

## **Forskningsårs-rapport**

### **Mia Eriksson stud.med.**

Gennem midler fra FSS har jeg fået muligheden for at gennemføre ét forskningsår. Mit projekt var et samarbejde mellem Bandim Health Project (BHP), Statens Serum Institut og Center for Inflammation og Metabolisme (CIM), Rigshospitalet. Mit år var opdelt i to dele, jeg var 8 måneder i Guinea-Bissau på BHP for at samle data samt 4 måneder på CIM, hvor jeg skulle deltage i analyserne af de blodprøver, som jeg indsamlede samt have tid til databehandling og artikelskrivning. Det har været et meget lærerigt år, og jeg føler, at jeg har fået et godt indblik i forskningsverden. Jeg har fået god opbakning og support af mine vejledere Christine S. Benn og Christian Erikstrup, hvilket blandt andet har udviklet mine evner som leder og problemløser samt min kritiske tænkning.

Vaccinationer nedsætter dødeligheden i lavindkomstlande. Epidemiologiske studier i Guinea-Bissau samt andre lande har vist, at dette ikke kun skyldes beskyttelse mod de sygdomme vaccinen er rettet imod, men derimod at de påvirker barns overlevelse generelt. Mæslingevaccine (MV) har for eksempel en beskyttende effekt på barnet sådan, at hvis man ser bort fra mæslingedødsfald er mortaliteten blandt de børn, som er vaccineret betydelig lavere end blandt uvaccinerede børn. Grunden til denne reduktion i dødelighed er ikke kendt, men da infektioner er den afgørende faktor for den høje barnedødeligheden i Guinea-Bissau, er det nærliggende at tro, at vaccinen påvirker barnets immunrespons på en mere generel måde.

Mit projekt i Guinea-Bissau var designet til at studere disse immunologiske effekter. Udgangspunktet var et større randomiseret studie på BHP, hvor børn blev randomiseret til en tidlig MV ved 4½ måneders alder eller til at få vaccinen som normalt (i udviklingslande) ved 9 måneder. Vi tog blodprøver på børnene før vaccinationen ved 4½ måneder (baseline) og igen 6 uger senere. Børn fra begge gruppe blev inkluderet, hvorfor halvdelen af børnene er vaccineret og halvdelen bruges som en kontrol gruppe.

Blod blev taget til tre forskellige slags analyser (fuldblods stimulationer, plasma til analyse for plasma cytokiner samt blod til DNA analyser), og da erfaring viser, at fingerprik er ganske smertefuldt for barnet, og da vi ønskede et lidt større volumen, blev det besluttet at oplære den lokale laborant i at tage venøse prøver.

Efter et par ugers introduktion til BHP og de studier der var i gang, skulle jeg hurtigt starte mit eget projekt op. Her havde jeg besøg af mine vejledere og således meget hjælp og støtte. Opstarten af projektet var præget af praktiske problemstillinger af både større og mindre art, men attituden blandt alle indblandede var meget positiv, og der var ikke noget, som ikke kunne løses. Det var forbløffende at se, hvor fleksibelt systemet var, hvor man fra en dag til en anden kunne gøre relativt store organisatoriske ændringer, dog hele tiden med fokus på ikke at ændre på den oprindelige protokol.

Også på laboratoriet opstod der tidligt en uheldig situation, da laboranten, som var optrænet i opsætningen af fuldblods-kulturer, gik bort. Jeg overtog selv opgaven med at opsætte disse kulturer indtil, at vi kunne organisere et besøg fra vores partner i Holland, som var i stand til at hjælpe mig med at optræne to nye laboranter i opgaven. Denne opgave, og ikke mindst besøget fra Holland, gav mig et ekstra godt indblik og større sikkerhed i laboratoriearbejdet.

Den første tid var dog frem for alt præget af problemerne med at tage venøse blodprøver på de meget små børnene. Det var en stor frustration både for mig og for den laborant, som skulle stikke, at vi ikke kunne komme op på en succé rate på mere end ca. 50%. Mange metoder blev afprøvet, blandt andet fik vi besøg af en laborant fra Gambia som instruerede i den teknik de bruger der. Vi analyserede den første måneds prøver og fandt, mod vores forventning, at der var signifikante forskelle i stimulerede *ex vivo* cytokin-respons mellem venøse og kapillære prøver. Efter dette fund og da vi fortsat havde problemer med de venøse prøverne, var jeg med til at træffe beslutningen om, at vi skulle overgå til kun at lave fingerprik. For at videre udforske dette tilfældige men interessante fund gennemførte vi et mindre studie, hvor vi tog både kapillært og venøst blod fra 11 voksne. Vi kunne hermed bekræfte mange af de forskelle vi havde fundet hos børnene, og netop denne problemstilling blev basis for min første artikel. Primært viser vi, at der bliver produceret højere niveauer af de pro- og anti- inflammatoriske cytokinerne TNF- $\alpha$  og IL-10 i fuldblodskulturer af kapillært blod end i dem af venøst blod (ustimuleret samt stimuleret med PPD samt PAM3Cys). Dette kan til dels skyldes, at det ser ud til, at leukocytallene normalt er højere i kapillært blod, med en differentieltælling som er forskudt mod en endda

større andel "store" hvide blodlegemer i kapillært blod. Herudover fandt vi en kønsforskel i produktionen af flere cytokiner efter PHA stimulation i kapillært blod, som ikke kunne genfindes i venøst blod.

Der opstår altid problemer af forskellige art, når man gennemfører et videnskabeligt studie, og ovenstående eksempler er ikke fremhævet for at illustrere, at studiet er gået dårligt, men for at fortælle gennem hvilke hindringer jeg er vokset som forsker. At være med til at gøre et tilfældigt fund og senere at få lov til at være med til at bekræfte dette i et andet studie har været meget lærerigt.

Projektets forløb under opholdet i Afrika var altså meget fokuseret på dataindsamling. Min hovedopgave var supervision af de lokalt ansatte. Om formiddagen gik jeg med min feltarbejder rundt for at indkalde børnene i hjemmet til om eftermiddagen og for samtidigt at interviewe mødrene. Om eftermiddagen tog jeg rundt med et team bestående af min feltarbejder, en læge samt en laborant til de forskellige sundhedscentre for at inkludere børnene, hvorefter vi tog på laboratoriet for at behandle blodprøverne.

Hensigten var, at jeg skulle lave et lignende immunologisk studie indenfor rammerne af et andet randomiseret studie på BHP. Det handlede om børn, som ikke havde fået DTP3 (difteri tetanus og pertussis) ved 9 måneder, hvor de kom for at få MV og blev her randomiseret til at få DTP3+ MV eller kun MV. Det blev hurtigt klart, at jeg ikke kunne køre de to studier parallelt, da jeg havde en meget aktiv rolle i den daglige rutine. Efter at have kørt en "pilot" af dette studie stod det derudover klart, at der ikke blev inkluderet tilstrækkeligt med børn for at opnå en god sample size. Til sidst tog involveringen i MV-studiet længere tid end forventet, og det blev besluttet, at jeg skulle fokusere på MV-studiet. I ugerne op til min hjemrejse deltog jeg dog aktivt med at opstarte det immunologiske DTP projekt på en lidt anderledes gruppe børn. Her kunne jeg bidrage med de erfaringer jeg havde gjort under opstarten af det første studie.

Målet var at inkludere 400 børn i det immunologiske MV-studiet, og dette må siges være opnået, da jeg har 384 parrede (baseline + follow-up) prøver. 50 af disse parrede prøver

er dog venøse og brugbarheden af disse må vurderes grundigt efter vores egne tidligere omtalte fund om forskelle i venøse og kapillære *ex vivo* stimulerede cytokinniveauer.

De fire måneder i Danmark var mere teoretisk orienterede, og meget tid blev brugt til databehandling. Jeg analyserede selv data, hvilket var tidskrævende men gav en god forståelse for data og for forskellige statistiske metoder. Mine vejledere var meget gode til at hjælpe men ikke overtage i denne arbejdsproces.

I tiden efter ansøgningen om midler til projektet er der sket fremskridt i de metoder man kan bruge til at måle plasma cytokiner. Den oprindelige plan var at bruge Elisa, men da dette ofte kræver større mængder plasma, har vi brugt meget tid på at få en rutine op at køre med luminex. Luminex er en multiplex assay, hvor man kan måle flere cytokiner simultant i en lille mængde plasma. Jeg har deltaget i valideringen af denne metode, blandt andet ved afprøvning af forskellige kit fra forskellige firmaer. Denne afprøvning resulterede i, at vi ikke fik tid til at analysere alle prøver indenfor studietiden, men dette vil blive gjort i løbet af foråret.

Tiden har heller ikke været tilstrækkelig til at få lave PCR på det DNA jeg indsamlet. Også disse analyser vil blive kørt under foråret / sommeren.

Forskningsåret tog altså en lidt anden drejning som følge af det tilfældige fund af forskelle i venøse og kapillære cytokinniveauer. Da der blev lagt fokus på dette, er andre laboratorieanalyser blevet forsinket, men ikke fravalgt. Det var spændende og vigtigt at få gennemarbejdet dette materiale også for bedre at kunne forholde os til vores videre resultater. Sammenfattende må man sige at forskningsåret var en succes. Projektet blev gennemført efter planen, de relevante prøver blev indsamlet og jeg nåede indenfor årets rammer at få et godt indblik i mange dele af en forskers hverdag. Jeg fik herudover skrevet en OSVAL II opgave, som efter videre redigering forventes at blive sent til publikation i nær fremtid. Grundet det gode samarbejde med mine vejledere samt resten af gruppen på BHP, har jeg besluttet, at jeg vil fortsætte mit engagement i projektet og deltager derfor i de videre analyser af blodprøverne og forventer at skrive yderligere artikler, når resultaterne af disse foreligger.