

EPÄPUHTAAN SISÄILMAN JA SIIHEN LIITTYVIEN TERVEYSRISKIEEN ENNAKOINTI JA ENNALTAEHKÄISY UUSIEN BIOLOGISTEN IHMISSOLUIHIN POHJAUTUVIEN TESTIMENETELMIEN AVULLA

Marika Mannerström¹, Jonna Ahoniemi¹, Elisa Aattela², Tuula Heinonen¹

¹ FICAM, Lääketieteen- ja biotieteiden tiedekunta, Arvo Ylpön katu 34, 33014 Tampereen yliopisto

² Sisäilmatutkimuspalvelut SEA Oy, Järvensivuntie 7 B 49, 33100 Tampere

TIIVISTELMÄ (SIY-OTSIKKO 1 -TYYLII)

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää ihmisen biologiaan pohjautuva testi, jolla voidaan tunnistaa terveydelle haitallinen sisäilma ja ”sairaavat rakennukset” riippumatta siitä, mikä sisäilmaa pilaa. Sisäilman tutkiminen on haastavaa ja kallista, varsinkin jos ei tiedetä mitä etsiä ja analysoida. Esimerkiksi julkisten tilojen sisäilman koostumus voi olla monimutkainen seos koostuen rakennusmateriaaleista ja siivousaineista vapautuvista kemikaaleista, mikrobeista ja niiden toksineista, otsonista ja ilmansaasteista. Testimme on nopea ja edullinen tapa kartoittaa tätä ongelmaa.

Tuloksemme osoittavat, että solutesteillä voidaan tunnistaa haitallinen sisäilma. Lisäksi mitatulla solukuolemalla oli yhteys koettuihin terveyshaittoihin.

TAUSTA JA TAVOITTEET

Tausta

Sisäilma saattaa olla hyvin kompleksinen seos mikrobitorksiineja, rakennusmateriaaleista ja siivousaineista haihtuvia yhdisteitä jne. Sisäilmatutkimus onkin haasteellista ja mm. kemialliset analyysit hankalia ja kalliita kun ei tiedetä mitä etsiä.

E-keräimen kehittäminen /1,2/ on mahdollistanut uudenlaisten työkalujen kehittämisen sisäilmatutkimukseen. E-keräimessä sisäilman vesimolekyylit härmistyvät huurteeksi hiilihappojään avulla. Huurre sulatetaan vedeksi, joka on valmis analysoitavaksi.

Huurrevesinäytteiden toksisuutta on mitattu mm. sian siittiöillä /3,4/ ja E.colilla (E.coli lux-menetelmä) /5/. E.coli lux-menetelmällä voitiin osoittaa pilaantuneen sisäilman yhteys E.colin elävyyteen /5/. Mikäli halutaan kuvata sisäilman potentiaalisia vaikutuksia ihmisessä, tarvitaan ihmisen biologiaan perustuvia toksisuustestejä /2, 6-7/. Solutoksisuustesteillä tarkoitetaan testejä, joissa mitataan testattavan materiaalin vaikutuksia solun perusominaisuuksiin tai rakenteisiin kuten esimerkiksi solukalvojen eheyteen ja energia-aineenvaihduntaan. Solutoksisuustestien edellytyksenä on, että tutkittava materiaali on liukoisessa muodossa, tai se on liuotettavissa/suspendoitavissa. E-keräimellä sisäilmasta kerätyt huurrevesinäytteet mahdollistavatkin sisäilman toksisuuden tutkimisen solutoksisuustestein.

Tavoitteet

Tutkimuksen ensisijaisena tavoitteena oli selvittää, voidaanko sisäilman toksisuutta mitata solutoksisuustestein. Toisena tavoitteena oli arvioida onko sisäilmasta mitatulla

toksisuudella ja koetuilla terveyshaitoilla yhteys, (ja edelleen voitaisiinko solutoksisuutta mittaamalla tunnistaa mahdollinen terveydelle haitallinen sairias sisäilma.)

MENETELMÄT

Sisäilmanäytteiden keruu

Sisäilmanäytteet (yhteensä 1028 kpl) kerättiin yksityiskodeista, kesämökeiltä, julkisista tiloista kuten kouluista ja terveystakesuksista sekä liikehuoneistoista. Osa kohteista oli uusia asuntoja. Sisäilmanäytteiden keruu tapahtui SEA Oy:n patentoimalla E-keräimellä /1/ SEA OY:n tai sen yhteistyökumppaneiden toimesta. E-keräimessä sisäilman vesimolekyylit härmistyivät huurteeksi hiilihappojään avulla. Huurre sulatettiin vedeksi, joka kerättiin talteen analysointia varten. Näytteenottotilan suhteellinen kosteus ja lämpötila mitattiin. Huurrevesinäytteet toimitettiin FICAMiin, jossa ne säilytettiin +4°C lämpötilassa. Testaus tapahtui noin viikon sisässä näytteen keruusta. Osa näytteistä säilytettiin lisäksi pakastimessa ja testattiin uudelleen noin kuukauden kuluttua. Osan näytteistä (377 kpl) mukana toimitettiin kaavake, jossa oli tiedot syystä näytteenotolle. Syynä saattoi olla esimerkiksi oireilu, haju, myynti/ostotilanne jne.

Solut

Työssä käytettiin kolmea eri solutyyppeä; THP-1 -monosyyttejä ja -makrofageja sekä BJ-fibroblastisoluja. Solut olivat normaaleja ihmissoluja ja ne hankittiin ATCC:ltä (American Type Culture Collection, LGC Promochem AB, Boras, Ruotsi). BJ-soluja on käytetty FICAMissa korvaamaan hiiren fibroblastisoluja OECD GD 129-mukaisessa NRU-sytotoksisuustestissä /7,8/ THP-1-monosyyttejä käyttää mm. OECD:n ihoherkistävyystesti (TG 442E) /8/.

Solujen kasvatus ja altistus huurrevesinäytteille

Sisäilmanäytteiden testaus tapahtui 96-kuoppalevyille siirrostetuilla soluilla. Testaus kesti 3-5 päivää solutyypistä riippuen.

BJ-fibroblastit: BJ-solut siirrostettiin 96-kuoppalevyille tiheydessä 4000 solua/kuoppa. Soluja kasvatettiin 24 tuntia ennen niiden altistusta sisäilmanäytteille. Kasvatusliuoksena käytettiin MEM:iä (Minimum Essential Medium w Earle's salts), johon oli lisätty 10% seerumia (FBS), 2 mM L-glutamiinia ja 0.1 nM aminohappoja.

THP-1 -monosyytit: THP-1 -monosyytit siirrostettiin testilevyille tiheydessä 10 000 solua/kuoppa. Soluja kasvatettiin 24 tuntia ennen niiden altistusta sisäilmanäytteille. Kasvatuksessa käytettiin RPMI 1640-mediumia, johon oli lisätty 10% seerumia.

THP-1 -makrofagit: THP-1 -monosyytit siirrostettiin testilevyille tiheydessä 10 000 solua/kuoppa. Solujen kasvatusliuokseen (RPMI 1640, jossa 10% seerumi) lisättiin 25 nM PMA (forboli 12-myristaatti 13-asetaatti). Soluja erilaistettiin 2 vrk, jonka jälkeen solujen annettiin toipua 24 h niiden normaalissa kasvatusliuoksessa ennen altistusta huurrevesinäytteille.

Huurrevesinäyte annosteltiin soluille 1:10 laimennoksena (tätä suurempaa vesipitoisuutta solut eivät kestä). Seerumipitoisuus vähennettiin altistuksissa 5%:iin. Jokaisesta näytteestä testattiin kuusi rinnakkaista. Negatiivisena kontrollina (verrokkina) oli puhdas vesinäyte. Positiivisina kontrolleina käytettiin WST-1 -testissä dinitroklorobentseeniä (DNCB), nikkeli II sulfaattia (positiiviset kontrollit myös OECD 442E:ssä) sekä triklosaania ja NRU-testissä natriumlauryylisulfaattia (SDS). Vertailun vuoksi analysoitiin näytteitä myös ”puhtaasta” ulkoilmasta.

Kaikki soluviljelyreagenssit olivat Gibco Invitrogenilta (Carlsbad, CA, USA) ja muut

kemikaalit Sigma Aldrichilta (Steinheim, Saksa).
Soluja altistettiin huurrevesinäytteille 1, 3, 24 tai 48 tuntia testiprotokollasta riippuen.
Altistuksen jälkeen mitattiin solujen elävyys sytotoksisuustestein.

Sytotoksisuustestit

Huurrevesinäytteiden sytotoksisuus tutkittiin käyttämällä solukalvon eheyttä kuvaavaa neutraalipunan sisäänotto-testiä (NRU) sekä mitokondrioiden aktiivisuutta kuvaavaa WST (water-soluble tetrazolium salt) -1 -testiä. WST-1-testi soveltuu pohjaan kiinnittyvien solujen (BJ fibroblastit), löyhästi pohjaan sitoutuneiden solujen (THP-1 makrofagit) sekä suspensiosolujen (THP-1 monosyytit) elävyyden määrittämiseen. NRU-testillä voitiin testata vain pohjaan kiinnittyneiden solujen (BJ fibroblastit) elävyys. Molemmat testit perustuvat fotometriin mittauksiin. WST-1 -testissä tetrazolium-suola muuttui elävien solujen energia-aineenvaihdunnassa värilliseksi lopputuotteeksi. Muodostuneen värin intensiteetti (absorbanssi) mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 450 nm. NRU-testissä puolestaan elävien solujen lysosomit keräsivät sisäänsä neutraalipunaa. Solut lyysattiin ja soluihin kertyneen neutraalipunan määrä mitattiin aallonpituudella 560 nm. Molemmissa testeissä mitattu absorbanssi on suoraan verrannollinen elävien solujen määrään.

Tulosten analysointi

Tulokset laskettiin kuolleiden solujen prosentuaalisena osuutena kontrolliin (verrokki, jossa solut oli käsitelty puhtaalla vedellä) verrattuna. Tulokset laskettiin ja analysoitiin vain siinä tapauksessa, että ne läpäisivät testille ennalta validointivaiheessa asetetut tekniset hyväksymiskriteerit. Lisäksi näyte luokiteltiin toksiseksi vain mikäli näytteellä käsiteltyjen solujen elävyys erosi tilastollisesti merkitsevästi kontrollista. Tilastollisessa analysissa käytettiin t-testiä ja SigmaPlot-ohjelmistoa (versio 12.5). Toksisuus luokiteltiin seuraavasti:

Ei toksisuutta: Ei solukuolemaa

Lievä toksisuus: Korkeintaan 5 % soluista kuolee

Kohtalainen toksisuus: 5-15% soluista kuolee

Huomattava toksisuus: Yli 15% soluista kuolee

Siltä osin kuin näytteiden mukana oli toimitettu tiedot ja syyt näytteen ottamisesta, tiedot taulukoitiin yhdessä tulosten kanssa.

TULOKSET

Tutkimuksessa vertailtiin sisäilmasta kerättyjen huurrevesinäytteiden toksisuutta eri solutyypeillä; BJ fibroblasteilla sekä THP-1 -monosyyteillä ja -makrofageilla, käyttäen eri altistusajoja (1, 3, 24 ja 48h) sekä eri toksisuustestejä (WST-1 ja NRU).

36 näytettä tutkittiin THP-1-makrofageilla ja BJ fibroblasteilla käyttäen WST-1-testiä ja 1 ja 3 ja 24 tunnin altistusajoja. Yksikään näytteistä ei ollut toksinen THP-1 -makrofageille 1 tai 3 tunnin altistuksen jälkeen, mutta 24 tunnin jälkeen 10 näytettä oli toksisia THP-1 makrofageille. BJ-soluille näytteistä oli toksisia vain 2, mutta toksisuutta esiintyi jo 1 ja 3 tunnin altistusten jälkeen. (Kaikki tutkitut näytteet oli kerätty vastavalmistuneista asuinrakennuksista.)

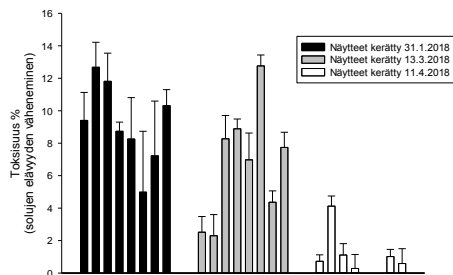
23 näytettä testattiin BJ fibroblasteilla käyttäen kahta eri toksisuustestiä, WST-1 ja NRU. WST-1 -testi osoittautui näistä herkemmäksi, sillä kuusi näytettä oli toksisia BJ soluille WST-1 -testissä ja vain kolme näytettä oli toksisia NRU-testissä. (Vertailun vuoksi samoista näytteistä 20 oli toksisia THP-1 -makrofageille).

Näiden tulosten perusteella rutiinitestiksi vakiintui THP-1-makrofagisolulla tehtävä WST-1 –testi ja 24 tunnin huurrevesialistus sen suurimman herkkyyden vuoksi. Tällä protokollalla testattiin kaikki 1028 sisäilmasta kerättyä huurrevesinäytettä. Näistä toksisia oli yli puolet, 573 näytettä. Toksisista näytteistä valtaosa (374) osui luokkaan kohtalainen toksisuus (5-15%). Huomattavan toksisia (yli 15%) näytteistä oli 29, loput olivat lievästi toksisia (alle 5%). Koska näytteidenkeruukohteet eivät olleet sattumanvaraisesti valittuja, näytteiden jakautumista toksisiin ja ei-toksisiin ei voida pitää sisäilman laadun mittarina yleisesti. Toksisuustestien tulosten ja terveyshaittojen yhteyttä pystyttiin arvioimaan 286 näytteen osalta. Ne olivat kohteista, joista oli saatu terveyshaittaraportti (Taulukko 1). Näistä valtaosa, 186 kpl, osoittautui toksisiksi, loput 100 eivät olleet toksisia. ”Väärien” negatiivisten testitulosten suurehkoon määrään voi olla useita syitä: 1) Mahdolliset terveyshaitat eivät välttämättä johdu tutkitun tilan sisäilmasta, vaan ehkä jonkin muun tilan sisäilmasta, jolle henkilö altistuu 2) Samasta kohteesta (esim. koulu tai virasto) saattoi olla näytteitä eri huoneista, joista osa oli puhtaita ja osa ei, mutta näytteenoton syyksi annettiin silti yleisesti henkilöstön oireilu. 3) Kuvatut terveyshaitat eivät perustuneet kliinisiin havaintoihin vaan henkilöiden subjektiivisiin kokemuksiin. 4) Testimenetelmä, johtuen näytteen pienestä pitoisuudesta testissä, ei ollut kyllin herkkä tunnistamaan huonoa sisäilmaa kaikissa tapauksissa.

Taulukko 1. Solutoksisuuden jakautuminen eri luokkiin eri syistä otetuissa näytteissä

SYY NÄYTTEENOTTOON	NÄYTEMÄÄRÄ KPL	TULOKSET (KPL NÄYTTEITÄ)			
		EI TOKSINEN	LIEVÄ TOKSISUUS <5%	KOHTALAINEN TOKSISUUS 5-15%	HUOMATTAVA TOKSISUUS YLI 15%
TERVEYS-HAITTOJA	286	100	50	128	8
HAJU	20	6	8	6	0
VESIVAHINKO, EPÄILY VAHINGOSTA	6	3	0	3	0
TYÖPAIKAN SISÄILMA-SELVITYS	35	3	6	24	2
ASUNNON OSTO/MYYNTI	22	11	2	7	2
KORJAUKSEN JÄLKEINEN MITTAUS	5	3	0	2	0
EI TERVEYSHAITTOJA	3	3	0	0	0
NÄYTTEITÄ YHTEENSÄ	377	129	66	170	12

Osa THP-1 –makrofaageilla ja WST-1 –testillä testatuista näytteistä (72 kpl) kuului hankkeeseen, jossa tutkittiin siivouksen vaikutusta sisäilman laatuun kolmessa pääkaupunkiseudun koulussa/lastentarhassa keräämällä kustakin koulusta 8 eri huurrevesinäytettä muutamien kuukausien välein. Aluksi tiloja siivottiin normaalisti ja sitten siirryttiin vesisiivouksen kautta ohjeiden mukaiseen, maltillisempaan siivousaineiden annosteluun. Sisäilmanäytteiden toksisuus väheni huomattavasti siivouskäytäntöjen muuttamisen myötä (Kuva 1). Kuvan esimerkki on helsinkiläisestä lastentarhasta.



Kuva 1. Sisäilman toksisuus helsinkiläisessä lastentarhassa. Tiloja siivottiin aluksi normaalisti. Siivousmenetelmiä muutettiin siten, että käytettyjen siivousaineiden määrä väheni. Samalla väheni sisäilman toksisuus.

THP-1 –monosyytit ja THP-1 –makrofagit reagoivat huurrevesinäytteisiin eri tavoin. 59 tutkitusta näytteestä valtaosa (45) oli toksisia THP-1 makrofageille, mutta vain 24 oli toksisia THP-1 monosyyteille. Sen sijaan 6 näytettä lisäsi THP-1 –monosyyttien elävyyttä. Näiden kuuden näytteen osalta tulokset on eritelty Taulukossa 2. Neljässä tapauksessa THP-1 –makrofageille toksiseksi osoittautunut näyte lisäsi THP-1 –monosyyttien elävyyttä. Kahdessa tapauksessa näyte ei ollut toksinen THP-1 –makrofageille, mutta lisäsi THP-1 –monosyyttien elävyyttä. Näissä tapauksissa tiloissa oleilevat ihmiset olivat kärsineet terveyshaitoista. Käyttämällä THP-1 monosyyttejä ja makrofageja yhdessä saatettaisiin tunnistaa huono sisäilma vielä herkemmin kuin käyttämällä pelkästään THP-1 -makrofageja.

Taulukko 2. Makrofagien ja monosyyttien erilaiset vasteet sisäilmanäytteisiin.

THP-1 makrofagit	THP-1 monosyytit	Kuvaus näytteenottoaikasta
Lievä toksisuus <5%	Viabiliteetti ↑5.20%	Juuri remontoitu, halutaan selvittää remonttimateriaalien vaikutussisäilmaan
Kohtalainen toksisuus 5-15%	Viabiliteetti ↑5.10%	Tilassa takkapuita
Kohtalainen toksisuus 5-15%	Viabiliteetti ↑3.50%	Lapset oireilivat ja ovat sairastuneet
Ei toksinen	Viabiliteetti ↑6.00%	Oireilu
Ei toksinen	Viabiliteetti ↑6.50%	Oireilu, mustia pilkkuja seinässä
Lievä toksisuus <5%	Viabiliteetti ↑6.50%	Tunkkainen ilma

Alustavien testien mukaan näytteiden pitempiaikainen säilytys pakastimessa vähensi niiden toksisuutta. Sisäilmanäytteet tulisivatkin testata mahdollisimman tuoreesti niiden ottamisen jälkeen.

JOHTOPÄÄTÖKSIÄ

Solutoksisuustesteillä pystyttiin mittaamaan sisäilman toksisuutta luotettavasti ja toistettavasti. Haasteena oli, että johtuen ilmanäytteen pienestä määrästä testissä, mitatut muutokset (solukuolema) olivat pieniä, korkeintaan 30%. Testitulosten luotettavuuden varmistamiseksi testit tulee ennen käyttöönottoa validoida ja niissä tulee olla etukäteen asetetut hyväksymiskriteerit: Rinnakkaisten mittausten välisen vaihtelun on oltava etukäteen hyväksytyissä rajoissa. Lisäksi positiivisten kontrollien tulee antaa etukäteen asetetut vasteet, jotka vastaavat suuruusluokaltaan sisäilmanäytteiden vasteita.

Tutkituista solutyypeistä THP-1 makrofaagit osoittautuivat herkeimmiksi. THP-1-makrofagisoluluilla tehtävä WST-1 –testi ja 24 tunnin altistusaika vakiintuikin rutiinitestiksi ja sillä testattiin kaikki kerätyt 1028 sisäilmanäytettä. Joissakin tapauksissa makrofageille toksinen sisäilmanäyte tai sisäilmanäyte joka ei lainkaan vaikuttanut makrofagien elävyyteen lisäsi monosyyttien elävyyttä, tapahtui ns. monosytoosia. Monosytoosi tarkoittaa yleensä immunologista aktivoitumista. Jatkossa selvitämme kuinka muutokset makrofagien ja monosyyttien määrissä (elävyydessä) suhteutuvat mm. sytokiiniin erityykseen. Sytokiinit ovat myös merkki immunologisesta aktivoitumisesta.

Solutoksisuudella ja ihmisten raportoimilla terveyshaitoilla oli yhteys 65 % tapauksista siten, että koettuja terveyshaittoja oli useammassa tapauksessa kuin mitattua solutoksisuutta. Luku on todennäköisesti kuitenkin todellisuutta pienempi mm. siitä syystä, että terveyshaitat raportoitiin varsin suurpiirteisesti koskemaan koko rakennusta, vaikka sytotoksisuustestissä samasta rakennuksesta erottui sisäilmaltaan sekä puhtaita sekä toksisia tiloja.

Myös siivouskemikaalien annostelun vähentämiseen liittynyt sisäilman solutoksisuuden mitattavissa oleva väheneminen oli hyvä esimerkki testimenetelmän toimivuudesta.

Ihmissolupohjaiset solutoksisuustestit ovat lupaava työkalu haitallisen/toksisen sisäilman tunnistamiseksi. Edullisuutensa takia ne soveltuvat hyvin massastestauksiin esimerkiksi identifioimaan haitalliset rakennukset ja huoneet ennen niiden korjausta tai uudiskohteet ennen käyttöönottoa. Näin ne voisivat täydentää ja monipuolistaa nykyistä sisäilmatutkimusta tarjoamalla siihen uuden lähestymistavan.

LÄHDELUETTELO

1. www.sisailmatutkimuspalvelut.fi
2. Salonen, H., Heinonen, T., Mannerström, M., Jackson, M., Andersson, M., Mikkola, R., Novoselac, A., Corsi, R. (2018) Assessing the indoor air toxicity from the condensed water to the mitochondrial activity of human fibroblasts and THP-1 –monocytes. Indoor Air conference 2018, Philadelphia.
3. Andersson, A.M.A, Aattela, E. , Mikkola, R.O., Atosuo, J., Lilius, E.-M., Suominen, E., Lehtinen, S., Viljanen, M. ja Salkinoja-Salonen, M.S. (2016) Uusia sisäilman tutkimusmenetelmiä. SIY raportti 34, s. 295-300.
4. Salin, J., Salkinoja-Salonen, M., Salin, P.J., Nelo, K., Holma, T., Ohtonen, P. ja Syrjäälä, H. (2017) Building-related symptoms are linked to the in vitro toxicity of indoor dust and airborne microbial propagules in schools: A cross-sectional study. Environmental Research. Vol. 154, s. 234-239.
5. Atosuo, J.T., Lilius, E.M. (2011) The real-time-based assessment of the microbial killing by the antimicrobial compounds of neutrophils. Scientific World Journal Vol. 11, s. 2382-2390. doi: 10.1100/2011/376278.
6. Mannerström, M., Toimela, T., Sarkanen, J.R., Heinonen, T. (2017) Human BJ Fibroblasts is an Alternative to Mouse BALB/c 3T3 Cells in In Vitro Neutral Red Uptake Assay. Basic Clinical Pharmacology and Toxicology. Vol. 21(3), s. 109-115. doi: 10.1111/bcpt.12790.
7. Heinonen, T. (2015) Better science with human cell-based organ and tissue models. ATLA Vol. 43, s. 29-38.
8. OECD Guidelines for the Testing of chemicals, Section 4. Health Effects.