

**ELISA-menetelmien hyödyntäminen
kosteusvaurioiden aiheuttamien immunologisten
vasteiden tutkimuksessa**

Pro gradu -tutkielma

Turun Yliopisto

Bioteknologian laitos

Molekyylibiotieteet, Solubiologia

Lokakuu 2021

Oliver Boucht

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

OLIVER BOUCHT: ELISA-menetelmien hyödyntäminen kosteusvaurioiden aiheuttamien immunologisten vasteiden tutkimuksessa

Pro gradu -tutkielma, 58 s.

Molekyylibiotieteet, Solubiologia

Lokakuu 2021

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin OriginalityCheck -järjestelmällä

Suurella osalla rakennuksia ilmenee jossain niiden elinkaaren aikana kosteusvaurioita, joissa usein havaitaan mikrobikasvustoa. Kuivuessa mikrobipartikkelit saattavat emittoitua kasvustosta sisäilmaan ja dormantit partikkelit saattavat päätyä näin hengitysteihin. Rakennusten mikrobivaurioiden ihmiseen vaikuttavat altistusmekanismit on yleisesti luokiteltu kolmeen eri kategoriaan; suoraan organismin infekioon, allergiseen tai ei-allergiseen immuunireaktioon sekä toksisuuden aiheuttamiin reaktioihin. Sisäilmaongelmien yhteydessä, allergisissa ja ei-allergisissa reaktioissa esiintyy usein hengenahdistusta, yskää ja myös laaja kirjo hengitysteiden sairauksia, kuten bronkiitteja ja astmaa. Kosteusvauriomikrobien aiheuttamien oireiden tarkkaa syntymekanismia ei tunneta. Tutkimusta tarvitaan lisää niin synnynnäisen kuin adaptiivisen immuunijärjestelmän tekijöiden alueella haitallisten mikrobien altistumisen yhteydessä

Tämän tutkimuksen tarkoituksena on saada parempi käsitys haitallisten mikrobien vaikutuksesta ihmisten immuunijärjestelmän reaktioihin sekä auttaa ymmärtämään niiden vaikutusta terveyteen sekä sitä, miten niitä pystyttäisiin korjaamaan, lievittämään tai ennalta ehkäisemään. Tutkimuksen tavoitteena on aiemman tutkimuksen aineistoja ja menetelmiä hyödyntäen tutkia kosteusvauriomikrobeille altistumisen vaikutusta immunologiisiin vasteisiin.

Tutkimuksessa kosteusvauriomikrobeille altistuneiden ja altistumattoman referenssiryhmän seeruminäytteistä mitattiin useita eri immunologisia parametreja ELISA- (engl. enzyme-linked immunosorbent assay) menetelmiä hyödyntäen. Mielenkiinnon kohteena olivat totaali sekä haittamikrobien itiöspesifiset immunoglobuliini IgE-tasot, kiertävät immuunikompleksit (CIC)-tasot sekä proinflammatoriset sytokiinit IL-1 β ja TNF- α seerumitasot. Näiden lisäksi tutkimuksessa mitattiin seerumin IgM-*Escherichia coli-lux* (*E. coli-Lux*) -tasoja. IgM-*E. coli-lux*-mittauksien tavoitteena oli selvittää aiemmassa tutkimuksessa havaittujen mikrobivauriokohteissa oleskelleiden yksilöiden *E. coli-lux*:ia kohtaan olevien komplementin epäspesifisten aktiivisuuksien alkuperä.

Tämän tutkimuksen perusteella mikrobivauriokohteissa oleskelleilla henkilöillä oli ryhmätasolla tilastollisesti merkitsevästi kohonnut veren seerumi CIC-tasot verrattuna verrokkiryhmäläisiin. *E. coli-lux* ja sytokiinimittauksissa ei havaittu ryhmien välillä tilastollisesti merkitseviä eroja. IgE-mittausmenetelmää ei saatu halutulle herkkyystasolle, jonka vuoksi IgE-mittauksia ei tehty.

Tulevaisuudessa CIC-EIA-määryksiä voitaisiin käyttää yhtenä mikrobivaurioaltistumisen todentamismenetelmänä. Tulevissa tutkimuksissa voitaisiin perehtyä muiden komplementin komponenttien tasojen vertailuun, CRP-tasojen mittaamiseen ja IgE-mittauksien ulkoistamiseen ja saadun datan analysointiin.

Asiasanat: ELISA-määrytykset, mikrobit, immuunijärjestelmä, kosteusvauriot

Haluaisin kiittää Turun yliopiston ympäristölääketeollista kliinistä tutkimusyksikkö TROSSI:a mahdollisuudesta suorittaa Pro gradu -tutkielmani heidän yksikössään. Erityiskiitokset haluan esittää ohjaajilleni FM Outi Karhuvaaralle ja FT Janne Atosuolle ohjaamisesta ja TtM Sirkku Bouchtille tutkielman kieliasun tarkastamisesta.

SISÄLLYS

LYHENTEET	3
1. Kirjallisuuskatsaus	6
1.1. Kosteusvauriot ja niiden alkuperä	6
1.1.1. Kosteusvaurioiden yleisyys Suomessa ja Euroopassa	6
1.1.2. Haitalliset komponentit kosteusvaurioiden aiheuttamissa mikrobikasvustoissa	7
1.1.2.1 Tutkimuksessa käsiteltävät mikrobilajit.....	9
1.1.3. Kosteusvaurioiden yhteydessä todennetut terveyshaitat	10
1.2. Ihmisen immuunijärjestelmä	12
1.2.1 Synnynnäinen immunitetti	13
1.2.2 Adaptiivinen immunitetti	14
1.2.2.1. Lymfosyytit, niiden kehitys ja toiminta	15
1.2.2.2 Immunoglobuliinit	18
1.2.3. Hypersensitiivisyysreaktiot	21
1.2.4 Tämän tutkimuksen kohteena olevat humoraaliset systeemit.....	23
1.2.4.1 Komplementtisysteemi.....	23
1.2.4.2 Immuunikompleksit ja kiertävät immuunikompleksit (CIC).....	26
1.2.4.3 Sytokiinit.....	28
1.3 Immunologisten vasteiden mittaaminen kosteusvauriotutkimuksissa	30
1.3.1 ELISA menetelmät.....	32
1.3.1.1. Historia.....	33
1.3.1.2 Mittaaminen	33
2. TYÖN TAVOITTEET JA TUTKIMUSKYSYMYKSET	38
3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT	40
3.1 Tutkimusmateriaalit	40
3.2 Itiöiden kasvatus.....	40
3.3. Seerumin totaali IgE -määritykset.....	41
3.4 <i>E. coli-lux</i> kasvatus ja ELISA levyn valmistelu	42

3.5 <i>E. coli-lux</i> spesifinen vasta-ainemääritys ELISA:lla	42
3.6 C3 ja C1q aktivaatiofragmenttia sisältävien CIC:iden kvantitatiivinen mittaus seeruminäytteistä.....	43
3.7. TNF- α sekä IL-1 β mittaus seeruminäytteistä.....	43
3.8 Datan käsittely.....	43
4. TULOKSET	44
4.1. Totaali IgE sekä itiöspesifiset IgE ELISA-mittaukset	44
4.2. <i>E. coli-Lux</i> spesifisen IgM ELISA-mittaukset	44
4.3. Sytokiini EIA-mittaukset	45
4.4. Komplementti fragmentti C1q sekä C3 sisältyvien CIC seeruminäyte EIA-mittaukset	48
5. TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT	51
5.1. IgE-mittaukset	51
5.2. <i>E. coli-Lux</i> spesifisen IgM ELISA-mittaukset.....	52
5.3 Sytokiini EIA-mittaukset	52
5.4 C1q sekä C3 komplementti fragmenttia sisältyvien CIC seeruminäytteiden EIA-mittaukset	53
5.5 Yhteenveto	56
6. EETTINEN LAUSUNTO	58
LÄHTEET	59

LYHENTEET

ABTS	(2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt)
ADCC	vasta-aineriippuvaisen soluvälitteisen sytotoksisuusreaktion (engl. antibodydependent cell-mediated cytotoxicity)
AP	(engl. alkaline phosphatase)
A_w	vesiaktiivisuus (engl. water activity)
BALT	(engl. bronchus associated lymphoid tissue)
BCR	B-solu reseptori (engl. B-cell receptor)
BG	(engl. background)
BSA	(engl. bovine serum albumin)
C	vakioketju (engl. lightchain)
C3	komplementin komponentti 3 (engl. complement component 3)
CD	(engl. cluster of differentiation)
C_H	raskas vakioketju (engl. constant heavychain)
CIC	kiertävä immuunikompleksi (engl. circulating immune complex)
C_L	kevyt vakioketju (engl. constant lightchain)
CRP	c-reaktiivinen proteiini (engl. C-reactive protein)
CTL	(engl. cytotoxic T-lymphocyte)
DAF	(engl. decay-accelerating factor)
DAMP	vahingoittuneiden solujen molekyyilejä (engl. damage-associated molecular pattern)
DTH	viivästynyt hypersensitiivisyys reaktio (engl. delayd-type hypersensitivity)
EIA	entsyymi immunotesteiksi (engl. enzyme immuneassay)
ELISA	entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (engl. enzyme-linked immunosorbent assay)
ERH	suhteellinen kosteus (engl. equilibrium relative humidity)

EU	Euroopan Unioni
Fab	(engl. fragments of antigen binding)
Fc	(engl. fragment crystallizable)
HRP	(engl. horseradish peroxidasehorseradish)
Ig	immunoglobuliini (engl. immunoglobulin)
IL	interleukiini
IL-1R1	(engl. interleukine 1 type receptor)
LB	(engl. Lysogeny broth)
MAC	membraania tuhoava kompleksi (engl. membrane attack complex)
MASP	(engl. MBL-associated proteins)
MBL	mannoosina sitova lektiini (engl. mannose-binding lectine)
MHC	(engl. major histocompatibility complex)
PAMP	patogeenin konservoitunut molekyylikomponentti (engl. Pathogen-associated molecular pattern)
PBS	(engl. phosphate-buffered saline)
PRR	hahmontunnistusreseptori (engl. pattern recognition receptor)
RIA	(engl. radio immunoassay)
RPM	(engl. rounds per minute)
SAPKs	(engl. stress-activated protein kinase)
T_c	CD8-T-sytotoksinen solu (engl. T-cytotoxic cell)
TCR	T-solu reseptori (engl. T-cell receptor)
T-D	T-soluvälitteinen antigeeni (engl. T-cell dependant antigen)
T_H	CD4-T-auttajasolu (engl. T-helper cell)
T-I	T-soluvapaa antigeeni (engl. T-cell independent antigen)
TLR	(engl. toll-like receptor)
TMB	(3,3',5,5'-tetramethylbenzidine)

TNF	(engl. tumor necrosis factor)
TNFR	(engl. tumor necrosis factor receptor)
V	muuttuva ketju (engl. variable chain)
V_H	muuttuva raskasketju (engl. variable heavychain)
V_L	muuttuva kevytketju (engl. variable lightchain)
WHO	World Health Organization

1. Kirjallisuuskatsaus

1.1. Kosteusvauriot ja niiden alkuperä

Rakennukset voivat olla usein käytössä kymmenistä vuosista satoihin vuosiin. Rakennusten ympäristö ja ihmisen arkipäiväinen eläminen vaikuttavat rakennusten sisäiseen sekä ulkoiseen kuntoon. Yksi monista rakennukselle aiheutuvista haitoista on kosteusvaurioiden syntyminen. Kosteusvaurio voi syntyä tai aiheutua monista syistä kuten, sateen, pohjaveden, ilmastoinnin, märkähuoneiden, huonon putkiston, korkean ilmankosteuden aiheuttaman kondensaation sekä ihmisten aiheuttamien aktiviteettien vuoksi (Institute of Medicine (US) 2004; Andersen ja muut 2011). Suuressa osassa rakennuksia ilmenee jossain niiden elinkaaren aikana kosteusvaurioita ja sen myötä usein mikrobikasvustoa (Institute of Medicine (US) 2004; Afshari ja muut 2009). Rakennuksen kosteusvaurio on määritelty miksi tahansa näkyväksi, mitattavaksi tai havaittavaksi liiallisen kosteuden aiheuttamaksi rakennukselliseksi ongelmaksi, kuten mikrobikasvuston esiintymiseksi, vuodoksi, rakennusmateriaalin hajoamiseksi, homeen hajuksi tai suoraan mitattavaksi ylimääräiseksi kosteudeksi (Afshari ja muut 2009). Mikrobikasvustoissa voi esiintyä homeita, bakteereita sekä hiivoja (Institute of Medicine (US) 2004; Afshari ja muut 2009). Useimmissa vaurioissa löytyy kaikkia näitä mikrobeita.

1.1.1. Kosteusvaurioiden yleisyys Suomessa ja Euroopassa

Puhdas sisäilma on luokiteltu perusihmisoikeudeksi vasta vuonna 2000 toukokuussa järjestetyssä WHO:n European Centre of Environment and Health kokouksessa (Mølhav ja Krzyzanowski 2000). Puhtaan sisäilman takaaminen on WHO:lle tärkeä tavoite, sillä ihminen viettää sisätiloissa valtaosan, osa jopa 90 %, elämästään (Horve ja muut 2020). Suurimmassa vaarassa ovat kosteusvauriokohteissa oleskelevat riskiryhmät. Usein vaurioita esiintyy julkisissa rakennuksissa, päiväkodeissa, kouluissa, sairaaloissa sekä hoitokodeissa (Afshari ja muut 2009). Näin ongelmista eniten kärsivät lapset, sairaat ja vanhukset sekä julkisen sektorin työntekijät. WHO onkin laatinut yleisen ohjeistuksen hyvän sisäilman takaamiseksi (Afshari ja muut 2009).

Rakennusten kosteusvauriot ovat maailmanlaajuinen ongelma. Saksan Fraunhoferin-instituutissa Susanne Urlaub:in ja muiden (2016) tekemässä raportissa ”Mould and dampness in European homes and their impact on health” vertailtiin Euroopan valtioiden kosteusvaurioiden määriä toisiinsa. Eniten vaurioita esiintyi meriveden läheisyydessä Portugalissa, Italiassa ja Kyproksella. Kosteusvaurioituneimpien valtioiden joukosta

löytyy myös vähävaraisempia Itä-Euroopan valtioita: Slovenia, Unkari sekä kaikki Baltian maat. Pohjoismaat, kuten Suomi, Ruotsi, ja Norja, sijoituivat vähiten rakennusvaurioita kärsineiden maiden joukkoon. Urlaubin raportissa Suomi sijoittui ykkössijalle. Toisen vuonna 2019 tehdyn tilastollisen kyselyn perusteella EU:n kosteusvauriokeskiarvo on 13,1 %, joka on huomattavasti korkeampi kuin Suomen vastaavaluku 4,1 % (Eurostat 2019). Suhteellisen pieni vaurioprocentti ei kuitenkaan korreloidu suoraan suomalaisten mikrobivaurioaltistumisen kanssa. Suomessa vuonna 2017 tehdyn FinTerveys-kyselyn mukaan noin 170 000 suomalaista työkäistä on altistunut kotonaan ja noin joka viides työpaikallaan huonolle sisäilmalle viimeisen 12 kk aikana (Koponen ja muut 2018). FinTerveys tutkimuksen mukaan sukupuolella on väliä oireiden tunnistuksessa. Kyselyssä naisilla oireilut ovat yleisempiä kuin miehillä ja naiset hakeutuvat herkemmin lääkäriin sisäilmaan liittyvien oireiden vuoksi.

1.1.2. Haitalliset komponentit kosteusvaurioiden aiheuttamissa mikrobikasvustoissa

Rakennuksilla on oma yksilöllinen mikrobiominsa ja näin jokaisen kodin ja työpaikan mikrobijalanjälkien väleillä löytyy eroavaisuuksia (Horve ja muut 2020). Mikrobit voivat olla sieniä, hiivoja ja/tai bakteereita. Usein vauriokohdasta ja kohteesta löytyy useita tai kaikkia näitä. Mikrobien kasvun mahdollistaa ja kiihdyttää kosteat ympäristöt ja jopa lievät kosteusvauriokohteet ovat lajeille oiva kasvu ympäristö (Taulukko 1.) (Afshari ja muut 2009). Kosteusasteen kohotessa sisätilat antavat kasvumahdollisuuden aina uusille mikrobilajikkeille, ja siksi kosteammissa olosuhteissa havaitaan yleensä biodiversiteetiltään laajoja mikrobikasvustoja.

Taulukko 1. Mikrobilajikkeiden kasvulle tarvitsemat kosteusaste.

Taulukkoon kerätty kolme eri kosteusastetta sekä niihin kuuluvia esimerkki kategorioita ja mikrobilajeja. Taulukon alla selitteet. (Afshari ja muut 2009).

Kosteusaste ^a	Mikro-organismi kategoriat ^b	Esimerkki mikrobilaji
Korkea (a_w , > 0.90; ERH, > 90 %)	Hydrofiilit	Aspergillus fumigatus
	Aktinobakteerit	Streptomyces Albus
Keskitaso (a_w , 0.80–0.90; ERH, 80–90 %)	Toisen asteen kolonisaattorit	Aspergillus versicolor (12°C)
		Rhizopus oryzae
Matala (a_w , < 0.80; ERH, < 80 %)	Xerofiilit	Aspergillus versicolor (25°C)
		Penicillium expansum

a = Vaadittu kosteusaste mikro-organismien kasvulle

b = kosteusasteessa kasvava esimerkki mikro-organismi kategorioita

a_w = vesiaktiivisuus (engl. water activity)

ERH = suhteellinen kosteus (engl. equilibrium relative humidity)

Kuivuessaan mikrobikasvustot saattavat emittoida mikrobipartikkeleita, kuten rihmastoja ja itiötä, sisäilmaan. Näin nämä dormantit partikkelit saattavat päätyä hengitysteihin. (Reponen ja muut 1998; Holme ja muut 2020.) Lisäksi kasvustot voivat erittää muita ihmisen terveydelle haitallisia aineita, esimerkiksi sekundääri metaboliitteja, toksineja, β -glukaaneja sekä metaania sisältäviä haihtuvia orgaanisia yhdisteitä (Afshari ja muut 2009; Salo ja muut 2019).

Kosteusvaurioiden aiheuttamista mikrobikasvustoista voi löytyä suuri määrä eri lajeja, ja vauriokehteissä oleskelevat yksilöt voivat altistua yhden tai useamman haittatekijän vaikutukselle. Useiden lajien emittoimien komponenttien synergiavaikutus terveyteen voi olla suurempi kuin yksittäisen vauriomikrobien haittojen summa. (Cox-Ganser 2015).

Kosteusvaurioiden terveydellisten haittojen tutkimukset usein kohdistuvat mikrobikasvustojen vaikutukseen ihmisten yleiseen terveyteen, ylä- ja alahengitysteiden tautien kehittymiseen, atooppiseen ihottumaan, astmaan ja muihin allergisiin reaktioihin (Nevalainen ja Seuri 2005; Pekkanen ja muut 2007; Cox-Ganser 2015; Putus 2016; Zhang ja muut 2016; Järvi ja muut 2018; Huttunen ja muut 2019; Atosuo ja muut 2020a; Holme

ja muut 2020). Haitalliset terveysvaikutukset ovat usein samanlaisia vertailtaessa eri maiden tapauksia, vaikka kosteusvaurioiden pääaiheuttajat vaihtelevat maantieteellisen sijainnin ja kulttuurien mukaan (Nevalainen ja Seuri 2005).

On monia syitä, miksi tietty mikrobiaalinen vaikuttaja on syytä tunnistaa. Yksi syy on tutkimuksesta saatavien tietojen jatkosoveltaminen. Jos esimerkiksi mikrobikasvustosta tunnistetaan astmaa aiheuttava komponentti, voidaan tutkimus keskittää tämän mikrobin analysointiin. Spesifisemmässä tutkimuksessa voidaan keskittyä kyseisen komponentin vaikutusmekanismeihin, sen yleisiin terveydellisiin vaikutuksiin, niiden estämiseen tai lieventämiseen ja lopulta niiden torjumiseen (Jayaprakash ja muut 2017). Haittatekijän tunnistaminen voi auttaa myös tulevien rakennusten rakentamisessa ja huollossa. Tunnistettua haitta-aiheuttajaa kohtaan voitaisiin kehittää diagnostisia työkaluja, joilla patogeeni tunnistettaisiin jo kohteessa. Työkaluilla voitaisiin monitoroida mikrobien kehitystä ja yhdistää ne ihmisten terveyteen sekä niillä pystyttäisiin arvioimaan rakennuksen kosteusvaurioasteen vakavuutta helpommin. (Jayaprakash ja muut 2017.)

Yhtenä tämän tutkimuksen lähtökohtana on selvittää *Streptomyces albus*-, *Penicillium expansum*- sekä *Aspergillus versicolor*-lajien itiöille altistumisen vaikutuksia immunologisiin vasteisiin. Näitä lajeja on löydetty Suomessa esiintyvistä kosteusvauriokohteista ja ne ovat yleisesti käytettyjä kosteusvaurioindikaattoreita (Institute of Medicine (US) 2004; Jayaprakash ja muut 2017; Salo ja muut 2019; Atosuo ja muut 2020b).

1.1.2.1 Tutkimuksessa käsiteltävät mikrobilajit

P. Expansum on sienilaji, joka parhaiten tunnetaan sen omenille, hasselpähkinöille sekä persikoille aiheuttamasta sadonkorjuun jälkeisestä sairaudesta sinisestä homeesta (Salo ja muut 2019; Luciano-Rosario ja muut 2020). Elintarvike haittojen lisäksi rihmasieni *P. Expansum*:ia on havaittu kosteusvauriokohteissa, joissa kostea kasvualusta mahdollistaa sienisolujen jakautumisen, itämisen, sekundääri metaboliittien synteesin ja sittemmin haihtuvien orgaanistenyhdisteiden emittoimisen (Kistler ja Broz 2015; Salo ja muut 2019). Syntetisoidut sekundääri metaboliitit, kuten kommunesiinit ja kaetoglobosiineja, kulkeutuvat solujen pinnalle, josta ne haihdutetaan nestemäisenä eritteenä sisäilmaan (Salo ja muut 2019). *P. Expansum*:in optimi kasvuympäristö on huoneenlämmössä 15–25°C asteessa ja laajassa pH ympäristössä (Tannous ja muut 2016).

Aspergillus on *Penicillium*:in tapaan maaperästä, kasvustoissa ja pilaantuvista elintarvikkeista löytyvä rihmasieni laji. (Andersen ja muut 2011; Piontek ja muut 2016).

Aspergillus -lajia voi löytyä luonnosta jyvistä ja siemenistä saprotrofina toimivana sienenä, ja sisätiloista kosteusvaurioiden aiheuttamista homeista, ilmastointilaitteista sekä pölyistä (Andersen ja muut 2011). *A. versicolor* kasvaa laajassa ympäristössä kasvaen parhaiten 20–30°C lämpötilassa, mutta se kestää jopa 4°-40°C lämpötilan ja laajan pH vaihtelun, mukaan lukien emäksisen 2.1. pH:n kasvuympäristö (Mousavi ja muut 2016; Piontek ja muut 2016). *A. versicolor* on patogeeninen, ja se aiheuttaa mm. eläimille aspergilloosia helposti hengitysteihin päätyvien pienien itiöiden vuoksi (Hoog ja muut 2001).

Penicillium ja *Aspergillus* ovat haittavaikutustensa sekä yleisyytensä vuoksi kaksi ekonomisesti vaikutusvaltaisinta sekä yleisintä homeista löytyvää sienilajia (Houbraken ja muut 2014). Lajien lisääntyminen sisäilman mikrobiassa on tutkimuksissa yhdistetty rakennusten kosteusvaurioitumiseen (Adams ja muut 2020).

Näiden sienten lisäksi maaperäbakteeri *S. albus*:ta on löydetty sisätilojen pölynäytteistä (Reponen ja muut 1998). Aktinobakteereihin kuuluva *S. Albus*:sin toiminta muistuttaa sienilajikkeiden elämää. Kuten sienet *S. albus* tuottaa ilmaan hengitysteitä ärsyttäviä kuivuneita itiöitä ja jakaa elinympäristöönsä sienten kanssa (Reponen ja muut 1998).

1.1.3. Kosteusvaurioiden yhteydessä todennetut terveyshaitat

Jo muinaisilla roomalaisilla oli selkeät ohjeet siitä, miten rakennus tulisi rakentaa, jotta rakennuksista saatiin elinkelpoisia. Ohjeita noudattamalla vältettiin rakennusvirheitä, jotka olisivat mahdollisesti voineet aiheuttaa rakennusvaurioita ja niiden seurauksena terveyshaittoja. Nykypäivänä talojen hyvän sisäilman takaamiselle on selvät ohjeet, joita noudattamalla vältetään niin tapaturmia kuin rakennusten ennen aikaista vaurioitumista (Afshari ja muut 2009).

Väistämättömien vaurioiden synnyttyä, mikrobivauriorakennukset altistavat niiden käyttäjät erilaisille terveyshaitoille. Vauriorakennuksen aiheuttamat altistusmekanismit on yleisesti luokiteltu kolmeen eri kategoriaan: mikrobin aiheuttamaan suoraan infekioon, allergiseen- tai ei-allergiseen tulehdusreakioon sekä toksisuuden aiheuttamiin reaktioihin. Näissä reaktioissa yksilö altistuu korkeille mikrobimäärille ja myrkyllisille komponenteille, kuten proteaaseille ja mykotoksiineille (Holme ja muut 2020). Allergisessa ja ei-allergisessa reaktiossa esiintyy hengitysteiden oireita kuten käheyttä, yskää, tukkoisuutta, allergiaa ja astmaa sekä muita vakavia hengitysteiden sairauksia (Hyvärinen 2002; Edmondson ja muut 2009; Zhang ja muut 2016; Holme ja

muut 2020). Suoran vaikutuksen lisäksi kosteusvauriomikrobit voivat herkistää muille tavallisille hengitysteiden infektioille.

Ihmisen hengityselimet ovat yksi suurimmista immunologisista porteista, joka on yhteydessä ulkomaailmaan (Martin ja Frevert 2005). Hengityselimiin kuuluvat nenä, suunielu, kurkunpää, hengitystiet sekä keuhkojen hengityspinta-alat (Aristizábal ja González 2013; Haddad ja Sharma 2019). Hengityselinten pinta-ala on yli 60 kertaa laajempi kuin kehon ulkoinen pinta-ala, johtuen hengityselinten monimutkaisesta rakenteesta. Noin 300 miljoona alveolia eli keuhkorakkulaa muodostavaa 120 m² kokoisen kudospinta-alan, joka on jatkuvasti ympäristötoksiinien altistuksen kohteena. (Aristizábal ja González 2013; Haddad ja Sharma 2019). Hengityselimen kautta kulkevat toksiinit ja mikrobipartikkelit pääsevät tätä kautta helposti kontaktiin sisäelinten kanssa.

Mikrobien haittavaikutuksiin perustuvat tutkimukset käsittelevät usein ulkoilmassa olevien mikrobien haittavaikutuksia ja sisätutkimukset ovat jääneet taka-alalle (Holme ja muut 2020). Sisätiloissa esiintyviä mikrobikasvustoja on tutkittu niin kvantitatiivisesti kuin kvalitatiivisestikin; vauriokohteiden mikrobikasvustoesiintymien määriä sekä biodiversiteettiä on tutkittu kansainvälisesti. Tehtyjen tutkimusten päätelmät ovat olleet osin ristiriitaisia ja tulokset ovat vaihdelleet tutkimusten välillä. Tämän hetken tiedoilla ei ole pystytty osoittamaan, mitkä epäpuhtaudet tai niiden yhdistelmät olisivat haitallisten terveysvaikutusten aiheuttajia. (Cox-Ganser 2015; Jayaprakash ja muut 2017.) Ristiriitaisien tuloksien pohjalta ei ole pystytty luomaan vahvaa linkkiä kosteusvauriokohteissa ilmenevien mikrobikasvustojen ja terveyshaittojen syy-seuraussuhteelle (Jayaprakash ja muut 2017).

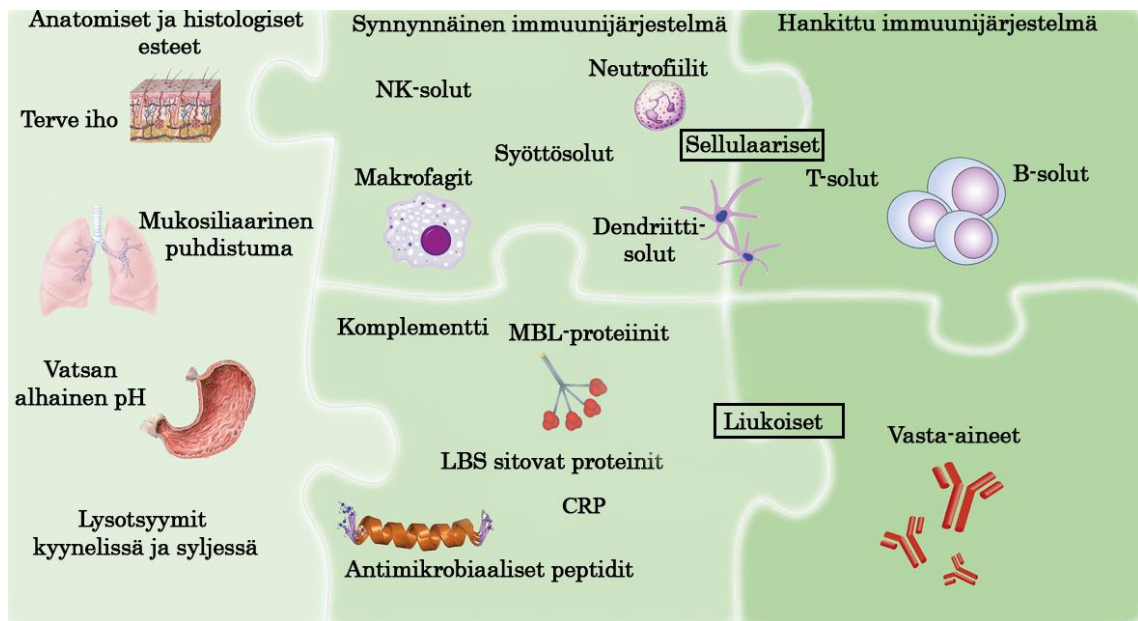
Ristiriitaisista tuloksista huolimatta, sisäilmaa ja sen terveysvaikutuksia tutkitaan yhä enemmän. Suomessa vuosittain pidettävä Sisäilmastoyhdistyksen sisäilmaseminaari kokoaa alan tutkijat yhteensä. Vuoteen 2021 mennessä jo 36. kertaa järjestetyssä sisäilmastoseminaarissa käsitellään aiheita, jotka liittyvät sisäilmaan ja sisäilmaongelmarakennuksiin. Seminaarien aiheet vaihtelevat sisäilmasto/ilmaongelmien yleisyydestä ja riskikäsityksestä kemiallisten ja hiukkasmaisten epäpuhtauksien vaikutuksiin sekä sisäilmamikrobien tutkimista ja altistumisen arviointia ja sisäilman laadun varmistamisen välillä. Seminaarin tarkoituksena on jakaa tietoa sisäilmaongelmista ja antaa alusta tutkijoille esittää tutkimustuloksiaan sekä havaintojaan todellisista kohteista sekä case-esittelyjä. (Sisäilmayhdistys 2020.)

Tutkimuksissa on osoitettu, että altistuminen mikrobivaurioille nostaa itiöspesifisen IgG:n ja alaluokkien määrää ja aiheuttaa epäspesifistä komplementtisysteemin aktivaatiota (Atosuo ja muut 2020b; Atosuo ja muut 2021). Nämä seikat viittaavat vaurion aiheuttamaan subkliiniseen tulehdustilaan, joka pitkään jatkuessaan saattaa aiheuttaa tilankäyttäjälle sairastumisen riskin. Lisäksi kosteusvauriokohteissa olevien mikrobilajien *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium* ja *Alternaria* läsnäolo on ryhmätasolla yhteydessä astman kehittymiseen mikrobivaurioille altistuneiden yksilöiden kohdalla (Cox-Ganser 2015). Allergeeneja tutkittaessa on todettu, että varhaisessa kasvussa olevien lasten altistuminen kosteusvaurioille lisää riskiä sairastua ei allergiseen astmaan. Mikrobivaurioille altistuminen yleisesti aiheuttaa lapsille ja nuorille pitkittyneitä tulehdustiloja, jotka voivat johtaa astmaan tai muihin tulehduksen aiheuttamiin sairauksiin. (Thacher ja muut 2017).

Yhdessä sisäilmastoseminaarissa esitetystä tutkimuksessa on osoitettu, että mikrobivauriorakennuksessa tilankäyttäjien keuhkofunktiot laskevat huomattavasti ja usein palautuvat ennalleen siirryttäessä esim. väistötiloihin tai uuteen rakennukseen. Myös tilan käyttäjien oireilu parani samassa suhteessa siirryttäessä puhtaampiin tiloihin. (Vilén ja muut 2020.) Kuitenkin osalla tutkimukseen osallistuneista henkilöistä keuhkofunktiot eivät parantuneet, vaan heille vauriokohde aiheutti kroonisen keuhkofunktioiden aleneman. (Päivinen ja muut 2020).

1.2. Ihmisen immuunijärjestelmä

Ihmisten immuunijärjestelmän voidaan jakaa kahteen osaan; synnynnäiseen- sekä hankittuun immuunijärjestelmään (Kuva 1.). Nämä osat voidaan edelleen jakaa humoraaliseen eli liukoiseen sekä soluvälitteiseen alaluokkaan (Owen ja muut 2013). Ryhmiin jakaminen ei ole mustavalkoinen prosessi. Immuunijärjestelmän eri systeemit toimivat yleensä lomittain ja yhdessä riippuen niitä tarvitsevista reaktioista sekä kehon tarpeista.



Kuva 1. Ihmisen immuunijärjestelmän eri luokat. Ihmisen immuunijärjestelmän voidaan luokitella erilaisiin luokkiin, kuten anatomisiin ja histologisiin esteisiin, synnynnäiseen, ja hankittuun immuunijärjestelmään. Synnynnäinen ja hankittu immuunijärjestelmä voidaan edelleen jakaa sellulaariseen eli solulliseen sekä humoraaliseen eli liukoiseen osioon. Muokattu kuvasta: (Turvey ja Broide 2010).

1.2.1 Synnynnäinen immunitaetti

Jokaiselle monisoluiselle eliölle on kehittynyt jonkinlainen immuunijärjestelmä ulkoisia vaaroja ja hyökkäyksiä vastaan. Synnynnäiseen immuunijärjestelmään kuuluvat sisäinen synnynnäinen immuunijärjestelmä sekä histologiset ja anatomiset esteet. Histologiset ja anatomiset esteet toimivat fyysisenä suojana elimistölle. Iho, limakalvot ja rauhaskudosten pinnat estävät patogeenien pääsyn kehoon. Solujen tiukat soluliitokset, epiteelikudokset, alhainen pH sekä limakalvot pitävät elimet turvassa. Jos jostain syystä nämä esteet läpäistään, on puolustusvuorossa epäspesifinen sisäinen immuunijärjestelmä. (Aristizábal ja González 2013; Owen ja muut 2013.)

Soluvälitteinen synnynnäinen immuunijärjestelmä käynnistää toimintansa minuuteissa hyökkäyksen alettua (Owen ja muut 2013). Ei-klonaalisesti toimiva epäspesifinen puolustusjärjestelmä toimii valkosolujen avulla. Epäspesifisyytensä vuoksi kaikki tämän järjestelmän vaikuttajasolut ovat identtisiä ja niiden toiminnan intensiteetti on aina samanlainen patogeenistä riippumatta. (Janeway ja Medzhitov 2002; Owen ja muut 2013). Solujen pinnoilla tai sisällä sijaitsevat reseptorit käynnistävät soluvälitteisen puolustusmekanismin, jossa vaikuttajasolut tunnistavat patogeenien konservoituneet molekyylikomponentit (engl. Pathogen-associated molecular pattern, PAMPs) tai kuolleiden ja/tai vahingoittuneiden solujen molekyyliä (engl. Damage-associated molecular pattern, DAMPs) (Janeway ja Medzhitov 2002; Owen ja muut 2013). Vaikuttajasolut kuten neutrofiilit ja makrofagit saapuvat paikalle tuhoamaan tunkeilijoita

fagosytoosin avulla Systeemi hälyttää paikalle myös tulehdustekijöitä, jotka aiheuttavat paikallisesti turvotusta ja punoitusta. Tätä tilaa kutsutaan tulehdustilaksi. (Owen ja muut 2013).

Soluvälitteisen immuunipuolustuksen lisäksi synnynnäiseen immuunijärjestelmään kuuluu myös humoraalisia osia. Humoraalinen synnynnäinen immuunijärjestelmä koostuu kolmesta päähaarasta: komplementista, koagulaatikaskadin aiheuttajista ja luonnollisista vasta-aineista (Owen ja muut 2013). Näihin järjestelmän osa-alueisiin kuuluviin komponentteihin kuuluvat esimerkiksi MBL-proteiinit (engl. Mannose-binding lectin), C-reaktiiviset proteiinit (engl. C-reactive protein, CRP), anti-mikrobiaaliset peptidit sekä komplementtijärjestelmä. MBL- ja CRP:t ovat PRR-proteiineja (engl. Pattern recognition receptor), jotka tunnistavat patogeenien ja solujen pinnalta löytyviä pinta-alueita ja auttavat esimerkiksi fagosytoosia (Janeway ja Medzhitov 2002; Turner 2003; Owen ja muut 2013). Suurin osa patogeenien tunnistamisista tapahtuu TLR:ien (engl. toll-like receptor) avulla, jotka tunnistavat PAMP:itä (Janeway ja Medzhitov 2002; Turvey ja Broide 2010).

Ulkoisten ja vaarallisten komponenttien tunnistus on iturataan koodattujen reseptorien tehtävänä ja reaktio tunkeilijoihin on välitön (Turvey ja Broide 2010). Yleisimmät kehoon pääsevät patogeenit omaavat jonkin yleisen PAMP:n, joka edelleen voidaan tunnistaa PRR-proteiineilla. Synnynnäisen immunitetin tunnistamat patogeenilista on evoluution kautta muokkautunut ”täydelliseksi” ja useimmat vaarat saadaan neutraloitua jo ennen terveydellisten haittojen ilmenemistä ilman epäsuotuisia reaktioita (Janeway ja Medzhitov 2002; Turvey ja Broide 2010).

1.2.2 Adaptiivinen immunitetti

Adaptiivinen eli hankittu immunitetti muodostuu yksilölle elämän myötä. Taudeille altistuminen ja rokotteet luovat suojan tulevia identtisiä hyökkäyksiä vastaan (Sebina ja Pepper 2018). Hyvin pieni osa kehon kohtaamista antigeeneistä aktivoi adaptiivisen immunitetin. Synnynnäisen immunitetin vahvat fysiologiset esteet sekä muut puolustusmekanismit estävät patogeenin pääsyn ylipäänsä kehoon. Adaptiivisen immunitetin aktivaatio on kehon viimeinen puolustusmekanismi. Patogeenin päätyessä kehoon, synnynnäinen immunitetti toimii tärkeänä adaptiivisen immunitetin laukaisijana. Adaptiivisen immunitetin reaktio tapahtuu synnynnäiseen immunitettireaktioon verrattuna viiveellä. Adaptiivinen immuunireaktio voi käynnistyä vasta päiviä patogeenin ensimmäisen kontaktin jälkeen (Turvey ja Broide 2010).

Hankittu immuniteetti toimii klonaalisesti, eli toisin kuin synnynnäinen immuniteetti, hyökkäys patogeeneja vastaan on täysin yksilöllinen (Owen ja muut 2013). Pitkittynyt reaktioaika antaa immuunijärjestelmälle mahdollisuuden kehittää hyökkäystä vastaan spesifimpiä puolustusmolekyylejä. Adaptiivisen puolustusjärjestelmän vaikuttajasolut ovat valkosoluihin kuuluvien lymfosyyttien ryhmän jäsenet B- ja T-lymfosyytit (B- ja T-solut). B- ja T-solujen lisäksi lymfosyytteihin kuuluvat NK-solut (engl. Natural Killer cell). Sairastunut henkilö saa parannuttuaan virustaudilta suojan loppuelämäkseen identtiselle taudille. Tämän vuoksi esimerkiksi vesirokko sairastetaan vain kerran elämässä. (Alberts ja muut 2002.)

1.2.2.1. Lymfosyytit, niiden kehitys ja toiminta

B- ja T-solut ovat vastuussa adaptiivisen immuniteetin spesifisyydestä. Kaikkien lymfosyyttien morfologinen homologisuus on lähes identtistä, jonka vuoksi niiden erotteluun käytetään solujen luonteenomaisia pintareseptorijakaumia (engl. cluster of differentiation, CD). Näiden CD:iden lisäksi B- ja T-solujen membraanilla voidaan havaita tuhansia niille suotyypinsä mukaisia antigeeni spesifisiä reseptoreita; B-solu reseptoreja (engl. B-cell receptor, BCR) sekä T-solu reseptoreja (engl. T-cell receptor, TCR). Ennen vasta-aineiden kohtaamista B- ja T-solut luokitellaan naiiveiksi soluiksi. Vasta-aine kontaktin jälkeen solut muuttuvat vaikuttajasoluiksi sekä muistisoluiksi. (Owen ja muut 2013).

T-solut ovat monimuotoinen soluryhmä, joka käy T-soluille ominaisen positiivisen sekä negatiivisen selektion niiden kypsymissijainnissa, kateenkorvassa (Sauls ja Taylor 2019). T-solut ovat vastuussa adaptiivisen immuniteetin soluvälitteisestä puolustuksesta, ja ne tunnistavat proteiinipohjaisia antigeenejä (Sauls ja Taylor 2019). Naiivit t-solut voidaan jakaa niiden CD:n mukaan CD4-T-auttaja-soluihin (engl. T-helper cell, T_H) sekä CD8-T-sytotoksisiin soluihin (engl. T-cytotoxic cell, T_C) (Owen ja muut 2013).

Ryhmiin jakaminen on toteutettu perustuen solujen luontaiseen kommunikaation MHC-molekyyliden (engl. major histocompatibility complex) kanssa. MHC:t ovat yleensä solujen membraanille sitoutuneita glykoproteiini komplekseja, jotka esittelevät prosessoituja antigeenipaloja (Owen ja muut 2013). MHC-molekyylejä on kahta eri luokkaa. Luokan I MHC-molekyylejä, yleensä endogeenisiä antigeenejä esitteleviä komplekseja, joita löytyy lähes jokaisen solun pinnalta, sekä luokan II MHC-molekyylejä, yleensä eksogeenisiä antigeenejä esitteleviä komplekseja, joita löytyy esittelijäsolujen kuten B-solujen sekä dendriittisolujen pinnalta. Kypsyessään naiivit

CD4⁺ T-solut tunnistavat luokan II MHC molekyyliä, kun taas naiivit CD8-T-solut tunnistavat luokan I MHC-molekyyliä. (Owen ja muut 2013.)

Aktivoituessaan T_c-solut erilaistuvat CTL soluiksi (engl. cytotoxic T-lymphocytes), jolloin ne tunnistavat ja eliminoivat kaikki solut, jotka esittelevät niille spesifistä luokan I MHC komplekseja, kuten syöpä- ja virusinfektoituneita soluja (Owen ja muut 2013). CTL solut tuhoavat kohdesolut erittämällä myrkyllisiä granuloita, jotka sisältävät yhden tai useamman sytolyyttisen komponentin (Reynold Verret ja muut 1987).

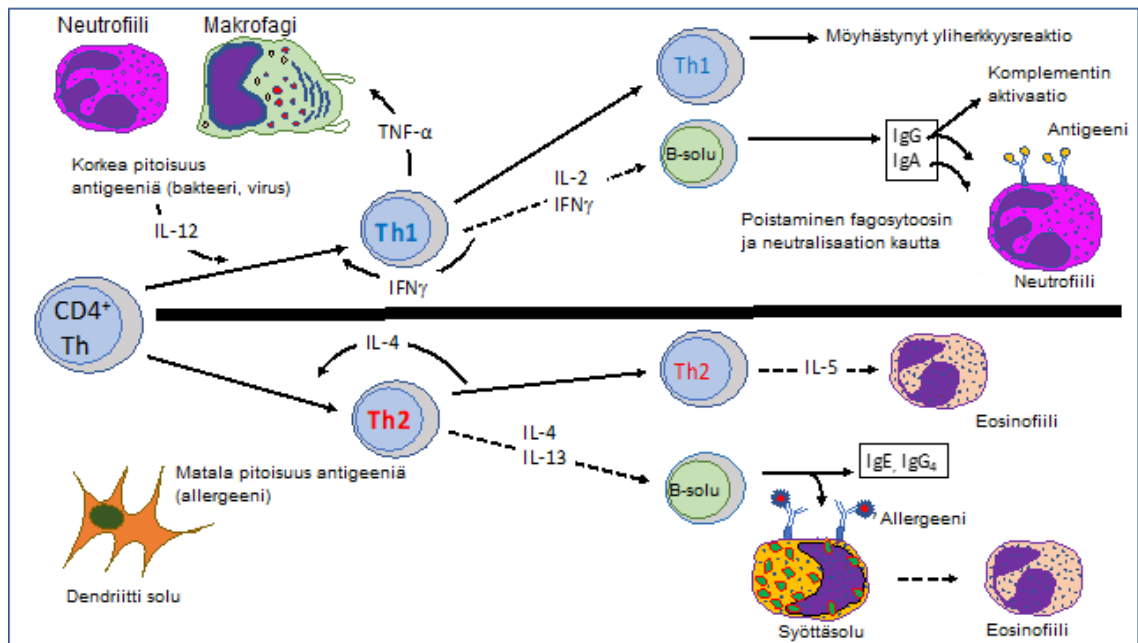
Aktivoituessaan naiivi T_H-solut voivat erilaistua viideksi erilaiseksi T_H-soluksi. T_{H1} on tärkeä makrofagiin aktivoija sekä osana solunsisäisten infektioiden taistelussa. T_{H2}-solut toimivat parasiittien vastaisessa taistelussa, vasta-aine välitteisessä immuniteetissä ja makrofagiin aktivoinnissa sekä astmassa ja allergisissa reaktioissa. T_{H17}-soluilla on oleellinen osa limakalvon immuniteetin toiminnassa ja ekstrasellulaaristen bakteerien ja sienien vastaisessa taistelussa. T_{FH}-solut auttavat liukoisen immuniteetin toiminnassa ja reguloivat B-solujen kehitystä itukeskuksissa. (Owen ja muut 2013; Sauls ja Taylor 2019.) Viides T-solu tyyppi on hieman muista poikkeava inhiboiva T_{REG}-solu, joka pystyy säätelemään immuunivasteita sekä heikentää autoimmuunisia reaktiota inhiboivilla IL-10 sekä IL-35 sytokiineilla (Sauls ja Taylor 2019).

Toiset adaptiivisen immuniteetin vaikuttajasolut, B-solut, kehittyvät ja kypsyvät bursa of Fabricius-elimessä (Owen ja muut 2013). B-solujen päätehtävänä on säädellä immuniteettiä, tuottaa vasta-aineita, esitellä antigeenejä, osallistua suoraan tulehdusteihin sekä auttaa muita mononukleaarisia soluja (Althuwaiqeb ja Bordoni 2021). Toisin kuin T-solut, B-solut tunnistavat liukoisia antigeenejä (Owen ja muut 2013). Solun pinnalla sijaitseva BCR on solun membraanille sitoutunut vasta-aine, joka tunnistaa spesifisesti yksilöllistä antigeeniä (Hoffman ja muut 2016). B-solu aktivaatio voi tapahtua kahdella eri tavalla. Aktivaatiotyypin määrää kohteena olevan antigeenin ominaispiirteistä, joiden mukaan aktivoija-antigeenit jaetaan T-soluvälitteisiin antigeeneihin (engl. T-dependent antigen, T-D) sekä T-soluvapaisiin antigeeneihin (engl. T-independent antigen, T-I) (Hoffman ja muut 2016). T-D aktivaatio tapahtuu B-solun kohdatessa vapaan antigeenin. B-solu sitoo vapaata antigeeniä BCR:nsä avulla, fagosytoi siitä osan ja re-ekspressoii prosessoitua antigeenipalaa B-solun luokan II MHC membraaniproteiinilla (Owen ja muut 2013). Luokan II MHC esitellään spesifiselle T_H-solulle, joka tunnistaa sen CD4-molekyyllillään. Tunnistettuaan vasta-aineen T-solu alkaa erittämään B-solua stimuloivia sytokiineja, jotka aiheuttavat B-solun jakautumisen ja erilaistumisen muisti- sekä plasmasoluiksi (Althuwaiqeb ja Bordoni 2021). Erilaistuessaan plasmasoluksi B-solu

menettää BCR:nsä ja aloittaa erittämään menetetyt reseptorin kaltaista liukoista vastaainetta (Owen ja muut 2013). Eritettyjen vasta-aineiden isotooppi riippuu aktivoituneen B-solun läheisyydessä olevista esittelijäsoluista sekä T-solun vapauttamista sytokiineista. Tätä kutsutaan luokanvaihdoksi. (Owen ja muut 2013; Stavnezer ja Schrader 2014.)

Toisin kuin T-D T-I aktivaatio tapahtuu nimensä mukaisesti ilman T_H -solujen apua. T-I:tä on kahta eri tyyppiä: T-I tyyppi I sekä II. T-I tyyppi I antigeenit ovat yleisesti mitogeenisiä stimulantteja esim. bakteeriaalisia liposakkarideja ja poly-IC:tä (engl. Polyinosinic-polycytidylic acid), jotka aktivoivat T-soluja TLR:ien kautta, kun taas T-I tyyppi II antigeenit ovat polysakkarideja, jotka sitoutuvat BCR:iin kanssa, aiheuttaen antigeenispesifisen reaktion (Obukhanych ja Nussenzweig 2006).

Ihmisen T_H -solujen vasta-ainevaste voidaan karkeasti jakaa kahteen eri toiminnalliseen osa-alueeseen (Kuva 2.), T_H1 sekä T_H2 suuntaiseen vasteeseen. Altistuessaan fysiologiselle vasteelle, naiivi $CD4-T_H$ erilaistuu paikalla olevien polarisoivien tulehdustekijöiden sytokiineista riippuen johonkin edellä mainittuun T_H muotoon, joista yleisimmät ovat T_H1 sekä T_H2 . (Owen ja muut 2013.) Ensimmäinen, normaali immunologinen vastetyyppi on T_H1 -solun ja IgA, IgG ja IgM-vasta-aineiden ohjaamat normaalit immuunisysteemin reaktiot. T_H1 erikoistuminen tapahtuu silloin, kun sytokiini IL-12 on läsnä sekä antigeenin pitoisuus on korkea, esim. bakteerin tai viruksen läsnä ollessa (Owen ja muut 2013). Toisena vastetyyppinä on T_H2 -vaste, joka on tärkeä loisinfektioita sekä myrkyjä vastaan, kuin myös B-solujen ja eosinofiilien aktivoinnissa (Butcher ja Zhu 2021). T_H2 erikoistuminen tapahtuu matalan antigeeni pitoisuuden sekä IL-4 läsnä ollessa (Owen ja muut 2013).



Kuva 2. Vasta-aine vasteen muodostuminen. Ylhäällä $Th1$ -vaste ja alhaalla $Th2$ -vaste. Vasta-aine vasteen muodostuminen riippuu läsnä olevasta antigeenistä, sen rakenteista, antigeeni pitoisuudesta ja sitä esittelevistä soluista. Muita vasta-aine vasteen muodostumiseen vaikuttavia tekijöitä ovat reaktion aikana lähellä olevat sytokiinit. Muokattu kuvasta (Atosuo 2021).

1.2.2.2 Immunoglobuliinit

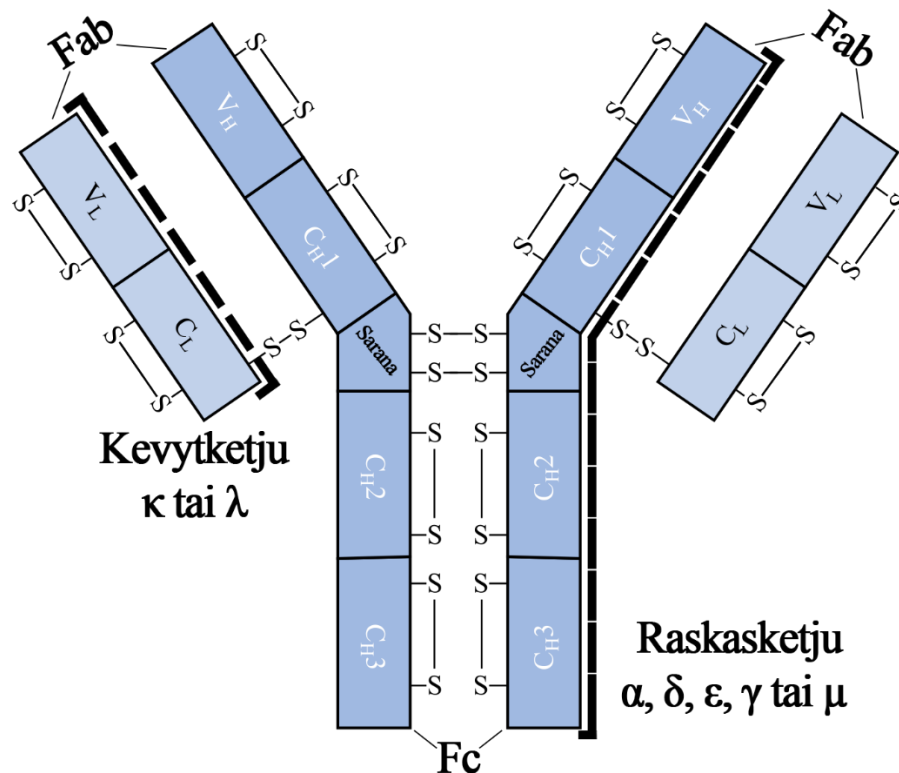
Immunoglobuliineilla (engl. immunoglobulin, Ig) eli vasta-aineilla on tärkeä rooli patogeenien tunnistamisessa. Immunoglobuliinit toimivat hankitun immunitetin antigeenireseptoreina. Usein y:n-muotoisena kuvattu Ig rakentuu yleisesti kahdesta samanlaisesta kevyestä sekä raskaasta ketjusta. Näitä eri immunoglobuliinin osioita kutsutaan immunoglobuliinidomaineiksi. Immunoglobuliineja tunnetaan viittä eri luokkaa: IgA, IgD, IgE, IgG ja IgM (Taulukko 2.). Ig-luokka määräytyy molekyylin raskaanketjun perusteella vastaavasti: α , δ , ϵ , γ μ . (Soppi 1992; Owen ja muut 2013; Vaillant ja muut 2021). Ihmisellä kevytketjut voivat olla joko κ - tai λ -ketjuja. IgG-, IgD- ja IgA-vasta-aineissa sijaitsee sarana-alue, joka IgM:ltä ja IgE:ltä puuttuu. Sarana-alueen tilalla IgM:llä sekä IgE:llä on ylimääräinen hiilihydraattiryhmä keskellä molekyyliä. (Owen ja muut 2013.)

Taulukko 2. Immunoglobuliinien ominaisuuksia.

Immunoglobuliineja eli vasta-aineita on kehossa eri isotooppeja. Taulukkoon on kerätty ihmisen eri vasta-aine isotoopit, kuinka monta alaluokkaa niitä löytyy, terveen yksilön keskiarvoinen seerumi konsentraatio kyseiselle vasta-aine isotoopille, yksittäisen vasta-aineen koko sekä mahdolliset muodot.

Isotooppi	Ala-luokat	Keskiarvoinen seerumi konsentraatio (mg/mL)	Koko seerumissa (Kd)	Muoto
IgA (α)	2	3,00	160	Monomeeri/ Dimeeri
IgD (δ)	1	0,03	184	Monomeeri
IgE (ϵ)	1	0,00005	188	Monomeeri
IgG (γ)	4	9,00	146	Monomeeri
IgM (μ)	2	1,50	970	Pentameeri

Immunoglobuliinidomainit ovat polypeptidiketjuja, jotka ovat laskostuneet vastakkaissuuntaisesti kulkeviksi β -nauhoiksi ja edelleen β -levyiksi (Schroeder, Jr ja Cavacini 2010; Owen ja muut 2013). Domainit muodostavat polypeptidiketjujen vakioketjuista C (engl. constant chain) sekä muuttuvasta ketjusta V (engl. variable chain) (Kuva 3.). Immunoglobuliinin rakenne vaihtelee isotooppien välillä. Esimerkiksi monomeeri IgG:n kevytketju rakentuu yhdestä muuttuvasta kevytketjusta V_L (engl. variable lightchain) ja yhdestä kevyestä vakioketjusta C_L (engl. constant lightchain). Raskasketju sen sijaan rakentuu raskaasta muuttuvasta ketjusta V_H (engl. variable heavychain) ja raskaista vakioketjuista C_{H1} , C_{H2} ja C_{H3} (engl. constan heavychain). Ketjujen päistä löytyvät karboksiterminaaliset domainit. B-solureseptoreissa tämä alue on korvattu kolmesta osasta rakentuvalla yhdistymisalueella, johon kuuluvat spacer-sekvenssi hydrofobisella alueella sekä lyhyellä sytoplasma hännällä. (Owen ja muut 2013.)



Kuva 3. Monomeeri immunoglobuliini G:n rakenne. IgG rakentuu kahdesta identtisestä raskaasta sekä kevyestä immunoglobuliinidomainista. Kuvaan merkitty kevytketju ja raskasketju, Fab- ja Fc-fragmenttien alueet ja rikkisillat (-S-). Piirretty mukaillen kuvasta: Kuva piirretty (Owen ja muut 2013) mukaan.

Proteolyttisillä entsyymeillä Ig:t voidaan halkaista sarana-alueelta kahteen eri osaan: Fab- (engl. fragments of antigen binding) fragmenttiin, jossa spesifinen antigeenin sitoutumisalue sijaitsee, sekä Fc- (engl. fragment crystallizable) fragmenttiin, joka kommunikoi vaikuttajamolekyylien, esim. komplementin osien, ja sytotoksisten solujen membraanilla olevien Fc-reseptoreiden kanssa. Fc-fragmentti isotoopit ovat suurimmassa vastuussa vasta-aine isotooppien eroavaisuuksista. (Schroeder, Jr ja Cavacini 2010.)

Ig:t voivat vaikuttaa immunitetin toimintaan neljällä eri tavalla: 1) Suoraan neutralisoimalla patogeenin, jolloin patogeeni-kohdesolu sitoutuminen estetään fysiologisesti, 2) opsonisaatiolla eli kohteen päällystyksellä, jolloin fagosyytit eli syöjäsolut pystyvät tunnistamaan ja eliminoimaan kohteet, 3) komplementin aktivaatiolla ja 4) yhteistyöllä sytotoksisten solujen, kuten NK-solujen, kanssa Ig:t voivat aiheuttaa vasta-aineriippuvaisen soluvälitteisen sytotoksisuusreaktion (engl. antibodydependent cell-mediated cytotoxicity, ADCC) (Owen ja muut 2013).

Opsonisaatiossa, stimulanttien aiheuttaman plasmalolujen Ig-tuotannon jälkeen, vasta-aineet hakeutuvat patogeenien luokse imunesteenä verenkiertoa pitkin (Thau ja Mahajan 2019). Saapuessaan patogeenin luokse vasta-aineet sitoutuvat Fab-alueidensa avulla patogeenin epitooppiin päällystäten kohteensa (Owen ja muut 2013; Thau ja Mahajan

2019). Opsonoituihin patogeeneihin sitoutuneiden vasta-aineiden vapaana olevat Fc-alueet kommunikoivat syöjäsolujen Fc-reseptoreiden kanssa aiheuttaen fagosytoosin ja patogeenin poiston (Thau ja Mahajan 2019).

Ig:n paikallinen vaikutus riippuu sen isotoopista. Nopeimpana tulehduspaikalla oleva IgM-opsonoi patogeenejä tehokkaasti sen ominaisen pentavalentti muodon vuoksi. IgM on tehokas yleisten patogeenien poistaja. (Owen ja muut 2013.) Spesifimpi IgG syntetisoidaan IgM:n jälkeen. IgG opsonoi patogeenin ja samalla sitoutuu Fc-reseptoreihin parantaen makrofagien toimintaa. Patogeenien tunnistuksen lisäksi IgG1 IgG3 tai IgM voivat osallistua komplementtisysteemin aktivaatioon. (Owen ja muut 2013; Middleton ja muut 2016.)

IgA on limakalvoille, kuten hengitysteihin ja suoliston limakalvoille suunnattu Ig. Sitä löytyy limakalvojen lisäksi eritteistä, kuten äidinmaidosta, syljestä ja kyyneleistä. (Woof ja Ken 2006; Thau ja Mahajan 2019.) IgA:n päätehtäviä ovat toksiinien neutralisointi, vastasyntyneiden immuunipuolustuksen auttaminen sekä endosytoosin käynnistäminen (Woof ja Ken 2006; Owen ja muut 2013). IgE molekyylit tunnetaan niiden vaikutuksesta astmaan sekä allergisiin reaktioihin kuten tyypin I hypersensitiivisyysreaktioon (Owen ja muut 2013; Abbas, Moussa ja Akel 2020). IgD:n ominaisuuksista on tutkimuksissa saatu tähän asti hyvin vähän tietoa. Niiden kuitenkin tiedetään vaikuttavan basofiilien toimintaan (Chen ja Cerutti 2011).

1.2.3. Hypersensitiivisyysreaktiot

Vaikka adaptiivinen immuunijärjestelmä on hyvin tarkka, se toisinaan tuottaa epäsuotuisia reaktioita antigeenejä vastaan, joita ei luokitella patogeeneiksi. Nämä ”turhat” reaktiot voivat toimia kehon puolustamisen sijaan sitä vastaan. Hypersensitiivisyysreaktio eli yliherkkyysoire on kehossa tapahtuva immuunivaste, joka liioittelee tai antaa väärää signaalia allergeenia tai antigeeniä vastaan aiheuttaen epäsuotuisia tulehdustiloja (Justiz Vaillant ja Zito 2018). Hypersensitiivisyysreaktiot voidaan jakaa niiden toimintamallin mukaan tyypin I-IV hypersensitiivisyysreaktioihin.

Ensimmäisenä tyyppinä on myös allergiaksi kutsuttu tyypin I hypersensitiivisyysreaktio, jonka käynnistäjä molekyylinä toimii IgE (Soppi 1992). Tuotetut IgE:t ohjaavat anafylaktisten välittäjäaineiden vapauttamista syöttösoluista liukoisia spesifisiä antigeenejä vastaan. Näistä käytetään yleisesti nimitystä allergeenit. (Abbas, Moussa ja Akel 2020.) Reaktio aiheuttaa histamiinin ja muiden tulehdusta säätelevien tekijöiden vapautumista kudokseen, luoden alueelle ärsytystä. Tyypin I reaktio voi tapahtua

paikallisesti, jolloin reaktio voi oireilla astman, paikallisen ekseeman, heinänuhan tai ruoka-allergian muodossa (Owen ja muut 2013). Toisinaan tyypin I reaktio voi ilmetä systemaattisena anafylaksiana, josta vakavin muoto on anafylaktinen shokki. Anafylaktinen shokki on hengenvaarallinen tila, jota voidaan hoitaa vain adrenaliinilla ja usein sairaalahoitolla. Shokkireaktion voi käynnistää lähes mikä tahansa aine, joista yleisempinä ovat ruoka-allergeenit ja myrkyt (Owen ja muut 2013; Abbas, Moussa ja Akel 2020; Bilò ja muut 2021).

Tyypin II reaktio on vasta-ainevälitteinen hypersensitiivisyysreaktio, jossa IgG sekä IgM ohjataan sellulaarisen tai extrasellulaarisen antigeenin luokse. Reaktion lopputuloksena on joko antigeenin toiminnan menetys ja/tai solun vaurioituminen tai tuhoutuminen. (Bajwa ja Mohammed 2020.) Reaktio voi tapahtua kolmella eri mekanismilla: vasta-aine voi sitoutua solun pintareseptoriin muuttaen sen toimintaa, vasta-aine voi käynnistää ADCC reaktion tai vasta-aine voi käynnistää komplementti kaskadin. (Owen ja muut 2013; Bajwa ja Mohammed 2020.)

Tyypin III reaktio on immuunikompleksi välitteinen reaktio, jossa vasta-aine-antigeeni kompleksit sitoutuvat epiteelikudoksiin kiinni aiheuttaen tulehdusreaktiota sekä komplementin aktivaatiota (Owen ja muut 2013). Tästä kerrotaan lisää osiossa 1.2.4.2.

Tyypin IV reaktiota kutsutaan viivästyneeksi hypersensitiivisyysreaktioksi (engl. delayd-type hypersensitivity, DTH), jolloin reaktio voi tapahtua 12, 48 tai jopa 72 tunnin kuluttua allergeenille altistumisen jälkeen (Marwa ja Kondamudi 2020). Toisin kuin muut yliherkkyysoireet, tyypin IV reaktio toimii ilman vasta-aineita. Reaktion toiminta perustuu yleensä T-solujen TCR:in, jotka tunnistavat antigeenin. TCR:t aktivoituvat, ja vapauttavat sytokiineja sekä kemokiinejä edelleen aiheuttaen kudonvaurioita sekä sairauksia. Tyypin IV hypersensitiivisyysreaktio voidaan edelleen jakaa IVa, IVb, IVc sekä IVd reaktioihin perustuen reaktiossa mukana olevien T-solujen (T_{H1} ja T_{H2}), kemokiinien ja sytokiinien yhdistelmästä. (Marwa ja Kondamudi 2020.)

Hypersensitiivisyysreaktiot ovat hyvin yleisiä. 15 % maailman asukkaista kokee allergisia reaktioita heidän elämänsä aikana. Yksi kolmesta tuhannesta amerikkalaisesta kokee vahvoja allergisia reaktioita vuosittain. Hypersensitiivisyysreaktioiden havaitseminen on kasvanut viimeisen vuosikymmenen aikana. Kasvun tarkkaa syytä ei olla pystytty määrittämään, mutta syyksi ollaan spekuloitu elämän tyylien muutokset, hengitys ilman saasteiden kasvaminen sekä imettämisen vähentyminen. (Justiz Vaillant ja

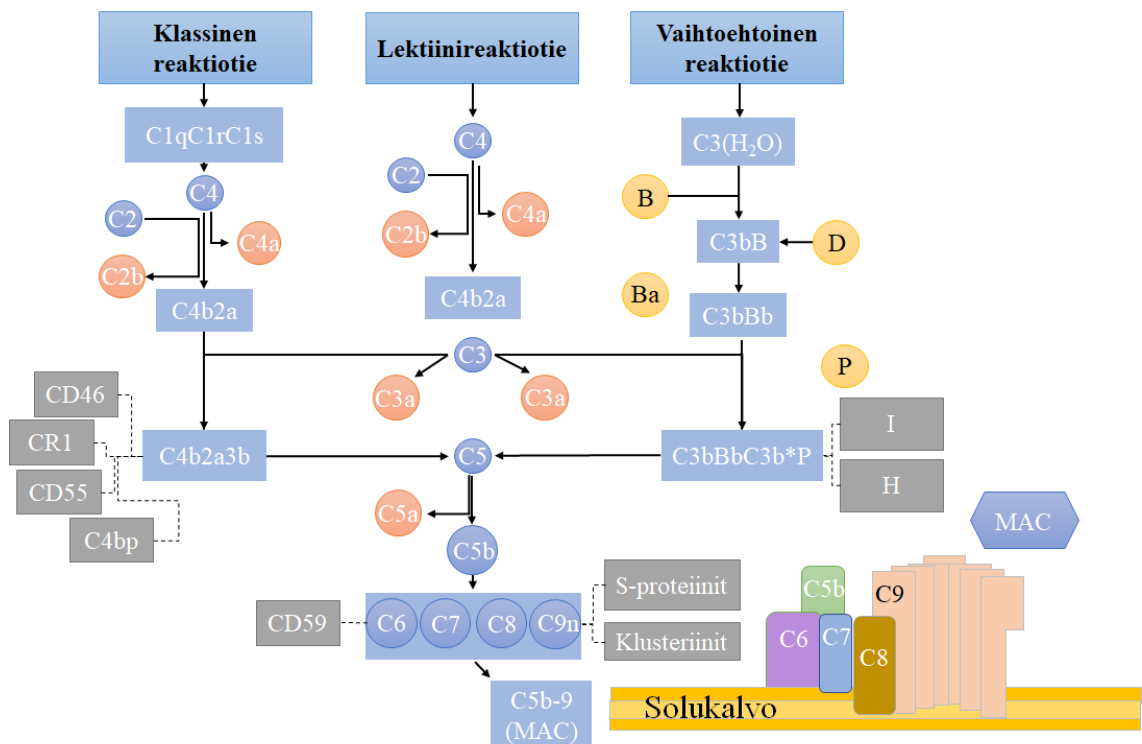
Zito 2018.) Havaitsemismekanismit, sekä reaktioiden toimintamallien tutkiminen on voinut olla osana havaintojen lukumäärän kasvussa.

1.2.4 Tämän tutkimuksen kohteena olevat humoraaliset systeemit

1.2.4.1 Komplementtisysteemi

Komplementtisysteemi on veressä ja kudostenesteessä oleva noin 30 erilaisen proteiinin muodostama systeemi, joka on olennainen osa synnynnäistä immunitettä (Xiong ja muut 2003). Systeemin osien syntetisaatio tapahtuu pääasiassa maksassa (Soppi 1992; Owen ja muut 2013). Komplementtisysteemi on osa synnynnäistä immunitettä, mutta toimii vahvasti sidoksissa adaptiivisen immunitetin kanssa. Komplementtisysteemin kolmeen päätehtävään kuuluvat partikkelien opsonointi fagosytoosia varten, kohdesolujen tuhoaminen ja puolustusjärjestelmän aktivaatio (Soppi 1992).

Komplementtisysteemin aktivaatio voi tapahtua klassisen, vaihtohtoisen tai lektiini reaktiotien kautta. Komplementtisysteemi toimii kaskadireaktion tavoin, jossa systeemin proteiinit aktivoivat järjestelmällisesti aina seuraavaa reaktiovaihetta, samalla vahvistaen vastetta. Lopulta kaikki reaktiotiet konvergoituvat C3-konvertaasivaiheessa ja jatkavat yhtenä, lyyttisenä reaktiotienä, C5b-9, membraaneja tuhoavan kompleksin (engl. membrane attack complex, MAC) muodostumiseen asti (Kuva 4.). (Xiong ja muut 2003.)



Kuva 4. Komplementtijärjestelmän reaktiotiet ja lopullisen C5b-9 (MAC)-rakenne. Komplementtijärjestelmä voi aktivoitua kolmea eri reaktiotietä: klassisen, lektiini- tai vaihtohtoisen reaktiotien kautta. Reaktiotiet konvergoituvat C3 konvertaasin kohdalla johtaen yhteiseen lyyttiseen reaktiotiehen ja lopulta membraania tuhoavan kompleksin (engl. membrane attack complex, MAC) muodostumiseen (C5b-9). Kuva piirretty (Tegla ja muut 2011) mukaan.

Klassinen reaktiotie on IgM:n, IgG:n, pentraksiinien sekä C1q-sitoutumisalueen laukaisema reaktiotie (Sarma ja Ward 2011). Klassinen reaktiotie luokitellaan yleisesti adaptiivisen immunitetin vasteeksi, toisin kuin vaihtoehtoinen ja lektiini reaktiotie, (Owen ja muut 2013). Syynä tähän on sen mahdollinen initiaatioreitti IgG1:n, IgG3:n tai IgM:n luomien vasta-aine-antigeeni kompleksien kautta (Owen ja muut 2013; Middleton, ja muut 2016). Reaktio käynnistyy C1q:n sitoutuessa antigeeniin yhdistyneen vasta-aineen Fc-alueelle. Vasta-aineen komplementin initiaatiopotentiaali riippuu sen isotoopista. IgM on satoja kertaa potentimpi klassisen komplementtireaktiotien laukaisija kuin IgG. Tämä johtuu IgM:n pentameeri muodosta. Vasta-aineen sitoutumisen jälkeen, IgG:hen verrattuna suuremman kokoinen IgM kykenee kommunikoimaan useamman C1q molekyylin kanssa sen useiden vapaiden Fc-alueidensa vuoksi. (Owen ja muut 2013.) C1q muodostaa vähintään kahden vasta-aineen, kahden C1s ja kahden C1r komponentin kanssa C1q-kompleksin. C1q-kompleksi reagoi C4 ja C2 komponenttien kanssa muodostaen C3-konvertaasin C4b2a-kompleksin. (Tegla ja muut 2011; Owen ja muut 2013.) Vasta-aine sidonnaisen initiaatioreitin lisäksi klassinen komplementtireaktiotie voi käynnistyä suoran pentraxinin, kuten CRP:n, patogeenin tunnistuksen ja C1q:n sitoutumisen jälkeen. Pentraxinit tunnistavat patogeenien osia niiden PRR:ien avulla ja tästä johtuen spesifisiä vasta-aineita ei tarvita reaktion käynnistämiseen. (Sarma ja Ward 2011.)

Lektiinireaktiotie aktivoituu MBL-proteiinin tai ficolinin tunnistessa mannoosin hiilivetyraketeen PAMP:in patogeenin pinnalla (Sarma ja Ward 2011; Owen ja muut 2013; Bakshi ja muut 2020). Tunnistuksen kohteena ovat yleensä hiivat, bakteerit, virukset sekä parasiitit. MBL- sekä ficolini-proteiinit kiertävät seerumissa yhdistyneenä MASP-komplekseissa (engl. MBL-associated proteins), joiden sitoutuminen patogeeneihin aktivoi komplementin osia. (Sarma ja Ward 2011). Lektiinireaktiotie noudattaa samaa reaktiojärjestystä kuin klassinen reaktiotie päätyne C3-konvertaasivaiheeseen muodostamalla C4b2a-kompleksin (Owen ja muut 2013).

Kolmas reaktiotie, vaihtoehtoinen reaktiotie, aktivoituu vieraiden lipidien, hiilivetyjen, sekä proteiinien läsnä ollessa (Sarma ja Ward 2011). Tien käynnistäminen voi tapahtua alituisesti tuotetun ja inaktivoidun komplementti komponentti C3:n spontaanin hydrolyysin johdosta (C3(H₂O)). Reaktiossa faktori B sitoutuu C3(H₂O) -kompleksiin, jonka jälkeen faktori D pilkkoo muodostuneen kompleksin irrottaen faktorin Ba:n. Reaktiossa jäljelle jäänyt kompleksi C3bBb on C3-konvertaasi. (Owen ja muut 2013). Vaihtoehtoinen reaktiotie voidaan myös käynnistää properdinin tai proteaasien, kuten

kallikreinin tai thrombinin kautta (Owen ja muut 2013). Näitä reaktioteitä kutsutaan myös vaihtoehtoisesti C3-itsenäisiksi reaktioteiksi (Sarma ja Ward 2011).

Komplementtireaktion lopullisen MAC-kompleksin muodostamisen ja lyyttisen solukuoleman ohjauksen lisäksi komplementtisysteemillä on muitakin immunologisia tehtäviä. Komplementin komponentit auttavat patogeenien opsonoinnissa ja sitä kautta patogeenien fagosytoosissa. Komplementin osat voivat sitoutua itse patogeeneihin tai patogeeneihin yhdistyviin vasta-aineisiin. Syöjäsolut kykenevät tunnistamaan nämä sitoutuneet komplementin osat syöjäsolujen membraanin komplementtiresptorien avulla, joka lopulta ohjaa syöjäsolut komplementtiresptorihjatuun patogeenin fagosytoosiin. (Owen ja muut 2013.)

Komplementtisysteemi vaikuttaa muihin immuunijärjestelmän systeemeihin, kuten koagulaatiosysteemin, T-solujen säätelyyn, solujätteiden hävittämiseen sekä sytokiiniin säätelyyn ja siten myös tulehdusreaktion syntymiseen (Sarma ja Ward 2011; Noris ja Remuzzi 2013; Owen ja muut 2013; Kenawy ja muut 2015). Komplementtisysteemi on olennaisen tärkeä tulehdusreaktion käynnistämisessä (Tyypin III hypersensitiivisyysreaktio) ja immuunikompleksin eliminaatiossa (Soppi 1992; Owen ja muut 2013; Usman ja Annamaraju 2020).

Komplementtisysteemin säätely on tarkka prosessi, sillä se vaikuttaa moneen kehon toimintaan. Komplementtia säätelevät tapahtumat ovat niin passiivisia kuin aktiivisiakin. Iso joukko proteiineja, kuten DAF-proteiinit (engl. decay-accelerating factor), protektiini, sekä karboksypeptidaasi inhiboi komplementin epäsuotuisaa aktivoitumista (Noris ja Remuzzi 2013; Owen ja muut 2013). Tarkasti säädellyt C3- ja C5-konvertaasivaiheet on säädeltä CD55, CR1, CD46, C4bp:n ja faktori I ja H toimesta. Muita sääteleviä tekijöitä ovat MAC:in muodostumista ohjaavat S-proteiini, klusteriinit sekä CD59. (Tegla ja muut 2011.)

Komplementin vajaatoiminta voi johtaa useisiin terveydellisiin haittavaikutuksiin. Toisinaan systeemi voi aktivoitua ilman syytä aiheuttaen autologisia vammoja. (Noris ja Remuzzi 2013.) Systeemin vajavainen toiminta voi johtaa useisiin tauteihin. Esimerkkejä taudeista ovat hemolyyttis-ureeminen oireyhtymä (aHUS), joka perustuu C3 konvertaasin vajaatoimintaan, perinnöllinen angiooedema, joka johtuu C1-inhibiittorin mutaatiosta ja vajaatoiminnasta sekä systemaattiseen lupus erythematosus (SLE, Punahukka), joka perustuu C1q, C1r, C1s, C2 ja C4-komponenttien vajaatoimintaan (Sarma ja Ward 2011).

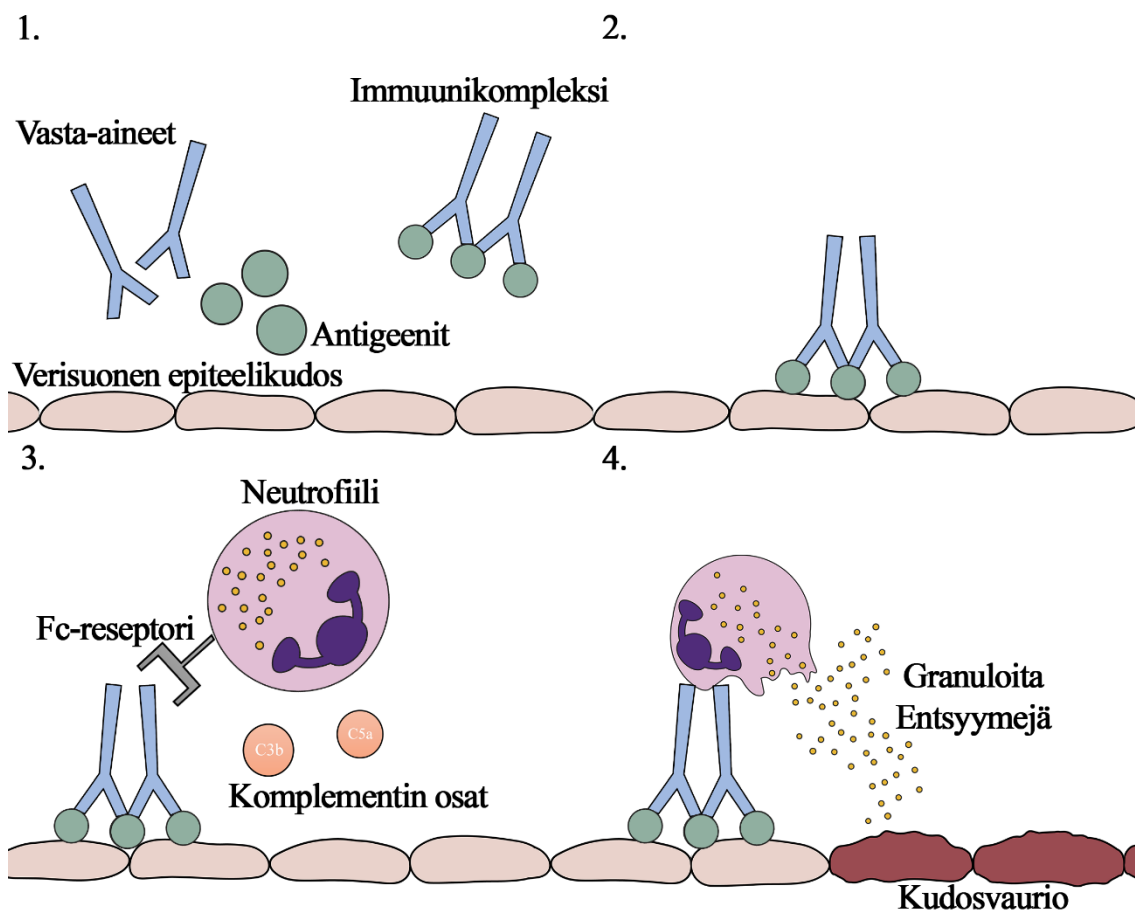
1.2.4.2 Immuunikompleksit ja kiertävät immuunikompleksit (CIC)

Immuunikompleksit ovat yleensä antigeenien, komplementin komponentin ja vasta-aineiden muodostamia komplekseja, jotka ovat sidoksissa toisiinsa spesifeillä ei-kovalenttisilla sidoksilla (Soppi 1992; Owen ja muut 2013). Liukoisten antigeenien päätyessä kehoon, paikalle saapuvat spesifiset vasta-aineet sitoutuvat erilaisiksi komplekseiksi. Muodostuneiden immuunikompleksien ominaisuudet riippuvat monesta kompleksin komponenttien piirteistä, kuten kompleksin antigeenin ja vasta-aineen määrästä, koosta ja valenssista sekä vasta-aine-antigeenisuhteesta. (Yancey ja Lawley 1984; Soppi 1992.) Immuunikompleksit voivat sisältää komplementin osia riippuen kompleksin vasta-aine isotoopista. IgG1-3 ja IgM:stä rakentuvat kompleksit sisältävät varhaisen klassisen reaktiotien komplementin fragmenttia C1q:ta ja IgA:sta rakentuvat kompleksit vaihtoehtoisen reaktiotien C3-fragmenttia. Huonosti komplementtia aktivoivat IgD sekä IgE vasta-aineita sisältävät immuunikompleksit eivät sisällä komplementin osia lainkaan. (Yancey ja Lawley 1984.)

Immuunikompleksien eliminaatiosta on vastuussa retikuloendoteliaalijärjestelmä. Retikuloendoteliaalijärjestelmään kuuluvat kiertävät veren valkosolut sekä imusolmukkeiden, pernan ja muiden elinten kudosten makrofagit. Normaalitilassa muodostuneet immuunikompleksit voivat kulkeutua esim. maksaan punasolujen pintaan (Fc γ -reseptoreihin) kiinnittyneenä, jossa ne eliminoidaan retikuloendoteliaalijärjestelmän toimesta (Aibara ja Ohya 2020; Soppi 1992). Kehossa liikkuvia immuunikomplekseja kutsutaan kiertäviksi immuunikomplekseiksi (CIC). Normaalitilassa kaikkia liukoisessa muodossa olevia CIC:itä ei saada tuhottua, jolloin osa CIC:istä saattaa jäädä kiertämään verisuonistoon. Immuunikompleksien saostuminen tai kiinnittyminen verisuonistoon ei itsessään aiheuta elinvauriota. Kompleksin kiinnittyminen suoniston kudoksiin voi aktivoida komplementin. Aktivaatio aiheuttaa endoteelisoluun kohdistuvan tuhoisan komplementtihyökkäyksen, jota kutsutaan Tyypin III hypersensitiivisyysreaktioksi (Kuva 5.) (Soppi 1992; Usman ja Annamaraju 2020).

Sitouduttuaan endoteelisoluun immuunikompleksit edelleen sitoutuvat syöttösoluihin, kuten neutrofiileihin sekä makrofageihin syöttösolujen Fc-reseptorien avulla aiheuttaen tulehdusvälittäjäaineiden (esim. sytokiinien) sekä vasoaktiivisten välittäjien eritystä. Reaktio edesauttaa verisuoniston seinien permabilisaatiota. (Owen ja muut 2013.) Kompleksit pääsevät kulkemaan rikkoutuneesta seinästä kudokseen, jossa ne tuottavat anafylaktisia kemokiinejä C3b:tä sekä C5a:ta. Paikalle saapuneet kemokiinit houkuttelevat paikalle lisää fagosytoivia soluja. (Soppi 1992; Owen ja muut 2013; Justiz

Vaillant ja Zito 2018.) Kudosvaurio voi aiheutua paikalle saapuneiden solujen vasta-aine välitteisten sytotoksisten mekanismien tai immuunikompleksien poiston seurauksena (Soppi 1992).



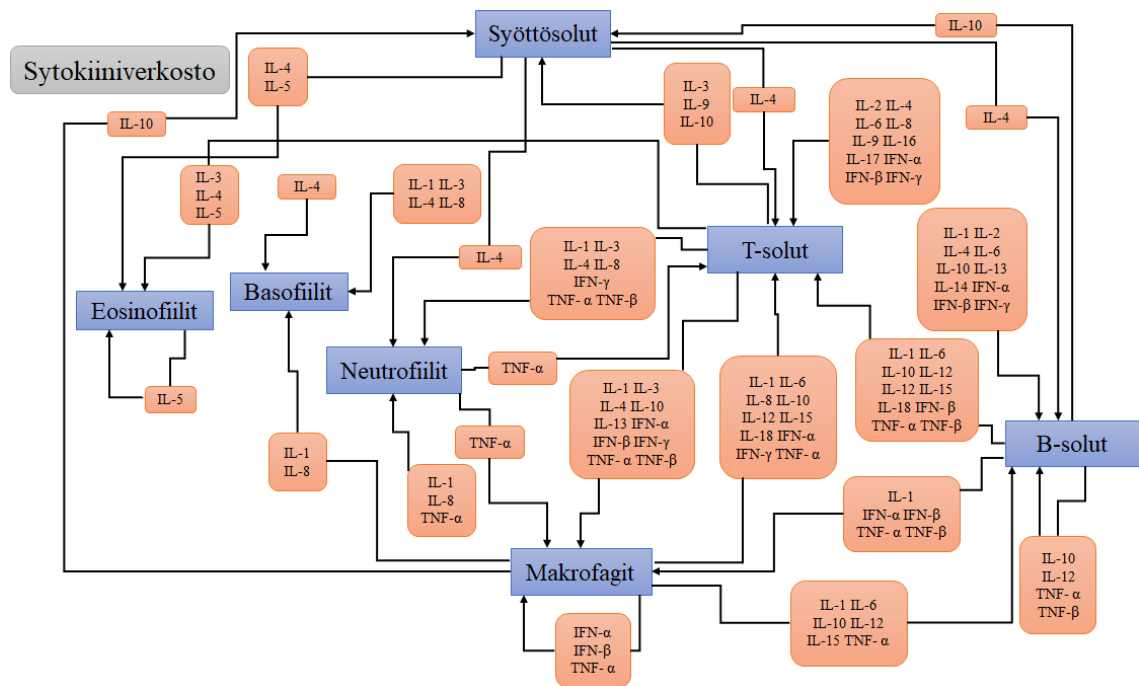
Kuva 5. IgG vasta-aine-antigeeni kompleksin aiheuttama hypersensitiivisyys III reaktio. 1. Immuunikompleksi muodostuu. 2. Kompleksi juuttuu seinään (tai kudokseen) 3. Sitoutuminen aiheuttaa komplementtikaskadireaktion. Neutrofiili tunnistaa epiteeliin kiinnittyneen immuunikompleksin Fc-reseptorin sekä komplementin osien avulla. 4. Neutrofiili sekä komplementin aktivoituminen aiheuttaa tulehdusta. Neutrofiilista erittyy sytotoksisia granuloita sekä entsyymejä, joka johtaa kudosvaurioihin. Kuva piirretty (PhysioPathoPharmaco 2018) mukaan.

Reaktion ja siitä johtuvien vaurioiden vakavuus riippuu immuunikompleksien määrästä, levinneisyydestä ja koosta sekä kehon kyvystä poistaa komplekseja (Owen ja muut 2013). Vasta-aine-antigeeni-suhde vaikuttaa siihen, kuinka hyvin CIC:itä saadaan eliminoitua. Normaalitilassa immuunikompleksit ovat suuria ja ei-liukoissa muodossa. Jos vasta-aine-antigeeni tasapaino kallistuu jommankumman suuntaan, muuttuvat kompleksit pienemmiksi ja liukoiksi. Liukoiset pienet ja keskikokoiset CIC:t pääsevät verenkiertoon ja mahdollistaa CIC:iden mahdollisen kiinnittymisen verisuoniston epiteelikudokseen. (Aibara ja Ohya 2020.) Kiinnittymisen aiheuttamien reaktioiden vahingot voivat edelleen altistaa uusille kudos- ja elinvaurioille. Tyypin III hypersensitiivisyysreaktio on tyypillinen tila taudeissa, kuten seerumisairaudessa, nekrotisoivassa vaskuliitissa, hepatiitissa, malariassa ja paikallisessa arthuksen reaktiossa. (Owen ja muut 2013; Justiz Vaillant ja Zito 2018.)

1.2.4.3 Sytokiinit

Sytokiinit ovat lähes jokaisen solun erittämiä, pieniä (<40 kDa) proteiineja, jotka säätelevät ja vaikuttavat solujen toimintaan sitoutumalla solujen membraaneilla sijaitseviin spesifisiin sytokiinireseptoreihin (Owen ja muut 2013; Kany ja muut 2019). Sytokiinit toimivat solujen välisinä kommunikaatiovälineinä ja ne ovat osatekijöinä solujen tuottaman immuunivasteen synnyssä (Zhang ja An 2007; Kany ja muut 2019).

Sytokiini on yleiskäsite eritettävälle proteiineille. Ne voidaan karkeasti jakaa niiden toimintaan sekä alkuperään perustuen neljään ryhmään; monosyytteissä syntetisoituihin monokiineihin, leukosyyttien tuottamiin interleukiineihin, lymfosyyttien tuottamiin lyfokiineihin sekä kemoaktiivisiin kemokiineihin (Zhang ja An 2007). Sytokiinien toimintaperiaatteet voivat erota valtavasti sytokiinista toiseen. Sytokiineja tuottavat solut voivat sytokiiniensa avulla kommunikoida ja sitä mukaan vaikuttaa autokriinisesti itse itseensä, parakriinisesti lähellä oleviin muihin soluihin tai endokreenisesti kauempana oleviin soluihin (Zhang ja An 2007). Eri mekanismeja omaavat sytokiinit muodostavat monimutkaisen verkoston immuunijärjestelmään solujen kanssa (Kuva 6.). Sytokiinien erittäminen kehoon aiheuttaa immuunijärjestelmässä ylävirtaukseen tapahtuvan reaktion, jossa elimistöön eritetään eri solujen toimesta tulehduksen vastaisia anti-inflammatorisia ja tulehdusta aiheuttavia pro-inflammatorisia sytokiineja samanaikaisesti. Sytokiinien määrä, diversiteetti ja suhde vaikuttaa tulehdusreaktion intensiteettiin sekä kestoon (Owen ja muut 2013; Kany ja muut 2019). Sytokiinien erittäminen vaikuttaa muiden solujen tai itsensä aktivointiin, sytokiinien lisääntymiseen sekä solun pintareseptorien esiintymisen määrään. Toisinaan reaktio voi edetä jopa ohjattuun solukuolemaan. (Owen ja muut 2013.) Tässä tutkielmassa tarkastelun kohteena ovat pro-inflammatoriset TNF- α sekä IL-1 β .



Kuva 6. Sytokiiniverkosto. T-solut, B-solut, makrofagit, syöttösolut, neutrofiilit, basofiilit ja eosinofiilit ohjaavat immuunijärjestelmää, kommunikoiden keskenään sytokiinin avulla. Suuri määrä erilaisia sytokiineja tarvitaan oikeanlaisen tulehdusvasteen muodostumisessa. Piirretty (Zhang ja An 2007) mukaan.

TNF- α (engl. Tumor necrosis factor- α) on TNF superperheeseen kuuluva tulehduksenaiheuttaja sytokiini (Sonar ja Lal 2015). TNF- α :n pääasiallisena lähteenä ovat monosytytilinjan solut, kuten makrofagit, mikroglia, Langerhansin solut, Kupfferin solut, astroglia ja hengitysrakkuloiden makrofagit, mutta sen tuottoa tapahtuu jokaisen muunkin solutyypin epiteelillä (Parameswaran ja Patial 2010; Owen ja muut 2013). TNF- α -sytokiinien pääasiallinen tehtävä on makrofagien toiminnan säätely tulehdusreaktion aikana. TNF- α muihin tehtäviin kuuluu NF- κ B aktivaatio tulehdusreaktiossa, solupintareseptori TNFR1 (engl. Tumor necrosis factor receptor) ja TNFR2 regulaatio apoptoosin aikana sekä SAPKs:än (engl. stress-activated protein kinase) aktivaatio. Tulehdustilan aikana TNF- α :t ovat yksi tulehtuneen kudoksen yleisimmistä sytokiineista. (Zhang ja An 2007.)

Interleukiini-1 oli tutkijoiden ensimmäiseksi havaitsema ei-interferonisytokiini, joka kuuluu 11 jäsenenisen interleukiini-1-perheeseen (Sims ja Smith 2010; Kaneko ja muut 2019). Interleukiini-1 nimen vakiintuminen tapahtui 1980-luvulla sen biologisten aktiivisuuksien todennuksen yhteydessä (Sims ja Smith 2010). Interleukiinit ovat yleisimmin tulehduksen aiheuttaja sytokiineja, muutamia poikkeusisotooppeja, kuten reseptorin säätelijät IL1-Ra, IL-36Ra ja IL-38, sekä tulehduksen vastaista isotooppi IL-37, lukuun ottamatta (Kaneko ja muut 2019). IL-1 sytokiinit eritetään tulehdusreaktion

varhaisessa vaiheessa bakeetriaalisen, viraalin tai parasiittisen antigeenin läsnä ollessa (Owen ja muut 2013).

IL-1 isotoopit IL-1 α ja IL-1 β ovat toistensa lähisukulaisia. Näiden isotooppien biologiset ominaisuudet ovat hyvin lähellä toisiaan jakaen samankaltaisen fysiologisen rakenteen sekä saman reseptorin: IL-1R1 (engl. interleukine 1 type receptor) (Kaneko ja muut 2019). Aminohapposekvenssiltään vain 27 % homologiset IL-1 α ja IL-1 β ovat liuoksissa funktionaalisesti samanlaisia (Kaneko ja muut 2019). Normaalityössä molempia isotooppeja eritetään hyvin vähän kehoon (Owen ja muut 2013). IL-1 α sekä IL-1 β eroavat toisistaan toiminnallisten ominaisuuksien sekä vaikutusympäristöjen perusteella. Aktivoituessaan IL-1 β eritetään verenkiertoon, jossa se vaikuttaa kuumeeseen nousemiseen, kun taas IL-1 α toimii paikallisesti sen tuottajasolun plasmamembraanin lähettyvillä osallistuen T-solujen kontaktihypersensitiivisyyteen (Sims ja Smith 2010).

IL-1 β on pääasiassa monosyyttien ja makrofagien erittämä sytokiini. Toisinaan fibroblastit ja epiteelisolut voivat toimia sytokiinin tuottajina soluvaurion, infektion, invaasion sekä tulehduksen aikana. (Zhang ja An 2007.)

Komplementtisysteemin tapaan sytokiinien säätely on hyvin tarkka toimenpide. Säätelyssä tapahtuneet virheet, kuten sytokiinien liika- tai vajaatuotanto, voi johtaa vaarallisiin terveystiloihin. Sepsiksessä kehoon on infektion seurauksena tuotettu liian paljon sytokiineja. Liikatuotannon aiheuttama tulehdustila voi johtaa elinvaurioihin, ja jopa lähes aina kohtalokkaaseen septiseen shokkiin. (Gyawali ja muut 2019.)

1.3 Immunologisten vasteiden mittaaminen kosteusvauriotutkimuksissa

Ihmisen immunologisia vasteita on helpointa tutkia verestä, jossa suurin osa immunologisista proteiineista sijaitsee. Viitearvoihin verrattuna koholla olevat tasot voivat kertoa immuunijärjestelmän aktivaatiosta ja edelleen käynnissä olevista immuunireaktioista.

Keuhkot ovat yksi tärkeimmistä immunologisista elimistä. Niiden vaurioituminen vaikuttaa huomattavasti koko puolustusjärjestelmään. Kohonneet immunologiset arvot voivat viitata mikrobivaurioiden vaikuttaneen negatiivisesti ihmisen keuhkoputkiin liittyvän imukudoksen (engl. bronchus associated lymphoid tissue, BALT) toimintaan (Atosuo ja muut 2020a). Immunitetin vajaatoiminta tai epätasapaino voi johtaa allergioihin, kroonisiin hengitysteiden infektioihin tai keuhkokudoksissa

immunopatologiaan. Immunologisista vasteista tutkimuksen kiinnostuksen kohteina ovat veren seerumissa sijaitsevat Ig:t, komplementtisysteemi, CIC:t sekä sytokiinit.

Vasta-aineita tarkasteltaessa, kohonneet IgE-arvot voivat olla merkki allergisesta reaktiosta, kun taas kohonneet IgM-arvot voivat kertoa komplementtijärjestelmän aktivaatiosta. IgM:n erityis verenkiertoon ei kerro suoraan minkään infektion alkamisesta tai sairauden kehittymisestä. IgM-vasta-aineiden läsnäolo seerumissa voi olla jäännös jo eliminoidusta patogeenistä, sillä kauan elävät plasmasolut voivat tuottaa vasta-aineita vielä viikkoja patogeenin poistamisen jälkeen. IgM:ien puuttuminen seerumista voi myös kertoa patogeenille altistumattomuudesta tai henkilön immuunivajeesta. (Sathe ja Cusick 2020.)

Koholla olevat CIC-tasot voivat olla merkki klassisen komplementtireaktiotien aktivaatiosta. CIC:den muodostuminen on olennainen osa klassisen immuunivasteen synnyssä, jonka vuoksi CIC-tasojen kohonneisuus voi olla merkki systeemisestä TH1-tyypin tulehdustilasta. Kohonneet CIC-määrät voivat johtaa tyypin III hypersensitiivisyysreaktioon ja sitä mukaan kudonvaurioihin. (Yancey ja Lawley 1984.)

Sytokiinien erittyminen vereen on usein merkki tulehduksen käynnistymisestä. Sytokiinien tuotanto määrää tulehdusreaktion vakavuudesta. Tutkimuksessa mielenkiinnon kohteena olevat sytokiinit IL-1 β sekä TNF- α kuuluvat synnynnäiseen immunitettiin ja ovat molemmat tulehdustekijöitä. (Owen ja muut 2013). Neuroimmunologiassa on todettu IL-1 β tuotannon aiheuttavan TNF- α -tuotantoa sekä saman reaktion tapahtuvan toiseen suuntaan (Leal ja muut 2013). Useimmissa tulehdustilanteissa, joissa reaktio vaatii IL-1 β , on myös TNF- α mukana.

Suurin ongelma immunologisten vasteiden tutkimuksessa on niiden alkuperän jäljittäminen. Tutkittaessa kosteusvauriokohteissa oleskelleita henkilöitä, veren kohonneet immunologiset vasteet eivät suoraan osoita, minkä takia vasteet ovat koholla. Verrokkiryhmään verrattuna kohonneet tulehdusvälittäjäaineet voivat kertoa käynnissä olevasta matalasta tulehdustilasta, jonka syynä voi olla kosteusvauriokohteiden mikrobikasvustojen lisäksi lähes mikä tahansa terveydellinen haitta. Toiseksi ongelmaksi nousee toissijaisen näytetyypin käyttö. Sisäilman haittamikrobeille altistuminen tapahtuu lähes poikkeuksetta hengitysteiden kautta. Keuhkonäytteiden keräämiseksi koehenkilöille pitäisi tehdä keuhkolavaatio, jota ei sen invasiivisen luonteen vuoksi yleensä tehdä.

1.3.1 ELISA menetelmät

Immunologisten vasteiden mittaaminen verestä onnistuu nykyteknologialla helposti ja nopeasti. Arvojen mittaamiseen on kehitetty useita määrittämenetelmiä, joista yksi suosituimmista on entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys (engl. enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). ELISA on immunodiagnostiikassa käytetty menetelmä, jolla voidaan tutkia näytteiden komponentteja kvalitatiivisesti ja kvantitatiivisesti. Yleisesti kaikkia testejä, joissa käytetään entsyymejä vasta-aine-antigeenisidosten määrittämiseen, kutsutaan entsyymi immunotesteiksi (engl. enzyme immunoassay, EIA). (Aydin 2015.) ELISA-määrittäyksillä näytteistä tarkasteltavia analyyttejä ovat vasta-aineet, antigeenit, hormonit ja proteiinit (Alhajj ja Farhana 2021).

ELISA-määrittäykset voivat olla hyvin tarkkoja, sillä testissä hyödynnetään immuunijärjestelmässä muodostuvia spesifisiä vasta-aineita. Spesifisten vasta-aineiden on lähes mahdotonta sitoutua muuhun kuin omaan antigeeniinsä (Aydin 2015). Hyvin optimoidussa määrittäyksissä käytetään tiedettyjä vasta-aineita tai antigeenejä. Tällöin määrittäyksessä tapahtuva sitoutumisreaktio tapahtuu juuri halutulle analyyttille. (Xiao ja Isaacs 2012.) Lähtöaineista tuloksiin voidaan päästä jo parissa tunnissa riippuen käytetyn protokollan monimutkaisuudesta sekä käytettävissä olevista laboratoriolaitteista. Kuten muissakin testeissä, voidaan ELISA-määrittäykselle määrittää spesifisyys ja sensitiivisyys.

ELISA-määrittäykset voidaan jakaa neljään eri luokkaan; suoraan, epäsuoraan, sandwich ja kilpailulliseen ELISA-määrittäykseen (Alhajj ja Farhana 2021). Jokaisella luokalla on sille ominaisia etuja ja joillain myös haittoja (Taulukko 3.). Tutkimuksen suunnitteluvaiheessa on päätettävä, mikä ELISA-määrittäys luokka olisi sopivin tutkimustarkoituksia ajatellen.

Taulukko 3 ELISA-määrittystyypit, niiden havaitsemat aineet, edut ja haitat.

ELISA-määrittäminen on valittava tehtävän tutkimuksen mukaan. ELISA-tyypit detektoivat eri analyyttejä. Tyypeillä on omat etunsa ja haittansa.

ELISA-tyyppi	Detektoitava aine	Edut	Haitat
Suora	Vasta-aine	Alhainen herkkyys	Mahdollisuus false-positive tulokseen
Epäsuora	Vasta-aine/ antigeeni	Korkea herkkyys	Immobilisaatio epäspesifistä
Sandwich	Antigeeni	Erittäin korkea herkkyys	-
Kilpaileva	Vasta-aine	Korkea herkkyys	-

1.3.1.1. Historia

ELISA-menetelmä kehitettiin 1971 vaihtoehtoiseksi työkaluksi RIA-määrittämiselle (engl. radio immunoassay) ja se on siitä lähtien ollut yksi maailmanlaajuisesti käytetyimmistä diagnostisista menetelmistä (Aydin 2015). ELISA-määrittämisien suosio on kasvanut vuosi vuodelta. Menetelmää käsittelevää kirjallisuutta on keräytynyt ScienceDirectin tietokantaan 1591 kappaletta 2004 vuoteen mennessä, ja pelkästään vuonna 2020 ELISA:a käsitteleviä tutkimusartikkeleita löytyi 18 329 (Crowther 2009; ScienceDirect 2021).

ELISA-menetelmiä käytetään nykyään kliinisten tautien vahvistukseen, immunologisten vasteiden määrittämiseen, antigeenien vertailuun, monoklonaalisten vasta-aineiden tarkkailuun, novellien systeemien kehittämiseen, ruoka-analyysiin ja moneen muuhun menetelmään (Crowther 2009).

1.3.1.2 Mittaaminen

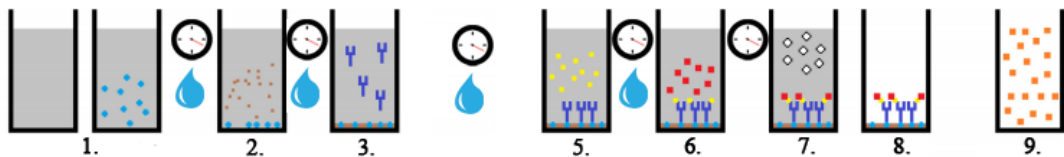
ELISA-määrittäminen suoritetaan jokin kiinteä faasi. Kiinteänä faasina usein käytetään jotain muovista, kuten polystyreenistä mikrotiitterilevyä, jolla on vahva vasta-aineen sitomiskyky (Crowther 2009). Levy muodostuu kymmenistä satoihin vierekkäisistä pienistä kuopista, joita kutsutaan kaivoiksi. Yleisin käytetty levy on ns. 96-mikrotiitterilevy, jossa kaivot ovat 8x12 asetelmassa (Crowther 2009). Kaivojen määrä,

muoto, materiaali, väri ja tilavuus vaihtelevat määrittämisen tarkoituksen ja tarpeen mukaan (Auld ja muut 2004).

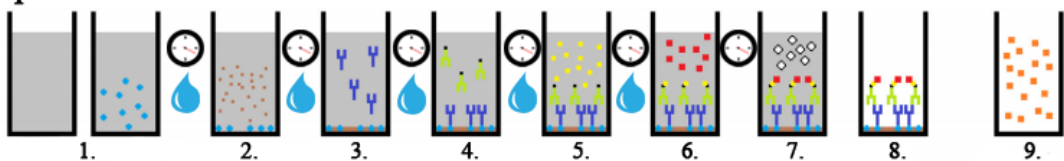
Valitun kiinteän faasin lisäksi muut määrittämiin tarvittavat komponentit riippuvat suoritettavasta ELISA-määrittämisen tyypistä. Tarvittaviin komponentteihin voi kuulua spesifinen primääri, ja/tai sekundääri detektio-aine, analyysi tai antigeeni, pesupuskuri, substraatti sekä blokkaus- ja pysäytysliuos (Crowther 2009; Alhajj ja Farhana 2021).

Niin kuin määrittämiseen tarvittavat reagenssitkin, ELISA-määrittämisen vaiheet ovat testikohtaisia. ELISA-määrittämisen suurpiirteiset ääriarvot perustuvat testien päälukkiin (Kuva 7.). Määrittämissä muodostuu tornimainen pino reaktioon osallistuvista reagensseista, jotka loppujen lopuksi antavat mitattavaa havaittavaa signaalia.

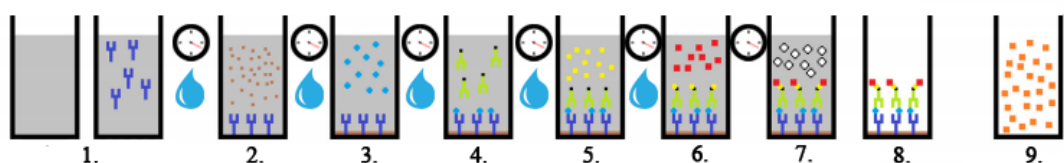
A) Suora ELISA



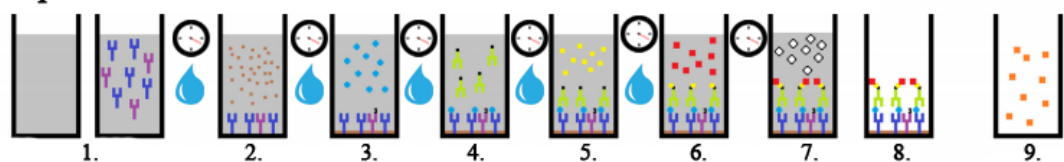
B) Epäsuora ELISA



C) Sandwich ELISA



D) Kilpaileva ELISA



Pesu Inkubaatio

Vasta-aine Vasta-aine Antigeeni Antigeeni Blokkaus Entsyymi
 Konjugaatti (Biotinyloitu) Tuote Substraatti Reaktiion pysäyttäjä

Kuva 7. Erilaiset ELISA-määrittämiset ja niiden esimerkki vaiheet. ELISA-määrittämiset tehdään niiden tyypille ominaisessa järjestyksessä. ELISA-määrittämisen vaiheet ovat seuraavat: 1. Kaivojen päällystäminen primääri vasta-aineella tai antigeenillä 2. Kaivojen blokkaus 3. Näytteen lisäys 4. Konjugaatin lisäys 5. Entsyymien lisäys 6. Biotinyloituneen konjugaatin lisäys 7. Reaktiion pysäyttäjän lisäys 8. Kaivojen analysointi 9. Tuote. Vaiheet selitetty tekstissä. Vaiheiden välillä suoritetaan tarkoituksenmukaisia inkubaatio- ja/tai pesutaukoja. Muokattu kuvasta (Aydin 2015).

Määrittäminen aloitetaan valitun kiinteän faasin kaivojen pohjien päällystämällä. Päällystäminen tehdään yleensä primäärillä vasta-aineella tai antigeenillä (Alhajj ja Farhana 2021). Reagenssin sitoutuminen reaktiopinoon ei tapahdu heti lisäyksen jälkeen. Tämän vuoksi ELISA-määrittäminen vaiheiden välillä on inkubaatiotaukoja, jonka yhteydessä kaivot ”pestään”. Pesu tehdään joko käsin pipetoimalla tai kaivonpesulaitteella, joka automaattisesti lisää ja poistaa pesupuskurin kaivoista. Pesupuskuri pesee kaivoista viime vaiheessa käytetyt sitoutumattomat reagenssit kuivaamatta tai kontaminoimatta kaivossa tapahtuvaa määrittämisreaktiota (Crowther 2009). Pesupuskurina yleisesti käytetään jotain neutraalia nestettä kuten PBS:ää (engl. phosphate-buffered saline). Inkubaation ajaksi mikrotiiterilevy voidaan asettaa levyn heiluttajaan ja/tai lämpökaappiin reaktion nopeuttamiseksi.

Toisinaan kaivojen päällystämättömäksi jääneet aukot blokataan BSA:lla (engl. bovine serum albumin). BSA estää kaivon pohjaan tapahtuvan epäspesifisen sitoutumisen (Xiao ja Isaacs 2012). Blokkauvaiheen hyödyistä on käyty tiedeyhteisössä keskustelua. Toisten tutkimusten mukaan vaihe on valinnainen tai kokonaan turha. (Ahirwar ja muut 2015.)

Blokkauvaiheen jälkeen kaivoihin lisätään näytemateriaalia, josta toivotaan löytyvän kohdeanalyyyttiä. Näytteet analysoidaan duplikaatteina minimoiden näin kontaminaation riskin. Duplikaateista lasketaan keskiarvo, jota käytetään lopullisissa laskelmissa. Näytteiden lisäyksen, inkubaatio- ja pesuvaiheen jälkeen kaivoihin lisätään konjugaatti, joka sitoutuu analyyytiin. Konjugaattiin on yhdistetty leima-aine, johon entsyymi on jo sitoutunut tai pystyy sitoutumaan.

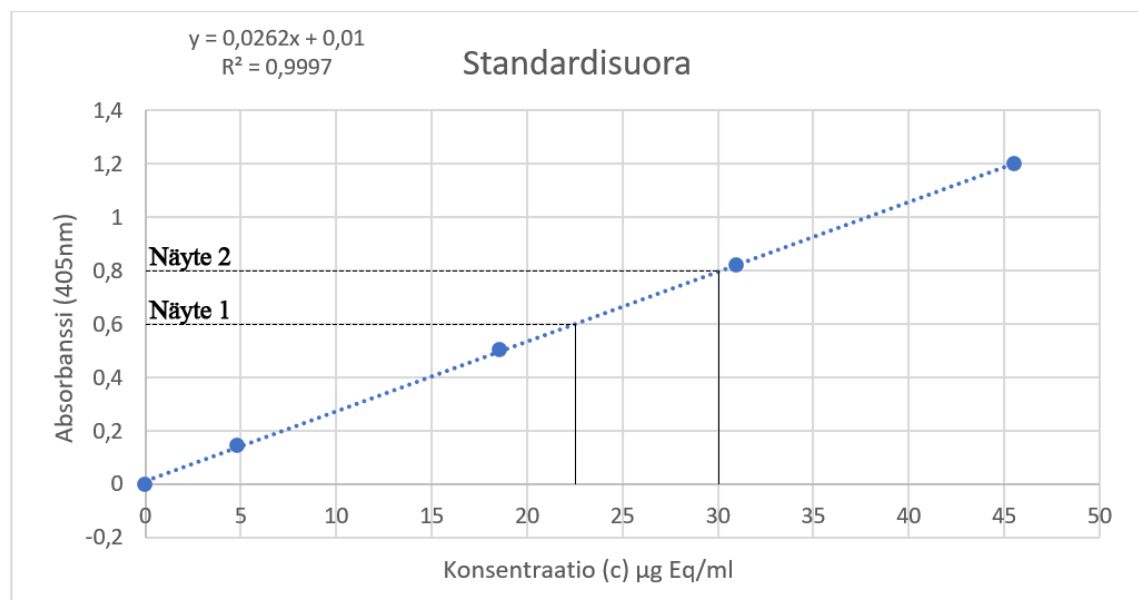
Entsyymi aktivoituu seuraavaksi lisättävän substraatin toimesta. Yleisesti käytetyt entsyymit ovat HRP (engl. Horseradish peroxidase/horseradish) sekä AP (engl. Alkaline phosphatase). Entsyymit voidaan aktivoida eri substraateilla esimerkiksi HRP aktivoituu TMB:n (engl. 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine) tai ABTS:n (engl. 2,2'-Azinobis [3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid]-diammonium salt) avulla luoden värireaktiota. (Crowther 2009.)

Absorptiohavainnointi voidaan suorittaa ELISA-levylukijalla, joka toimii spektrofotometrillä tai luminometrillä määrittämisestä riippuen. Spektrofotometrillä lukija havaitsee sitoutuneen konjugaation luoman värienvaihdoksen määrällisesti mitattavana absorptiona määritetyllä havaittavalla aallonpituudella. Havaitsemisallonpituus voi vaihdella 400-600nm välillä riippuen käytetystä konjugaatista (Aydin 2015). Kun reaktiossa käytetään HRP:tä, substraattina käytetty TMB toimii 450nm aallonpituudella

ja ABTS 410nm aallonpituudella. Absorptio mitataan näytteistä näiltä aallonpituuksilta. Absorption määrä on suoraan verrannollinen kaivoissa olevan analyytin määrään.

Mitattuja absorptiomääriä vertaillaan yleensä tiedettyihin standardeihin (Taulukko 4.). Kaupallisten kittien mukana yleensä saapuu standardeja, jotka mitataan samalla mikrotiiterilevyllä kuin näytteet. Jos ELISA-määritys on oma kehitteinen, standardina voidaan käyttää jotain yhtä näytettä, jonka mitattuun arvoon vertaillaan muita näytteitä. Standardien lisäksi näytelevyllä on hyvä ajaa ns. 0-näyte, johon ei lisätä yhtään primääriä vasta-ainetta tai antigeeniä. Tämä tyhjä kaivo antaa taustasignaalin (engl. background, BG), joka poistetaan kaikkien kaivojen signaaleista analysointivaiheessa.

Tiedetyistä standardeista luodaan standardisuora, josta voidaan laskea standardiyhtälö. Näytteistä saatu absorbanssi arvo sijoitetaan tähän yhtälöön, jolloin signaali voidaan muuttaa standardeihin vertailtavaksi yksiköksi esim. $\mu\text{g Eq/ml}$.



Kuvaaja 1. Esimerkki ELISA-määrityksen analyysivaiheessa muodostetusta standardisuorasta. Kuvaajan vasemmassa yläkulmassa sijaitsee standardien pisteiden muodostaman suoran yhtälö, johon sijoittamalla näytteistä havaitut absorbanssiarvot saadaan tuntemattoman näytteen sisältämän analyytin konsentraatio.

Taulukko 4 Kuvaajan 1. arvot ja lasketut absorbansit.

Taulukko sisältää kuvaajassa käytetyt standardit, absorbanssin sekä korjatun absorbanssin, jossa lasketusta arvosta on poistettu taustanäytteestä saatu absorbanssi. Lisäksi taulukossa näytteet 1 ja 2, jotka on merkitty kuvaajaan 1.

Standardi	konsentraatio (c) $\mu\text{g Eq/ml}$	Absorbanssi - BG	Absorbanssi (405nm)
A	0	-0,002	0,072
B	4,8	0,144	0,218
C	18,5	0,504	0,578
D	31	0,818	0,892
E	45,5	1,199	1,273
Näyte 1	22,52	0,6	0,674
Näyte 2	30,15	0,8	0,874
BG	-	0	0,074

2. TYÖN TAVOITTEET JA TUTKIMUSKYSYMYKSET

Tämän tutkimuksen tavoitteena on aiemman tutkimuksen (Atosuo ja muut 2020b) aineistoja ja menetelmiä hyödyntäen tutkia kosteusvauriomikrobeille altistumisen vaikutusta IgE ja IgM-luokan vasta-aineiden tuotantoon sekä immuunikompleksien ja sytokiinien tasoihin. Voidaanko näitä arvoja mittaamalla erottaa esim. vauriokohteissa altistuneita potilaita altistumattomista?

Tutkimuksessa käytettiin antigeeninä aikaisemmin mainittujen mikrobien *A. versicolor* ja *S. albus* lisäksi *P. expansum*:ia. Valitut mikrobilajikkeet ovat kaikki haittamikrobeja, joita voidaan havaita kosteusvaurioituneissa rakennuksissa (Reponen ja muut, 1998; Engelhart ja muut 2002; Nielsen, 2003; Salo ja muut, 2019).

Tutkimuskysymys 1: Ovatko mikrobivaurioille altistuneiden henkilöiden IgE- ja IgM-tasot kohonneet verrattuna referenssiryhmään?

Tutkimuskysymys 2: Saadaanko IgE -menetelmän herkkyys sille tasolle, että näiden mittaaminen seerumista on mahdollista?

Tutkimuskysymys 3: Testihenkilöillä, joilla oli havaittu ryhmätasolla merkitsevästi kohonneita haittamikrobispesifisiä IgG-tasoja, (Atosuo ja muut 2020b) oli lisäksi havaittu ryhmätasolla epäspesifisesti kohonneet komplementin klassisen reaktiotien aktiivisuutta *Escherichia coli-lux* (*Escherichia coli* K-12 pEGFP_{lux}ABCDEAmp) (Atosuo ja Lilius 2011; Atosuo ja muut 2021) -antigeeniä vastaan. Johtuiko tämä epäspesifisempi komplementti aktiivisuus seerumin *E. coli*-spesifisistä IgM-luokan vasta-aineista, jotka myös aktivoivat komplementtisysteemiä? Ovatko IgM-tasot kohonneet verrattuna referenssiryhmään?

Tutkimuskysymys 4: Löytyykö testiryhmältä korkeampia kiertävien immuunikompleksien ja/tai sytokiini tasoja verrattuna referenssiryhmään.

Näytteistä mitataan veren kokonais- (totaali) IgE, *E. coli-lux* IgM, ja *S. albus*-, *P. expansum*- sekä *A. versicolor*-lajien itiöspesifinen IgE-arvot sekä sytokiini ja immuunikompleksi tasot. Ig-tasoja verrataan altistumattoman referenssiryhmän tasoihin. Sytokiini sekä immuunikompleksi tasoja verrataan tiedettyihin, kittien mukana tulleisiin standardeihin.

Tutkimuksen tarkoituksena on saada parempi käsitys haitallisten mikrobien vaikutuksesta ihmisten hyvinvointiin sekä kehittää menetelmiä, joilla altistuneiden henkilöiden puolustusjärjestelmässä tapahtuneita muutoksia voitaisiin havainnoida. Saatujen tulosten

ja menetelmien avulla pyritään edelleen tutkimaan, miten sisäilmavauriot vaikuttavat terveyteen ja miten vaikutuksia pystyttäisiin korjaamaan, lievittämään tai ennalta ehkäisemään.

3. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

3.1 Tutkimusmateriaalit

Rakennukset ja seeruminäytteet

Vauriokohderakennukset ja niissä olleet mikrobikasvustot oli tutkittu ulkopuolisten asiantuntijoiden toimesta. Mikrobivahingot oli arvioitu mikrobiviljemillä, joiden perusteella kaikista vauriokohteista löytyi *S. albus* ja *A. versicolor* lajeja. Vauriokohteesta myös löytyi *P. expansum*:ia. Vertailurakennuksista ei löydetty mikrobivaurioita.

Työssä käytetyt seeruminäytteet (197 kpl) oli kerätty klinisen tutkimusyksikkö TROSSIn tutkimuksien yhteydessä, Länsi- ja Etelä-Suomessa mikrobivaurioituneissa rakennuksissa työskenteleviltä vapaaehtoisilta koehenkilöiltä. Vertailumateriaalina käytettiin vaurioitumattomissa tiloissa työskentelevien vapaaehtoisten henkilöiden seeruminäytteitä (89 kpl) (Taulukko 5.).

Taulukko 5. Tutkimuksessa käytettyjen kohteiden määrä sekä yksilöjakauma.

Taulukkoon on kerätty tutkimuksen kohderakennukset, niiden mikrobivaurioitumis tilat ja kohteessa oleskelleiden tutkimukseen osallistuvien koehenkilöiden määrä.

Altistunut	Kohde	Yksilömäärä	Altistunut	Kohde	Yksilömäärä
Kyllä	Kohde 1	43	Ei	Kohde 6	59
	Kohde 2	45		Kohde 7	12
	Kohde 3	51		Kohde 8	11
	Kohde 4	32		Kohde 9	7
	Kohde 5	26			
	Yhteensä	197		Yhteensä	89

Viitenäytteinä käytettiin kahden vapaaehtoisen aikuisen seeruminäytteitä. Viiteyksilöt olivat terveitä, vapaaehtoisia henkilöitä, jotka eivät kuuluneet tutkimusotantaan. Seerumien keräyksessä ja säilytyksessä noudatettiin samaa protokollaa kuin Atosuo ja muut (2020).

3.2 Itiöiden kasvatust

S. albus-itiöt kasvatettiin maljoilla mannitol-agarissa ja *A. versicolor* sekä *P. expansum* mallasagarissa (Aínsa ja A. 2010).

Steriloidulla vedellä hydratoidut kasvustot kerättiin kasvatusmaljoilta kaapimalla muovikeräysastioihin talteen, jonka jälkeen kasvustojen soluseinät sonikoitiin rikki vesihauteessa. Ylimääräinen mikrobikasvusto, kuten rihmasto, karsittiin pois suodattamalla steriloidun puuvillan lävitse. Suodatetusta kasvatuksesta sentrifugoitiin 10 min 20 000 rpm, supernatantti poistettiin ja jäljelle jäänyt pelletti suspentoitiin glyseroliin. Valmistuneet itiöstokit pakastettiin myöhempiä ELISA-määrytyksiä varten.

Villi tyypin *S. albus* -kanta oli lahjoitus Turun yliopiston biokemian laitoksen Antibiotic Biosynthetic Engineering ryhmältä, ja *A. versicolor* SL/3-kanta Turun Yliopiston Aerobiologisen laitokselta.

3.3. Seerumin totaali IgE -määrytykset

Seeruminäytteistä mitattiin totaali-IgE ELISA-määrytyksellä. Testaus aloitettiin sopivan seerumipitoisuuden valinnalla. Koenäytteet laimennettiin 23 laimennoksen laimennossarjaksi mikrotiitterilevyille. Laimentaminen aloitettiin 50 % seerumi-PBS konsentraatiosta, jonka jälkeen seuraava näyte laimennettiin kolmannekseen (50 %, 16,7 %, 5,56 %, 1,85 %...). Näytelevyt päällystettiin parafilmillä ja annettiin inkuboitua yön yli 5°C.

Seuraavana päivänä näytelevyt pestiin kolme kertaa PBS-Tween20 pesunesteellä (Sigma, Aldrich, Missouri, USA) (2,5 % Tween20). Kaikissa pesuissa käytettiin samaa pesunestettä. Pesun jälkeen kaivot blokkattiin 1 % BSA/PBS-liuoksella, jota inkuboitiin kaivoissa 2 h huoneen lämmössä (20°C). Kaivot pestiin, jonka jälkeen kaivoihin lisättiin sekundääri IgE-HRP/PBS laimennosta (kahta eri konsentraatiota testattiin 1/2000 (0,75 µl/ml) sekä 1/4000 (0,375 µl/ml)) (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, U.S) ja inkuboitiin 1 h huoneen lämmössä. Värireaktio saatiin aikaiseksi lisäämällä HRP substraatti ABTS:llä (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, U.S). Inkuboinnin jälkeen levyistä mitattiin 420 nm alueelta absorbanssi HIDEX mikrolevylukijalla (HIDEX, Turku, Finland). Saaduista arvoista vähennettiin taustanäytteestä saadut arvot.

Kahdelle uudelle sekä kahdelle jo analysoidulle näytteelle tehtiin uusi totaali IgE-määrytys. Laimennossarjat aloitettiin tällä kertaa 100 % seerumista, jonka jälkeen näytettä laimennettiin aina 2/3-konsentraatioon edellisestä näytteestä (100 %, 66,7 %, 44,4 %...). Näytteiden annettiin inkuboitua yön yli 5°C.

Näytteisiin lisättiin konjugaatti IgE-HRP/PBS 0.75 µl/ml (Invitrogen). Värireaktiota varten kaivoihin lisättiin ABTS (Thermo Fisher Scientific) kuten edellä ja mitattiin 420

nm alueelta absorbanssi HIDEX mikrolevylukijalla (HIDEX). Saaduista arvoista vähennettiin BG.

3.4 *E. coli-lux* kasvatusta ja ELISA levyn valmistelu

Näytteiden *E. coli* spesifistä IgM-vastetta mitataan käyttäen *E. coli-lux* ELISA-antigeeniä. *E. coli-lux* kasvatettiin pakkaspreparaatista (Atosuo ja muut 2020a) erlenmeyer pullossa. Pulloon lisättiin *E. coli-Lux*-pakastepreparaattia, kasvatusmedium LB:tä (engl. Lysogeny broth) sekä 100 ug/ml ampicilliinia selektiopaineen ylläpitämiseksi. Kasvatus suoritettiin 37°C kevyesti sekoittaen. Kun OD₆₂₀ arvo ylitti 0,4 OD, kasvatus lopetettiin ja *E. coli-lux* sentrifugoitiin 20 000 rpm 10 min. Pelletti resuspenoitettiin 1x PBS:ään niin, että saatiin laskennalliseksi OD₆₂₀=1. *E. coli-lux*-PBS suspensiota lisättiin mikrotiitterilevyjen kaivoihin, inkuboitui yon yli 4°C ja pestiin suspensio pois kolme kertaa pesunesteellä. Pestyt mikrotiitterilevy suojattiin parafilmillä ja muovipusseilla, ja pakastettiin -20°C myöhempää käyttöä varten.

3.5 *E. coli-lux* spesifinen vasta-ainemääritys ELISA:lla

Päällystettyihin ELISA-levyihin lisättiin näytteserumilaimennoksia duplikaatteina vierekkäisiin kaivoihin, joita inkuboitui 1 h huoneen lämmössä. Kaivot pestiin ja lopuksi kuivattiin kopauttamalla muutaman kerran varovasti imukykyistä paperia vasten.

Konjugaattina ELISA-testeissä käytettiin 1,5 µg/ml IgM spesifistä IgM-HRP sekundääriavasta-ainetta (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, U.S). ELISA määrityksessä käytettävä konjugaattikonstentraatio määritettiin valmistelevisissä testeissä. Mikrotiitterilevyihin lisättiin konjugaattilaimennosta ja annettiin inkuboitua 1 h huoneen lämmössä. Tämän jälkeen levyt pestiin.

Värireaktio (vihreä) saatiin lisäämällä HRP:n substraatti ABTS (Thermo Fisher Scientific). Inkuboitujen kaivojen absorbanssi mitattiin alueelta 420 nm HIDEX mikrolevy lukijalla (HIDEX). Rinnakkaisnäytteiden absorbanssiarvojen keskiarvoja ja keskihajontaa verrattiin samanaikaisesti ajettuihin vertailunäytteisiin. Saaduista arvoista poistettiin BG. Absorbanssin suuruus on verrannollinen sitoutuneiden seerumin immunoglobuliinien määrään. Verrokkiyksilön OD tulos merkittiin testikohtaisesti arvolla 1, johon saatujen testihenkilöiden mittausarvot suhteutettiin. Lopputuloksena oli eri testikertojen välillä keskenään vertailukelpoisia tuloksia.

Näytteiden analysointi ja mittaus suoritettiin monella eri mittauskerralla ja mittauslevyllä. Jokaisen mittauskerran mukana oli näytteserumeiden joukossa saman verrokkihenkilön seerumia.

3.6 C3 ja C1q aktivaatiofragmenttia sisältävien CIC:iden kvantitatiivinen mittaus seeruminäytteistä

Vauriokohteessa oleskelleilta henkilöiltä mitattiin veren seerumi C3- ja C1q-komplementtfragmentteja sisältävien CIC:n määriä MicroVue CIC-Raji cell replacement EIA- sekä MicroVue CIC-C1q-kittien avulla (MicroVue, Hannover, Germany). CIC-RAJI-kitti mittasi aktivoituneiden komplementti komponentin C3:n fragmentteja iC3b, C3dg ja C3d sisältäviä CIC:itä. CIC-C1q mittasi komplementin C1q:n fragmentteja sisältäviä CIC:itä.

Kitin ohjeiden mukaisesti levyjen absorbanssi mitattiin alueelta 405 nm HIDEX mikrolevylukijalla (HIDEX). Saatuja tuloksia verrattiin kitin mukana tulleiden standardien OD-arvojen mukaan muodostettuun standardisuoraan.

3.7. TNF- α sekä IL-1 β mittaus seeruminäytteistä

Vauriokohteessa oleskelleilta henkilöiltä mitattiin seerumissa olevien TNF- α sekä IL-1 β sytokiinien määriä Elabscience Human TNF- α ELISA- kitin (E-EL-H0109, Elabscience, Wuhan, Kiina) sekä Elabscience Human IL-1 β ELISA- kitin (E-EL-H0149, Elabscience, Wuhan, Kiina) avulla.

Testeillä käytetty seerumikonsentraatio määritettiin laimennossarjan avulla. Kitin ohjeiden mukainen 100 % seerumikonsentraation määritettiin olevan optimaalinen testeille.

Tehtyjen kittien näytteiden absorbanssi mitataan alueelta 405 nm HIDEX mikrolevylukijalla (HIDEX). Absoluuttiset konsentraatiot (pg/ml) määriteltiin standardinäytteistä tehdyn standardisuoran perusteella.

3.8 Datan käsittely

Saatu data analysoitiin ja käsiteltiin Excel-ohjelman eri versioilla (Microsoft, Redmond, Washington, USA). Lopulliset analyysit tehtiin tilasto-ohjelma SPSS versio 25:lla (IBM, New York, Yhdysvallat). Analysoitu data mallinnettiin Excel-ohjelmalla sekä Origin:lla (Microcal, OriginLab, Massachusetts, Yhdysvallat).

4. TULOKSET

4.1. Totaali IgE sekä itiöspesifiset IgE ELISA-mittaukset

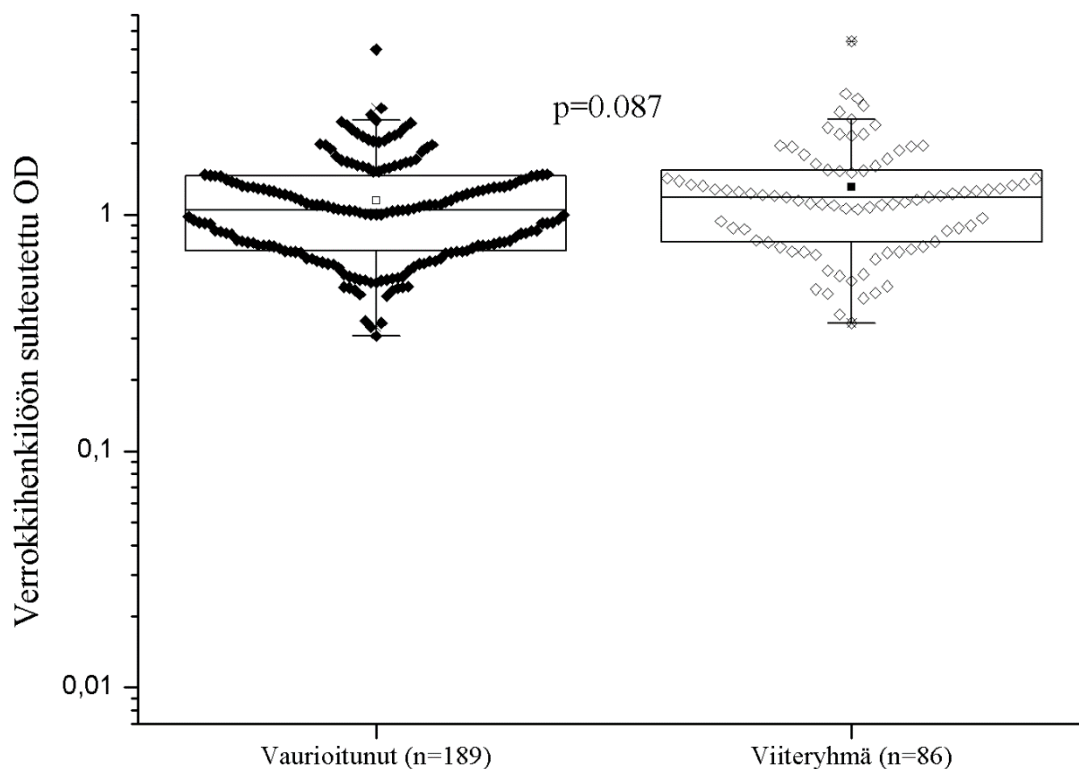
Testatuista näytteistä ei kyetty määrittää oikeaa IgE-konsentraatiota. Epäsuotuisten totaali-IgE tuloksien vuoksi itiöspesifisiä *S. albus*, *A. versicolor* sekä *P. expansum* IgE mittauksia ei jatkettu tästä eteenpäin.

4.2. *E. coli-Lux* spesifisen IgM ELISA-mittaukset

E. coli-lux-IgM-ELISA määrittämisessä vertailtiin kosteusvauriokohteissa sekä vaurioitumattomissa vertailukohteissa oleskelleiden henkilöiden *E. coli-lux* itiöspesifisiä IgM-vasta-aine tasoja. IgM-standardeja ei ollut käytössä, joten kaikkien näytteiden $A_{420\text{nm}}$ arvoja vertailtiin tutkimusmateriaalin ulkopuolisen verrokkiyksilön arvoon. OD-lukemia vertailtiin ryhmien välillä (Kuvaaja 2.).

Mittauksia suoritettiin yhteensä 275 näytteelle, joista 189 oli mikrobivaurioille altistuneiden yksilöiden ja 86 altistumattomien yksilöiden näytteitä. Näiden ryhmien keskiarvoja verrattiin keskenään. Ryhmien välillä ei tilastollisesti merkitseviä eroavaisuuksia löytynyt ($p = 0.087$) (Kuvaaja 2.). Data oli epä-parametrisesti jakautunut, ja tilastollinen merkitsevyys arvioitiin käyttämällä Mann-Whitney U testiä p-arvojen laskemiseen.

E.coli-lux-IgM-ELISA

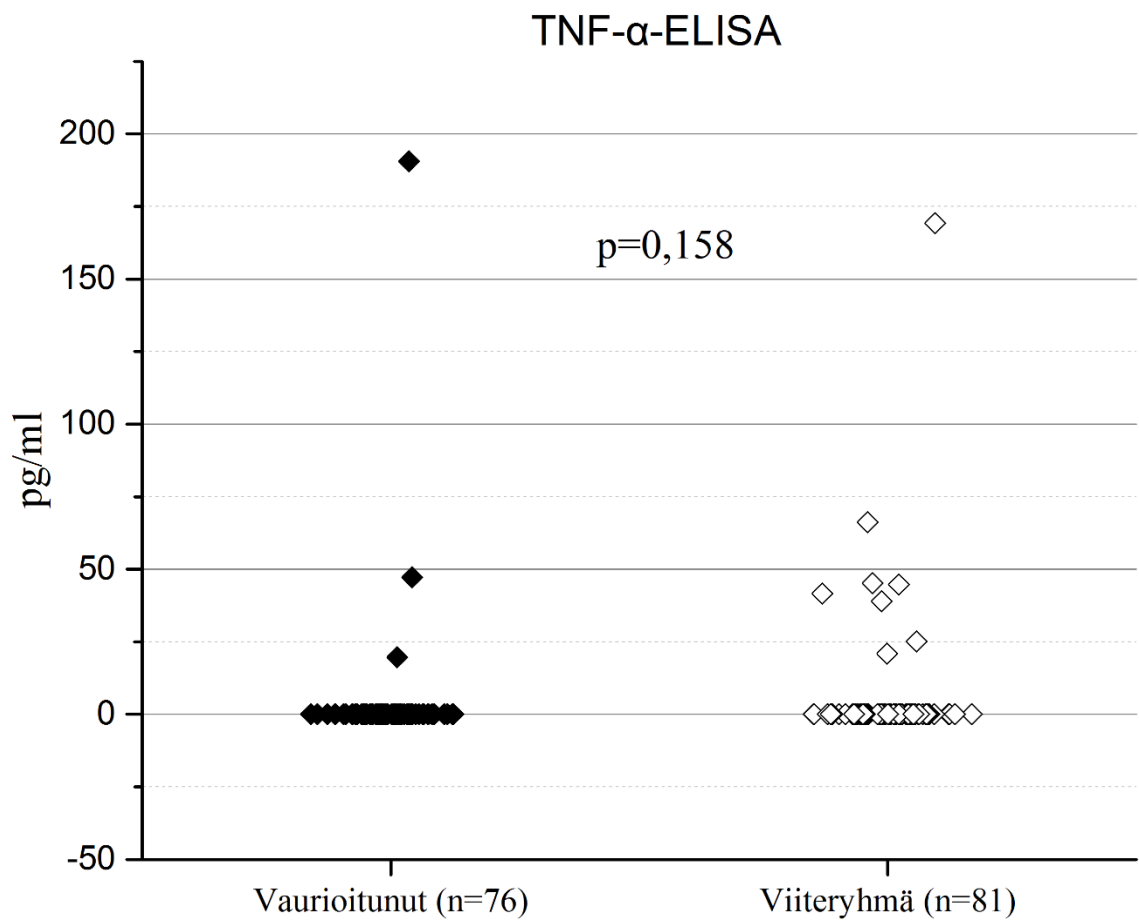


Kuvaaja 2. *E. coli-Lux* spesifisen IgM ELISA-mittaukset. Kuvaajassa 75 %, 25 %, keskiviiva on mediaani vaurioituneilla valkoinen neliö, ja viiteryhmällä musta neliö ovat keskiarvoja sekä ristit osoittavat minimi ja maksimi arvot. P-arvo on laskettu Mann-Whitney U-testillä.

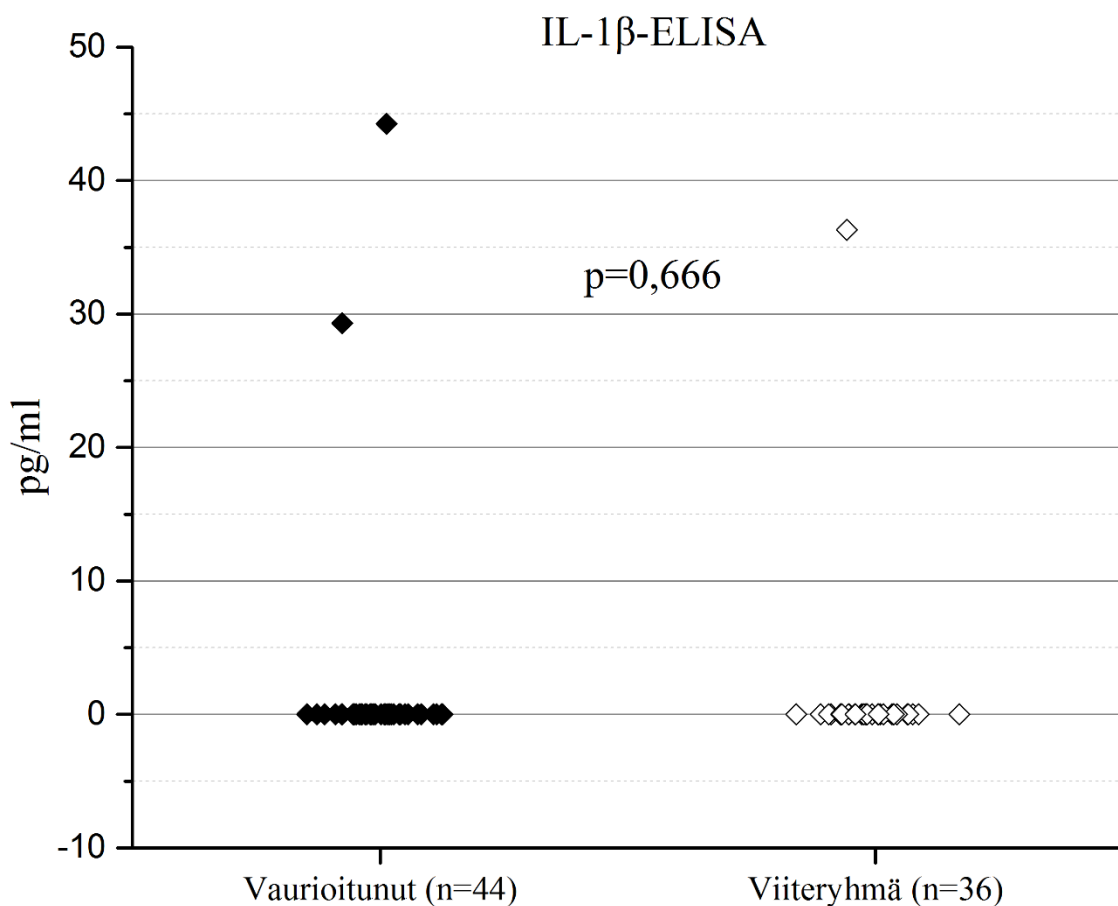
4.3. Sytokiini EIA-mittaukset

TNF- α mittauksilla analysoitiin 157 seeruminäytettä (vauriokohteissa oleskelleita n=76, vertailunäytteitä=81) ja IL-1 β mittauksilla 80 seeruminäytettä (vauriokohteissa oleskelleita n=44, viiteryhmä n=36). Kummassakaan testissä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä (Kuvaaja 3. ja 4). Molempien testien p-arvot olivat suurempia kuin 0.05 (TNF- α testin p-arvo=0,158, IL-1 β -testin p-arvo=0,666)

TNF- α EIA-testeissä 11 näytteelle havaittiin nollasta poikkeava sytokiinikonsentraatio (pg/ml>0). Nollasta poikkeavista näytteistä 3 oli altistuneilla ja 8 altistumattomilla. IL-1 β -EIA-testeissä 3 näytteelle mitattiin nollasta poikkeava sytokiinikonsentraatio. Nollasta poikkeavista näytteistä 2 oli altistuneilla ja 1 altistumattomilla. Testien datat olivat epä-parametrisesti jakautuneita, ja tilastollinen merkitsevyys arvioitiin käyttämällä Mann-Whitney U -testiä p-arvojen laskemiseen. Tulokset on kerätty taulukkoon 6.



Kuvaaja 3. TNF- α -ELISA. Testissä vertailtiin vauriokohteissa oleskelleiden seeruminäytteitä altistumattoman viiteryhmän näytteisiin. Suuri osa näytteiden signaaleista ei eronnut taustasta, jolloin näytteen sytokiinikonsentraatio muutettiin nollassi. P-arvo on laskettu Mann-Whitneyn U-testillä.



Kuvaaja 4. IL-1 β -ELISA. Testissä vertailtiin vauriokohteissa oleskelleiden seeruminäytteitä altistumattoman viiteryhmän näytteisiin. Suuri osa näytteiden signaaleista ei eronnut taustasta, jolloin näytteen sytokiini-konsentraatio muutettiin nolaksi. P-arvo on laskettu Mann-Whitneyn U-testillä.

Taulukko 6. Sytokiini-ELISA-mittausten tulokset taulukoituna ja jaettuna altistuneisiin sekä altistumattomiin.

Sytokiini-ELISA-mittausten tulokset on jaoteltu näytteiden konsentraatioiden (pg/ml) perusteella yli nollan ja nollan tai alle saaneisiin näytteisiin. Taulukkoon on myös merkitty ryhmittäin prosentuaalinen osuus yli nollan konsentraation omaavista näytteistä verrattuna koko ryhmään.

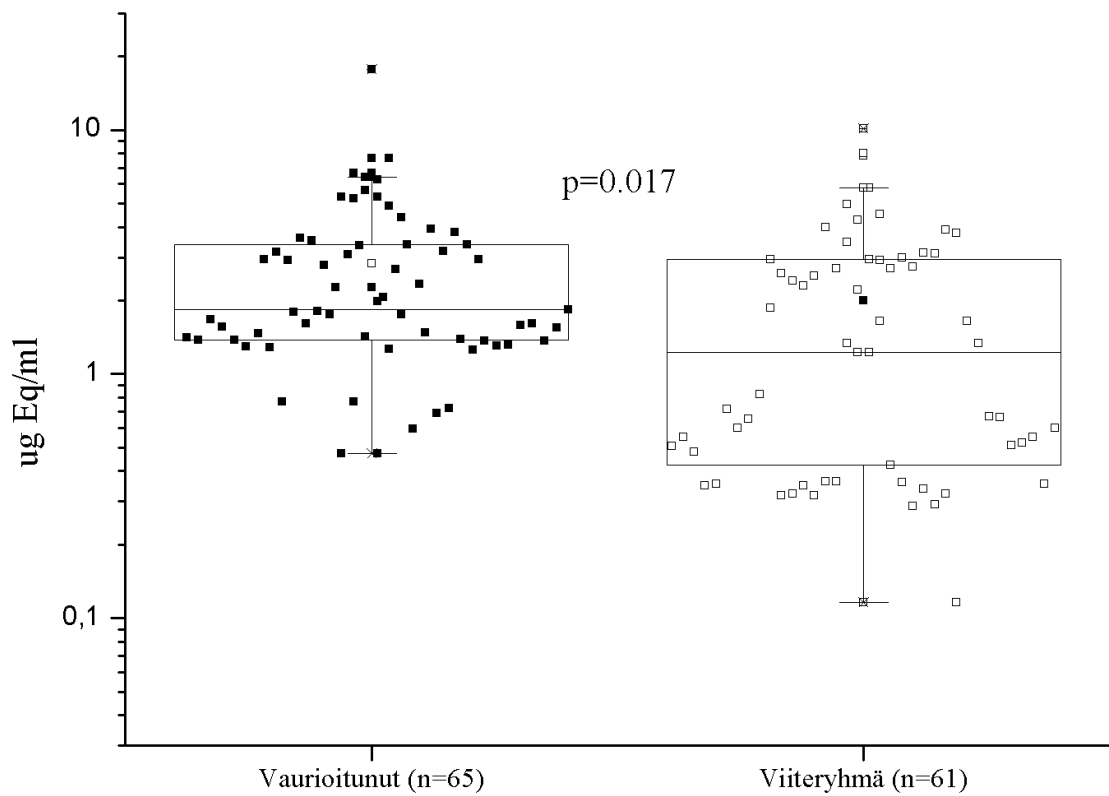
TNF-α	Konsentraatio (c)	Vaurioitunut (n=76)	Viiteryhmä (n=81)
	pg/ml >0	3	8
	pg/ml \leq 0	73	73
	(pg/ml >0) / n (%)	3,9 %	9,8 %
IL-1β	Konsentraatio (c)	Vaurioitunut (n=44)	Viiteryhmä (n=36)
	pg/ml >0	2	1
	pg/ml \leq 0	42	35
	(pg/ml >0) / n (%)	4,4 %	2,7 %

4.4. Komplementti fragmentti C1q sekä C3 sisältyvien CIC seeruminäyte EIA-mittaukset

CIC-RAJI mittauksilla analysoitiin 80 seeruminäytettä (vauriokohteissa oleskelleita n=22, vertailunäytteitä=58) ja CIC-C1q mittauksilla 126 seeruminäytettä (vauriokohteissa oleskelleita n=65, viiteryhmä n=61). Molemmissa testeissä havaittiin ryhmien välisiä tilastollisesti merkitseviä eroja (Kuvaajat 5. ja 6). Vaurioituneissa rakennuksissa oleskelleiden veren seerumin CIC-arvot olivat ryhmätasolla merkitsevästi korkeampia kuin viiteryhmän näytteiden arvot (CIC-C1q testin $p < 0.05$ ja CIC-Raji testin $p < 0.001$).

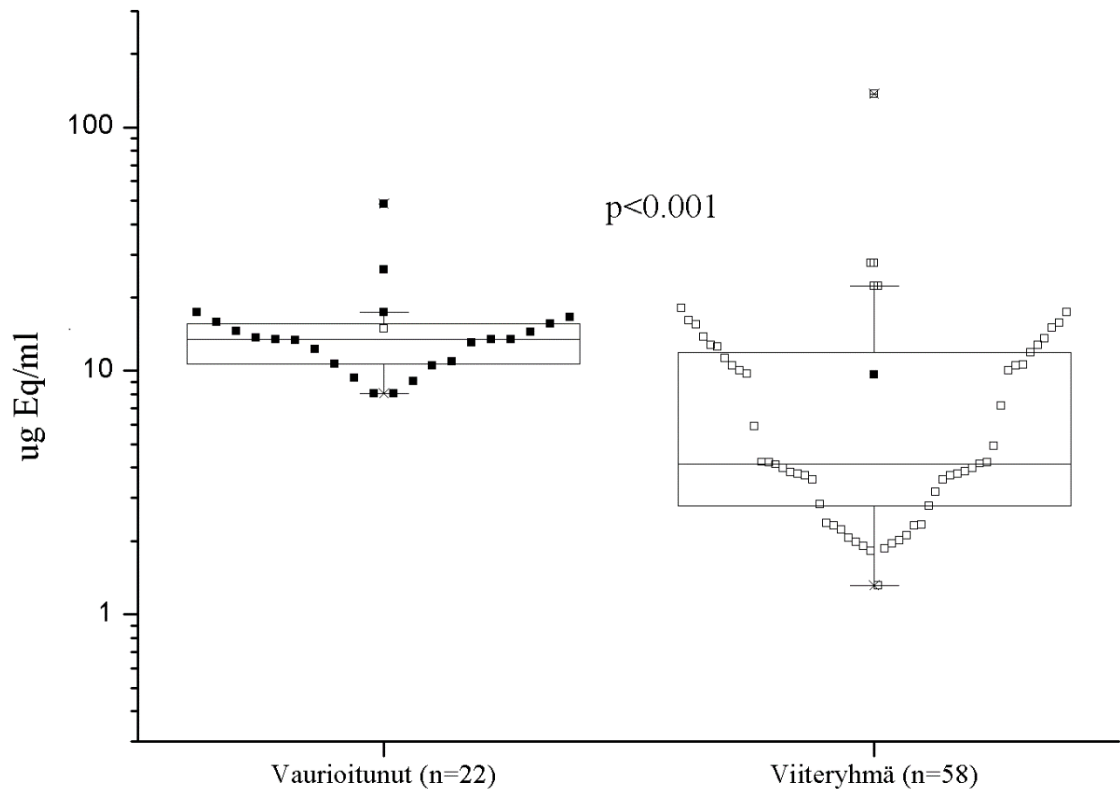
CIC-C1q-EIA-testien perusteella 18 näytettä määriteltiin arvoiltaan huomattavasti kohonneiksi ($>4 \mu\text{g Eq/mL}$). Huomattavasti kohonneista näytteistä 11 oli vauriokohteissa oleskelleiden näytteitä ja 7 verrokkiryhmäläisten näytteitä. CIC-Raji-EIA-testeissä korkeita kohonneita CIC-arvoja ($>20 \mu\text{g Eq/ml}$) antoi 5 näytettä. Huomattavasti kohonneista näytteistä 2 oli mikrobivaurioille altistuneilla ja 3 verrokkiryhmäläisillä. Testien datat olivat epä-parametrisesti jakautuneita, ja tilastollinen merkitsevyys arvioitiin käyttämällä Mann-Whitney U -testiä p-arvojen laskemiseen. Tulokset on kerätty taulukkoon 7.

CIC-C1q



Kuvaaja 5. CIC-C1q-EIA määrittäminen. Testissä vertailtiin vaurioituneiden oleskelleiden seeruminäytteitä altistumattoman viiteryhmän näytteisiin. Kuvaajassa 75 %, 25 %, keskiviiva on mediaani, vaurioituneilla valkoinen neliö ja viiteryhmällä musta neliö ovat keskiarvoja sekä ristit osoittavat minimi ja maksimi arvot. P-arvo on laskettu Mann-Whitneyn U-testillä.

CIC-Raji



Kuvaaja 6. CIC-Raji-EIA-määritys. Testissä vertailtiin vauriokohteissa oleskelleiden seeruminäytteitä altistumattoman viiteryhmän näytteisiin. Kuvaajassa 75 %, 25 %, keskiviiva on mediaani, vaurioituneilla valkoinen neliö ja viiteryhmällä musta neliö ovat keskiarvoja sekä ristit osoittavat minimi ja maksimi arvot. P-arvo on laskettu Mann-Whitneyn U-testillä.

Taulukko 7. CIC-ELISA-mittausten tulokset taulukoituna ja jaettuna altistuneisiin sekä altistumattomiin.

CIC-ELISA-määrityksissä mitattujen eri ryhmien keskiarvot sekä keskihajonnat.

CIC-C1q		Vaurioitunut (n=65)	Viiteryhmä (n=61)
	Keskiarvo ($\mu\text{g Eq/ml}$)	2,73	2,01
	Keskihajonta	2,54	2,10
CIC-RAJI		Vaurioitunut (n=22)	Viiteryhmä (n=58)
	Keskiarvo ($\mu\text{g Eq/ml}$)	14,92	9,49
	Keskihajonta	8,42	18,03

5. TULOSTEN TARKASTELU JA PÄÄTELMÄT

Tässä tutkimuksessa saadut tulokset osoittavat, että mikrobivaurioituneissa rakennuksissa oleskelleilla henkilöillä on ryhmätasolla korkeammat veren seerumi CIC-arvot verrattuna verrokkiryhmän arvoihin. Ryhmien välillä ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja tarkasteltaessa ryhmien seerumin itiöspesifisiä *E. coli-lux-IgM*-arvoja tai sytokiinitasoja. IgE-tasoja ei kyetty mittaamaan käytetyillä menetelmillä.

Tutkimustuloksia tarkasteltaessa on otettava huomioon, että yksilöiden mikrobivaurioaltistumisen määrää on vaikea arvioida. Jokainen vauriokohteissa oleskellut henkilö on saanut yksilökohtaisen altistumisannoksen. Altistumismäärä riippuen monesta tekijästä, kuten henkilöiden työhistoriasta, työpisteen sijainnista, ilmastoinnin laadusta, sekä mikrobivaurion läheisyydessä vietetystä ajasta. Yksilöt ovat myös voineet altistua haittamikrobeille muualla kuin vauriokohteissa, kuten kotonaan. (Koponen ja muut 2018). Tällöin vauriokohde ei välttämättä ole ollut ainoa paikka, jossa altistuminen tapahtuu tai on tapahtunut. Toinen huomioitava tekijä tuloksia tarkasteltaessa on henkilöiden yksilölliset herkkyys erot ympäristötekijöitä kohtaan. Tässä tutkimuksessa keskityttiin ryhmien välisiin eroihin. Tämän vuoksi yksilökohtaiset tekijät eivät vaikuttaneet merkityksellisesti lopputuloksiin.

Mikrobivauriokohteissa oleskelleiden yksilöiden altistuminen on, mitä todennäköisimmin, tapahtuu keuhkojen kautta, hengitysilman mukana. Näytteiden kerääminen ei ollut mahdollista hengityskanavista tai keuhkoista, jonka vuoksi tutkimus tehtiin testihenkilöiden seeruminäytteistä.

5.1. IgE-mittaukset

IgE-tasoja ei pystytty havaitsemaan seeruminäytteistä käytetyllä menetelmällä. Seerumista mitatut tasot ovat saattaneet olla niin alhaisia, että käytössä olleen mittaussysteemin herkkyys ei havainnut IgE-tasoja luotettavasti. Ei-toivotun mittaustuloksen voisi selittää näytteiden seerumi IgE konsentraation pienuus. Kuten aikaisemmin esitetystä taulukosta (Taulukko 2.) nähtiin, IgE:n seerumikonsentraatio (0,00005 mg/ml) on pieni verrattuna esimerkiksi IgG:n konsentraatioon (9,0 mg/ml). Pieni Ig-konsentraatio voi olla syynä ei-toivottuihin tuloksiin. Menetelmän herkkyys ei välttämättä riitä IgE:n mittaamiseen, vaikka saman kaltainen menetelmä on toiminut muilla Ig isotoopeilla. Muita vaihtoehtoja mittauksen epäonnistumiselle voi olla reagenssien, kuten vasta-aineen, toimimattomuus tai mikrotiitterilevylukijan herkkyys alitus. IgE on tyyppin I hypersensitiivisyys reaktion, eli allergisen reaktion käynnistäjä.

IgE-mittauksien avulla voitaisiin tutkia allergisten reaktioiden eroja kosteusvaurioille altistuneiden sekä altistumattomien välillä. Itiöspesifisillä IgE-mittauksilla voitaisiin saada selville allergisen reaktion aiheuttavat mikrobit.

IgE-mittauksia varten on tarjolla useita hyviä kaupallisia mittauslaboratorioita, joilta löytyy valmiita, toimivia menetelmiä näytemittauksia varten. Tulevaisuudessa IgE-mittaukset voitaisiin ulkoistaa, ja ryhmäerojen analyysia jatkaa saatujen tuloksien pohjalta.

5.2. *E. coli-Lux* spesifisen IgM ELISA-mittaukset

Aikaisemmassa tutkimuksessa Atosuo ja muut (2021) olivat havainneet *E. coli*-spesifisten komplementin aktiivisuuksien olleen koholla mikrobivaurioaltistuneilla henkilöillä ryhmätasolla verrattuna verrokkiryhmään. Toisessa tutkimuksessa todettiin, että *E. coli-Lux*-spesifiset IgG-tasot eivät ryhmätasolla eronneet ryhmien välillä tilastollisesti merkitsevästi (Atosuo ja muut 2020b). IgM on merkittävä klassisen komplementtireaktiotien aktivoija, joten kohonneet IgM-tasot voisivat selittää aiemman tutkimuksen komplementtiaktiivisuudet. Tässä tutkimuksessa haluttiin tutkia, johtuiko nämä komplementtiaktiivisuudet kohonneista IgM-tasoista. Tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä tarkasteltaessa *E. coli-Lux* IgM-tasoja.

Tässä tutkimuksessa ryhmien välisten IgM-tasojen samankaltaisuus voisi kertoa primäärin immuunivastevaiheen puuttumisesta koehenkilöiltä. Koehenkilöt olivat työskennelleet vauriokohteissa eri pituisia aikoja ja mikrobivaurioille tapahtunut ensimmäinen altistuminen, sekä IgM-tuotanto, on voinut tapahtua kuukausia tai vuosia sitten. Tämä selittäisi ryhmien *E. coli-lux*-IgM-tasojen samanlaisuuden.

Toinen selitys tasojen samankaltaisuus voi johtua fysiologisista esteistä. Haittamikrobialtistuminen on todennäköisimmin tapahtunut hengitysteitse, jolloin immuunireaktio on tapahtunut keuhkoissa. Vaikka tulehdustila olisi käynnissä, suuren pentameeri-muotonsa vuoksi IgM:ien diffuusion patogeenien luokse keuhkokudokseen on fysiologisesti haasteellista (Burnett 1986).

Aikaisemman tutkimuksen komplementin aktiivisuuden alkuperää on etsittävä muualta. Tutkimuksissa voitaisiin mitata samoilta henkilöiltä akuutin faasin tekijöitä esim. CRP:tä joka on toinen komplementin klassisen reaktiotien käynnistäjä.

5.3 Sytokiini EIA-mittaukset

Tässä tutkimuksessa IL-1 β ja TNF- α sytokiinimittauksissa ei todettu tilastollisesti merkitseviä eroja altistuneiden ja altistumattomien ryhmien välillä. Nollasta eroavia

sytokiinimittaustuloksia oli pieni määrä verrattuna nolla tuloksiin. Tutkimuksessa saatuja tuloksia tarkastelemalla pystyttiin toteamaan, että henkilöt, joilla toinen sytokiinitaso oli koholla, oli myös toinen taso koholla. IL-1 β sekä TNF- α ovat tärkeässä roolissa tulehdusreaktiossa.

Sytokiinien tuotanto sekä eliminaatio on nopeaa ja hyvin tapauskohtainen immunologinen reaktio. Nopea sytokiinitasojen seerumikonsentraatiomuutos johtaa nopean nousun lisäksi nopeaan laskuun. Immunologisen reaktion aiheuttamasta tuotannosta johtuvat korkeat tasot voivat näin palautua nopeasti basaalitasolle. Tämän vuoksi tasojen mittaaminen on tässä tapauksessa haasteellista, ehkä tämän tutkimuksen kannalta jopa mahdotonta. Tässä tutkimuksessa optimaalisessa tilanteessa kaikilta koehenkilöiltä olisi saatu mitattua sytokiinitasot ensimmäisen mikrobivaurio kohtaamisen yhteydessä. Ensimmäisen kohtaamisen tunnistus voi olla haastavaa. Havaittavien tulehdusoireiden esiintyessä sytokiinitasot ovat jo voineet laskea normaalille tasolle. Sytokiinien erittäminen kehoon vaikuttaa pitkälti millainen tulehdusvaste keholle syntyy. Tämän vuoksi sytokiinitasojen mittaaminen olisi ollut mielekästä ensimmäisen kohtaamisen yhteydessä.

Sytokiinien tehtävien monimotoisuuden vuoksi kohollaan olevien sytokiinitasojen syytä on haasteellista jäljittää. Vaikka muutamilla tutkimukseen osallistuneilla yksilöillä havaittiin kohollaan olevia tasoja, ei voida suoraan sanoa, johtuvatko ne altistumisesta kohteiden mikrobikasvustoille. Sytokiinitasot voivat nousta minkä tahansa sytokiineja tarvitsevan tulehdusvasteen vuoksi. Tällöin pienikin flunssa voi kohottaa tasoja.

Sytokiinien mittaamisen sijaan tulevissa tutkimuksissa voitaisiin keskittyä esim. sytokiinireseptorien mittaamiseen leukosyyttien pinnalta. Tosin, näiden mittaamisessa voi ilmetä samanlaisia ongelmia kuin tämän tutkimuksen sytokiinitasojen mittaamisessa.

5.4 C1q sekä C3 komplementti fragmenttia sisältävien CIC seeruminäytteiden EIA-mittaukset

Tässä tutkimuksessa CIC-EIA-mittauksissa havaittiin tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmätasolla kosteusvauriokohteissa altistuneiden sekä altistumattomien välillä. Tutkimustulokset voisivat viitata mikrobivauriokohteissa työskentelevien yksilöiden kärsivän ryhmätasolla suuremmalla todennäköisyydellä T_H1-vasteen tulehdusreaktiosta. CIC:iden muodostuminen on olennainen osa klassisen immuunivasteen synnyssä, jonka vuoksi CIC-tasojen kohonaisuus on yleisesti merkki T_H1-tyypin tulehdustilasta. Tämän tutkimuksen mukaan mikrobivauriotilojen käyttäjille on syystä tai toisesta aktivoitunut

komplementti. Kohonneet CIC-määrät voivat johtaa tyypin III hypersensitiivisyysreaktioon ja sitä kautta mahdollisiin kudosaivuriioihin.

Yksi selitys kohonneille seerumin CIC-tasoille voi olla kehon epänormaalit IgG sekä IgM tuotannot. Ig-tuotanto voi laukaista klassisen komplementtireaktiotien, jonka yhteydessä muodostuu immuunikomplekseja. Komplementin aktivaatiossa syntyneet CIC:t rakentuvat mm. Ig:istä sekä käynnistyneen komplementtireaktion fragmentti C1q:sta sekä C3:sta. Aiemmissa tutkimuksissa samaa tutkimusmateriaalia tarkasteltaessa on havaittu, että mikrobivauriokohteissa altistuneilla on kohonneet totaali IgG ja haittamikrobispesifiset IgG1- sekä IgG3-tasot. IgG1 sekä IgG3 ovat molemmat klassisen komplementin reaktiotien aktivoijia, jotka aiheuttavat komplementti kaskadin ja edelleen CIC:iden synnyn. C1q:ta sisältävät immuunikompleksit voivat sisältää IgG:tä. Epänormaalin suuri määrä IgG:tä voi aiheuttaa seerumin CIC-tasojen kohoamisen. Vasta-aine-antigeeni suhde vaikuttaa CIC:iden määrään huomattavasti. Normaalioloissa ei-liukoiset suuret immuunikompleksit poistetaan makrofagien toimesta helposti. Ylimäärä vasta-ainetta tai antigeeni voi aiheuttaa normaalia pienempien kompleksien synnyn. Pienet kompleksit pääsevät helposti verenkiertoon, jossa ne voivat mahdollistaa CIC:iden aiheuttamia komplikaatioita, kuten verisuonistoihin tarttumista ja tyypin III hypersensitiivisyys reaktion.

Toisessa aikaisemmassa tutkimuksessa (Atosuo ja muut 2021) havaittiin näiltä samoilta altistuneilta, haittamikrobispesifisten IgG-tasojen omaavilta testiyksilöiltä komplementin klassisen reaktiotien epäspesifisiä aktiivisuuksia *E. coli lux*:ia kohtaan. Haittamikrobien aiheuttamat IgG-tuotannot ovat voineet olla osasyynä CIC:iden muodostumiseen ja sitä kautta komplementin klassisen reaktiotien aktivaatioon. Johtopäätöksiä vedettäessä on huomioitava, että C1q:ta sisältävät CIC:t voivat sisältää myös muita Ig-isotooppeja kuten IgM:ää. CIC-tuotanto ei siis ole suoraan sidonnainen IgG-tuotantoon. Aiemmassa tutkimuksessa ei kuitenkaan havaittu seeruminäytteistä ryhmien väleillä eroavaisuuksia IgM-tasojen tutkittaessa. Myöskään tässä tutkimuksessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja *E. coli-lux*-IgM-mittauksissa.

CIC-tasot voidaan selittää myös CIC:iden vajanaisella eliminaatiolla. Vajaaseen eliminaatioon voi vaikuttaa kehossa muodostuneiden CIC:iden ylimäärä tai CIC:itä syövien makrofagien poikkeuksellisen matala määrä. Ryhmätasolla tutkittaessa on otettava huomioon, että suurella todennäköisyydellä jokaisella tutkimusyksilöllä ei ole makrofagivajetta. Retikuloendoteliaalijärjestelmän toiminta voi heiketä epänormaalin korkean CIC-määrän johdosta, jolloin normaali järjestelmän CIC eliminaatiosysteemi ei

toimi ja järjestelmä saturoituu aiheuttaen hetkellisiä kohonneita CIC-tasoja. Myös komplementtisysteemin toimintahäiriöt voivat johtaa saman kaltaisiin tilanteisiin.

Tässä tutkimuksessa mikrobivaurioille altistuneiden komplementin käynnistymisen syytä ei ole täydellä varmuudella saatu selville. Mahdollinen komplementin aktivaatio on voinut johtua mistä tahansa muustakin, kuin yllä mainituista syistä. Komplementin aktivaatio voi tapahtua mistä tahansa sitä vaativasta tilasta, minkä vuoksi mikrobivauriot ovat vain yksi mahdollisista systeemin aktivaattoreista.

Tuloksia tarkasteltaessa on huomioitava mahdollinen tutkimustulosten vinoutuminen. Tutkimusajan niukkuuden sekä rajallisen sytokiini-kittien saatavuuden vuoksi CIC-RAJI testien otanta jäi toivottua pienemmäksi. Otannan koko sekä mahdollinen vinoutuminen voi vaikuttaa tuloksiin merkityksellisesti. Pienessä otannassa jo muutaman tutkimusnäytteen ulkoisista syistä johtuva korkea CIC-arvo voi vaikuttaa koko analyysin lopputulokseen. CIC-C1q-testeissä otanta oli suurempi ja tieteellisen tutkimuksen näkökulmasta parempi kuin CIC-RAJI-testeissä. Suuremman otannan osalta CIC-C1q testien tuloksia voidaan pitää näin luotettavina.

CIC-C1q testin tuloksiin olisi voinut vaikuttaa suuri seerumin CRP määrä. Pentarksi CRP pystyy sitoutumaan CIC-C1q testin kiinteään faasin C1q:ihin. Sitoutuneet CRP:t voivat estää mitattavien immuunikompleksien sitoutumisen kiinteään faasiin antaen virheellisiä negatiivisia tuloksia. Muita mahdollisia seerumissa olevia C1q sitoja ovat DNA, endotoksiini ja hepariini. Tässä tutkimuksessa nämä seikat eivät ole estäneet tilastollisesti merkitsevien tulosten saantia. Seerumin CRP-tasojen kohonneisuus voisi tarkoittaa näytteseerumeiden sisältävän vielä enemmän CIC:itä, kuin testit antavat tulokseksi. Jos CRP-tasoja olisi tutkittu ja tasot todettu kohonneiksi olisi ratkaisuksi voitu käyttää varmistusliuosta. Varmistusliuos sisältää suuren konsentraation suolaa, jonka tiedetään inhiboivan CIC:n ja C1q:n sitoutumista. Liuottamalla näytteet varmistusliuokseen saataisiin selville, että löytyykö seeruminäytteistä muita C1q sitovia aineita kuin CIC:tä. Vahvistusliuoksen vaikutusta näiden muiden C1q sitovien komponenttien sitoutumiseen ei tiedetä, jonka vuoksi parempi ratkaisu olisi jokaisen komponentin erillinen määrittäminen.

Tästä tutkimuksesta saatuja tietoja voitaisiin tulevaisuudessa käyttää mm. yksilön mikrobialtistumisen todentamisessa. Seerumin CIC-testit voisivat olla yksi todentamismenetelmät mikrobivaurioille altistuneita tutkittaessa, kun tutkimus tehdään jo muutenkin tutkimusyksilöiden seeruminäytteillä. Tutkimuksesta saatuja tietoja

voitaisiin myös käyttää jatkotutkimuksiin, joissa voitaisiin keskittyä muiden komplementin aktivaatiotekijöiden tutkimiseen ja tyyppin III hypersensitiivisyysreaktion reaktio-osien määrittämiseen.

5.5 Yhteenveto

Osaan tutkimuskysymyksistä ei saatu vastauksia. IgE-vasteiden mittauskelvottomuuden vuoksi mikrobivaurioille altistuneiden sekä altistumattomien veren seerumin IgE-tasoja ei pystytty tutkimuksessa mittaamaan, eikä IgE-menetelmiä saatu herkkyydeltään sille tasolle, että tasojen määrittäminen olisi onnistunut käytetyillä metodeilla.

Tutkimuksen *E. coli-lux*-IgM-ELISA-mittauksissa ei havaittu tilastollisia eroja referenssiryhmän ja kohderyhmän välillä. Nämä tulokset osoittavat, että *E. coli-lux*-IgM-tasot eivät olleet syynä aiemmassa tutkimuksessa (Atosuo ja muut 2021) havaittujen henkilöiden epäspesifisen komplementin klassisen reaktiotien aktiivisuuksiin *E. coli-lux*:ia kohtaan. Myöskään sytokiiniarvoja tarkasteltaessa ei havaittu tilastollisesti merkitseviä eroja ryhmien välillä.

Tämän tutkimuksen perusteella tilastollisesti merkitseviä eroja löytyi vain seerumin CIC-tasoja vertailtaessa. Molemmissa CIC-C1q sekä CIC-RAJI-EIA määrittäyksissä havaittiin CIC-tasojen olevan tilastollisesti merkitsevästi korkeammat mikrobivaurioille altistuneilla kuin altistumattomilla. Kohonneet CIC-tasot voivat olla yhteydessä terveysvaikutuksiin, mutta kuten jo edellä mainittiin, kohonneet CIC-tasot eivät suoraan kerro mistään haitallisesta terveydentilasta. Tutkimuksen tulosten perusteella seerumin CIC-testejä voitaisiin käyttää yhtenä mikrobialtistumisen todentamismenetelmänä.

Tämän tutkimuksen ja lähiaikoina tehtyjen muiden tutkijoiden tutkimusten tulokset asettavat hypoteesin, että kosteusvaurioiden aiheuttamat mikrobikasvustot vaikuttavat jollain tavoin vauriokohteissa oleskelleiden yksilöiden immuunijärjestelmään. Tämän hypoteesin varmistaminen ja tarkentaminen vaatii lisää tutkimusta erityisesti IgE ja komplementin tutkimuksen puolelta.

Tulevissa tutkimuksissa voitaisiin keskittyä tutkimaan mikrobivaurioille altistuneiden muita immuunivasteita, kuten akuutin faasin tekijöitä (esim. CRP) määriä, sytokiinireseptoreita sekä muita komplementin toimintaan osallistuvia komponentteja. Tulevien tutkimusten tavoitteeksi voitaisiin myös asettaa tarkemman IgE-määrittämisperiaatteen kehittäminen, jolloin itiöspesifisten IgE-määrittäysten mittaus mahdollistettaisiin. Jos huonoja terveysvaikutuksia tuottava mikrobilaji saataisiin selville, voitaisiin osa kosteusmikrobivauriotutkimuksista siirtää näiden mikrobien pariin.

Identifioimalla haittamikrobi voitaisiin parantaa rakennusten rakennusperiaatteita, joilla saataisiin ehkäistyä tai jopa estettyä kyseisten lajien kasvaminen. Näin säästyttäisiin väistämättömiltä korjaustoimenpiteiltä sekä mahdollisilta terveydellisiltä haitoilta.

6. EETTINEN LAUSUNTO

Tutkimuksen eettisyys: Kaikki tutkimukseen osallistuvat ovat vapaaehtoisia aikuisia.
Tutkimuksella on TYKS:in eettisen toimikunnan puolto (Dnro: 59/1801/2019).

LÄHTEET

Abbas, M., Moussa, M. & Akel, H. (2020) Type I Hypersensitivity Reaction. *StatPearls* StatPearls Publishing. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32809396>>. (Luettu 4.12.2020).

Adams, R. I., Sylvain, I., Spilak, M. P., Taylor, J. W., Waring, M. S. & Mendell, M. J. (2020) Fungal signature of moisture damage in buildings: Identification by targeted and untargeted approaches with mycobiome data. *Appl Environ Microbiol*, **86**:e01047-20.

Afshari, A., Anderson, H., Cohen A., De Oliveira Fernandes, E., Douwes, J., Górný, R., Hirvonen, M., Jaakkola, J., Kirchner, S., Kurnitski, J., Levin, H., Mendell, M., Mølhav, L., Morawska, L., Nevalainen, A., Richardson, M., Rudnai, P., Schleibinger, H., Schwarze, P. & Krzyzanowski, M. (2009). WHO guidelines for indoor air quality: Dampness and mould. World Health Organization, Regional Office for Europe.

Ahirwar, R., Bariar, S., Balakrishnan, A. & Nahar, P. (2015) BSA blocking in enzyme-linked immunosorbent assays is a non-mandatory step: A perspective study on mechanism of BSA blocking in common ELISA protocols. *RSC Advances*, **5**:100077–100083.

Aibara, N. & Ohshima, K. (2020) Aibara, N., & Ohshima, K. (2019). Revisiting immune complexes: Key to understanding immune-related diseases. *Adv Clin Chem* **96**:1-17.

Aínsa, A., Keiser, J., Bibb, M. J., Buttner M. J., Chater, K. F. & Hopwood, D. A. (2010) Practical Streptomyces Genetics. T. Kieser, M. J. Bibb, M. J. Buttner, K. F. Chater, D. A. Hopwood. *International Microbiology - The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, **3**:260–261.

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2002) The Adaptive Immune System. Kirjassa: *Molecular Biology of the Cell*. 4. painos, s. 3457-3459 Garland Science, New York.

Alhajj, M. & Farhana, A. (2021) Enzyme Linked Immunosorbent Assay. *StatPearls* StatPearls Publishing. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32310382>> (Luettu: 15.6.2021).

Althuwaiqeb, S. A. & Bordoni, B. (2021) Histology, B Cell Lymphocyte. *StatPearls* StatPearls Publishing. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560905/>> (Luettu: 17.8.2021).

- Andersen, B., Frisvad, J. C., Søndergaard, I., Rasmussen, I. S. & Larsen, L. S. (2011) Associations between fungal species and water-damaged building materials. *Applied and Environmental Microbiology*, **77**:4180–4188.
- Aristizábal, B. & González, Á. (2013) Autoimmunity: From Bench to Bedside, Chapter 2: Innate Immune System. Kirjassa: Cervera, R. (toim.) *Autoimmunity: From Bench to Bedside* Bogota (Colombia): El Rosario University Press <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459455/>> (Luettu 29.5.2021).
- Atosuo, J. & Lilius, E. (2011) The real-time-based assessment of the microbial killing by the antimicrobial compounds of neutrophils. *Sci World J*, **11**:2382–2390.
- Atosuo, J., Karhuvaara, O., Päivinen, M., Vilén, L., Suominen, E., Nuutila, J. & Putus, T. (2020a) Löytyykö uusia työkaluja sisäilmaongelmaisten työtilojen ja niiden käyttäjien tutkimukseen? Trossi hankeen 180090 loppuraportti, Turku.
- Atosuo, J., Karhuvaara, O., Suominen, E., Vilén, L., Nuutila, J. & Putus, T. (2020b) Indoor exposure to *Streptomyces albus* and *Aspergillus versicolor* elevates the levels of spore-specific IgG, IgG1 and IgG3 serum antibodies in building users — A new ELISA-based assay for exposure assessment. *Sci Total Environ*, **698**:134335.
- Atosuo, J. (2021) Seminaarikuva vasta-ainevasteen synnystä.
- Atosuo, J., Karhuvaara, O., Suominen, E., Vilén, L., Nuutila, J. & Putus, T. (2021) Indoor-related microbe damage induces complement system activation in building users. *Innate Immunity*, **27**:15–22.
- Auld, D. S., Coassin, P. A., Coussens, N. P., Hensley, P., Klumpp-Thomas, C., Michael, S., Sittampalam, G. S., Trask, O. J., Wagner, B. K., Weidner, J. R., Wildey, M. J. & Dahlin, J. L. (2004) Microplate Selection and Recommended Practices in High-throughput Screening and Quantitative Biology, . *Assay Guidance Manual* Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Aydin, S. (2015) A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, **72**:4–15.
- Bajwa, S. F. & Mohammed, R. H. (2020) Type II Hypersensitivity Reaction. *StatPearls* StatPearls Publishing, Florida. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK563264/>> (Luettu: 18.1.2021).
- Bakshi, S., Cunningham, F., Nichols, E. M., Biedzka-Sarek, M., Neisen, J., Petit-Frere,

- S., Bessant, C., Bansal, L., Peletier, L. A., Zamuner, S. & van der Graaf, P. H. (2020) Mathematical Modelling of Alternative Pathway of Complement System. *Bull. Math. Biol* **82**:33.
- Bilò, M. B., Martini, M., Tontini, C., Corsi, A. & Antonicelli, L. (2021) Anaphylaxis. *European Annals of Allergy and Clinical Immunology* StatPearls Publishing, 4–17. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482124/>> (Luettu: 7.9.2021).
- Burnett, D. (1986) Immunoglobulins in the lung. *Thorax* **40**:337–344.
- Butcher, M. J. & Zhu, J. (2021) Recent advances in understanding the Th1/Th2 effector choice. *Fac Rev* **10**:30.
- Chen, K. & Cerutti, A. (2011) The function and regulation of immunoglobulin D. *Curr Opin Immunol* **23**:345–352.
- Cox-Ganser, J. M. (2015) Indoor dampness and mould health effects - ongoing questions on microbial exposures and allergic versus nonallergic mechanisms. *Clin Exp Allergy* **45**:1478–1482.
- Crowther, J. R. (2009) The ELISA Guidebook, 2. painos. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*. s. 9-77. Second Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Edmondson, D. A., Barrios, C. S., Brasel, T. L., Straus, D. C., Kurup, V. P. & Fink, J. N. (2009) Immune response among patients exposed to molds. *Int J Mol Sci*, **10**:5471–5484.
- Eurostat (2019) Total population living in a dwelling with a leaking roof, damp walls, floors or foundation, or rot in window frames or floor - EU-SILC survey. <https://appsso.eurostat.ec.europa.eu/nui/show.do?dataset=ilc_mdho01&lang=en> (Luettu: 25.5.2021).
- Gyawali, B., Ramakrishna, K. & Dharmoon, A. S. (2019) Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med*, **7**:205031211983504.
- Haddad, M. & Sharma, S. (2019) Physiology, Lung. *StatPearls* StatPearls Publishing, Treasure Island (FL). <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31424761>> (Luettu: 7.6.2021).
- Hoffman, W., Lakkis, F. G. & Chalasani, G. (2016) B cells, antibodies, and more. *Clin J Am Soc Nephrol*, **11**:137–154.
- Holme, J. A., Øya, E., Afanou, A. K. J., Øvrevik, J. & Eduard, W. (2020) Characterization

and pro-inflammatory potential of indoor mold particles. *Indoor Air*, **30**:662–681.

Hoog, G. S. de, Guarro, J., Gené, J. & Figueras, M. J. (2001) Atlas of clinical fungi. *Int. J. Microbiol* **4**:51-52.

Horve, P. F., Lloyd, S., Mhuireach, G. A., Dietz, L., Fretz, M., MacCrone, G., Van Den Wymelenberg, K. & Ishaq, S. L. (2020) Building upon current knowledge and techniques of indoor microbiology to construct the next era of theory into microorganisms, health, and the built environment. *J Expo Sci Environ Epidemiol* Springer Nature, **30**:219–235.

Houbraken, J., de Vries, R. P. & Samson, R. A. (2014) Modern taxonomy of biotechnologically important aspergillus and penicillium species. *Adv Appl Microbiol* **86**:199–249.

Huttunen, K., Włodarczyk, A. J., Tirkkonen, J., Mikkonen, S., Täubel, M., Krop, E., Jacobs, J., Pekkanen, J., Heederik, D., Zock, J. P., Hyvärinen, A., Hirvonen, M. R., Adams, R., Jones, T., Zimmermann, R. & Bérubé, K. (2019) Oxidative capacity and hemolytic activity of settled dust from moisture-damaged schools. *Indoor Air*, **29**:299–307.

Institute of Medicine (US) Committee on Damp Indoor Spaces and Health (2004) Damp Buildings. Kirjassa: *Damp Indoor Spaces and Health*, s. 29-78. National Academies Press, Washington (DC).

Janeway, C. A. & Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **2**:197–216.

Järvi, K., Hyvärinen, A., Täubel, M., Karvonen, A. M., Turunen, M., Jalkanen, K., Patovirta, R., Syrjänen, T., Pirinen, J., Salonen, H., Nevalainen, A. & Pekkanen, J. (2018) Microbial growth in building material samples and occupants' health in severely moisture-damaged homes. *Indoor Air*, **28**:287–297.

Jayaprakash, B., Adams, R. I., Kirjavainen, P., Karvonen, A., Vepsäläinen, A., Valkonen, M., Järvi, K., Sulyok, M., Pekkanen, J., Hyvärinen, A. & Täubel, M. (2017) Indoor microbiota in severely moisture damaged homes and the impact of interventions. *Microbiome*, **5**:138.

Justiz Vaillant, A. A. & Zito, P. M. (2018) Hypersensitivity Reactions, Immediate. *StatPearls* StatPearls Publishing. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30020687>> (Luettu: 4.12.2020).

- Kaneko, N., Kurata, M., Yamamoto, T., Morikawa, S. & Masumoto, J. (2019) The role of interleukin-1 in general pathology. *Inflamm Regener* **39**:12.
- Kany, S., Vollrath, J. T. & Relja, B. (2019) Cytokines in inflammatory disease. *Int J Mol Sci* **20**:6008.
- Kenawy, H. I., Boral, I. & Bevington, A. (2015) Complement-coagulation cross-talk: A potential mediator of the physiological activation of complement by low pH. *Front Immunol.* **6**:215.
- Kistler, H. C. & Broz, K. (2015) Cellular compartmentalization of secondary metabolism. *Front Microbiol* **6**:68.
- Koponen, P., Borodulin, K., Lundqvist, A. & Sääksjärvi, K. (2018) Koskinen S. (toim.) Terveys, toimintakyky ja hyvinvointi Suomessa. Raportissa: FinTerveys 2017 -tutkimus. THL- Raportti 4/2018, Helsinki.
- Leal, M. C., Casabona, J. C., Puntel, M. & Pitossi, F. (2013) Interleukin-1beta and TNF-alpha: Reliable targets for protective therapies in Parkinson's disease? *Front Cell Neurosci* **7**:53.
- Luciano-Rosario, D., Keller, N. P. & Jurick, W. M. (2020) *Penicillium expansum*: biology, omics, and management tools for a global postharvest pathogen causing blue mould of pome fruit. *Mol Plant Pathol* **21**:1391–1404.
- Martin, T. R. & Frevert, C. W. (2005) Innate immunity in the lungs *Proc Am Thorac Soc* **2**:403–411.
- Marwa, K. & Kondamudi, N. P. (2020) Type IV Hypersensitivity Reaction. *StatPearls* StatPearls Publishing. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK562228/>> (Luettu: 7.9.2021).
- Middleton, O., Wheadon, H. & Michie, A. M. (2016) Classical Complement Pathway. Kirjassa: Ratcliffe, M. J. H. (toim.) *Encyclopedia of Immunobiology* s. 318–324. Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Mølhave, L. & Krzyzanowski, M. (2000) The right to healthy indoor air. *Indoor air* **10**:211.
- Mousavi, B., Hedayati, M. T., Hedayati, N., Ilkit, M. & Syedmousavi, S. (2016) Aspergillus species in indoor environments and their possible occupational and public health hazards. *Curr Med Mycol* **2**:36–42.

- Nevalainen, A. & Seuri, M. (2005) Of microbes and men. *Indoor Air*, **15**:58–64.
- Noris, M. & Remuzzi, G. (2013) Overview of complement activation and regulation. *Semin Nephrol* **33**:479–492.
- Obukhanych, T. V. & Nussenzweig, M. C. (2006) T-independent type II immune responses generate memory B cells. *J Exp Med* **203**:305–310.
- Owen, J., Punt, J. & Stanford, S. (2013) Kuby Immunology, 7. painos, s 37-48, 80-91, 105-138, 141-181, 187- 219, 261-262, 299-318, 357-381, 385-412, 415-444, 451-480, 485-513. W. H. Freeman, Yhdysvallat, New York.
- Päivinen, M., Vilén, L. & Putus, T. (2020) Terveisiin tiloihin siirtymisen vaikutus työntekijöiden keuhkofunktioihin. *Sisäilmastoseminaari 2020* Grano Oy, Vaasa.
- Parameswaran, N. & Patial, S. (2010) Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, **20**:87–103.
- Pekkanen, J., Hyvärinen, A., Haverinen-Shaughnessy, U., Korppi, M., Putus, T. & Nevalainen, A. (2007) Moisture damage and childhood asthma: A population-based incident case-control study. *Eur Respir J*, **29**:509–515.
- PhysioPathoPharmaco (2021) <https://i.ytimg.com/vi/_yUsZO6Vio/maxresdefault.jpg> (Luettu 18.10.2021).
- Piontek, M., Łuszczynska, K. & Lechów, H. (2016) Occurrence of the toxin-producing *Aspergillus versicolor* tiraboschi in residential buildings. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **13**:862.
- Putus, T. (2016) Terveyshaitat kosteusvaurioituneilla paloasemilla, *Sisäilmastoseminaari 2016*, SIY raportti 34, Helsinki.
- Reponen, T. A., Gizenko, S. V., Grinshpun, S. A., Willeke, K. & Cole, E. C. (1998) Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl Environ Microbiol* **64**:3807–3812.
- Reynold Verret, C., Firmenich, A. A., Kranz, D. M. & Eisen, H. N. (1987) Resistance of cytotoxic T lymphocytes to the lytic effects of their toxic granules. *J Exp Med* **166**:1536-1547.
- Salo, M. J., Marik, T., Mikkola, R., Andersson, M. A., Kredics, L., Salonen, H. & Kurnitski, J. (2019) *Penicillium expansum* strain isolated from indoor building material was able to grow on gypsum board and emitted guttation droplets containing

- chaetoglobosins and communesins A, B and D. *J Appl Microbiol* **127**:1135–1147.
- Sarma, J. V. & Ward, P. A. (2011) The complement system. *Cell Tissue Res* **343**:227–235.
- Sathe, A. & Cusick, J. K. (2020) Biochemistry, Immunoglobulin M (IgM). *StatPearls StatPearls Publishing*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555995/>> (Luettu: 20.8.2021).
- Sauls, R. S. & Taylor, B. N. (2019) Histology, T-Cell Lymphocyte. *StatPearls StatPearls Publishing*. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK535433/>> (Luettu: 12.8.2021).
- Schroeder, H. W., Jr & Cavacini, L. (2010) Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol* **125**:41-52.
- ScienceDirect (2021) Hakutulos - Hakusana(ELISA), <<https://www.sciencedirect.com/search?qs=ELISA&lastSelectedFacet=years&articleTypes=FLA&years=2020>> (Luettu: 15.6.2021).
- Sisäilmäyhdistys (2020) Esipuhe. *Sisäilmästäseminaari 2020*. SIY raportti 38.
- Sebina, I. & Pepper, M. (2018) Humoral immune responses to infection: common mechanisms and unique strategies to combat pathogen immune evasion tactics. *Curr Opin Immunol* **51**:46–54.
- Sims, J. E. & Smith, D. E. (2010) The IL-1 family: Regulators of immunity. *Nat Rev Immunol* **10**:89–102.
- Sonar, S. & Lal, G. (2015) Role of tumor necrosis factor superfamily in neuroinflammation and autoimmunity. *Front. Immunol* **6**:364.
- Soppi, E. (1992) Kliininen immunologia. s. 5-1 – 5-14, 4-1 – 4-11, 9-1 – 9-6. Medical Interscience Talents M.I.T. Consulting, Tampere, Kirjapaino Markprtin Oy, Tampere.
- Stavnezer, J. & Schrader, C. E. (2014) IgH Chain Class Switch Recombination: Mechanism and Regulation. *J Immunol* **193**:5370–5378.
- Tannous, J., Atoui, A., El Khoury, A., Francis, Z., Oswald, I. P., Puel, O. & Lteif, R. (2016) A study on the physicochemical parameters for *Penicillium expansum* growth and patulin production: effect of temperature, pH, and water activity. *Food Sci Nutr* **4**:611–622.
- Tegla, C. A., Cudrici, C., Patel, S., Trippe, R., Rus, V., Niculescu, F. & Rus, H. (2011)

Membrane attack by complement: The assembly and biology of terminal complement complexes. *Immunol Res* **51**:45–60.

Thacher, J. D., Gruzieva, O., Pershagen, G., Melén, E., Lorentzen, J. C., Kull, I. & Bergström, A. (2017) Mold and dampness exposure and allergic outcomes from birth to adolescence: data from the BAMSE cohort. *Allergy* **72**:967–974.

Thau, L. & Mahajan, K. (2019) Physiology, Opsonization. *StatPearls* StatPearls Publishing. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534215/>> (Luettu: 18.8.2021).

Turner, M. W. (2003) The role of mannose-binding lectin in health and disease. *Mol Immunol* **40**:423–429.

Turvey, S. E. & Broide, D. H. (2010) Innate immunity. *J Allergy Clin Immunol* **125**:24–34.

Urlaub, S. G. G. (2016) Mould and dampness in European homes and their impact on health. IBP-Report EER-058/2016/950.

Usman, N. & Annamaraju, P. (2020) Type III Hypersensitivity Reaction. *StatPearls* StatPearls Publishing, Florida. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32644548>> (Luettu: 29.1.2021).

Vaillant, A. A. J., Jamal, Z. & Ramphul, K. (2021) Immunoglobulin. *StatPearls* StatPearls Publishing, Florida. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK513460/>> (Luettu: 16.8.2021).

Vilén, L., Päivinen, M. & Putus, T. (2020) Tapaustutkimus: Väistötilaan siirtymisen vaikutukset sisäilmaongelmista kärsineen lukion henkilökunnan terveyteen. *Sisäilmastoseminaari 2020*, SIY raportti 38.

Woof, J. M. & Ken, M. A. (2006) The function of immunoglobulin A in immunity. *J Pathol* **208**:270–282.

Xiao, Y. & Isaacs, S. N. (2012) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and blocking with bovine serum albumin (BSA)-not all BSAs are alike. *J Immunol Methods*, **384**:148–151.

Xiong, Z. Q., Qian, W., Suzuki, K. & McNamara, J. O. (2003) Formation of complement membrane attack complex in mammalian cerebral cortex evokes seizures and neurodegeneration. *J Neurosci* **23**:955–960.

Yancey, K. B. & Lawley, T. J. (1984) Circulating immune complexes: Their immunochemistry, biology, and detection in selected dermatologic and systemic diseases. *J Am Acad Dermatol* **10**:711–731.

Zhang, J. M. & An, J. (2007) Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin* **45**:27–37.

Zhang, Z., Reponen, T. & Hershey, G. K. K. (2016) Fungal Exposure and Asthma: IgE and Non-IgE-Mediated Mechanisms. *Curr Allergy Asthma Rep* **16**:86.