst assay for leukocytter fra henholdsvis laks og torsk).

PBL og HKL fra 2 laks og 2 torsk ble isolert på samme måte som beskrevet i kapittel 2.2. Etter isolering ble leukocytterne resuspendert i L-15 medium uten gentamicin. Celletallet ble justert til 5×10^6 celler per ml, og cellesuspensjonene ble oppbevart på is.

Bakterieløsning (*F. philomiragia* subsp. *noatunensis*) fra en hovedkultur med OD_{600 nm}-verdi mellom 1,5 og 1,8 ble fortynnet i L-15 uten gentamicin til OD_{600 nm}-verdi 0,4 (se Appendix, Kapittel 6.2.2. for utregning av bakteriekonsentrasjon). Deretter ble bakterien inkubert ved 20 °C under risting (150 rpm) frem til overføring av bakterier til leukocyttsuspensjonene (maksimalt 1 time).

500 µl leukocytter løst i L-15 uten gentamicin (5×10^6 celler per ml) ble tilsatt fem flow cytometri rør. To av rørene ble tilsatt 500 µl L-15 uten gentamicin og merket usmittede kontroller, og tre rør ble tilsatt 500 µl bakterieløsning med OD_{600 nm}-verdi 0,4, slik at OD_{600 nm}-verdien i de bakterieinkuberte prøvene ble 0,2. Bruken av denne OD_{600 nm}-verdien ved smitteforsøk med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* på leukocytter, og inkuberings-

betingelsene, er basert på forsøk utført i upublisert studie utført av Furevik (2009). Deretter ble leukocytene med og uten bakterier inkubert i 1 eller 4 timer ved 12 °C.

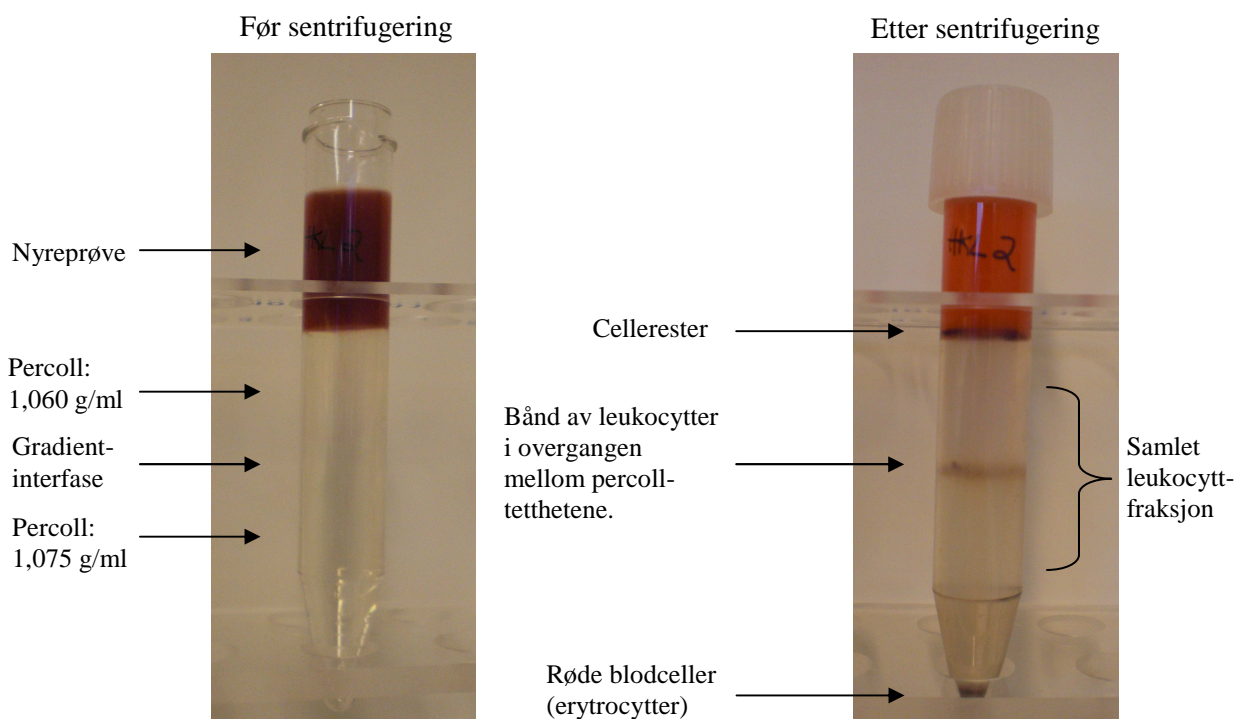
Etter inkubering ble leukocytene lagt på hver sin PBS/3 % BSA /4,5 % glukose-gradient (se Appendix, Kapittel 6.1.3.), og sentrifugert ved 100 x g og 4 °C i 10 minutter for å redusere antall eventuelle ekstracellulære bakterier. Supernatanten ble fjernet, og cellepelletene ble resuspendert i 0,9 ml PBS 380, for å få en cellekonsentrasjon på rundt $2,5 \times 10^6$ celler per ml. Deretter ble et standard forsøksoppsett på respiratory burst assay med og uten PMA-stimulering for lakse- og torskeleukocytter satt opp, som beskrevet i kapittel 2.6.1.3. for laks, og kapittel 2.6.2.3. for torsk.

Flow cytometri resultatene ble videre analysert i FCS express. Ved beregning av prosentandel RHO-positive leukocytter ble de DHR-tilsatte (5 µM), ustimulerte leukocytene i PBS 380 uten bakterieinkubering, satt som negative for respiratory burst aktivitet (RHO-negative), der tillatt andel RHO-positive celler ble satt til 2 %, som i tidligere forsøk. Ved å bruke de ustimulerte leukocytene uten bakterieinkubering kunne eventuell stimulering gjort av bakterier i de bakterieinkuberte leukocytene detekteres.

3. Resultater

3.1. Isolering av leukocytter fra laks og torsk

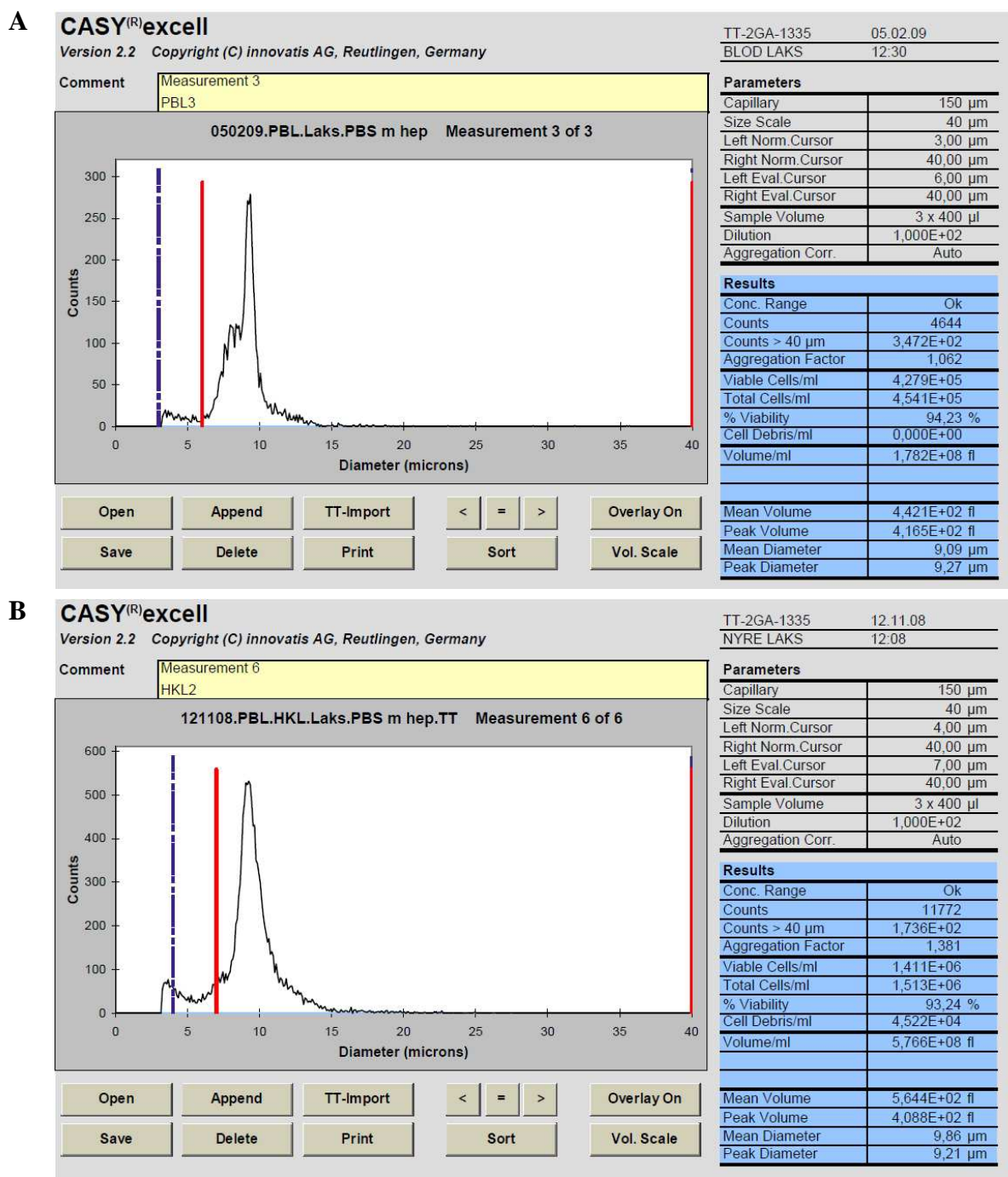
Etter sentrifugering av fortynnede blod- og hodenyreprøver på Percoll-gradient dannet det seg et synlig bånd av leukocytter i interfasen mellom de to Percoll-løsningene med ulik tetthet (Figur 7). Eventuelle cellerester la seg øverst i gradienten, mens erytrocyttene la seg i bunnen av røret.



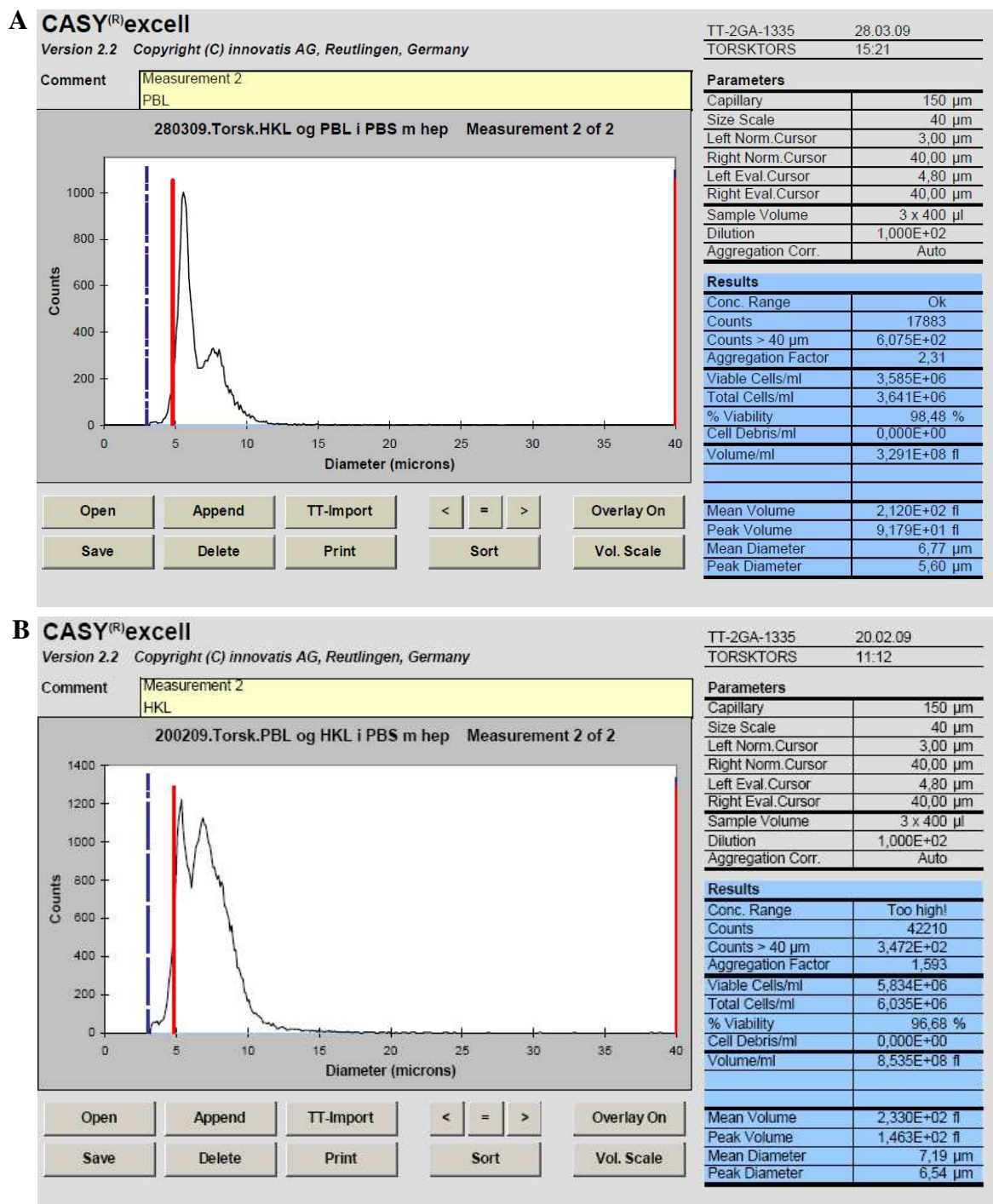
Figur 7: Isolering av leukocytter fra hodenyre (HKL) hos laks. Percoll-gradient før og etter sentrifugering.

3.2. Telling av celler

Figur 8 og 9 viser utskrifter av data fra målinger gjort med CASY celledetektor på leukocytter fra blod og hodenyre fra laks og torsk. CASY-målingene viste at gjennomsnittsdiameteren av lakseleukocytene var 9-10 μm , mens for leukocytter fra torsk var den 5-7 μm . Viabiliteten til leukocytene fra laks og torsk var etter isolering oftest over 90 %. Celleaggregeringen i celleduspensjoner med leukocytter fra laks lå oftest mellom 1,2-1,4, mens aggregeringen i celleduspensjoner av torskeleukocytter ofte kom opp til 2.



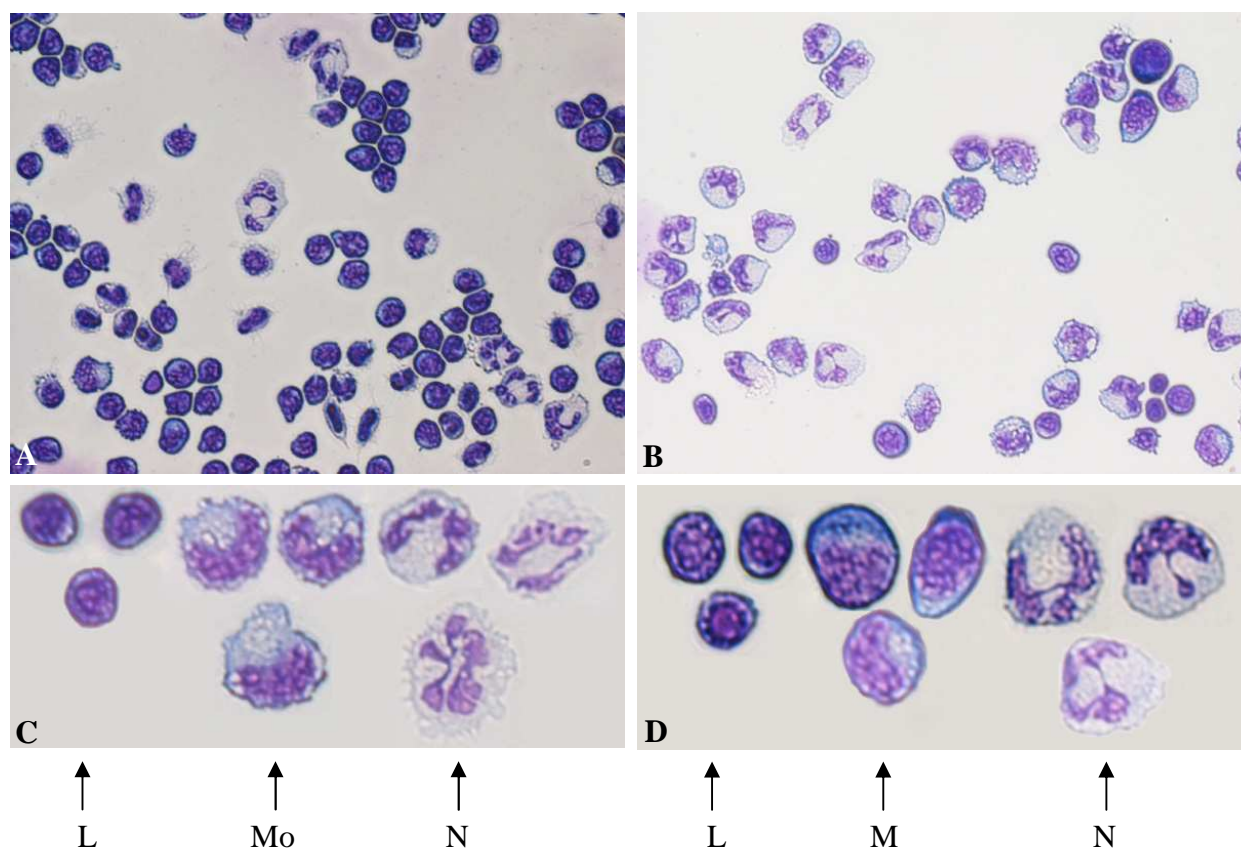
Figur 8: CASY-målinger av PBL (A) og HKL (B) fra laks. Celler plassert mellom den røde og blå linjen i grafene er døde celler, og celler til venstre for den blå linjen er cellerester. I tabellen til høyre i hver figur står det informasjon om totalt antall celler, antall og prosentandel levende celler, den gjennomsnittlige cellestørrelsen, aggregeringsfaktoren og mengde cellerester i prøven.



Figur 9: CASY-målinger av PBL (A) og HKL (B) fra torsk. Celler plassert mellom den røde og blå linjen i grafene er døde celler, og celler til venstre for den blå linjen er cellerester. I tabellen til høyre i hver figur står det informasjon om totalt antall celler, antall og prosentandel levende celler, den gjennomsnittlige cellediameteren, aggregeringsfaktoren og mengde cellerester i prøven.

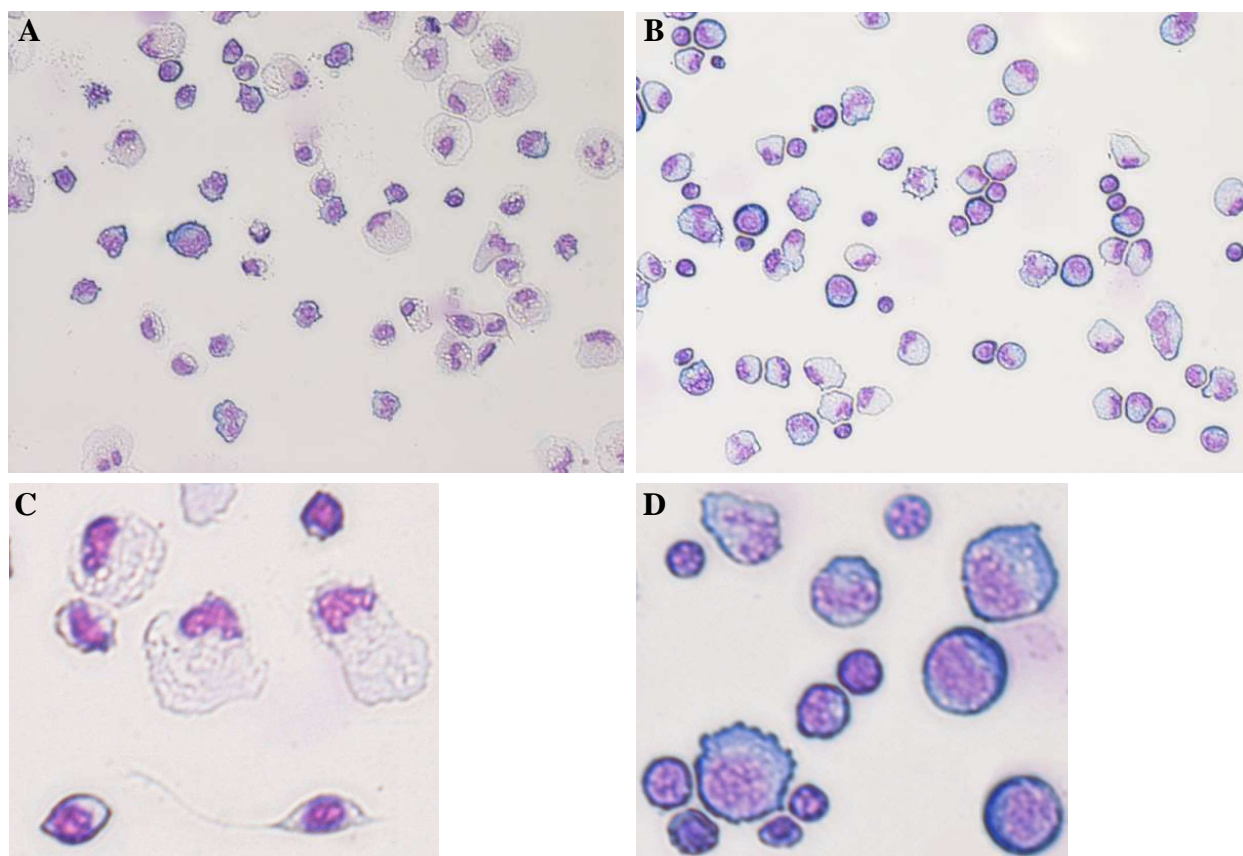
3.3. Cytospinpreparater og farging med Diff-Quick

På de Diff-Quick fargede cytospinpreparatene kunne de ulike leukocytterne observeres. På preparatene av lakseleukocytter (Figur 10) kunne det observeres hovedsaklig tre typer celler i blod og hodenyre; små runde celler med stor kjerne, større mononukleære celler, og polymorfonukleære celler. Dette var trolig henholdsvis lymfocytter, monocytt (blod)/makrofager (hodenyre) og nøytrofile granulocytter.



Figur 10: Diff-Quick fargede PBL (A og C), og HKL (B og D) fra laks, 400x forstørrelse. A og B er oversiktsbilder av PBL (A) og HKL (B). C og D viser ulike PBL (C) og HKL (D) hos laks. Lymfocytter (L), monocytt (Mo), makrofager (M), og nøytrofile granulocytter (N). C og D er redigert i Adobe® Photoshop® CS2 (versjon 9).

På preparater av torskeleukocytter (Figur 11) fra blod og hodenyre var to celletyper svært utpreget; små, runde celler med stor kjerne, og større celler med en liten kjerne uten lobedeling.



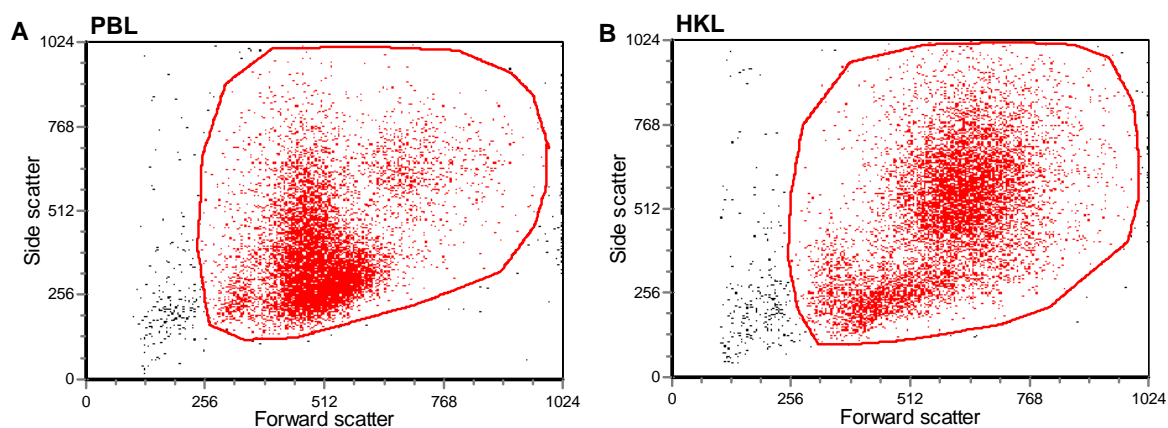
Figur 11: Diff-Quick fargede PBL (A) og HKL (B) fra torsk, 400x forstørrelse. Representative oversiktsbilder av PBL (A) og HKL (B). C og D viser forstørrelser av ulike PBL (C) og HKL (D) fra torsk.

3.4. Flow cytometrianalyser av respiratory burst hos laks

3.4.1. Utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst assay på lakseleukocytter

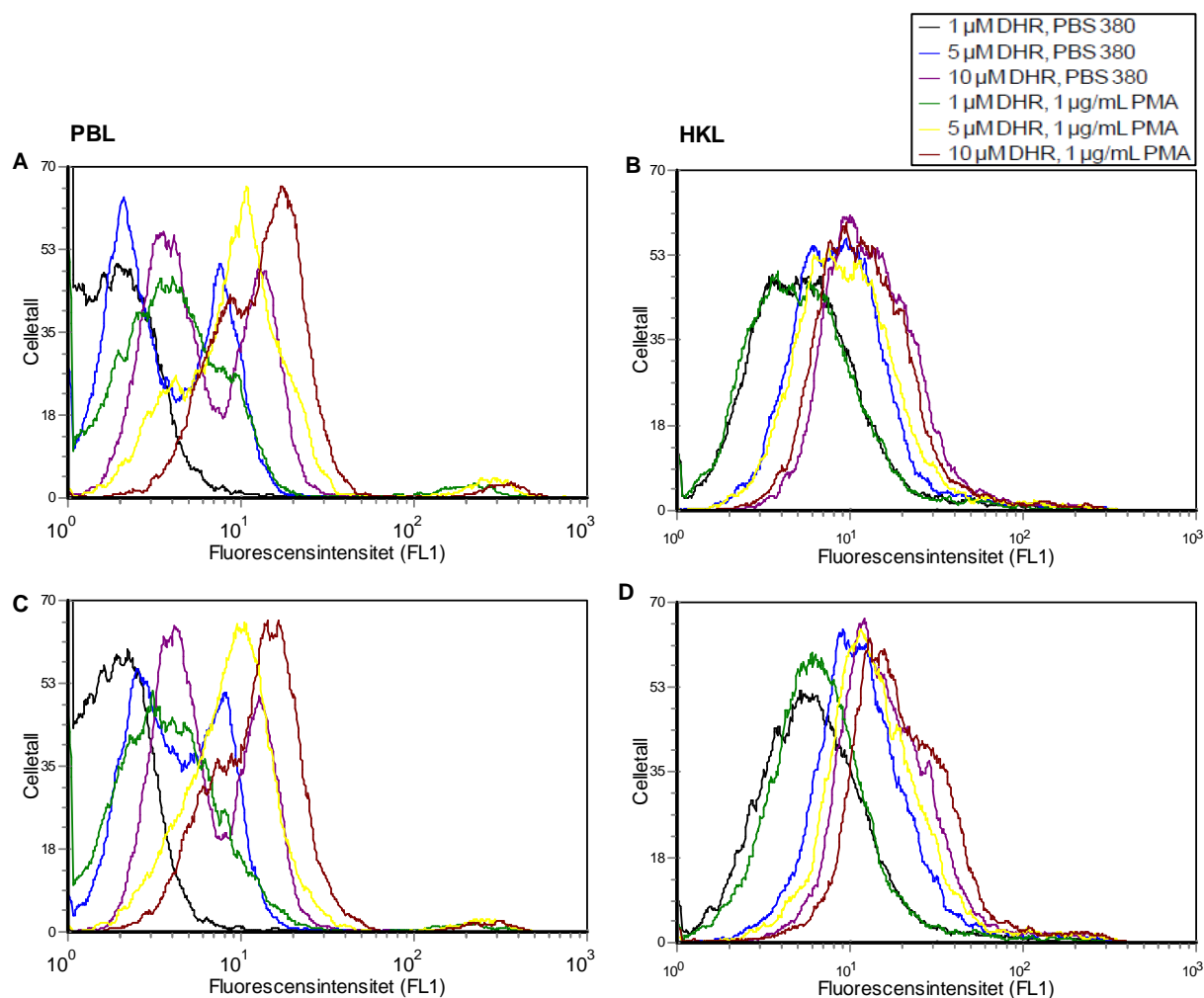
Celldataene fra flow cytometeret fremstilt i dot plot ble først gatet for å unngå data fra døde celler og celleaggregater i grafene over fluorescensverdiene. Figur 12 viser et eksempel på hvordan celledataene ble gatet i dot plotene.

Resultatene fra flow cytometrimålingene ble analysert ved at graden av fluorescens i ustimulerte leukocytter (tilsatt PBS 380 og DHR), ble sammenlignet med graden av fluorescens i stimulerede leukocytter (tilsatt PMA og DHR).



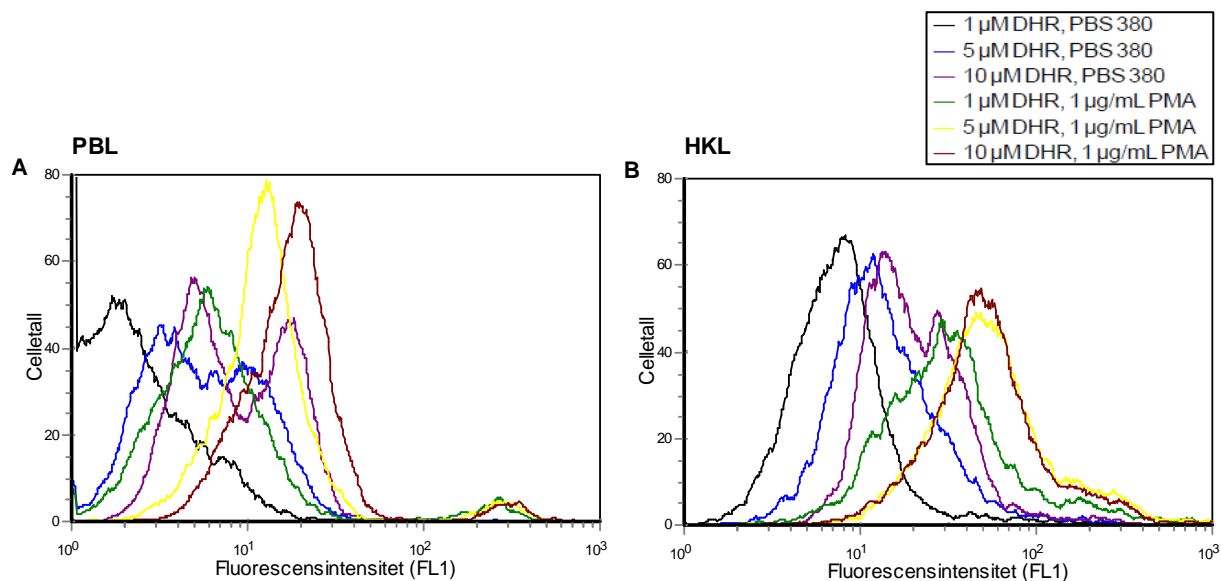
Figur 12: Flow cytometrianalyse av isolerte PBL (A) og HKL (B) fra laks gatet for respiratory burst analyse. Representative størrelse/granularitet (FSC/SSC) dot plot viser rød region som angir gatede leukocytter tatt med i analyse av respiratory burst aktivitet.

I de første forsøkene med PBL og HKL ble det brukt en cellekonsentrasjon på 5×10^6 celler per ml. En konsentrasjon på $2,5 \times 10^6$ celler per ml gav samme resultatet, og ble brukt i videre forsøk. Sammenligning av disse to cellekonsentrasjonene er vist i (Figur 13).



Figur 13: Flow cytometrianalyse av ustimulerte og stimulerte PBL (A og C) og HKL (B og D) fra laks (N = 1), med ulike cellekonsentrasjoner, oppbevart på is. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytene. Cellesuspensjonene med cellekonsentrasjon $2,5 \times 10^6$ celler per ml (A og B), og $5,0 \times 10^6$ celler per ml (C og D) ble oppbevart på is før DHR tilsetning. Prøvene ble tilsatt DHR (1, 5 eller 10 μM) 5 minutter før stimulering med PMA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ustimulerte leukocytter ble kun tilsatt DHR (1, 5 eller 10 μM). Flow cytometrianalyse etter 15 minutter inkubering med PMA.

De første resultatene fra flow cytometrianalysene med ulike konsentrasjoner DHR tilsatt (1, 5 eller 10 μM), viste stor variasjon i fluorescensintensitet for PBL i forhold til HKL (Figur 13 og 14). Den videre metodeutprøvingen ble derfor utført på HKL.

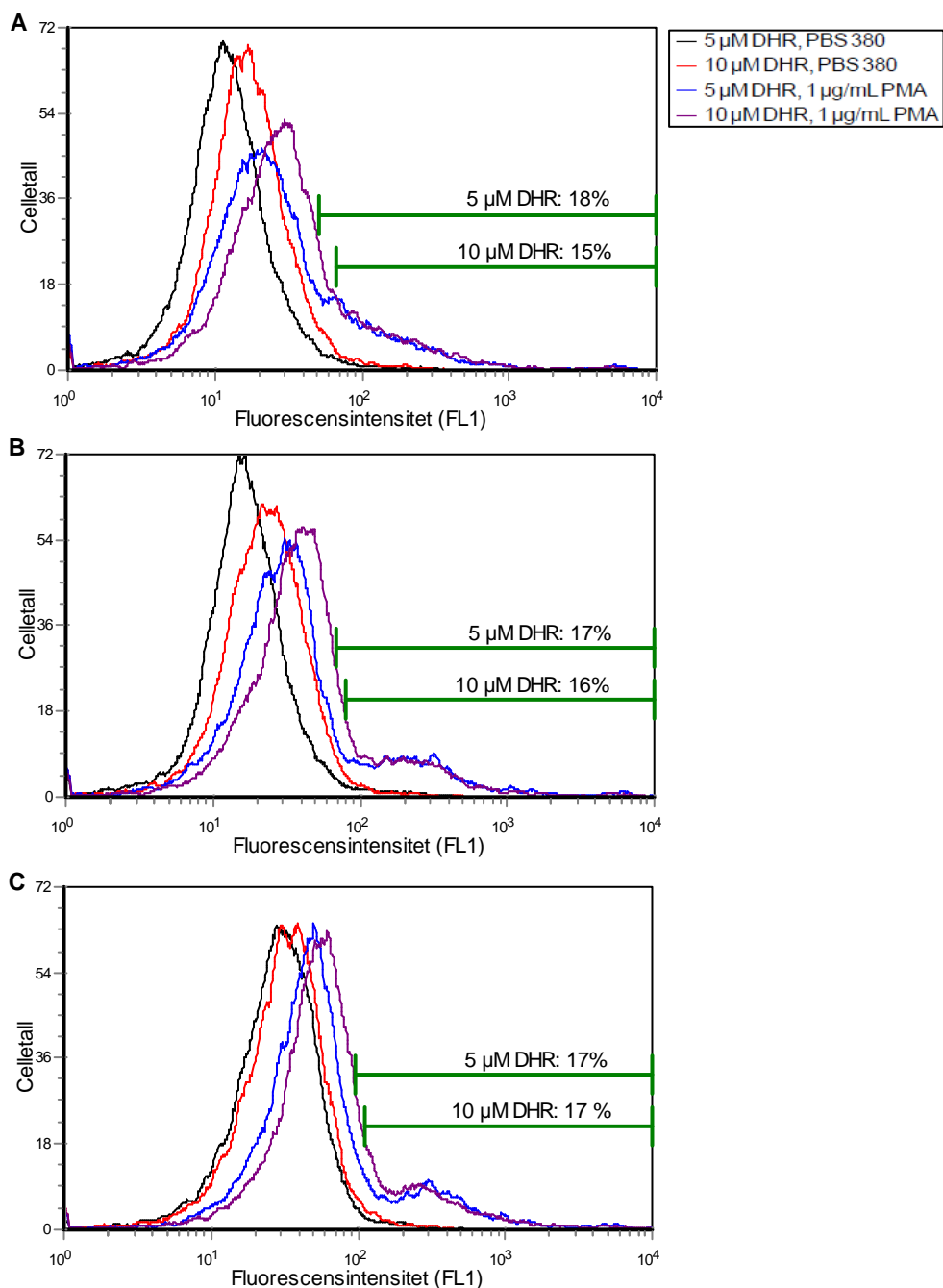


Figur 14: Flow cytometrianalyse av PBL (A) og HKL (B) ($2,5 \times 10^6$ celler per ml) fra laks ($N = 1$), inkubert 10 minutter i romtemperatur før tilsetning av DHR. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytene. Cellesuspensjonene ble inkubert i 10 minutter i romtemperatur før tilsetning av DHR (1, 5 eller 10 μM), og videre inkubert i 5 minutter før stimulering med PMA (1 $\mu\text{g/ml}$). Ustimulerte leukocytter ble kun tilsatt DHR (1, 5 eller 10 μM). Flow cytometrianalyse etter 15 minutter inkubering med PMA.

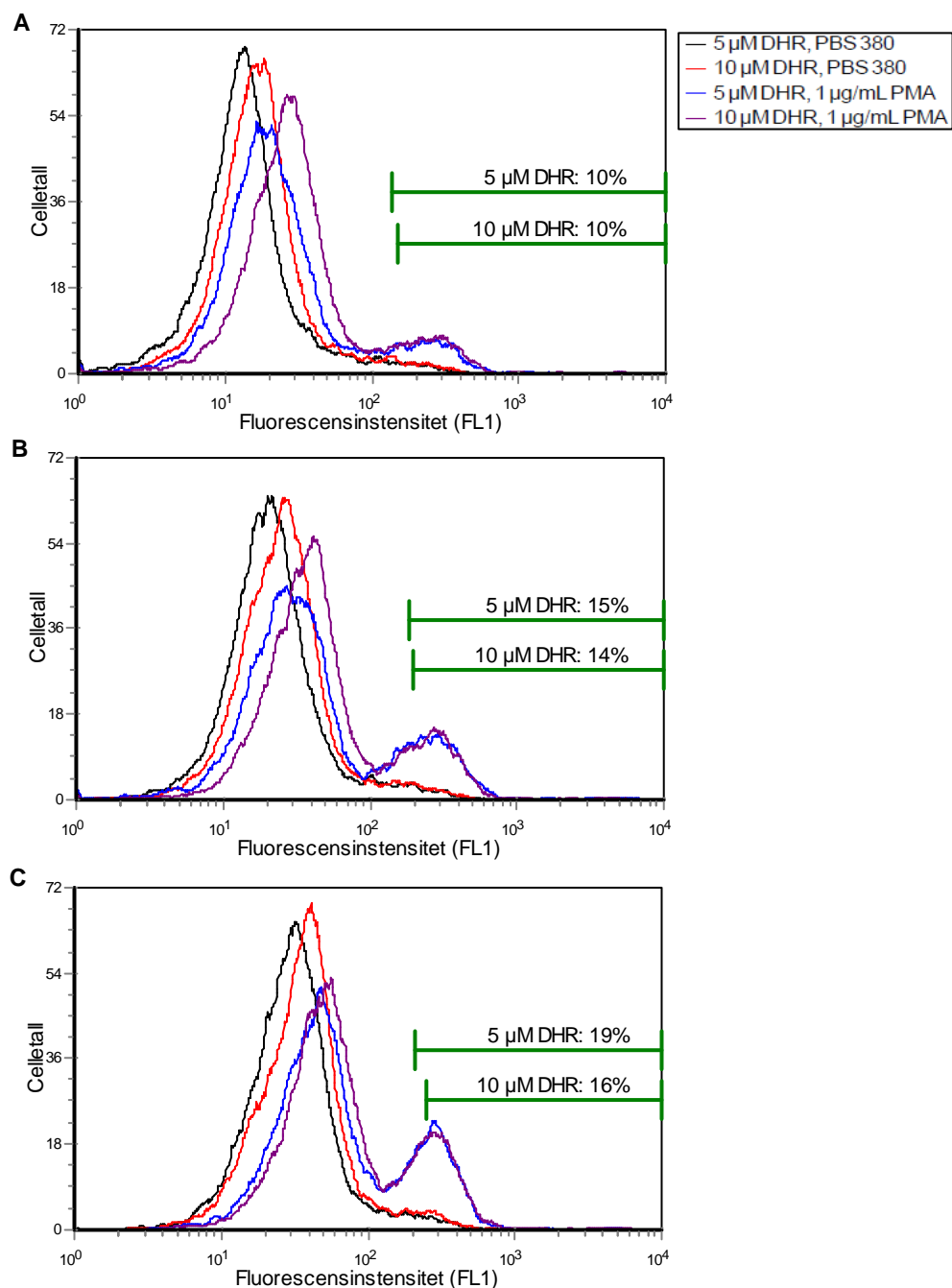
Ved en DHR-sluttkonsentrasjon på 1 μM i prøvene viste flow cytometrianalyser at fluorescensgraden var lavere hos stimulerte leukocytter i forhold til de ustimulerte. Dette avvok fra analyser av prøver tilsatt 5 og 10 μM , der fluorescensgraden hos de stimulerte leukocytene var høyere enn hos de ustimulerte.

Det ble også funnet en større forskjell i fluorescensintensiteten mellom stimulerte og ustimulerte leukocytter når cellesuspensjonene ble inkubert 10 i romtemperatur før tilsetning av DHR (Figur 14), enn når DHR ble tilsatt direkte etter at cellesuspensjonene ble overført fra is (Figur 13). På bakgrunn av disse resultatene ble cellene inkubert 10 minutter i romtemperatur før tilsetning av reagenser, og det ble tilsatt DHR-konsentrasjoner på 5 og 10 μM videre i metodeutprøvingen.

Videre ble det utprøvd lengre inkuberingsperioder etter den siste reagenstilsetningen (tid 0) på 30, 45 og 60 minutter. Samtidig ble det prøvd ut flere forsøksoppsett der DHR ble tilsatt 5 minutter før (Figur 15), samtidig med (Figur 16), eller 5 minutter etter 1 μl PBS 380 (ustimulert) eller 1 μl PMA (stimulert) (Figur 17).



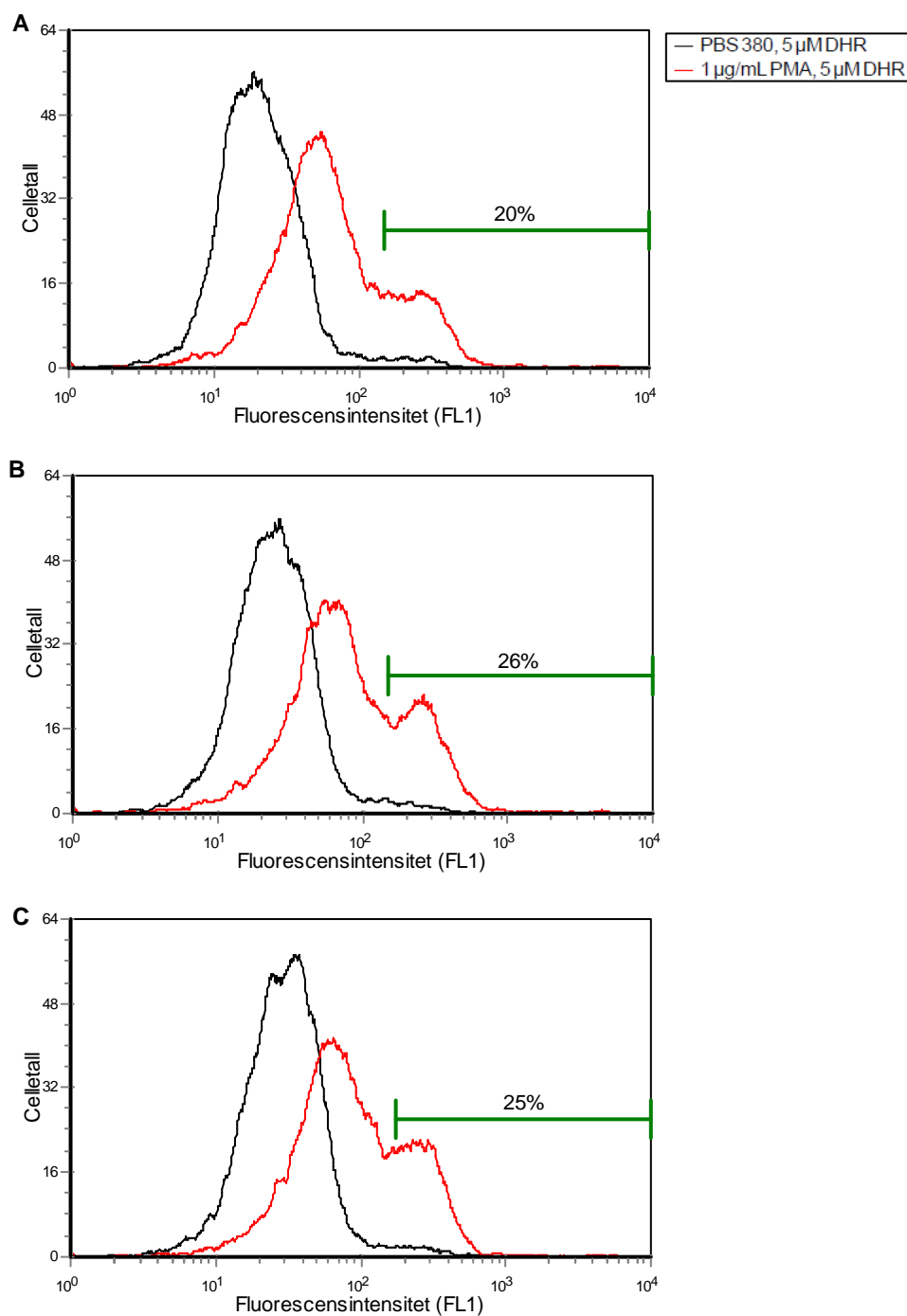
Figur 15: Flow cytometrianalyse av HLK ($2,5 \times 10^6$ celler per ml) fra laks ($N = 1$) tilsatt ulike konsentrasjoner DHR før PMA-stimulering. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til cellene. Leukocytterne ble inkubert i 5 minutter med DHR (5 eller 10 μ M), før stimulering med PMA (1 μ g/ml). Ustimulerte leukocytter ble kun tilsatt DHR (5 og 10 μ M). Flow cytometrianalyse etter 15 (A), 30 (B) og 45 (C) minutter inkubering med PMA. Grønne histogrammarkører angir prosentandel RHO-positive celler i de stimulerede prøvene.



Figur 16: Flow cytometrianalyse av HKL ($2,5 \times 10^6$ celler per ml) fra laks ($N = 1$) tilsatt ulike konsentrasjoner DHR samtidig med PMA-stimulering. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensitet til leukocytene. Leukocytene ble tilsatt DHR (5 eller 10 μ M), og stimulert med PMA (1 μ g/ml) samtidig. Ustimulerte leukocytter ble kun tilsatt DHR (5 og 10 μ M). Flow cytometrianalyse etter 15 (A), 30 (B) og 45 (C) minutter etter tilsetning av reagenser. Grønne histogrammarkører angir prosentandel RHO-positive celler i de stimulerte prøvene.

Flow cytometrianalyser av prøver med 5 og 10 μM DHR tilsatt 5 minutter før eller samtidig med PMA (stimulerte HKL) eller PBS 380 (ustimulerte HKL), viste ikke forskjell i prosentandel RHO-positive leukocytter. Det ble derfor videre i metodeutprøvingen brukt DHR-konsentrasjon på 5 μM i prøvene.

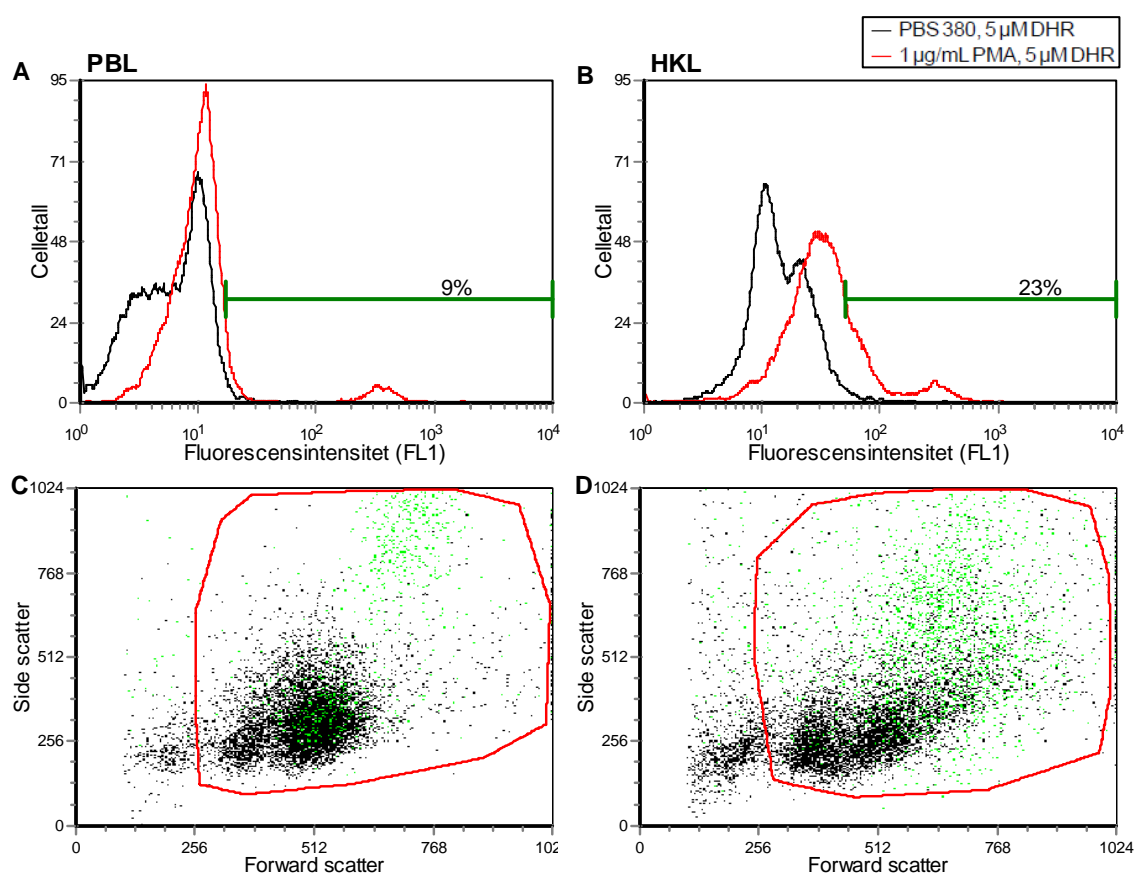
Prosentandel RHO-positive HKL i flow cytometrianalyser etter 15, 30 og 45 minutter av prøver tilsatt DHR 5 minutter før (Figur 15), eller samtidig med PMA (Figur 16), viste en lavere andel RHO-positive celler sammenlignet med prøver stimulert med PMA i 5 minutter før tilsetning av DHR (Figur 17). Forsøket med PMA-stimulering før tilsetning av DHR ble utført på 3 laks, og analysert ved flow cytometri etter 30, 45 og 60 minutter inkubering med DHR. Ved flow cytometrianalyse etter 15 minutter inkubering med DHR, viste resultatene stor variasjon og lave verdier for RHO-positive celler. På bakgrunn av dette ble tidspunktet for flow cytometrianalyse på 15 minutter byttet ut med en analyse etter 60 minutter inkubering.



Figur 17: Flow cytometrianalyse av HKL ($2,5 \times 10^6$ celler per ml) fra laks ($N = 1$) stimulert med PMA før DHR-tilsetning. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytterne. Stimulerte leukocytter ble tilsatt PMA (1 μ g/ml) 5 minutter før tilsetning av DHR (5 μ M). Ustimulerte leukocytter ble kun tilsatt DHR (5 μ M). Flow cytometrianalyse etter 30 (A), 45 (B) og 60 (C) minutter inkubering med DHR. Grønne histogrammarkører angir prosentandel RHO-positive stimulerte HKL.

RHO-positive PBL la seg annerledes i scatter plot enn RHO-positive HKL (Figur 18). RHO-positive PBL la seg i to populasjoner i forhold til de RHO-negative leukocytene i FSC/SSC dot plotene. Den ene cellepopulasjonen hadde lave side scatter-verdier, og noe høyere forward scatter-verdier, noe som betyr liten grad av granularitet, og middels størrelse. Den andre populasjonen la seg høyt oppe på side scatter-aksen, og noe høyere oppe på forward scatter-aksen, og disse cellene var dermed mer granulære og forholdsvis store.

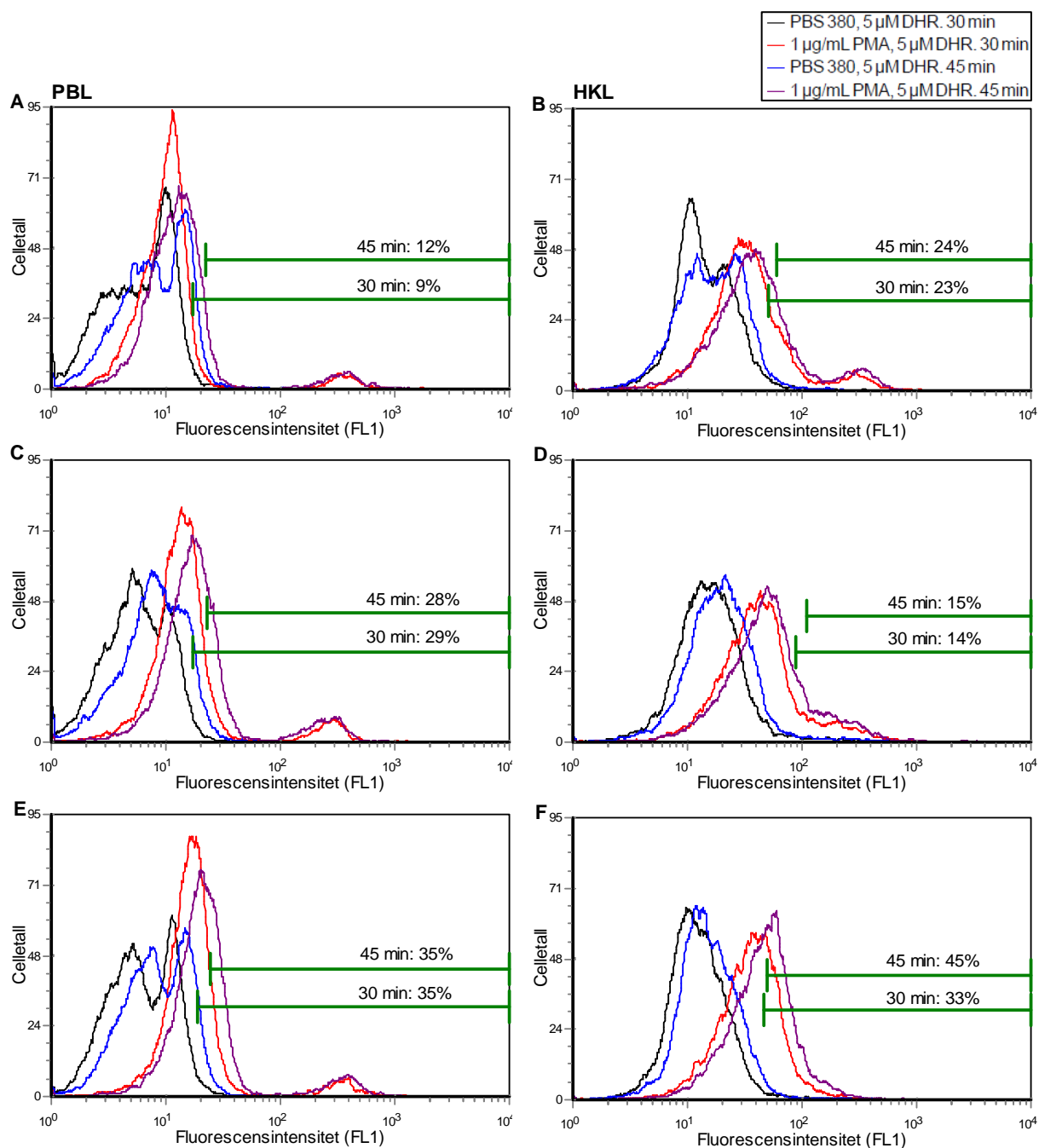
RHO-positive HKL la seg mer spredt i den øvre delen av FSC/SSC dot plotene, og disse cellene hadde dermed ulik grad av granularitet og varierende størrelse.



Figur 18: Flow cytometrianalyser av DHR-tilsatte ustimulerte og stimulerede PBL (A og C) fra samme laks, og HKL (B og D) fra samme laks (N = 2). Representative FL1-histogrammer viser RHO-fluorescensintensitet til leukocytene. Grønne histogrammarkører angir prosentandel RHO-positive stimulerede leukocytter. Representative FSC/SSC dot plot viser plasseringen av RHO-positive PBL (C) og HKL (D) (grønnfargede), angitt av markørene i FL1-histogrammene av henholdsvis PBL (A) og HKL (B). Analysene i figurene er fra målinger av samme prøver fra PBL (A og C) og HKL (B og D). Rød gate i dot plotene (C og D) angir leukocytter analysert for respiratory burst aktivitet.

3.4.2. Optimalisering av endelig forsøksoppsett for respiratory burst assay på lakseleukocytter

Ut fra forsøksresultater presentert i figur 17, ble det bestemt å gå videre med forsøksoppsettet der leukocytene etter inkubering i romtemperatur i 10 minutter ble stimulert med PMA (1 µg/ml), eller bare tilsatt PBS 380 (ustimulerte prøver), og inkubert i 5 minutter, og deretter tilsatt DHR (5 µM). Dette ble gjort med HKL og PBL fra 3 laks i flere forsøk, der fluorescensintensiteten til leukocytene ble analysert ved flow cytometri etter 30, 45 og 60 minutter inkubering med DHR. Resultater av flow cytometrianalyser etter 30 og 45 minutter inkubering er vist i figur 19.



Figur 19: Flow cytometrianalyser av respiratory burst aktivitet hos PBL (A, C og E) og HKL (B, D, F) ($2,5 \times 10^6$ celler per ml) fra 3 laks ved ulike inkuberingstider med DHR. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytene. Et standard respiratory burst assay for leukocytene ble gjennomført. Flow cytometrianalyser 30 og 45 minutter etter tilsetning av DHR. Grønne histogrammarkører angir prosentandel RHO-positive stimulerte leukocytter.

Ut fra resultatene fra flere forsøk basert på samme oppsett som i figur 19, men med flow cytometrianalyser også etter 60 minutter, ble det regnet ut den gjennomsnittlige prosentandelen RHO-positive celler både på PBL og HKL fra laks. I målingene av RHO-positive leukocytter i stimulerte prøver ble en overlapping på 2 % RHO-positive ustimulerte leukocytter tillatt. Verdiene fra forsøk der PBL og HKL ble stimulert med PMA (1 µg/ml) i 5 minutter før tilsetning av DHR (5 µM) er presentert i tabell 6 og figur 20. Et klart trekk var at antall RHO-positive celler gikk ned, mens den geometriske middelveiden av fluorescensintensiteten til de RHO-positive leukocytene (GMFI, geometric mean fluorescence intensity) gikk opp over tid.

Den gjennomsnittlige prosentandelen RHO-positive stimulerte PBL var høyest etter 30 minutter DHR-inkubering, da den var 22 ± 11 % (N = 16), mens verdien etter 45 minutter var 20 ± 12 % (N = 16). Etter 60 minutter var den gjennomsnittlige prosentandelen RHO-positive PBL på 14 ± 11 % (N = 6). Etter 30 minutter viste stimulerte HKL tilsatt DHR høyest andel av fluorescerende RHO-positive celler, med et gjennomsnitt på 27 ± 14 % (N = 15). Etter 45 minutter inkuberingstid med DHR var 25 ± 14 % av stimulerte HKL RHO-positive (N = 14), mens etter 60 minutter var 15 ± 6 % HKL RHO-positive (N = 7).

Fluorescensintensiteten (GMFI) for RHO-positive PBL og HKL fra laks økte over tid, og verdiene for PBL var rundt 63 ± 41 etter 30 minutter (N = 16), 86 ± 43 etter 45 minutter (N = 16), og 105 ± 39 etter 60 minutter inkubering (N = 6). For HKL var verdiene 152 ± 70 etter 30 minutter (N = 15), 194 ± 66 etter 45 minutter (N = 14), og 251 ± 53 etter 60 minutter inkubering (N = 7).

Siden hensikten var å påvise respiratory burst aktivitet hos stimulerte leukocytter ved hjelp av RHO-positive celler, ble det bestemt at leukocytene skulle inkuberes i 30 minutter med DHR før flow cytometrianalyse. Forsøksoppsettet beskrevet i kapittel 2.6.1.3. ble prøvd ut på PBL fra 16 laks, og HKL fra 15 laks.

Med bakgrunn i disse resultatene vil analyser fra flow cytometrimålinger av kontrollprøver fremstilles fra målinger etter 30 minutter inkubering med DHR.

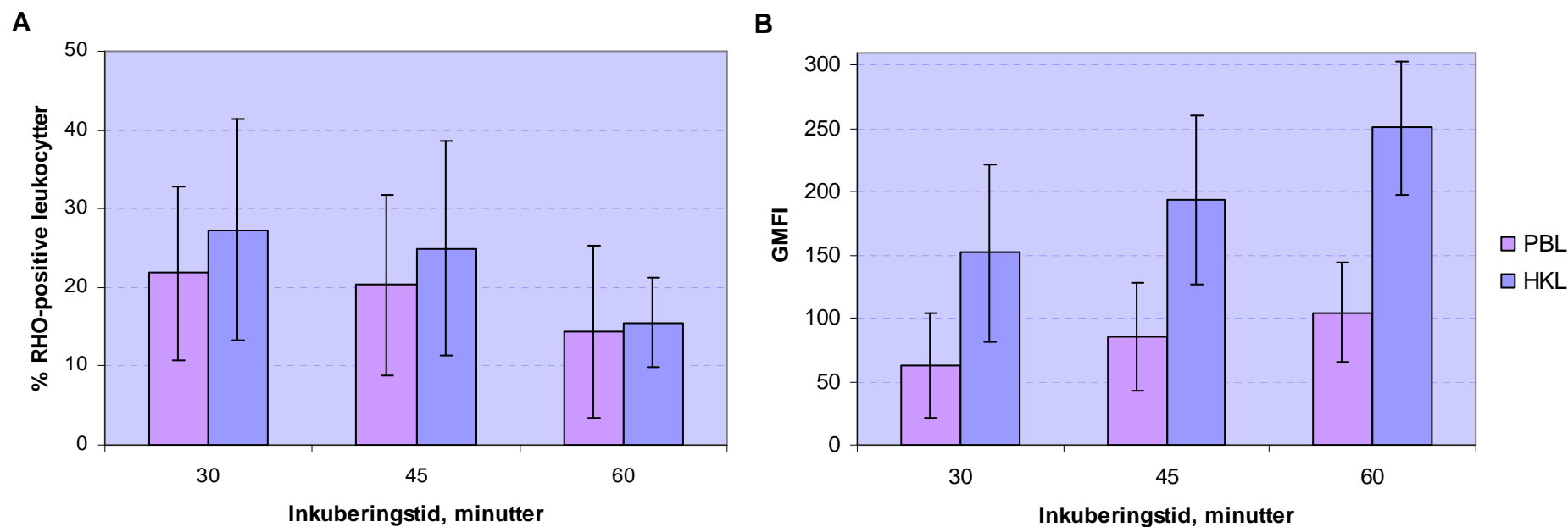
Tabell 6: Prosentandel RHO-positive leukocytter, og geometrisk middelverdi av fluorescensintensitet (GMFI) hos PMA-stimulerte PBL og HKL fra laks tilsatt DHR, og analysert ved flow cytometri. (Gjennomsnitt \pm standardavvik).

Minutter	PBL		HKL	
	% RHO-positive celler	GMFI av RHO-positive celler	% RHO-positive celler	GMFI av RHO-positive celler
30 ^a	22 \pm 11	63 \pm 41	27 \pm 14	152 \pm 70
45 ^b	20 \pm 12	86 \pm 43	25 \pm 14	194 \pm 66
60 ^c	14 \pm 11	105 \pm 39	15 \pm 6	251 \pm 53

^a PBL: N = 16, HKL: N = 15

^b PBL: N = 16, HKL: N = 14

^c PBL: N = 6, HKL: N = 7



Figur 20: RHO-positive PBL og HKL fra laks i standard respiratory burst assay (**A**), og geometrisk middelverdi av fluorescensintensiteten til RHO-positive leukocytter (GMFI) (**B**) etter 30 (PBL: N = 16, HKL: N = 15), 45 (PBL: N = 16, HKL: N = 14) og 60 (PBL: N = 6, HKL: N = 7) minutter inkubering med DHR. (Middelverdier, staver viser standardavvik).

3.4.3. Kontrollprøver

Negativ leukocyt kontroll:

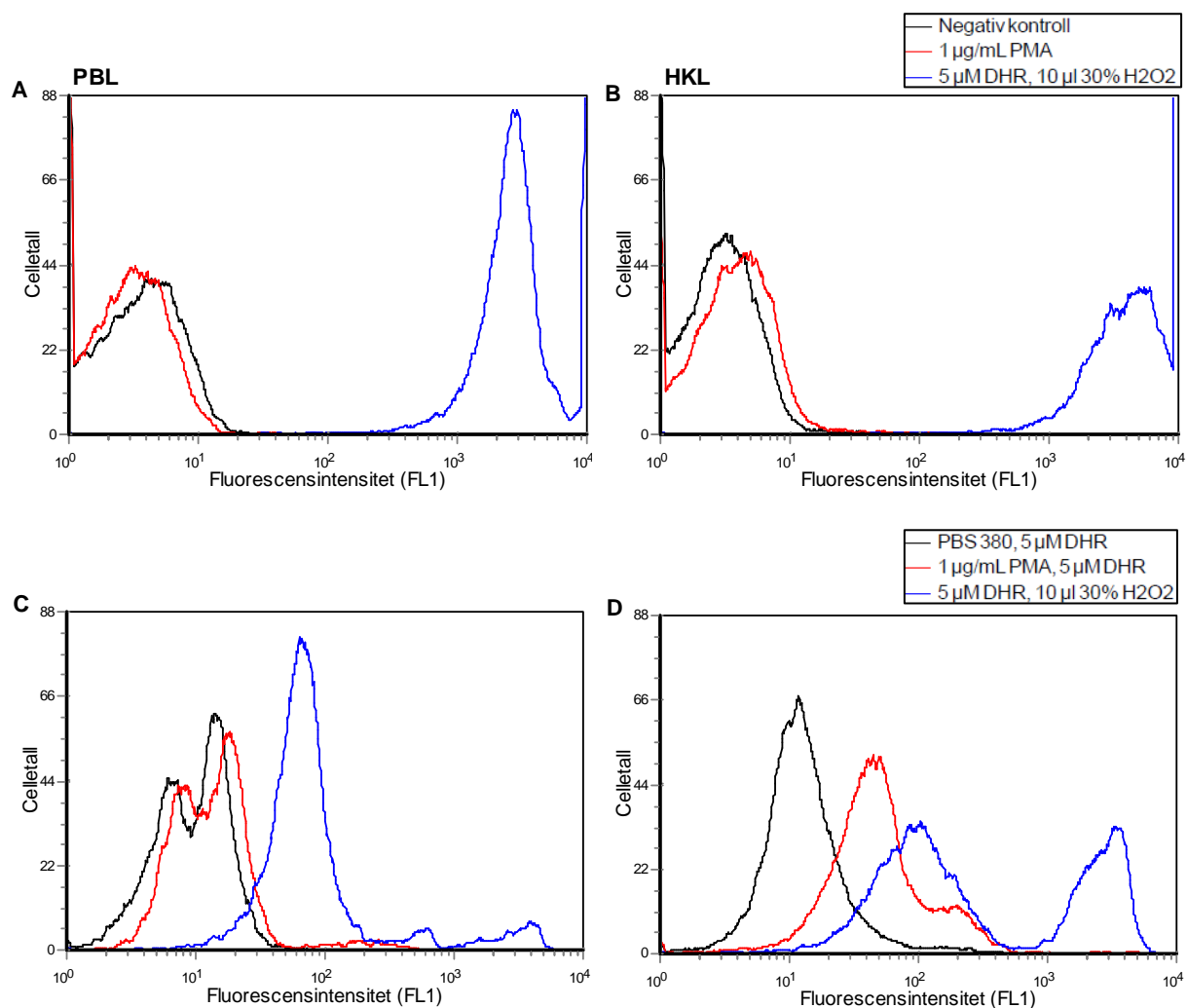
PBL og HKL fra laks uten PMA og DHR tilsatt, analysert ved flow cytometri med instrumentinnstillinger for DHR-tilsatte celler, viste ikke samme fluorescensintensitet som celler tilsatt DHR. De umerkede leukocytene kunne ikke detekteres i FL1-histogrammet for DHR-tilsatte leukocytter.

Negativ PMA kontroll:

Kontrollprøvene med PMA-stimulerte PBL og HKL fra laks uten DHR, viste ingen signifikante forskjeller i fluorescensnivåene fra analyser gjort av ustimulerte leukocytter uten DHR tilsatt (Figur 21).

Positiv DHR kontroll:

Leukocytter tilsatt H_2O_2 og DHR viste seg å være svært RHO-positive i prøver målt med instrumentinnstillinger i flow cytometeret beregnet for leukocytter uten tilsatt DHR. Med instrumentinnstillinger for prøver tilsatt DHR viste leukocytter tilsatt H_2O_2 og DHR en høyere grad av fluorescens enn PMA-stimulerte leukocytter tilsatt DHR (Figur 21). H_2O_2 påvirket plasseringen av leukocytene i dot plotet, og cellene ble gatet i forhold til scatter-egenskapene.



Figur 21: Flow cytometrianalyser fra PMA-negative og DHR-positive kontrollforsøk med PBL (A og C) og HKL (B og D) fra laks. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten i cellene. Leukocytene ble tilsatt enten 1 μ l 206 μ g/ml PMA (1 μ g/ml), eller 5 μ l 206 μ M DHR (5 μ M). Etter inkubering i 5 minutter ble det tilsatt 10 μ l 30 % H_2O_2 (1,46 %) i prøvene med DHR. Leukocytene ble inkubert i 30 minutter før flow cytometrianalyse, med instrumentinnstillinger beregnet for prøver uten DHR (A og B), og med instrumentinnstillinger beregnet for prøver med DHR (C og D).

Hemming av respiratory burst aktivitet hos lakseleukocytter:

Flow cytometrianalyser av DPI-hemmede leukocytter viste at en konsentrasjon på 20 μ M DPI i prøvene hemmet mer enn 10 μ M DPI. En konsentrasjon på 20 μ M DPI i prøvene ble derfor videre brukt i kontrollforsøkene med hemming av respiratory burst.

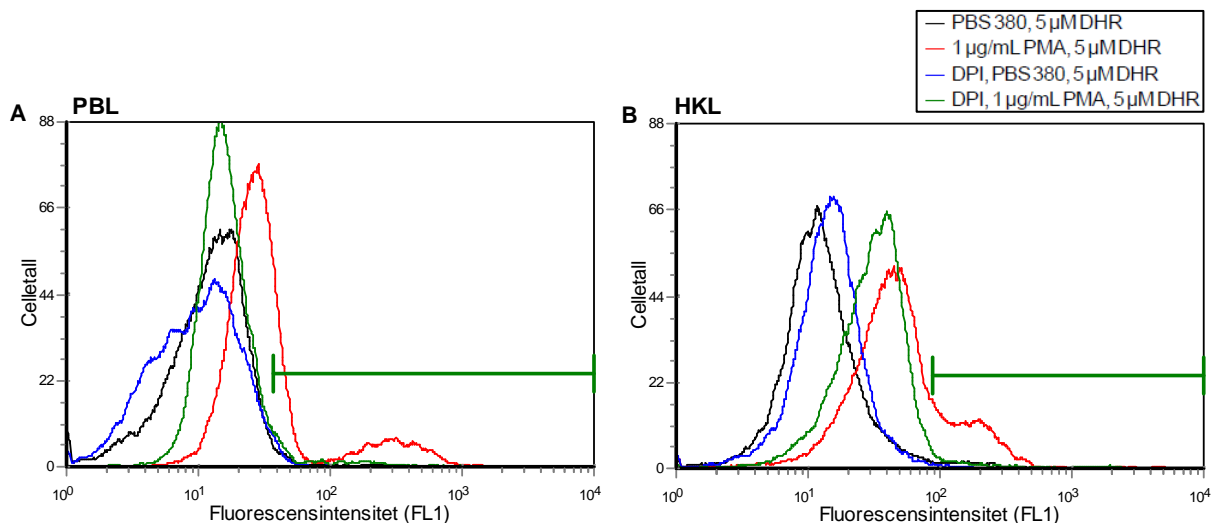
Flow cytometrianalyser, fremstilt i figur 22, viser at den høyere fluorescensintensiteten hos stimulerede HKL tilsatt PMA og DHR, til en viss grad

uteble når DPI var tilsatt på forhånd, i forhold til stimulerede leukocytter tilsatt DHR, uten DPI.

Derimot var det en forskjell i hvordan de DPI-hemmede PBL og HKL plasserte seg i FL1-histogrammet i forhold til de ustimulerede DPI-hemmede og uhemmede PBL og HKL tilsatt DHR. DPI-hemmede PMA-tilsatte PBL plasserte seg i stor grad på samme måten som ustimulerede PBL med og uten DPI tilsatt DHR. DPI-hemmede PMA-tilsatte HKL viste høyere fluorescensintensitet enn de ustimulerede DPI-hemmede og uhemmede HKL tilsatt DHR.

For DPI-hemmede PBL tilsatt PMA og DHR, var mengden RHO-positive celler etter 30 minutter 5 %, i forhold til ustimulerede PBL i PBS 380 tilsatt DHR, der grensen for RHO-positive celler var satt til 2 %. I prøvene med ustimulerede DPI-hemmede PBL tilsatt DHR var 2 % av cellene RHO-positive, mens 23 % av de uhemmede, stimulerede og DHR-tilsatte PBL fra samme fisk var RHO-positive.

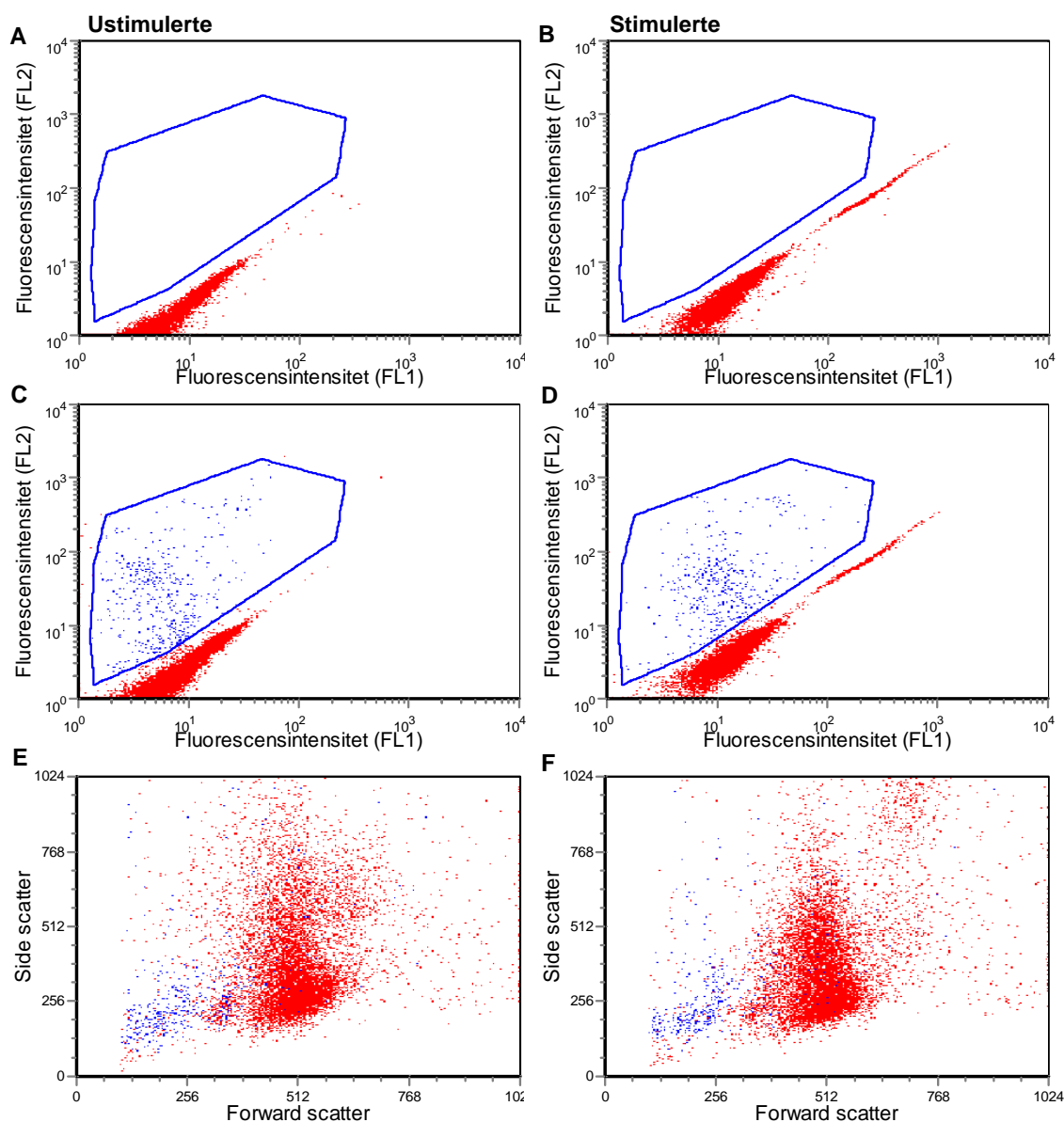
Prosentandelen RHO-positive HKL hemmet med DPI, tilsatt PMA og DHR, var 3 %, mens 0,5 % av de ustimulerede DPI-hemmede HKL tilsatt DHR var RHO-positive etter 30 minutter inkubering. 20 % av de uhemmede, stimulerede DHR-tilsatte HKL fra samme fisk var RHO-positive.



Figur 22: Flow cytometrianalyser fra kontrollforsøk med hemming av respiratory burst hos PBL (A) og HKL (B) fra laks. Representative FL1-histogrammer av fluorescensintensiteten hos leukocytene. DPI (20 μ M) ble tilsatt 10 minutter før PMA (1 μ g/ml) (stimulert) eller PBS 380 (ustimulert). Prøvene ble inkubert i 5 minutter før DHR (5 μ M) ble tilsatt. Flow cytometrianalyser etter 30 minutter, med instrumentinnstillinger for DHR-tilsatte celler. Grønne histogrammarkører angir grensen mellom RHO-positive og RHO-negative leukocytter.

Celledødkontroll:

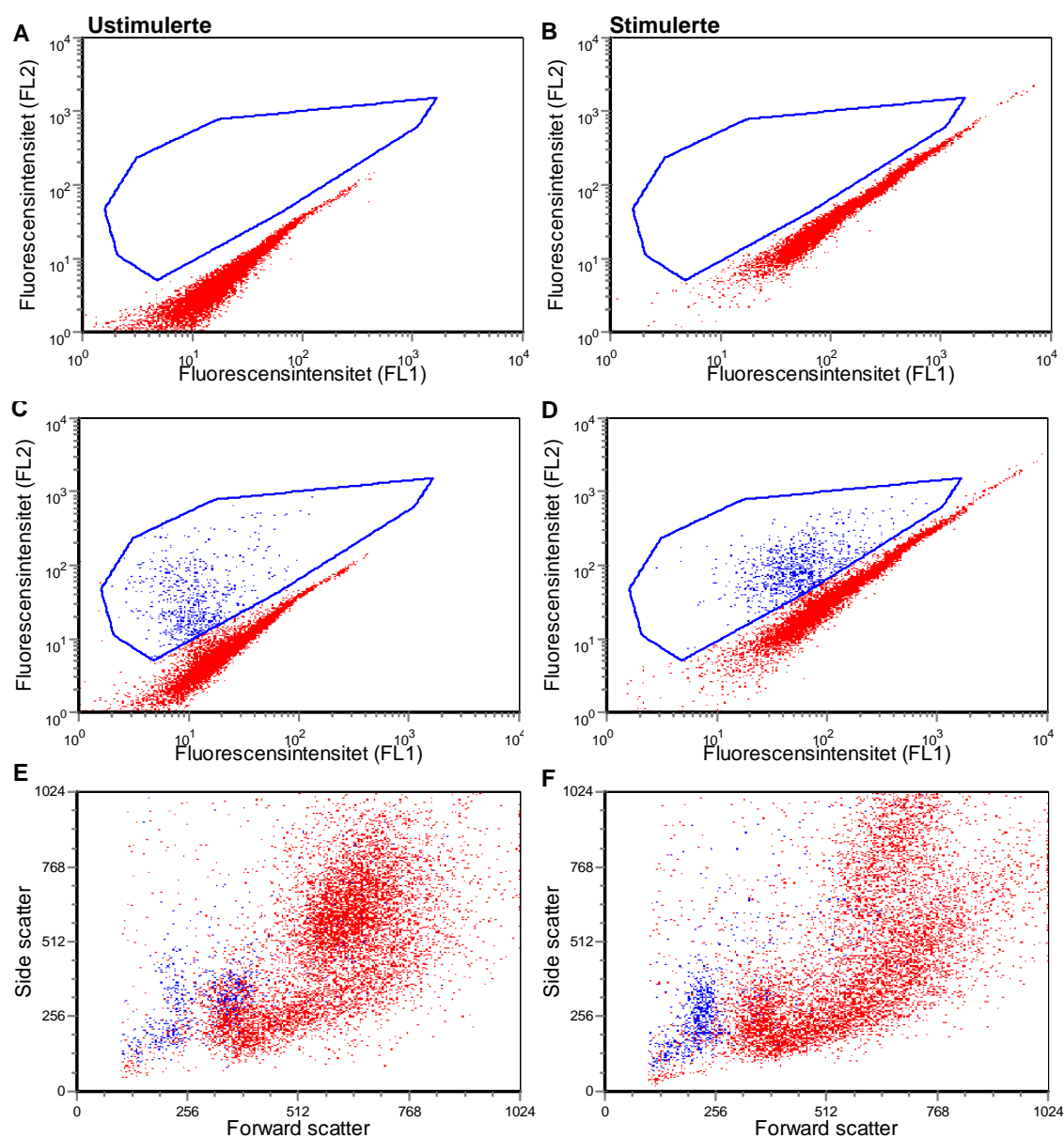
Ustimulerte og stimulerte PBL og HKL fra samme laks tilsatt DHR (5 μ M), ble inkubert i 30 minutter, og deretter tilsatt PI (2 μ g/ml) for å merke døde celler. Etter 5 minutter på is ble det utført flow cytometrianalyse. Flow cytometrianalyser av PI-merkede og umerkede PBL er presentert i figur 23. Ingen av cellene i prøvene uten PI tilsatt lå innenfor gaten laget for de PI-positive cellene. Analyser gjort på de gatede PBL tilsatt PI, viste at 4,6 % av de ustimulerte cellene var PI-positive, mens 4,2 % av PBL stimulert med PMA (1 μ g/ml) var PI-positive. CASY-målingene gjort av de samme cellene før flow cytometri, viste en celleoverlevelse på 97.7 %.



Figur 23: Flow cytometrianalyser av PBL fra laks (N = 1) tilsatt PI i celledødkontrollforsøk. Representative scatter plot (A – D) sammenligner FL1/FL2-fluorescens (RHO/PI-fluorescensmerking) hos leukocytene, der PI-positive døde celler er gatet i blå region. Scatter plot E og F representerer FSC/SSC (cellestørrelsen/granulariteten), og viser hvor de gatede, blåfargede PI-positive cellene legger seg i dot plotene. **A:** Ustimulerte PBL tilsatt DHR (5 μ M). **B:** Stimulerte PBL tilsatt PMA (1 μ g/ml) og DHR (5 μ M). **C og E:** Ustimulerte PBL tilsatt DHR (5 μ M) og PI (2 μ g/ml). **D og F:** Stimulerte PBL tilsatt PMA (1 μ g/ml), DHR (5 μ M) og PI (2 μ g/ml). Flow cytometrianalyse ble utført etter 30 minutter inkubering med DHR i romtemperatur, og videre 5 minutter inkubering med PI på is.

Analyser av prøver med HKL tilsatt PI for å merke døde celler er vist i figur 24. Ingen av prøvene uten PI hadde celler innenfor gaten som ble laget for de PI-positive cellene. I prøver med HKL, kun tilsatt DHR (5 μ M) og PI (2 μ g/ml), var prosentandelen PI-positive celler 6,3 %, mens andel PI-positive HKL stimulert med PMA (1 μ g/ml) i samme DHR- og

PI-konsentrasjon, var 8,5 %. Ved CASY-måling før flow cytometri analyse var andelen levende celler i HKL-løsningen 94,3 %.



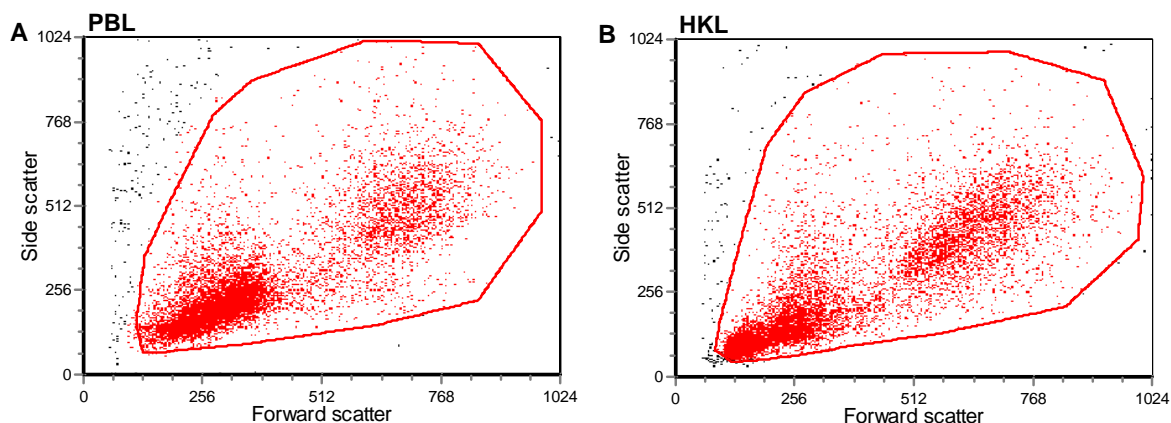
Figur 24: Flow cytometrianalyse av HKL fra laks (N = 1) tilsatt PI i celledødkontrollforsøk. Representative scatter plot (A – D) sammenligner FL1/FL2-fluorescens (RHO/PI-fluorescens-merking) hos leukocytene, der PI-positive døde celler er gattet i blå region. Scatter plot E og F representerer FSC/SSC (cellestørrelsen/granulariteten), og viser hvor de gattede, blåfargede PI-positive cellene legger seg i dot plotene. **A:** Ustimulerte HKL tilsatt DHR (5 μ M). **B:** Stimulerte HKL tilsatt PMA (1 μ g/ml) og DHR (5 μ M). **C og E:** Ustimulerte HKL tilsatt DHR (5 μ M) og PI (2 μ g/ml). **D og F:** Stimulerte HKL tilsatt PMA (1 μ g/ml), DHR (5 μ M) og PI (2 μ g/ml). Flow cytometrianalyse ble utført etter 30 minutter inkubering med DHR i romtemperatur, og videre 5 minutter inkubering med PI på is.

Samlet resultater fra PMA-negative og DHR-positive kontrollforsøk, og kontrollforsøk med DPI-hemming av respiratory burst og PI-merking av døde celler, verifiserte at en inkuberingstid på 30 minutter med DHR var optimalt for påvisning av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks.

3.5 Flow cytometrianalyser av respiratory burst hos torsk

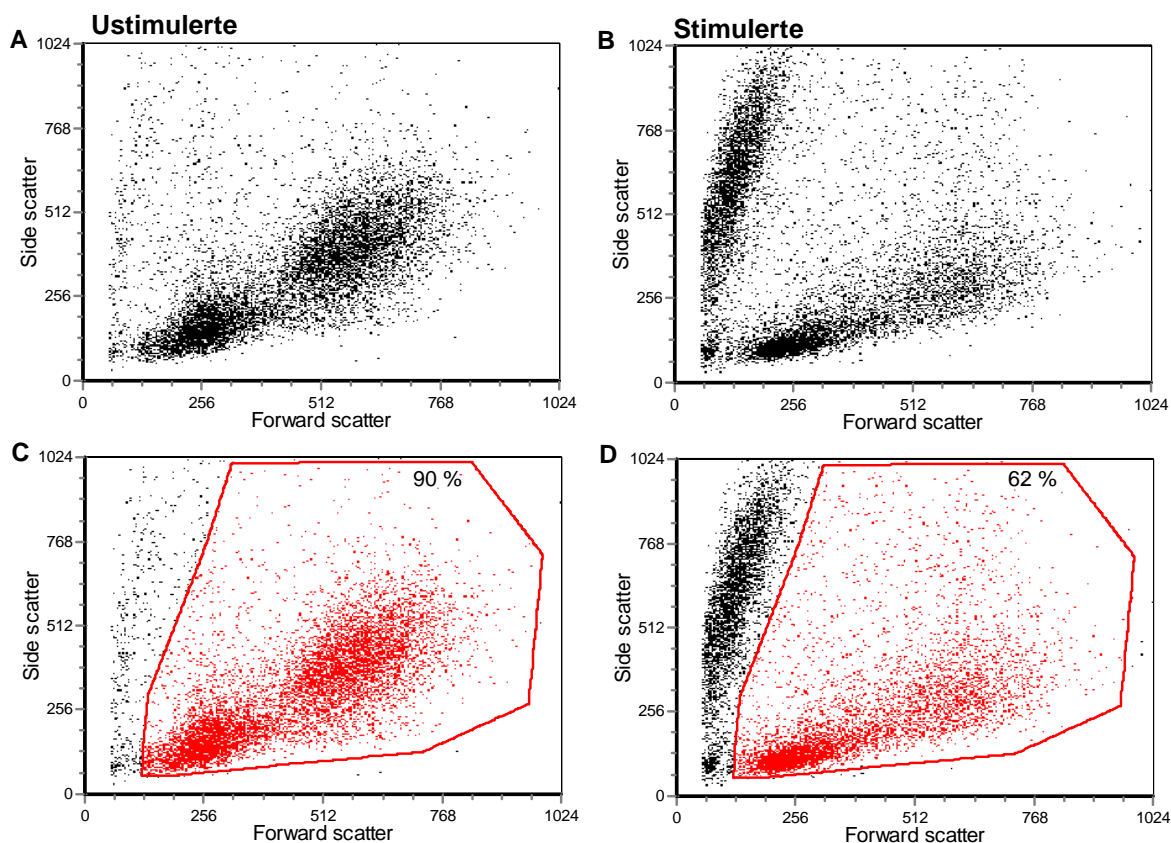
3.5.1. Utarbeiding av forsøksoppsett for respiratory burst assay på torskeleukocytter

Karakteristiske FSC/SSC dot plot av umerkede PBL og HKL fra torsk er presentert i figur 25. Stimulerte leukocytter tilsatt DHR ble gatet på samme måte som i figur 25, og kun gatede celler ble brukt i flow cytometrianalyser av respiratory burst aktivitet.



Figur 25: Flow cytometrianalyser av isolerte PBL (A) og HKL (B) fra torsk (N = 1) gatet for respiratory burst analyse. Gatede celler (rød region) i de representative FSC/SSC dot plotene angir leukocytter tatt med i analyse av respiratory burst aktivitet. Flow cytometrianalyse etter 30 minutter inkubering.

I de første forsøkene med tilsetning av DHR på leukocytter fra torsk, ble det tilsatt 1 μ l 206 μ g/ml PMA (1 μ g/ml) til 200 μ l leukocyttiløsning. Etter videre merking med 5 μ l 206 μ M DHR (5 μ M) og flow cytometrianalyse etter 30 minutter, viste noen av de stimulerte leukocytterne seg å ha lave FSC-verdier og høye SSC-verdier, som i figur 26. Analyser av leukocytter fra tre torsk med samme forsøksoppsett viste sammenfallende resultater. Ved gating av leukocytterne i dot plotene ble det brukt samme gate som for ustimulerte, umerkede HKL, som i figur 25. I prøvene med en PMA-konsentrasjon på 1 μ g/ml, var 62 ± 3 % av HKL gated, mens 90 ± 5 % av de ustimulerte HKL var gated (Figur 26). Disse egenskapene antydte at en stor andel av cellene i prøvene var døde, og på grunnlag av dette ble det prøvd ut lavere konsentrasjoner av PMA på 0,1, 0,01 og 0,001 μ g/ml.

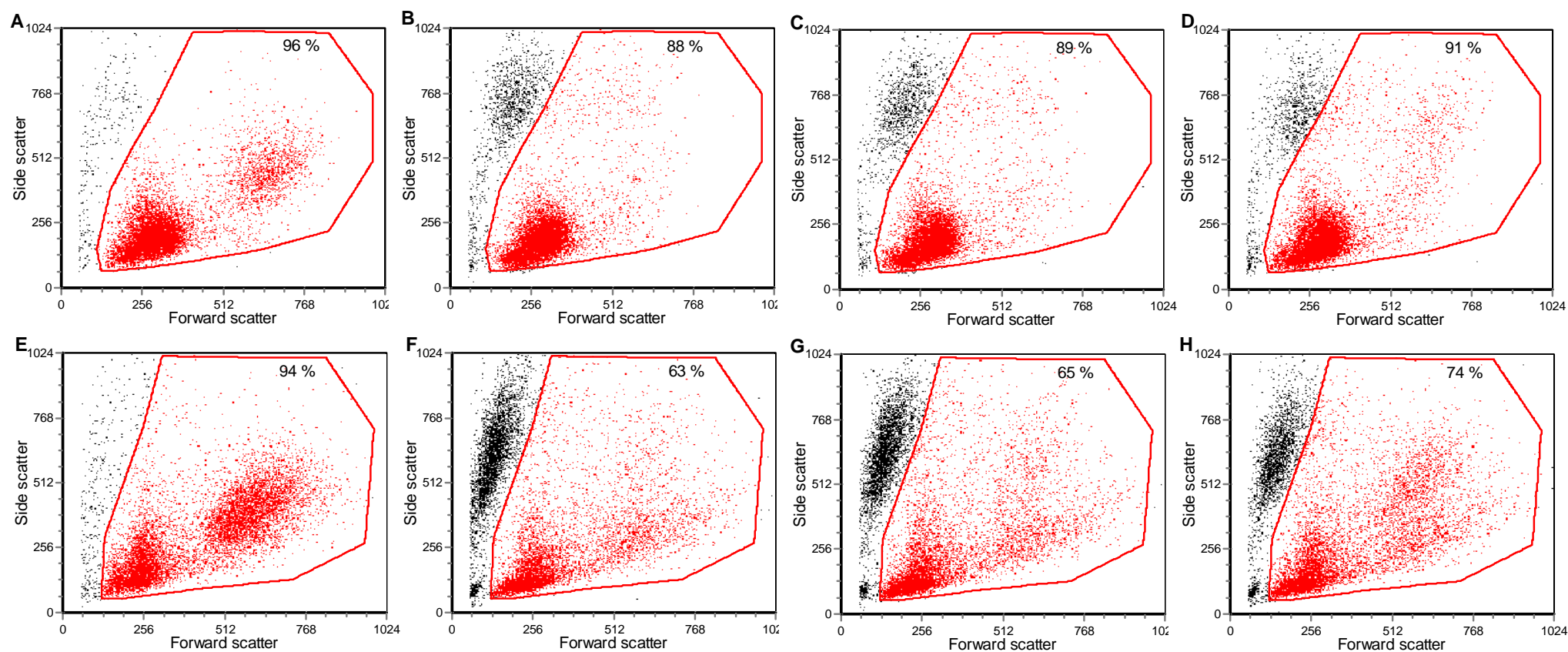


Figur 26: Flow cytometrianalyse av HKL fra torsk ($N = 1$) stimulerte med PMA. Representative FSC/SSC dot plot av ugatede (A og B) og gatede (C og D) (rød region) leukocytter. A og C: Ustimulerte HKL. B og D: PMA-stimulerte ($1 \mu\text{g/ml}$) HKL. Flow cytometrianalyse 30 minutter etter tilsetning av PMA.

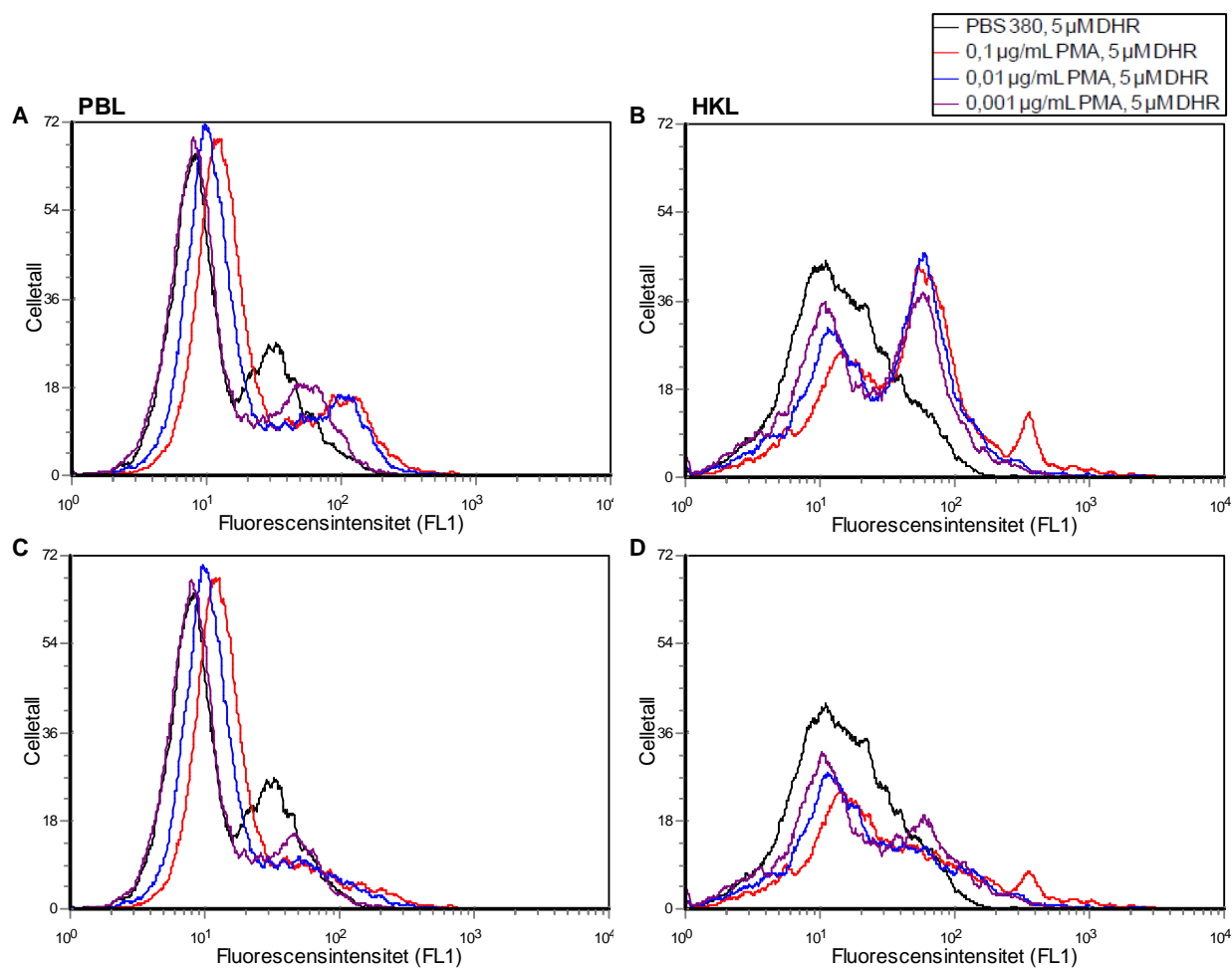
I den påfølgende utprøvingen av lavere konsentrasjoner av PMA for stimulering av PBL og HKL, viste de analyserte prøvene etter 30 minutter inkuberingstid med DHR en noe mer variert forflytning av cellene i FSC/SSC dot plot (Figur 27). De ustimulerte PBL og HKL i PBS 380 tilsatt DHR ble gattet i dot plotene, og de samme gatene ble brukt henholdsvis for stimulerte PBL og HKL. I figur 26 og 27 er det påført hvor mange prosent av cellene i de ustimulerte og stimulerte prøvene som ligger innenfor gaten.

Ved flow cytometrianalyse 30 minutter etter tilsetning av DHR, viste fluorescensintensiteten til PBL og HKL stimulert med $0,01$ og $0,001 \mu\text{g/ml}$ PMA seg å være lavere enn ved stimulering med $0,1 \mu\text{g/ml}$ PMA (Figur 28).

I flow cytometrianalysene ble det tillatt 2 % RHO-positive leukocytter i de ustimulerte prøvene ved måling av andel RHO-positive stimulerte leukocytter. Tabell 7 og 8, og figur 29, viser en oversikt over prosentandel DHR-positive HKL fra torsk stimulert med en PMA-konsentrasjon på 1 , $0,1$, $0,01$ og $0,001 \mu\text{g/ml}$, og PBL stimulert med de tre laveste PMA-konsentrasjonene.



Figur 27: Flow cytometrianalyser av PBL (A, B, C og D) og HKL (E, F, G og H) fra torsk (N = 1) stimulert med ulike PMA-konsentrasjoner. Representative FSC/SSC dot plot viser størrelsen og granulariteten til cellene, og gatede celler er vist i rød region. A og E: Ustimulerte leukocytter. Leukocytter stimulert med PMA ($\mu\text{g/ml}$); B og F: 0,1, C og G: 0,01, D og H: 0,001. Flow cytometrianalyse etter 30 minutter inkuberingstid med DHR.



Figur 28: Flow cytometrianalyse av ustimulerte og stimulerte PBL (A og C) og HKL (B og D) fra torsk (N = 1) tilsatt DHR (5 μ M). Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytene. Leukocytene ble stimulert med ulike konsentrasjoner PMA (0,1, 0,01 og 0,001 μ g/ml). A og B: Ugatede leukocytter. C og D: Gatede leukocytter. Flow cytometrianalyse etter 30 minutter inkubering med DHR.

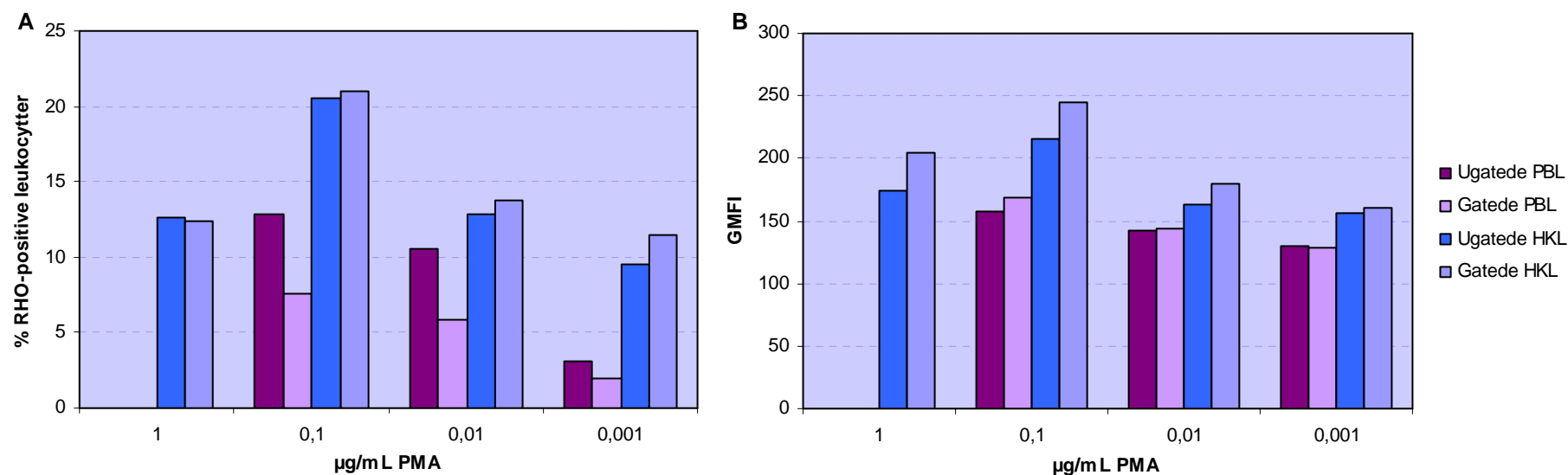
Basert på at leukocytter stimulert med en PMA-konsentrasjon på 0,1 μ g/ml viste høyere prosentandel RHO-positive celler, og at prosentandel gatede celler viste liten økning ved de lavere konsentrasjonene PMA, ble det bestemt å stimulere torskeleukocytene med en PMA-konsentrasjon på 0,1 μ g/ml i respiratory burst assayet. I tillegg ble de PMA-stimulerte DHR-tilsatte leukocytene gatet på samme måte som de ustimulerte DHR-tilsatte leukocytene.

Tabell 7: Prosentandel RHO-positive, og geometrisk middelvei av fluorescensintensiteten (GMFI) til, PBL fra torsk (N = 1) stimulert med ulike PMA-konsentrasjoner. Flow cytometrianalyser etter 30 minutter.

PMA-konsentrasjon	% RHO-positive, ugatede celler	% RHO-positive, gatede celler	GMFI, ugatede celler	GMFI, gatede celler	% gatede celler i dot plot
0 µg/ml	2	2	133	117	96
0,1 µg/ml	13	8	157	168	88
0,01 µg/ml	11	6	142	143	89
0,001 µg/ml	3	2	131	128	91

Tabell 8: Prosentandel RHO-positive, og geometrisk middelvei av fluorescensintensiteten (GMFI) til, HKL fra torsk (N = 1) stimulert med ulike PMA-konsentrasjoner. Flow cytometrianalyser etter 30 minutter.

PMA-konsentrasjon	% RHO-positive, ugatede celler	% RHO-positive, gatede celler	GMFI, ugatede celler	GMFI, gatede celler	% gatede celler i dot plot
0 µg/ml	2	2	123	116	94
1,0 µg/ml	13	12	174	204	62
0,1 µg/ml	21	21	216	245	63
0,01 µg/ml	13	14	163	180	65
0,001 µg/ml	10	12	157	160	74



Figur 29: Prosentandel RHO-positive leukocytter i HKL (N = 1) og PBL (N = 1) fra torsk stimulert med ulike PMA-konsentrasjoner. Representative diagram viser andel RHO-positive leukocytter i forhold til PMA-konsentrasjon ved stimulering (**A**), og geometrisk middelverdi av fluorescensintensiteten (GMFI) til de RHO-positive leukocytterne, i forhold til PMA-konsentrasjon ved stimulering (**B**). Analysene med ugatede og gatede leukocytter er fra samme analyse og dot plot. Verdiene er fra flow cytometrianalyser etter 30 minutter inkubering med DHR.

I utprøving av andre stimulanter, POLY I:C og LPS, for leukocytter fra blod og hodenyre hos torsk, ble det brukt en konsentrasjon på 1,0 µg/ml. Resultatene ble sammenlignet med leukocytter fra samme fisk stimulert med en PMA-konsentrasjon på 0,1 µg/ml. Prøvene ble analysert ved flow cytometri etter 30 minutter inkuberingstid med DHR, og resultatene er fremstilt i figur 30 og 31, og tabell 9.

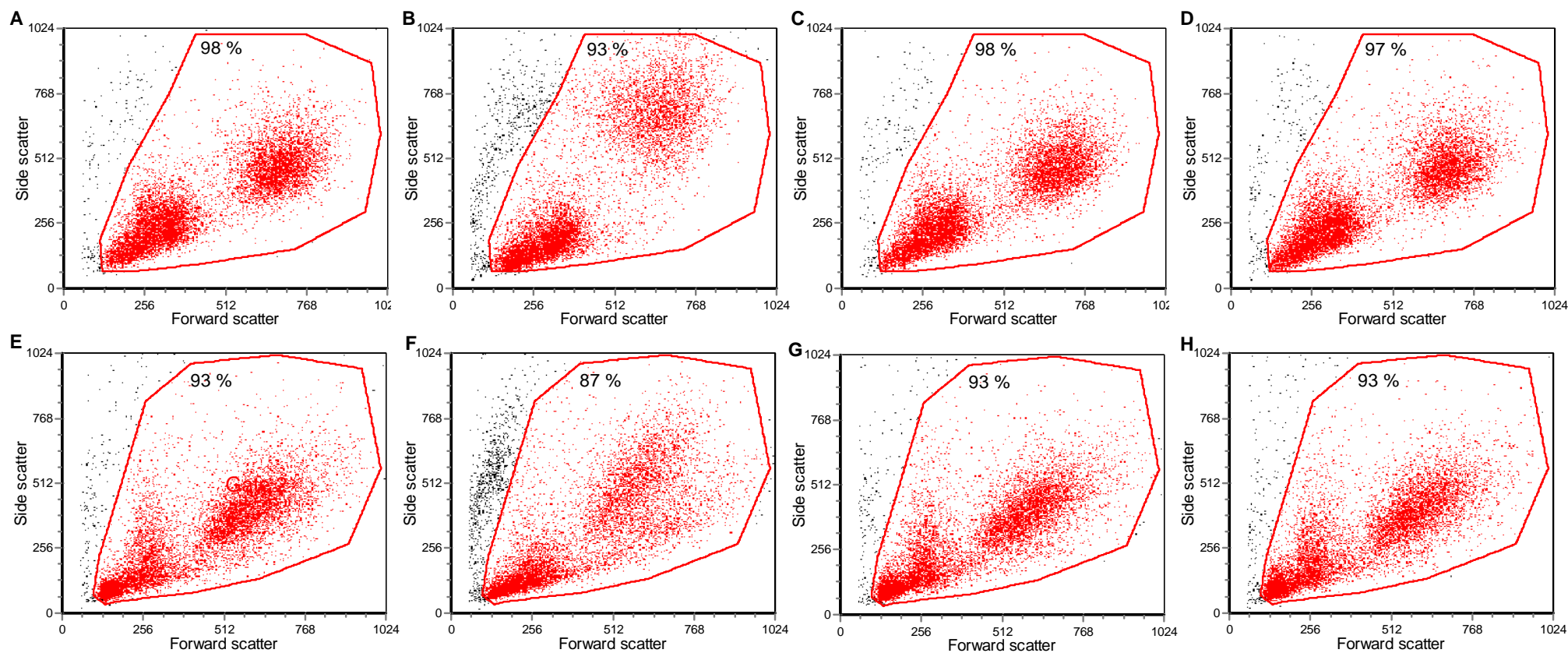
Figur 30 viser HKL og PBL fra torsk stimulert med PMA (0,1 µg/ml), POLY I:C (1 µg/ml) eller LPS (1 µg/ml), og deretter tilsatt DHR (5 µM). De stimulerede leukocytene er gatet med samme gate som de ustimulerede leukocytene. Av figur 30 kommer det frem at både for PBL og HKL er prosentandelen gatede POLY I:C- og LPS-stimulerede leukocytter i scatter plot større enn ved stimulering med PMA.

Samtidig viste leukocytter tilsatt POLY I:C eller LPS en mye lavere prosentandel RHO-positive celler, i forhold til de som var stimulert med PMA (Figur 31). Verdier av prosentandel RHO-positive leukocytter stimulert med PMA (0,1 µg/ml), POLY I:C (1 µg/ml) eller LPS (1 µg/ml), og GMFI av de RHO-positive cellene, er fremstilt i tabell 9. Verdiene i tabell 9 viser at andel RHO-positive leukocytter, både i blod og hodenyre, er høyere for leukocytter stimulert med PMA, enn for leukocytter stimulert med POLY I:C eller LPS. I prøver med ustimulerede og POLY I:C- og LPS-stimulerede leukocytter var prosentandelen RHO-positive celler på rundt 2 %, noe som hentyder at respiratory burst aktivitet ikke hadde blitt aktivert. I de PMA-stimulerede prøvene var henholdsvis 40 og 37 % av PBL og HKL RHO-positive. Samtidig hadde de RHO-positive leukocytene som var stimulert med PMA en høyere geometrisk middelvei av fluorescensintensitet (GMFI), enn de som var stimulert med POLY I:C eller LPS (Tabell 9).

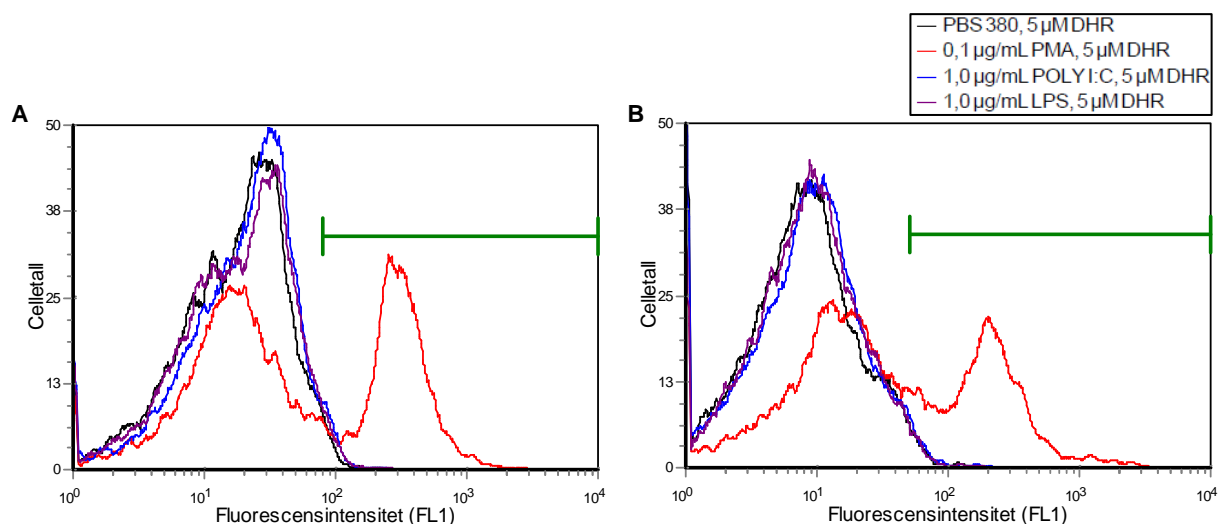
Tabell 9: PBL og HKL fra torsk (N = 1) stimulert med PMA, POLY I:C eller LPS, tilsatt DHR (5 µM) og analysert ved flow cytometri etter 30 minutter inkubering med DHR. (Gjennomsnitt ± standardavvik).

HKL/PBL	Stimulant	% DHR-positive celler	Geometrisk middelvei
PBL	X*	2 ± 0	97 ± 3
PBL	PMA, 0,1 µg/ml	40 ± 1	299 ± 4
PBL	POLY I:C, 1,0 µg/ml	3 ± 1	99 ± 1
PBL	LPS, 1,0 µg/ml	3 ± 0	104 ± 1
HKL	X*	2 ± 0	73 ± 2
HKL	PMA, 0,1 µg/ml	37 ± 2	198 ± 4
HKL	POLY I:C, 1,0 µg/ml	2 ± 0	70 ± 0
HKL	LPS, 1,0 µg/ml	2 ± 0	73 ± 4

* Ustimulert



Figur 30: Flow cytometrianalyser av PBL (A, B, C og D) og HKL (E, F, G og H) fra torsk (N = 1) stimulert med PMA, POLY I:C eller LPS, og tilsatt DHR. Representative FSC/SSC dot plot angir gatede leukocytter (rød region) analysert for respiratory burst aktivitet. A og E: Ustimulerte leukocytter tilsatt DHR (5 μ M). B og F: PMA-stimulerte leukocytter (0,1 μ g/ml). C og G: POLY I:C-stimulerte leukocytter (1,0 μ g/ml). D og H: LPS-stimulerte leukocytter (1,0 μ g/ml). Flow cytometrianalyse etter 30 minutter inkubering med DHR.

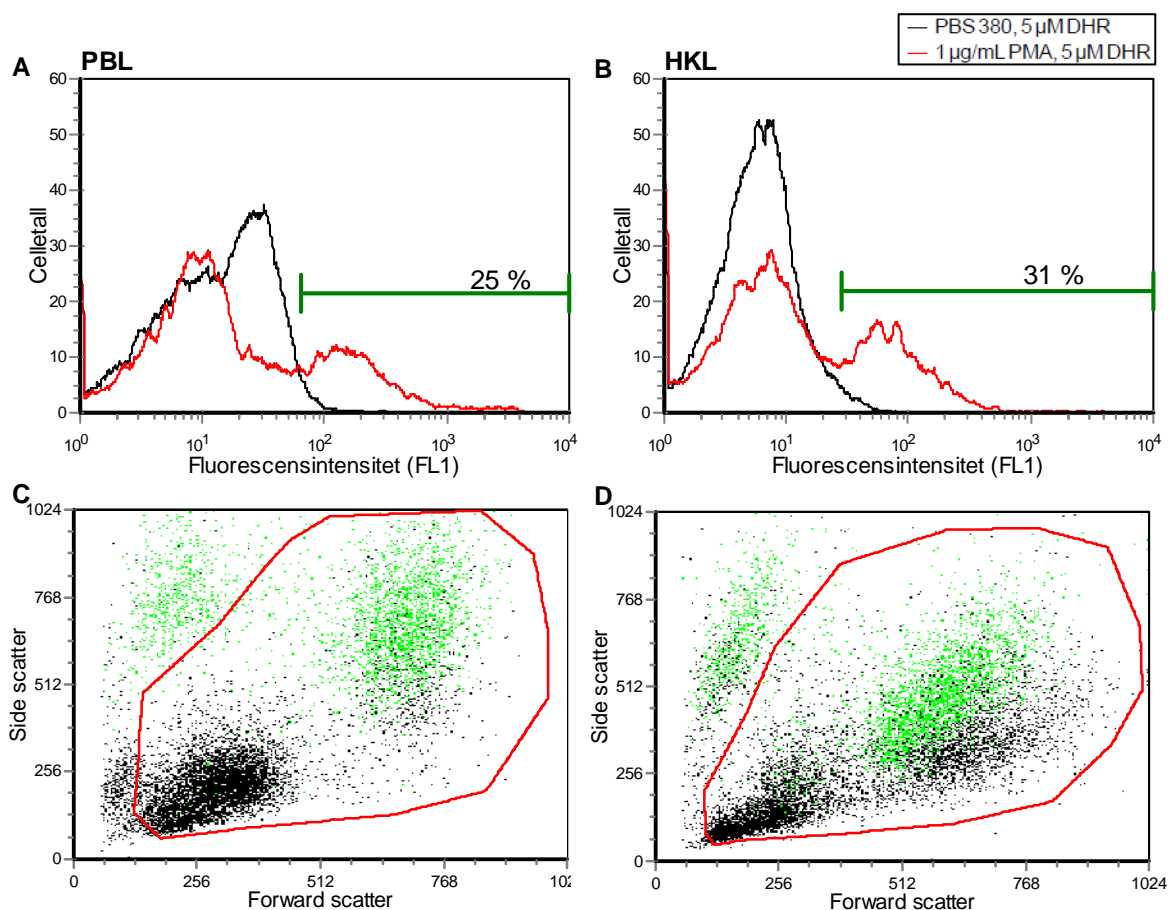


Figur 31: Flow cytometrianalyse av PBL (A) og HKL (B) fra torsk tilsatt ulike stimulanter. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytterne. Prøvene ble stimulert med PMA (0,1 $\mu\text{g/ml}$), POLY I:C (1 $\mu\text{g/ml}$) eller LPS (1 $\mu\text{g/ml}$), og tilsatt DHR (5 μM). Flow cytometrianalyse etter 30 minutter inkubering med DHR. Grønne histogrammarkører angir RHO-positive leukocytter.

Etter utprøving av ulike stimulanter ble det bestemt å fortsette å stimulere torskeleukocytterne med en PMA-konsentrasjon på 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 5 minutter før tilsetning av DHR (5 μM).

Plasseringen til RHO-positive PMA-stimulerte DHR-tilsatte leukocytter i FSC/SSC dot plot varierte mellom PBL og HKL (Figur 32). RHO-positive PBL lå i to populasjoner, der den ene besto av små og granulære celler som ble antatt å være døde og dermed ble gatet vekk og ikke tatt med i analyse av respiratory burst aktivitet. Den andre cellepopulasjonen av RHO-positive PBL i scatter plot besto av større og mer granulære celler (Figur 32 C).

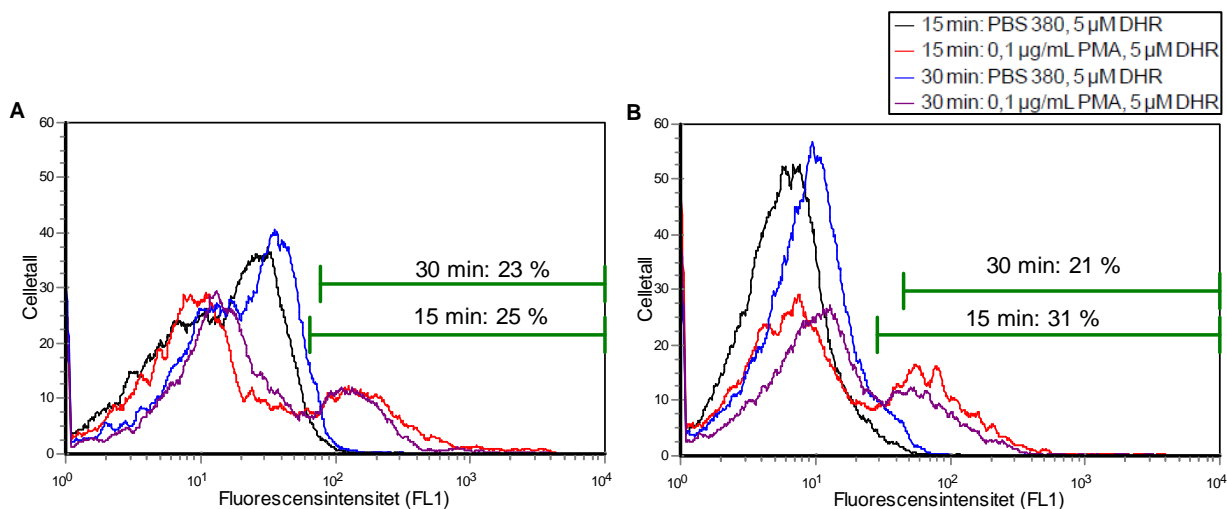
RHO-positive HKL besto også av to cellepopulasjoner i scatter plot. Den ene populasjonen besto av celler som var små og granulære, og disse ble regnet som døde celler og gatet vekk, og ikke tatt med i analyse av respiratory burst aktivitet i leukocytterne. Den andre RHO-positive cellepopulasjonen besto av større celler med noe mindre granularitet enn de RHO-positive PBL (Figur 32 D).



Figur 32: Flow cytometrianalyse av ustimulerte og stimulerte, DHR-tilsatte PBL (A og C) og HKL (B og D) fra torsk. Representative FL1-histogram (A og B) viser fluorescensintensitet til leukocyttene hvor grønne histogrammarkører angir prosentandel RHO-positive leukocyttene. Representative FSC/SSC dot plot (C og D) viser plasseringen av RHO-positive PMA-stimulerte leukocyttene (grønne) angitt av histogrammarkørene i FL1-histogrammene (henholdsvis A og B). Ustimulerte og PMA-stimulerte leukocyttene ble tilsatt DHR (5 μ M). Flow cytometrianalyse etter 15 minutter inkubering med DHR.

3.5.2. Optimalisering av endelig forsøksoppsett for respiratory burst assay på torskeleukocyttene

Etter inkubering i romtemperatur i 10 minutter, stimulering med PMA (0,1 μ g/ml) i 5 minutter, og tilsetting av DHR (5 μ M), ble det utført flow cytometrianalyser etter 15 og 30 minutter etter DHR-tilsetting. Figur 33 viser en representativ sammenligning av leukocyttene fra torsk, både PBL og HKL, analysert ved flow cytometri etter 15 og 30 minutter inkubering med DHR (5 μ M).



Figur 33: Flow cytometrianalyse av PBL (A) og HKL (B) fra torsk (N = 1). Representative FL1-histogrammer viser fluorescensen til leukocytene. Et standard respiratory burst assay for leukocytene ble gjennomført. Flow cytometrianalyse 15 og 30 minutter etter tilsetning av DHR. Grønne histogrammarkører angir prosentandel RHO-positive leukocytter.

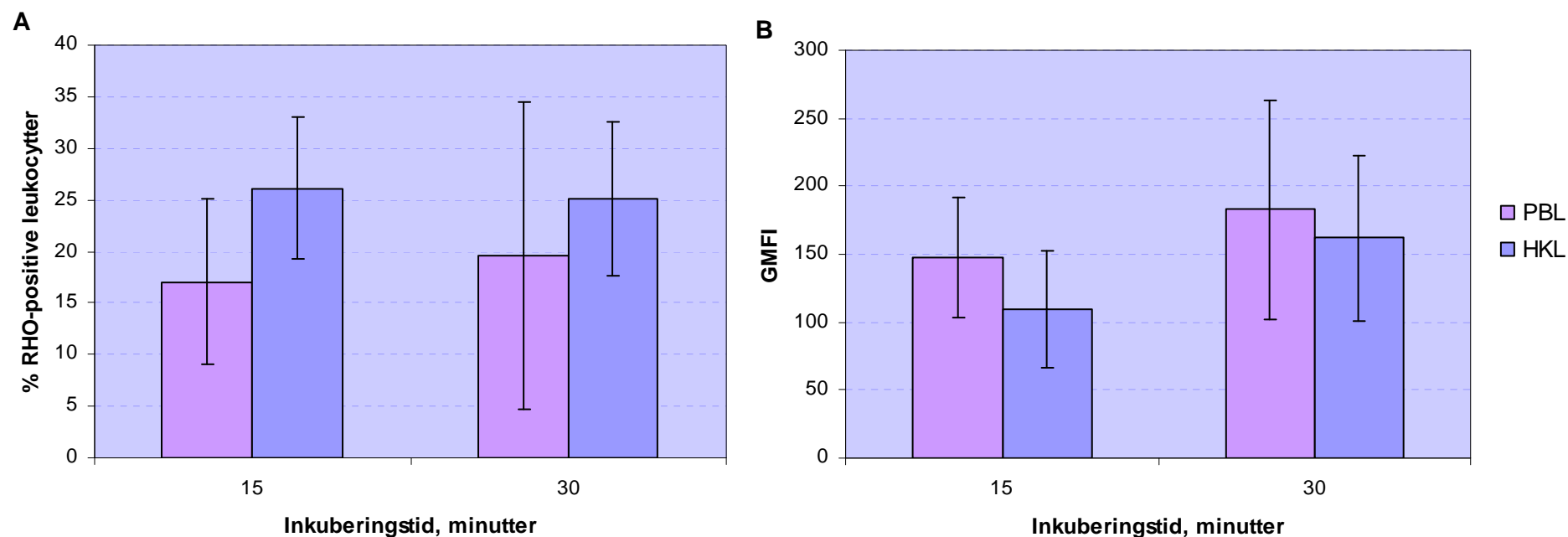
Det ble gjennomført flere forsøk med standardoppsettet for respiratory burst assay, der 200 μ l leukocyttiløsning fikk stå 10 minutter i romtemperatur før tilsetning av PMA (0,1 μ g/ml), og videre inkubering i 5 minutter før tilsetning av DHR (5 μ M). Flow cytometrianalyser ble gjennomført etter 15 og 30 minutter inkubering etter tilsetning av DHR. Den gjennomsnittlige verdien av de DHR-positive cellene, og den geometriske middelveiden av fluorescensen til disse (GMFI), er presentert i tabell 10, og figur 34.

Tabell 10: Prosentandel RHO-positive, og geometrisk middelværdi av fluorescensintensiteten (GMFI) til, PBL og HKL fra torsk stimulert med PMA (0,1 µg/ml) i 5 minutter, tilsatt DHR (5 µM) og inkubert i 15 eller 30 minutter før flow cytometrianalyse. (Gjennomsnitt ± standardavvik).

Minutter	PBL		HKL	
	% RHO-positive celler	GMFI av RHO-positive celler	% RHO-positive celler	GMFI av RHO-positive celler
15 ^a	17 ± 8	148 ± 45	26 ± 7	110 ± 43
30 ^b	20 ± 15	183 ± 80	25 ± 7	162 ± 61

^aN = 4

^bN = 5



Figur 34: Prosentandel RHO-positive, og fluorescensintensiteten til, PBL og HKL fra torsk stimulert med PMA (0,1 µg/ml) i 5 minutter før tilsetning av DHR (5 µM). Prosent RHO-positive leukocytter (**A**), og geometrisk middelværdi av fluorescensintensiteten (GMFI) til de RHO-positive leukocytterne (**B**) ved flow cytometrianalyse 15 (N = 4) og 30 (N = 5) minutter etter tilsetning av DHR.

3.5.3. Kontrollforsøk

I fremstilling av resultater fra kontrollforsøk er det brukt data fra analyser av flere fisk.

Negativ leukocyt kontroll:

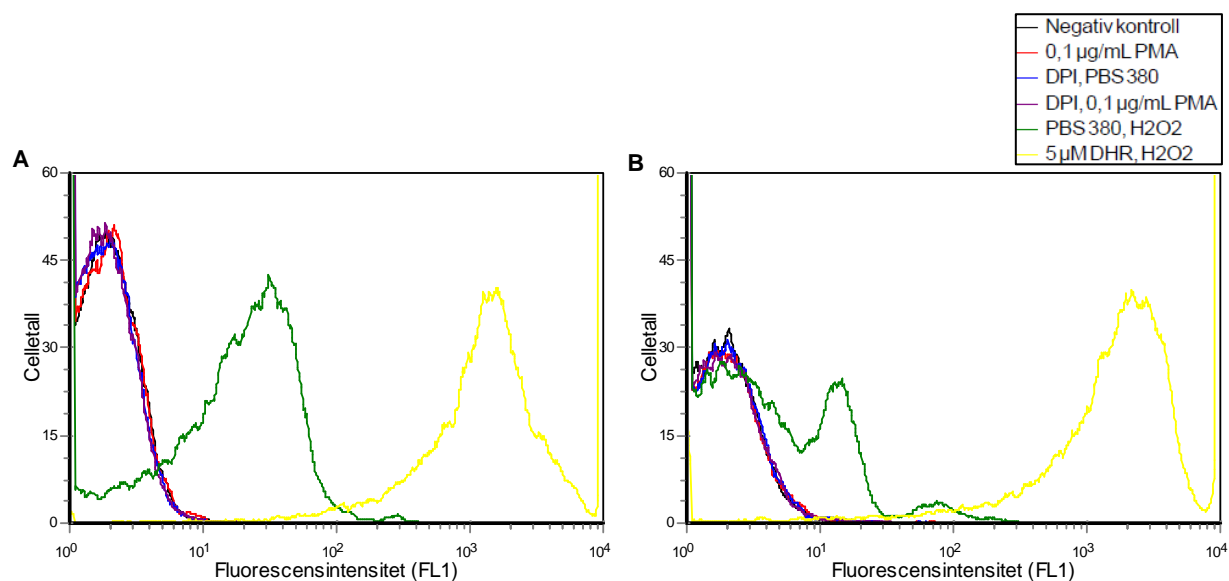
PBL og HKL fra torsk uten PMA og DHR tilsatt, viste ikke fluorescensintensitet ved flow cytometrianalyser med innstillinger for DHR-tilsatte leukocytter. Cellene uten DHR tilsatt var ikke synlige i samme FL1-histogram som de DHR-tilsatte cellene.

Negativ PMA kontroll:

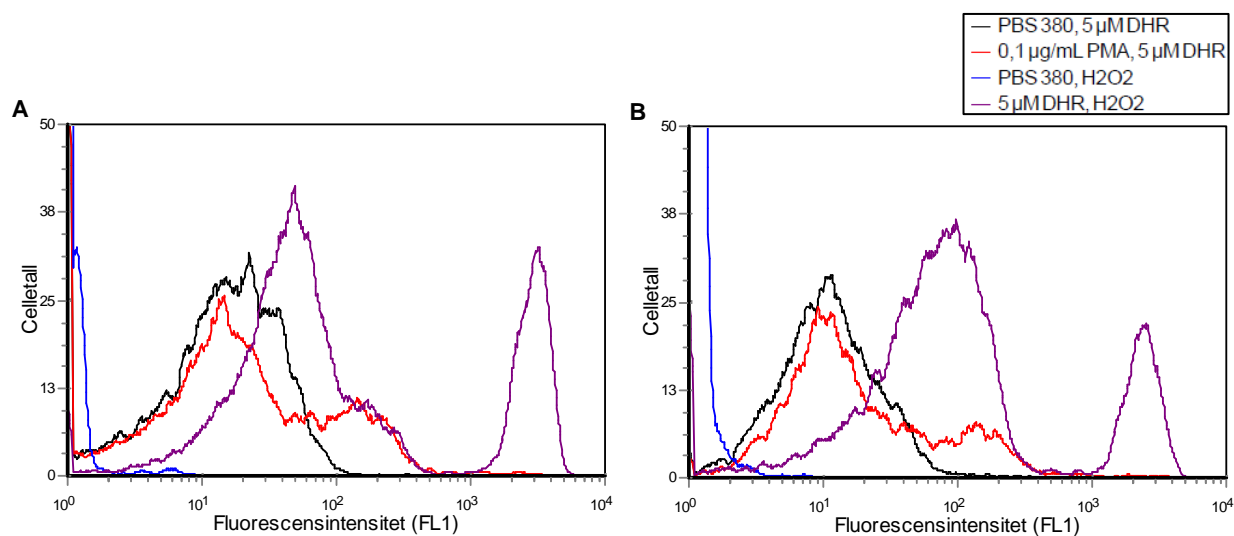
PBL og HKL fra torsk stimulert med PMA (0,1 µg/ml) ble analysert ved flow cytometri med innstillinger beregnet for leukocytter både med og uten DHR. De PMA-stimulerte leukocytterne hadde samme fluorescensintensitet som de ustimulerte, umerkede leukocytterne (Figur 35), og var ikke synlige i samme FL1-histogram som de DHR-tilsatte leukocytterne.

Positiv DHR kontroll:

PBL og HKL fra torsk ble tilsatt DHR (5 µM) og H₂O₂, eller bare H₂O₂, og analysert ved flow cytometri med instrumentinnstillinger beregnet for leukocytter uten DHR (Figur 35), og med DHR tilsatt (Figur 36). Leukocytter tilsatt kun H₂O₂ hadde høyere fluorescensintensitet enn leukocytter uten tilsatte reagenser (Figur 35), men lavere fluorescens enn leukocytter tilsatt DHR, eller DHR og H₂O₂ (Figur 36). Leukocytter tilsatt DHR og H₂O₂ hadde høyere fluorescens enn ustimulerte og PMA-stimulerte leukocytter tilsatt DHR (Figur 36). Dette viste at ved tilsetning av H₂O₂ og DHR, ble fluorescensintensiteten til leukocytterne høyere enn ved tilsetning av DHR til ustimulerte og stimulerte leukocytter.



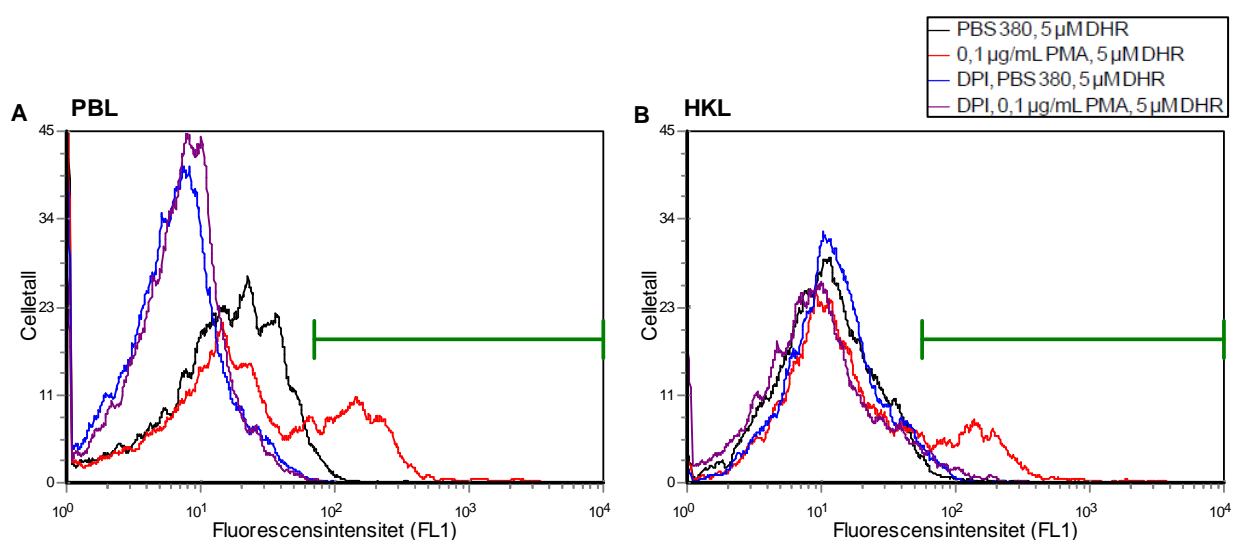
Figur 35: Flow cytometrianalyser fra PMA- og DPI- negative og DHR-positive kontrollforsøk med PBL (A) og HKL (B) fra torsk. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til cellene. Leukocytene ble tilsatt DPI (20 μM), PMA (0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 5 μl 30 % H_2O_2 (0,73 %) og DHR (5 μM) i ulike forsøksoppsett. Flow cytometrianalyser 15 minutter etter siste reagenstilsetning, med instrumentinnstillinger beregnet for prøver uten DHR.



Figur 36: Flow cytometrianalyser fra DHR-positive kontrollforsøk med PBL (A) og HKL (B) fra torsk. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytene. Leukocytter ble tilsatt PBS 380 (ustimulert) eller PMA (stimulert) og DHR (5 μM), eller DHR (5 μM) og 5 μl 30 % H_2O_2 (0,73 %). Flow cytometrianalyser 15 minutter etter siste reagenstilsetning med instrumentinnstillinger beregnet for prøver tilsatt DHR.

Hemming av respiratory burst aktivitet hos torskeleukocytter:

I kontrollprøver tilsatt DPI ble fluorescensnivået til prøver med DHR nedsatt, sammenlignet med prøver tilsatt DHR uten DPI-hemming. Disse resultatene er presentert i figur 37. Av figur 37 kan det observeres både for PBL og HKL at de DPI-tilsatte prøvene, både med ustimulerte og stimulerede leukocytter tilsatt DHR, viste nedsatt fluorescensintensitet og antall DHR-positive celler, i forhold til prøvene uten DPI tilsatt. Denne nedgangen var tydeligere for PBL enn for HKL. I prøvene med de DPI-hemmede, både stimulerede og ustimulerte PBL, var 0,2 % av cellene RHO-positive. 25 % av de uhemmede, stimulerede PBL var RHO-positive. I prøvene med DPI-hemmede HKL var 3 % av de ustimulerte leukocytterne RHO-positive, mens 5 % av de stimulerede var RHO-positive. Av de uhemmede stimulerede HKL var 21 % RHO-positive.

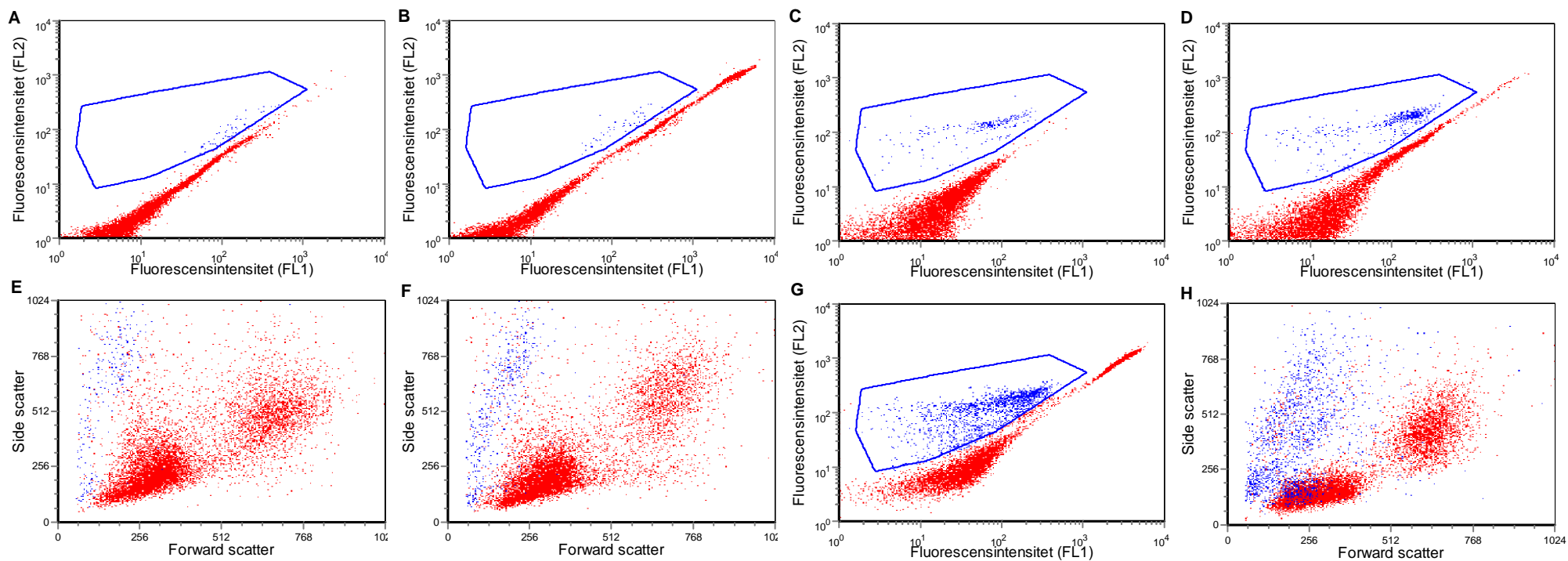


Figur 37: Flow cytometrianalyser fra kontrollforsøk med hemming av respiratory burst aktivitet hos PBL (A) og HKL (B) fra torsk. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytterne. Uhemmede og DPI-hemmede (20 μM), ustimulerte og PMA-stimulerte (0,1 μg/ml) leukocytter ble tilsatt DHR (5 μM). Flow cytometrianalyser etter 15 minutter inkubering med DHR. Grønne histogrammarkører angir RHO-positive leukocytter.

Celledødkontroll:

Det ble tilsatt PI for å påvise døde celler i kontrollprøver med ustimulerte og PMA-stimulerte PBL og HKL fra torsk tilsatt DHR. Noen representative resultater er vist i figur 38. Ut fra gate laget i analysene av PBL, kommer det frem at en liten andel ustimulerte og PMA-stimulerte leukocytter (cirka 0,5 %) av PBL tilsatt DHR, uten PI, var også positive for gaten laget for de PI-merkede cellene (Figur 38 A og B). I analyser av ustimulerte og stimulerte PBL tilsatt DHR og PI, var 2,4 % av de ustimulerte leukocytene PI-positive (Figur 38 C), mens 4,5 % av de stimulerte PBL var PI-positive (Figur 38 D). I tillegg ble PBL tilsatt DHR og H₂O₂ også tilsatt PI og målt i flow cytometeret etter 15 minutter inkubering med DHR. Analyser av resultatene viste at cirka 17, 2 % av PBL tilsatt DHR, H₂O₂ og PI, var PI-positive (Figur 38 G). De døde cellene var små (lav FSC) og viste varierende grad av granularitet (SSC) (Figur 38 E, F og H).

Prøver av ustimulerte og stimulerte PBL fremstilt i figur 38 ble målt i CASY celledetelleren etter flow cytometrianalysene. CASY-utskriftene viste at både de ustimulerte og stimulerte prøvene med PBL tilsatt DHR og PI, hadde en celleoverlevelse på 94 %.

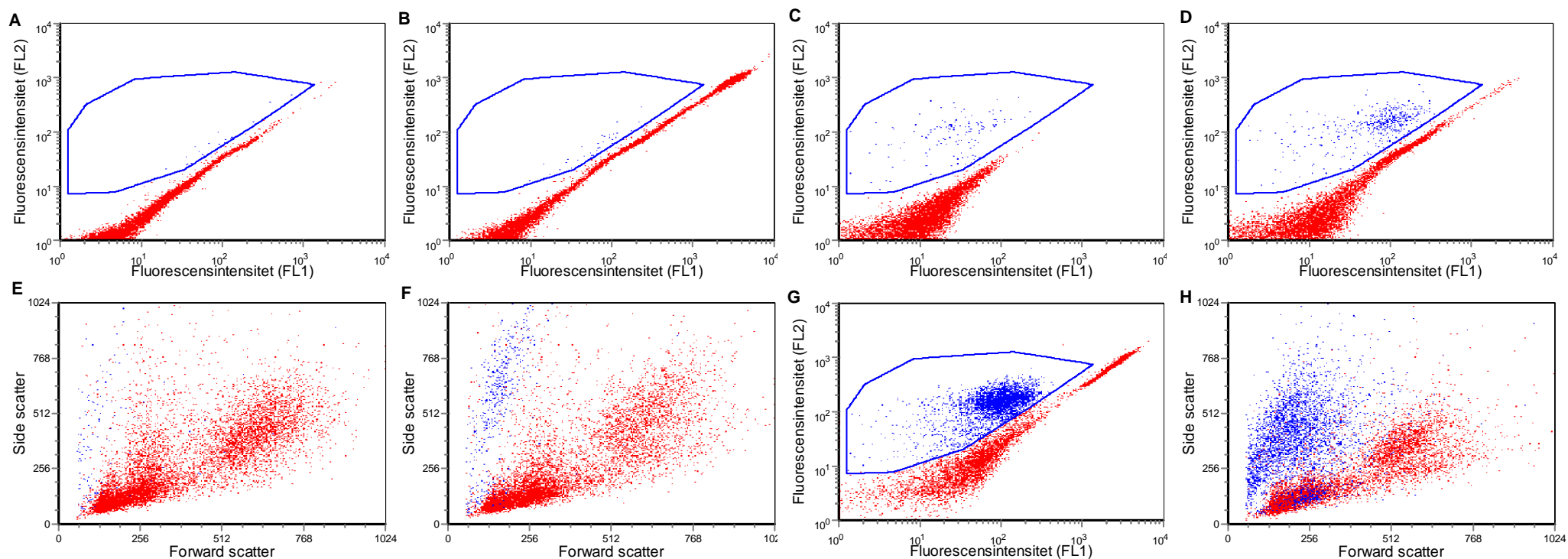


Figur 38: Flow cytometrianalyse fra celledødkontrollforsøk med PBL fra torsk ($N = 1$). Representative scatter plot (A, B, C, D og G) sammenligner RHO-positive med PI-positive (blå region) leukocyters fluorescens. Representative FSC/SSC dot plot (E, F og H) viser plasseringen av de PI-positive (blå), døde leukocytter i dot plot av ustimulerte og PMA-stimulerte prøver tilsatt DHR og PI, og leukocytter tilsatt DHR, H_2O_2 og PI. Ustimulerte leukocytter og leukocytter stimulert med PMA ($0,1 \mu\text{g/ml}$) ble tilsatt DHR ($5 \mu\text{M}$), og eventuelt PI ($2 \mu\text{g/ml}$). A: Ustimulerte PBL tilsatt DHR. B: PMA-stimulerte PBL tilsatt DHR. C og E: Ustimulerte PBL tilsatt DHR og PI. D og F: PMA-stimulerte PBL tilsatt DHR og PI. G og H: Ustimulerte PBL tilsatt DHR, H_2O_2 og PI. Flow cytometrianalyser etter 15 minutter inkubering med DHR.

Analysen av PI-merkede og -umerkede HKL viste at cirka 0,3 % av de ustimulerte og stimulerede leukocytene tilsatt DHR uten PI lå inni gaten laget for PI-positive celler (Figur 39 A og B). 1,4 % av de ustimulerte HKL tilsatt DHR og PI var PI-positive, mens cirka 5 % av PMA-stimulerte celler tilsatt DHR og PI var PI-positive (Figur 39 C og D). Figur 39 G viser at 36,4 % av HKL tilsatt DHR, H₂O₂ og PI, var merket som PI-positive, døde celler. CASY-målinger av leukocytene etter flow cytometri viste at 94,3 % av både de ustimulerte og stimulerede HKL tilsatt DHR fremdeles var i live. Det var ikke nok celleløsning til å måle antall levende celler i prøver tilsatt H₂O₂. Figur 39 E, F og H viser at de PI-positive, døde cellene var små (lav FSC), og hadde varierende grad av granularitet (SSC).

Prøver av ustimulerte og stimulerede HKL, fremstilt i figur 39, målt i CASY celletelleren etter flow cytometrianalyse, viste at ustimulerte HKL tilsatt DHR og PI hadde en overlevelse på 88 %, og PMA-stimulerte HKL tilsatt DHR og PI hadde en overlevelse på 86 %. Det var ikke nok celledensitasjon av H₂O₂-tilsatte HKL til å måle overlevelsen i CASY celletelleren.

Samlet resultater fra PMA-negative og DHR-positive kontrollforsøk, og kontrollforsøk med DPI-hemming av respiratory burst og PI-merking av døde celler, bekreftet at en inkuberingstid på 15 minutter med DHR var optimalt for påvisning av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra torsk.

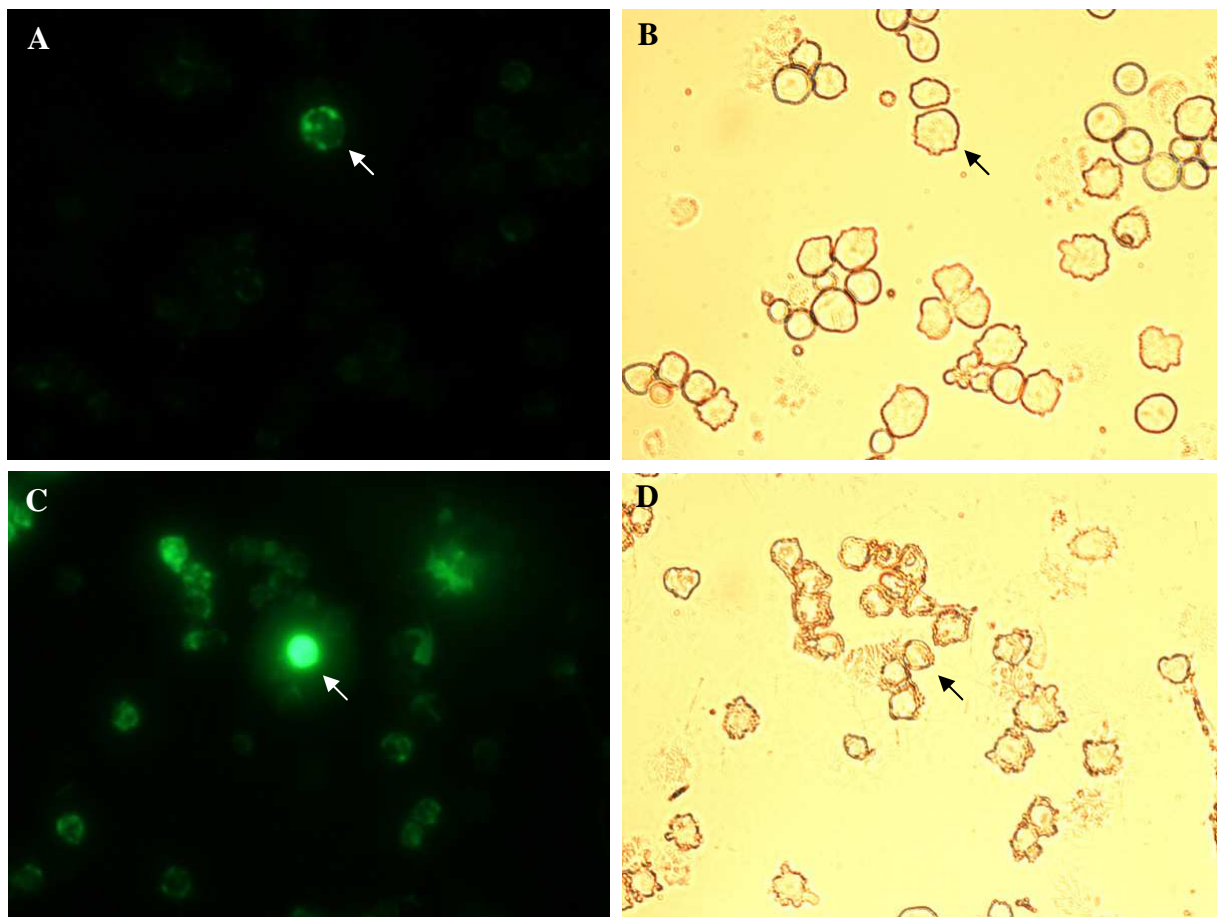


Figur 39: Flow cytometrianalyser fra celledødkontrollforsøk med HKL fra torsk (N = 1). Representative scatter plot (A, B, C, D og G) sammenligner RHO-positive og PI-positive (blå region) leukocyters fluorescens. Representative FSC/SSC dot plot (E, F og H) viser de PI-positive (blå) leukocytenes plassering i dot plot av ustimulerte og stimulerede, og H_2O_2 -tilsatt leukocyter tilsatt DHR og PI. Ustimulerte leukocyter og leukocyter stimulert med PMA (0,1 $\mu\text{g/ml}$) ble tilsatt DHR (5 μM), og eventuelt PI (2 $\mu\text{g/ml}$) A: Ustimulerte HKL tilsatt DHR. B: Stimulerte HKL tilsatt DHR. C og E: Ustimulerte HKL tilsatt DHR og PI. D og F: PMA-stimulerte HKL tilsatt DHR og PI. G og H: HKL tilsatt H_2O_2 , DHR og PI. Flow cytometrianalyse etter 15 minutter inkubering med DHR.

3.6. Fluorescensmikroskopi av leukocytter fra laks og torsk tilsatt DHR

3.6.1. Lakseleukocytter

Ved mikroskopering kunne det observeres enn grønn fluorescens hos noen få celler på preparater av ustimulerte leukocytter fra laks tilsatt DHR (5 μ M) (Figur 40 A). Fase-kontrast bilder av samme område på samme preparat (Figur 40 B) viste flere celler som ikke hadde RHO-fluorescens. På preparater av PMA-stimulerte leukocytter tilsatt DHR (5 μ M), kunne det observeres flere RHO-positive celler, og noen hadde svært sterkt fluorescens (Figur 40 C). Fase-kontrast av samme preparater viste flere celler som ikke kunne observeres ved fluorescensmikroskopi (Figur 40 D). På preparater med ustimulerte, umerkede leukocytter (negative kontroller) var ingen leukocytter RHO-positive.



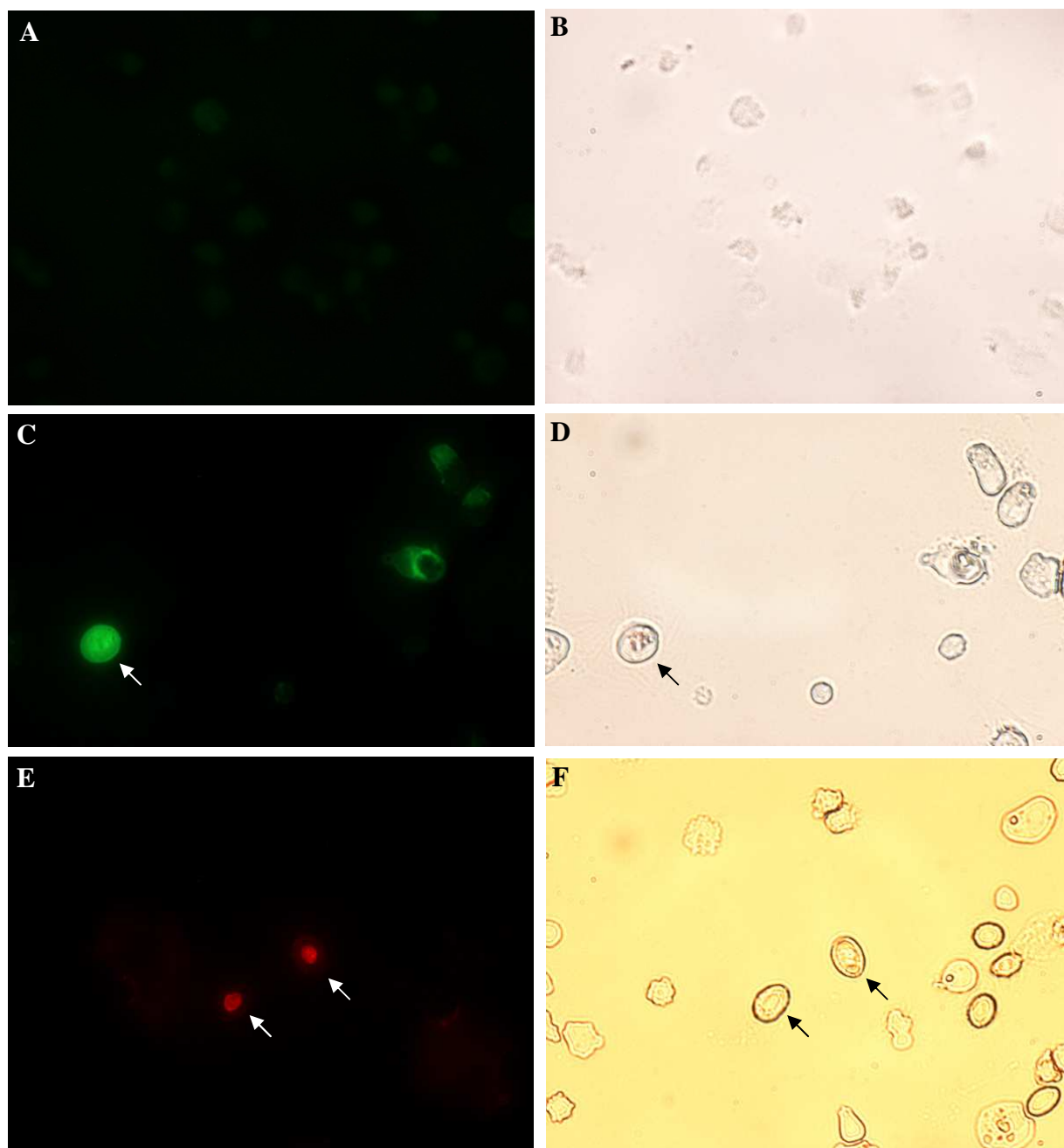
Figur 40: Fluorescensmikroskopering (A og C) og lysmikroskopering (B og D) av HKL fra laks etter respiratory burst assay. A og B: Ustimulerte HKL tilsatt DHR (5 μ M). Bildene er fra samme sted på samme preparat. C og D: PMA-stimulerte HKL merket med DHR (5 μ M). Bildene er fra samme sted på samme preparat. (400x forstørrelse). Pil i figurene angir samme celler på de parvise preparatene.

3.6.2. Torskeleukocytter

Ustimulerte leukocytter uten tilsatt DHR eller PI viste verken grønn eller rød fluorescens (negative kontroller). Ustimulerte PBL og HKL tilsatt DHR (5 μ M) viste liten grad av grønn RHO-fluorescens (Figur 41, A og B). På preparater av PMA-stimulerte HKL og PBL tilsatt DHR (5 μ M), hadde noen celler høyere fluorescensintensitet enn andre (Figur 41, C og D), og det var flere RHO-positive celler på preparater med stimulerte enn ustimulerte leukocytter. De svært fluorescerende leukocytterne sett på preparater av lakseleukocytter ble ikke observert på preparater av torskeleukocytter.

På preparater av torskeleukocytter tilsatt PI, hadde flere celler som var stimulert med PMA (0,1 μ g/ml) en rødfarget kjerne (PI-positive) (Figur 41 E), sammenlignet med ustimulerte leukocytter der det var færre tilfeller av PI-positive celler. Preparater med PI-positive celler observert ved fluorescensmikroskopi, sammenlignet med fase-kontrast av samme område ved hjelp av vanlig lysmikroskopi, viste at mange celler ikke var PI-positive (Figur 41 F).

Preparater av DHR- og PI-tilsatte leukocytter kunne ikke analyseres for RHO-fluorescens i det grønne filteret i fluorescensmikroskopet på grunn av overlappende fluorescensspekter mellom DHR og PI.



Figur 41: Ustimulerte og stimulerte leukocytter fra torsk merket med DHR (5 μM) og PI (2 $\mu\text{g/ml}$). **A og B:** Ustimulerte HKL merket med DHR, 400x forstørrelse. **C og D:** Stimulerte HKL fra torsk tilsatt PMA (0,1 $\mu\text{g/ml}$) og DHR (5 μM), 630x forstørrelse. **E og F:** Stimulerte PBL fra torsk tilsatt PMA (0,1 $\mu\text{g/ml}$), DHR (5 μM) og PI (2 $\mu\text{g/ml}$), 630x forstørrelse. De parvise preparatbildene (**A-B**, **C-D**, **E-F**) fra fluorescensmikroskopi og lysmikroskopi, er av samme område på preparatene. Pilene angir de samme cellene i de parvise preparatene.

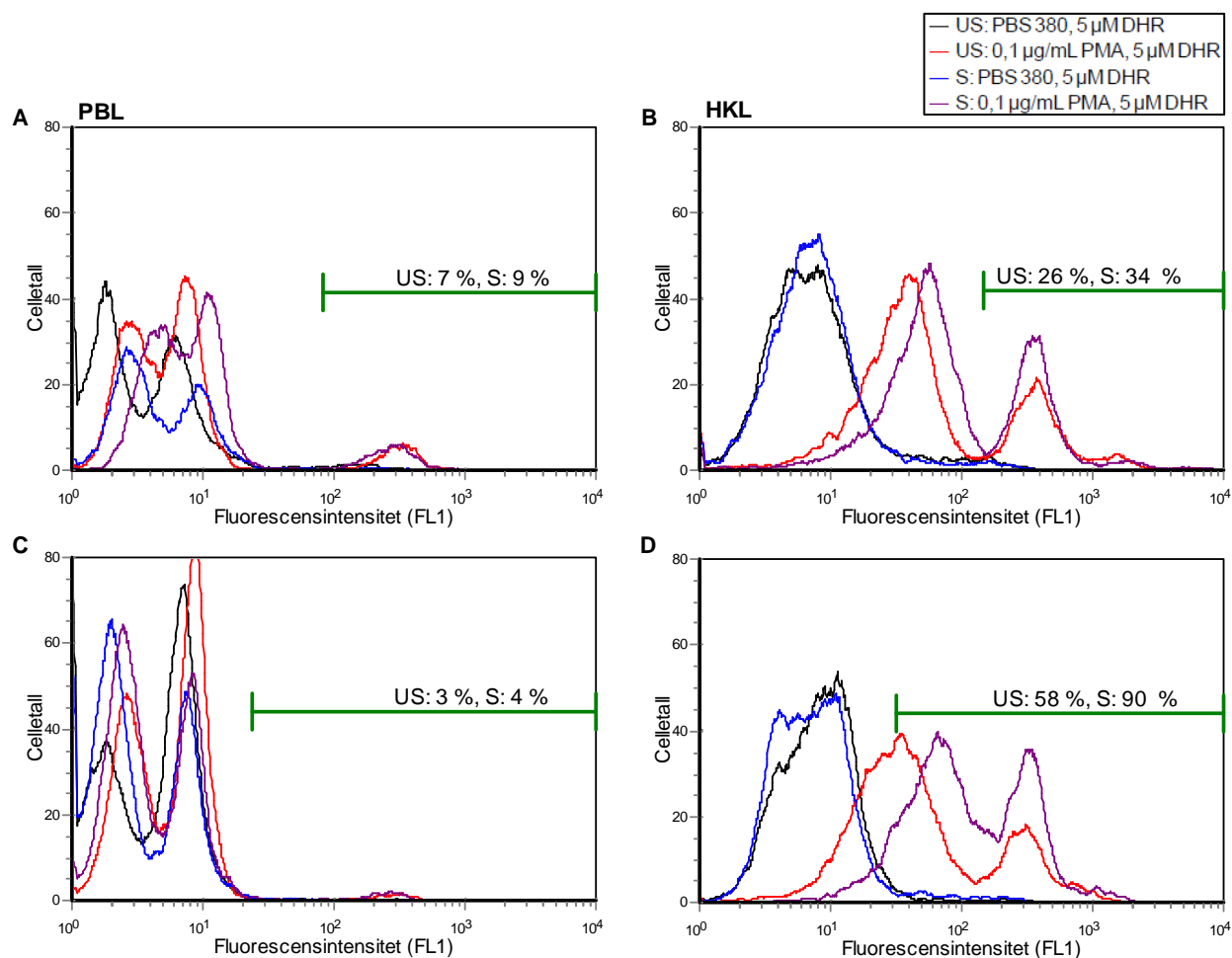
3.7. Analyse av respiratory burst aktivitet hos PBL og HKL fra laks og torsk inkubert med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*

3.7.1. Lakseleukocytter

Etter 1 og 4 timer inkubering av PBL og HKL fra laks med og uten *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, ble et respiratory burst assay på leukocytterne gjennomført. Respiratory burst aktivitet til ustimulerte og PMA-stimulerte leukocytter inkubert både med og uten bakterier ble analysert ved flow cytometri. Resultater fra analysene er presentert i figur 42, og fremstilt i tabell 11. Andel RHO-positive leukocytter ble målt ut fra de DHR-tilsatte, ustimulerte leukocytterne inkubert uten bakterier (2 % RHO-positive celler tillatt).

Figur 42 viser at andel RHO-positive PBL er lavere enn andel RHO-positive HKL, både etter 1 og 4 timer inkubering med bakterier. Resultatene fra analyser av PBL, viser at den prosentvise forskjellen på PMA-stimulerte RHO-positive leukocytter er så vidt høyere i prøver inkubert i 1 og 4 timer med bakterier, i forhold til PBL uten bakterieinkubering. Til forskjell fra resultatene fra HKL, er det en høyere andel RHO-positive PBL etter 1 time inkubering enn etter 4 timer inkubering, både med og uten bakterieinkubering (Figur 42 A og C).

Samtidig viser resultatene at en større andel HKL inkubert med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er RHO-positive sammenlignet med HKL inkubert uten bakterier, både etter 1 og 4 timer inkubering (Figur 42 B og D). Analyser viser også at en høyere prosentandel bakterieinkuberte HKL er RHO-positive etter 4 timer inkubering, i forhold til etter 1 time inkubering. HKL uten bakterieinkubering har også en høyere prosentandel RHO-positive celler etter 4 timer enn etter 1 time inkubering. PMA-stimulerte HKL inkubert med bakterier har en tydelig høyere prosentandel RHO-positive celler enn prøver med HKL inkubert uten bakterier (Figur 42 B og D).



Figur 42: Flow cytometrianalyser av PBL (A og C) og HKL (B og D) fra laks inkubert uten og med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytene. A og B: PBL og HKL inkubert uten (US) og med (S) *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i 1 time. C og D: PBL og HKL inkubert uten (US) og med (S) *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i 4 timer. Ustimulerte leukocytter, og leukocytter stimulert med PMA (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), ble tilsatt DHR (5 μM). Flow cytometrianalyse etter 30 minutter inkubering med DHR. De grønne histogrammarkørene angir prosentandel RHO-positive leukocytter inkubert uten (US) og med (S) *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*.

Tabell 11 viser at ustimulerte leukocytter, både PBL og HKL, inkubert uten *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, har lavere geometrisk middelværdi av fluorescensintensiteten (GMFI) enn de bakterieinkuberte, ustimulerte leukocytene etter 1 time inkubering med bakterier. Etter 4 timer inkubering er GMFI derimot høyere hos de ustimulerte leukocytene uten bakterieinkubering, enn i de ustimulerte bakterieinkuberte leukocytene.

PMA-stimulerte PBL og HKL inkubert uten bakterier i 1 og 4 timer hadde høyere GMFI enn PMA-stimulerte leukocytter inkubert med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*.

GMFI-verdiene målt på både ustimulerte og stimulerede HKL, inkubert uten og med bakterier i 1 time, var høyere enn verdiene til PBL. De PMA-stimulerte PBL etter inkubering med og uten bakterier i 4 timer hadde høyere GMFI-verdier enn HKL med samme forsøksoppsett. De ustimulerte PBL uten og med bakterieinkubering i 4 timer hadde derimot lavere GMFI-verdier enn HKL med samme forsøksoppsett.

Tabell 11: Prosentandel RHO-positive PBL og HKL fra laks, og geometrisk middelverdi av fluorescensintensiteten (GMFI) til de RHO-positive cellene. Inkubert i 1 (N = 1) og 4 (N = 1) timer med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Ustimulerte og PMA-stimulerte leukocytter tilsatt DHR (5 µM).

PBL	Uten bakterier		Med bakterier	
Inkuberingstid	1 time	4 timer	1 time	4 timer
% RHO-positive, ustimulert	2	2	1	2
% RHO-positive, stimulert	7	3	9	4
GMFI, ustimulert	158	99	183	63
GMFI, stimulert	310	248	270	201
HKL				
HKL	Uten bakterier		Med bakterier	
Inkuberingstid	1 time	4 timer	1 time	4 timer
% RHO-positive, ustimulert	2	2	2	4
% RHO-positive, stimulert	26	58	34	90
GMFI, ustimulert	184	149	189	137
GMFI, stimulert	427	224	383	193

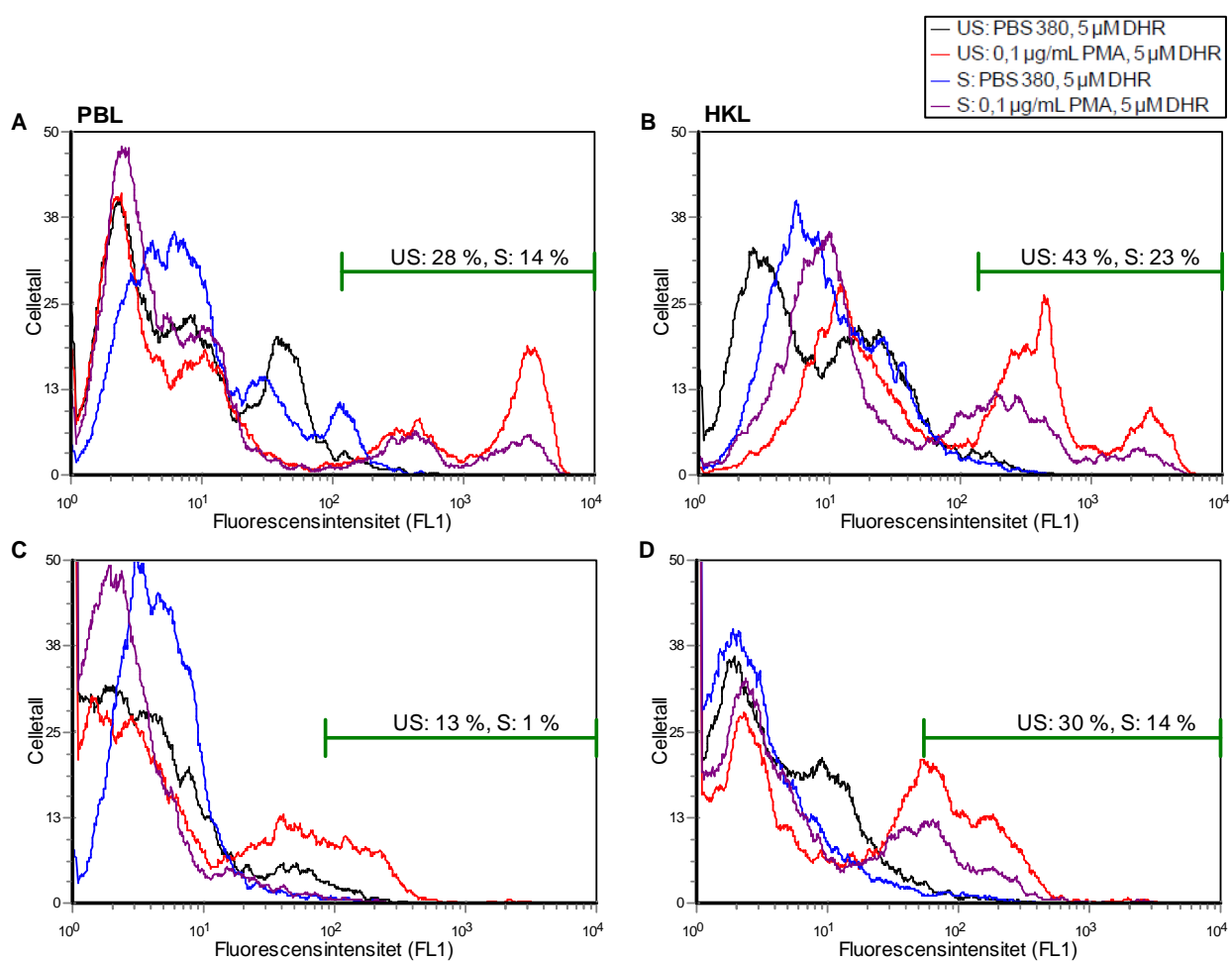
3.7.2. Torskeleukocytter

Prosentandel RHO-positive celler av de stimulerede leukocytterne inkubert uten bakterier, og ustimulerte og stimulerede leukocytter inkubert med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, ble beregnet ut fra de ustimulerte leukocytterne inkubert uten bakterier (2 % RHO-positive celler tillatt).

Figur 43 viser at bakterieinkuberte leukocytter både fra blod og hodenyre inkubert i 1 eller 4 timer, og stimulert med PMA (0,1 µg/ml), hadde lavere prosentandel RHO-positive celler enn de PMA-stimulerte leukocytterne inkubert uten bakterier. Prosentandel RHO-positive PBL og HKL var høyere etter 1 time inkubering enn etter 4 timer inkubering uten og med bakterier. Figur 43 viser også at PMA-stimulerte HKL inkubert uten og med bakterier

hadde høyere andel RHO-positive celler, enn PMA- stimulerte PBL inkubert uten og med bakterier, etter 1 og 4 timer inkubering.

De ustimulerte bakterieinkuberte leukocytene hadde lavere prosentandel RHO-positive celler enn den fastsatte grensen for RHO-positive ustimulerte leukocytter uten bakterieinkubering, på 2 %. Eneste unntaket var de bakterieinkuberte ustimulerte PBL inkubert i 1 time, der 5 % var RHO-positive. I prøver med ustimulerte PBL inkubert med bakterier i 4 timer, var 1 % av leukocytene RHO-positive. Ustimulerte HKL hadde en prosentandel RHO-positive celler på 1 % etter 1 time inkubering, og 2 % etter 4 timer inkubering med bakterier.



Figur 43: Flow cytometrianalyse av PBL (A og C) og HKL (B og D) fra torsk. Representative FL1-histogrammer viser fluorescensintensiteten til leukocytene. Leukocytene ble inkubert i 1 (A og B) eller 4 (C og D) timer uten (US) og med (S) bakterien *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*. Ustimulerte og PMA-stimulerte prøver ble tilsatt DHR (5 μ M). Flow cytometrianalyse etter 15 minutter inkubering med DHR. Grønne histogrammarkører angir prosentandel RHO-positive leukocytter.

Prosentandel RHO-positive ustimulerte og PMA-stimulerte leukocytter inkubert uten og med bakterier, og den geometriske middelveiden av fluorescensintensiteten (GMFI) til de RHO-positive cellene, er fremstilt i tabell 12. GMFI-verdiene til PMA-stimulerte PBL og HKL, inkubert både med og uten bakterier i 1 og 4 timer, var høyere enn GMFI-verdiene til de ustimulerte PBL og HKL inkubert uten og med bakterier. Samtidig hadde leukocytterne inkubert uten og med bakterier en høyere GMFI etter 1 time inkubering, sammenlignet med GMFI-verdiene etter 4 timer inkubering uten og med bakterier.

PMA-stimulerte PBL inkubert uten og med bakterier i 1 og 4 timer, hadde høyere GMFI enn PMA-stimulerte HKL i samme forsøksoppsett. PMA-stimulerte PBL inkubert med bakterier hadde lavere GMFI etter 1 time inkubering, i forhold til PMA-stimulerte PBL inkubert uten bakterier i 1 time. Dette var også tilfelle ved 4 timer inkubering, men da var differansen mellom GMFI-verdiene mellom de PMA-stimulerte PBL inkubert uten og med bakterier lavere (Tabell 12). GMFI-verdiene til ustimulerte PBL inkubert uten og med bakterier viste samme mønster, men verdiforskjellene var mindre.

Ustimulerte HKL inkubert uten bakterier hadde ved både 1 og 4 timer inkubering lavere GMFI enn ustimulerte HKL inkubert med bakterier. Dette var ikke tilfelle for PMA-stimulerte HKL inkubert uten bakterier, som hadde høyere GMFI enn PMA-stimulerte HKL inkubert med bakterier. Som for PBL hadde både ustimulerte og PMA-stimulerte HKL høyere GMFI-verdier etter 1 time enn etter 4 timer inkubering både uten og med bakterier.

Tabell 12: Prosentandel RHO-positive PBL og HKL fra torsk, og geometrisk middelveid av fluorescensintensiteten (GMFI) til de RHO-positive leukocytterne. Leukocytterne ble inkubert uten og med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i 1 (N = 1) eller 4 (N = 1) timer. Ustimulerte og PMA-stimulerte leukocytter ble tilsatt DHR (5 µM). Flow cytometrianalyse etter 15 minutter inkubering med DHR.

PBL	Uten bakterier		Med bakterier	
	1 time	4 timer	1 time	4 timer
Inkuberingstid				
% RHO-positive, ustimulert	2	2	5	1
% RHO-positive, stimulert	28	13	14	1
GMFI, ustimulert	199	136	162	131
GMFI, stimulert	1319	176	835	153
HKL				
HKL	Uten bakterier		Med bakterier	
	1 time	4 timer	1 time	4 timer
Inkuberingstid				
% RHO-positive, ustimulert	2	2	1	2
% RHO-positive, stimulert	43	30	23	14
GMFI, ustimulert	201	103	212	112
GMFI, stimulert	563	134	443	123

4. Diskusjon

Leukocyttenes respiratory burst aktivitet spiller en viktig rolle i nedbrytningen av fagocytterte partikler, og er en viktig funksjon i det uspesifikke immunforsvaret. Ved å merke og måle de ulike leukocyttenes evne til å produsere stoffer som inngår i denne funksjonen, ROS og RNS, er det mulig å kartlegge aktiviteten til de ulike leukocytterne, og bestemme deres rolle i den viktige prosessen med blant annet eliminering av patogener.

I denne oppgaven ble respiratory burst aktivitet i leukocytter fra laks og torsk påvist ved stimulering med PMA, merking med DHR, og påfølgende flow cytometrianalyser. Metodeutprøvingen resulterte i en analyseprosedyre for respiratory burst aktivitet i leukocytter fra laks og torsk, med noen artsavhengige modifikasjoner. Metoden gav reproducerbare resultater, og ble vurdert som velegnet.

4.1. Respiratory burst assay for lakseleukocytter

Ved påvisning av respiratory burst aktivitet hos lakseleukocytter ble det utarbeidet et standard respiratory burst assay, der cellene først ble stimulert med PMA (1 µg/ml) i 5 minutter før tilsetning av DHR (5 µM), og flow cytometrianalyse ble utført etter 30 minutter inkubering. Stimulerte leukocytter tilsatt DHR viste høyere fluorescensintensitet enn DHR-tilsatte ustimulerte leukocytterne. Gjennomsnittlig 22 ± 11 % av stimulerte PBL, og 27 ± 14 % av stimulerte HKL var RHO-positive i forhold til de ustimulerte leukocytterne.

I utarbeidelsen av respiratory burst assayet ble det forsøkt flere inkuberingstider med DHR på 15, 30, 45 og 60 minutter før flow cytometrianalyse. Ved flow cytometrianalyse etter 15 minutter inkubering så det ikke ut til at respiratory burst hos leukocytterne hadde blitt aktivert i samme grad som ved senere analysetidspunkt. Ved 30 minutter inkubering ble de RHO-positive stimulerte cellene mer avgrenset fra de RHO-negative i FL1-histogrammene, enn etter 45 og 60 minutter inkubering. Dette indikerer at skillet mellom RHO-positive og RHO-negative celler blir mindre ved lengre tids inkubering. I tillegg var prosentandelen RHO-positive celler høyere både for PBL og HKL etter 30 minutters inkuberingstid med DHR enn ved senere måletidspunkt. Resultatene fra 30 minutters inkuberingstid stemmer godt overens med resultater fra studier med bruk av PMA-stimulering og DHR-merking på andre fiskearter som gullfisk (*C. auratus*) (Katzenback and Belosevic, 2009), regnbueørret (*O. mykiss*) (Stafford *et al.*, 2001) og havkaruss (*S. aurata*) (Ortuño *et al.*, 2000).

Flow cytometrianalyser viste at ustimulerte leukocytter tilsatt DHR hadde fluorescensintensitet som gjorde de synlige i FL1-histogrammet ved de anvendte instrumentinnstillingene. Samtidig ble de ustimulerte leukocytene tilsatt DHR mer RHO-positive (fluorescerende) jo lenger de ble inkubert. Siden alle celler til en viss grad har fagocytisk aktivitet hos pattedyr (Aderem and Underhill, 1999), er det mulig at en liten andel DHR blir oksidert til fluorescerende RHO i alle leukocytene hos fisk. I tillegg kan fluorescensen hos de ustimulerte DHR-tilsatte leukocytene indikere at DHR også blir omdannet til fluorescerende RHO ved andre stimuli av cellene enn PMA. Det er også mulig at DHR autooksideres til RHO ved eksponering for lys, luft og temperaturer over $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Invitrogen, 2009c).

Ideelt sett skulle de RHO-negative lakseleukocytene i de PMA-stimulerte DHR-tilsatte prøvene, vist samme fluorescensintensitet som de ustimulerte DHR-tilsatte prøvene. Dette var ikke tilfelle. Størstedelen av de PMA-stimulerte DHR-tilsatte leukocytene karakterisert som RHO-negative celler, lå ofte noe høyere enn de ustimulerte leukocytene i FL1-histogrammene. Dette tyder på at PMA har en innvirkning på alle leukocytene. En annen mulighet er at celler som har blitt stimulert av PMA, frigjør cytokiner og andre humorale stoffer som aktiverer de andre cellene i leukocyttsuspensjonen. Siden alle celler i pattedyr til en viss grad har fagocytisk aktivitet (Aderem and Underhill, 1999), er det mulig at også alle celler fra fisk kan stimuleres til å utøve en begrenset høyere respiratory burst aktivitet. Dermed vil disse cellene også bli noe mer RHO-positive enn de ustimulerte DHR-tilsatte leukocytene.

I tidligere studie utført av Egenberg (2006) ble det prøvd ut to fluorescerende markører for respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks; chlorometyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H₂DCFDA), og 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H₂DCFDA). Ved flow cytometrianalyser av HKL fra laks stimulert med PMA (1 $\mu\text{g/ml}$) og tilsatt disse markørene, viste cellene varierende grad av fluorescensintensitet (GMFI). PMA-stimulerte HKL tilsatt CM-H₂DCFDA viste lavere GMFI-verdier sammenlignet med PMA-stimulerte HKL tilsatt H₂DCFDA. I det studiet ble det derimot foreslått å prøve DHR som markør, i stedet for CM-H₂DCFDA og H₂DCFDA. GMFI-verdiene til de DHR-tilsatte PMA-stimulerte HKL og PBL fra laks i forsøk utført i denne oppgaven viste en jevn økning med tid. GMFI målt på cellene inkubert med CM-H₂DCFDA og H₂DCFDA ble beregnet ut fra alle analyserte celler i prøvene. GMFI til de DHR-tilsatte leukocytene i denne oppgaven ble beregnet ut fra kun de RHO-positive cellene. Sammenligning av disse verdiene er derfor ikke mulig, men som for leukocytene tilsatt CM-

H₂DCFDA og H₂DCFDA i studiet av Egenberg (2006), økte GMFI til de DHR-tilsatte, RHO-positive cellene over tid. Flow cytometrianalyser etter 30, 45 og 60 minutter viste at GMFI til de RHO-positive cellene økte med inkuberingstiden. Dette stemmer også med funn i forsøk med havkaruss (*S. aurata*) (Ortuño *et al.*, 2000), der fluorescensintensiteten til PMA-stimulerte DHR-merkede HKL økte jevnt fra tid 0 til siste måling ved 60 minutter. Økningen av GMFI til de RHO-positive leukocytterne kan komme av en akkumulering av fluorescerende RHO i cellene (Crow, 1997).

I denne oppgaven ble GMFI til de RHO-positive leukocytterne målt for å angi aktivitetsgraden til de respiratory burst aktiverte cellene. En annen mulighet er å måle GMFI til alle leukocytter målt i flow cytometrianalysen. På denne måten kan den samlede GMFI-verdien til de ustimulerte leukocytterne tilsatt DHR, sammenlignes med den samlede GMFI-verdien til de PMA-stimulerte leukocytterne tilsatt DHR. Hvilken metode som er best for beregning av graden av respiratory burst aktivitet i leukocytterne, er vanskelig å avgjøre, og kan variere mellom forsøk. I noen forsøk med flow cytometrianalyser av de ustimulerte DHR-tilsatte leukocytterne, lå cellene i en samlet celletopp i fluorescenshistogrammet, samtidig som de stimulerte DHR-tilsatte cellene fordelte seg ujevnt i to delte topper. Toppen med høyest fluorescens var ofte mindre enn den med lavere fluorescens. Celletoppen av stimulerte leukocytter med høy fluorescens, lå høyere enn den ustimulerte celletoppen, mens den andre celletoppen lå lavere enn den ustimulerte celletoppen. I slike tilfeller vil det beste trolig være å beregne GMFI av kun cellene som er RHO-positive, da celletoppen med lav fluorescens vil dra gjennomsnittet for alle de PMA-stimulerte cellene ned. I forsøk der celler i ustimulerte og stimulerte prøver tilsatt DHR ligger samlet i celletopper som ikke varierer mye fra hverandre i fluorescenshistogrammene, vil det trolig være mest hensiktsmessig å sammenligne GMFI fra alle cellene i de to prøvene. Det er også mulig å gate celler ut fra dot plot for å studere bestemte cellepopulasjoner. Slike analysebearbeidelser vil kunne gi informasjon om ulike cellepopulasjoners respiratory burst aktivitet.

I dette studiet var prosentandel RHO-positive HKL fra laks, og GMFI-verdiene, høyere enn for PBL ved alle måletidspunktene. Årsaken til dette kan være en høyere andel fagocytterende leukocytter i hodenyre enn i blod hos laks (Pettersen *et al.*, 2000; Rønneseth *et al.*, 2006).

Resultater fra standard forsøksoppsettet av respiratory burst assay for lakseleukocytter fra ulike individer viste relativt store forskjeller i respiratory burst aktiviteten og andel RHO-positive leukocytter. I tillegg var plasseringen til de DHR-tilsatte leukocytterne i FL1-histogrammer ofte noe forskjellig fra fisk til fisk. Årsakene til disse individuelle forskjellene

kan være mange og komplekse, og må regnes med som ukontrollerbare variabler i respiratory burst assay.

4.2. Respiratory burst assay for torskeleukocytter

Det ble utarbeidet et standard forsøksoppsett i respiratory burst assay for torskeleukocytter, der PBL og HKL ble tilsatt PMA (0,1 µg/ml) 5 minutter før tilsetting av DHR (5 µM), og videre inkubert i 15 minutter før flow cytometrianalyse. Prosentandel RHO-positive celler var gjennomsnittlig 17 ± 8 % i PBL og 26 ± 7 % i HKL.

Tidlig i forsøksperioden måtte konsentrasjonen av PMA nedjusteres fra 1 µg/ml, til 0,1 µg/ml, på grunnlag av en betydelig celledød i prøvene. Til tross for at en del celler så ut til å være døde også ved en konsentrasjon på 0,1 µg/ml i prøvene, særlig HKL, var antall RHO-positive celler høyere enn ved en PMA-konsentrasjon på 1 µg/ml i prøvene. Prosentandel RHO-positive celler gikk derimot noe ned etter at cellene ble gatet. Dette indikerer at en del av de døde cellene også var RHO-positive. Ved tilsetting av lavere PMA-konsentrasjoner på 0,01 og 0,001 µg/ml i prøvene, gikk prosentandelen RHO-positive leukocytter ned i forhold til en PMA-konsentrasjon på 0,1 µg/ml. Samtidig endret ikke antall celler gatet som levende i FSC/SSC dot plotene seg nevneverdig i forhold til en PMA-konsentrasjon på 0,1 µg/ml. Dette viser at torskeleukocytter er svært sensitive for PMA, og celledød induseres fort, og er synlig i scatter plot innen 30 minutter.

Ved stimulering av HKL med PMA-konsentrasjon på 1 µg/ml var fluorescensintensiteten til de RHO-positive cellene lavere enn ved stimulering med PMA-konsentrasjon på 0,1 µg/ml. Dette stemmer overens med studier av leukocytter fra hund (Eickhoff *et al.*, 2004), da det ble antydnet at høye konsentrasjoner av PMA hadde negativ effekt på fagocytosekapasiteten og fluorescensintensiteten til PMA-stimulerte leukocytter, sammenlignet med leukocytter stimulert med lavere PMA-konsentrasjoner.

Fluorescensintensiteten til PBL og HKL stimulert med 0,01 og 0,001 µg/ml PMA var også lavere enn ved en PMA-konsentrasjon på 0,1 µg/ml i prøvene. Dette antyder at disse konsentrasjonene var for lave til at cellene klarte å produsere like store mengder ROS og RNS som ved stimulering med PMA-konsentrasjon på 0,1 µg/ml.

Da torskeleukocytterne viste seg å være svært sensitive for PMA, ble POLY I:C og LPS prøvd ut som stimulanter for å aktivere respiratory burst aktiviteten. Etter tilsetting av stimulant og DHR, og påfølgende flow cytometrianalyse etter 30 minutter inkubering, viste resultatene at tilnærmet ingen av cellene var RHO-positive. Dette kan komme av at

leukocytene trengte lengre stimuleringsstid med POLY I:C og LPS i forhold til PMA, at konsentrasjonene var for lave, eller at POLY I:C og LPS ikke stimulerte respiratory burst aktivitet i leukocytene.

Lengre inkuberingsperioder med POLY I:C og LPS, og lavere og høyere konsentrasjoner, har vært brukt i tidligere studier av leukocytter fra torsk (Steiro *et al.*, 1998; Seppola *et al.*, 2007). En lenger inkuberingsstid i respiratory burst assayet hadde hatt negativ innvirkning på cellekvaliteten i prøvene da leukocytene er suspendert i PBS 380, i tillegg til at det hadde fått praktiske konsekvenser ved bruk av assayet i andre forsøk. Samtidig viste resultatene ved stimulering med POLY I:C og LPS at prosentandelen RHO-positive celler var mye lavere enn ved PMA-stimulering. Dette kan komme av at POLY I:C og LPS ikke stimulerer produksjonen av ROS og RNS i samme grad som PMA.

POLY I:C kan stimulere produksjon av cytokinet INF- γ i leukocytter fra laks og torsk. INF- γ er kjent for å påvirke det uspesifikke og spesifikke immunsystemets antivirale og antimikrobielle funksjoner, og aktiverer blant annet makrofager (Furnes *et al.*, 2009). Grunnen til at det ikke ble sett en økning i RHO-positive leukocytter ved stimulering med POLY I:C, kan være at POLY I:C-stimulert produksjon av INF- γ ikke hadde kommet igang tilstrekkelig i løpet av inkuberingsperioden til å aktivere respiratory burst aktivitet hos leukocytene. Det samme er trolig tilfelle ved LPS-stimulering av torskeleukocytene. LPS er kjent for å stimulere fagocytisk aktivitet hos leukocytter via TLR4-binding av LPS på celleoverflaten til fagocytter. Videre frigir de aktiverte fagocytene cytokiner som aktiverer flere fagocytter. For at denne aktiveringen skal bli synliggjort gjennom et respiratory burst assay, er leukocytene trolig avhengig av lenger inkuberingsstid før tilsetning av DHR og påfølgende flow cytometrianalyse. Det at både POLY I:C og LPS er avhengig av lengre inkuberingsperioder, og at effekten på stimulering av respiratory burst aktivitet i leukocytene er usikker, gjør PMA til en mer høvelig stimulant av respiratory burst aktivitet hos torskeleukocytter i assayet utviklet i denne oppgaven.

I standard forsøksoppsettet av respiratory burst assay på torskeleukocytter stimulert med PMA og tilsatt DHR, viste resultater etter 15 minutter inkubering med DHR at prosentandel RHO-positive celler var høyere i HKL (26 ± 7 %) enn i PBL (17 ± 8 %). Etter 30 minutter inkubering med DHR, var prosentandel RHO-positive celler 25 ± 7 % i HKL, og 20 ± 15 % i PBL. På bakgrunn av den lavere prosentandelen RHO-positive HKL, og det høye standardavviket i prosentandel RHO-positive PBL etter 30 minutter inkubering, ble det valgt en inkuberingsstid på 15 minutter etter DHR-tilsetning før flow cytometrianalyse.

Den lavere prosentandelen RHO-positive HKL etter inkubering med DHR i 30 minutter, i forhold til inkubering i 15 minutter, kan komme av cellene stimulert med PMA allerede hadde reagert og blitt RHO-positive etter 15 minutter inkubering. Det høye standardavviket i RHO-positive PBL etter 30 minutter inkubering kommer trolig av individforskjeller, der en del av cellene i prøvene fra enkelte individer ble overstimulert og døde, mens leukocytter i PBL fra andre individer tålte stimulering bedre. I de prøvene der cellene ble overstimulert, ble de døde cellene gatet bort og ikke tatt med i beregningen av andel RHO-positive respiratory burst aktiverte celler. I de prøvene der cellene tålte stimuleringen bedre, ble store deler av cellepopulasjonen av PBL gatet, og flere celler ble tatt med i beregningen av prosentandel RHO-positive celler. Disse resultatene tyder på at torskeleukocytter blir påvirket av en PMA-konsentrasjon på 0,1 µg/ml, og at en inkuberingstid på 15 minutter etter DHR-tilsetning er best egnet.

De RHO-negative PMA-stimulerte leukocytene fra torsk la seg i FL1-histogrammene på samme fluorescensintensitet som de ustimulerte cellene tilsatt DHR. Dette kan bety at det ikke forekommer, som for laks, celler som bare delvis blir stimulert og er lavt RHO-positive etter DHR-tilsetning. Siden en del av de PMA-stimulerte DHR-tilsatte cellene ligger like langt nede på FL1-histogrammene som de ustimulerte cellene, kan det tenkes at disse cellene mangler evne til respiratory burst aktivitet, og at de derfor ikke kan danne ROS eller RNS som oksiderer DHR til fluorescerende RHO.

4.3. Kontrollforsøk i utarbeidingen av respiratory burst assay for leukocytter fra laks og torsk

Ustimulerte leukocytter fra laks og torsk uten tilsatt DHR, kunne ikke sees i FL1-histogrammer ved samme instrumentinnstillinger som de ustimulerte og stimulerte leukocytene tilsatt DHR. Dermed påvirket ikke eventuell autofluorescens fra cellene analysene av fluorescensen i RHO-positive leukocytter. Resultater fra kontrollforsøk viste i tillegg at tilsetning av PMA alene ikke medførte fluorescensøkning hos leukocytene. Dermed kan det slås fast at verken cellene, eller tilsatt PMA, hadde fluorescerende egenskaper som feilaktig kunne tolkes som RHO-fluorescens.

I følge van Pelt *et al.* (1996) er H₂O₂ hovedmetabolitten ved oksidasjon av DHR. Ved tilsetning av H₂O₂ til prøver med DHR økte fluorescensen til cellene kraftig i forhold til de ustimulerte leukocytene tilsatt DHR. Samtidig endret plasseringen til leukocytene seg i scatter plotene ved tilsetning av H₂O₂. Det er godt mulig at en del av cellene, som var små (lav

FSC) og granulære (høy SSC), var døde, da Li *et al.* (1997) rapporterte at H_2O_2 kan indusere apoptose hos fagocytter. Leukocytene i kontrollforsøket ble kun brukt til å verifisere at H_2O_2 oksiderte DHR til fluorescerende RHO som kunne detekteres ved flow cytometrinanalyse, og cellekvaliteten og den endrede scatter plasseringen hadde ikke noe å si i det positive DHR kontrollforsøket.

En del av de stimulerte leukocytene i de H_2O_2 -tilsatte prøvene viste kun noe høyere fluorescens enn de stimulerte leukocytene kun tilsatt DHR. Årsaken til dette kan være at oksidasjon av DHR til fluorescerende RHO er avhengig av katalyse ved myeloperoksidase (Wardman, 2007), og at tilgjengeligheten til myeloperoksidase var lav. I tillegg kan den delvise økte fluorescensintensitet i cellene komme som følge av mangel på reagenser tilgjengelig i løsningen. Dermed vil fluorescensintensiteten bli lavere på grunn av mindre oksidasjon av DHR til RHO, forårsaket av mangel på MPO, H_2O_2 eller DHR, eller en kombinasjon av dette. Ustimulerte leukocytter fra torsk uten DHR, kun tilsatt H_2O_2 , hadde en noe høyere fluorescens enn cellene i den negative kontrollen uten tilsatt reagenser. Denne fluorescensintensiteten var riktignok mye lavere enn fluorescensintensiteten til leukocytter tilsatt bare DHR, eller DHR og H_2O_2 . De samlede resultatene fra kontrollforsøk med leukocytter tilsatt H_2O_2 og DHR, viser at DHR i leukocytene oksideres til sterkt fluorescerende RHO ved H_2O_2 .

Ved tilsetning av DPI i prøver med leukocytter fra laks og torsk før respiratory burst assay, ble fluorescensintensiteten til leukocytter lavere enn prøvene uten DPI tilsatt, og tilnærmet lik de ustimulerte DHR-tilsatte leukocytene. DPI er kjent for å hemme enzymene NADPH oksidase og NO syntase, som er nødvendige i dannelsen av ROS og RNS i respiratory burst reaksjonen. Når produksjonen av H_2O_2 og $ONOO^-$ blir hemmet i leukocytene, skal heller ikke DHR kunne oksideres til fluorescerende RHO. Resultatene viste at DHR-oksidasjonen til RHO ble hemmet av DPI. Henholdsvis 5 og 3 % av DPI-tilsatte, PMA-stimulerte PBL og HKL fra laks, og 3 og 0,2 % av DPI-tilsatte, PMA-stimulerte HKL og PBL fra torsk, var RHO-positive. Samtidig var mellom 20 og 25 % av de uhemmede, stimulerte leukocytene RHO-positive. Disse prosentandelene stemmer overens med resultater fra studier utført av Rinaldi *et al.* (2007), som viste at 98 % av RHO-fluorescensen til PMA-stimulerte leukocytter fra pattedyr ble hemmet av DPI.

Respiratory burst aktiviteten i PBL ble mer hemmet av DPI enn i HKL, både hos laks og torsk. Dette kan komme av at leukocytter i blod stort sett er uaktiverte, mens leukocytter i hodenyre på forhånd kan være mer aktiverte og dermed har en lagret mengde ROS og RNS

som kan oksidere DHR til RHO, til tross for hemming av NADPH oksidase- og NO syntase-enzymene med DPI.

Døde celler i de stimulerte og ustimulerte leukocytprøvene fra laks og torsk ble merket med PI, og flow cytometri resultatene ble sammenlignet med CASY-målinger. Prosentandel døde celler merket av PI og målt ved flow cytometri, og målt i CASY celledeller, samsvarte godt, med noen få prosent i forskjell. Derimot er det viktig å merke seg at andel levende celler i de ustimulerte prøvene var oftest noe høyere enn i de stimulerte. Det er tidligere vist at respiratory burst aktivitet kan fremkalle celledød (Laskay *et al.*, 2008). Det økte antallet døde celler i PMA-stimulerte prøver, særlig hos torsk, kan muligens forklares med at stimuleringen induserer celledød.

De samlede resultatene av kontrollforsøkene samsvarer med teorien om at PMA stimulerer produksjonen av NADPH oksidase og medfører produksjon av ROS og RNS, og at DHR blir oksidert til RHO ved H_2O_2 . Denne oksidasjonen kunne hemmes av DPI. På bakgrunn av disse slutningene kan det videre konkluderes med at DHR er en godt egnet markør i assayet for påvisning av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk. Et kontrollforsøk der DHR ble tilsatt celler som er kjent å mangle respiratory burst aktivitet burde vært gjennomført. Eksempel på slike celler er TO-celler, som er en cellelinje med opphav i leukocytter fra hodenyre hos laks (Pettersen *et al.*, 2008). Ved å gjennomføre et respiratory burst assay på TO-celler ville det vært mulig å se hvordan DHR-tilsatte celler, som teoretisk sett skal være helt RHO-negative, plasserer seg i FL1-histogrammene. Dersom TO-celler tilsatt DHR avgir høyere fluorescens enn leukocytter uten tilsatt DHR, kan dette indikere at DHR kan oksideres til RHO ved andre funksjoner i cellene enn respiratory burst. Grunnet praktiske begrensninger på laboratoriet ble et slikt negativt DHR kontrollforsøk ikke utført i denne oppgaven.

4.4. Sammenligning av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk

Proseduren utarbeidet for påvisning av respiratory burst aktivitet i lakseleukocytter viste seg, med visse modifikasjoner, å være anvendelig også på leukocytter fra torsk. I optimaliseringen av respiratory burst assay for leukocytter fra laks og torsk var det to forskjeller som skilte forsøksoppsettene; konsentrasjonen av PMA ved stimulering av

leukocytene og inkuberingstid fra tilsetning av DHR (tid 0) frem til flow cytometrianalyse. Lakseleukocytene ble stimulert med en PMA-konsentrasjon (1 $\mu\text{g/ml}$) ti ganger høyere enn torskeleukocytene (0,1 $\mu\text{g/ml}$). Samtidig måtte lakseleukocytene inkuberes dobbelt så lenge (30 minutter) som torskeleukocytene (15 minutter) etter tilsetning av DHR, for å oppnå høyest prosentandel RHO-positive, gatede PBL og HKL.

Det er vist at torsk, sammenlignet med laks, har manglende eller svært lav produksjon av spesifikke antistoffer, og manglende proliferasjon av antistoffproduserende celler, etter stimulering med antigen ved vaksinerings (Rønneseth *et al.*, 2007; Alvarez-Pellitero, 2008). Dette medfører trolig at torsk benytter det uspesifikke immunsystemet i bekjempelsen av infeksjoner i større grad enn atlantisk laks. Steiro *et al.* (1998) fant at leukocytter fra torsk hadde lavere respiratory burst aktivitet enn andre fiskearter, deriblant atlantisk laks, mens Nikoskelainen *et al.* (2006) fant at torsk hadde dobbelt så høy respiratory burst aktivitet som regnbueørret (*O. mykiss*). Resultater i denne oppgaven viser at leukocytter fra torsk har tilnærmet samme respiratory burst aktivitet som leukocytter fra laks, der respiratory burst aktiviteten hos PBL og HKL fra torsk var henholdsvis gjennomsnittlig 5 % og 1 % lavere enn PBL og HKL fra laks.

Samtidig viser resultater fra flow cytometrianalyser i respiratory burst assay at GMFI-verdiene til RHO-positive PBL fra laks var lavere sammenlignet med PBL fra torskeleukocytter. GMFI til RHO-positive HKL fra laks er derimot høyere enn til HKL fra torsk. Dette indikerer at respiratory burst aktiverte PBL fra laks har lavere reaktivitet (GMFI) enn PBL fra torsk, mens HKL fra laks har høyere respiratory burst reaktivitet enn HKL fra torsk. Ved en infeksjon vil patogener først være tilstede i blod før de transporteres til organer. Fordi det uspesifikke immunsystemet hos torsk trolig spiller en mer sentral rolle enn det spesifikke, vil det derfor være sannsynlig at leukocytter hos torsk viser en høyere respiratory burst aktivitet i blod enn i hodenyre, for å raskest mulig fjerne patogener. Immunforsvaret hos laks baseres mer på det spesifikke immunsystemet, og eliminering av patogener fra vev er trolig en viktig prosess hos laks.

Det at immunforsvaret hos torsk trolig baseres mer på den uspesifikke i forhold til den spesifikke delen, kan i tillegg forklare den økte dødeligheten ved PMA-stimulering av leukocytene fra torsk, sammenlignet med laks. Trolig reagerer leukocytter i det uspesifikke immunforsvaret hos torsk kraftigere ved stimulering enn hos laks. Som tidligere nevnt kan respiratory burst aktivitet indusere celledød (Laskay *et al.*, 2008), og dette kan forklare det økte antallet døde celler i målinger av PMA-stimulerte torskeleukocytter i forhold til PMA-stimulerte lakseleukocytter.

Det at respiratory burst aktivitet hos torskeleukocytter kan analyseres ved flow cytometri etter kortere inkuberingstid med DHR enn leukocytter fra laks, samsvarer med tidligere studier av respiratory burst hos torskeleukocytter, beskrevet av Whyte (2007), som indikerte at torskeleukocytters respiratory burst aktivitet stimuleres raskere enn i andre fiskearter.

Siden forsøksoppsettene var teknisk like for prøvene fra laks og torsk, med prøveuttaking og isolering av leukocytterne på lik måte, og hver inkubering ble utført i romtemperatur i mørke med vipping, kunne ikke forskjellene i resultatene forårsakes av ulik håndtering av cellene.

I respiratory burst assay på lakse- og torskeleukocytter kunne antall RHO-positive leukocytter, og fluorescensintensiteten avvike noe fra individ til individ. Dette gjenspeiles i standardavvikene til beregninger av gjennomsnittlig prosentandel RHO-positive leukocytter fra flow cytometrianalysene. I følge Kaplan *et al.* (2008) varierer ROS-produksjonen til sebrafisk (*Danio rerio*) gjennom døgnet. Trolig kan dette også være tilfelle for leukocytter fra andre fiskearter som torsk og laks, noe som kan bidra til å forklare variasjoner i respiratory burst aktiviteten til leukocytter fra ulike individer.

Laks og torsk er systematisk klassifisert i to ulike overordener, Protacanthopterygii (Moyle and Cech, 2004b) og Paracanthopterygii (Moyle and Cech, 2004a), i undergruppen Euteleostei av beinfisker (gruppen Teleostei). Dette gjenspeiler at laks og torsk ligger langt fra hverandre i den evolusjonære utviklingen, noe som også forklarer hvorfor leukocytter fra laks og torsk ikke har de samme fysiologiske egenskapene.

4.5. Karakterisering av RHO-positive leukocytter

Ved fluorescensmikroskopi ble det på preparater av DHR-tilsatte leukocytter observert RHO-positive leukocytter, og det ble bekreftet at den grønne fluorescensfargen var jevnt spredt i leukocytterne, og ikke begrenset til deler av cellene. Det ble ikke observert forskjell i fluorescensgradene mellom preparater av PBL og HKL.

I preparater av PMA-stimulerte DHR-tilsatte lakseleukocytter hadde noen RHO-positive leukocytter svært sterk fluorescensintensitet i forhold til andre RHO-positive. Dette var ikke tilfelle for preparater av PMA-stimulerte DHR-tilsatte torskeleukocytter, der fluorescensintensiteten var relativt jevn hos de RHO-positive cellene. Påviste profesjonelle fagocytterende celler hos laks og torsk er nøytrofile granulocytter, og monocytter i blod eller makrofager i hodenyre. Siden de sterkt fluorescerende cellene kun var til stede i preparater av

leukocytter fra laks, og ikke torsk, er det mulig at dette er celler med et høyere respiratory burst aktivitetsnivå som ikke finnes hos torsk.

B-lymfocytter fra fisk har vist seg å ha effektive fagocytterende evner (2007), men det er ennå uklart om disse cellene har respiratory burst aktivitet. Respiratory burst aktivitet ved NCC-indusert drap av målceller hos fisk er ikke påvist (Secombes, 1996), men det er diskutert om NCC, NK-celler og cytotoksiske T-lymfocytter har granzzymer som inneholder cytotoksiske stoffer (Praveen *et al.*, 2006). Disse cellene er vist å blant annet stå for eliminering av kreftceller og virusinfiserte celler både hos pattedyr og fisk (Connor *et al.*, 2009), men om de benytter seg av respiratory burst aktivitet i denne prosessen, og i hvor stor grad de finnes hos fisk, er uvisst.

I forsøk på å finne hvilke celletyper som var RHO-positive i cytospinpreparatene av PMA-stimulerte, DHR-merkede lakseleukocytter, ble det forsøkt å montere preparatene med DAPI monteringsmedium (Invitrogen) for å merke cellekjernene. Cellekjernene ble da merket blå med DAPI, men den grønne RHO-fluorescensen lekket ut av cellene og RHO-positive celler kunne ikke detekteres. Montering med DAPI kunne derfor ikke brukes og det var ikke mulig å undersøke videre hvilke ulike celletyper som var RHO-fluorescerende ut fra mikroskopi.

Ved flow cytometrianalyser av PMA-stimulerte DHR-tilsatte leukocytter fra laks, var det to typer RHO-positive cellepopulasjoner i PBL FSC/SSC dot plot, og en stor RHO-positiv cellepopulasjon i HKL FSC/SSC dot plot. Den ene RHO-positive cellepopulasjonen i scatter plotet med PBL bestod av forholdsvis små (lav FSC) og lite granulære (lav SSC) celler, og kan derfor være lymfocytter, NCC, eller monocytter i tidlig utviklingsstadier. Den andre cellepopulasjonen i samme dot plot bestod av større (høy FSC) og svært granulære celler (høy SSC), og var sannsynligvis nøytrofile granulocytter. Den store cellepopulasjonen av RHO-positive HKL i dot plot var varierende i størrelse og granularitet, og bestod trolig av ulike celletyper, som nøytrofile granulocytter og makrofager. Fordelingen av RHO-positive lakseleukocytter i scatter plotene samsvarer med tidligere angitte verdier av prosentandel nøytrofile granulocytter i PBL (36 %) (Pettersen *et al.*, 2000) og HKL (78 %) (Rønneseth *et al.*, 2006) hos laks.

Ved flow cytometrianalyser av PMA-stimulerte DHR-tilsatte PBL og HKL fra torsk la de RHO-positive leukocyttene seg i to populasjoner i dot plotene. Begge de RHO-positive PBL cellepopulasjonene var svært granulære (høy SSC). Den ene populasjonen bestod derimot av relativt store celler (høy FSC), mens i den andre populasjonen var cellene svært små (lav FSC). De små cellene som i forsøk med PI-merking viste seg å være døde, ble gatet

bort og ble ikke tatt med i beregningen av prosentandel RHO-positive celler i prøvene. Den andre populasjonen var antakelig en blanding av ulike celletyper, men bestod trolig mest nøytrofile granulocytter, som i studier av Rønneseth *et al.*(2007) er vist å utgjøre 84 % av PBL hos torsk.

Scatter plot av HKL viste at de RHO-positive cellene også her enten var svært små (lav FSC) eller relativt store (middels FSC). De små cellene var svært granulære (høy SSC), og i forsøk med PI-merking viste disse cellene seg å være døde. De døde cellene ble gatet bort og ikke tatt med i analyse av prosentandel RHO-positive celler. Populasjonen med de større cellene var noe granulære (middels SSC), og bestod trolig mer av makrofager enn nøytrofile granulocytter sammenlignet med analyser av PBL. Disse resultatene stemmer godt med studier utført av Rønneseth *et al.* (2007), som påviste ulike typer leukocytter i hodenyre hos torsk, og viste at 48 % er nøytrofile granulocytter.

4.6. Hvor går grensen mellom RHO-negative og RHO-positive leukocytter?

For å angi prosentandel RHO-positive celler i PMA-stimulerte prøver med leukocytter fra laks og torsk tilsatt DHR, ble fluorescensintensiteten til stimulerte celler sammenlignet med ustimulerte celler tilsatt DHR. En tillatt grense på 2 % RHO-positive celler ble satt for de DHR-tilsatte ustimulerte prøvene, da det ble antatt at noen leukocytter (2 %) ble stimulert under isolering og preparering av prøvene, ved for eksempel bevegelse, pipettering, eller kontakt med overflater (egenstimulering). Lignende beregninger av RHO-positive leukocytter i ustimulerte prøver er blitt gjort i tidligere studier utført av Greyfer *et al.* (2008) og Katzenback og Belosevic (2009). Hvorvidt en tillatt prosentandel på 2 % er den optimale grenseverdien for beregning av stimulerte celler i prøvene uten PMA tilsatt, er vanskelig å vite. Ved å sette markøren som angir de RHO-positive leukocytterne på mindre enn 2 %, risikerer en å utelate RHO-positive PMA-stimulerte leukocytter fra resultatene. Dersom markøren settes til å beregne en høyere andel RHO-positive egenstimulerte leukocytter, kan en risikere å overestimere andel RHO-positive celler.

Når markøren settes for beregning av RHO-positive celler bør det også tas hensyn til fluorescenshistogrammene (FL1-histogrammene) til de flow cytometrianalyserte ustimulerte og PMA-stimulerte DHR-tilsatte leukocytterne. Dersom en svært fluorescerende celletopp distinkt skiller seg ut fra en lavere fluorescerende celletopp, kan det stilles spørsmål ved om grensen mellom de RHO-positive og RHO-negative bør settes i overgangen mellom de to

celleoppene. Dersom de ustimulerte DHR-tilsatte leukocytene ligger lavere enn den laveste celletoppen til de PMA-stimulerte leukocytene, og det regnes med en prosentandel på 2 % RHO-positive celler, kan en risikere å beregne en for stor andel RHO-positive leukocytter i den stimulerte prøven.

Individuelle forskjeller mellom fisk kan også bidra til å gi ulike resultater i måling av respiratory burst aktivitet i leukocytene, og gjøre grensesettingen for RHO-negative og RHO-positive celler utfordrende. I utførelsen av et respiratory burst assay er det derfor viktig å være nøyaktig og konsekvent i gjennomføringen av forsøkene, for å på best mulig måte unngå forskjeller i resultatene. I tillegg må det komme klart frem hvordan og på hvilket grunnlag grensen mellom de RHO-positive og negative cellene blir satt.

4.7. Respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk inkubert med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*

Leukocytter fra laks og torsk ble inkubert med bakterien *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i 1 time og 4 timer før analyse av respiratory burst aktivitet. Resultatene indikerte at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* øker respiratory burst aktiviteten hos lakseleukocytter, mens aktiviteten hos torskeleukocytter hemmes.

De bakterieinkuberte PMA-stimulerte leukocytene fra laks hadde en høyere prosentandel RHO-positive celler enn de stimulerte leukocytene uten bakterieinkubering. Dette tyder på at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* stimulerer respiratory burst reaksjonen ytterligere i sammenheng med PMA-stimulering i lakseleukocytter. Forskjellen på prosentandel RHO-positive PMA-stimulerte HKL inkubert uten og med bakterier var større enn for PBL. De ustimulerte leukocytene inkubert med bakterier viste derimot liten respiratory burst aktivitet sammenlignet med de PMA-stimulerte leukocytene, og forskjellen i prosentandel RHO-positive leukocytter var liten eller fraværende ved sammenligning av ustimulerte leukocytter inkubert uten og med bakterier. Dette indikerer at 1 og 4 timer bakterieinkubering fører til økt respiratory burst aktivitet hos PMA-stimulerte lakseleukocytter, i tillegg til at bakterien i liten grad alene stimulerer respiratory burst aktivitet i leukocytter fra laks. Hos fagocytter fra pattedyr er det kjent at *Francisella* sp. kan forårsake en utskillelse av ulike cytokiner og chemokiner, som kan være med på å modulere en videre immunreaksjon. Det er også vist at TLR2, og muligens TLR4, spiller en viktig rolle i gjenkjennelsen av bakterien (Elkins *et al.*, 2007). Det kan være at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* i PMA-stimulerte lakseleukocytter, ved å stimulere en økt utskillelse av humorale

stoffer, medvirker til en økt respiratory burst reaksjon i forhold til leukocytter inkubert uten bakterier, stimulert med PMA.

Det at prosentandel RHO-positive leukocytter fra laks var høyest i PBL etter 1 time i forhold til PBL inkubert i 4 timer, og høyest i HKL etter 4 timer i forhold til HKL inkubert i 1 time med bakterier, kan indikere at leukocytter i blod reagerer kraftigere på patogener hurtigere enn leukocytter i organer (hodenyre). Disse resultatene kan komme av at leukocytter i blod er adaptert til å reagere raskere ved infeksjon enn leukocytter i hodenyre. Samtidig er hodenyre et hematopoietisk organ der leukocytter, blant annet nøytrofile granulocytter, produseres, og det er mulig at disse cellene ikke reagerer så raskt som ferdig utviklede celler i blod. Det er også vist fra pattedyr at monocytter i blod har større respiratory burst aktivitet enn makrofager i vev (Neumann *et al.*, 2001). Muligens kan dette være med på å forklare at det var flest aktive PBL etter 1 time, og flest aktive HKL etter 4 timer bakterieinkubering.

Torskeleukocytter inkubert med bakterier i 1 og 4 timer, stimulert med PMA, viste lavere prosentandel RHO-positive celler sammenlignet med leukocytter inkubert uten bakterier. Dette indikerer at bakterien har egenskaper til å hemme respiratory burst hos leukocyttene.

I ustimulerte PBL fra torsk inkubert med bakterier kan det etter 1 time inkubering observeres en liten økning i prosentandel RHO-positive celler (5 %) i forhold til inkubering i 4 timer (1 %). Dette tyder på at leukocyttene i blod i startfasen av inkuberingen reagerer på *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, men at denne aktiviteten reduseres gradvis over tid. En slik reaksjon kunne ikke observeres for ustimulerte HKL, der respiratory burst aktiviteten ikke var forskjellig fra ustimulerte HKL inkubert uten bakterier.

Denne hemmingen av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra torsk stemmer overens med resultater fra studier av Reilly *et al.* (1996), McCaffrey og Allen (2006), og Schulert *et al.* (2009), som viser at *Francisella tularensis* hemmer respiratory burst aktiviteten i nøytrofile granulocytter hos pattedyr. Samtidig viser den økte respiratory burst aktiviteten hos lakseleukocytter, i forhold til den hemmede aktiviteten hos torskeleukocytter, at *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* sine hemmingsegenskaper på respiratory burst aktivitet er artsavhengig.

Siden francisellose forårsaket av *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* er et problem innen torskeoppdrett, er det i framtiden viktig å utvikle en vaksine mot sykdommen. Dersom flere beviser for at bakterien har evner til å hemme respiratory burst aktivitet hos torskeleukocytter fremlegges, i tillegg til at bakterien er fakultativ intracellulær, kan utviklingen av vaksine i framtiden bli en ekstra stor utfordring.

4.8. Konklusjon og fremtidsperspektiver

Respiratory burst assayet utarbeidet i denne oppgaven ble vurdert som godt egnet for påvisning av respiratory burst aktivitet i leukocytter fra blod og hodenyre hos laks og torsk. De metodiske utfordringene i assayet krever at instrumentinnstillingene ved flow cytometrianalyse, og resultater, blir nøye og kritisk vurdert.

Antall prøver i hvert flow cytometri forsøk var begrenset grunnet tidsskjema i forsøkene, og det var viktig at alle variabler som skulle sammenlignes i metodeutprøvingen ble analysert på leukocytter fra samme fisk. Prøver fra samme fisk ble i hvert forsøk analysert under metodeutviklingen av respiratory burst assayet. I verifikasjonen av standard respiratory burst assay for leukocytter fra laks og torsk ble flere fisk analysert. Resultatene bekreftet at de utarbeidede standardoppsettene i respiratory burst assay for leukocytter fra laks og torsk, med PMA-stimulering og DHR-tilsetning, var velegnet og gav reproducerbare resultater. Basert på disse resultatene konkluderes det med at respiratory burst assay tilpasset leukocytter fra laks og torsk gir pålitelige resultater ved analyseringen av respiratory burst aktivitet i leukocytter.

En utfordring ved bruk av flow cytometri i respiratory burst assay er analyse av resultatene. Skillet mellom RHO-negative og RHO-positive leukocytter kan være vanskelig å definere, og leukocytter fra forskjellige fisk, både innen samme art, og mellom ulike arter, kan vise varierende fluorescensintensitet. Ved bruk av respiratory burst assay i forsøk er det derfor viktig å bearbeide data fra de enkelte prøvene på en måte som best mulig skiller de RHO-negative fra de RHO-positive leukocytterne.

I en tidligere studie utført av Egenberg (2006) ble det benyttet CM-H₂DCFDA og H₂DCFDA som indikatorer for respiratory burst aktivitet hos lakseleukocytter. Bruken av disse markørene gav varierende resultater. I denne oppgaven ble DHR funnet å være mer egnet, da leukocytter med respiratory burst aktivitet skilles bedre fra de inaktive leukocytterne. I fremtidige forsøk anbefales det derfor DHR i påvisning av respiratory burst aktivitet hos leukocytter.

I tillegg til å karakterisere funksjonene til de ulike leukocytterne, kan respiratory burst assay også benyttes til å studere patogeners innvirkning på leukocytterne hos laks og torsk. Ved undersøkelse av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk inkubert med bakterien *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*, ble det vist at assayet fungerte godt. Flow cytometrianalysene fra de innledende forsøkene med lakse- og torskeleukocytter inkubert med bakterier indikerte at respiratory burst aktiviteten i leukocytter fra torsk ble hemmet. Leukocytter fra laks inkubert med *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* viste derimot en økning

i respiratory burst aktiviteten. Disse resultatene er i samsvar med at bakterien overlever i torskens leukocytter ved at den unngår å bli drept etter fagocytose, og videre studier bør gjøres for å verifisere dette. Kunnskap om intracellulære prosesser i leukocytter, som for eksempel fra respiratory burst assay, kan bidra til forståelsen av hvorfor *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* forårsaker patologi og sykdom hos torsk, men ikke hos laks.

Funksjonelle respiratory burst assay kan ved modifikasjoner brukes i en rekke sammenhenger i forbindelse med smitteforsøk og immunstimulering, både på cellenivå og i studier av infeksjoner i tidlige utviklingsstadier av fiskelarver. Respiratory burst assay kan bidra til å skape bedre forståelse for sykdomsforløpene forårsaket av ulike patogener hos fisk.

5. Referanser

- Aderem,A., 2003. Phagocytosis and the inflammatory response. *Journal of Infectious Diseases* 187, 340-345.
- Aderem,A., Underhill,D.M., 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annual Review of Immunology* 17, 593-623.
- Alvarez-Larran,A., Toll,T., Rives,S., Estella,J., 2005. Assessment of neutrophil activation in whole blood by flow cytometry. *Clinical and Laboratory Haematology* 27, 41-46.
- Alvarez-Pellitero,P., 2008. Fish immunity and parasite infections: from innate immunity to immunoprophylactic prospects. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 126, 171-198.
- Avendano,A., Sales-Pardo,I., Marin,L., Marin,P., Petriz,J., 2008. Oxidative burst assessment and neutrophil-platelet complexes in unlysed whole blood. *Journal of Immunological Methods* 339, 124-131.
- Babior,B.M., 1984. The respiratory burst of phagocytes. *Journal of Clinical Investigation* 73, 599-601.
- Baldrige,C.W., Gerard,R.W., 1933. The extra respiration of phagocytosis. *American Journal of Physiology* 103, 235-236.
- Bassøe,C.F., Li,N.Y., Ragheb,K., Lawler,G., Sturgis,J., Robinson,J.P., 2003. Investigations of phagosomes, mitochondria, and acidic granules in human neutrophils using fluorescent probes. *Cytometry Part B-Clinical Cytometry* 51B, 21-29.
- Beutler,B., 2004. Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology* 40, 845-859.
- Birkbeck,T.H., Bordevik,M., Froystad,M.K., Baklien,A., 2007. Identification of *Francisella* sp. from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., in Chile. *Journal of Fish Diseases* 30, 505-507.
- Boshra,H., Li,J., Sunyer,J.O., 2006. Recent advances on the complement system of teleost fish. *Fish & Shellfish Immunology* 20, 239-262.
- Boshra,H., Peters,R., Li,J., Sunyer,J.O., 2004. Production of recombinant C5a from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): role in leucocyte chemotaxis and respiratory burst. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 293-303.
- Campos-Perez,J.J., Ward,M., Grabowski,P.S., Ellis,A.E., Secombes,C.J., 2000. The gills are an important site of iNOS expression in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* after challenge with the Gram-positive pathogen *Renibacterium salmoninarum*. *Immunology* 99, 153-161.
- Cape,J.L., Hurst,J.K., 2009. The role of nitrite ion in phagocyte function-perspectives and puzzles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 484, 190-196.

- Castro,R., Couso,N., Obach,A., Lamas,J., 1999. Effect of different beta-glucans on the respiratory burst of turbot (*Psetta maxima*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*) phagocytes. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 529-541.
- Cha,S.H., Lee,J.S., Song,C.B., Lee,K.J., Jeon,Y.J., 2008. Effects of chitosan-coated diet on improving water quality and innate immunity in the olive flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture* 278, 110-118.
- Chanock,S.J., Elbenna,J., Smith,R.M., Babior,B.M., 1994. The respiratory burst oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 269, 24519-24522.
- Clem,L.W., Sizemore,R.C., Ellsaesser,C.F., Miller,N.W., 1985. Monocytes as accessory cells in fish immune-responses. *Developmental and Comparative Immunology* 9, 803-809.
- Clemens,D.L., Horwitz,M.A., 2007. Uptake and intracellular fate of *Francisella tularensis* in human macrophages. *Francisella Tularensis: Biology, Pathogenicity, Epidemiology, and Biodefense* 1105, 160-186.
- Connor,M.A., Jaso-Friedmann,L., Leary,J.H., Evans,D.L., 2009. Role of nonspecific cytotoxic cells in bacterial resistance: Expression of a novel pattern recognition receptor with antimicrobial activity. *Molecular Immunology* 46, 953-961.
- Cross,A.R., Segal,A.W., 2004. The NADPH oxidase of professional phagocytes - prototype of the NOX electron transport chain systems. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* 1657, 1-22.
- Crow,J.P., 1997. Dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 are sensitive indicators of peroxynitrite in vitro: Implications for intracellular measurement of reactive nitrogen and oxygen species. *Nitric Oxide-Biology and Chemistry* 1, 145-157.
- Cuesta,A., Esteban,M.A., Meseguer,J., 2006. Cloning, distribution and up-regulation of the teleost fish MHC class II alpha suggests a role for granulocytes as antigen-presenting cells. *Molecular Immunology* 43, 1275-1285.
- Cuesta,A., Rodriguez,A., Salinas,I., Meseguer,J., Esteban,M.A., 2007. Early local and systemic innate immune responses in the teleost gilthead seabream after intraperitoneal injection of whole yeast cells. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 242-251.
- Darzynkiewicz,Z., Bruno,S., Delbino,G., Gorczyca,W., Hotz,M.A., Lassota,P., Traganos,F., 1992. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13, 795-808.
- Densmore,C.L., Smith,S.A., Holladay,S.D., 1998. In vitro effects of the extracellular protein of *Renibacterium salmoninarum* on phagocyte function in brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Veterinary Immunology and Immunopathology* 62, 349-357.
- Du Pasquier,L., 2001. The immune system of invertebrates and vertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 129, 1-15.
- Eaton,W.D., 1990. Antiviral activity in 4 species of Salmonids following exposure to poly inosinic - cytidylic acid. *Diseases of Aquatic Organisms* 9, 193-198.

- Egenberg,M. Flow cytometrianalyse av fagocytose og oksidativ respons i leukocytter fra Atlantisk laks (*Salmo salar* L.). 2006. Bergen, Institutt for Biologi, Universitetet i Bergen. Master Thesis.
- Eickhoff,S., Mironowa,L., Carlson,R., Leibold,W., Tipold,A., 2004. Measurement of phagocytosis and oxidative burst of canine neutrophils: High variation in healthy dogs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 101, 109-121.
- Elkins,K.L., Cowley,S.C., Bosio,C.M., 2007. Innate and adaptive immunity to *Francisella*. *Francisella tularensis*: Biology, Pathogenicity, Epidemiology, and Biodefense 1105, 284-324.
- Ellis,A.E., 1999. Immunity to bacteria in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 291-308.
- Ellis,A.E., 2001. Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 827-839.
- Esteban,M.A., Meseguer,J., 2006. Phagocytosis in teleosts. In: Swain,P., Sahoo,P.K., Ayyappan,S. (Eds.), *Fish and shellfish immunology. An introduction*. Narendra publishing house, Delhi, pp. 25-36.
- Esteban,M.A., Meseguer,J., Tafalla,C., Cuesta,A., 2008. NK-like and oxidative burst activities are the main early cellular innate immune responses activated after virus inoculation in reservoir fish. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 433-438.
- Fletcher,T.C., Secombes,C.J., 2001. Immunology of fish. *Encyclopedia of Life Sciences*. John Wiley & Sons.
<http://www.mrw.interscience.wiley.com/emrw/9780470015902/els/article/a0000520/current/pdf>
- Folkes,L.K., Patel,K.B., Wardman,P., Wrona,M., 2009. Kinetics of reaction of nitrogen dioxide with dihydrorhodamine and the reaction of the dihydrorhodamine radical with oxygen: Implications for quantifying peroxynitrite formation in cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 484, 122-126.
- Furevik,A. *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i torskeleukocytter. 2009. Bergen, Institutt for Biologi, Universitetet i Bergen. Master Thesis.
- Furnes,C., Seppola,M., Robertsen,B., 2009. Molecular characterisation and expression analysis of interferon gamma in Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Fish & Shellfish Immunology* 26, 285-292.
- Glebska,J., Koppenol,W.H., 2003. Peroxynitrite-mediated oxidation of dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine. *Free Radical Biology and Medicine* 35, 676-682.
- Grayfer,L., Walsh,J.G., Belosevic,M., 2008. Characterization and functional analysis of goldfish (*Carassius auratus* L.) tumor necrosis factor-alpha. *Developmental and Comparative Immunology* 32, 532-543.
- Griendling,K.K., Harrison,D.G., 1999. Dual role of reactive oxygen species in vascular growth. *Circulation Research* 85, 562-563.

- Grønstøl,H., 2004. Veterinærmedisinsk ordbok. Det Norske Samlaget, Oslo.
- Handa,O., Naito,Y., Takagi,T., Shimosawa,M., Kokura,S., Yoshida,N., Matsui,H., Cepinskas,G., Kvietys,P.R., Yoshikawa,T., 2004. Tumor necrosis factor-alpha-induced cytokine-induced neutrophil chemoattractant-1 (CINC-1) production by rat gastric epithelial cells: Role of reactive oxygen species and nuclear factor-kappa B. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 309, 670-676.
- Henderson,L.M., Chappell,J.B., 1993. Dihydrorhodamine 123 - A fluorescent-probe for superoxide generation. *European Journal of Biochemistry* 217, 973-980.
- Henderson,L.M., Chappell,J.B., Jones,O.T.G., 1987. The superoxide-generating NADPH oxidase of human-neutrophils is electrogenic and associated with an H⁺ channel. *Biochemical Journal* 246, 325-329.
- Iyer,G.Y., Islam,M.F., Quastel,J.H., 1961. Biochemical Aspects of Phagocytosis. *Nature* 192, 535-541.
- Jiang,I.F., Kumar,V.B., Lee,D.N., Weng,C.F., 2008. Acute osmotic stress affects Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) innate immune responses. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 841-846.
- Jones,R.D., Morice,A.H., 2000. Hydrogen peroxide - an intracellular signal in the pulmonary circulation: Involvement in hypoxic pulmonary vasoconstriction. *Pharmacology & Therapeutics* 88, 153-161.
- Kaplan,J.E., Chrenek,R.D., Morash,J.G., Ruksznis,C.M., Hannurn,L.G., 2008. Rhythmic patterns in phagocytosis and the production of reactive oxygen species by zebrafish leukocytes. *Comparative Biochemistry and Physiology A-Molecular & Integrative Physiology* 151, 726-730.
- Kato,Y., Nakao,M., Shimizu,M., Wariishi,H., Yano,T., 2004. Purification and functional assessment of C3a, C4a and C5a of the common carp (*Cyprinus carpio*) complement. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 901-910.
- Katzenback,B.A., Belosevic,M., 2009. Isolation and functional characterization of neutrophil-like cells, from goldfish (*Carassius auratus* L.) kidney. *Developmental and Comparative Immunology* 33, 601-611.
- Kindt,T.J., Goldsby,R.A., Osborne,B.A., 2007a. Antigenes and antibodies. *Immunology*. W. H. Freeman and Company, New York, pp. 76-110.
- Kindt,T.J., Goldsby,R.A., Osborne,B.A., 2007b. The complement system. *Immunology*. W. H. Freeman and company, New York, pp. 168-188.
- Kjønhaug,A.F., Lassen,T., Mortensen,S., Duinker,A., Strand,Ø., 2009. Havbruk. In: Agnalt,A.-E., Bakketeig,I.E., Haug,T., Knutsen,J.A., Opstad,I. (Eds.), *Kyst og havbruksrapport 2009*. Havforskningsinstituttet, Bergen, pp. 128-133.
- Klebanoff,S.J., 2005. Myeloperoxidase: friend and foe. *Journal of Leukocyte Biology* 77, 598-625.

- Kolstø,S. Påvisning av *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* i leukocytter fra Atlantisk torsk (*Gadus morhua*). 2008. Bergen, Institutt for Biologi, Universitetet i Bergen. Master Thesis.
- Laing,K.J., Grabowski,P.S., Belosevic,M., Secombes,C.J., 1996. A partial sequence for nitric oxide synthase from a goldfish (*Carassius auratus*) macrophage cell line. *Immunology and Cell Biology* 74, 374-379.
- Laing,K.J., Hardie,L.J., Aartsen,W., Grabowski,P.S., Secombes,C.J., 1999. Expression of an inducible nitric oxide synthase gene in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Developmental and Comparative Immunology* 23, 71-85.
- Lamas,J., Ellis,A.E., 1994. Atlantic Salmon (*Salmo salar*) neutrophil responses to *Aeromonas salmonicida*. *Fish & Shellfish Immunology* 4, 201-219.
- Lambeth,J.D., 2002. Nox/Duox family of nicotinamide adenine dinucleotide (phosphate) oxidases. *Current Opinion in Hematology* 9, 11-17.
- Laskay,T., van Zandbergen,G., Solbach,W., 2008. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. *Immunobiology* 213, 183-191.
- Li,J., Barreda,D.R., Zhang,Y.A., Boshra,H., Gelman,A.E., LaPatra,S., Tort,L., Sunyer,J.O., 2007. Complement and B cell cooperation in teleost fish: Role in phagocytosis and inflammation. *Molecular Immunology* 44, 205.
- Li,P.F., Dietz,R., vonHarsdorf,R., 1997. Differential effect of hydrogen peroxide and superoxide anion on apoptosis and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Circulation* 96, 3602-3609.
- Long,S., Milev-Milovanovic,I., Wilson,M., Bengten,E., Clem,L.W., Miller,N.W., Chinchar,V.G., 2006. Identification and expression analysis of cDNAs encoding channel catfish type I interferons. *Fish & Shellfish Immunology* 21, 42-59.
- Long,S., Wilson,M., Bengten,E., Bryan,L., Clem,L.W., Miller,N.W., Chinchar,V.G., 2004. Identification of a cDNA encoding channel catfish interferon. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 97-111.
- Lovy,J., Wright,G.M., Speare,D.J., 2006. Morphological presentation of a dendritic-like cell within the gills of chinook salmon infected with *Loma salmonae*. *Developmental and Comparative Immunology* 30, 259-263.
- Lovy,J., Wright,G.M., Speare,D.J., 2008. Comparative cellular morphology suggesting the existence of resident dendritic cells within immune organs of salmonids. *Anatomical Record-Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology* 291, 456-462.
- Magnadottir,B., 2006. Innate immunity of fish (overview). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 137-151.
- Magnadottir,B., Lange,S., Gudmundsdottir,S., Bogwald,J., Dalmo,R.A., 2005. Ontogeny of humoral immune parameters in fish. *Fish & Shellfish Immunology* 19, 429-439.

- Magor,B.G., Magor,K.E., 2001. Evolution of effectors and receptors of innate immunity. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 651-682.
- Matsuyama,T., Iida,T., Kurokura,H., 1999. Kinetics of defense activities of inflammatory neutrophils in carp and red sea bream. *Fish Pathology* 34, 133-137.
- McCaffrey,R.L., Allen,L.A.H., 2006. Pivotal Advance: *Francisella tularensis* LVS evades killing by human neutrophils via inhibition of the respiratory burst and phagosome escape. *Journal of Leukocyte Biology* 80, 1224-1230.
- Mikalsen,J., Olsen,A.B., Rudra,H., Moldal,T., Lund,H., Djonne,B., Bergh,O., Colquhoun,D.J., 2009. Virulence and pathogenicity of *Francisella philomiragia* subsp *noatunensis* for Atlantic cod, *Gadus morhua* L., and laboratory mice. *Journal of Fish Diseases* 32, 377-381.
- Mikalsen,J., Olsen,A.B., Tengs,T., Colquhoun,D.J., 2007. *Francisella philomiragia* subsp *noatunensis* subsp nov., isolated from farmed Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 57, 1960-1965.
- Mohanty,J.G., Jaffe,J.S., Schulman,E.S., Raible,D.G., 1997. A highly sensitive fluorescent micro-assay of H₂O₂ release from activated human leukocytes using a dihydroxyphenoxazine derivative. *Journal of Immunological Methods* 202, 133-141.
- Morena,M., Cristol,J.P., Senecal,L., Leray-Moragues,H., Krieter,D., Canaud,B., 2002. Oxidative stress in hemodialysis patients: Is NADPH oxidase complex the culprit? *Kidney International* 61, S109-S114.
- Moritomo,T., Serata,K., Teshirogi,K., Aikawa,H., Inoue,Y., Itou,T., Nakanishi,T., 2003. Flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst of ayu, *Plecoglossus altivelis*: Comparison with other fresh water fish. *Fish & Shellfish Immunology* 15, 29-38.
- Moyle,P.B., Cech,J.J.Jr., 2004a. Anglerfish, barracudas, cods, and dragonfishes. In: Lee,C., Chung,T., Kuhl,M., Bradley,K. (Eds.), *Fishes. An introduction to ichthyology*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, pp. 331-347.
- Moyle,P.B., Cech,J.J.Jr., 2004b. Smelt, salmon, and pike. In: Lee,C., Chung,T., Kuhl,M., Bradley,K. (Eds.), *Fishes. An introduction to ichthyology*. Prentice-Hall, Inc., Upper Saddle River, pp. 319-329.
- Mulero,V., Meseguer,J., 1998. Functional characterisation of a macrophage-activating factor produced by leucocytes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 8, 143-156.
- Neumann,N.F., Stafford,J.L., Barreda,D., Ainsworth,A.J., Belosevic,M., 2001. Antimicrobial mechanisms of fish phagocytes and their role in host defense. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 807-825.
- Nikoskelainen,S., Kjellsen,O., Lilius,E.M., Schroder,M.B., 2006. Respiratory burst activity of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) blood phagocytes differs markedly from that of rainbow trout. *Fish & Shellfish Immunology* 21, 199-208.

- O'Donnell, V.B., Tew, D.G., Jones, O.T.G., England, P.J., 1993. Studies on the inhibitory mechanism of iodonium compounds with special reference to neutrophil NADPH oxidase. *Biochemical Journal* 290, 41-49.
- Ortuño, J., Esteban, M.A., Meseguer, J., 2000. Kinetics of hydrogen peroxide production during in vitro respiratory burst of seabream (*Sparus aurata* L.) head-kidney leucocytes, as measured by a flow cytometric method. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 725-729.
- Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., Kamaishi, T., 2009. Elevation of *Francisella philomiragia* subsp. *noatunensis* Mikalsen et al. (2007) to *Francisella noatunensis* comb. nov. [syn. *Francisella piscicida* Ottem et al. (2008) syn. nov.] and characterization of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* subsp. nov., two important fish pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1231-1243.
- Ottem, K.F., Nylund, A., Karlsbakk, E., Friis-Møller, A., Krossoy, B., Knappskog, D., 2007. New species in the genus *Francisella* (Gammaproteobacteria; Francisellaceae); *Francisella piscicida* sp. nov. isolated from cod (*Gadus morhua*). *Archives of Microbiology* 188, 547-550.
- Palazzolo-Ballance, A.M., Suquet, C., Hurst, J.K., 2007. Pathways for intracellular generation of oxidants and tyrosine nitration by a macrophage cell line. *Biochemistry* 46, 7536-7548.
- Pasare, C., Medzhitov, R., 2004. Toll-like receptors and acquired immunity. *Seminars in Immunology* 16, 23-26.
- Pettersen, E.F., Bjerknes, R., Wergeland, H.I., 2000. Studies of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) blood, spleen and head kidney leucocytes using specific monoclonal antibodies, immunohistochemistry and flow cytometry. *Fish & Shellfish Immunology* 10, 695-710.
- Pettersen, E.F., Fyllingen, I., Kavlie, A., Maaseide, N.P., Glette, J., Endresen, C., Wergeland, H.I., 1995. Monoclonal-antibodies reactive with serum Igm and leukocytes from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 5, 275-287.
- Pettersen, E.F., Ingerslev, H.C., Stavang, V., Egenberg, M., Wergeland, H.I., 2008. A highly phagocytic cell line TO from Atlantic salmon is CD83 positive and M-CSFR negative, indicating a dendritic-like cell type. *Fish & Shellfish Immunology* 25, 809-819.
- Pinhong, W., Wei, J., Yaqing, C., 2007. Electrochemical measurement of hydrogen peroxide in plasma: Evaluation of freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) and crucian carp (*Cyprinus carpio*) phagocytes under natural conditions. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 1231-1241.
- Plouffe, D.A., Hanington, P.C., Walsh, J.G., Wilson, E.C., Belosevic, M., 2005. Comparison of select innate immune mechanisms of fish and mammals. *Xenotransplantation* 12, 266-277.
- Praveen, K., Leary, J.H., Evans, D.L., Jaso-Friedmann, L., 2006. Nonspecific cytotoxic cells of teleosts are armed with multiple granzymes and other components of the granule exocytosis pathway. *Molecular Immunology* 43, 1152-1162.

- Prince,H.E., LapeNixon,M., 1995. Influence of specimen age and anticoagulant on flow cytometric evaluation of granulocyte oxidative burst generation. *Journal of Immunological Methods* 188, 129-138.
- Purcell,M.K., Smith,K.D., Aderem,A., Hood,L., Winton,J.R., Roach,J.C., 2006. Conservation of Toll-like receptor signaling pathways in teleost fish. *Comparative Biochemistry and Physiology D-Genomics & Proteomics* 1, 77-88.
- Radcliff,G., Jaroszeski,M.J., 1994. Basics of flow cytometry. In: Darzynkiewicz,Z., Robinson,J.P., Crissman,H.A. (Eds.), *Flow cytometry. Part A*. Academic press limited, London, pp. 1-24.
- Reilly,T.J., Baron,G.S., Nano,F.E., Kuhlenschmidt,M.S., 1996. Characterization and sequencing of a respiratory burst-inhibiting acid phosphatase from *Francisella tularensis*. *Journal of Biological Chemistry* 271, 10973-10983.
- Richardson,M.P., Ayliffe,M.J., Helbert,M., Davies,E.G., 1998. A simple flow cytometry assay using dihydrorhodamine for the measurement of the neutrophil respiratory burst in whole blood: comparison with the quantitative nitrobluetetrazolium test. *Journal of Immunological Methods* 219, 187-193.
- Rinaldi,M., Moroni,P., Paape,M.J., Bannerman,D.D., 2007. Evaluation of assays for the measurement of bovine neutrophil reactive oxygen species. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 115, 107-125.
- Robinson,J.M., 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochemistry and Cell Biology* 130, 281-297.
- Rønneseth,A., Pettersen,E.F., Wergeland,H.I., 2006. Neutrophils and B-cells in blood and head kidney of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) challenged with infectious pancreatic necrosis virus (IPNV). *Fish & Shellfish Immunology* 20, 610-620.
- Rønneseth,A., Wergeland,H.I., Pettersen,E.F., 2007. Neutrophils and B-cells in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Fish & Shellfish Immunology* 23, 493-503.
- Rosen,G.M., Pou,S., Ramos,C.L., Cohen,M.S., Britigan,B.E., 1995. Free-radicals and phagocytic-cells. *The Journal of the Federation of American Societies of Experimental Biology* 9, 200-209.
- Rossi,F., Zatti,M., 1964. Biochemical aspects of phagocytosis in polymorphonuclear leucocytes . NADH and NADPH oxidation by granules of resting phagocytizing cells. *Experientia* 20, 21-21.
- Rothe,G., Oser,A., Valet,G., 1988. Dihydrorhodamine-123 - A new flow cytometric indicator for respiratory burst activity in neutrophil granulocytes. *Naturwissenschaften* 75, 354-355.
- Rotllant,J., Parra,D., Peters,R., Boshra,H., Sunyer,J.O., 2004. Generation, purification and functional characterization of three C3a anaphylatoxins in rainbow trout: Role in leukocyte chemotaxis and respiratory burst. *Developmental and Comparative Immunology* 28, 815-828.

- Royall, J.A., Ischiropoulos, H., 1993. Evaluation of 2',7'-Dichlorofluorescein and Dihydrorhodamine 123 as fluorescent-probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial-cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 302, 348-355.
- Sakurada, H., Koizumi, H., Ohkawara, A., Ueda, T., Kamo, N., 1992. Use of Dihydrorhodamine-123 for detecting intracellular generation of peroxides upon UV irradiation in epidermal-keratinocytes. *Archives of Dermatological Research* 284, 114-116.
- Salinas, I., Lockhart, K., Bowden, T.J., Collet, B., Secombes, C., Ellis, A.E., 2004. Assessment of immuno stimulants as Mx inducers in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) parr and the effect of temperature on the kinetics of Mx responses. *Fish & Shellfish Immunology* 17, 159-170.
- Schulert, G.S., McCaffrey, R.L., Buchan, B.W., Lindemann, S.R., Hollenback, C., Jones, B.D., Allen, L.A.H., 2009. *Francisella tularensis* genes required for inhibition of the neutrophil respiratory burst and intramacrophage growth identified by random transposon mutagenesis of strain LVS. *Infection and Immunity* 77, 1324-1336.
- Secombes, C.J., 1996. The nonspecific immune system: cellular defenses. In: Iwama, G., Nakanishi, T. (Eds.), *The fish immune system. Organism, pathogen, and environment*. Academic Press, San Diego, pp. 63-103.
- Segal, A.W., 2005. How neutrophils kill microbes. *Annual Review of Immunology* 23, 197-223.
- Segal, A.W., 2008. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 40, 604-618.
- Seppola, M., Robertsen, B., Jensen, I., 2007. The gene structure and expression of the non-specific cytotoxic cell receptor protein (NCCRP-1) in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry & Molecular Biology* 147, 199-208.
- Solem, S.T., Jorgensen, J.B., Robertsen, B., 1995. Stimulation of respiratory burst and phagocytic-activity in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) macrophages by lipopolysaccharide. *Fish & Shellfish Immunology* 5, 475-491.
- Stafford, J., Neumann, N.F., Belosevic, M., 1999. Inhibition of macrophage activity by mitogen-induced goldfish leukocyte deactivating factor. *Developmental and Comparative Immunology* 23, 585-596.
- Stafford, J.L., Belosevic, M., 2003. Transferrin and the innate immune response of fish: identification of a novel mechanism of macrophage activation. *Developmental and Comparative Immunology* 27, 539-554.
- Stafford, J.L., McLauchlan, P.E., Secombes, C.J., Ellis, A.E., Belosevic, M., 2001. Generation of primary monocyte-like cultures from rainbow trout head kidney leukocytes. *Developmental and Comparative Immunology* 25, 447-459.

- Steinkamp,J.A., Lehnert,B.E., Lehnert,N.M., 1999. Discrimination of damaged dead cells by propidium iodide uptake in immunofluorescently labeled populations analyzed by phase-sensitive flow cytometry. *Journal of Immunological Methods* 226, 59-70.
- Steiro,K., Johansen,A., Gildberg,A., Bogwald,J., 1998. Optimising of culture conditions and stimulation of head kidney macrophages from Atlantic cod, *Gadus morhua* L. *Journal of Fish Diseases* 21, 335-344.
- Swain,P., Sahoo,P.K., 2006. Cytokines of fish. In: Swain,P., Sahoo,P.K., Ayyappan,S. (Eds.), *Fish and shellfish immunology. An introduction*. Narendra publishing house, Delhi, pp. 85-98.
- Szucs,S., Poka,R., Sarvary,A., Bardos,H., Balazs,M., Kappelmayer,J., Adany,R., 1997. Single-cell measurement of superoxide anion production and hydrogen peroxide production by human neutrophils with digital imaging fluorescence microscopy. *Blood* 90, 2922.
- Torreilles,J., Guerin,M.C., 1999. Production of peroxynitrite by zymosan stimulation of *Mytilus galloprovincialis* haemocytes in vitro. *Fish & Shellfish Immunology* 9, 509-518.
- vanPelt,L.J., vanZwieten,R., Weening,R.S., Roos,D., Verhoeven,A.J., Bolscher,B.G.J.M., 1996. Limitations on the use of dihydrorhodamine 123 for flow cytometric analysis of the neutrophil respiratory burst. *Journal of Immunological Methods* 191, 187-196.
- Velard,F., Laurent-Maquin,D., Guillaume,C., Bouthors,S., Jallot,E., Nedelec,J.M., Belaouaj,A., Laquerriere,P., 2009. Polymorphonuclear neutrophil response to hydroxyapatite particles, implication in acute inflammatory reaction. *Acta Biomaterialia* 5, 1708-1715.
- Vowells,S.J., Sekhsaria,S., Malech,H.L., Shalit,M., Fleisher,T.A., 1995. Flow cytometric analysis of the granulocyte respiratory burst - A comparison study of fluorescent-probes. *Journal of Immunological Methods* 178, 89-97.
- Walrand,S., Valeix,S., Rodriguez,C., Ligot,P., Chassagne,J., Vasson,M.P., 2003. Flow cytometry study of polymorphonuclear neutrophil oxidative burst: a comparison of three fluorescent probes. *Clinica Chimica Acta* 331, 103-110.
- Wardman,P., 2007. Fluorescent and luminescent probes for measurement of oxidative and nitrosative species in cells and tissues: Progress, pitfalls, and prospects. *Free Radical Biology and Medicine* 43, 995-1022.
- Watts,C., Amigorena,S., 2001. Phagocytosis and antigen presentation. *Seminars in Immunology* 13, 373-379.
- Whyte,S.K., 2007. The innate immune response of finfish - A review of current knowledge. *Fish & Shellfish Immunology* 23, 1127-1151.
- Yoder,J.A., 2004. Investigating the morphology, function and genetics of cytotoxic cells in bony fish. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology* 138, 271-280.

Zapata,A.G., Chibá,A., Varas,A., 1996. Cells and tissues of the immune system of fish. In: Iwama,G., Nakanishi,T. (Eds.), The fish immune system. Organism, pathogen, and environment. Academic press, San Diego, pp. 1-62.

Zou,J., Wang,T., Hirono,I., Aoki,T., Inagawa,H., Honda,T., Soma,G.I., Ototake,M., Nakanishi,T., Ellis,A.E., Secombes,C.J., 2002. Differential expression of two tumor necrosis factor genes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Developmental and Comparative Immunology 26, 161-172.

Internettreferanser:

BD, 2009:

http://www.bdbiosciences.com/immunocytometry_systems/support/training/flow_cytometry_learning_guide.pdf

Invitrogen, 2009a:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/tables/Spectral-characteristics-and-recommended-bandpass-filter-sets-for-Molecular-Probes-dyes.html>

Invitrogen, 2009b:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/support/Research-Tools/Fluorescence-SpectraViewer.html?CID=fl-spectraviewer>

Invitrogen, 2009c:

<http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook.html>

Sigma, 2009a:

http://www.sigmaaldrich.com/catalog/ProductDetail.do?lang=en&N4=P1585|SIGMA&N5=SEARCH_CONCAT_PNO|BRAND_KEY&F=SPEC

Sigma, 2009b:

http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/d2926pis.Par.0001.File.tmp/d2926pis.pdf

Statistisk sentralbyrå, 2009:

http://statbank.ssb.no/statistikbanken/Default_FR.asp?PXSid=0&nvl=true&PLanguage=0&tilside=selectvarval/define.asp&Tabellid=03143

6. Appendix

6.1. Oppskrifter til respiratory burst assay

6.1.1. Løsninger til isolering av leukocytter fra laks

0,36 M NaCl:

NaCl 5,26 g (Riedel-de Haën)

dH₂O til 250 mL

(Autoklaveres)

0,46 M NaCl:

NaCl 6,72 g (Riedel-de Haën)

dH₂O til 250 mL

(Autoklaveres)

1,060 g/mL Percoll-løsning:

10 mL Percoll (GE Healthcare)

11,3 mL 0,36 M NaCl (Riedel-de Haën)

1,075 g/mL Percoll-løsning:

10 mL Percoll (GE Healthcare)

7,1 mL 0,46 M NaCl (Riedel-de Haën)

6.1.2. Løsninger til isolering av leukocytter fra torsk

1,5 M NaCl:

NaCl 21,915 g (Riedel-de Haën)

dH₂O til 250 mL

(Autoklaveres)

1,050 g/mL Percoll-løsning:

1,5 mL 1,5 M NaCl (Riedel-de Haën)

5,1 mL Percoll (GE Healthcare)

8,4 mL dH₂O

1,070 g/mL Percoll-løsning:

1,5 mL 1,5 M NaCl (Riedel-de Haën)

7,35 mL Percoll (GE Healthcare)

6,15 mL dH₂O**6.1.3. Løsninger til forsøk med leukocytter fra laks og torsk**Heparin stock-løsning (5000 U/ml):

Heparin 50 000 U (Sigma)

dH₂O 10 mL

(Filtreres gjennom 0,2 µm filter)

L-15, 370 mOsm:

- Løsning A: 100 mL dH₂O
 - 2,4 g NaCl (Riedel-de Haën)
 - 2,8 g NaHCO₃ (Sigma)
 - 0,66 g glucose (Sigma)
 - (Filtreres gjennom 0,2 filter)

- 5 mL løsning A
 - 95 mL Leibovitz, L-15 (Biowhittaker, Lonza)

L-15 medium til leukocytter fra laks og torsk:

100 µl gentamicin (Biowhittaker, Lonza)

200 µl heparin stock-løsning (Sigma)

1 mL 200 mM glutamin (Biowhittaker, Lonza)

1,5 mL 1 M HEPES (Sigma)

L-15, 370 mOsm til 100 mL

PBS 380 mOsm, med heparin:Na₂HPO₄ x 2H₂O 0,427 g (Merck)KH₂PO₄ 0,127 g (Fluka)

NaCl 5,552 g (Riedel-de Haën)

dH₂O til 500 mL

Vanlig PBS:

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	0,72 g (Merck)
KH ₂ PO ₄	0,27 g (Fluka)
NaCl	8,5 g (Riedel-de Haën)
dH ₂ O	til 1000 mL

For begge PBS-løsningene justeres pH-verdien* med lut (NaOH) til 7,3 for leukocytter fra laks, og 7,4 for leukocytter fra torsk, før alt vannet tilsettes. Autoklaveres. Etter autoklaring tilsettes 200 µl heparin stock-løsning (Sigma) til 100 mL PBS. Etter autoklaving og tilsetning av heparin filtreres løsningen gjennom et 20 µm filter (Filtropur).

* PBS-løsningenes pH-verdi ble i oppgaven målt med et pH-meter (Orion 2-star, Thermo Electron Corporation).

PBS/BSA/Glukose:

3 g BSA (3% (w/v)) (Sigma)
 4,5 g D-glukose (4,5 % (w/v)) (Sigma)
 Til 100 mL med vanlig PBS.

6.1.4. Stimulanter til forsøk med leukocytter fra laks og torskPMA stock-løsninger:

Til laks:

Stock 1 (1 mg/mL): 1 mg PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, Sigma)
 1 mL DMSO (dimetylsulfoksid, ((CH₃)₂SO), Sigma)

Stock 2 (211 µg/mL): 21,1 µl PMA stock 1 (1 mg/mL)
 78,9 µl PBS 380

Stock 3 (206 µg/mL): 20,6 µl PMA stock 1 (1 mg/mL)
 79,4 µl PBS 380

Til torsk:

Stock 4 (20,6 µg/mL): 10 µl PMA stock 3 (206 µg/mL) fra oppskrift på PMA til laks
 90 µl PBS 380

Stock 5 (2,06 µg/mL): 10 µl PMA stock 4 (20,6 µg/mL)
90 µl PBS 380 mOsm, med heparin

Stock 6 (0,206 µg/mL): 10 µl PMA stock 5 (2,06 µg/mL)
90 µl PBS 380 mOsm, med heparin

POLY I:C stock-løsninger:

Stock 1 (1 mg/mL): 1 mg POLY I:C (polyinosinic-polycytidylic acid sodium salt, Sigma)
1 mL DMSO (Sigma)

Stock 2 (206 µg/mL): 20,6 µl 1 mg/mL POLY I:C, Stock 1
79,4 µl PBS 380 mOsm, med heparin

LPS stock-løsninger:

Stock 1 (5 mg/mL): 5 mg LPS (lipopolysakkarid, Sigma)
1 mL DMSO (Sigma)

Stock 2 (206 µg/mL): 4,12 µl 5 mg/mL LPS, Stock 1
95,88 µl PBS 380 mOsm, med heparin

6.1.5. Hemming av respiratory burst aktivitet hos leukocytter fra laks og torsk

DPI stock-løsninger:

Stock 1 (5 mM): 10 mg DPI (diphenyleneiodonium chloride (C₁₂H₈ClI), Sigma)
6,36 mL DMSO (Sigma)

Stock 2 (206 µM): 4,12 µl DPI (5mM, Sigma)
95,88 µl PBS 380 mOsm, med heparin

Stock 3 (412 µM): 8,24 µl DPI (5mM), Sigma)
91,76 µl PBS 380 mOsm, med heparin

6.1.6. Reagensløsninger av DHR og PI til forsøk med leukocytter fra laks og torsk

DHR stock-løsning (210 µM):

8,4 µl DHR (løst i DMSO, 5 mM, Invitrogen)

191,6 µl PBS 380 mOsm, med heparin

DHR stock-løsning (206 µM):

8,24 µl DHR (løst i DMSO, 5 mM, Invitrogen)

191,76 µl PBS 380 mOsm, med heparin

Propidium iodid-løsning:

Stock 1 (1 mg/mL): 1 mg PI (Sigma)

1 ml DMSO (Sigma)

Stock 2 (100 µg/mL): 10 µl PI (1 mg/mL)

90 µl PBS 380 mOsm, med heparin

6.2. Oppskrifter ved bakterieinkubering av leukocytter fra laks og torsk

6.2.1. Dyrking av bakterien *F. philomiragia* subsp. *noatunensis*

Vekstmedium, Eugon Broth:

30,4 g mediumpulver (Becton Dickinson)

1 L dH₂O

Blandes godt og kokes i 1 minutt før fordeling i erlenmeyerkolber med vattkork for forkultur (50 mL medium) eller hovedkultur (250 mL medium). Autoklaveres ved 121°C i 15 minutter.

Jernklorid (Fluka) stock-løsning, 2M:

FeCl₃ x 6H₂O 27,3 g

dH₂O til 50 mL

Autoklaveres. 1 mL 2M jernklorid tilsettes i 1 L dyrkingsmedium (2mM jernklorid) rett før bakterieoverføring.

Ampicillin (Sigma) stock-løsning, 50 mg/mL:

1 g Ampicillin-pulver

20 mL dH₂O

Steriliseres ved filtrering (0,2 µm filter) og oppbevares ved -20°C. 1 mL 50 mg/mL ampicillin-løsning tines rett før bruk og tilsettes i 1 L dyrkingsmedie (50 µg/mL ampicillin) rett før bakterieoverføring.

6.2.2. Eksempel på konsentrasjonsutregning ved justering av OD-verdi til bakterien *F. philomiragia* subsp. *noatunensis* ved formelen $X_1 \times Y_1 = X_2 \times Y_2$

X_1 = OD-verdi i hovedkultur, X_2 = ønsket OD-verdi, Y_1 = volum av X_1 , Y_2 = ønsket volum av X_2

$$1,5 \times X_1 = 0,4 \times 5 \text{ mL}$$

$$X_1 = (0,4 \times 5 \text{ mL}) / 1,5$$

$$X_1 \approx 1,333 \text{ mL}$$

1,333 mL (Y_1) av bakterie hovedkultur med OD-verdi 1,5 (X_1) tilsettes i 3,667 mL L-15 uten gentamicin for å få 5 mL (Y_2) av bakterieløsning med OD-verdi 0,4 (X_2).

6.3. Instrumentinnstillinger i flow cytometeret

6.3.1. Flow cytometrianalyser av lakseleukocytter

HKL/PBL uten tilsatt DHR (og ved tilsatt PI):

Cytometer Type: FACSCalibur				
Detectors/Amps:				
Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.16	Lin
P2	SSC	380	1.00	Lin
P3	FL1	600	1.00	Log
P4	FL2	620	1.00	Log
P5	FL3	620	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
Threshold:				
Primary Parameter:		FSC		
Value:		100		
Secondary Parameter:		None		
Compensation:				
FL1 - 0.8 % FL2				
FL2 - 25.8 % FL1				
FL2 - 0.0 % FL3				
FL3 - 0.0 % FL2				

HKL/PBL tilsatt DHR (og ved tilsatt PI):

Cytometer Type: FACSCalibur				
Detectors/Amps:				
Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.16	Lin
P2	SSC	380	1.00	Lin
P3	FL1	365	1.00	Log
P4	FL2	385	1.00	Log
P5	FL3	600	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
Threshold:				
Primary Parameter:		FSC		
Value:		100		
Secondary Parameter:		None		
Compensation:				
FL1 - 0.8 % FL2				
FL2 - 25.8 % FL1				
FL2 - 0.0 % FL3				
FL3 - 0.0 % FL2				

6.3.2. Flow cytometrianalyser av torskeleukocytter

HKL/PBL uten DHR tilsatt (og ved tilsatt PI):

Cytometer Type: FACSCalibur				
Detectors/Amps:				
Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.16	Lin
P2	SSC	380	1.00	Lin
P3	FL1	600	1.00	Log
P4	FL2	600	1.00	Log
P5	FL3	650	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
Threshold:				
Primary Parameter:		FSC		
Value:		100		
Secondary Parameter:		None		
Compensation:				
FL1 - 0.8 % FL2				
FL2 - 25.8 % FL1				
FL2 - 0.0 % FL3				
FL3 - 0.0 % FL2				

HKL/PBL tilsatt DHR (og ved tilsatt PI):

Cytometer Type: FACSCalibur				
Detectors/Amps:				
Param	Detector	Voltage	AmpGain	Mode
P1	FSC	E00	1.16	Lin
P2	SSC	380	1.00	Lin
P3	FL1	365	1.00	Log
P4	FL2	400	1.00	Log
P5	FL3	650	1.00	Lin
P6	FL2-A		1.00	Lin
P7	FL2-W		1.00	Lin
Threshold:				
Primary Parameter:		FSC		
Value:		100		
Secondary Parameter:		None		
Compensation:				
FL1 - 0.8 % FL2				
FL2 - 25.8 % FL1				
FL2 - 0.0 % FL3				
FL3 - 0.0 % FL2				