

**Fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden vaikutus ihmisen komplementtisysteemin reaktioteiden aktiivisuuteen - menetelmän hyödyntäminen sisäilmaongelmaisten tilankäyttäjien altistuksen toteamiseen.**

Pro gradu -tutkielma  
Turun yliopisto  
Bioteknologian laitos  
Solubiologia  
09/2022

Julia Virtanen

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

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

JULIA VIRTANEN: Fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden vaikutus ihmisen komplementtisysteemin reaktioteiden aktiivisuuteen - menetelmän hyödyntäminen sisäilmaongelmaisten tilankäyttäjien altistuksen toteamiseen.

Pro gradu -tutkielma, 54 s.

Solubiologia

09/2022

Turun yliopiston laatu-järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

---

Komplementtisysteemi on osa selkärankaisten immuunijärjestelmää ja toimii ensimmäisenä puolustuskeinona mikrobi-infektioissa. Sen tärkeimpiä tehtäviä on patogeenin lyysaus, leukosyyttivasteen aktivointi ja opsonisaatio. Komplementtisysteemi muodostuu noin 50 proteiinista ja aktivoituu kolmen eri reaktiotien kautta, jotka ovat klassinen, vaihtoehtoinen ja lektiini-reaktiotie. Komplementin on arveltu olevan evolutiivisesti vanha systeemi ja sen yksittäisiä komponentteja on löydetty fylogeneettisesti vanhemmilta lajeilta, kuten rävuilta, joilla ei vielä ole toimivaa komplementtisysteemiä.

Tutkimustyössä hyödynnettiin koetinsoluna käytetyn *Escherichia coli* K-12 pEGFP<sub>lux</sub>ABCDEamp<sup>r</sup> -kannan (*E. coli* –lux) tuottamaa bioluminesenssia mittaamaan komplementtisysteemin reaktioteiden mikrobittappokinetiikkaa. Tutkimuksen tarkoituksena oli tutkia lämpötilan ja kalsiumpitoisuuden vaikutusta komplementin aktiivisuuteen, erottaa komplementin eri reaktiotiet toisistaan vasta-aineiden avulla ja tutkia niiden avulla sisäilmaongelmille altistuneiden komplementin antimikrobiaalista toimintaa. *E. coli* –luxin avulla mikrobittappokinetiikkaa voitiin seurata reaaliajassa, koska bakteerien tuottama bioluminenssi laskee samassa suhteessa komplementin tappamien solujen määrän kanssa.

Lämpötilan huomattiin vaikuttavan komplementin aktiivisuuteen, esimerkiksi kuume nostaa sen aktiivisuutta. Kaksinkertainen kalsiumpitoisuus lisäsi komplementin tehokkuutta. Komplementtisysteemin eri reaktioteiden blokkaminen onnistui hyvin vasta-aineiden (anti-IgG, anti-C1q) avulla. Eri reaktioteiden aktiivisuutta mitattiin 35 potilasseeruminäytteestä, jotka ovat altistuneet sisäilmavaurioille. Hypoteesina oli, että vaurio saattaa nostaa tilankäyttäjän tulehdusvasteita ja että komplementtisysteemin aktiivisuutta voidaan käyttää tässä indikaattorina. Potilasnäytteiden tuloksissa havaittiin yksilöiden välillä suuria eroavaisuuksia komplementin aktivaatiossa.

Avainsanat: Altistuminen, bioluminesenssi, klassinen reaktiotie, komplementtisysteemi, sisäilmavaurio

Haluan kiittää ohjaajaani FT Janne Atosuota hyvästä ohjaamisesta ja immunologian tutkimusryhmää tsemppauksista tutkimustyön aikana

## Sisällys

Lyhenteet.....	3
I Kirjallisuuskatsaus .....	4
1 Komplementtisysteemi.....	4
1.1 Komplementtisysteemin reaktiotiet .....	6
1.1.1 Klassinen reaktiotie.....	7
1.1.2 Lektiinireaktiotie.....	8
1.1.3 Vaihtoehtoinen reaktiotie.....	8
1.2 Komplementtisysteemin säätely .....	9
1.3 Komplementtisysteemi immuunipuolustuksessa.....	10
1.3.1 Kohdesolujen lysisaus .....	10
1.3.2 Oponisaatio.....	11
1.3.3 Immuunikompleksien hävittäminen.....	11
1.3.4 Tulehdusreaktio ja sen säätely .....	11
1.4 Lämpötila ja komplementtisysteemi .....	13
2 Komplementtisysteemin aktiivisuuden mittaaminen .....	13
2.1 Komplementin funktionaalinen mittaus .....	13
2.2 Komplementin antimikrobiaalisen aktiivisuuden mittaus.....	14
3 Bakteerien elinkelpoisuus .....	15
3.1 Bakteerien kasvun ja elinkelpoisuuden mittaaminen.....	16
3.2 Bakteerien kasvuvaiheet puhtasviljelmässä .....	17
3.2.1 Viivevaihe .....	18
3.2.2 Eksponentiaalinen kasvuvaihe .....	18
3.2.3 Stationäärivaihe .....	18
3.2.4 Kuolinvaihe .....	19
3.3 Bakteerien kuolema.....	19
4 Bioluminesenssia tuottavat <i>E. coli</i> -lux bakteerisolut .....	20
4.1 Bakteerien tuottama bioluminesenssi.....	20
4.2 <i>E. coli</i> -lux bakteerikannan hyödyntäminen.....	22
5 Sisäilmaongelmat .....	24
5.1 Kosteusvaurioiden aiheuttamat terveyshaitat.....	27
5.2 Kosteusvaurioille altistumisen toteaminen.....	29
6 Erikoistyön tavoitteet .....	30

II Kokeellinen osa .....	33
7 Materiaalit ja menetelmät.....	33
7.1 <i>E. coli</i> -lux bakteeripreparaatin valmistus.....	33
7.2 Seerumipooli ja potilasnäytteet .....	33
7.3 Fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden vaikutus komplementtisysteemiin .....	34
7.3.1 Lämpötilan vaikutus komplementtisysteemin reaktioteihin .....	34
7.3.2 Kalsiumin, gelatiinin ja albumiinin vaikutus komplementtisysteemiin .....	35
7.3.3 Inaktiivisen seerumin komplementtisysteemin toiminnan testaus .....	35
7.3.4 Vasta-aineiden vaikutus .....	35
8 Tulokset & tulosten tarkastelu.....	39
8.1 Bakteeripreparaatin ja -laimennoksen valinta .....	39
8.2 Lämpötilan vaikutus komplementtisysteemiin.....	40
8.3 Kalsiumin, gelatiinin ja albumiinin vaikutus komplementtisysteemiin.....	41
8.4 Inaktiivisen seerumin komplementtisysteemin toiminnan testaus .....	43
8.5 Vasta-aineiden valinta ja niiden vaikutus komplementtisysteemiin .....	44
8.6 Vasta-aineiden vaikutus potilasnäytteisiin.....	47
9 Pohdinta.....	51
10 Lähteet/Kirjallisuus .....	55

## Lyhenteet

AP	Komplementin vaihtoehtoinen reaktiotie
APC	Antigeeniä esittelevä solu
ASP	Asylaatiota stimuloiva proteiini
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
BRI	Rakennukseen liittyvä sairaus
CFU	Pesäkkeen muodostava yksikkö
CP	Komplementin klassinen reaktiotie
CPS	Mittaus sekunnissa
CR1	Komplementtireseptori 1
CRP	C-reaktiivinen proteiini
DAF	Hajoamista kiihdyttävä tekijä
EGTA	Etyleeniglykoli-tetra-etaanihappo
ELISA	Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
fB	B-tekijä
fD	D-tekijä
fH	H-tekijä
fI	I-tekijä
GFP	Vihreä fluoresoiva proteiini
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
IAQ	Sisäilman laatu
LP	Komplementin lektiinireaktiotie
MAC	Kalvohyökkäyskompleksi
MASP	MBL:ään liittyvä seriiniproteaasi
MBL	Mannoosia sitova lektiini
OD	Optinen tiheys
SBA	Seerumin bakterisidinen aktiivisuus
SBS	Sairaankäytön rakennuksen oireyhtymä
VBNC	Elinkykyinen muttei viljeltävä solu

# I Kirjallisuuskatsaus

## 1 Komplementtisysteemi

Nisäkkään immuunipuolustus koostuu useasta biokemiallisesta prosessista, jotka mahdollistavat patogeenien, esimerkiksi bakteerien ja virusten, tehokkaan tunnistamisen ja tuhoamisen. Immuunipuolustus jaetaan toiminnallisesti yleensä kahteen osaan: synnynnäiseen ja hankittuun immuniteettiin. Kahtiajako ei ole kovin mustavalkoinen, sillä synnynnäinen ja hankittu immuniteetti toimivat rinnakkain. Synnynnäinen immuniteetti on evolutiivisesti vanha puolustusmekanismi, ja se löytyy kaikilta monisoluisilta organismeilta. Se tuottaa nopean vasteen patogeeniä vastaan ja reagoi aina samalla tavalla, vaikka patogeeni olisi sama joka kerralla. Luontaisen immuniteetin puolustusmekanismit ovat fysikaalisia, fysiologisia tai kemikaalisia esteitä. Fysikaalisiin esteisiin kuuluu esimerkiksi iho, eritteet ja värekarvat ja ne estävät patogeeniä tunkeutumasta elimistöön. Kehon lämpötila, mahalaukun pH ja lysosyymit ovat esimerkkejä fysiologisista ja kemiallisista esteistä. Ne estävät patogeenien replikaatiota ja leviämistä. Synnynnäiseen immuniteettiin kuuluu polymorfonukleaariset solut, kuten neutrofiilit ja basofiilit, muut fagosyytit, kuten monosyytit ja makrofagit, sekä luonnolliset tappajasolut. Siihen kuuluu myös erilaiset liukoiset proteiinit ja peptidit, kuten komplementtisysteemi ja sytokiinit. (Chaplin 2010; Howell ja Shepherd 2021; Monie 2017.)

Hankittu immuniteetti löytyy vain selkärangkaisilta. Se voidaan jakaa humoraaliseen ja soluvälitteiseen immuunivasteeseen. Humoraalinen vaste käyttää B-lymfosyytteja ja soluvälitteinen vaste käyttää T-lymfosyytteja. Hankitun immuniteetin tuottama primaarivaste on huomattavasti hitaampi kuin synnynnäisen vaste, mutta sen tuottama sekundaarivaste on useimmiten nopeampi immunologisen muistin ansiosta. Tätä käytetään hyväksi esimerkiksi rokotteiden kanssa. Hankittu immuniteetti hyödyntää vasteessaan T- ja B-lymfosyyttien pinnoilla ekspressoituja antigeenispesifisiä reseptoreita. B-solut mahdollistavat patogeenien spesifisen tunnistamisen ja tappamisen. Niiden tuottamat vasta-aineet (liukoiset B-solureseptorit) ovat tärkeitä muun muassa komplementtisysteemin aktivoinnissa. Kun antigeeniä esittelevä solu (engl. *antigen presenting cell*, APC) esittää antigeenin naiiveille T- tai B-solulle, solut aktivoituvat ja kypsyvät. B-solut kypsyvät joko plasma- tai muistisoluiksi. Muistisolut ovat inaktiivisia sekundaariseen antigeenialtistumiseen asti, jolloin ne aktivoituvat ja tuottavat



nopeamman vasteen. Ne tuottavat pitkäkestoisen spesifisen immuniteetin tunnistettuja antigeenejä vastaan. Soluvälitteiseen vasteeseen kuuluu T-solut, jotka kypsyvät joko T-auttajasoluiksi, T-tappajasoluiksi tai säätelijä-T-soluiksi. (Chaplin 2010; Howell ja Shepherd 2021.) Näiden lisäksi hankittu immuniteetti on vastuussa allergioista, monista autoimmuunisairauksista ja kudossiirtojen hylkimisestä (Janeway ja muut 2002).

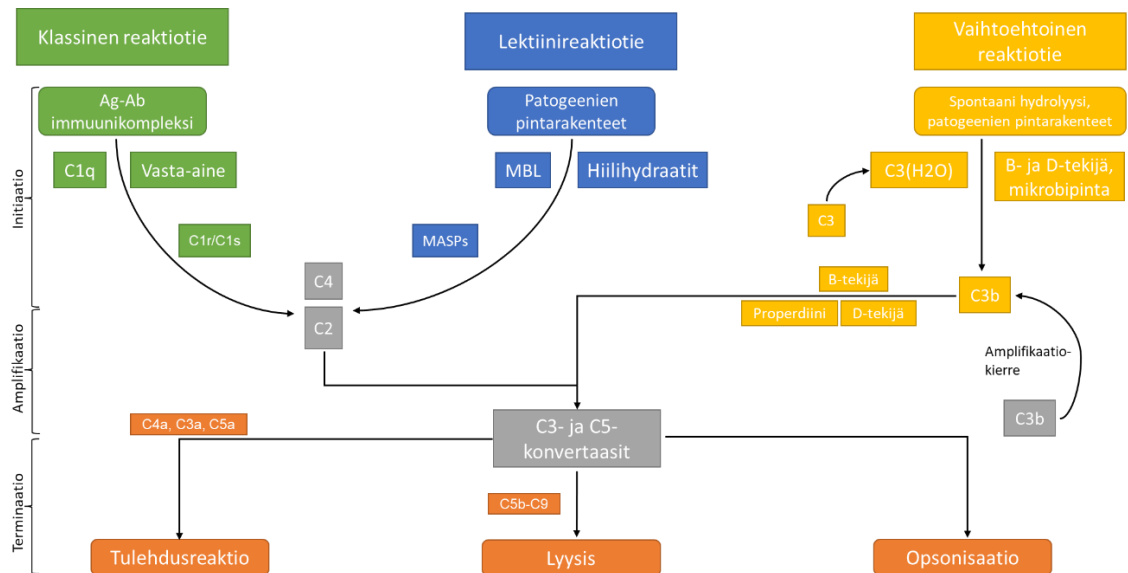
Komplementtisysteemi on osa synnynnäistä immuunipuolustusta, ja se on kehittynyt myös osaksi hankittua immuunijärjestelmää. Näin ollen synnynnäinen ja hankittu immuniteetti työskentelevät yhdessä täydentäen toisiaan. Komplementti on verestä ja kudostesteestä löytyvä liukoinen immuunipuolustusmekanismi, joka toimii ensimmäisenä puolustusmekanismina mikrobi-infektiossa. Komplementti nimenä viittaa seerumin lämpölabiiliin osaan ja sen kykyyn tunnistaa, opsonisoida ja tappaa kohdesolut epäspesifisesti. Se koostuu noin 50 liukoisesta ja solukalvoon sitoutuvista plasma- ja glykoproteiinista. (Atosuo ja muut 2021.) Maksan hepatosyytit tuottavat suurimman osan komplementin komponenteista, mutta endoteeli- ja epiteelisolut voivat myös tuottaa joitakin komponentteja (Lubbers ja muut 2017). Komplementti on tarkasti säädelty proteiinikaskadi, jonka tärkeimpiä tehtäviä on edistää leukosyyttivasteen aktivoitumista, patogeenien opsonisointia ja kemotaksista, kun patogeenit on tunnistettu. Se osallistuu myös fysiologisiin prosesseihin, esimerkiksi apoptoosiin, hematopoieesiin ja koagulaatioon. Alkuun luultiin, että komplementtisysteemi löytyy vain selkärankaisilta, mutta komplementin komponentti C3 on löydetty esimerkiksi myös ravuilta ja korallieläimiltä, joilla ei ole vielä funktionaalisesti toimivaa komplementtia. (Dunkelberger ja Song 2010.) Meritähdiltä ja madoilta taas löytyy funktionaalisesti toimiva komplementti. Nämä löydöt todistavat sen, että komplementti on evolutiivisesti vanha. (Punt ja muut 2019).

Komplementin aktivaatioon liittyvät komponentit voidaan jakaa seitsemään eri ryhmään: komplementin aloittavat komponentit, entsyymaattiset välittäjäyhdisteet, solukalvolle sitoutuvat komponentit, tulehdusvälittäjäaineet, solukalvolle hyökkäävät proteiinit, komplementtireseptorit ja komplementin säätelyproteiinit. Nämä komponentit muodostavat 15 % plasman proteiinifraktiosta, kun kokonaispitoisuus on 3 mg/ml. Komplementin aloittavat komponentit, kuten C1q ja fikoliinit, nimensä mukaisesti aloittavat komplementtikaskadin. Entsyymaattiset välittäjäyhdisteet ovat proteolyttisiä ja

näin ollen pilkkovat ja aktivoivat muita komplementin proteiineja. Solukalvoon sitoutuvat komponentit ovat komplementin komponenttien hajoamistuotteita. Ne sitoutuvat patogeenien pinnalle ja opsonoivat ne. Tulehdusvälittäjäaineet C3a, C4a ja C5a sitoutuvat verisuonten endoteelisolujen reseptoreihin ja aktivoivat kapillaarien läpimitan kasvun. Tämä lisää verenkiertoa tulehduspaikalle. Solukalvolle hyökkäävät proteiinit muodostavat komplementin kalvohyökkäyskompleksin (engl. *membrane attack complex*, MAC). Komplementtireseptorit (engl. *complement receptor*, CR) aikaansaavat solusignaaloinnin ja -vasteen sitomalla komplementtisysteemin komponentteja. Säätelijäproteiinit säätelevät komplementin toimintaa ja suojaa kudoksia epäspesifiseltä lyysikseltä. (Punt ja muut 2019).

### 1.1 Komplementtisysteemin reaktiotiet

Nisäkkäiden komplementtisysteemiin kuuluu kolme reaktiotietä, jotka ovat klassinen reaktiotie (engl. *classical pathway*, CP), lektiinireaktiotie (engl. *lectin pathway*, LP) ja vaihtoehtoinen reaktiotie (engl. *alternative pathway*, AP) (kuva 1). CP aktivoituu, kun pääasiassa antigeeneihinsä sitoutuneet IgG-vasta-aineet sitoutuvat C1-komponenttiin. LP muistuttaa CP:tä, mutta sen aktivaatio ei ole yhtä spesifinen. Se aktivoituu, kun patogeenin pinnalta tunnistetaan mannoosin tähteitä C1-antigeeni-vasta-aineen sijaan. AP kuuluu synnynnäiseen immuniteettiin ja sen ajatellaan olevan fylogeneettisesti nisäkkäiden vanhin reaktiotie. Se aktivoituu, kun C3b-komponentti sitoutuu patogeenin pintaan ja C3:n spontaanin hydrolyysin kautta. Kaikki kolme reaktiotietä aktivoivat lopulta C3-komponentin, joka saa aikaan MAC-kompleksin muodostumiseen ja aktivoitumisen. (Atosuo 2015.) Se toimii myös opsoniinina ja tehostaa fagosytoosia sitoutumalla neutrofiilien ja makrofagien pinnalla oleviin komplementtireseptoreihin. Komplementin aktivoituminen johtaa tulehdusvasteen syntyyn, jolloin patogeeni tapetaan ja hajotetaan. Komplementtisysteemillä on tärkeä osa immunokompleksin muodostamisessa. (Atosuo ja muut 2021; Chaplin 2010.)



**Kuva 1 Komplementtisysteemin kolme reaktiotietä.** Komplementtisysteemi voi aktivoitua kolmen eri reaktiotien kautta, jotka ovat klassinen reaktiotie, lektiinireaktiotie ja vaihtoehtoinen reaktiotie. Initiaatiovaiheessa näkyy kunkin reaktiotien initiaatiokomponentit ja niiden sitoutumiskohteet. Amplifikaatiovaiheessa reaktiotiet alkavat tuottamaan C3-konvertaaseja. Lopulta kaikki reaktiotiet johtavat MAC-kompleksin (C5b-C9) muodostumiseen, ja tämä saa aikaan patogeenein lyysauksen. C4a, C3a ja C5a säätelevät tulehdusreaktiota. C3b toimii opsoniinina. Kuva on adaptoitu lähteestä Dunkelberger ja Song 2010.

### 1.1.1 Klassinen reaktiotie

Komplementtisysteemin klassinen reaktiotie oli ensimmäinen reaktiotie, joka löydettiin 1800-luvun lopulla. Se aktivoituu, kun yksi C1q- ja kaksi C1r- sekä C1s-komponenttia muodostavat C1-kompleksin. Molekyylien liittyminen toisiinsa on kalsiumriippuvaista. C1-kompleksi sitoutuu vähintään kahteen IgG- tai IgM-immunoglobuliinien Fc-alueeseen C1q:n avulla. Kun C1q sitoutuu immunoglobuliineihin, se saa aikaan seriiniproteaasien C1r ja C1s aktivoitumisen. Immunoglobuliinit ovat sitoutuneet patogeenein pinnalta löytyviin epitooppiin. IgM on tehokkain klassisen reaktiotien aktivoija, sillä se aktivoi komplementin sata kertaa tehokkaammin kuin IgG. C1q ei kuitenkaan pysty sitoutumaan plasmassa vapaana olevaan IgM:ään, koska vasta-aineen rakenne on tasomainen. (Punt ja muut 2019). Akuutin faasin vaikuttajat, kuten C-reaktiivinen proteiini (engl. *C-reactive protein*, CRP), amylaasi ja suora sitoutuminen patogeeniin voivat myös aktivoida sen. (Oikonomopoulou ja muut 2012.) C1r:n ja C1s:n autokatalyyttinen aktivaatio saa aikaan C4- ja C2-komponenttien hajottamisen isompiin (C4b, C2a) ja pienempiin (C4a, C2b) fragmentteihin. C4b sitoutuu tioesterisidoksella patogeenein pinnalla olevaan hydroksyyli- tai aminoryhmään, ja tämä johtaa patogeenein opsonisaatioon. C4bC2a-konvertaasi muodostuu patogeenein pinnalla, ja se hajottaa C3-komponentin C3a:ksi ja C3b:ksi. C3a toimii anafylatoksiinina ja C3b on opsoniini. C3b

sitoutuu C4bC2a:han muodostaen klassisen ja lektiinireaktiotien C5-konvertaasin, C4bC2aC3b:n. (Dunkelberger ja Song 2010; Oikonomopoulou ja muut 2012.) CP lisää vasta-aineiden vaikutuksia ja se yhdistää luontaisen ja hankitun immunitetin (Atosuo ja muut 2021).

### 1.1.2 Lektiinireaktiotie

Lektiinireaktiotie ei ole riippuvainen immunoglobuliineista. Se aktivoituu, kun mannoosia sitovan lektiini (engl. *mannose-binding lectin*, MBL) tai fikoliini sitoutuu patogeenin pinnalla oleviin hiilihydraatteihin, kuten mannoosiin tai N-asetyyli-glukoamiiniin. MBL on kollektiiniperheeseen kuuluva reseptori, joka muodostaa C1-kompleksin kaltaisen kompleksin MBL:ään liittyvien seriiniproteaasien (engl. *MBL-associated serine protease*, MASP) 1, 2 ja 3 kanssa. Nämä MASP:t ovat toiminnaltaan ja rakenteeltaan samankaltaisia kuin C1r ja C1s. MBL:n sitoutuminen patogeenin pinnalle johtaa MASP:ien aktivoitumiseen, jotka pilkkovat C2- ja C4-komponentit. Tämän jälkeen muodostuu C3-konvertaasi, joka on sama kuin CP:llä. (Dunkelberger ja Song 2010; Oikonomopoulou ja muut 2012.)

### 1.1.3 Vaihtoehtoinen reaktiotie

Vaihtoehtoinen reaktiotie eroaa CP:stä ja LP:stä. Natiivilla C3:lla on piilotettu tioesteriryhmä, joka paljastuu proteolyyttisen tai konformationaalisen aktivaation kautta. Tämä saa aikaan sen, että AP on koko ajan matalalla tasolla aktiivinen, mikä taas saa aikaan sen, että komplementtisysteemi voi käynnistyä nopeasti patogeeni-infektion yhteydessä. Se käynnistyy C3:n matalatasoisella ja spontaanilla hydrolyysillä C3b-analogiksi, joka on C3(H<sub>2</sub>O). Analogi sitoutuu B-tekijään (engl. *factor B*, fB) magnesiumin läsnä ollessa, jolloin D-tekijä (engl. *factor D*, fD) voi pilkkoa fB:n Bb:ksi ja Ba:ksi. Bb-fragmentti muodostaa C3-konvertaasin, joka on C3(H<sub>2</sub>O)Bb. C3-konvertaasi muodostaa amplifikaatiokierteen pohjan, jossa C3-komponentti muutetaan C3b:ksi ja C3a:ksi. C3b sitoutuu patogeenien pinnalle aikaansaaden niiden opsonisaation. Se voi sitoutua myös fB:ään, jolloin muodostuu AP:n hallitseva C3-konvertaasi C3bBb. Tätä konvertaasia voidaan stabiloida properdiinin avulla, mikä vahvistaa AP:n ja amplifikaatiokierteen aktivoitumista ja näin ollen myös komplementin aktivoitumista.

C3b ja C3(H<sub>2</sub>O) inaktivoidaan proteaasi faktori I:llä (Dunkelberger ja Song 2010; Oikonomopoulou ja muut 2012.)

Hiljattain on kuvailtu kaksi lisämekanismia, joilla komplementtisysteemi voi aktivoitua. Näiden fysiologisia rooleja ei vielä tunneta. Ensimmäinen mekanismi hyödyntää properdiinia, joka voisi edistää uuden C3-konvertaasin muodostumista, kun se immobilisoidaan inerttiin pintaan, jossa se voisi aloittaa C3-konvertaasin muodostumisen mikrobipinnoilla. Tätä on tutkittu knock-out-hiirillä, ja tutkimukset tukevat properdiinin roolia initiaatiossa. Toisessa mekaniismissa käytetään proteaaseja, jotka eivät liity komplementtiin. Näitä ovat esimerkiksi kallikreiini ja trombiini. Proteaasit voivat suoraan pilkkoa C3- ja C5-komponentit, jolloin muodostuu C3a- ja C5a-anafylatoksiineja. Tämä voi luoda uuden ja mahdollisesti tärkeän yhteyden komplementin ja koagulaatiokaskadin välille. (Dunkelberger ja Song 2010.)

## 1.2 Komplementtisysteemin säätely

Komplementtisysteemin toimintaa säädellään hyvin tarkasti, koska sen yliaktivaatio saattaa aiheuttaa tulehduksellisia sairauksia, kuten immuunikompleksisairauksia tai jopa suoraan kudostuhoa. Komplementtiaktiivisuus on rajoitettava vain patogeenien pinnoille, jotta se ei pääse aiheuttamaan vahinkoa isäntäkudoksille. Monet liukoiset ja solukalvoon kiinnittyneet säätelijäproteiinit huolehtivat komplementin säätelystä. Komplementin aktivoitumista säädellään pääasiassa neljällä tavalla: C3b- ja C4b-komponenttien hajottaminen, C3-konvertaasien ja MAC-kompleksin muodostumisen häiritseminen sekä anafylatoksiinien C3a ja C5a inaktivoiminen. C3b ja C4b käyvät läpi toisen kahdesta vaihtoehdosta, joita ovat aktiivisen konvertaasin muodostumisen estäminen ja sellaisen aktiivisen konvertaasin muodostaminen, joka on samanlainen kuin sen normaali biologinen imperatiivi. Ensimmäisessä vaihtoehdossa C3b:n ja C4b:n muodostumista säädellään konstitutiivisesti aktiivisella seriiniproteaasi I-tekijällä (engl. *factor I*, fI), joka hajottaa komponentit niiden inaktiivisiin fragmentteihin, kuten iC3b, C3c ja C3dg. C3:n epäspesifistä hajottamista säädellään esimerkiksi sopivan komplementin tapauksessa fI:n kofaktoreilla, kuten H-tekijällä (engl. *factor H*, fH) ja komplementtiresptori 1:llä. (Dunkelberger ja Song 2010; Oikonomopoulou ja muut 2012.)

Toisessa vaihtoehdossa säädellään kunnollisen C3-konvertaasien muodostumista erilaisilla inhibiittoreilla. Hajoamista kiihdyttävä tekijä (engl. *decay-accelerating factor*, DAF) inhiboi uuden C3-konvertaasin muodostumista ja lyhentää esimuodostetun konvertaasin puoliintumisaikaa. fH osallistuu myös AP:n C3-konvertaasin hajottamiseen. Monet komplementin säätelijöistä ovat isäntäsolun sisäisiä kalvoproteiineja. fH on nestefaasissa ja se saavuttaa isäntäspesifisen suojan sitoutumalla polyanioneihin, joita ei löydy prokaryooteilta. Se siis sitoutuu ensisijaisesti isäntäsolujen pinnalle ja estää C3-konvertaasin muodostumisen. Viimeinen komplementin säätelyn taso on välttämätön hallitsemattomassa komplementin aktivaatiossa, jossa estetään MAC-kompleksin muodostuminen solukalvoon sitoutuneiden (CD59) tai nestefaasissa olevien (S-proteiini) estäjien avulla. (Dunkelberger ja Song 2010.)

C1 inhibiittori on tärkeä tekijä vaihtoehdoisen reaktiotien C1s- ja C1r-komponenttien ja lektiinireaktiotien MASP1- ja MASP2-komponenttien säätelyssä. Se estää pääasiassa C1s:n liiallisen aktivoitumisen C1r:n automaattisen aktivoitumisen. C1s voi aktivoitua hallitsemattomasti, jos C1 inhibiittori puuttuu. Tämä voi aiheuttaa CP:n liiallisen aktivoitumisen. (Hedman ja muut 2012; Huovinen ja muut 2005.)

### **1.3 Komplementtisysteemi immuunipuolustuksessa**

#### **1.3.1 Kohdesolujen lyysaus**

Komplementin C3- ja C5-konvertaasien alavirrassa C5b sitoutuu C6-, C7, C8- ja useiden C9-molekyyliden kanssa, joka indusoi solujen lyysausta. Näiden kaikkien komponenttien väliset vuorovaikutukset johtavat MAC:n muodostumiseen ja aktivoitumiseen. MAC muodostaa kanavan kohdesolun plasmamembraanin läpi, jolloin patogeenin sisään virtaa solunulkopuolisia nesteitä ja fagolysosomaalisia aineita, kuten lysotsyymeja ja kohdesolusta virtaa ulos esimerkiksi ATP:ta (engl. *adenosine triphosphate*, ATP), natriumia ja aminohappoja. Tämä aiheuttaa kohdesolun lyysiksen tai heikkenemisen. (Atosuo 2015.) Se toimii myös opsoniinina ja tehostaa fagosytoosia sitoutumalla neutrofiilien ja makrofagien pinnalla oleviin komplementtiresptoreihin.

### 1.3.2 Oponisaatio

Oponisaatio on mekanismi, joka tehostaa fagosytoosia päällystämällä kohdesolu komplementtisysteemin komponenteilla ja vasta-aineilla. Nämä kiinnittyvät fagosyyttireseptoreihin tehostaen patogeenien nielemistä ja hajottamista. Fagosyyttien pinnalla on esimerkiksi C1q-, C3b- ja iC3b-komponenttien reseptoreita, ja tämän perusteella on ehdotettu, että oponisaatio olisi tärkeämpi tehtävä komplementille kuin bakteerien lyysaus. Vaihtoehtoinen reaktiotie peittää kohdesolun pinnan C3b- ja iC3b-komponenteilla. Patogeenit, joilla on kyky vastustaa komplementin aktiivisuutta, pystyvät häiritsemään komplementin toimintaa C3-tasolla. Suurempien parasiittien tapauksessa eosinofiilisten granulosityttien pinnalla olevat C3b-reseptorit tunnistavat kohdepintaan kiinnittyneet C3b-molekyylit ja immuunivaste aktivoituu. (Hedman ja muut 2012; Huovinen ja muut 2005.)

### 1.3.3 Immuunikompleksien hävittäminen

Immuunikomplekseja muodostuu, kun vasta-aineet reagoivat mikrobien, elintarvikkeiden tai isännän omien hajoavien solujen kanssa. Kompleksien suuremmilla aggregaateilla on taipumus sedimentoitua. Komplementin C4b- ja C3b-komponentit estävät tätä tapahtumaa. Nämä komponentit peittävät muodostuneita immuunikomplekseja, jolloin kompleksit kiinnittyvät neutrofiilireseptoreihin ja joko fagosytoituvat suoraan tai kiinnittyvät erytrosyyttien reseptoreihin, jolloin ne kuljetetaan maksaan tai pernaan hajotettavaksi. C1q:lla on kyky tunnistaa fosfolipideja, jotka ovat muuten solun sisällä, mutta ovat kiertyneet vaurioituneen ja apoptoottisen solun ulkopuolelle ”flip-flop”-mekanismilla, mikä johtaa näiden solujen fagosytoosiin. (Hedman ja muut 2012; Huovinen ja muut 2005.)

### 1.3.4 Tulehdusreaktio ja sen säätely

C3- ja C5-konvertaasien hajoamistuotteet C3a ja C5a ovat tehokkaita anafylatoksiineja. Ne ovat pieniä polypeptidejä, jotka koostuvat 77 ja 74 aminohaposta ja ovat kationisia molekyylejä. Ne ovat tulehdusvälittäjiä, jotka kohdistuvat immuuni- ja ei-immuunisoluihin. C3a ja C5a säätelevät verisuonten laajenemista, lisäävät pienten verisuonien läpäisevyyttä ja indusoivat sileiden lihasten supistumista. Ne voivat aiheuttaa

oksidatiivisen purkauksen makrofageissa, neutrofiileissä ja eosinofiileissä. Ne säätelevät eosinofiilien kationisen proteiinin tuotantoa, sen adheesiota endoteelisoluihin ja migraatiota. Basofiilit ja syöttösolut reagoivat anafylatoksiinien stimulaatioon vapauttamalla histamiinia. C5a on kemoattraktantti esimerkiksi makrofageille, neutrofiileille ja aktiivisille B- ja T-soluille. Anafylatoksiinit edistävät tulehdusvasteita allergisten, infekti- ja autoimmuunisairauksien efektorivaiheessa. (Klos ja muut 2009.)

Anafylatoksiinit välittävät tulehdusreaktionsa kolmen G-proteiinikytkentäisen reseptorien kautta, jotka ovat C3aR, C5aR ja C5L2. C3aR sitoo spesifisesti C3a:ta, mutta se ei tunnista C5a:ta, josta puuttuu arginiini. Muihin reseptoreihin verrattuna C3aR:lla on suuri toinen solunulkoinen silmukka, joka on välttämätön ligandin sitoutumiselle. Silmukassa sijaitsee tyrosiini 174, jolla on keskeinen rooli C3a:n ja C3aR:n välisessä vuorovaikutuksessa. Reseptorin N-terminaalinen pää ei osallistu sitoutumiseen. C3a:n sitouduttua reseptoriin solunsisäistä signaalinsiirtoa edistetään G-proteiinien avulla. Neutrofiileissä C3aR signaloi hinkuyskämyrkylle herkkien G-proteiinien kautta ja saa aikaan kalsiumvirtoja solunulkoisesta väliaineesta. Syöttösoluissa se edistää sytokiinien ilmentymistä. C5aR sitoo spesifisesti C5a:ta. Tähän tarvitaan kaksi erillistä kohtaa C5aR:ssa: reseptorin N-terminaalinen pää on vuorovaikutuksissa C5a:n ytimen kanssa ja C5a:n C-terminaalinen on vuorovaikutuksissa sitoutumistaskun kanssa. Jälkimmäinen on välttämätön reseptorin aktivoitumiseen. Tämänkin reseptorin signaalinsiirtoa edistetään G-proteiinien avulla. C5a:n sitoutuminen C5aR:aan aikaansaa kalsiumvirtoja sekä solunsisäisistä varastoista että solunulkoisesta väliaineesta. C5a sitoutuu suurella affiniteetilla myös C5L2:een. C5L2 käyttää N-terminaalisen päänsä tähteitä sitoutuakseen C5a:han, josta puuttuu arginiini. Se sitoo myös C3a:ta ja C4a:ta. Se ei pysty sitomaan G-proteiinia. (Klos ja muut 2009.)

Anafylatoksiinien säätely on tärkeää, ja niitä varten on kehittynyt säätelymekanismeja. Karboksipeptidaasit säätelevät niiden aktiivisuutta verenkierrassa ja kudoksissa katkaisemalla nopeasti C-terminaalisen arginiinitähteen. C5a, josta puuttuu arginiini, säilyttää noin 1–10 % tulehdusaktiivisuudesta, kun taas C3a:lla, josta puuttuu arginiini, ei ole ollenkaan tulehdusaktiivisuutta. (Klos ja muut 2009.)



## 1.4 Lämpötila ja komplementtisysteemi

Hypotermian vaikutus komplementtisysteemin aktivaatioon on edelleen tuntematon. Komplementtisysteemin aktivaatio hidastuu huomattavasti erittäin matalissa lämpötiloissa (0–4 °C). Shah tutkimusryhmineen (Shah ja muut 2014) tutkivat komplementin aktivaation hemolyyttisillä testeillä hypotermisissä lämpötiloissa. 31 °C:een lämpötilassa oli noin yhdeksän kertaa enemmän hemolyysiä verrattuna 41 °C:een ja kaksinkertainen määrä verrattuna 37 °C:een. Näiden tulosten perusteella klassisen reaktiotien tuottama komplementin aktivaatio lisääntyi terapeuttisessa hypotermiassa (32–34 °C). Tämän lisäksi he tutkivat mitä tapahtuu, jos ihmisen ruumiinlämpö laskee 37 °C:sta ensin 24 °C:een ja siitä vielä 13 °C:een. Tutkimusten tuloksissa havaittiin samanlainen kaksinkertainen vasta-aineen aiheuttama komplementin aktivaatio, mutta 0–13 °C:ssa komplementin aktivaatio oli minimaalista. Vaihtoehtoisen reaktiotien tutkimuksissa ei huomattu eroa komplementin tuottamassa lyysiksessä terapeuttisessa hypotermiassa, mutta 24 °C:ssa ja matalammissa lämpötiloissa aktivaation inhibitio lisääntyi merkittävästi. Näiden tulosten perusteella klassisen reaktiotien aikaansaama aktivaatio lisääntyi hypotermiassa verrattuna normaaliin ruumiinlämpöön. Tämä voi viitata siihen, että läpivirtauksen palautumisen aikana tapahtuva komplementin aktivaatio saattaa lisätä komplementtivälitteistä kudosaauriota. (Shah ja muut 2014).

## 2 Komplementtisysteemin aktiivisuuden mittaaminen

### 2.1 Komplementin funktionaalinen mittaus

Hemolyyttistä mittausta on yleensä käytetty komplementin toiminnan tutkimuksissa. Se antaa tietoa koko kaskadireaktion toiminnasta ja sitä käytetään, kun epäillään komplementtikomponentin puutosta. Hemolyyttinen mittaus aloitetaan inkuboimalla analysoitavan näytteen sarjalaimennoksia vasta-aineherkistettyjen lampaiden punasolujen kanssa tietyssä lämpötilassa. Minimikonsentraation pitää tuottaa 50 % lyyysis. Yleensä tulokset ilmaistaan laimennoksina, jotka tarvitaan tuottamaan 50 tai 100 % lyyysis. CH50 mittaa klassisen reaktiotien toimintaa. Vaihtoehtoista reaktiotietä voidaan mitata AH50 avulla. (Ling ja Murali 2019; Ohtani 2021.)

Näissä testeissä kohdesoluina on marsun, kanin tai kanan punasoluja. CP:n toiminta estetään etyleeniglykoli-tetra-etaanihapon (engl. *ethylene glycol tetraacetic acid*, EGTA) avulla. Komplementin toimintaa voidaan tutkia myös komplementin yksittäisten komponenttien toimintaa. Yksittäisen komponentin tutkiminen on helpointa suorittaen, että palautuuko seerumin hemolyyttinen aktiivisuus, kun siihen lisätään puhdistettua puuttuvaa komponenttia. Nämä mittaukset ovat herkkiä komplementin aktivaatiolle *in vitro*. Jos seerumia on esimerkiksi lämpökäsitelty tai pidetty pitkään huoneenlämmössä, hemolyyttinen aktiivisuus vähenee. Tämän vuoksi on tärkeää käyttää tuoretta, enintään 48 h vanhaa, seerumia tai näytettä on säilötty 70 °C:ssa testaukseen asti. (Kirschfink ja Mollnes 2003; Mollnes ja muut 2007.)

Komplementin toimintaa voidaan mitata myös käyttämällä entsyymivälitteistä immunosorbenttimäärittäyksiä (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA). ELISA-kitit kykenevät havaitsemaan komplementin yksittäisiä komponentteja, joten näitä alettiin käyttämään klassisen ja vaihtoehtoisen reaktiotien puutteiden seulontaan. Klassisen reaktiotien mikrotiiterilevyt on pinnoitettu IgM:lla ja vaihtoehtoisen reaktiotien levyt lipopolysakkaridilla. Komplementin aktivaation havaitsemiseksi käytetään joko monoklonaalista vasta-ainetta C9:a tai properdiinia vastaan. Lektiniireaktiotie saadaan aktivoitua pinnoittamalla levy mannaanilla. CP:n ja AP:n aktivaatio pitää estää, jotta voidaan tutkia LP:ta. Koska näissä levyissä kaikki reaktiotiet ovat erillään, kehitettiin ELISA, jossa kaikki kolme reittiä ovat (Wielisa®, Wieslab, Lund, Ruotsi). Tämä on helppo suorittaa ja sillä on etuuksia verrattuna hemolyyttisiin mittauksiin: se ei ole riippuvainen punasolujen saatavuudesta, se kattaa kaikkien kolmen reitin tutkimisen ja se havaitsee properdiinipuutoksen. (Mollnes ja muut 2007.)

## **2.2 Komplementin antimikrobiaalisen aktiivisuuden mittaaminen**

Seerumin bakterisidiaktiivisuutta (engl. *serum bactericidal activity*, SBA) mittaavaa määrittäystä käytetään vasta-aineiden komplementtiin liittyvän antimikrobiaalisen vaikutuksen mittauksissa. Tämän menetelmän avulla voidaan arvioida infektioiden ja rokotteiden tuottamien vasta-aineiden vaikutusta komplementtisysteemin aktiivisuuteen. Menetelmää voidaan käyttää myös synnynnäisen immunitetin tutkimuksissa esimerkiksi määrittämällä tietyn sairauden esiintyvyyttä eri ikäryhmissä. Yleensä SBA-määrittäykset

suoritetaan inkuboimalla seerumista tehtyjä laimennoksia patogeenin ja eksogeenisen komplementin kanssa. Patogeenispesifinen vasta-aine sitoutuu patogeenin pinnalla oleviin proteiini- ja hiilihydraattirakenteisiin. C1q voi tämän jälkeen sitoutua vasta-aineen Fc-alueeseen, jolloin komplementtisysteemi pääsee aktivoitumaan klassisen reaktiotien kautta. Tämä johtaa lopulta patogeenin lyysaukseen. Tämä SBA mittaa siis vain klassisen reaktiotien antimikrobiaalista aktiivisuutta. Klassisen ja vaihtoehdoisen reaktiotien antimikrobiaalisia eroja mitattu bioluminesenssimittausten avulla. Näiden tutkimusten perusteella ihmisen klassinen reaktiotie on bakteerien tappamisen perusteella jopa viisinkertaisesti aktiivisempi kuin vaihtoehtoinen reaktiotie. Komplementtisysteemin tappotehokkuutta voidaan arvioida, kun kunkin seerumilaimennoksen SBA-reaktioseos maljataan ja maljalta lasketaan pesäkkeen muodostavat yksiköt (engl. *colony forming units*, CFU). Maljaaminen ja CFU:n laskeminen maljoilta on työlästä, jonka vuoksi on kehitetty esimerkiksi fluorometrisiä SBA-menetelmiä. (Kilpi ja muut 2009; Necchi ja muut 2017.)

### **3 Bakteerien elinkelpoisuus**

Bakteerien ja muiden mikro-organismien toiminta vaikuttaa ihmisten hyvinvointiin, joten niiden toiminnan kontrollointi on tärkeää. Bakteerien elinkelpoisuuden tunteminen on olennaista, kun pyritään luomaan suotuisat elinympäristöt niiden selviytymiselle ja aktiivisuudelle esimerkiksi teollisuudessa ja probiootteina elintarvikkeissa. On myös tärkeää tuntea bakteerien kuoleman aiheuttamat uhkat, kun bakteereja yritetään tuhota esimerkiksi niiden uhatessa elämäämme tai elintarvikkeita. (Atosuo 2015.)

Jatkuvasti erilaisille ympäristötekijöille altistuvien solujen elinkyvyn mittaaminen on tärkeä osa mikrobiologiassa ja immunologiassa. Se on myös kiistanalaista, sillä bakteerikasvustossa on sekä eläviä että kuolleita soluja. Bakteerien elinkykyisyys määritellään yleensä bakteerien kykynä jakaantua sopivissa elatusaineissa tai muodostaa pesäkkeitä kiinteässä agaralustassa, jossa on sopivat ravintoaineet ja fysikaaliset olosuhteet. Elinkelpoisuus ja viljeltävyys eivät kuitenkaan ole synonyymeja toisilleen, vaikka kuolleet tai kuolemassa olevat bakteerit ovat menettäneet viljelykelpoisuutensa. Useimmat bakteerit kykenevät jakaantumaan luonnossa erilaisissa olosuhteissa, mutta niiden aktiivisuuden yksityiskohtainen tutkimus on mahdollista vain keinotekoisissa olosuhteissa. Luonnollisissa olosuhteissa bakteerit tasapainoilevat jatkuvasti

jakaantumisen ja kuoleman välillä. Laboratorio-olosuhteissa bakteereja on mahdollista säilyttää kauemmin elinkykyisinä. (Atosuo 2015.)

Kuolleiden bakteerien määritelmä on yhtä monitahoinen kuin niiden elinkelpoisuus. Bakterisolukuoleman kriteerinä on perinteisesti pidetty bakteerien kasvun ja metabolisen aktiivisuuden puuttumista. Elinkykyiset bakteerit voivat kuitenkin olla lepotilassa, jolloin niiden viljeleminen tietyissä olosuhteissa ei ole mahdollista. Lisäksi kuolleet bakteerit kykenevät tuottamaan aineenvaihduntaan viittaavia merkkejä ja tuottaa sekundaarisia metaboliitteja inaktiivisesti diffundoimalla liuenneita yhdisteitä ympäristöön. Kuoleva bakteeri voi myös säilyttää eheyden, eikä solujen hajoaminen viittaa aina kuolemaan. Tietyissä olosuhteissa elinkelpoiset ja viljeltävät bakteerit voivat muuttua ei-viljeltäviksi soluiksi (engl. *viable but non-culturable*, VBNC). Ne ovat metabolisesti aktiivisia, mutta ne eivät jakaannu. Bakteerit muuttuvat VBNC-soluiksi esimerkiksi soluvaurioiden ja erilaisten stressitekijöiden läsnä ollessa, kuten lämpö, kuivuus ja osmoottinen paine. Tässä tilassa bakteerit eivät ole eläviä eikä kuolleita, eikä niitä voida havaita elinkelpoisuustutkimuksissa. Näiden tietojen pohjalta bakteerit voidaan jakaa kolmeen luokkaan niiden elintilan mukaan: elinkelpoiset, lepotilassa olevat ja kuolleet solut. (Atosuo 2015.)

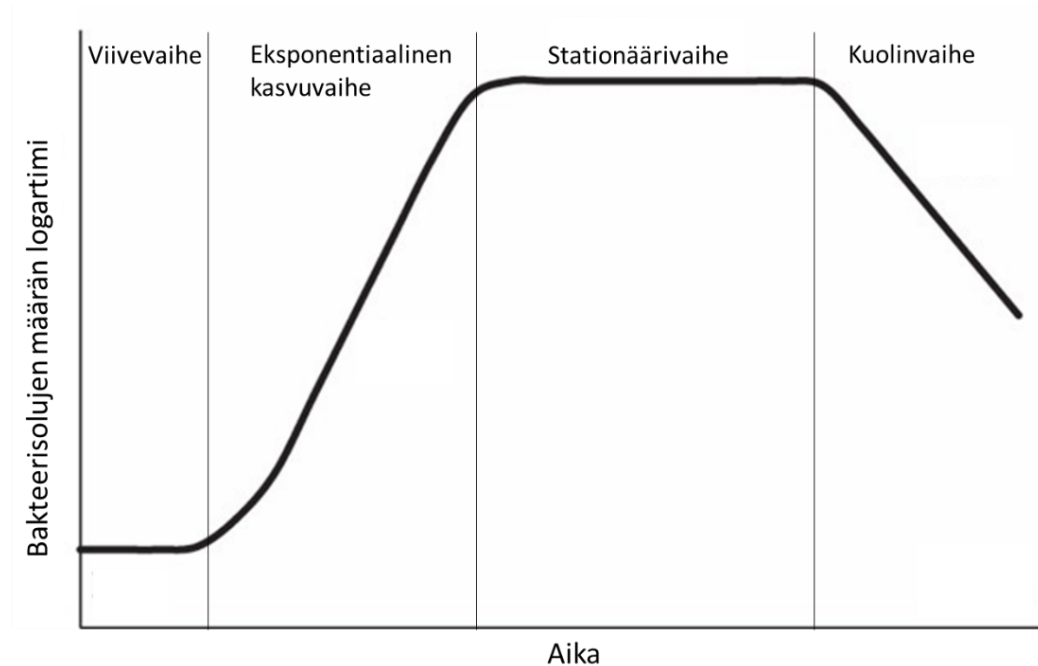
### **3.1 Bakteerien kasvun ja elinkelpoisuuden mittaaminen**

Bakterisolujen pienen koon vuoksi *in vitro*-kasvua tutkitaan yleensä mittaamalla suuremman bakteeripopulaation kasvua nestemäisessä kasvatusmediumissa. Kasvua mitataan yleensä spektrofotometrin avulla, joka mittaa näytteen ”sameutta”. Tämä tarkoittaa bakteerisuspension läpi kulkevan valon voimakkuuden mittaamista. Mitä enemmän näytteessä on soluja, sitä sameampi näyte on ja näytteen läpi kulkee vähemmän valoa. Spektrofotometrin avulla mitataan optista tiheyttä (engl. *optical density*, OD). OD antaa mahdollisuuden seurata bakteerien kasvua reaaliaikaisesti. Sameus ei kuitenkaan erota eläviä soluja kuolleista soluista. Elinkykyisten solujen määrää voidaan mitata usealla menetelmällä. Yleisin on bakteerisuspensiolaimennosten maljaaminen ja laskemalla maljoilla olevien pesäkkeiden kokonaismäärä. Tämän avulla voidaan laskea kunkin laimennoksen bakteerimäärät ja arvioida bakteerien määrä millilitrassa kohtuullisella tarkkuudella. Lisäksi bakteerien määrää voidaan mitata virtaussytometrin

tai mikroskoopin avulla. Nämä erottavat elävät ja kuolleet solut toisistaan esimerkiksi soluvärjäyksen avulla. (Adams 1995; Salkinoja-Salonen 2002.)

### 3.2 Bakteerien kasvuvaiheet puhtasviljelmässä

Bakteerien kasvu on monimutkaista ja siihen osallistuu monia tekijöitä. Bakteerit saavat kasvualustasta tarvittavia molekyylejä sytoplasman ja kalvon syntetisoimiseen. Bakteerien jakaantuminen tapahtuu yleensä säännöllisin väliajoin. Kun bakteereja siirretään nestemäiseen kasvumediumiin, bakteerimäärän avulla voidaan määrittää eri kasvuvaiheita. Kasvuvaiheet voidaan jakaa viive-, eksponentiaaliseen kasvu-, stationääri- ja kuolinvaiheeseen. Nämä vaiheet voidaan esittää kasvukäyränä ajan funktiona (kuva 2). Y-akselilla on yleensä bakteerien lukumäärän logaritmi, mutta se voi olla myös massa tai jokin muu suure. (Madigan ja muut 1997; Prescott ja muut 2006.)



**Kuva 2** Tyypillinen logaritminen bakteerien kasvukäyrä ja sen eri vaiheet ajan funktiona. Viivevaiheessa bakteerit sopeutuvat elinympäristöönsä. Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa bakteerien kasvunopeus on suurin mahdollinen. Stationäärivaiheessa bakteerisolujen jakautuminen ja kuoleminen ovat tasapainossa. Kuolinvaiheessa bakteerisolut kuolevat. Kuva on muokattu lähteestä Wang ja muut 2015.

### 3.2.1 Viivevaihe

Bakteerien ensimmäinen vaihe on viivevaihe, jota voidaan kutsua myös lag-vaiheeksi. Siinä bakteerit sopeutuvat uuteen kasvuympäristöönsä. Kasvu alkaa solukoon kasvulla ilman välitöntä solumäärän kasvua. Viivevaiheen aikana syntetisoidaan uusia olennaisia komponentteja ennen solujen jakautumista. Näitä ovat esimerkiksi ATP, välttämättömät kofaktorit, membraanilipidit, ribosomit ja DNA. Viivevaiheen aika vaihtelee paljon riippuen kasvualustasta ja mikrobin tilasta. Solujen metabolinen aktiivisuus kasvaa tässä vaiheessa ja saavuttaa maksimin tämän vaiheen lopussa tai seuraavan kasvuvaiheen alussa. (Madigan ja muut 1997; Prescott ja muut 2006.)

### 3.2.2 Eksponentiaalinen kasvuvaihe

Viivevaihetta seuraa eksponentiaalinen kasvuvaihe, jota voidaan kutsua myös log-vaiheeksi. Eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa bakteerit alkavat jakautumaan säännöllisesti ja suurimmalla mahdollisella nopeudella. Bakteerien määrän kaksinkertaistumiseen kuluva aika kutsutaan keskimääräiseksi generaatioajaksi, joka tarvitaan kunkin bakteerisolun jakautumiseen kahdeksi tytärsoluksi. Eksponentiaaliseen kasvunopeuteen vaikuttaa kolme tekijää, jotka ovat inkubointilämpötila, mediumin laatu ja bakteerilaji. Bakteerien väliset generaatioajat vaihtelevat paljon, esimerkiksi *E. coli* voi jakautua jopa kerran 20 min aikana, kun taas *tubercle bacillus* -bakteerien generaatioaika on monta tuntia. Voimakkaasti kasvavassa eksponentiaalisessa kasvuvaiheessa mikrobipopulaatio on kemiallisilta ja fysiologisilta ominaisuuksiltaan yhtenäisin ja elinkelpoisiin. Tämän vuoksi biokemiallisissa tutkimuksissa käytetään usein 28 eksponentiaalisen vaiheen mikrobiviljelmää. Lisäksi antimikrobiaalisia analyysejä tehtäessä viivevaiheen tai varhaisen log-vaiheen solut ovat yleensä herkempiä lämpökäsittelylle ja kemiallisille aineille kuin kypsemät solut. Eksponentiaalisen kasvuvaiheen lopussa mikrobien määrä jatkaa kasvuaan, mutta hitaammin. (Madigan ja muut 1997; Prescott ja muut 2006.)

### 3.2.3 Stationäärivaihe

Solujen loputon kasvaminen ei ole mahdollista, ja eksponentiaalista kasvuvaihetta seuraa stationäärivaihe. Stationäärivaiheessa elinkelpoisten solujen määrä pysyy vakiona. Tässä

vaiheessa bakteerisolujen määrä on noin  $10^8$  solua/ml. Solujen jakautuminen ja kuoleminen tasapainottavat toisiaan, tai solut ovat metabolisesti aktiivisia, mutta ne eivät jakaudu. (Madigan ja muut 1997; Prescott ja muut 2006.) Bakteerien jakautumisen vähenemiseen vaikuttaa kasvualustan ravinteiden vähentymisestä, koska jokaisen solujakautumisen jälkeen tarvittavien komponenttien ja energian määrä kaksinkertaistuu teoreettisesti. Lisäksi haitalliset aineenvaihduntatuotteet ja asteittainen hapenpuute aerobisten bakteerien kohdalla hidastavat jakautumista. (Siegele ja Kolter 1993.)

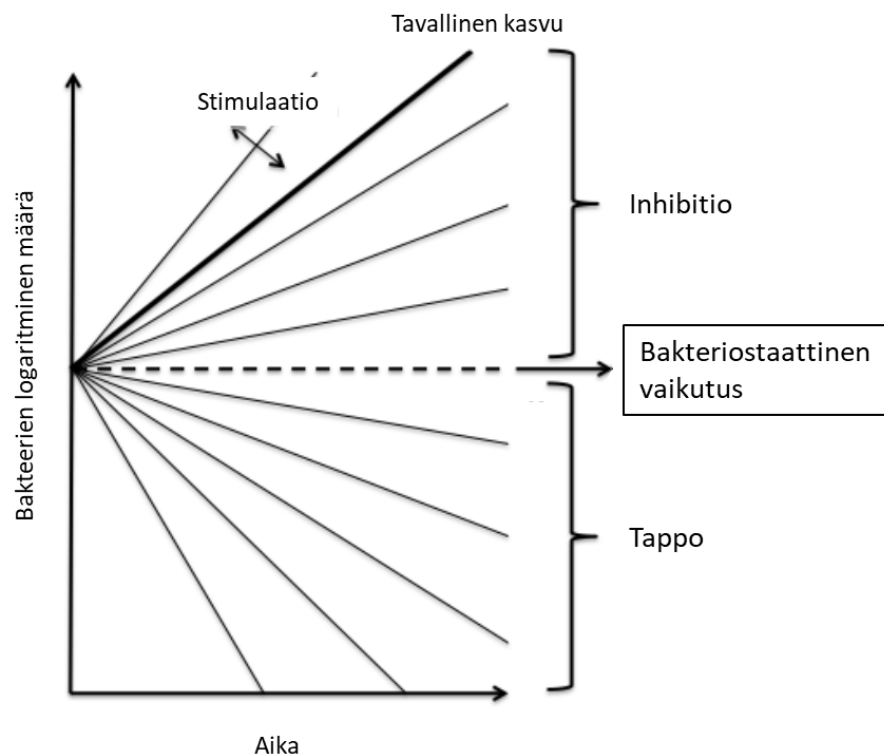
### **3.2.4 Kuolinvaihe**

Kuolinvaihe on kasvukäyrän viimeinen vaihe. Tässä vaiheessa elinkelpoiset bakteerit menettävät kykynsä jakautua ja kuolleiden solujen määrä kasvaa verrattuna eläviin soluihin. Solujen kuoleminen voi olla logaritminen riippuen esimerkiksi kasvualustasta ja muista mahdollisista mukana olevista mikrobeista. Yleensä suurin osa mikrobipopulaatioista kuolee logaritmisesti. Kuoleman käyrä voi olla monimutkainen, sillä kun suurin osa populaatiosta on kuollut nopeasti, kasvustoon voi muodostua pieni populaatio vastustuskykyisiä soluja. (Madigan ja muut 1997; Prescott ja muut 2006; Salle 1948.)

### **3.3 Bakteerien kuolema**

Useat kemialliset, fysikaaliset ja biologiset tekijät voivat aiheuttaa bakteerisolujen kuoleman. Useimmat kemikaalit aiheuttavat sopivissa pitoisuuksissa bakteerien kuoleman, mutta harvoin käytössä olevien tuotteiden pitoisuudet ovat alhaisempia. (Madigan ja muut 1997; Prescott ja muut 2006.) Aineet, jotka ovat sopivassa pitoisuudessa bakterisidisiä, ovat yleensä pienemmissä pitoisuuksissa inhiboivia ja voivat stimuloida bakteerien kasvua pitoisuuden laskiessa. Kuvassa 6 näkyy kemiallisten aineiden vaikutukset bakteerien jakaantumiseen. Erillään olevat viivat osoittavat, että terävää rajaviivaa ei voida muodostaa. Aineet käyttäytyvät eri organismeissa eri tavalla, jolloin aineiden vyöhykkeiden leveydet vaihtelevat. Bakteerien lukumäärän lisääntyminen ja väheneminen ajan kuluessa on esitetty logaritmisessa kasvuvaiheessa oleville kasvatuksille, joihin on lisätty eri määrä kemiallista ainetta kasvatuksen alussa (nolla-aika). Kun ainetta on vähän, bakteerin kasvukäyrä noudattaa normaalia käyrää. Aineen pitoisuuden lisääntyessä se voi stimuloida bakteerien kasvua. Korkeammilla

pitoisuuksilla kasvunopeus laskee ja pitoisuuden kasvaessa nopeus lähenee nollaa, mutta organismi ei kuole lyhyessä ajassa. Pitoisuuden lisääntyminen johtaa joidenkin solujen kuolemaan ja lopulta saavutetaan pitoisuus, jossa kaikki organismit kuolevat. Bakteerien elintila vaikuttaa kuinka nopeasti bakteeri kuolee. Esimerkiksi nuoret bakteerit kuolevat nopeammin kuin vanhemmat. Stationäärivaiheessa olevat ja VBNC-solut sopeutuvat helpommin elinympäristönsä muutoksiin ja ovat vastustuskykyisempiä kemikaaleille. (Atosuo 2015.)



**Kuva 3 Kemiallisten aineiden vaikutukset bakteerien lukumäärään.** Kemiallinen aine, kuten desinfiointiaine, voi vaikuttaa bakteerin kasvuun ja kuolemaan. Tietyissä pitoisuuksissa se voi jopa stimuloida bakteerien jakaantumista. Pääasiassa se kuitenkin joko inhiboi tai tappaa bakteereja ajan kuluessa. Kuva on muokattu lähteestä Atosuo 2015.

## 4 Bioluminesenssia tuottavat *E. coli*-lux bakteerisolut

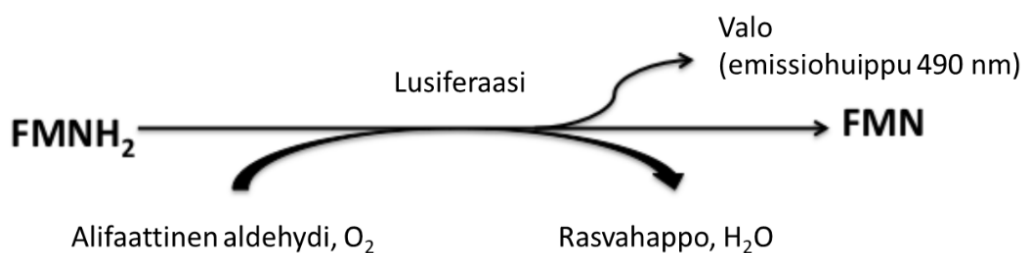
### 4.1 Bakteerien tuottama bioluminesenssi

Bioluminesenssi tarkoittaa elävän organismin kykyä tuottaa valosignaalia. Sitä esiintyy muun muassa hyönteisillä, bakteereilla, kaloilla, kasveilla ja joillakin meressä elävillä selkärangattomilla. Bioluminesenssia tuottavat systeemit voidaan jakaa eri kategorioihin. Valoa suoraan emittoivat proteiinit eivät tarvitse esimerkiksi entsyymien apua valon



tuottamiseen, vaan virityksen oikealla valon aallonpituudella. Nämä proteiinit emittoivat fluoresenssia. Tunnetuin fluoresenssia tuottava proteiini on vihreä fluoresoiva proteiini (engl. green fluorescent protein, GFP), ja sitä käytetään paljon organismien elinkyvyn ja metabolisen aktiivisuuden tutkimuksissa. GFP-geenejä voidaan siirtää muihin eliöihin transformaatiolla. (Atosuo 2015.)

Toinen bioluminesenssia tuottava ryhmä koostuu lusiferaaseista. Lusiferaasit ovat proteiineja, jotka käyttäytyvät kuin entsyymit katalysoimalla reaktioita, joissa syntyy sivutuotteena bioluminesenssia. Bioteknologiassa käytetään eniten kovakuoriaisten ja bakteerien lusiferaaseja. Kaikilla lusiferaaseilla on sama systeemi tuottaa valoa, johon kuuluu lusiferaasi entsyymi ja substraattina toimiva lusiferiini. Yleensä tähän systeemiin liittyvät geenit löytyvät samasta operonista, joten ne ovat helposti siirrettävissä muihin soluihin ja lajeihin. Lusiferaasin katalysoima reaktio, jossa lusiferiinisubstraatit hapettuvat molekulaarisen hapen läsnä ollessa, tuottaa valoemissiota muiden tuotteiden ohella (kuva 4). Bioluminesenssia syntyy, kun heterodimeerinen lusiferaasi luxAB katalysoi alifaattisen aldehydin mono-oksygenaatiota. Tämä tarvitsee molekulaarista happea ja luxAB:n kofaktorina toimivan flaviinimononukleotidin (FMNH<sub>2</sub>). Välituotteena muodostuu virittynyt FMN-4a-hydroksidi, joka tuottaa bioluminesenssia palautumalla matalammalle energiatasolle. Bioluminesenssin emissiohuippu on 490 nm. Reaktion lopputuotteita ovat rasvahappo, vesi ja flaviinimononukleotidi (FMN). (Scott ja muut 2011; Atosuo 2015.)



**Kuva 4 Bakteerien tuottama lusiferaasireaktio.** Lusiferaasin katalysoimassa reaktiossa FMNH<sub>2</sub> muutetaan FMN:ksi, jonka välituotteena syntyy bioluminesenssia. Bioluminesenssin valo on maksimissaan 490 nm. Kuva on muokattu lähteestä Atosuo 2015.

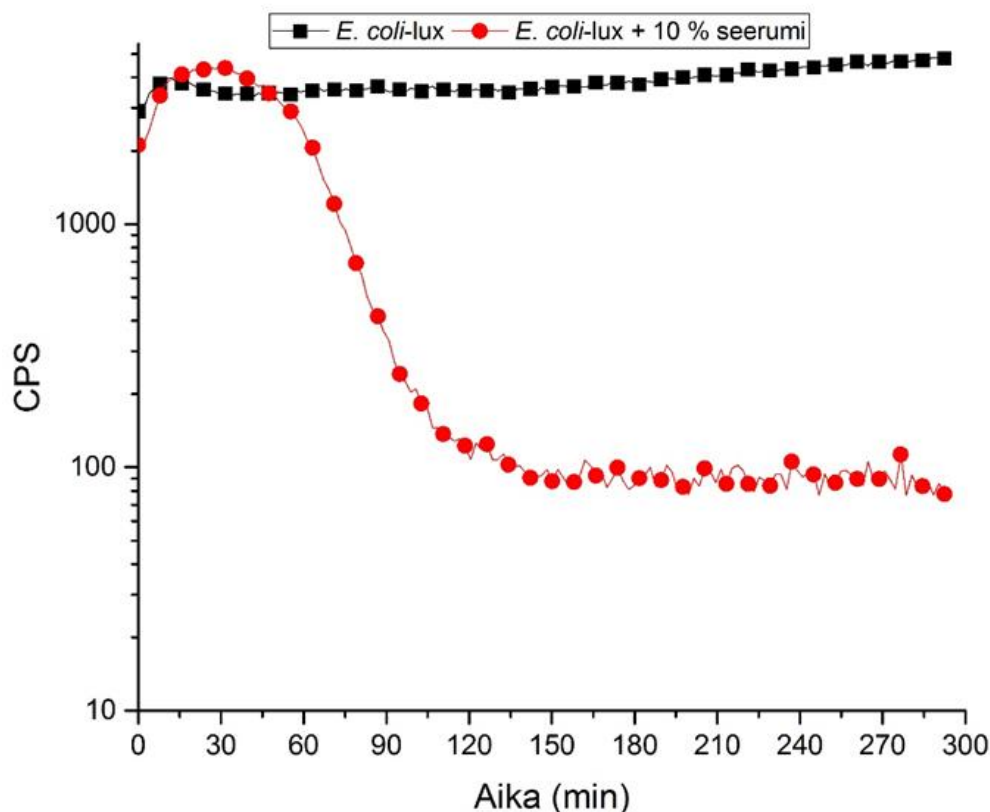
Bioluminesenssia tuottavilla bakteereilla on samat valoa tuottavat ydingeenit. Näitä geenejä on viisi, jotka sijaitsevat *lux*-operonissa *luxCDABE* järjestyksessä. *luxA* ja *luxB*

ovat heterodimeeristä lusiferaasia koodaavia geenejä. *luxC*, *luxD* ja *luxE* ovat taas rasvahapporeduktaasin osia koodaavia geenejä. Monissa tapauksissa kuitenkin koodataan vain geenit *luxAB*. Tämä rakenne on helppo siirtää muihin lajeihin, erityisesti eukaryoottisoluihin. Näiden avulla voidaan tutkia bakteerien elinkelpoisuutta ja erilaisten antimikrobiaalisten aineiden vaikutusta esimerkiksi komplementtisysteemin ja fagosyyttien aktiivisuuksiin. Pitkäketjuisten rasva-aldehydien lisääminen reaktioon indusoi valoemissiota. Lusiferaasien ilmentäminen vaatii metabolisesti aktiivista bakteeria. Bioluminesenssia tuottavien eliöiden välituotteet eivät ole pitkäikäisiä ja ne eivät kerry soluihin. Näiden ominaisuuksien avulla voidaan erottaa elävät solut kuolleista soluista reaaliajassa. Koska *lux*-geenien siirtäminen uusiin lajeihin on yksinkertaista, niitä on alettu käyttää mikrobien kasvukinetiikan seuraamisessa. Luonnossa elävät bioluminesenssia tuottavat bakteerit ovat kaikki gram-negatiivisia bakteereja. Gram-positiivisia bakteereja on saatu tuottamaan bioluminesenssia joko siirtämällä bakteeriin pelkästään *luxAB*-geenit tai muokkaamalla ydingeenien järjestys *luxABCDE* muotoon, joka on sopiva gram-positiivisten bakteerien transkriptiolle. (Atosuo 2015; Brodl ja muut 2018.)

#### 4.2 *E. coli*-lux bakteerikannan hyödyntäminen

Atosuo ja hänen tutkimusryhmänsä on siirtänyt elektroporaation avulla *pEGFP*-plasmidissa *luxABCDE*-geenit *E. coli* K-12 bakteerikantaan. Tämä plasmidi on saanut nimekseen *pEGFPluxABCDEamp*. Nimen lopussa oleva *amp* viittaa ampicilliiniresistenttigeeniin, joka on lisätty plasmidiin selektiopaineen ylläpitämisen vuoksi. Tämä geeni tuottaa  $\beta$ -laktamaasia, joka kykenee hajottamaan ampicilliinin lisäksi muitakin antibiootteja, esimerkiksi penisilliiniä. *E. coli* K-12 *pEGFPluxABCDEamp* on nimetty *E. coli*-lux:ksi. Tämän tuottama bioluminesenssin intensiteetti on suoraan verrannollinen kasvatuksessa olevien elävien bakteerien lukumäärään, jota mitataan mittauksina sekunneissa (engl. *counts per seconds*, CPS). Luminometrin avulla voidaan tutkia reaaliajassa bakteerien bioluminesenssikinetiikkaa, joka kuvaa bakteeripreparaatin aineenvaihduntaa eli elinkykyä (kuva 5). *E. coli*-lux bakteerien tuottamasta bioluminesenssista saadut kinetiikkatulokset korreloivat CFU:n ja osittain OD:n kanssa. OD ei aina laske, vaikka bioluminesenssi laskisi. Tämä riippuu siitä, miten solut kuolevat. Esimerkiksi tietyt kemikaalit ja antibiootit eivät aiheuta bakteerien lyysausta, vaan ne tappavat muulla tavalla. Tällöin bioluminesenssi laskee, mutta OD ei välttämättä laske.

Komplementin lyysatessa bakteerisolut OD laskee myös. Tällä menetelmällä voidaan seurata kasvatuksia, joissa on  $10^2$ – $10^8$  bakteerisolua/kaivo. Bioluminesenssikinetiikasta voitiin erottaa kaikki neljä antimikrobiaalista vaikutusta, jotka ovat stimulaatio, inhibitio, bakteriostaattinen vaikutus ja tappo, kun bakteereja altistettiin eri määriille antimikrobiaalista etanolia ja polymyksiini B:tä. (Atosuo ja muut 2013.)



**Kuva 5 Bakteerisolujen tappokinetiikan seuraaminen.** Bioluminesenssin tuottama signaali on ilmoitettu mittauksina sekunnissa (CPS) ajan funktiona. Kuvassa on pelkkien bakteerisolujen tuottama bioluminesenssi (musta käyrä) ja 10 % seerumin antimikrobiaalinen vaikutus bakteerien kuolemaan (punainen käyrä).

*E. coli-lux* -bakteereja on käytetty immunologian ja toksikologian tutkimuksissa. Soluja on hyödynnetty, kun on tutkittu komplementin mikrobintappoaktiivisuutta. Ensimmäisissä tutkimuksissa on mitattu *E. coli-lux* bakteerien elinkelpoisuutta inkuboimalla niitä 10 % kokoseerumissa ja 10 % EGTA:lla käsitellyssä seerumissa. Näiden tutkimusten tulosten mukaan huomattiin, että reaktioteiden välillä on eroja varsinkin komplementtisysteemin antimikrobiaalisen vaikutuksen aktivoitumisen nopeudessa. Tätä menetelmää on ehdotettu hemolyyttisten kokeiden rinnalle. (Kilpi ja muut 2009; Atosuo ja muut 2013.) Atosuo tutkimusryhmineen on käyttänyt tätä menetelmää sisäilmaongelmille altistuneiden henkilöiden klassisen reaktiotien aktiivisuuden muutosten tutkimisessa (Atosuo ja muut 2021). Ihmisen

komplementtisysteemi ei ole ainut, jota on tutkittu. Esimerkiksi myös lepakon, sian ja kirjolohen komplementin toimintaa on tutkittu. (Kilpi ja muut 2009; Lilley ja muut 2013.) Eräs lepakkolaji altistuu luonnossa orgaanisille tinayhdisteille. Näiden lepakoiden komplementtisysteemiä on tutkittu, ja on huomattu, että orgaaniset tinayhdisteet heikentävät komplementtisysteemin antimikrobiaalista aktiivisuutta. (Lilley ja muut 2013.) Niveljalkaisilla on verenkierron sijaan hemolymfa. Niiltä ei löydy samanlaista komplementtisysteemiä kuin selkärankaisilta, mutta hemolymfalla on komplementtisysteemiä muistuttava antimikrobiaalinen vaikutus bakteerisoluihin. Ne käyttävät patogeenien hajottamiseen antimikrobiaalisia peptidejä, jotka muistuttavat komplementtisysteemin eri komponentteja. (Vojtek ja muut 2014.) Muissa immunologisissa tutkimuksissa on keskitytty tutkimaan neutrofiilien hengityspurskeen osuuteen bakteerien tappamisessa. (Atosuo and Lilius 2011; Atosuo and Suominen 2019)

*E. coli*-lux bakteereja voidaan käyttää, kun halutaan tutkia antimikrobiaalisten yhdisteiden tehokkuutta. Seuraamalla näiden yhdisteiden lyhyt- ja pitkäaikaista vaikutusta saadaan tietoa niiden toksisista vaikutuksista. (Suominen ja muut 2020.) *E. coli*-lux bakteerien avulla on tutkittu kuuden eri sisäilmasta löytyvän home-lajin uutosten toksisuutta. Toksiset yhdisteet vaikuttivat bakteerisolujen elinkelpoisuuteen negatiivisesti. Yleensä sytotoksisissa tutkimuksissa käytetään sikojen munuaisen epiteelisoluja ja villisikojen siittiöitä. Bakteritutkimuksista saatuja tuloksia on verrattu sioista saatuihin tuloksiin ja ne korreloivat keskenään. Tämä tarkoittaa sitä, että *E. coli*-lux solut soveltuvat sytotoksisiin tutkimuksiin. Näitä soluja on käytetty, kun on mitattu sisäilmavaurioisten rakennusten yläpölystä otettujen näytteiden toksisuutta. Tätä menetelmää on käytetty sokotetuissa kokeissa ja menetelmän avulla on pystytty erottamaan sisäilmavaurioista kärsivät rakennukset kontrollirakennuksista. (Atosuo 2015.) On huomattu, että sisäilmavaurioille altistuneiden henkilöiden kokemat oireet ja rakennusten pölynäytteiden toksisuus korreloivat keskenään. Toksisuustestien käyttämisestä on pidetty kyseenalaisena, kun on tutkittu rakennusten sisäilmavaurioita. (Putus 2017.)

## **5 Sisäilmaongelmat**

Ihmiset viettävät keskimäärin noin 90 % ajastaan sisätiloissa, joten sisäilman laadulla (engl. *indoor air quality*, IAQ) on suuri vaikutus ihmisten terveyteen. Sisätilojen huono

ilmanlaatu on maailmanlaajuisesti iso ongelma, ja WHO:n mukaan sisäilman saasteisiin kuolee vuosittain miljoonia ihmisiä. Kuitenkin tietoisuus sisäilman saastumisesta ei ole samalla tasolla kuin tietoisuus ulkoilman saastumisesta. Toimistorakennuksista noin viidennes ja koulurakennuksista noin kolmannes kärsii sisäilmavaurioista. Sisäilmaongelmat aiheuttavat niin terveydellisiä kuin taloudellisia ongelmia. Ihmisten sairastuessa heidän työtuntinsa vähenevät ja terveydenhoidon kulut nousevat. Sisäilmavauriot voivat pahimmassa tapauksessa aiheuttaa pysyvän työkyvyttömyyden. Tämä ja rakennusten korjaaminen tai purkaminen ja uudelleen rakentaminen tuottavat miljardiluokan kustannukset valtiolle. (WHO 2010; Atosuo ja muut 2020.) Sisäilman laatuun vaikuttavat ulkoilman laatu, mikrobit, kuinka aktiivisessa käytössä rakennus on ja millaisia rakennusmateriaaleja ja kalusteita siellä käytetään. Ulkoilman epäpuhtaudet pääsevät sisäilmaan ilmanvaihdon kautta. Ihmisten aktiivisuus vapauttaa epäpuhtauksia, kuten pölyä, kaasuja ja patogeenejä. Rakennuksissa käytettävät pintamateriaalit, kuten liimat ja maalit, voivat myös vapauttaa myrkkyyä ilmaan. Lisäksi rakennuksissa olevat tietotekniset laitteet vapauttavat otsonia ja muita haihtuvia yhdisteitä. Huonon IAQ:n on havaittu altistavan ihmisiä monille eri terveyshaitoille, kuten allergialle, maksavaurioille ja jopa syöväälle. Oireet voivat ilmaantua jo lyhytaikaisestakin altistumisesta. (Van Tran ja muut 2020.)

Sisätilat ovat ainakin kaksi kertaa saastuneempia kuin ulkoympäristö. Sisätilojen haitallisia saasteita ovat ilman pienhiukkaset, biologiset saasteet, fysikaaliset tekijät sekä useat sadat kemialliset yhdisteet, joista suurin osa on haihtuvia yhdisteitä. Pienhiukkaset ovat maksimissaan noin 2.5 µm mittaisia hiukkasia. Lasikuitu ja asbesti voidaan myös sisällyttää tähän ryhmään. Ulkoilman pienhiukkaset voivat kulkeutua sisätiloihin rakennusten ilmanvaihdon kautta. Ruuanlaittaminen, polttaminen sisällä ja takan lämmittäminen voivat myös vapauttaa pienhiukkasia. Biologisia saasteita ovat muun muassa allergeenit, bakteerit, homeet ja itiöt, joita syntyy esimerkiksi, kun rakennuksiin tulee kosteusvaurioita. Kosteus ja lämpötila ovat otolliset olosuhteet mikrobien kasvulle. Mikrobikasvustot vapauttavat itiöitä ja toksineja, jotka voivat kulkeutua hengitysteihin. Mikrobit voivat myös vapauttaa rakennusmateriaaleista saasteita. Fysikaalisiin tekijöihin kuuluvat lämpötila, elektromagneettinen kenttä ja meluhaitat. Merkittävimpiä saastuttavia kemiallisia yhdisteitä ovat kaasut, esimerkiksi hiilidioksidi, hiilimonoksidi, monet typpioksidit, otsoni ja haihtuvat orgaaniset tai epäorgaaniset yhdisteet, joita ovat muun muassa bentseeni ja tolueni. Kaasut pääsevät ilmanvaihtojen kautta sisätiloihin.

Niitä voi myös syntyä palamisreaktioissa. Haihtuvat yhdisteet vapautuvat esimerkiksi rakennuksissa käytetyistä materiaaleista ja siivoustuotteista. Viime aikoina on myös havaittu, että sisätiloihin on vapautunut yhdisteitä muovista, lääkkeitä ja hygieniatuotteista. (González-Martín ja muut 2021.)

Kehitysmaissa ja kehittyneissä maissa on huomattavia eroja sisätilojen ilmanlaadussa ja sisäilmaa saastuttavissa saasteissa. Kehittyneet maat ovat siirtyneet biomassan käytöstä sähköön. Kehitysmaissa kotitalouksissa käytetään edelleen biomassaa, kuten puuta, lantaa tai satojätteitä, esimerkiksi talojen lämmityksessä ja ruuanlaitossa. Kun nämä eivät pääse palamaan täydellisesti, sisätiloihin vapautuu kaasuja. Muita kehitysmaissa sisäilmaa saastuttavia tekijöitä ovat muun muassa sisällä tupakan polttaminen, lähimetsien polttaminen ja petrolilamppujen käyttäminen. Kehitysmaiden ihmiset altistuvat yleensä korkeille saastetasoille useamman tunnin päivässä monien vuosien ajan. Pieniä lapsia kannetaan usein äitien selässä esimerkiksi ruuanlaiton aikana, jolloin myös lapset altistuvat epätäydellisessä palamisessa muodostuville saasteille. (Bruce ja muut 2000.) Kehittyneissä maissa sisäilmaongelmat johtuvat yleensä kosteusvaurioista. Kosteusvauriosta kärsivissä rakennuksissa kasvavat mikrobit ovat suurin piirtein samanlaisia eri ilmastoalueilla ympäri maailmaa. Suomalaisista rakennuksista löytyviä kosteusvauriomikrobeja on tutkittu Terveystieteiden ja hyvinvoinnin laitoksen eli THL:n ja Työterveyslaitoksen toimesta. Puurakenteista löytyvien homeiden ja lahottajien toksiineja on tutkittu maailmanlaajuisesti monissa tutkimuksissa. (Atosuo ja muut 2020.) Suomessa sisäilmavaurioista käytetään usein nimitystä kosteus- tai homevaurio, sillä mikrobikasvustot ja niiden tunkkainen haju on helppo havaita (Putus 2017).

Kotimaassa kosteusvaurioiden tutkiminen on alkanut 1990-luvun alussa (Putus 2017). Maailmalla alettiin puhumaan samoihin aikoihin sairaan rakennuksen oireyhtymästä (engl. *sick building syndrome*, SBS). Oireyhtymää kuvailtiin siten, että ihminen oireilee vain tietyssä rakennuksessa ja oireet katoavat, kun henkilö poistuu tästä rakennuksesta. Tutkijat pyrkivät tutkimaan oireiden aiheuttajia ja he epäilivät syyksi sisäilmaongelmia aiheuttavia tekijöitä. SBS oli kuitenkin epäselvä ja sitä kritisoitiin paljon. (Tuuminen 2020.) Majvik-suositus käsittelee kosteus- ja mikrobivaurioiden tunnistamisen, tutkimisen ja hoidon. Se on laadittu sisäilma-asiantuntijoiden toimesta ja on päivitetty nykyiseen

muotoonsa 2007. Majvik-suosituksen mukaan rakennusten kosteusvauriot aiheuttavat materiaalien kemiallista hajoamista ja mikrobiongelmia. (Putus 2017.)

Kosteus- ja homevaurioiden aiheuttamat terveyshaitat jakavat edelleen tiedeyhteisön kahtia. Eräiden tutkijoiden mukaan kyse on vain massahysteriasta eikä mistään fysiologisesta sairastumisesta. Heidän mielestään monista tuhansista, jopa miljoonista, eri homelajeista vain pieni osa on patogeenisia ihmisille ja heidän mielestään näiden patogeenien aiheuttamat oireet ovat vain allergiat, astma ja sieni-infektiot. Sienien mykotoksiinien haittavaikutuksia on tutkittu paljon, ja on todettu, että ne aiheuttavat maksavaurioita ja syöpää. Kriittisesti ajattelevat tutkijat eivät kuitenkaan usko, että ne voisivat aiheuttaa terveyshaittoja kosteusvaurion muodossa. Lisäksi kosteusvauriosta kärsivien rakennusten näytteenottomenetelmät eivät ole edustava, sillä ne antavat tuloksia vain yksittäisen sijainnin ja hetken mikrobikannasta. Jos taas rakennuksista kerätään pölynäytteitä, niiden uskotaan antavan tuloksia vain pölyssä kasvavista mikrobeista, eikä taaskaan kuvaa koko rakennuksen mikrobipopulaatiota. Kriitikoiden mukaan kosteusvaurioille altistumisen testaaminen ei anna totuudenmukaisia tuloksia, sillä kliinisille testeille ei ole olemassa standardeja. (Borchers ja muut 2017; Chang ja Gershwin 2019.)

## **5.1 Kosteusvaurioiden aiheuttamat terveyshaitat**

Imeväiset, vanhukset, kroonisista sairauksista kärsivät henkilöt ja useimmat kaupunkilaiset kärsivät enemmän kosteusvaurioiden aiheuttamista SBS-terveysriskeistä (Van Tran ja muut 2020). Alkuvaiheessa kosteusvaurio ilmenee lähinnä vain hajuhaittoina. Alussa oireet on helpompi yhdistää kosteusvaurioista kärsivään rakennukseen. Altistumisen jatkuessa oireet alkavat pahentua. Altistuminen sisätiloissa oleville mikrobeille aiheuttaa seerumin IgG-tasojen ja kiertävien immuunikompleksien tason nousemisen aikuisilla ja lapsilla. Kiertävien immuunikompleksien tason nousun on huomattu lisäävän esimerkiksi nivelreuman ja keuhkosairauksien riskiä. Kosteusvauriorakennuksissa työskentelevillä henkilöillä on havaittu alveoliitin ja orgaanisen pölyn aiheuttaman toksisen oireyhtymän oireita. Epidemiologisten tutkimusten avulla on saatu selville, että henkilöillä, jotka oleskelevat mikrobipopulaatioista kärsivissä rakennuksissa, on korkeampi riski saada tiettyjä oireita

tai sairastua. Oireita voivat olla esimerkiksi ärsytysoireet iholla, silmissä ja hengitysteissä, astma ja hengitystieinfektiot. Jos henkilö altistuu pidemmän aikaa mikrobeille, hänen riskinsä sairastua astmaan on nelinkertainen. Kosteusvauriomikrobien on havaittu aiheuttavan suuria eroja tulehdusvasteissa, kun on tutkittu miten mikrobit vaikuttavat nisäkässoluihin. Vakavimmat oireet, kuten autoimmuunisairaudet, elinvauriot ja neurologiset oireet, tulevat ilmi, kun henkilö altistuu useamman vuoden kosteusvaurioille. (Putus 2017; Atosuo ja muut 2020.)

Hengityselimet ovat usein sisäilmaongelmien vaikutusten ensisijainen kohde, koska epäpuhtaudet pääsevät hengityksen kautta elimistöön. Hengitystieinfektiot voidaan jakaa akuutteihin alahengitystieinfektioihin ja ylempien hengitysteiden infektioihin. Ylemmät hengitystieinfektiot ovat yleensä lievempiä ja aiheutuvat biologisista saasteista. Alahengitystieinfektiot johtuvat viruksista tai bakteereista, jotka johtavat keuhkotulehdukseen. Huono sisäilman laatu lisää lapsilla alahengitystieinfektioiden riskiä 78 % ja noin miljoona alle 5-vuotiasta kuolee tähän vuosittain. Lisäksi on havaittu, että haitalliset hiukkaset vaikuttavat keuhkojen kehitykseen jo kohdussa. (Van Tran ja muut 2020.)

Hengitysteiden vaurioiden syntymiseen on ehdotettu useita mekanismeja. Sisäilmavauriot muuttavat henkilön immuunivasteita, mikä johtaa kroonisiin hengitystiesairauksiin. Altistuminen vaurioille johtaa tulehdusta edistäviin tiloihin, joihin liittyy esimerkiksi neutrofiilisen tulehduksen, oksidatiivisen stressin ja apoptoosin lisääminen. Pitkäaikainen altistuminen sisäilmaongelmille aiheuttaa keuhkojen toiminnan menetystä, ja tämän on ehdotettu johtavan lopulta keuhkohtaumaan. Sisäilmavaurioiden on osoitettu heikentävän makrofagien fagosytoosia, vähentävän limakalvojen puhdistumaa ja häiritsevän keuhkojen alveoli-kapillaariestettä. Immuunivasteiden on huomattu heikentyvän hengitystieviruksille. Aikaisemman kirjallisuuden mukaan lisääntynyt PM10 altistuminen voi heikentää alveolaaristen makrofagien vasteita RS-viruksia vastaan. Kosteusvauriot voivat johtaa myös geneettisiin ja epigeneettisiin muutoksiin. Sikiön ja nuoren keuhkojen kehitys on kriittinen ajanjakso, sillä 85–90 % alveoleista kehittyy sen aikana. Sisäilmavauriotutkimukset ovat osoittaneet yhteyksiä synnytystä edeltävän altistumisen, syntymähetkellä keuhkojen toiminnan



heikentymisen ja teini-iän hengitystiesairauksien todennäköisyyden välillä. (Raju ja muut 2020.)

Polttoaineiden vapauttamat haitalliset epäpuhtaudet lisäävät riskiä sairastua tiettyihin akuutteihin sydän- ja verisuonitauteihin, kuten iskeemisen aivohalvaukseen, rytmihäiriöihin ja sydämen vajaatoimintaan. Haitalliset hiukkaset aiheuttavat oksidatiivista stressiä, systeemistä tulehdusta, lisääntyntä veren hyytymistä ja verenkierron epätasapainoa. Ne myös lisäävät merkittävästi fibrinogeenia, verihiutaleiden aktivaatiota, plasman viskositeettia ja endoteelien vapautumista. Ilman hiilidioksidi voi vaikuttaa kudosten hapettumiseen karboksihemoglobiinin tuotannon kautta, mikä vaikuttaa voimakkaasti sydämen ja verisuonten toimintoihin. Altistuminen PAH- ja Pb-yhdisteille lisäävät oksidatiivista stressiä stimuloiden angiotensiinijärjestelmää ja alentaen typpioksidin määrää. (Van Tran ja muut 2020.)

## **5.2 Kosteusvaurioille altistumisen toteaminen**

Kosteusvauriomikrobien vapauttamia toksiineja ja niiden tuottamia terveysvaikutuksia on tutkittu monella tavalla. Toksiineja on mahdollista tutkia laboratoriossa, mutta mikrobien toksisuus voi hävitä laboratorio-olosuhteissa tai kohderakennuksessa toksiineja tuottamattomat mikrobit alkavat tuottamaan toksiineja pitkän kasvatuksen aikana. Nykyisin altistumista tutkitaan pääasiassa mikrobiologisen näytteen viljelymenetelmillä ja tunnistamalla kasvaneet mikrobit. Tämän lisäksi on yritetty suoramikroskopiointia, PCR-tekniikkaa ja homeiden entsyymien semikvantitatiivista osoittamista pikatestien avulla. Haitallisten sisäilmasaasteiden toksisuuden ja komponenttien toteamiseen tarvitaan parempaa tietoa altistumisesta, jotta terveysriskit voidaan arvioida luotettavasti. Yksittäisen sisäilmasaasteen vaikutuksen tutkiminen on mahdotonta ja hyödytöntä, sillä henkilöt altistuvat samanaikaisesti monille sisäilmasaasteille. Sisäilmavaurioisissa rakennuksissa on yleensä bakteereja ja mykotoksiineja, joita voidaan mitata pölynäytteistä. Kohderakennusten tutkimiseen on vaikeaa löytää luotettavaa, edullista ja toistettavaa testi- ja näytteenkeräysmenetelmää. Kemiaalliset tutkimukset eivät kerro mikrobien kokonaisvaikutuksesta ja viljelymenetelmät eivät osoita mikrobikasvustojen toksisuutta, joten biologisten vaikutusten mittaaminen on olennaista. Ilmasta otetuilla näytteillä saadaan viljellyksi vain noin 1–10 % kaikista ilman mikrosienistä. Näiden asioiden vuoksi toksisuuden

mittaamiseen on alettu käyttämään esimerkiksi *E. coli*-lux-testiä, siittiöiden liikkuvuustestiä ja ihmisen makrofagisoluja. (Atosuo ja muut 2020.)

Jotta voidaan arvioida työntekijöiden riskiä altistumiselle, tarvitaan tietoa rakennuksesta löytyvien mikrobien lajistosta ja ilmassa leijuvan pölyn toksisuudesta. Kuolevien mikrobien vapauttamat pienhiukkaset, toksiinit, bakteerien endotoksiinit, homeiden pintarakenteiden entsyymit ja kitiinit ovat merkittävämpiä kokonaisriskiarvioinneissa kuin näytteistä löytyvät elinkykyiset mikrobit. Toksiinien mittaaminen on kallista, jonka vuoksi Suomessa niitä ei mitata rutiininomaisesti. Niille ei myöskään ole mitään viitearvoja, joten tarvitaan lisää tutkimusta viranomaisohjeiden, viitearvojen ja kenttätyöhön sopivien testien saamiseksi. (Atosuo ja muut 2020.)

Sisäilmasairauksille ei ole omaa diagnoosia Suomessa, vaan se luokitellaan astmaksi. Altistumista voidaan kuitenkin tutkia erilaisten menetelmien avulla. Oirekyselyn avulla saadaan tietoa esimerkiksi kosteusvauriosta, altistuneen henkilön oireista ja hoidon tarpeesta sekä hänen kokemuksensa sisäilman laadusta. Työterveyslaitos käyttää oirelomakkeena Örebro-kyselyä, jossa ei kysytä esimerkiksi infektiosairauksista tai allergiaoireista. Tuula Putus on käyttänyt tätä Örebro-kyselyä pohjanaan kehittäessään kattavamman oirekyselyn. Kosteusvaurioille altistumisen aiheuttamien sairauksien diagnosointi ja hoito on perusterveydenhuollon ja erikoislääkäreiden vastuulla. Erikoislääkäri hoitaa vaativimmat kliiniset kokeet, joita ovat esimerkiksi allergologiset ihopistotestit, vasta-ainetutkimukset ja autoimmuunisairauksien tutkiminen. Majvik II suosittelee IgG-vasta-aineiden mittaamista, mutta Työterveyslaitos tarjoaa nykyisin vain IgE-vasta-aineiden mittauksia. (Putus 2017; Putus ja Vilén 2017.)

## **6 Erikoistyön tavoitteet**

Tutkimusryhmämme on kehittänyt rekombinantin *E. coli* K-12 pEGFP<sub>lux</sub>ABCDEamp bakteerikannan (Atosuo ja muut 2013). Tätä bakteerikantaa on käytetty lyhyen aikavälin toksisuusmittauksissa, joissa tutkittiin sisäilmavaurioista kärsivien rakennusten pölynäytteiden toksisuutta ja erilaisten antimikrobiaalisten yhdisteiden toimivuutta (Atosuo ja Lilius 2011; Suominen ja muut 2020). Atosuo tekemien tutkimusten perusteella on huomattu, että komplementtisysteemin klassinen reaktiotie on

huomattavasti aktiivisempi sisäilmavaurioille altistuneiden henkilöiden seeruminäytteissä. Lektiniireaktiotietä ei onnistuttu eristämään tässä tutkimuksessa, joten sen aktiivisuudesta ei ole tietoa. Vaihtoehtoinen reaktiotie ei ollut aktiivinen seeruminäytteissä. AP:n eristämisessä käytetty EGTA vaikuttaa kuitenkin negatiivisesti bakteerien kasvuun ja sitä kautta niiden tuottamaan bioluminesenssiin. (Atosuo ja muut 2021.)

Pro gradu -tutkielmani sisälsi muutaman tärkeän tavoitteen. Ensimmäisenä tutkittiin, miten lämpötilan muutos vaikuttaa komplementtiin ja sen reaktioteiden aktiivisuuteen. Lämpötilan vaikutusta komplementtisysteemiin ei tiettävästi ole tutkittu juuri ollenkaan, joten tämän tutkimuksen avulla saataisiin uutta tietoa komplementin reaktioteiden toiminnasta eri lämpötiloissa. Reaktioteiden antimikrobiaalista aktiivisuutta voitiin mitata käyttämällä *E. coli*-lux bakteereja. Näissä tutkimuksissa käytettiin eri seerumipitoisuuksia. Ensimmäisen vaiheen jälkeen siirryttiin tutkimaan eri proteiinien ja inaktiivisen seerumin vaikutusta komplementtiin. Proteiinien, kuten gelatiinin, vaikutuksista ei myöskään ole tiettävästi tutkittu kovinkaan paljoa, joten tämänkin tutkimuksen avulla saataisiin uutta tietoa.

Erikoistyön tärkeimpänä tavoitteena oli eristää klassinen reaktiotie vaihtoehtoisesta reaktiotiestä ja lektiiniireaktiotiestä vasta-aineiden avulla. Näin ollen eristämisessä ei tarvitse käyttää EGTA:a, jolloin bakteerisolut voivat kasvaa ilman häiriötekijöitä. AP ja LP ja eristettiin myös muista reaktioteistä, mutta tutkimuksissa keskityttiin CP:n salpaamiseen. Bakteerien tuottama bioluminesenssi voisi olla potentiaalinen menetelmä mitata komplementtisysteemin toimintaa. Lisäksi näiden tutkimusten avulla voitaisiin saada uutta tietoa reaktioteiden toiminnasta gram-negatiivisten bakteerien tappamisessa.

Kun reaktiotiet on eristetty toisistaan, voidaan siirtyä tutkimaan sisäilmaongelmille altistuneiden seeruminäytteiden komplementin antimikrobiaalista toimintaa. Hypoteesina on, että sisäilmavaurioille altistuneiden henkilöiden komplementtisysteemin mikrobintappoaktiivisuudet ovat korkeammat ja että heillä on matalatasoinen tulehdustila. Aktiivisuutta voidaan tutkia tappokinetiikkojen avulla. Jos tappokinetiikkojen avulla havaitaan huomattavia ja toistettavia eroja

komplementtisysteemin aktiivisuudessa, tätä menetelmää voitaisiin käyttää sisäilmaongelmien aiheuttaman tulehdustilan toteamiseen.

## II Kokeellinen osa

### 7 Materiaalit ja menetelmät

#### 7.1 *E. coli*-lux bakteeripreparaatin valmistus

*E. coli*-lux:n kasvatusta varten valmistettiin Luria Agar -kasvatusmaljoja (LA) (10 g/l tryptoni (Neogen), 5 g/l hiivauute (Neogen), 5 g/l NaCl (Sigma-Aldrich), 3,5 g/l agar). Kasvatusmaljoille lisättiin 100 µl 25 µg/ml ampisilliinia (Sigma). Maljoille tehtiin puhtasviljely *E. coli*-lux -bakteeripreparaatista ja niiden annettiin kasvaa yön yli 37 °C:ssa. Seuraavana päivänä mitattiin yönyli kasvaneiden bakteerien OD<sub>620</sub> ja CPS, joiden avulla laskettiin CPS/OD<sub>620</sub> suhde. Uusiokasvatukseen valittiin ne kaksi solupesäkettä, joilla oli suurimmat suhteet. Uusiokasvatukset tehtiin 150 ml Luria Bertani Broth -mediumissa (LB<sub>amp</sub>) (10 g/l tryptoni (Neogen), 5 g/l hiivauute (Neogen), 5 g/l NaCl (Sigma-Aldrich) ja 100 µg/ml ampisilliini (Sigma)) ja kasvatuksia inkuboitiin ravistimessa (37 °C, 80 rpm). Kun kasvatukset saavutti 0.4 OD-arvon, solut kerättiin sentrifugoimalla (10 min, 3 000 rpm). Tämän jälkeen supernatantti kaadettiin pois ja bakteeripelletti resuspensoitiin 5 ml LB<sub>amp</sub> (25 % glyseroli). Bakteeripreparaatit jaettiin Eppendorf-putkiin ja pakastettiin (- 80 °C).

#### 7.2 Seerumipooli ja potilasnäytteet

Kolmelta terveeltä ja vapaaehtoiselta aikuiselta otettiin verinäytteet seerumipoolin valmistamiseen. Ulkopuolinen ammattilainen otti verinäytteet 8 ml VACUETTE™ seerumiputkiin (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Seerumit valmistettiin sentrifugoimalla (11 min, 540 g). Tämän jälkeen valmistettiin seerumipooli yhdistämällä kolmen ihmisen seerumit. Seerumipooli jaettiin Eppendorf-putkiin ja pakastettiin (- 80 °C). Seeruminäytteet edustavat tervettä populaatiota komplementin reaktioteiden tutkimisessa.

Tutkimuksessa käytettiin 35 potilasnäytettä. Potilasnäytteet kerättiin 8 ml VACUETTE™ seerumiputkiin (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria). Seeruminäytteet valmistettiin samalla tavalla kuin seerumipooli ja näytteet pakastettiin (- 80 °C). Näytteet on kerätty sellaisilta henkilöiltä, jotka ovat yhä asuneet tai työskennelleet

sisäilmaongelmaisissa rakennuksissa. Tässä tutkimuksessa ei ollut seerumipoolin lisäksi muita referenssinäytteitä terveiltä henkilöiltä.

**Tutkimuksen eettisyys:** Tutkimuksessa kerätään tutkimukseen osallistuvien henkilöiden verinäytteitä ja eristetään niistä seeruminäytteet. Kaikki tutkimukseen osallistuvat ovat vapaaehtoisia aikuisia. Tutkimuksella on Varsinais-Suomen Sairaanhoidopiirin eettisen toimikunnan puolto (Dnro: 59/1801/2019).

### 7.3 Fysikaalisten ja kemiallisten tekijöiden vaikutus komplementtisysteemiin

Fysikaalisen ja kemiallisten tekijöiden vaikutusta komplementtisysteemin toimintaan mitattiin reaktioissa, jotka tehtiin 96-kuoppalevyllä (Optiplat<sup>TM</sup> – 96, PerkinElmer). Kaikkien reaktioiden lopputilavuus oli 100 µl ja kaikista näytteistä tehtiin 2–3 rinnakkaisnäytettä. Optimaalisten laimennosten löytämiseksi komplementtiaoja ajettiin erilaisilla bakteri- ja seerumilaimennoksilla (0.16–10 %). Laimennokset tehtiin 1 x Hank's Balanced Salt Solution -puskuriin (HBSS) (Sigma Aldrich). Näissä tutkimuksissa reaktio oli seuraavanlainen: 25 µl seerumilaimennos, 50 µl 1 x HBSS ja 25 µl bakterilaimennosta. Bakterikontrollinäytteessä ilman seerumia oli 75 µl 1 x HBSS ja 25 µl bakterilaimennosta. Bakterilaimennos pipetoitiin viimeisenä, sillä se käynnistää reaktion. *E. coli*-lux:n bioluminesenssia mitattiin luminometrillä (Hidex Sense Plate Reader, Hidex). Mittauksissa oli joko 150 tai 180 sykliä 2 min välein.

#### 7.3.1 Lämpötilan vaikutus komplementtisysteemin reaktioteihin

Lämpötilan vaikutusta komplementtisysteemin aktiivisuuteen tutkittiin 25–44 °C:ssa. Tässä tutkimuksessa reaktio oli muuten samanlainen, mutta käytössä oli vain optimaaliseksi havaittu bakterilaimennos. Jokaisen lämpötilan kohdalla toisessa laitteessa ajettiin vastaavat näytteet 37 °C:ssa, joihin eri lämpötilojen tuloksia verrattiin. Vaihtoehdoisen reaktiotien aktiivisuutta tutkittiin samoissa lämpötiloissa. AP saatiin erotettua muista reaktioteistä lisäämällä HBSS -puskuriin 10 mM EGTA, joka kelatoi näytteestä Ca<sup>2+</sup>-ioneja.

### 7.3.2 Kalsiumin, gelatiinin ja albumiinin vaikutus komplementtisysteemiin

Kaksinkertainen kalsiumpitoisuus (280 mg/l) saatiin lisäämällä CaCl<sub>2</sub> (J.T.Baker®) HBSS -puskuriin. Kalsiumpitoisuuden vaikutusta komplementtisysteemin aktiivisuuteen tutkittiin 35–40 °C:ssa 0.16–10 % seerumipitoisuuksilla. Referenssinäytteinä käytettiin normaaliin 1 x HBSS -puskuriin laimennettuja näytteitä.

Eri gelatiini- (Swine Skin Type II, 175 g Bloom, Sigma-Aldrich) ja albumiinipitoisuuksien (Albumin bovine, Acros Organics) vaikutusta komplementin aktiivisuuteen tutkittiin myös. Gelatiinitutkimuksissa tutkittiin ensin, miten 0.01–10 mg/ml HBSS<sub>gelat</sub> -puskuri vaikuttaa eri seerumipitoisuuksiin (0.1–10 %). HBSS<sub>gelat</sub> -puskuria tutkittiin myös 0.5 % seerumia sisältävä HBSS<sub>gelat</sub>-puskurin kanssa. HBSS<sub>gelat</sub> -näytteet laimennettiin HBSS:aan ja seerumia sisältävä HBSS<sub>gelat</sub> laimennettiin seerumia sisältävään 1 x HBSS:aan. Tämän jälkeen tutkittiin gelatiini- (1 mg/ml) ja albumiinilaimennosten (1 mg/ml) vaikutusta 1 % seerumin komplementtiin yksin ja yhdessä. Lopuksi tutkittiin vielä pelkän albumiinin (0.625–10 mg/ml) vaikutusta 1 % seerumiin.

### 7.3.3 Inaktiivisen seerumin komplementtisysteemin toiminnan testaus

Inaktiivisen seerumin (0.01–10 %) toimintaa tutkittiin vertailemalla tuloksia aktiiviseen seerumiin. Seerumi inaktivoitiin laittamalla se 56 °C 30 min ajaksi. Seerumilaimennokset tehtiin pääasiassa 1 x HBSS:aan, mutta yhdessä tutkimuksessa tutkittiin miten 1 x HBSS:aan ja 10 % inaktiiviseen seerumiin tehdyt laimennokset eroavat toisistaan.

### 7.3.4 Vasta-aineiden vaikutus

Komplementtisysteemin toimintaa tutkittiin myös erilaisten vasta-aineiden avulla, joiden avulla eristettiin jokin kolmesta reaktioteistä. Seerumipooli (0.6 %) ja vasta-ainelaimennokset pipetoitiin ensimmäisenä kaivoihin ja niitä inkuboitiin 1 h 4 °C:ssa. Komplementtisysteemin vaihtoehtoinen reaktiotie blokattiin anti-properdiinin (Anti-Propardin Antibody C-4, 200 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) ja antifaktori B:n (Complement Factor B Monoclonal Antibody 313011, 0.5 mg/ml, Invitrogen) avulla.

Anti-properdiinista valmistettiin 0.01–50 µg/ml laimennossarja ja antikofaktori B:sta 0.24–125 µg/ml laimennossarja. Lektiniireaktiotie blokattiin käyttämällä monoklonaalista anti-IgA1 (Monoclonal antibody Human IgA1, 0.2 mg/ml, Immunotech), josta tehtiin laimennossarja (0.09–50 µg/ml). Klassinen reaktiotie blokkauksessa käytettiin C1r monoklonaalisen vasta-aineen (C1r Monoclonal Antibody, 0.5 mg/ml, Invitrogen) laimennossarjaa (0.4–125 µg/ml), anti-C1q:n (C1q Monoclonal Antibody 3R9/2, 1.09 mg/ml, Invitrogen) laimennossarjaa (0.05–25 µg/ml) ja anti-IgG:n (Goat Anti-Human IgG, 33.7 mg/ml, Jackson ImmunoResearch) laimennossarjaa (0.008–4.2 mg/ml). Vasta-aineet laimennettiin HBSS:aan.

Anti-C1q ja anti-IgG valittiin jatkotutkimuksiin, joiden avulla etsittiin optimaalinen vasta-ainepitoisuus potilasseeruminäytteiden tutkimiseen. Anti-C1q:n (0.05–50 µg/ml) vaikutusta tutkittiin ensin seerumipoolin eri seerumeilla (0.6 %) ja nämä laimennokset tehtiin 1 x HBSS:aan. Vertailua varten valmistettiin vastaavanlaiset näytteet 1 mg/ml gelatiinia sisältävään 1 x HBSS:aan. Optimaalisen vasta-ainepitoisuuden löydyttyä anti-C1q:ta alettiin testaamaan ensin 0.6 % potilasseeruminäytteillä ja lopulta päädyttiin käyttämään 1 % seerumia. Anti-IgG:ta tutkittiin myös ensin seerumipoolin seerumeilla (1 %). Kun optimaalinen pitoisuus löytyi, vasta-aineen vaikutusta tutkittiin potilasseerumeilla. Erikoistyön lopussa tutkittiin vielä anti-C1q:n (1–6.5 µg/ml) ja anti-IgG:n (0.05–3.2 mg/ml) yhteisvaikutusta komplementtisysteemin aktiivisuuteen 1 % seerumilla. Kun optimaaliset pitoisuudet löytyivät, potilasseeruminäytteitä ajettiin näiden vasta-aineiden kanssa.

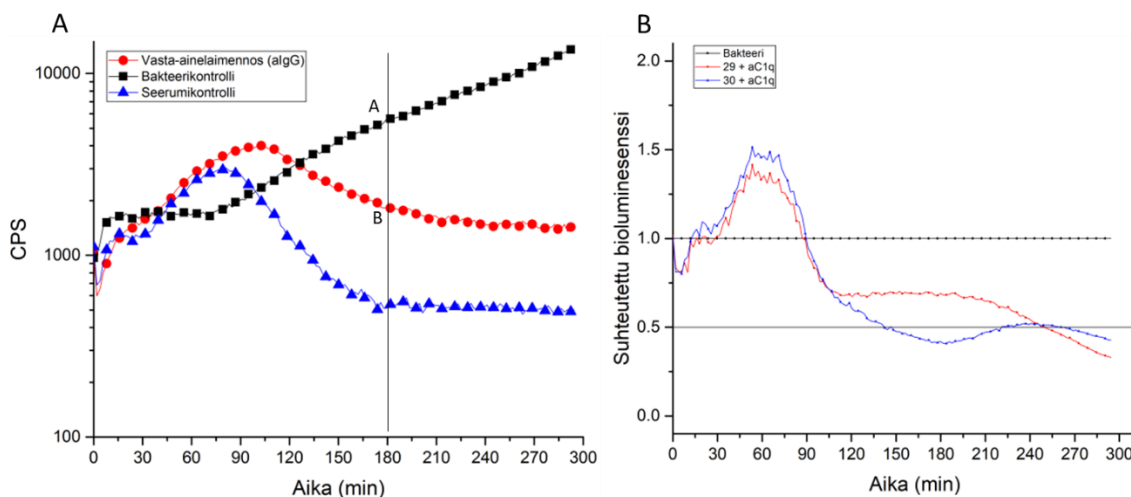
Tutkimuksissa käytetyt vasta-aineet ja niiden blokkaamat reaktiotiet löytyvät taulukosta 1. Tulokset ja tulosten tarkastelu -osiossa käydään läpi vain niitä vasta-aineita, jotka valittiin loppututkimuksiin komplementtisysteemin klassisen reaktiotien eristämisessä potilasnäytteissä.



**Taulukko 1 Tutkimuksissa käytetyt vasta-aineet.** Taulukossa on esitelty kunkin vasta-aineen kohdereaktiotie, konsentraatio ja valmistaja. Näiden vasta-aineiden avulla eristettiin reaktiotiet toisistaan. AP eristettiin kahden vasta-aineen (anti-properdiini ja anti-fB) avulla. LP eristettiin anti-IgA1 vasta-aineen avulla. CP eristettiin kolmen vasta-aineen avulla, jotka olivat anti-C1q, anti-C1q ja anti-IgG.

Reaktiotie	Vasta-aine	Konsentraatio	Valmistaja
AP	Anti-Propardin Antibody (C-4)	200 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology
CP	C1r Monoclonal Antibody	0.5 mg/ml	Invitrogen
AP	Complement Factor B Monoclonal Antibody (313011)	0.5 mg/ml	Invitrogen
LP	Monoclonal antibody Human IgA1	0.2 mg/ml	Immunotech
CP	C1q Monoclonal Antibody (3R9/2)	1.09 mg/ml	Invitrogen
CP	Goat Anti-Human IgG	33.7 mg/ml	Jackson ImmunoResearch

Luminometriltä saadut kinetiikkatulokset esitettiin kasvukäyrinä. Näissä kuvaajissa näytteiden tuottaman bioluminesenssisignaalin logaritmi on ajan funktiona (kuva 6). Mittauksissa käytettiin bakteerikontrollia, seerumikontrollia ja vasta-ainelaimennosta. Vasta-ainelaimennoksen tilalla voi olla myös esimerkiksi inaktiivinen seerumi tai gelatiini.



**Kuva 6 A Tyypillinen kinetiikkakuvaaja.** Bakteerikontrolli tarkoittaa pelkkiä *E. coli*-lux soluja ilman seerumia tai vasta-aineita. Seerumikontrollissa ei ole mukana vasta-aineita. Kinetiikkakuvaajien avulla verrataan esimerkiksi komplementin antimikrobiaalista toimintaa inhiboivien vasta-aineiden vaikutusta bakteeri- ja seerumikontrolliin. Kinetiikkakuvaajia hyödynnetään kaikissa erikoistyön tutkimuksissa, joten vasta-aineen tilalla voi olla esimerkiksi gelatiini tai inaktiivinen seerumi. Näiden kuvaajien avulla laskettiin myös vasta-aineiden annosvasteet 180 min kohdalla käyttäen kuvan A ja B arvoja. **Kuvassa 6 B** on kuvattu, miten katsottiin kuinka kauan komplementtisysteemillä kesti tappaa 50 % kaikista bakteereista. Kinetiikkatulokset suhteutettiin bakteerin tuottamiin tuloksiin siten, että kaikki tulokset jaettiin bakteerikontrollin tuloksella.

Kinetiikkakuvaajien avulla laskettiin vasta-aineiden annosvasteet 180 min kohdalla seuraavalla kaavalla:

$$\frac{A - B}{A} \cdot 100\%$$

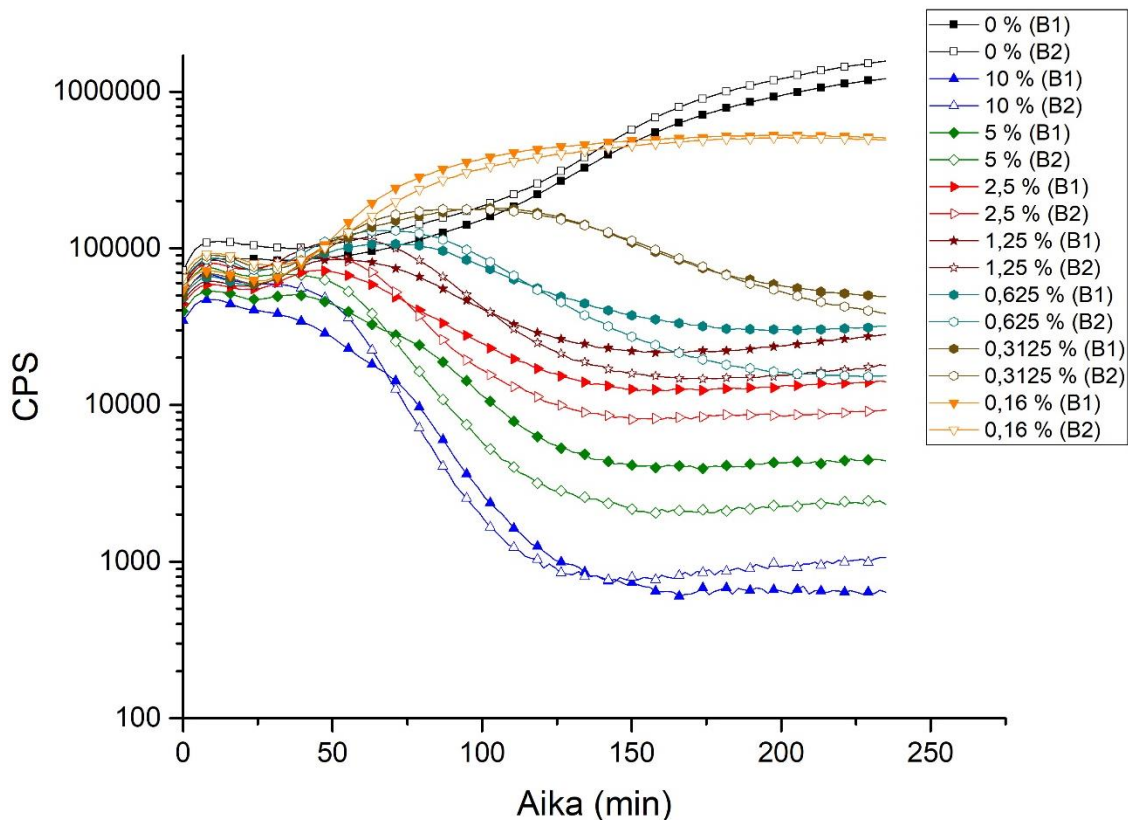
jossa A on bakteerikontrollin CPS ja B on tutkittavan reaktion CPS 180 min kohdalla. Tällä kaavalla saadaan seeruminäytteen tappoprosentti suhteessa bakteerikontrolliin. 180 min aikana kaikki reaktiotiet olivat jo ehtineet käynnistyä, joten tämä aika valittiin sen perusteella. Lisäksi mittauksen aikana haihtuu nestettä, jonka vuoksi ei voida valita liian myöhäistä mittauspistettä.

Annosvasteiden lisäksi katsottiin kuinka kauan komplementtisysteemillä kesti tappaa 50 % kaikista bakteereista. Ensin kaikki kinetiikkatulokset suhteutettiin pelkän bakteerikontrollin kinetiikkatuloksiin jakamalla tulokset kontrollin tuloksella. Tällöin bakteerinäytteen tulokset saavat arvokseen 1 ja muodostavat yhtenäisen viivan kuvaan. Kuvaan on myös piirretty viiva 0.5 kohtaan helpottamaan ajan lukemista. Tätä lukua ei kuitenkaan aina saada esimerkiksi pienemmillä seerumipitoisuuksilla tai kun komplementtisysteemi ei ole niin aktiivinen. Tämä on myös yksi syy, miksi annosvasteita verrataan tietyssä aikapisteessä.

## 8 Tulokset & tulosten tarkastelu

### 8.1 Bakteripreparaatin ja -laimennoksen valinta

*E. coli*-lux bakterikannasta valmistettiin kaksi eri preparaattia. Kuvassa 7 on esitetty kummankin bakteripreparaatin tulokset eri seerumipitoisuuksilla (0.16–10 %). B1 on bakteripreparaatti 1 ja B2 on bakteripreparaatti 2. Näiden tulosten perusteella jatkotutkimuksiin valittiin preparaatti 2.



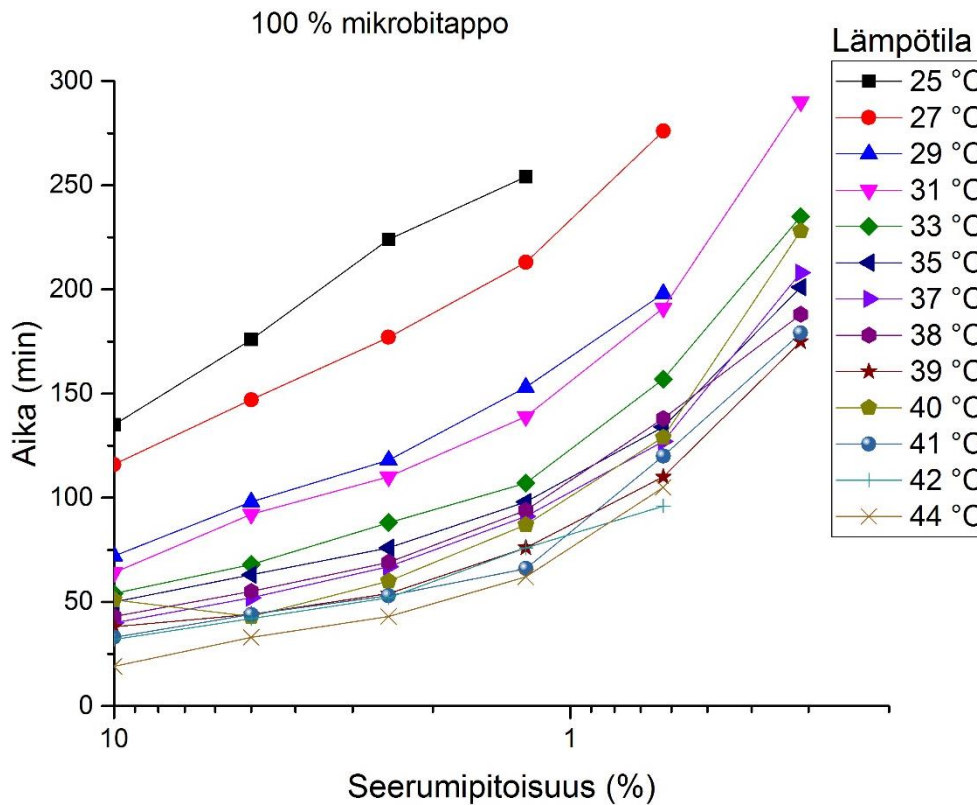
**Kuva 7 Bakteripreparaatin valinta.** Kuvaajassa luminesenssisignaali mittaauksina sekunnissa (CPS) on ilmoitettu ajan funktiona. Kuvaajan avulla vertailtiin kahden bakteripreparaatin (B1 ja B2) eroja eri seerumipitoisuuksilla (0.16–10 %). Näiden tulosten perusteella päätettiin käyttää bakteripreparaatti 2 tulevissa tutkimuksissa.

Kun bakteripreparaatti oli valittu, etsittiin optimaalinen bakterilaimennos 0.5 % seerumin perusteella, jota on käytetty tutkimusryhmän aiemmissa tutkimuksissa (Atosuo ja muut 2021). Optimaalisiksi bakterilaimennoksiksi osoittautuivat 1/64, 1/128 ja 1/256. Näistä kolmesta laimennoksesta päädyttiin käyttämään 1/64 laimennosta lopuissa tutkimuksissa.

Bakteerilaimennoksen lisäksi etsittiin optimaalinen seerumilaimennos vasta-ainetutkimuksiin. Tulosten perusteella päädyttiin käyttämään 0.6 % ja 1 % seerumilaimennoksia.

## **8.2 Lämpötilan vaikutus komplementtisysteemiin**

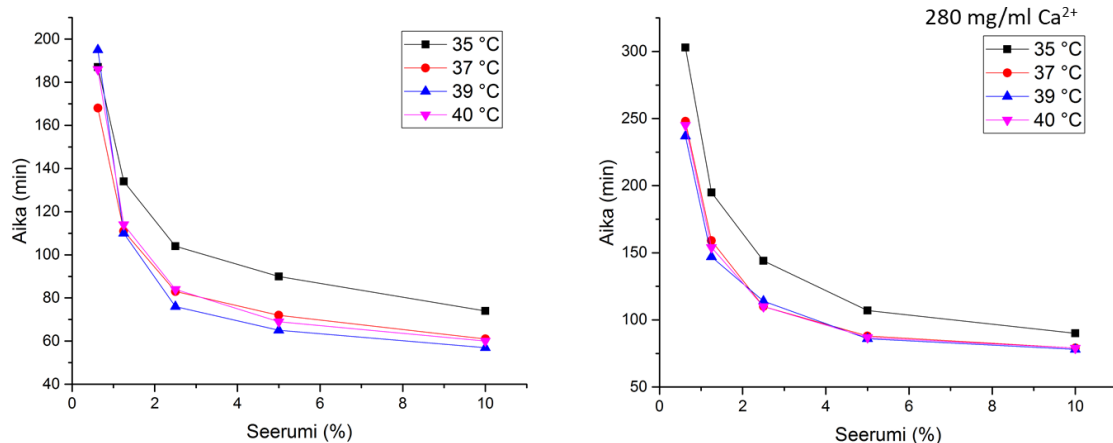
Lämpötilan vaikutusta komplementtisysteemiin ei ole tiettävästi tutkittu juuri ollenkaan. Lämpötilatutkimuksissa huomattiin, että komplementti toimii korkeammissa lämpötiloissa tehokkaammin kuin matalammissa lämpötiloissa (kuva 8). Esimerkiksi 39 °C:een kuume tappaa 100 % mikrobeista noin 38 min aikana, kun taas 29 °C:een alilämpö tappaa 100 % mikrobeista noin 75 min aikana. 44 °C:een tutkimuksissa bakteerikontrollinäytteen bakteerit kuolivat nopeasti jo ilman seerumia. Tämä voi viitata siihen, että komplementtisysteemi ei enää toimi näin korkeissa lämpötiloissa, koska sen optimaalinen lämpötila on 37 °C. Shah ja muut (2014) huomasi, että hemolyysiä esiintyy yhdeksän kertaa enemmän 31 °C:ssa kuin 41 °C:ssa ja kaksi kertaa enemmän kuin 37 °C:ssa. Ensimmäinen tulos tukee sitä, että komplementtisysteemi ei toimi enää korkeimmilla lämpötiloilla niin hyvin kuin normaalissa lämpötilassa. Kuitenkin erikoistyön tutkimuksissa esimerkiksi 10 % seerumin komplementti tappaa 100 % bakteereista noin 45 minuuttia aikana 37 °C:ssa ja 31 °C:ssa siihen menee noin 70 minuuttia. Näiden tulosten perusteella komplementti toimii nopeammin normaalissa lämpötilassa.



**Kuva 8** Lämpötilan (25–44 °C) vaikutus seerumin (0.31–10 %) komplementtisysteemin antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen. Tulokset on saatu *E. coli*-lux bioluminesenssin kineetiikoista. Mitä korkeampi lämpötila on, sitä tehokkaampi antimikrobiaalinen reaktio on. Kuume (esim. 39 °C) nostattaa komplementin aktiivisuutta ja alilämpö (esim. 29 °C) heikentää sitä. Kuitenkin, 44 °C:ssa bakteerikontrollinäytteen bakteerit kuolivat nopeasti, joten voi olla, ettei komplementti enää toimi näin korkeissa lämpötiloissa, sillä sen optimaalinen lämpötila on 37 °C.

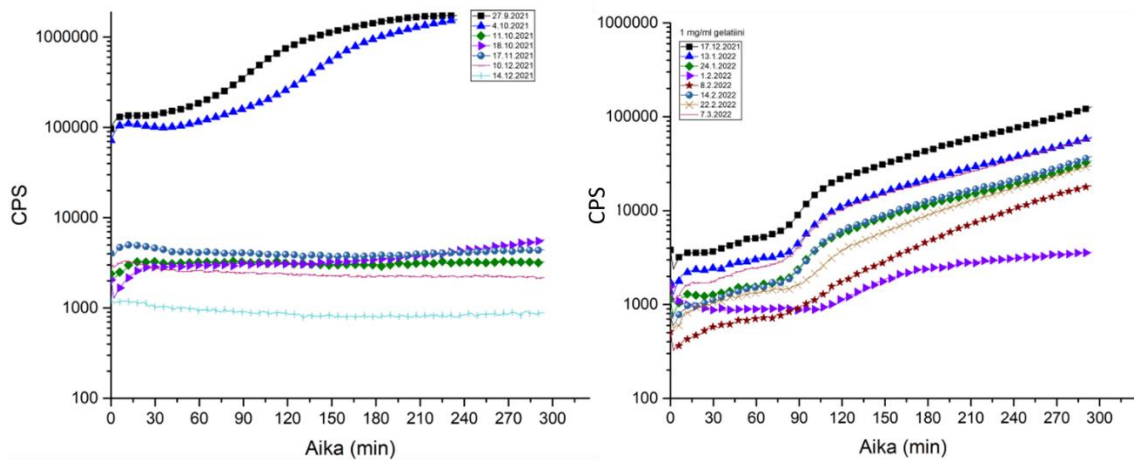
### 8.3 Kalsiumin, gelatiinin ja albumiinin vaikutus komplementtisysteemiin

Kaksinkertaista kalsiumpitoisuutta tutkittiin, koska kalsiumpitoisuus nousee tulehdustilassa (Arruda ja Hotamisligil 2015). Tutkimusten perusteella kaksinkertainen kalsiumpitoisuus hidastaa merkittävästi komplementtisysteemin aktiivisuutta pienemmillä seerumipitoisuuksilla (0.16–1.25 %) (kuva 9). Esimerkiksi 0.625 % seerumin komplementti tappaa 50 % bakteereista normaalissa kalsiumpitoisuudessa 37 °C:ssa noin 170 minuutin aikana, kun taas kaksinkertaisessa kalsiumpitoisuudessa tähän menee noin 250 min. Tämä voisi johtua siitä, että kalsium on mahdollinen kudostuhon estäjä korkeammilla pitoisuuksilla.



**Kuva 9** Normaalin kalsiumpitoisuuden 50 %:n mikrobintapon vertaaminen kaksinkertaisen kalsiumpitoisuuden 50 %:n mikrobintappoon eri lämpötiloissa (35–40 °C). Vasemmalla ylhäällä on normaali  $\text{Ca}^{2+}$ -pitoisuus ja oikealla ylhäällä kaksinkertainen  $\text{Ca}^{2+}$ -pitoisuus. 2 x  $\text{Ca}^{2+}$  hidastaa komplementin aktivaatiota merkittävästi. Mitä pienempi seerumipitoisuus on (0.16–1.25 %), sitä suurempi mikrobin tapon prosentuaalinen hidastuminen on kaksinkertaisella kalsiumilla. Esimerkiksi 0.625 % seerumi tappaa normaalissa  $\text{Ca}^{2+}$ -pitoisuudessa 37 °C:ssa 50 % mikrobeista noin 170 min aikana, kun taas kaksinkertaisessa  $\text{Ca}^{2+}$ -pitoisuudessa tappoaika on noin 250 min.

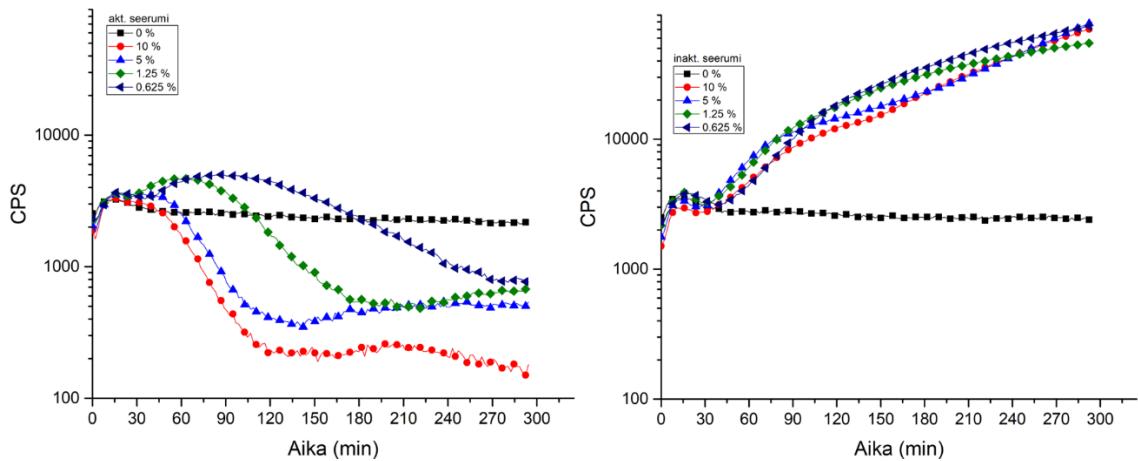
Gelatiinin biopolymeerit ovat satunnaisessa kierrakenteessa, jolloin niiden lämpöliike voi vaikuttaa bioluminesenssireaktion kineettisiin ominaisuuksiin. Toinen bakteerien bioluminesenssia lisäävä tekijä on naudan seerumin albumiini. (Bezrukikh ja muut 2014.) Erikoistytön aikana bakteerien tuottama bioluminesenssi heikkeni huomattavasti, joten bakteerien toimintaa tutkittiin gelatiinin ja albumiinin kanssa (kuva 11). Gelatiinin huomattiin lisäävän bakteerien tuottamaa bioluminesenssia. Albumiini lisäsi myös bioluminesenssin tuotantoa, mutta ei yhtä tehokkaasti kuin gelatiini. Koska gelatiinin huomattiin nostattavan bakteerien bioluminesenssia, lopuissa tutkimuksissa käytettiin 1 mg/ml gelatiinia.



**Kuva 10 Gelatiinin vaikutus *E. coli*-lux:n tuottamaan bioluminesenssiin.** Bakteerien tuottamat bioluminesenssit (CPS) ovat ajan funktiona. Vasemmalla olevassa kuvassa ei ole gelatiinia mukana. Oikealla olevassa kuvassa ajossa on ollut mukana 1 mg/ml gelatiinia. Kuten vasemmanpuoleisesta kuvasta nähdään, bakteerien tuottama bioluminesenssi heikkeni ajan kuluessa. Oikeanpuoleisesta kuvasta nähdään, että 1 mg/ml gelatiinia nostattaa bakteerien tuottamaa bioluminesenssia. Tämän tutkimuksen perusteella loppuihin tutkimuksiin otettiin mukaan 1 mg/ml gelatiinia lisäämään bioluminesenssia.

#### 8.4 Inaktiivisen seerumin komplementtisysteemin toiminnan testaus

Seerumin inaktivointi 56 °C:ssa inaktivoi komplementtisysteemin toiminnan. Inaktiivisen seerumin komplementtisysteemin mikrobintappoaktiivisuus on heikentynyt merkittävästi verrattuna aktiivisen komplementtisysteemin antimikrobiaaliseen toimintaan (kuva 12). Kuvasta nähdään, että aktiivisilla seerumipitoisuuksilla on antimikrobiaalista vaikutusta *E. coli*-lux soluja vastaan. Inaktiiviset seerumipitoisuudet taas eivät tapa ollenkaan bakteereja, vaan bakteerien määrä vain nousee. Nämä tulokset olivat odotettavissa, sillä tiedettiin, ettei inaktiivisen seerumin komplementtisysteemi toimi.



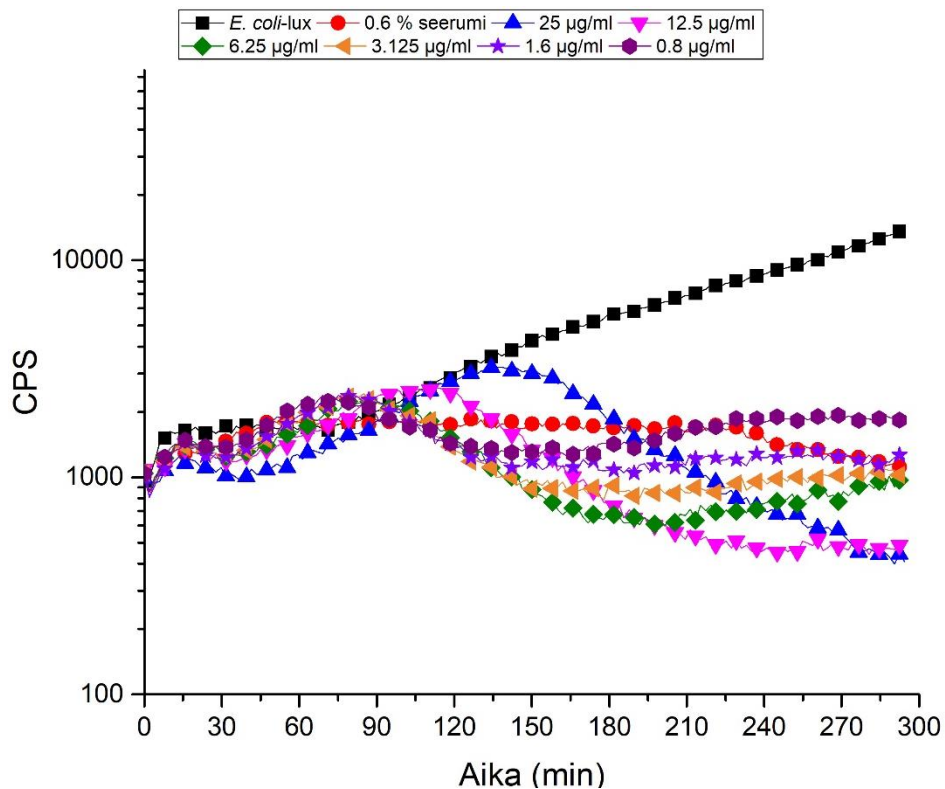
**Kuva 11 Inaktiivisen seerumin komplementin aktiivisuuden vertaus aktiivisen seerumin komplementtiin.** Vasemmalla ylhäällä on esitetty aktiivisten seerumipitoisuuksien (0.01–10 %) komplementin antimikrobiaaliset vaikutukset ja oikealla ylhäällä inaktiivisten seerumipitoisuuksien (0.01–10 %) antimikrobiaaliset vaikutukset. Kuvissa näkyvät 0 % tarkoittavat bakteeritaustaa, joissa ei ole ollenkaan seerumia. Korkeimmilla aktiivisilla seerumipitoisuuksilla (0.625–10 %) on korkea aktiivisuus, kun taas yhdelläkään inaktiivisella seerumipitoisuudella ei ole antimikrobiaalista vaikutusta.

## 8.5 Vasta-aineiden valinta ja niiden vaikutus komplementtisysteemiin

Vasta-ainetutkimuksissa keskityttiin pitkälti vain CP:n inhiboimiseen. Tämän vuoksi tässä osiossa käsitellään vain CP:tä eristävien vasta-aineiden tuloksia. Myös potilasnäytteiden kohdalla keskityttiin vain CP:n inhiboimiseen.

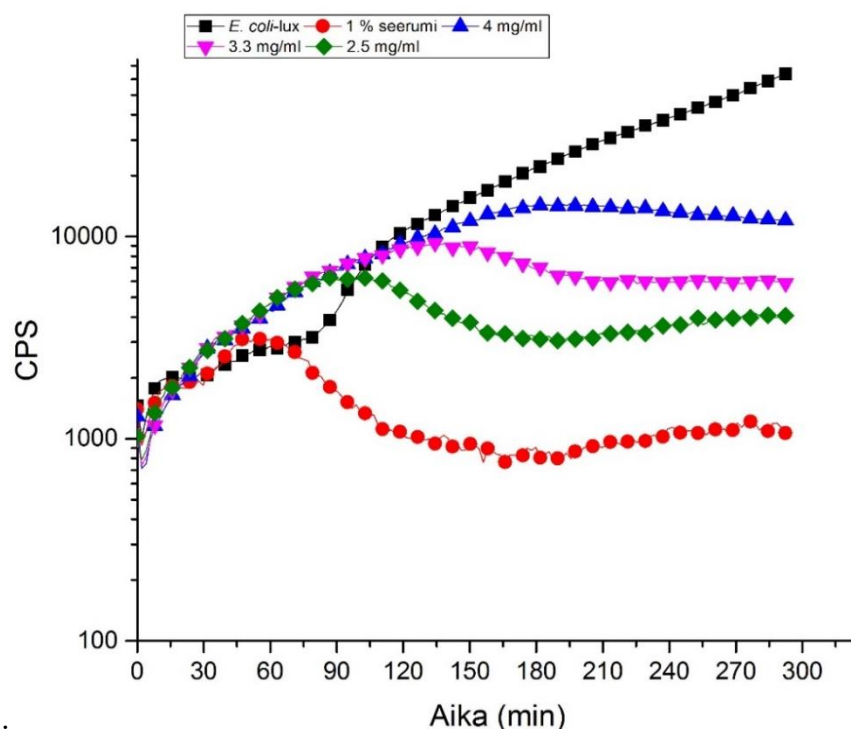
Ensimmäisenä aloitettiin tutkimaan anti-C1q:n vaikutusta komplementtisysteemiin. C1q:n inhiboiminen on tehokas tapa blokata CP:n toiminnan (McGonigal ja muut 2016). Anti-C1q:n vaikutus CP:n toimintaan pitäisi näkyä tuloksissa siten, että bioluminesenssisignaalit ovat korkeampia verrattuna toimivan CP:n signaaleihin. Kun näytteessä on enemmän vasta-ainetta, näytteen kuvaajan pitäisi lähestyä bakteerikontrollia. Vasta-aineesta valmistettiin laimennossarja (kuva 12), jonka avulla tutkittiin, mikä on optimaalisin vasta-ainepitoisuus klassisen reaktiotien salpaamiseen. Kuvasta 13 nähdään, että vasta-ainelaimennosten tuottamat kuvaajat eivät mene pitoisuuden mukaan suurimmasta pienempään, vaan esimerkiksi korkeimmat anti-C1q-pitoisuudet (12.5 µg/ml ja 25 µg/ml) aiheuttavat saturaatiota. Tämä voi johtua siitä, että näytteeseen muodostuu immuunikomplekseja, jolloin vasta-aine ei pysty sitomaan kaikkea C1q:ta. 1.6 µg/ml ja 3.2 µg/ml tuottavat tasaisimmat kuvaajat, ja potilasnäytteiden tutkimuksissa päätettiin käyttää 1.6 µg/ml pitoisuutta.





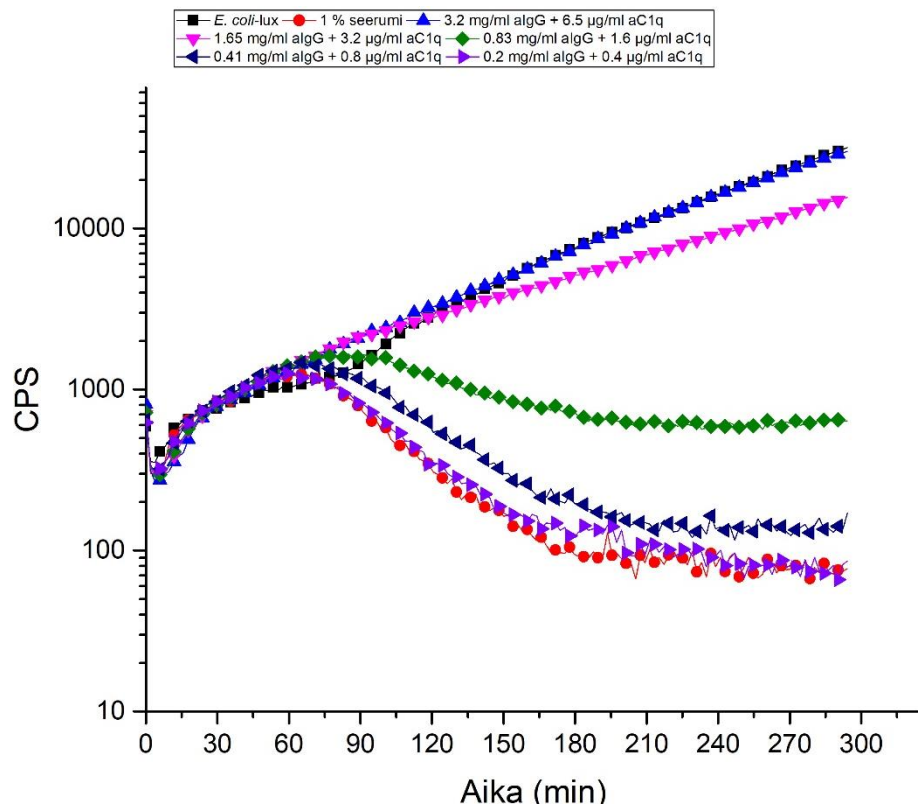
**Kuva 12 Anti-C1q -laimennossarja ja sopivan pitoisuuden valitseminen.** Kuvassa on bioluminesenssisignaali mittaauksina sekunnissa ajan funktiona. *E. coli-lux* tarkoittaa bakteerikontrollia ilman seerumia. 0.6 % seerumi tarkoittaa seerumikontrollia ilman vasta-aineita. Anti-C1q:ta tutkittiin 0.05–25 µg/ml pitoisuuksilla. Korkeimmat pitoisuudet aiheuttavat saturaatiota, joka voi johtua immunokompleksien muodostumisesta, jolloin seerumiin jää vapaata C1q:ta. Jatkotutkimuksiin valittiin 1.6 µg/ml.

CP:n blokkauksesta tutkittiin myös anti-IgG:n avulla, sillä sen on huomattu olevan tehokas tapa inhiboida komplementin aktivaatiota (van der Zee ja muut 1986). Anti-IgG:n vaikutus CP:n aktivaatioon pitäisi myös siten, että korkeammilla pitoisuuksilla käyrä lähenee bakteerikontrollia. Kuvasta 14 huomataan, että anti-IgG:sta tehdyn laimennossarjan käyrät menevät juuri sillä tavalla, että korkein anti-IgG-pitoisuus (4 mg/ml) on lähimpänä bakteerikontrollia ja CP:n aktivaatio kasvaa mentäessä pienempiä pitoisuuksia kohti. Näiden tutkimusten perusteella potilasnäytteiden tutkimuksissa päätettiin käyttää 3.3 mg/ml anti-IgG-pitoisuutta.



**Kuva 13 Anti-IgG -laimennossarja ja sopivan pitoisuuden valitseminen.** Kuvassa on bioluminesenssisignaali mittaauksina sekunnissa ajan funktiona. *E. coli-lux* tarkoittaa bakteerikontrollia ilman seerumia. 1 % seerumi tarkoittaa seerumikontrollia ilman vasta-aineita. Anti-IgG:ta tutkittiin 0.008–4.2 mg/ml pitoisuuksilla. Näistä pitoisuuksista valittiin 3.3 mg/ml jatkotutkimuksiin.

Koska CP:n blokkaminen onnistui anti-C1q:n ja anti-IgG:n avulla, haluttiin tutkia miten nämä kaksi vasta-ainetta vaikuttavat komplementtisysteemin aktivaatioon yhdessä. Hypoteesina oli se, että näiden yhdistelmä heikentää aktivaatiota ja että korkeimpien vasta-ainepitoisuuksien käyrä on lähimpänä bakteerikontrollia. Vasta-aineista valmistettiin laimennossarja. Kuvassa 15 on esitetty tämän tutkimuksen tulokset. Korkeimpien vasta-ainepitoisuuksien (3.2 mg/ml anti-IgG + 6.5 µg/ml anti-C1q) käyrä on lähes päällekkäin bakteerikontrollin kanssa. Pitoisuuksien pienentyessä käyrät laskevat ja pienempien pitoisuuksien (0.2 mg/ml anti-IgG + 0.4 µg/ml anti-C1q) käyrä on lähes samalla tasolla kuin seerumikontrollin käyrä. Tulosten mukaan vasta-aineet inhiboivat CP:tä ja käyrät menevät hypoteesin mukaisesti. Potilasnäytteiden tutkimuksiin valittiin laimennos, jossa on 0.41 mg/ml anti-IgG + 0.8 µg/ml anti-C1q.

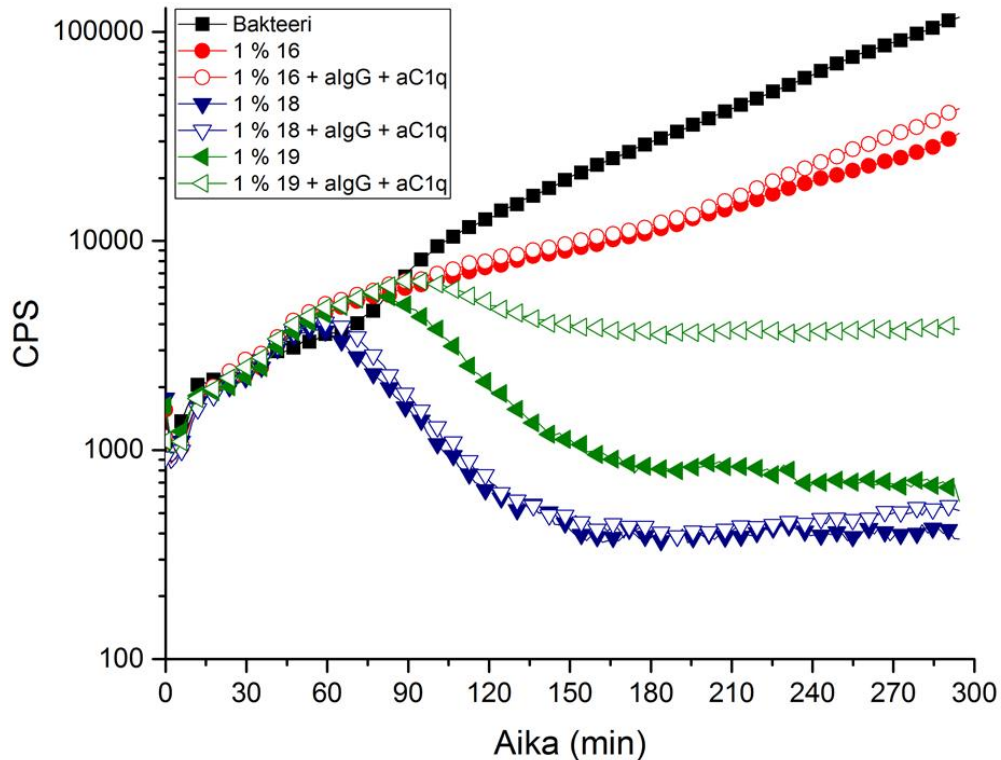


**Kuva 14 Anti-C1q- ja anti-IgG -laimennossarjat ja sopivien pitoisuuksien valitseminen.** Kuvassa on bioluminesenssisignaali mittauksina sekunnissa ajan funktiona. *E. coli-lux* tarkoittaa bakteerikontrollia ilman seerumia. 1 % seerumi tarkoittaa seerumikontrollia ilman vasta-aineita. Anti-C1q:n (1–6.5 µg/ml) ja anti-IgG:n (0.05–3.2 mg/ml) yhteisvaikutusta komplementtisysteemin aktiivisuuteen tutkittiin 1 % seerumilla. Jatkotutkimuksiin valittiin laimennos, jossa on 0.41 mg/ml anti-IgG + 0.8 µg/ml anti-C1q. aIgG = anti-IgG ja aC1q = anti-C1q.

## 8.6 Vasta-aineiden vaikutus potilasnäytteisiin

Kun optimaaliset vasta-ainelaimennokset oli löydetty, siirryttiin potilasnäytteiden pariin. Erikoistyön tutkimuksissa oli mukana 35 potilasseeruminäytettä, ja kaikki olivat altistuneet sisäilmavaurioille. Kuvassa 16 on kuitenkin vain kolmen potilaan tulokset 0.41 mg/ml anti-IgG:n ja 0.8 µg/ml anti-C1q:n yhteisvaikutuksesta. Nämä potilaat on valittu tähän kuvaan sillä perusteella, että heidän näytteiden tulosten perusteella on helppo näyttää yksilöiden välistä eroavaisuutta komplementin antimikrobiaalisissa aktiivisuuksissa. Lisäksi näiden kahden vasta-aineen yhteisvaikutus tuotti paremman tuloksen kuin kumpikaan yksinään, joten tässä käsitellään vain vasta-aineiden yhteisvaikutusta potilasnäytteisiin. Kuvassa 16 on potilaiden 16, 18 ja 19 tulokset. Potilaan 16 komplementtisysteemin mikrobintappoaktiivisuus on matala sekä vasta-aineiden kanssa, että ilman vasta-aineita. Tämä voi johtua siitä, että potilaan seeruminäytteessä ei ollut paljoa C1q:ta ja/tai IgG:ta, joita vasta-aineet olisivat voineet sitoa. Potilaan 18 komplementtisysteemi toimii aktiivisesti ilman vasta-aineiden vaikutusta ja vasta-aineiden kanssa. Tämä voi johtua siitä, että potilasnäytteessä on ollut

niin paljon C1q:ta ja/tai IgG:ta, että vasta-aineet eivät ole kyenneet sitomaan niitä kaikkia. Potilaan 19 komplementtisysteemin aktiivisuus on suhteellisen korkea ilman vasta-aineita, mutta vasta-aineiden läsnäolo heikentävät sen toimintaa.



**Kuva 15 Vasta-aineiden (0.41 mg/ml anti-IgG ja 0.8 µg/ml anti-C1q) vaikutus potilasseeruminäytteisiin (1 % seerumi ja potilaat 16, 18 ja 19).** Anti-IgG ja anti-C1q heikentää komplementtisysteemin aktiivisuutta estämällä klassisen reaktiotien aktivoitumista ja niiden avulla havaitaan yksioiden välisiä eroja komplementin mikrobintappokinetiikoissa. Potilaalla 16 on matala komplementtisysteemin aktiivisuus niin vasta-aineiden kanssa ja ilman niitä. Potilaan 18 komplementti toimii aktiivisesti ilman vasta-aineita ja niiden kanssa. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että potilaan näytteessä on niin paljon IgG:ta ja C1q:ta, jolloin vasta-aineet eivät kykene sitomaan niitä kaikkia. Potilaalla 19 on suhteellisen korkea komplementtiaktiivisuus ilman vasta-aineita, mutta vasta-aineet heikentävät sen toimintaa. aIgG = anti-IgG ja aC1q = anti-C1q.

Taulukossa 2 on esitetty kunkin potilasnäytteen annosvasteet 180 min aikana anti-IgG:n, anti-C1q:n ja näiden yhteisvaikutuksen tutkimuksissa. Taulukossa on lisäksi potilasseerumin komplementin toiminta ilman vasta-aineita, jotta nähdään miten vasta-aineet ovat vaikuttaneet komplementin aktiivisuuteen. Annosvasteet on kuvattu tappoprosentteina. Annosvasteiden tulosten perusteella voidaan sanoa, että anti-IgG heikentää komplementtisysteemin

**Taulukko 2 Potilaiden annosvasteet (%) 180 min ajankohdalta.** Taulukossa näkyy kunkin potilaan mikrobintappoprosentti vasta-aineiden läsnä ollessa ja ilman vasta-aineita. aIgG = anti-IgG, aC1q = anti-C1q, va = vasta-aine.

<b>Näyte</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
Ilman va	44,6	97,8	51,7	97,8	98,3	97,5	98,1
algG	-35,2	40,2	-25,8	26,3	4,2	11,8	58,2
aC1q	42,2	75,1	45,1	39,6	47,6	26,0	46,1
algG+aC1q	49,6	60,2	50,8	51,8	40,0	45,0	71,5
<b>Näyte</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>14</b>	<b>15</b>	<b>16</b>
Ilman va	95,4	69,0	70,5	94,0	94,6	71,3	67,3
algG	-15,2	-5,7	-7,0	-3,0	-17,7	-28,4	-54,8
aC1q	34,0	58,4	61,0	97,4	84,6	62,1	38,3
algG+aC1q	73,6	56,4	57,3	97,7	95,6	64,6	59,9
<b>Näyte</b>	<b>17</b>	<b>18</b>	<b>19</b>	<b>20</b>	<b>22</b>	<b>24</b>	<b>25</b>
Ilman va	96,0	98,7	98,2	61,2	94,3	20,4	85,2
algG	26,6	19,5	32,5	-34,8	-37,6	-42,2	-7,8
aC1q	60,9	97,0	31,1	45,0	41,8	64,1	62,1
algG+aC1q	95,9	98,6	88,0	50,5	65,5	61,6	63,4
<b>Näyte</b>	<b>26</b>	<b>27</b>	<b>28</b>	<b>29</b>	<b>30</b>	<b>32</b>	<b>34</b>
Ilman va	82,1	80,3	96,9	94,8	94,2	92,5	97,4
algG	-38,9	13,3	59,2	6,5	14,7	35,7	17,3
aC1q	57,1	63,8	55,0	30,9	58,1	59,9	45,3
algG+aC1q	44,1	98,0	55,3	54,6	66,4	43,4	41,6
<b>Näyte</b>	<b>35</b>	<b>36</b>	<b>37</b>	<b>38</b>	<b>39</b>	<b>42</b>	<b>44</b>
Ilman va	50,5	46,3	51,7	98,3	52,4	96,4	90,9
algG	-25,6	-19,5	-9,0	59,5	4,0	7,8	12,0
aC1q	59,3	46,2	45,7	83,2	58,1	61,3	53,2
algG+aC1q	61,6	61,0	56,8	97,0	62,8	43,7	59,5

Taulukon tuloksista nähdään, että noin puolella potilaista komplementtisysteemin tappoprosentti on yli 90 %, kun näytteessä ei ole yhtään vasta-ainetta. Vain muutaman potilaan (1, 24 ja 36) komplementtisysteemi ei ole kovin aktiivinen. Annosvasteiden tulosten perusteella voidaan sanoa, että anti-IgG heikentää komplementtisysteemin aktiivisuutta paljon, sillä jokaisen potilaan komplementin tappoprosentti laski. Anti-IgG:n käyttö jopa stimuloi koetinsolujen kasvua, koska monella potilaalla tappoprosentti on negatiivinen. Anti-C1q:lla on myös komplementin tehokkuutta alentava vaikutus, mutta ei yhtä tehokas kuin anti-IgG:lla. Kuitenkin potilailla 35 ja 39 tappoprosentti vain nousee entisestään. Tämä voi johtua siitä, että näytteissä on ollut niin paljon C1q-komponentteja, että vasta-aineet eivät kyenneet sitomaan niitä kaikkia. Näiden kahden vasta-aineen yhteisvaikutus vaikuttaa komplementin tappoaktiivisuuteen vaihtelevasti. Joillakin potilailla, kuten 1, 12, 24 ja 27, ne nostattavat komplementin aktiivisuutta. Tämä voi johtua siitä, että näytteissä on ollut niin paljon IgG:ta ja/tai C1q:ta, jolloin vasta-aineet eivät ole sitoneet kaikkia komponentteja. Monilla potilailla nämä vasta-aineet ovat

heikentäneet komplementin aktiivisuutta paljon, esimerkiksi potilaiden 5, 28 ja 42 kohdalla tappoaktiivisuus laskee monta kymmentä prosenttia. Joidenkin potilaiden kohdalla aktiivisuuden heikentyminen on erittäin pientä, jopa vain 0.1 %. Näin tapahtuu esimerkiksi potilailla 17 ja 18. Taulukon 2 tulosten perusteella voidaan päätellä, että vasta-aineiden avulla saadaan yksilöiden välisiä eroavaisuuksia komplementtisysteemin aktivaatiossa.

## 9 Pohdinta

Tämä pro gradu -tutkielma on jatkoa tutkimusryhmämme aikaisemmille julkaisuille. Näissä on tutkittu esimerkiksi sisäilmaongelmille altistuneiden henkilöiden komplementtisysteemin aktivoitumista. (Atosuo ja muut 2021). Tutkimusryhmän kehittämien *E. coli*-lux bakteerisolujen tuottamaan bioluminesenssiin perustuva menetelmä on halpa, nopea ja helppo, sillä se on pitkälti automatisoitu. Näiden ominaisuuksien perusteella se voisi olla potentiaalinen testi hemolyyttisten testien tilalle. Menetelmä on kuitenkin vielä uusi, joten sitä täytyy vielä tutkia lisää ja optimoida. Esimerkiksi AP on eristetty epäspesifin EGTA:n kanssa ja LP:n toimintaa ei onnistuttu mittaamaan vanhalla menetelmällä. (Atosuo 2015.) Lisäksi ei ole juurikaan mitään tietoa, miten erilaiset fysikaaliset tai kemialliset tekijät vaikuttavat komplementtisysteemiin tai sen aktiivisuuteen. Erikoistyöni tarkoituksena oli tutkia lämpötilan ja kalsiumpitoisuuden vaikutusta komplementin aktiivisuuteen, erottaa komplementin eri reaktiotiet toisistaan vasta-aineiden avulla ja tutkia niiden avulla sisäilmaongelmille altistuneiden komplementin antimikrobiaalista toimintaa.

Erikoistyön fysikaalisena tekijänä toimi lämpötila. Lämpötilatutkimusten avulla saatiin selville, että se vaikuttaa komplementin antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen tiettyyn pisteeseen asti. Matalammissa lämpötiloissa komplementti toimii hitaammin kuin optimaalisessa lämpötilassa. Kuume nostatti komplementin tappoaktiivisuutta, mutta korkeimmat testatut lämpötilat (40–44 °C) tappoivat kuitenkin jo ilman komplementtia bakteerit nopeasti. Voi olla, ettei komplementti toimi enää korkeammissa lämpötiloissa, sillä komplementtisysteemin optimaalinen lämpötila on 37 °C. Voiko olla mahdollista, että komplementtisysteemin komponentit alkavat inaktivoitua jo pienemmissä lämpötiloissa kuin 54 °C? Lämpötilatutkimuksia olisi hyvä tehdä lisää, jotta saadaan enemmän ymmärrystä, miten komplementtisysteemi toimii korkeammissa lämpötiloissa ja onko kuumeella loppupeleissä merkittävää vaikutusta komplementtisysteemin toiminnan kannalta.

Tutkielman biologisia tekijöitä olivat kaksinkertainen  $\text{Ca}^{2+}$ -pitoisuus, gelatiini, albumiini ja inaktiivinen seerumi. Kalsiumtutkimusten alustavien tulosten perusteella luultiin, ettei kalsiumpitoisuudella ole mitään vaikutusta komplementtisysteemin tappoaktiivisuuteen.

Tarkempien tulosten käsittelyjen avulla kuitenkin selvisi, että kaksinkertainen  $\text{Ca}^{2+}$  -pitoisuus hidastaa komplementin aktiivisuutta merkittävästi pienemmillä seerumpitoisuuksilla. Tämä voisi johtua siitä, että kalsium toimisi niin sanotusti kudostuhoa estävänä tekijänä. Korkeammilla seerumpitoisuuksilla kalsiumilla ei kuitenkaan ole merkittävää vaikutusta. Gelatiinin ja albumiinin huomattiin tehostavan bakteerien kasvua ja näin ollen niiden tuottamaa bioluminesenssisignaalia. Niiden vaikutusmekanismista ei tiettävästi ole vielä paljoakaan tietoa, joten tätä tutkimusta voisi olla mielenkiintoista jatkaa. Inaktiivisen seerumin komplementin odotettiin toimivan heikommin tai ei ollenkaan verrattuna aktiivisen seerumin komplementtiin ja tutkimukset antoivat juuri tällaiset tulokset.

Tutkielman yksi tärkeimmistä tarkoituksista oli erottaa komplementtisysteemin kolme reaktiotietä toisistaan vasta-aineiden avulla. Tutkimuksissa keskityttiin pitkälti vain CP:n eristämiseen muista. Reaktioteiden erottaminen toisistaan onnistui vasta-aineiden avulla. Eristämisessä testattiin kuutta eri vasta-ainetta. Edellisten tutkimusten tulosten perusteella anti-C1q:n oli todettu olevan tehokas eristämään klassista reaktiotietä, ja näissä tutkimuksissa se myös toimi hyvin. Kyseistä vasta-ainetta ei tarvitse käyttää paljoakaan CP:n eristämisessä, sillä jo 1.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$  pitoisuus riittää. CP:tä eristettiin myös anti-IgG:n avulla. Jotta sillä saatiin eristettyä CP tarpeeksi hyvin, anti-IgG:n pitoisuuden piti olla 3.3  $\text{mg}/\text{ml}$ . Edellisissä tutkimuksissa huomattiin, että anti-C1q:n ja anti-IgG:n käyttö yhdessä inhiboi komplementtisysteemin aktivaatiota. CP saatiin eristettyä huomattavasti pienemmillä vasta-ainepitoisuuksilla, sillä anti-C1q:n pitoisuus oli 0.8  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ja anti-IgG:n pitoisuus 0.41  $\text{mg}/\text{ml}$ . Nämä kaksi vasta-ainetta olivat tutkielman käytetyimmät vasta-aineet. AP:n ja LP:n eristäminen oli vain sivuprojekti tutkielmassa. AP:tä eristettiin anti-properdiinin ja anti-B-tekijän avulla. AP saatiin eristettyä näiden vasta-aineiden avulla. Tämä on hyvä asia, sillä vasta-aineiden käyttö mahdollistaa sen, ettei epäspesifistä EGTA:a tarvitse käyttää eristämisessä. LP:n eristämisessä käytettiin anti-IgA1:ta. Tällä vasta-aineella ei juurikaan ollut vaikutusta, ja joillain pitoisuuksilla anti-IgA1 jopa aktivoi komplementin toimintaa. Näin ollen LP:n eristäminen muista ei onnistunut niin hyvin kuin AP:n ja CP:n.

Reaktioteiden eristämisen onnistuttua voitiin siirtyä erikoistyön viimeiseen ja tärkeimpään vaiheeseen eli potilasnäytteiden tutkimiseen. Onko menetelmä



potentiaalinen mittaamaan muutoksia komplementtisysteemin reaktioteiden aktiivisuuksissa? Vasta-ainetutkimusten tuloksista havaitaan sisäilmavaurioille altistumisen aiheuttamia muutoksia komplementin reaktioteiden aktiivisuuksissa. Komplementtisysteemin komponentteja inhiboivien vasta-aineiden avulla voitiin jättää EGTA sivuun, jolloin tulokset ovat luotettavampia. Tutkielman aikana saatujen tulosten perusteella voidaan sanoa, että menetelmä on potentiaalinen mittaamaan sisäilmavaurioille altistumisen aiheuttamia muutoksia komplementtisysteemin aktiivisuudessa.

Vaikka menetelmä vaikuttaa potentiaaliselta, sitä tarvitsee vielä optimoida. Monissa tutkimuksissa on keskitytty pääasiassa CP:n tutkimiseen, joten tulevaisuudessa voisi keskittää tutkimukset AP:n ja LP:n tutkimiseen. LP:n eristämisessä voitaisiin kokeilla esimerkiksi MBL:n tai MASP:ien vasta-aineita. AP:n eristämisessä taas voitaisiin käyttää joko tässäkin tutkielmassa käytettyjä vasta-aineita, tai sitten muihin AP:n initiaatiovaiheen komponentteihin kohdistuneita vasta-aineita. Myös tulosten käsittelyä voitaisiin kehittää. Itse työ vie pienen osan ajasta sen ollessa niin yksinkertainen, mutta jokaisesta ajosta tulee paljon dataa pienessä ajassa. Tässä kohtaa annosvasteiden laskeminen on helppo tapa saada monesta näytteestä jonkinlainen käsitys, mutta se ei kuitenkaan kerro kuin vain yksittäisen hetken tulokset. Tällöin ei saada tietoa koko tappokinetiikasta, esimerkiksi miten nopeasti komplementtisysteemi aktivoituu, tappaako se jossain kohtaa 50 % kaikista bakteereista vai lähtevätkö bakteerit mahdollisesti uuteen kasvuun. Annosvasteiden erot voivat olla erittäin pieniä, jolloin tulosten vertaaminen keskenään on työlästä.

Tässä tutkimuksessa käytettiin seerumipoolia, jossa oli vain kolmen henkilön seerumia. Referenssiryhmä oli siis todella pieni. Lisäksi ei ole varmuutta, onko nämä kolme henkilöä varmasti terveitä ja ovatko he altistuneet kosteusvaurioille tietämättään. Jatkotutkimuksissa referenssinäytteitä olisi hyvä olla huomattavasti enemmän, jotta seerumipooli olisi edustavampi. Olisi myös hyvä, jos näytteet kerättäisiin terveiksi todetuista rakennuksista. Allekirjoittanutta jäi mietityttämään referenssiryhmän kohdalla se, että jos henkilö on esimerkiksi tietämättään nuoruudessaan asunut tai aikaisemmin työskennellyt sisäilmavaurioisessa rakennuksessa, voiko hän edustaa tervettä populaatiota? Referenssiryhmän ollessa pieni myös altistuneiden näytteiden määrä oli

aika pieni. Näin ollen tutkimuksia tulisi tehdä isommalla otannalla. Menetelmän toistettavuutta olisi myös hyvä tutkia tekemällä toistoja mittauksista. Hyvä keino todeta tämä menetelmä toimivaksi olisi tehdä tutkimuksia sokottamalla, eli sisäilmavaurioille altistuneiden henkilöiden näytteitä ja terveiden henkilöiden näytteitä tutkitaan samanaikaisesti ja tulosten perusteella erotellaan, kuka on altistunut ja kuka ei. Tulevaisuudessa voisi myös testata henkilöitä oireiden ja altistumisten perusteella. Näitä tutkimuksia on helppo jatkaa, sillä useampi hyvä vasta-aine on jo löytynyt ja menetelmä on yksinkertainen, joten se on helppo opettaa seuraavalle.

## 10 Lähteet

- Atosuo, J. (2015) Novel Cellular Luminescence Probes for Immunological and Toxicological Assessments 98.
- Atosuo, J., Karhuvaara, O., Päivinen, M., Vilén, L., Suominen, E., Nuutila, J., and Putus, T. (2020) Löytyykö uusia työkaluja sisäilmaongelmaisten työtilojen ja niiden käyttäjien tutkimukseen?
- Atosuo, J., Karhuvaara, O., Suominen, E., Vilén, L., Nuutila, J., and Putus, T. (2021) Indoor-related microbe damage induces complement system activation in building users. *Innate Immun* **27**(1): 15–22. SAGE Publications Ltd.
- Atosuo, J., Lehtinen, J., Vojtek, L., and Lilius, E.M. 2013. Escherichia coli K-12 (pEGFPfluxABCDEamp): A tool for analysis of bacterial killing by antibacterial agents and human complement activities on a real-time basis. *Luminescence* **28**(5): 771–779.
- Atosuo, J., and Suominen, E. (2019) A real-time-based in vitro assessment of the oxidative antimicrobial mechanisms of the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-halide system. *Mol Immunol* **116**: 38–44.
- Atosuo, J.T., and Lilius, E.M. (2011) The real-time-based assessment of the microbial killing by the antimicrobial compounds of neutrophils. *ScientificWorldJournal* **11**: 2382–2390.
- Bezrukikh, A., Esimbekova, E., Nemtseva, E., Kratasyuk, V., and Shimomura, O. (2014) Gelatin and starch as stabilizers of the coupled enzyme system of luminous bacteria NADH:FMN-oxidoreductase-luciferase. *Anal Bioanal Chem* **406**(23): 5743–5747.
- Borchers, A.T., Chang, C., and Eric Gershwin, M. (2017) Mold and Human Health: a Reality Check. *Clin Rev Allergy Immunol* **52**:305–322.
- Brodl, E., Winkler, A., and Macheroux, P. (2018) Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J* **16**:551–564.
- Bruce, N., Perez-Padilla, R., and Albalak, R. (2000) Indoor air pollution in developing countries: a major environmental and public health challenge TT - Pollution atmosphérique à l'intérieur des locaux: un problème majeur pour l'environnement et la santé publique TT - Contaminación del aire de locales ce. *Bull World Health Organ* **78**:1078–1092.
- Chang, C., and Gershwin, M.E. (2019) The Myth of Mycotoxins and Mold Injury. *Clin Rev Allergy Immunol* **57**:449–455.
- Chaplin, D.D. (2010) Overview of the immune response. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**
- Dunkelberger, J.R., and Song, W.C. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* **20**(1): 34–50.

- González-Martín, J., Kraakman, N.J.R., Pérez, C., Lebrero, R., and Muñoz, R. (2021) A state-of-the-art review on indoor air pollution and strategies for indoor air pollution control. *Chemosphere* **262**.
- Hedman, K., Heikkinen, T., Huovinen, P., Järvinen, A., Meri, S., and Vaara, M. (2012) Mikrobiologia, immunologia ja infektiosairaudet kirja 1, 2 ja 3. Duodecim, Porvoo, Suomi.
- Howell, M., and Shepherd, M. (2021). The immune system. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine* **20**: 518–521.
- Huovinen, P., Meri, S., Peltola, H., Vaara, M., Vaheri, A., and Valtonen, V. (2005) Mikrobiologia ja Infektiosairaudet Kirja 1 ja 2. Duodecim, Jyväskylä, Suomi.
- Janeway, C.A., and Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**:197–216.
- Kilpi, M.K., Atosuo, J.T., and Lilius, E.M.E. (2009) Bacteriolytic activity of the alternative pathway of complement differs kinetically from the classical pathway. *Dev Comp Immunol* **33**(10): 1102–1110.
- Kirschfink, M., and Mollnes, T.E. (2003) Modern Complement Analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**:982–989.
- Klos, A., Tenner, A.J., Johswich, K.O., Ager, R.R., Reis, E.S., and Köhl, J. (2009) The role of the anaphylatoxins in health and disease. *Mol Immunol* **46**(14): 2753–2766.
- Lilley, T.M., Ruokolainen, L., Meierjohann, A., Kanerva, M., Stauffer, J., Laine, V.N., Atosuo, J., Lilius, E.M., and Nikinmaa, M. (2013) Resistance to oxidative damage but not immunosuppression by organic tin compounds in natural populations of Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* **157**(3): 298–305.
- Ling, M., and Murali, M. (2019) Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. W.B. Saunders. *Clin Lab Med* **39**(4): 579–590
- Lubbers, R., van Essen, M.F., van Kooten, C., and Trouw, L.A. (2017) Production of complement components by cells of the immune system. *Clinical and Experimental Immunology* **188**:183–194
- Madigan, M., Martinko, J., and Parker, J. (1997) Brock Biology of Microorganisms 8. Edition. Prentice Hall International INC, New York.
- McGonigal, R., Cunningham, M.E., Yao, D., Barrie, J.A., Sankaranarayanan, S., Fewou, S.N., Furukawa, K., Yednock, T.A., and Willison, H.J. (2016) C1q-targeted inhibition of the classical complement pathway prevents injury in a novel mouse model of acute motor axonal neuropathy. *Acta Neuropathol Commun* **4**: 23.
- Mollnes, T.E., Jokiranta, T.S., Truedsson, L., Nilsson, B., Rodriguez de Cordoba, S., and Kirschfink, M. (2007) Complement analysis in the 21st century. *Molecular Immunology* **44**:3838–3849.

- Necchi, F., Saul, A., and Rondini, S. (2017) Development of a high-throughput method to evaluate serum bactericidal activity using bacterial ATP measurement as survival readout. *PLoS One* **12**(2).
- Ohtani, K. (2021) Complement-Related Proteins and Their Measurements: The Current Status of Clinical Investigation. *Nephron* **144**(1):7–12.
- Oikonomopoulou, K., Reis, E.S., and Lambris, J.D. (2012) Complement System and Its Role in Immune Responses. *eLS*.
- Prescott, L., Harley, J., and Klein, D. (2006) Microbiology 6. Edition. McGraw-Hill Higher Education, New York.
- Punt Jenni, Stanford Sharon, Jones Patricia, and Owen Judy. (2019) Kuby Immunology (8th edition).
- Putus, T. (2017) Home ja terveys, 3. painos. Suomen Ympäristö- ja Terveysalan Kustannus Oy, Pori.
- Putus, T., and Vilén, L. (2017) Sisäilman laatu, oireet ja sairaudet.
- Raju, S., Siddharthan, T., and McCormack, M.C. (2020) Indoor Air Pollution and Respiratory Health. W.B. Saunders. *Clin Chest Med.* **41**(4): 825–843.
- Salle, A. 1948. Fundamental Principle of Bacteriology 3. Edition.
- Scott, D., Dikici, E., Ensor, M., and Daunert, S. (2011) Bioluminescence and its impact on bioanalysis. *Annual Review of Analytical Chemistry* **4**: 297–319.
- Shah, T.A., Mauriello, C.T., Hair, P.S., Sandhu, A., Stolz, M.P., Bass, W.T., Krishna, N.K., and Cunnion, K.M. (2014) Clinical hypothermia temperatures increase complement activation and cell destruction via the classical pathway. *Journal of Translational Medicine* **12**:181
- Siegele, D.A., and Kolter, R. (1993) Isolation and characterization of an Escherichia coli mutant defective in resuming growth after starvation. *Genes Dev* **7**(12B):2629–40.
- Suominen, E.N., Putus, T., and Atosuo, J. (2020) Investigating the short- and long-term effects of antibacterial agents using a real-time assay based on bioluminescent E. coli-lux. *Heliyon* **6**(7).
- van Tran, V., Park, D., and Lee, Y.C. (2020) Indoor air pollution, related human diseases, and recent trends in the control and improvement of indoor air quality. *Int J Environ Res Public Health* **17**(8):2927.
- Tuuminen, T. (2020) The Roles of Autoimmunity and Biotoxicosis in Sick Building Syndrome as a “Starting Point” for Irreversible Dampness and Mold Hypersensitivity Syndrome. *Antibodies* **9**(2): 26.
- Vojtek, L., Dobeš, P., Büyükgüzel, E., Atosuo, J., and Hyršl, P. (2014) Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *Eur J Entomol* **111**(3): 335–340.

van der Zee, J.S., van Swieten, P., and Aalberse, R.C. (1986) Inhibition of complement activation by IgG4 antibodies. *Clin Exp Immunol* **64**(2):415–22.