

**Ihmisen komplementtisysteemin eri reaktioteiden
mikrobitappokinetiikka – biologisten tekijöiden ja
ympäristöaltisteiden vaikutus seerumin aktivaatioteiden
antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen**

Pro gradu -tutkielma
Turun yliopisto
Bioteknologian laitos
Biokemia
Kesäkuu 2021

Olli Lukkarinen

TURUN YLIOPISTO

Bioteknologian laitos

OLLI LUKKARINEN:

Pro gradu –tutkielma, 62 s.

Biokemia

Kesäkuu 2021

Ihmisen komplementtisysteemin eri reaktioteiden mikrobiotappokinetiikka – biologisten tekijöiden ja ympäristöaltisteiden vaikutus seerumin aktivaatioteiden antimikrobiaaliseen vaikutukseen

Komplementtisysteemi on yli 30:stä eri proteiinista muodostuva selkärankaisten immuunipuolustuksen liukoinen osa, joka on ensisijainen puolustuskeino mikrobi-infektioita vastaan. Sen pääasiallisia tehtäviä ovat patogeenien lyysaus, opsonisointi, immuunikompleksien hävittäminen sekä tulehdusreaktion ja hankitun immuunipuolustuksen säätely. Komplementtisysteemi jaetaan kolmeen eri reaktiotiehen: klassiseen, vaihtoehtoiseen ja lektiinireaktiotiehen.

Tutkimusryhmässämme kehitettyä *Escherichia coli* K-12 pEGFPluxABCDEamp kantaa on käytetty koetinsoluina komplementtisysteemin klassisen ja vaihtoehtoisen reaktiotien antimikrobiaalisen vaikutuksen mittaamisessa. Elinkelpoiset koetinsolut tuottavat bioluminesenssia, minkä avulla bakteerien kasvukinetiikkoja voidaan seurata reaaliajassa. Seerumin komplementtisysteemin tappaessa koetinsoluja, niiden tuottaman bioluminesenssisignaalin intensiteetti laskee. Menetelmällä on havaittu komplementin klassisen reaktiotien aktivoituneen sisäilmavaurioille altistuneiden seeruminäytteissä. Kyseisissä mittauksissa vaihtoehtoinen reaktiotie eristettiin Ca^{+2} -ioneita kelatoivalla etyleeniglykoli-tetra-etaanihapolla (EGTA), joka saattaa vaikuttaa myös koetinsolujen jakaantumiseen.

Tutkielmani tavoite oli eristää komplementtisysteemin reaktiotiet käyttämällä komplementin komponenteille spesifisiä vasta-aineita. Näin välttyttäisiin EGTA:n epäspesifisyydeltä sekä saataisiin tietoa myös lektiinireaktiotien antimikrobiaalisesta vaikutuksesta, josta on edelleen vähäisesti tietoa saatavilla. Eri reaktioteiden aktiivisuutta mitattaisiin 36 sisäilmavaurioille altistuneiden potilasnäytteistä. Tavoitteena oli selvittää, korreloivatko erot reaktioteiden aktiivisuuksissa potilaiden kokemien oireiden kanssa?

Reaktioteiden erottaminen tuntui onnistuvan ja menetelmän todettiin olevan toimiva vaihtoehto muille komplementin aktiivisuutta mittaaville menetelmille. Potilasnäytteissä havaittiin merkittäviä eroja etenkin lektiinireaktiotien ja vaihtoehtoisen reaktiotien annosvasteissa. Yli puolella potilaista lektiinireaktiotie oli jopa klassista reaktiotietä aktiivisempi, kun taas vaihtoehtoinen reaktiotie oli selvästi reaktioteistä vähiten antimikrobiaalinen. Toistaiseksi ei osata sanoa ovatko nämä erot synnynnäisiä, onko niissä näkyvissä ympäristöaltisteiden vaikutusta vai voidaanko eroja selittää tutkimusmenetelmän itsensä aiheuttamiksi. Jatkotutkimuksissa tarvitaan vielä reaktioteiden kinetiikan tarkentamista, suurempaa otantaa sekä potilas- että referenssinäytteistä.

Asiasanat: Altistuminen, bioluminesenssi lektiinireaktiotie, komplementtisysteemi, sisäilmavaurio

Sisällys

Lyhenteet.....	3
I Kirjallisuuskatsaus	4
1. Komplementtisyteemi	4
1.1 Komplementin reaktiotiet	5
1.1.1 Klassinen reaktiotie	6
1.1.2 Lektiinireaktiotie	7
1.1.3 Vaihtoehtoinen reaktiotie	7
1.2 Komplementin tehtävät immuunipuolustuksessa	8
1.2.1 Patogeenien lyysaus	8
1.2.2 Opsonisaatio	8
1.2.3 Immuunikompleksien ja apoptoottisten solujen hävittäminen.....	8
1.2.4 Tulehdusreaktion säätely.....	9
1.2.5 Hankitun immuunipuolustuksen säätely	9
1.3 Komplementin säätely	10
2. Komplementtisyteemin toiminnan mittaaminen.....	13
2.1 Komplementtisyteemin funktionaalinen analyysi.....	13
2.2 Komplementin antibakteriaaliset kokeet	14
3. Bakteerien elinkelpoisuus.....	15
3.1 Bakteerien kasvun ja elinkelpoisuuden mittaaminen	15
3.2 Bakteerien kasvuvaiheet puhdasviljelmässä.....	17
3.2.1 Viivevaihe	18
3.2.2 Eksponentiaalisen kasvun vaihe.....	19
3.2.3 Stationäärivaihe.....	19
3.2.4 Kuolinvaihe	19
3.3 Antimikrobiaaliset vaikutukset.....	20
4. Bioluminesoivat <i>E. coli</i> -lux koetinsolut	21
4.1 Bakteerien bioluminesenssi	21
4.2 <i>E. coli</i> -lux koetinsolujen hyödyntäminen	23
5. Sisäilmavauriot	25
5.1 Kosteusvaurioille altistumisen terveyshaitat	28
5.2 Kosteusvaurioille altistumisen diagnosointi	30

6. Tutkimustavoitteet.....	33
II Kokeellinen osa	34
7. Materiaalit ja menetelmät	34
7.1 <i>E. coli</i> -lux bakteeripreparaatti.....	34
7.2 Seerumipooli ja potilasnäytteet	34
7.3 Komplementtisysteemin aktiivisuuden mittaaminen	35
8. Tulosten tarkastelu.....	37
8.1 Seerumilaimennosten valinta.....	37
8.2 Vasta-aineiden valinta	38
8.2.1 CP:n salpaaminen.....	38
8.2.2 LP:n salpaaminen	39
8.2.3 AP:n salpaaminen.....	40
8.2.4 Vasta-aineiden annosvasteet	42
8.3 Reaktioteiden eristämisen.....	43
8.3.1 CP:n eristäminen	43
8.3.2 LP:n eristäminen	44
8.3.3 AP:n eristäminen.....	45
8.3.4 Eristettyjen reaktioteiden annosvasteet	46
8.4 Potilasnäytteiden analysointi	47
8.5 Immunologiset tekijät	49
9. Pohdinta.....	52
Lähteet	57

Lyhenteet

AP	Komplementin vaihtoehtoinen reaktiotie
APC	Antigeeneja esittelevä solu
ATP	Adenosiinitrifosfaatti
C	Komplementin komponentti
CD	Solujen pintatunnistusjärjestelmä
CFU	Pesäkkeen muodostavat yksiköt
CP	Komplementin klassinen reaktiotie
CRP	C-reaktiivinen proteiini
EGTA	Etyleeniglykoli-tetra-etaanihappo
ELISA	Entsyymivälitteinen immunosorbenttimääritys
fB	B-tekijä
fD	D-tekijä
fH	H-tekijä
FMN/H₂	Flaviinimononukleotidi
GFP	Vihreä fluoresoiva proteiini
LP	Komplementin lektiinireaktiotie
MAC	Kalvohyökkäyskompleksi
MASP1/2	MBL:ään liittyvä seriiniproteaasi
MBL	Mannoosia sitova lektiini
OD	Optinen tiheys
SAA	Seerumin amyloidi A
SBA	Seerumin bakterisidisuuskoe
SBS	Sairaana rakennuksen oireyhtymä
VBNC	Elinkelpoinen muttei viljeltävä

I Kirjallisuuskatsaus

1. Komplementtisyteemi

Perinteisesti immuunipuolustus jaetaan toiminnallisesti kahteen eri osaan: luontaiseen ja hankittuun immuunipuolustukseen. Nämä osat eroavat toisistaan reaktionopeuksiltaan ja spesifisyydeltään. Eliön luontaiseen immuunipuolustukseen kuuluvat kaikki ne puolustusmekanismit, jotka on koodattu iturataan sellaisenaan funktionaalisina geeneinä. Näihin mekanismeihin kuuluvat fysikaaliset esteet, kuten iho, värekarvat ja kehon eritteet, eliön normaalimikrobisto sekä erilaiset luontaisen immuunipuolustuksen solut tai yhdisteet, kuten neutrofiilit, makrofagit ja akuutin faasin proteiinit. Luontainen immuunipuolustus on fylogeneettisesti vanha ja hyvin konservoitunut, sillä sen ominaisuuksia esiintyy sekä kasveilla että eläimillä, mikä tarkoittaa sen kehittyneen jo ennen näiden kahden eliökunnan erkaantumista. Luontaisen immuunipuolustuksen solut sitoutuvat patogeenien molekulaarisiin rakenteisiin epäspesifisesti. (Janeway ja Medzhitov 2002; Chaplin 2010; Day ja Schultz 2010.)

Hankittu immuunipuolustus on fylogeneettisesti luontaista immuunipuolustusta huomattavasti uudempi, eikä sitä tavata kuin selkärangkaisilla. Se perustuu antigeneispesifisiin T- ja B-lymfosyytteihin, jotka aktivoituvat ja kypsyvät kohdatessaan antigeneinsä. Kypsät auttaja-T-solut tuottavat immuunipuolustusta sääteleviä sytokiineja, tappaja-T-solut tappavat infektoituneita isäntäsoluja ja B-solut tuottavat patogeeneille haitallisia vasta-aineita. Spesifisyytensä lisäksi hankitun immuunipuolustuksen toinen erikoisominaisuus on immunologinen muisti, mikä syntyy, kun osa aktivoituneista B-soluista kypsyvät pitkäikäisiksi muistisoluiksi. Nämä kiertävät muistisolut tunnistavat aiemmin tavatun patogeenin, mikä mahdollistaa entistä nopeamman ja tehokkaamman immunologisen vasteen. T-muistisoluja on neljää eri alatyyppeä, joista osan toiminta on verrattavissa B-muistisoluihin. Toistaiseksi ei tiedetä, miten T-solut kypsyvät muistisoluiksi. (Chaplin 2010; Day ja Schultz 2010.)

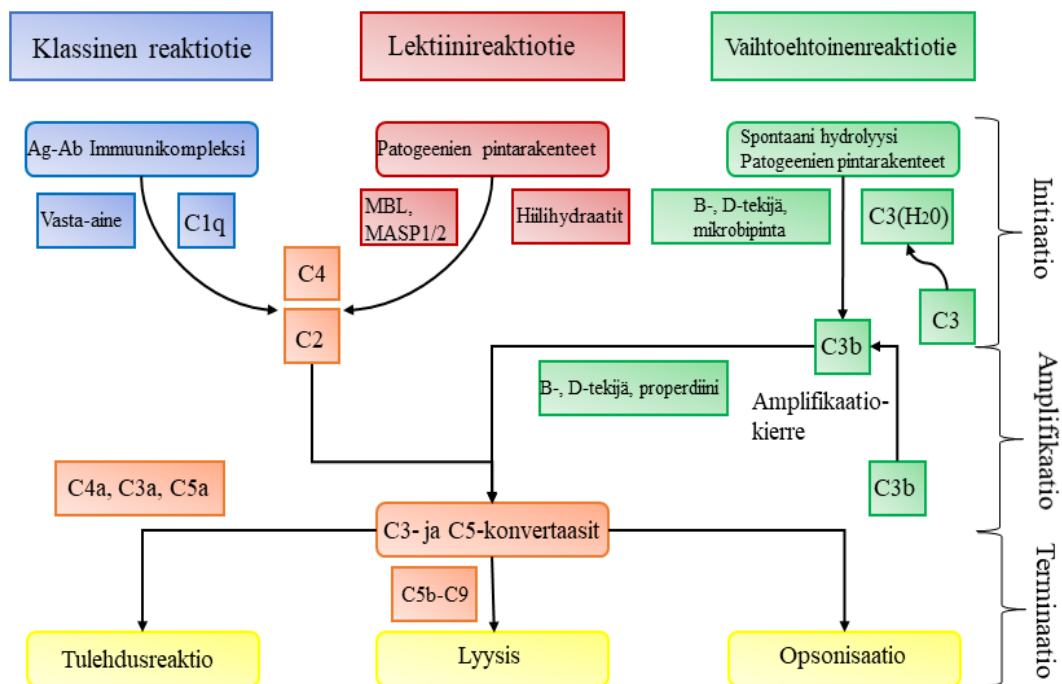
Todellisuudessa immuunipuolustuksen jako kahteen eri osaan ei ole selkeä, vaan luontaisen ja hankitun immuunipuolustuksen välillä on risteyskohtia – ideaalisen immuunipuolustuksen osat täydentävät toisiaan (Kvell ja muut 2007). Yksi näistä risteyskohdista on komplementtisyteemi, joka on aikojen saatossa kehittynyt pelkästä luontaisen immuunipuolustuksen mekanismeista myös osaksi hankitun

immuunipuolustuksen toimintaa. Komplementtisysteemin varhaisin, jopa miljardi vuotta vanha, muoto on saattanut olla komplementin komponentin 3 (engl. *complement component*, C) kaltainen proteiini, joka on suojeleminen yksisoluisia organismeja patogeeneilta. (Zhu ja muut 2005; Elvington ja muut 2016.) Geenien kahdentumisen ja eksonien sekoittumisen johdosta komplementtisysteemi on vasta nisäkkäillä kehittynyt monimutkaisemmaksi järjestelmäksi (Nonaka ja Sekiguchi 2013).

Veren ja kudoksen yli 30:stä joko liukoisesta tai solukalvoon sitoutuvista proteiineista muodostuva komplementtisysteemi on immuunipuolustuksen ensisijainen puolustusmekanismi tunkeutuvia patogeeneja vastaan. Maksan hepatosyytit sekä osa immuunipuolustuksen soluista tuottavat komplementin komponentteja, jotka kulkevat verenkierron etsien patogeeneja. Patogeenin kohdatessaan komponentit käynnistävät reaktiokaskadin, joka nopeasti tuottaa lisää komplementin komponentteja. Komplementin reaktiot tapahtuvat pääosin patogeeneiden ja muiden solujen pinnoilla. Komplementin komponenttien pääasiallisena tehtävänä ovat mikrobien tappaminen, opsonisaatio sekä tulehdusreaktion säätely. Näiden tehtävien lisäksi komplementtisysteemi osallistuu myös moniin fysiologisiin prosesseihin, kuten koagulaatioon, hematopoieesiin ja apoptoosiin. (Sarma ja Ward 2011; Oikonomopoulou ja muut 2012.)

1.1 Komplementin reaktiot

Nisäkkäiden komplementtisysteemi (kuva 1) koostuu kolmesta eri reaktiotiestä: klassinen reaktiotie (engl. *classical pathway*, CP), joka käynnistyy C1q-komponentin sitoutuessa antigeeni-vasta-aine -kompleksiin, lektiinireaktiotie (engl. *lectin pathway*, LP) käynnistyy pääasiallisesti mannoosia sitovan lektiinin (engl. *mannose binding lectin*, MBL) sitoutuessa mikrobien soluseinän rakenteisiin ja vaihtoehtoinen reaktiotie (engl. *alternative pathway*, AP), joka on konstitutiivisesti aktiivinen C3-komponentin spontaanin hydrolyysin sekä C3b-komponentin amplifikaatiokierteen johdosta. Kaikki reaktiotiet lopulta johtavat C3:n aktivoitumiseen, mikä lopulta johtaa kalvohyökkäyskompleksin (engl. *membrane attack complex*, MAC) muodostumiseen ja patogeenin tuhoutumiseen. Komplementin komponentit on nimetty usein numeroin, kuten C3, mutta osalla on myös triviialinimiä. (Oikonomopoulou ja muut 2012.)



Kuva 1. Komplementtisysteemin reaktiotiet. Komplementin kolmen eri reaktiotien rakenteet. Initiaatiiovaiheessa on mainittu reaktioteiden initiaatiokomponentit sekä niiden sitoutumiskohteet. Amplifikaatiiovaiheen voidaan sanoa alkavan, kun reaktiotiet alkavat tuottamaan C3-konvertaasejaan, jotka johtavat reaktioiden yltymiseen. Vaihtoehtoisella reaktioteillä on myös sille ominainen amplifikaatiokierre. Kaikki reaktiotiet lopulta päättyvät MAC-kompleksin muodostumiseen ja patogeenein lyysaykseen. Osa komplementin komponenteista toimii opsoniineina. Komponentit C4a, C3a ja C5a toimivat tulehdusreaktiota säätelevinä anafylatoksiineina. Adaptoitu lähteestä Dunkelberger ja Song 2010.

1.1.1 Klassinen reaktiotie

Immunoglobuliinit IgG ja IgM käynnistävät CP:n muodostettuaan kohteen pinnalla kompleksin antigeeninsa kanssa. IgA, IgD ja IgE ovat heikkoja CP:n aktivoijia. C1q-, C1r- ja C1s-komponenteista muodostuvan multimeerisen C1-kompleksin C1q:n sitoutuessa antigeeni-vasta-aine-kompleksiin C1r:n ja C1s:n sisäinen seriiniproteaasiaktiivisuus käynnistyy. Aktivoitunut C1s pilkkoo C4-komponentin C4a:ksi ja C4b:ksi. C4b sitoutuu patogeenein pintaan tioesterisidoksellaan, mikä johtaa patogeenein opsonisaatioon. C1s pilkkoo myös C2-komponentin, josta vapautuva C2b yhdessä C4b:n kanssa muodostuu CP:n C3-konvertaasin, C4b2b:n. Kuten kaikissa reaktioteissä, C3-konvertaasi pilkkoo C3:n C3a:ksi ja C3b:ksi, mikä mahdollistaa C3b:n sitoutumisen C3-konvertaasiin muodostaen C5-konvertaasin, joka on CP:n ja LP:n kohdalla C4b2b3b ja AP:n kohdalla C3bBb3b. C5-konvertaasin aktivoima C5b sitoutuu

patogeenin pinnalle, minkä seurauksena C5b–C9 –komponentit lopulta muodostavat MAC:in patogeenin solukalvolle. (Sarma ja Ward 2011.) CP:n voivat immunoglobuliinien lisäksi aktivoida pentraksiinit, kuten C-reaktiivinen proteiini (engl. *C-reactive protein*, CRP), joka voi sitoutua C1q:hun. CRP mahdollistaa CP:n aktivoinnin ilman hankitun immuunipuolustuksen käynnistymistä. (Suresh ja muut 2006).

1.1.2 Lektiinireaktiotie

LP käynnistyy MBL:n sitoutuessa patogeenien pintarakenteiden hiilihydraatteihin, kuten mannoosiin tai N-asetyyli-glukosamiiniin. MBL muodostaa C1-kompleksin kaltaisen kompleksin MBL:ään liittyvien seriiniproteaasien 1 ja 2 (engl. *MBL-associated serine protease*, MASP) kanssa. Aktivoituneen kompleksin MASP2 pilkkoo C4:n ja C2:n, mikä johtaa CP:n kanssa identiteettisen C3-konvertaasin muodostumiseen. Reaktiotie etenee MAC:in kuten CP:ssä. (Sarma ja Ward 2011.) LP:n voivat myös käynnistää osa fikoliineista ja kollektiineista. Ihmisen L-, H- ja M-fikoliinit ovat MBL:n kaltaisia lektiinejä, mutta ne ilmenevät MBL:stä poiketen kudosspesifisesti. (Matsushita 2009.) Kollektiinien 10 ja 11 tiedetään sitoutuvan MASP:eihin sekä joihinkin MBL:n sitoutumiskohteina toimiviin hiilihydraattirakenteisiin, mutta näiden proteiinien tarkkaa tehtävää ei vielä tunneta (Garred ja muut 2016). MBL:n konsentraatio seerumissa on muihin komplementin komponentteihin verrattaessa alhainen. Esimerkiksi C1q:n konsentraatio voi olla jopa 80-kertainen MBL:än verrattuna. (Oikonomopoulou ja muut 2012.)

1.1.3 Vaihtoehtoinen reaktiotie

AP on matalalla tasolla konstitutiivisesti aktiivinen, mikä johtuu C3:n tioesteriryhmän spontaanista hydrolyysistä, joka tuottaa C_{3H₂O}:ta. Tämä viritystila mahdollistaa komplementin reaktiokaskadin nopean käynnistymisen mikrobi-infektion yhteydessä. C_{3H₂O} sitoo B-tekijää (engl. *factor B*, fB), mikä mahdollistaa C_{3H₂O}:n proteolyyttisen aktivoinnin seriiniproteaasi D-tekijän (engl. *factor D*, fD) toimesta. Vapautuva Bb-fragmentti muodostaa AP:n initiaatio-C3-konvertaasin, C_{3H₂O}Bb:n. Kaikkien C3-konvertaasien tuottama C3b opsonoi patogeenit sitoutumalla näiden pintarakenteisiin, mutta se pystyy myös sitomaan fB:tä tuottaen yhä enemmän AP:n amplifikaatio-C3-konvertaasia, C3bBb:tä. Tämä amplifikaatiokierre edelleen voimistaa komplementin aktivoitumista. Etenkin neutrofiilien tuottama properdiini stabiloi C3bBb:tä, ja saattaa myös itsenäisesti aktivoida komplementtia. C3b:n sitoutuessa C3bBb:hen muodostuu

C3bBb3b:tä, joka on AP:n C5-konvertaasi. (Thurman ja Holers 2006; Oikonomopoulou ja muut 2012.)

1.2 Komplementin tehtävät immuunipuolustuksessa

1.2.1 Patogeenien lyysaus

Komplementtisysteemin reaktioteiden terminaalinen kompleksi MAC tuhoaa patogeenin muodostamalla huokosen tämän solukalvon ulkoiselle pinnalle. Kalvon lävistävä huokonen tuhoaa patogeenin joko osmoottisen virtauksen avulla tai mahdollistamalla lysosyymien pääsyn patogeenin ulkoisten pintarakenteiden lävitse. MAC:n toimintaa on tutkittu etenkin gram-negatiivisilla bakteereilla, joita vastaan se on tärkeä puolustuskeino, sillä geneettiset puutokset MAC:n komponenteissa altistavat neisseriaalisille infektioille. MAC voi myös muodostua gram-positiivisten bakteerien pinnalle tai jopa isäntäsolujen solukalvolle, jos kompleksin muodostumista ei säädelä. (Skattum ja Truedsson 2015; Bayly-Jones ja muut 2017.)

1.2.2 Oponisaatio

Oponisaatiossa patogeenin pintaepitopeihin sitoutuvat opsoniinit tehostavat patogeenien fagosytoimista leukosyyttien toimesta. Komplementin pääasialliset opsoniinit ovat C3b ja C4b, jotka sitoutuvat patogeenin pintaan tioesterisidoksilla. Fagosytoivien leukosyyttien CR1- ja CR3-reseptorit kykenevät sitoutumaan näihin opsoniineihin. Myös C1q, MBL ja fikoliinit toimivat opsoniineina. (Litvack ja Palaniyar 2010; Oikonomopoulou ja muut 2012.)

1.2.3 Immuunikompleksien ja apoptoottisten solujen hävittäminen

Immuunikompleksien muodostuminen kehoon altistaa autoimmuunisairauksille, kuten systeemille lupus erythematosukselle. Systeeminen lupus erythematosus on autoimmuunisairaus, jossa immuunipuolustuksen solut hyökkäävät isäntäsoluja vastaan, mikä johtaa oireisiin, kuten nivelsärkyyn, väsymykseen, kuumeeseen ja eri elinten tulehduksille. (Vignesh ja muut 2017.) Etenkin C1q:n geneettisillä puutoksilla on havaittu yhteys tähän sairauteen, sillä jopa 90 % ihmisistä, joilla C1q:n toiminta puuttuu havaitaan systeemisen lupus erythematosuksen oireita. C1q ja C3 toimivat opsoniineina, jotka sitoutuvat immuunikomplekseihin. Punasolut sitoutuvat opsonoituihin immuunikomplekseihin ja kuljettavat ne maksaan hävitettäväksi. (Chen ja muut 2010; Oikonomopoulou ja muut 2012.) Toimivan apoptoosiprosessin on todettu vaativan

apoptoottisten solujen opsonisoitumista C3:n toimesta. Erityisesti CP:n komponentit C1q, C4 ja C2 aktivoivat komplementtivälitteistä apoptoosia. (Gullstrand ja muut 2009.)

1.2.4 Tulehdusreaktion säätely

C3- ja C5-konvertaasien vapauttamat C3a ja C5a ovat anafylatoksiineja, jotka värväävät infektiopaikalle inflammatorisia soluja, kuten neutrofiilejä, eosinofiilejä, basofiilejä, syöttösoluja ja makrofageja. Ne siis toimivat immuunisoluja kemiallisesti houkuttelevina positiivisina kemotaksiineina. C3a ja C5a nostavat verisuonten adheesiota ja läpäisevyyttä, jolloin immuunipuolustuksen solut pääsevät kulkemaan infektiopaikalle. Anafylatoksiinit aktivoivat myös neutrofiilien fagosytoosireaktioita ja syöttösolujen histamiinituotantoa. Neutrofiilien fagosytoosireaktiot perustuvat pääasiallisesti happeen sidottuihin radikaalireaktioihin, jotka hengitysryöpsähdyksessä tuottavat reaktiivisia yhdisteitä patogeenien hallittuun tuhoamiseen. C3a ja C5a välittävät vaikutuksensa kahden G-proteiinikytkentäisen reseptorin, C3aR ja C5aR, kautta. Anafylatoksiinin sitoutuminen reseptorinsa ekstrasellulaariseen N-terminaaliseen osaan, aiheuttaa reseptorin intrasellulaarisessa C-terminaaliosassa konformaation muutoksen, joka mahdollistaa reseptorin sitoutumisen G-proteiineihin, jotka aiheuttavat signaalikaskaadin. (Sarma ja Ward 2011). Kolmas tunnettu reseptori, C52L, ei kykene sitomaan G-proteiinia, eikä sen tarkoitusta vielä tunneta. C4a on rakenteeltaan C3a:n ja C5a:n kaltainen proteiini, mutta sillä ei ole todettu merkittävää anafylatoksista vaikutusta, eikä sen kohdereseptoreita tunneta tarkkaan (Dunkelberger ja Song 2010). Se saattaa nostaa verisuonten läpäisevyyttä sitoutumalla endoteelisolujen PAR1- ja PAR4-reseptoreihin (Wang ja muut 2017).

1.2.5 Hankitun immuunipuolustuksen säätely

Antigeneja esittelevät solut (engl. *antigen presenting cells*, APC), kuten dendriittisolut ja B-lymfosyytit, sitoutuvat antigeneja opsonisoiviin C3b-komponentteihin komplementtireseptoreilla CR1:llä ja CR2:lla. APC:t käsittelevät sitomansa antigeenit, jotka kompleksoituvat luokan II kudosityhteensopivuustekijöihin, mikä mahdollistaa antigeenien esittelyn T-lymfosyyteille. Antigeenin opsonisaatio laskee B-lymfosyyttien aktivaatorajaa moninkertaisesti ja näin komplementin opsoniinit voivat luonnollisina adjuvantteina. CR1 ja CR2 osallistuvat myös B-lymfosyyttien kypsymiseen ja klonaaliseen selektioon. Näiden reseptorien puutos johtaa B-solujen kuolemaan germinaalikeskuksessa. Germinaalikeskusten dendriittisolut ekspressoivat CR1:tä ja CR2:ta korkealla tasolla, ja sitovat C3-opsoniineilla pinnoitettuja antigeneja, joita

esittelemällä ne vaikuttavat B-muistisolujen ylläpitoon ja kypsyymiseen. (Dunkelberger ja Song 2010.)

Komplementtisysteemi osallistuu T-solujen toiminnan säätelyyn monipuolisesti. APC:t tuottavat komplementin komponentteja, kuten fB:tä, fD:tä, C3:a ja C5:a. Näiden komponenttien tuotanto kasvaa APC:n vuorovaikuttaessa T-solujen kanssa. Näistä komponenteista syntyvät anafylatoksiinit vaikuttavat APC:eiden sytokiiniprofiiliin, joka säätelee T-solujen lisääntymistä ja aktivoitumista. Esimerkiksi anafylatoksiinien sitoutuminen APC:eiden Toll:in kaltaisiin reseptoreihin muuttavat APC:eiden kudosityhteensopivuustekijöiden ilmenemistä sekä aktivoivat sytokiinien tuotantoa. Nämä signaalit vaikuttavat siihen, miten CD4-positiiviset (engl. *cluster of differentiation*, solujen pintatunnistusjärjestelmä) T-solut reagoivat auttaja-T-soluihin ja regulatorisiin T-soluihin. (Oikonomopoulou ja muut 2012.) Komplementtisysteemin toiminta on välttämätöntä optimaalisen T-solujen toiminnan kannalta, sillä C3-puutteellisten hiirten CD4-positiivisten T-solujen herkkyys viruksille on heikko (Kemper ja Atkinson 2007). T-solujen signalointiverkostot ovat kuitenkin monimutkaisia, eikä komplementtiin liittyviä säätelymekanismeja tunneta tarkkaan (Dunkelberger ja Song 2010).

1.3 Komplementin säätely

Primaariset, eli synnynnäiset, immuunipuutteet ovat suhteellisen harvinaisia sairauksia, mutta niiden tutkiminen antaa tärkeää tietoa terveen immuunipuolustuksen toiminnasta (McCusker ja Warrington 2011). Komplementtisysteemin puutokset vaihtelevat harvinaisuudeltaan: joidenkin komponenttien kohdalla tapauksia on todettu vain muutama; MBL:n toiminnan puuttuminen sen sijaan saattaa esiintyä jopa 5–10 %:lla populaatiosta (Skattum ja Truedsson 2015). Huomattavasti komplementin puutoksia merkittävämpiä ovat virheet komplementin toiminnan säätelyssä, sillä jatkuva komplementin aktiivisuus johtaa tulehdustilan vaaralliseen pitkittymiseen, joka aiheuttaa vahinkoa isäntäsoluille ja kudoksille. Merkittävin ja tutkituin komplementin aiheuttama tulehdustila on sepsis, jossa esimerkiksi bakteeri-infektiosta alkanut tulehdustila yltyy rajusti johtaen pitkittyessään monielinräiriöön ja kuolemaan. Tästä syystä komplementtisysteemin on oltava tarkasti säädelty ja sillä täytyy olla kyky erottaa isäntäsolut patogeeneista. Suurin osa komplementin säätelystä on negatiivista, jotta komplementin reaktiokaskadin tuottamat tuhannet komponentit pysyisivät immuunipuolustuksen hallinnassa. Säätely tapahtuu neljällä eri tasolla: C3b:n sekä

C4b:n hajottaminen, C3-konvertaasien rakenteen häiritseminen, MAC:n muodostumisen häiritseminen ja komplementin anafylatoksiinien inaktivoiminen. (Oikonomopoulou ja muut 2012.)

I-tekijä on seriiniproteaasi, joka hajottaa C3b:n ja C4b:n inaktiivisiksi palasiksi, mutta vaatii toimiakseen kofaktoreitaan, H-tekijää (engl. *factor H*, fH), membraanikofaktorin proteiinia ja CR1:tä. I-tekijän riippuvuus kofaktoreistaan mahdollistaa komponenttien hallitun hajottamisen niin, että esimerkiksi patogeenin pinnalla asianmukaisesti toimivaa C3b:tä ei hajoiteta. Tämä osaksi selittyy membraanikofaktorin proteiini ja CR1:den ilmenemisellä isäntäsolujen pinnalla. fH ja CR1 toimivat myös AP:n C3-konvertaasin, C3bBb:n, hajotusta nopeuttavina proteiineina. (Dunkelberger ja Song 2010.)

fH:n teorisoidaan esiintyvän kahdessa eri konformaatioissa: alhaisemman aktiivisuuden konformaatioissa fH toimii kofaktorina, kun taas korkeamman aktiivisuuden konformaatioissa C3bBb:n hajotusta nopeuttavana proteiinina. fH:n sitoutuessa isäntäsolun glykosaminoglykaaneihin tai siaalihappoihin, se vaihtaa konformaatiotaan korkeamman aktiivisuuden muotoon, jolloin se puolustaa isäntäsoluja komplementin toiminnalta. (Pangburn 2000; Meri 2016.) Akuutin faasin proteiini CRP aktivoi CP:ta ja toimii opsoniina, mutta se myös säätelee AP:ta rekrytoimalla tulehduspaikalle fH:ta. CRP on siis opsoniinin lisäksi anti-inflammatorinen proteiini. (Mold ja muut 1999.) Isäntäsolun solukalvolle kovalenttisesti sitoutunut hajotusta nopeuttava tekijä estää uusien C3-konvertaasien muodostumista isäntäsolujen pinnalle ja nopeuttaa C2b:n tai Bb:n irtoamista C3- ja C5-konvertaaseista (Dunkelberger ja Song 2010).

MAC:n muodostumista inhiboi protektiini, CD59, joka on glykosyylifosfatidyyliinositoliin sitoutunut solukalvon proteiini. Se sitoutuu C8:an ja C9:an pakottaen MAC:n konformaatioon, jossa se ei pysty lävistämään solukalvoa. (Bayly-Jones ja muut 2017.) Liukoiset vitronektiini ja S-proteiini inhiboivat MAC:n muodostumista sitoutumalla C5b:hen ja C8:an, mikä estää liukoisten MAC:n makromolekyylien toimintaa (Su 1996). Inflammatoristen anafylatoksiineiden toimintaa inhiboivat karboksipeptidaasit, jotka poistavat C3a:sta ja C5a:sta N-terminaalisen arginiinin, jolloin muodostuvat desarginoidut komponentit eivät enää kykene tehokkaasti sitoutumaan reseptoreihinsa (Dunkelberger ja Song 2010). Edellä mainittujen lisäksi C1-inhibiittori on tärkeä komplementin säätelyyn osallistuva proteiini, sillä se inhiboi sekä CP:tä että LP:tä

sitoutumalla C1r:än, C1s:än ja MASP2:en. Se myös kontrolloi verisuonten läpäisevyyttä inhiboimalla proteaaseja, jotka aktivoivat bradykiniiniä, XIIa-tekijää ja plasman kallikreiniä. (Davis ja muut 2008.)

2. Komplementtisysteemin toiminnan mittaaminen

2.1 Komplementtisysteemin funktionaalinen analyysi

Komplementtisysteemin aktiivisuuden mittaaminen mahdollistaa komplementin toimintahäiriöiden havaitsemisen ja näiden häiriöiden aiheuttamien tai niihin liittyvien sairauksien diagnosoinnin. Tyypillisesti funktionaalinen analyysi tehdään hemolyytisillä kokeilla, joissa seeruminäytteet lyysaavat IgG-pinnoitettuja lampaan punasoluja. Seeruminäytteitä laimennetaan, kunnes saadaan minimikonsentraatio, joka tappaa 50 %:ia punasoluista. Tämä CH50-testi mittaa CP:n toimintaa. AP:n funktionaalinen analyysi tehdään AH50-testinä, joka eroaa CH50-testistä reaktiossa käytetyn etyleeniglykoli-tetra-etaanihapon (engl. *ethylene glycol tetraacetic acid*, EGTA) suhteen. EGTA salpaa CP:n ja LP:n kelatoimalla seerumin Ca^{2+} -ionit, jolloin vain reaktioteistä vain AP jää aktiiviseksi. Komplementtipuutosten suhteen nämä testit ovat vain suuntaa-antavia, sillä ne eivät kerro yksittäisten komponenttien toiminnasta, vaan kokonaisista reaktioteistä. (Kirschfink ja Mollnes 2003). LP:n funktionaalinen analyysi hemolyytisesti onnistuu pinnoittamalla punasolut mannaanilla, mutta tämä vaatii eksogeenista MASP:ia tai muita komplementin komponentteja, mikä tekee testistä epäkäytännöllisen (Seelen ja muut 2005). Hemolyytisiä kokeita käytetään myös yksittäisten komplementin komponenttien toiminnan analyysiin. Komponenttien titraatio vaatii kyseisen reaktiotien muiden komponenttien läsnäolon. Kätevin tapa mitata tietyn komponentin aktiivisuutta on kokeilla palautuuko näytteseerumin hemolyytinen aktiivisuus, kun reaktioon lisätään puhdistettua seerumista puuttuvaa komponenttia. (Kirschfink ja Mollnes 2003.)

Hemolyytiset kokeet ovat työläitä ja vaikeasti standardoitavissa. Tämän vuoksi reaktioteiden analyysiä varten on kehitetty useita entsyymivälitteisiä immunosorbenttimäärityksiä (engl. *enzyme-linked immunosorbent assay*, ELISA), joiden pohjalta on myös kehitetty kaupallisesti saatava Wielisa-kitti (Wielisa COMPL300 Total Complement Functional Screen kit, Wieslab AB, Lund, Ruotsi). Tässäkin kitissä ongelmaksi muodostuu CP:n aiheuttama häiriö LP:n aktiivisuuden mittaamisessa, mikä vältetään käyttämällä CP:n salpaavaa C1q-vasta-ainetta. C1q-vasta-aineen käyttö vaatii korkean seerumipitoisuuden, joka saattaa johtaa väärin positiivisten toteamiseen. LP:n funktionaalisesta analyysistä hankalaa tekevät myös suuret erot reaktiotien aktiivisuudessa eri ihmisten välillä. Nämä erot johtuvat ainakin MBL:n oligomerisaatioeroista sekä MBL:n toiminnan puutteiden suhteellisesta yleisyydestä, ja näistä eroista johtuen LP:n aktiivisuuden analysointiin täytyy käyttää

erityisiä laskutoimenpiteitä. Joka tapauksessa ELISA-menetelmät korreloivat hemolyyttisten kokeiden kanssa, ja nämä menetelmät ovat yleistyneet reaktioteiden toiminnan analyysissä. (Seelen ja muut 2005; Palarasah ja muut 2011).

2.2 Komplementin antibakteriaaliset kokeet

Seerumin bakterisidisuuskoetta (engl. *serum bactericidal activity*, SBA) käytetään vasta-aineiden komplementtisysteemiin liittyvän bakterisidisen vaikutuksen mittaamisessa. Menetelmällä voidaan arvioida sekä passiivisten infektioiden että aktiivisten rokotteiden tuottamien vasta-aineiden vaikutusta bakteereihin. SBA:ta käytetään rokotteiden kehityksessä sekä luonnollisen immunitetin tutkimuksessa, esimerkiksi, kun halutaan tietää, miten tietyt sairaudet esiintyvät eri ikäryhmillä. Käytännössä koe tehdään inkuboimalla seerumilaimennoksia kohdebakteerien ja eksogeenisen komplementtisysteemin kanssa. Eksogeenisen komplementtisysteemin lähteenä käytetään usein jäniksen seerumia. Patogeenille spesifinen vasta-aine sitoutuu bakteerin pintarakenteisiin, joka mahdollistaa C1q:n sitoutumisen antigeeni–vasta-aine-kompleksiin ja CP:n käynnistymisen, joka johtaa kohdebakteerien lyysikseen. Seerumin tappotehokkuus voidaan arvioida maljaamalla SBA-reaktioseos ja laskemalla pesäkkeen muodostavat yksiköt (engl. *colony forming units*, CFU) jokaiselle seerumilaimennokselle. Bakterisidiset vasta-ainetiitterit lasketaan yli 50 %:ia bakteereista tappaneen seerumilaimennoksen käänteisarvosta. Maljaaminen ja CFU:n laskeminen on työlästä eikä sovellu usean seeruminäytteen analysointiin, joten SBA:ta varten on kehitetty fluorometrisiä ja kolorimetrisiä muunnelmia. (Necchi ja muut 2017.)

Perinteinen SBA mittaa vain komplementin CP:n antibakteriaalista vaikutusta. Vanhimmat AP:n bakterisidista vaikutusta mitanneet tutkimukset käyttivät 11 AP:n ja MAC:n isooiduista proteiineista muodostettua seosta, joka sisälsi AP:n sytolyyttisen kokonaisuuden. Tämän seoksen vaikutusta *Escherichia coli*-soluihin mitattiin CFU:n avulla. Tutkijat totesivat AP:n olevan bakterisidinen ilman immunoglobuliineja, mikä tällöin vielä oli uutta tietoa. (Schreiber ja muut 1979.) AP:n bakterisidista aktiivisuutta *E. coli*n eri serotyyppejä vastaan on mitattu EGTA:aa sisältävällä seerumilla (Roberts ja Phillips 1983). Myöhemmin AP:n ja CP:n bakteriolyttisiä eroja on mitattu bioluminesenssiin perustuvilla menetelmillä, joissa ihmisen CP:n todettiin olevan bakteerikoettimien tappotahdin suhteen jopa viisinkertaisesti aktiivisempi kuin AP:n (Kilpi ja muut 2009).

3. Bakteerien elinkelpoisuus

Tavanomaisesti bakteerien elinkelpoisuudella tarkoitetaan niiden kykyä jakaantua meediumissa tai muodostaa pesäkkeitä agarilla, kun niiden saatavilla on tarvittavat ravintoaineet ja optimaaliset ympäristöolosuhteet. Tämä määritelmä on ongelmallinen, sillä laboratorion *in vitro* olosuhteet eivät vastaa bakteerien luonnollista elinympäristöä, ja vain osa bakteerilajeista jakaantuu meediumissa tai agarilla. Laboratorio-olosuhteissa bakteerit myös säilyvät kauemmin elinkelpoisina kuin luonnossa, jossa bakteeripopulaatiot joutuvat jatkuvasti tasapainoilemaan jakaantumisen ja kuoleman välillä. Myös bakteerien kuolema on hankalampi käsite kuin voisi olettaa. Vanhat menetelmät bakteerien kasvun ja elinkelpoisuuden mittaamiseksi rajoittivat kuolleen bakteeripopulaation määritelmän bakteeripopulaatioksi, joka ei enää jakaannu ja, jolla ei ole metabolista aktiivisuutta. Nykyään jo tiedetään, että elinkelpoiset bakteerit voivat vaipua horrostilaan, jossa ne ovat yhä elinkelpoisia, mutta eivät jakaannu ennen kasvuolosuhteiden muuttumista. Tämän lisäksi kuolleilla bakteereilla voi olla mitattavissa olevaa metabolista aktiivisuutta. (Atosuo 2015.)

Osalla tavanomaisesti viljeltävistä bakteereista on havaittu horrostilan kaltainen olotila, jossa ne lakkaavat jakaantumasta niille ominaisella kasvumeediumilla, vaikka ne ovat yhä elinkelpoisia. Tällöin bakteerin sanotaan olevan elinkelpoinen muttei viljeltävä (engl. *viable but non-culturable*, VBNC). VBNC-solut eroavat kuolleista soluista usealla eri tavalla: niiden solukalvo ei ole vahingoittunut, eikä se päästä ulos bakteerin DNA:ta, ne ovat yhä metabolisesti aktiivisia, ne tuottavat mRNA:ta ja ottavat sisäänsä ravintoaineita. Solut siirtyvät VBNC-tilaan niiden altistuessa erilaisille stressitekijöille, mikä kertoo tämän tilan olevan osa bakteerien selviytymisstrategiaa haastavissa olosuhteissa. Tätä hypoteesia vahvistavat näiden solujen korkeampi vastustuskyky kuumuutta, matalaa pH:ta, etanolia, antibiootteja ja oksidatiivista stressiä vastaan. Jotkut VBNC-solut voivat selvitä nälkiinnyttyinä jopa kuusi vuotta. VBNC-soluja ei voida havaita perinteisillä bakteerien elinkelpoisuutta mittaavilla menetelmillä, mikä tekee näistä soluista erityisen vaarallisia patogeeneja ihmisille. Elinkelpoisten bakteerien erottaminen kuolleista on siis myös tässäkin suhteessa välttämätöntä. (Li ja muut 2014.)

3.1 Bakteerien kasvun ja elinkelpoisuuden mittaaminen

Elinkelpoisten bakteerien lukumäärän mittaamiseen voidaan käyttää useaa eri menetelmää, jotka eroavat toisistaan vahvuuksiltaan ja heikkouksiltaan. Yleisin

menetelmä on CFU:iden laskeminen agarmaljalta. Menetelmä on yksinkertainen ja bakteerilaimennosten avulla voidaan laskea suuriakin määriä soluja. Valitettavasti menetelmä ei erota viljeltäviä soluja VBNC-soluista. (Hazan ja muut 2012.) Kasvukinetiikkojen seuranta maljausmenetelmillä on työlästä, eikä tuloksia saada reaaliajassa (Atosuo 2015). Toinen suosittu menetelmä on bakteerikasvuston optisen tiheyden (engl. *optical density*, OD) mittaaminen 600 nm aallonpituudella. Spektrofotometrin emittoima 600 nm aallonpituuksinen valo taittuu suhteessa bakteerikasvuston sameuteen, eli turbiditeettiin. Spektrofotometri mittaa havaitun ja alunperin emittoidun valon aallonpituuksien suhteen, ja ilmoittaa tuloksen absorbanssina. OD:n avulla voidaan seurata bakteerien kasvukinetiikkoja, mutta menetelmä ei erota eläviä soluja kuolleista. Menetelmällä voidaan luotettavasti mitata 10^8 – 10^{10} bakteeria/ml konsentraatioisia näytteitä. (Hazan ja muut 2012.)

Elinkelpoiset bakteerit voidaan havaita käyttämällä hyödyksi niiden erityispiirteitä, kuten metabolista aktiivisuutta ja solukalvon eheyttä. Erilaisia värjäysmenetelmiä voidaan käyttää elinkelpoisten ja kuolleiden bakteerien erottamiseen. Esimerkiksi LIVE/DEAD[®] BacLight[™] –menetelmä perustuu kahden eri fluoresoivan väriaineen käyttöön. Vihreä väriaine SYTO[®]9 läpäisee sekä ehjän että vahingoittuneen solukalvon värjäten kaikki bakteerisolut. Punainen väriaine propidiumjodidi läpäisee vain vahingoittuneen solukalvon ja sitoutuu bakteerisolujen DNA:han. Elinkelpoiset solut erottuvat vihreinä ja kuolleet tai kuolevat solut punaisina. Menetelmää voidaan käyttää mikroskopian tai virtaussytometriin kanssa. Solujen metabolista aktiivisuutta voidaan mitata iodonitrotetrazoliumin kanssa. Se on liukoinen suola, joka kilpailee hapen kanssa elektronin vastaanottamisesta osana solujen elektroninsiirtoketjua. Pelkistysreaktiosta syntyvä punainen formatsaani voidaan havaita mikroskoopilla. (Li ja muut 2014.) Adensiinitrifosfaatti (engl. *adenosine triphosphate*, ATP) on solun energiatalouteen liittyvä runsasenerginen yhdiste, jota voidaan käyttää elinkelpoisten bakteerien havaitsemiseen. ATP-testissä bakteerisolut lysataan, jolloin vapautunut ATP voidaan havaita valoa tuottavassa bioluminesenssi reaktiossa, johon ATP osallistuu. (Eed ja muut 2016.) Edellä mainittujen menetelmien heikkous on, että ne mittaavat usein vain yhtä päätepistettä, jolloin ne eivät anna reaaliaikaista tietoa bakteerien kasvusta. (Atosuo 2015).

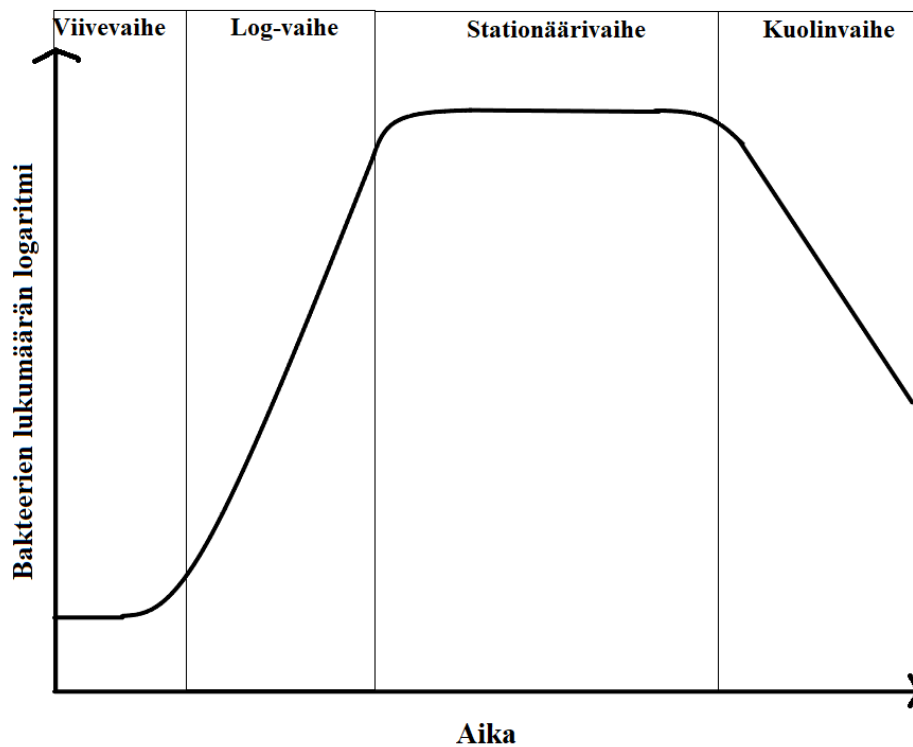
Bakteerien kasvukinetiikkojen reaaliaikaiseen seurantaan on kehitetty monimutkaisia, ja kalliita, menetelmiä, kuten valon sirontaan perustuva ”biospeckle” (Loutfi ja muut

2020), rengasresonaattoribiosensori (Narang ja muut 2018) ja bakteerikasvuston lämmön siirtymisen mittaaminen (Betlem ja muut 2018). Bakteerisolujen kasvukinetiikkoja voidaan myös seurata käyttämällä fluoresoivia tai luminesoivia reportterigeenejä, joiden ekspressiolla on yhteys bakteerien elinkelpoisuuteen. Tällaisten rekombinanttien bakteerien solujen lukumäärä kasvustossa on verrannollinen niiden tuottaman valon intensiteettiin. (Atosuo 2015.)

3.2 Bakteerien kasvuvaiheet puhdasviljelmässä

Bakteerien kasvu on monimutkainen prosessi, johon kuuluu useita anabolisia ja katabolisia reaktioita, mutta lopulta nämä biosynteesiset reaktiot johtavat solujakautumiseen. Jakautumisnopeus vaihtelee merkittävästi riippuen ympäristön olosuhteista. Homogeenisessä, ravintorikkaassa meediumissa solut voivat jakautua jopa kerran kymmenessä minuutissa, mutta joidenkin maanpinnan alaisten bakteerien arvioidaan jakautuvan vain kerran sadassa vuodessa. Ravintoaineiden lisäksi jakaantumiseen vaikuttavat ympäristön lämpötila, pH, osmoottinen paine ja kilpailu muiden eliöiden kanssa. (Vinet ja Zhedanov 2011)

Tyypillisesti bakteereiden kasvatus tapahtuu nestemeediumissa, jonka ravinteita ja ympäristöolosuhteita voidaan kontrolloida. Mikäli meediumi sisältää kasvulle välttämättömät ravinteet ja ympäristöolosuhteet ovat optimaaliset, bakteerisolujen jakaantumista voidaan mitata ajan funktiona, mikä mahdollistaa kasvukäyrän (kuva 2) piirtämisen. Näin luotu kasvukäyrä käyttäytyy usein ennustettavasti, ja siitä voidaan havaita neljä eri kasvuvaihetta: viivevaihe, eksponentiaalisen kasvun vaihe, stationäärivaihe ja kuolinvaihe. (Maier 2009.) Puhdasviljelmät ovat välttämätön työkalu bakteerien virulenssin ja antibioottiherkkyuden tutkimuksessa (Lagier ja muut 2015).



Kuva 2. Bakteerien kasvuvaiheet. Bakteerisolujen lukumäärien logaritmit on esitetty ajan funktiona. Log-vaihe = Eksponentiaalisen kasvun vaihe. Adaptoitu lähteestä Maier 2009.

3.2.1 Viivevaihe

Viivevaiheessa bakteerisolut käyvät läpi intrasellulaarisia muutoksia, joiden avulla ne sopeutuvat uuteen kasvu ympäristöön. Tämä prosessi saattaa sisältää stationäärivaiheen aikana syntyneen makromolekulaarisen vahingon korjaamisen tai jakautumisen vaatimien uusien yhdisteiden synteesin, mutta muista kasvuvaiheista poiketen, viivevaiheen fysiologisista ja molekulaarisista prosesseista on vain vähän tietoa. Tästä johtuen viivevaiheen termille ei ole fysiologisia tai biokemiallisia kriteerejä. (Rolfe ja muut 2012.) Alkuperäisen bakteeripopulaation kaksinkertaistuttua, voidaan sanoa populaation siirtyneen viivevaiheesta eksponentiaalisen kasvun vaiheeseen. Tämä siirtymä voi kestää minuuteista muutamaan tuntiin, mutta viivevaiheen pituus riippuu jälleen kasvuolosuhteista sekä siitä, missä kasvuvaiheessa mikrobisiirroksen solut ovat. Esimerkiksi eksponentiaalisesta kasvuvaiheesta otetulla siirroksella ei nähdä viivevaihetta, jos siirros tehdään uuteen mediumiin, kun taas viivevaihe nähdään, jos mikrobisiirros otettaisiin stationäärivaiheen soluista. (Maier 2009.)

3.2.2 Eksponentiaalisen kasvun vaihe

Eksponentiaalisen kasvun vaihe erottuu kasvukäyrästä jyrkkänä nousuna, jonka aikana kasvunopeus saavuttaa huippunsa. Tämän vaiheen aikana solujen lukumäärä kasvaa lineaarisesti ajan funktiona. Jos alkuperäisten solujen lukumäärä on X_0 , niin solujen määrä n jakaantumisten jälkeen on $2^n X_0$. Eksponentiaalista kasvua voidaan matemaattisesti kuvata kaavalla:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X$$

Missä X on solujen lukumäärä tai solumassa, t on aika ja μ on kasvuvakio. Laskukaavan avulla voidaan laskea bakteeripopulaation generaatioaika, eli se aika, jossa populaatio kaksinkertaistuu. Generaatioaika voidaan laskea kasvukäyrän antamien tietojen mukaan, ja se on myös eksponentiaalisen kasvun muodostaman suoran kulma. (Maier 2009.)

3.2.3 Stationäärivaihe

Luonnossa bakteerit harvoin kohtaavat ympäristöolosuhteita, joissa ne voisivat kasvaa eksponentiaalisesti, mutta niiden kyky nopeasti hyödyntää saamansa ravinteet kertoo siitä, että todellisuudessa bakteerit viettävät suurimman osan ajastaan nälkiintyneinä (Kolter ja muut 1993). Puhdasviljelmässäkään eksponentiaalinen kasvu ei jatku loputtomiin, sillä bakteerit lopulta kuluttavat hiilen lähteensä tai muut ravinteensa, kasvutila loppuu ja meediumiin kasaantuu erilaisia myrkyllisiä jätelyhdisteitä. Tämä näkyy kasvukäyrän tasaantumisena ja siirtymänä stationäärivaiheeseen, jonka aikana solujakaantumisen ja solukuolemien välillä on tasapaino, eikä solujen lukumäärässä ole enää nettokasvua. Tämä voidaan ilmaista laskukaavalla:

$$\frac{dX}{dt} = 0$$

Stationäärivaiheen solut ovat kooltaan pienempiä ja muodoltaan pyöreämpiä kuin eksponentiaalisen kasvun vaiheen solut, mikä johtuu rajoittavien ravinteiden puutoksen aiheuttamasta stressistä. (Maier 2009.)

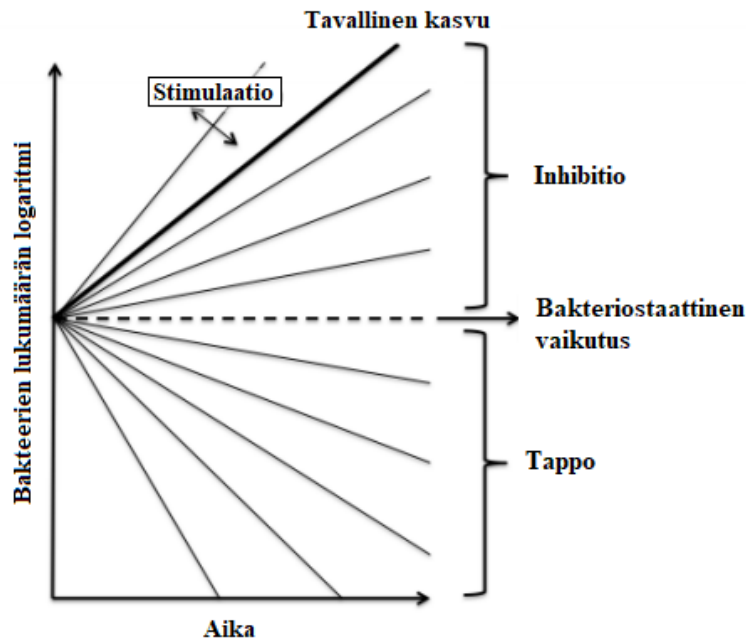
3.2.4 Kuolinvaihe

Lopulta bakteerikasvusto siirtyy kuolinvaiheeseen, jossa solujen lukumäärä laskee. Tämä lasku on usein eksponentiaalista, mutta ei yhtä nopeaa kuin eksponentiaalisen kasvun vaiheessa. Jopa kuolinvaiheessa esiintyy yksittäisiä jakaantuvia soluja, jotka

ovat erityisen resistenttejä vaikeille kasvuolosuhteille tai saavat ravintonsa kuolleilta soluilta, mikä voi näkyä poikkeamina kasvukäyrässä. (Vinet ja Zhedanov 2011).

3.3 Antimikrobiaaliset vaikutukset

Mikrobien tappamiseen käytettäviin desinfektioaineisiin kuuluu laaja kirjo erilaisia kemiallisia yhdisteitä, kuten alkoholeja, fenoleja, hopean eri yhdisteitä ja halogeeneja. Näiden antimikrobiaalinen vaikutus riippuu niiden konsentraatiosta, ja tätä vaikutusta voidaan havainnollistaa kasvukäyrän avulla (kuva 3). Riittävän matalalla desinfektioaineen konsentraatiolla ei ole vaikutusta bakteerin kasvukinetiikkaan. Konsentraation hieman noustessa nähdään bakteerien jakaantumista stimuloiva vaikutus. Konsentraation noustessa kasvukäyrä lähestyy stationäärivaihetta muistuttavaa jakaantumisen ja kuolemissen tasapainotilaa, mitä kutsutaan bakteriostaattiseksi vaikutukseksi. Bakteriostaattinen vaikutus on koetinsolujen inhibition ja tappamisen raja. Sitä korkeammilla konsentraatioilla bakteerien lukumäärän logaritmi lähestyy nollaa. Korkeilla desinfektioaineiden konsentraatioilla bakteerien kuolinvaihe voi muistuttaa eksponentiaalisen kasvun vaiheen kuvaajaa. Eksponentiaalisessa kuolinvaiheessa tietyn ajanjakson kuolleiden solujen logaritmi on suhteessa tämän ajanjakson pituuteen, eli prosentuaalisesti bakteereita kuolee yhtä paljon aikayksikköä kohti. Eri-ikäiset ja eri kasvuvaiheessa olevat bakteerit eroavat niiden desinfektioaineherkkyyden suhteen siten, että nuoremmat solut kuolevat vanhoja helpommin. Stationäärivaiheen solut ja VBNC-solut sopeutuvat ympäristön stressitekijöihin ja kehittyvät eksponentiaalisen kasvun vaiheen soluja vastustuskykyisemmiksi. Logaritminen kuolinvaihe selittyy näillä eroilla, sillä suuri nuorten solujen populaatio kuolee ensin logaritmisessa kuolinvaiheessa. (Atosuo 2015.)



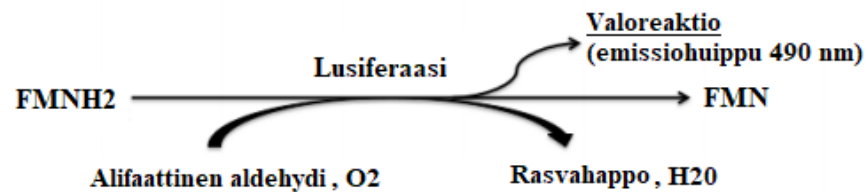
Kuva 3. Antibakteriaaliset vaikutukset. Desinfektioaineen tai muun kemiallisen tekijän konsentraation vaikutus bakteerien kasvuun ja kuolemaan. Adaptoitu lähteestä Atosuo 2015.

4. Bioluminesoivat *E. coli*-lux koetinsolut

4.1 Bakteerien bioluminesenssi

Bioluminesenssilla tarkoitetaan elävän organismin kykyä tuottaa valoa, ja sitä esiintyy hyönteisillä, bakteereilla, kaloilla, sienillä, kasveilla ja eräillä meressä elävillä selkärangattomilla. Eliöt käyttävät bioluminesenssia puolustuskeinona, saalistukseen, kommunikointiin ja terminaaliseen oksidaatioon osana niiden metaboliaa. Bioluminesenssi syntyy kemiallisessa reaktiossa, jossa lusiferiini hapettuu lusiferaasin katalysoimassa reaktiossa. Virittynyt lusiferiini vapauttaa fotonin, mikä havaitaan valona, sen palatessa jälleen alemmalle energiatasolle. Meressä elää maanpintaan verrattuna huomattavasti enemmän bioluminesoivia organismeja, joista parhaiten tunnetaan bakteerit *Vibrio fischeri* ja *Vibrio harveyi*. Näiden bioluminesenssi syntyy reaktiossa (kuva 4), jossa bakteerien heterodimeerinen lusiferaasi luxAB katalysoi alifaattisen aldehydin mono-oksigenaatiota, mikä vaatii molekulaarista happea ja luxAB:n kofaktorin, pelkistetyn flaviinimononukleotidin (engl. *flavin mononucleotide*, FMNH₂). Reaktion välituotteena syntyy virittynyt FMN-4a-hydroksidi, jonka palautuminen matalammalle energiatasolle tuottaa valoa. Syntyvä valo on huipussaan 490 nm aallonpituudella. Reaktiossa syntyy aldehydiä vastaavaa rasvahappoa, hapettunutta flaviinimononukleotidia (FMN) ja vettä. Bioluminesenssista vastaava *lux*-geenikasetti (*luxCDABE*) sisältää geenit sekä lusiferaasille sekä substraatin tuotosta vastaaville

entsyymeille, mikä poikkeaa muista bioluminesoivista organismeista. (Scott ja muut 2011.)



Kuva 4. Bakteerien lusiferaasireaktio. Adaptoitu lähteestä Atosuo 2015.

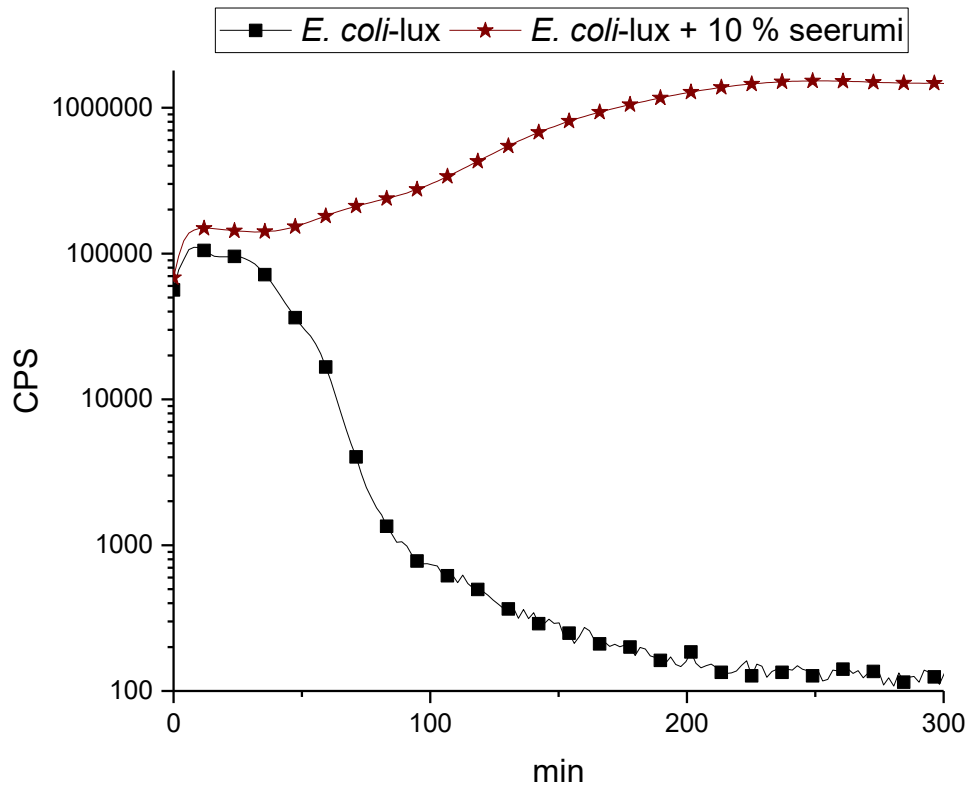
Kaikki bioluminesoivat bakteerit jakavat samat valon tuotosta vastaavat ydingeenit. Nämä geenit sijaitsevat *lux*-operonissa, yhden promoottorin alla. Geenit esiintyvät konservoidusti järjestyksessä *luxCDABE*, mutta lajista riippuen operoni saattaa sisältää muitakin geenejä. *luxA* ja *luxB* geenit koodaavat heterodimeeristä lusiferaasia; *luxC*, *luxD* ja *luxE* koodaavat rasvahapporeduktaasikompleksin osia. Osalta bakteereista puuttuva *luxG* koodaa flaviinireduktaasia, joka osallistuu reaktion aldehydisubstraatin biosynteesiin. Siksi tämä geeni joskus lasketaan mukaan konservoituneeseen geenikasettiin. Muita geenejä ovat *luxF*, *ribEBHA* ja *luxI* sekä viereisessä operonissa lukukehykseltään vastakkaisesti orientoitunut *luxR*. *luxF*:n tuottaman proteiinin *luxF*:n uskotaan estävän lusiferaasin inhibitiota sitoutumalla myrFMN:ään, joka on lusiferaasireaktion oletettu sivutuote. Osalla bioluminesoivista bakteereista solutiheys vaikuttaa bioluminesenssin säätelyyn, johon *luxI*:n ja *luxR*:n tiedetään osallistuvan. *ribEBHA*-geenit osallistuvat riboflaviinin biosynteesiin, joka on luminesenssireaktion substraatin FMNH₂:n osa. *rib*- ja *lux*-geenien kotranskriptio saattaa siis tehostaa bioluminesenssin tuotantoa. (Brodli ja muut 2018.)

Bioluminesoivien bakteerien käyttö kokosolun biosensoreina mahdollistaa bakteerien elinkelpoisuuden, antimikrobiaalisten yhdisteiden vaikutuksen ja immuunipuolustuksen toiminnan tutkimisen. Lusiferaasien toiminta reportterigeeneinä bakteerien elinkelpoisuudelle perustuu siihen, että, niiden ilmeneminen vaatii metabolisesti aktiivisen isäntäsolun. Toisin kuin fluoresoivat yhdisteet, bioluminesoivien eliöiden virittyneet välituotteet ovat lyhytikäisiä, eivätkä ne kerry soluihin. Tämä mahdollistaa kuolleiden solujen erottamisen elävistä reaaliaikaisesti. Bioluminesenssi onkin hyödyllinen työkalu mikrobien kasvukinetiikan seurannassa, ja menetelmä on yleistynyt

senkin takia, että *lux*-geenikonstruktioiden siirtäminen uusiin bakteerikantoihin on yksinkertaista. Luonnossa kaikki bioluminesoivat bakteerit ovat gram-negatiivisia, mutta myös gram-positiivisista bakteereista on onnistuttu tekemään bioluminesoivia. Tämä on onnistunut joko siirtämällä vain *luxAB*-geenit tai muokkaamalla ydingeenien järjestystä gram-positiivisten bakteerien transkriptiosysteemille sopivaksi, muotoon *luxABCDE*. Jälkimmäinen konstrukti on siirretty gram-positiivisille *Streptococcus pneumoniaelle* ja *Streptococcus aureukselle*. (Atosuo 2015.)

4.2 *E. coli*-lux koetinsolujen hyödyntäminen

Atosuo tutkimusryhmineen on transformoinut *luxABCDE*-geenikasetin *E. coli* K-12-kantaan suuren kopioluvun plasmidissa *pEGFP*:ssä. Lac-promoottorin alainen *lux*-operoni tuottaa lusiferaasiholoentsyymiä ilman eksogeenista substraattia. Selektiopaineen ylläpitämiseksi plasmidi sisältää myös ampicilliiniresistenssigeenin, *amp*-geenin. Geenin koodaama β -laktamaasi hajottaa ampicilliinin lisäksi myös muita antibiootteja, kuten penisilliiniä ja amoksisilliiniä. Rekombinantti *E. coli* K-12 *pEGFPluxABCDEamp* nimettiin *E. coli*-lux:iksi. *E. coli*-lux:in tuottaman valon intensiteetti on suoraan suhteellinen kasvustossa elävien bakteerisolujen lukumäärään, joten luminometrin kanssa voidaan bakteerien kasvukinetiikkaa seurata reaaliajassa (kuva 5). Koetinsolujen bioluminesenssiin perustuvalla menetelmällä saadut kasvukinetiikat korreloivat CFU:n ja OD:n kanssa, ja menetelmällä voidaan seurata 10^2 – 10^8 bakteerisolua/kaivo kokoisia kasvustoja. Bakteerien kuolema erottuu luminesenssisignaalin laskuna. Altistamalla solut eri konsentraatioille antimikrobiaalista etanolia ja polymyksiini B:tä voitiin kasvukäyristä erottaa kaikki neljä eri antibakteriaalista vaikutusta: stimulaatio, inhibitio, bakteriostaattinen vaikutus ja tappo. (Atosuo ja muut 2013.)



Kuva 5. Koetinsolujen tappokinetiikkojen seuranta. Kuvaajassa luminesenssisignaali mittauksina sekunnissa (CPS) on ilmoitettu ajan funktiona. Ilman seerumia tai muuta antimikrobiaalista yhdistettä koetinsolujen (*E. coli-lux*) kasvu näkyy bioluminenssisignaalin nousuna. Seerumin antimikrobiaalinen vaikutus näkyy koetin solujen kuolemana ja signaalin laskuna (*E. coli-lux* + 10 % seerumi). Tarpeeksi väkevällä bakteriosidilla signaali lähestyy nollaa.

E. coli-lux:ia on käytetty koettimena immunologisissa ja toksilogisissa mittauksissa. Koetinsolujen avulla on tutkittu seerumin komplementtisysteemin antimikrobiaalista aktiivisuutta. Varhaisimmista tutkimuksista mitattiin *E. coli-lux* solujen elinkelpoisuutta, kun niitä inkuboitii 10 %:ssa kokoseerumissa ja 10 %:ssa EGTA:lla käsitellyssä seerumissa. Tutkimuksissa havaittiin reaktioteiden suhteen eroja etenkin komplementin antimikrobiaalisen aktiivisuuden käynnistymisen nopeudessa. Menetelmää ehdotettiin vaihtoehdoksi perinteisille hemolyttisille kokeille (Kilpi ja muut 2009; Atosuo ja muut 2013), ja sitä on viimeaikoina käytetty sisäilmavaurioille altistuneiden CP:n aktiivisuuden muutosten tutkimiseen (Atosuo ja muut 2021). Seerumin komplementin toimintaa tutkittiin myös taimenilla, sialla ja lepakolla (Kilpi ja muut 2009; Lilley ja muut 2013). Luonnossa orgaanisille tinan yhdisteille altistuneiden *Myotis daubentonii* lepakoiden seerumista tutkittiin näiden yhdisteiden komplementtisysteemin vaimentavaa vaikutusta (Lilley ja muut 2013). Niveljalkaisten hemolymfalla oli komplementin kaltainen antimikrobiaalinen vaikutus koetinsoluihin, vaikka niillä ei ole selkärankaisten kaltaista komplementtisysteemiä. Sen sijaan ne

suojaantuvat patogeeneilta erilaisin antimikrobiaalisin peptidien, joiden toiminta saattaa olla verrattavissa joihinkin komplementin komponentteihin. (VOJTEK ja muut 2014.) Muut immunologiset tutkimukset ovat keskittyneet neutrofiilien hengityspurskeen eri mekanismien osuuteen koetinsolujen tapossa (Atosuo ja Lilius 2011; Atosuo ja Suominen 2019).

E. coli-lux soveltuu antimikrobiaalisten yhdisteiden tehokkuuden tutkimiseen. Näiden yhdisteiden sekä lyhyt- että pitkäaikaista vaikutusta seuraamalla voidaan varmistua niiden toksisesta vaikutuksesta. (Suominen ja muut 2020.) Kuuden eri sisäilman homelajin uutosten toksisuutta koetinsoluille verrattiin yleisesti sytotoksisissa tutkimuksissa käytetyillä villisian siittiöillä ja sian munuaisen epiteelisoluilla saatuihin vastaaviin tuloksiin. Toksisten yhdisteiden negatiivinen vaikutus *E. coli*-lux:n elinkelpoisuuteen korreloi näiden kahden menetelmän tulosten kanssa, mikä kertoo *E. coli*-lux:in soveltuvuudesta sytotoksisiin tutkimuksiin. Sisäilmavaurioisten rakennusten yläpölystä otettujen näytteiden toksisuutta mitattiin *E. coli*-lux:n kanssa. Sokotetussa kokeessa menetelmällä pystyttiin onnistuneesti tunnistamaan sisäilmavaurioiset rakennukset kontrollirakennuksista. (Atosuo 2015.) Piloottitutkimuksissa pölynäytteiden toksisuuden on todettu korreloivan altistuneiden kokemien oireiden kanssa. Valitettavasti toksisuustestien käyttöä sisäilmavaurioiden arvioimisessa pidetään kyseenalaisena menetelmänä. (Putus 2017.)

5. Sisäilmavauriot

Suurin osa ihmisistä kuluttaa noin 90 %:ia ajastaan sisätiloissa, joten sisäilman laadulla on merkittävä vaikutus hyvinvointiin. Sisäilmavauriot ja huonolle sisäilmalle altistuminen ovat ihmisen merkittävien ympäristöuhkien maailmanlaajuisesti. Arvioiden mukaan joka kymmenes kuolemantapaus maailmassa liittyy sisäilman epäpuhtauksiin, ja vuonna 2013 5,5 miljoonaa ihmistä kuoli pelkästään sisäilmavaurioiden aiheuttamiin oireisiin. Sisäilmavauriot aiheuttavat mittavat taloudelliset kulut menetettyjen työtuntien, materiaalien vahinkojen ja terveydenhoidon kulujen muodossa. Sisäilman laatuun vaikuttavat kolme päätekijää: ulkoilman laatu, ihmisten aktiivisuus rakennuksessa ja käytetyt rakennusmateriaalit sekä kalustus. Ulkoilman saasteet pääsevät sisäilmaan ilmanvaihdon kautta ja näin vaikuttavat myös sisäilman laatuun. Ihmisten päivittäisestä aktiivisuudesta vapautuu saasteita, kuten hyönteismyrkkyjä, liuottimia, ja pölyä. Ihmiset myös luovat mikrobeille, viruksille ja hyönteisille otollisia elinympäristöjä. Tietotekniikka ja muu välineistö vapauttavat otsoonia ja haihtuvia yhdisteitä. Useat yleiset rakennusmateriaalit, kuten lattiapäällysteet, maalit ja liimat voivat vapauttaa myrkyllisiä yhdisteitä. Sisäilman saasteilla on laaja kirjo eri terveyshaittoja, joita ovat ainakin astma, allergiareaktiot, mikrobi-infektiot, hengitystien sairaudet, syöpä ja maksavauriot. (Van Tran ja muut 2020; González-Martín ja muut 2021.)

Sisäilman saasteisiin luetellaan ilman pienhiukkaset, biologiset saasteet, fysikaaliset päästöt ja yli 400 erilaista kemiallista yhdistettä. Pienhiukkaset ovat tyypillisesti alle 2,5 µm kokoisia ilman kiinteitä hiukkasia, jotka voivat päätyä hengitysteihin. Pienhiukkaset pääsevät sisäilmaan ilmanvaihdon kautta tai niitä voi vapautua palamisreaktioista, kuten ruuanlaitosta, lämmityksestä tai tupakoinnista. Myös rakennusten lasikuidut ja asbesti lasketaan pienhiukkasiin. Biologisiin saasteisiin luetellaan eläinperäiset allergeenit, mikrobit, mikrobien toksiniitit ja virukset. Biologisia saasteita syntyy etenkin rakennusten kosteusvaurioiden yhteydessä, jolloin kosteus ja lämpö mahdollistavat haitallisten mikrobien kasvun. Mikrobit, niiden itiöt tai toksiniitit voivat kulkeutua hengitysteihin, ja mikrobikasvustot vapauttavat myös rakennusmateriaaleista saasteita. Kosteusvauriomikrobeja ovat homeet, hiivat ja eräät maaperän aktinobakteerit, joita on ennen kutsuttu sädesieniksi. Fysikaalisia päästöjä ovat esimerkiksi liian korkea lämpötila, elektromagneettiset kentät tai melu. Saastuttavia kemiallisia yhdisteitä on sekä epäorgaanisia että orgaanisia. Merkittävimpiä näistä ovat kaasut kuten, hiilidioksidi, hiilimonoksidi, typpioksidit sekä otsoni, ja haihtuvat yhdisteet, kuten bentseeni, tolueni ja ksyleenit. Kaasut pääsevät sisäilmaan joko ulkoa tai ne syntyvät

palamisreaktioissa. Haihtuvia yhdisteitä vapautuu rakennusmateriaaleista sekä siivous- ja hygieniatuotteista. (González-Martín ja muut 2021.)

Sisäilman laadussa ja saasteprofiileissa on eroja kehitysmaiden ja kehittyneiden maiden välillä. Kehitysmaissa ongelmaksi on muodostunut biomassan käyttö lämmityksessä ja ruuanlaiton polttoaineena. Jopa kolme miljardia ihmistä käyttää puuta, lantaa tai satojätteitä polttoaineina yksinkertaisissa kamiinoissa, jolloin epätäydellisestä palamisesta vapautuvat kaasut aiheuttavat sisäilmavaurioita. (Bruce ja muut 2000.) Toinen kehitysmaalle ominainen ongelma ovat vaaralliset rakennusmateriaalit, kuten asbesti, joiden käytön kehittyneet maat ovat jo lopettaneet (Frank ja Joshi 2014). Suomessa ja muissa kehittyneissä maissa kosteusvaurioiden aiheuttamat mikrobikasvustot ovat yleisempi sisäilmavaurioiden syy, sillä esimerkiksi Norjassa noin 30 %:ssa rakennuksista on kosteusvaurion merkkejä (Holme ja muut 2020). Suomen julkisessa keskustelussa sisäilmavaurioista puhutaan usein nimenomaan kosteusvaurioina tai homevaurioina, vaikka sisäilmavaurio on näitä laajempi käsite. Kenties tämä johtuu osaksi siitä, että mikrobikasvustot, ja etenkin homesienet, on helppo havaita silmämääräisesti tai niiden tunkkaisen ominaishajun perusteella, toisin kuin esimerkiksi haihtuvat kemialliset yhdisteet. (Putus 2017).

Suomessa kosteusvaurioiden tutkimus alkoi 1990-luvun alussa, kun Kansanterveyslaitoksella oli tarve vastata kunnilta tulevaan tiedon tarpeeseen. Terveystarkastajien oli määrä selvittää kosteusvaurioiden terveyshaittoja asunnoissa ja julkisissa laitoksissa lähtökohtanaan vain tieto maatalous- ja sahatyön homepölykeuhtotapauksista. (Putus 2017). Samaan aikaan maailmalla puheenaiheena oli niin sanottu sairaan rakennuksen oireyhtymä (engl. *sick building syndrome*, SBS), jossa ihminen oireilee vain tietyssä rakennuksessa, mutta oireet häviävät rakennuksesta poistuttaessa. SBS-rakennusten uskottiin olevan uuden allergiaepidemian lähtöpiste, minkä takia tutkijat pyrkivät selvittämään monipuolisten oireiden syitä. Syiksi epäiltiin nykyään jo tunnettuja sisäilmavaurioiden aiheuttajia, kuten kosteusvaurioita, mutta terminä SBS oli hyvin epäselvä ja laajasti kritisoitu. Tutkijat eivät päässeet yhteisymmärrykseen SBS:n oireista, diagnosoinnista tai hoitotoimenpiteistä. (Tuuminen 2020.) Suomessa kosteus- ja mikrobivaurioiden tunnistamisesta, tutkimisesta ja hoidosta on tehty sisäilma-asiantuntijoiden yhteinen kannanotto, Majvik-suositus, joka 2007 päivitettiin nykyiseen muotoonsa. Tämän Majvik II –suosituksen mukaan

rakennusten kosteusvaurio johtaa materiaalien kemialliseen hajoamiseen ja mikrobiongelmiin. (Putus 2017).

Kaikesta huolimatta homeiden terveyshaitat ovat yhä kiistanalainen puheenaihe tiedeyhteisössä. Ilmiön kriitikoiden mukaan jopa miljoonista eri homelajeista vain pieni osa on ihmiselle patogeenisia, ja näiden aiheuttamat oireet rajoittuvat allergiaan, astmaan ja sieni-infektioihin. Sienien mykotoksiinien tiedetään aiheuttavan maksavaurioita ja syöpää, mutta kriitikot eivät usko niillä olevan terveyshaittoja kosteusvaurioiden yhteydessä, koska niiden täytyisi päästä elimistöön ruuansulatuskanavan kautta. Kosteusvaurioiden näytteenottomenetelmiä kritisoidaan siitä, että ne kuvaavat vain yksittäisen hetken ja sijainnin mikrobikantaa, vaikka viljeltävien sieni-itiöiden määrät vaihtelevat huomattavasti. Pölynäytteiden uskotaan sen sijaan sisältävän vain pölyssä kasvavaa uniikkia mikrobipopulaatiota, jolloin ne eivät kuvaa rakennuksen koko mikrobipopulaatiota. Kosteusvaurioille altistumista testaavia kliinisiä testejä kritisoidaan niiden standardoinnin puutteesta. Skeptinen suhtautuminen kosteusvaurioihin saattaa johtua oireiden ja altistumisen määrittämisen vaikeuden lisäksi myös SBS:n aiheuttamasta kohusta sekä kosteusvaurioiden mittavista taloudellisista kuluista. (Pettigrew ja muut 2010; Borchers ja muut 2017; Chang ja Gershwin 2019.)

5.1 Kosteusvaurioille altistumisen terveyshaitat

Kosteusvaurioille altistumisen oireet etenevät vaurion iän ja mikrobikannan mukaan. Kosteusvaurion alkuvaihe oireilee viihtyvyys- ja hajuhaittoina, jotka johtuvat indikaattorimikrobeista, kuten *Penicillium*-suvun homeista. Altistuksen alkuvaiheessa oireet on mahdollista ajallisesti yhdistää vaurioituneeseen rakennukseen, mutta altistuksen jatkuessa pitkään tämä yhteys hämärtyy. Vähitellen altistuneille alkaa ilmetä hengitysteiden, ihon ja silmien ärsytysoireita, kuten nuhaa, yskää, silmien punoitusta, ihottumaa ja kutinaa. Mikrobikannan muuttuessa myös oireet alkavat muuttua – ärsytysoireita seuraavat hengitystieinfektiot ja vaikeat tulehduskierteet. Kehittyvään oirekuvaan kuuluvat myös astmaan ja allergiaan liittyvät yleisoireet. Vakavimmat oireet esiintyvät yleensä kosteusvaurion loppuvaiheessa, jonka indikaattorimikrobeihin kuuluu musta homeenakin tunnettu *Stachybotrys chartarum*. Näihin oireisiin kuuluvat autoimmuunisairaudet, elinvauriot ja neurologiset oireet. Vakavimpia terveyshaittoja saattaa edeltää jopa yli kymmenen vuotta jatkunut altistuminen. (Putus 2017).

Allerginen nuha on nenän IgE-välitteinen tulehdussairaus, joka oireilee joko jatkuvasti tai kausiluonteisesti. Allergista nuhaa sairastavista 2,7–19 %:lla on todettu herkistyneen homeille, joista yleisimpiä ovat kausiluonteiset ulkoilman homeet, kuten *Alternaria alternata*. Epidemiologisissa tutkimuksissa kosteusvaurioille ja sisätilojen homeille altistumisella on todettu olevan yhteys allergiseen nuhaan. Myös homeiden aiheuttama allerginen astma on yleensä kausiluonteinen sairaus. Erityisesti lapsilla on havaittu astman esiintymisellä ja oireiden pahenemisella olevan yhteys kosteusvaurioihin. Astmaa esiintyy usein potilailla, joilla on muitakin atooppisia sairauksia, kuten allergista nuhaa tai atooppista ekseemaa. Homeista oireilevaa astmaa sairastavien on havaittu herkistyneen useille muillekin ympäristön allergeeneille, joka saattaa kertoa geneettisten tekijöiden tärkeydestä sairauden synnyssä. Homeiden allergeenien uskotaan aiheuttavan atooppista ekseemaa, ja altistuneet usein kärsivät ihon kuivuudesta ja kutinasta. Varmaa immunologista yhteyttä homeisiin on kuitenkin vaikea todistaa. (Hurraß ja muut 2017.) Allerginen alveoliitti on hengitysteiden kautta keuhkorakkuloihin päässeiden orgaanisten hiukkasten aiheuttama sairaus, jonka oireita ovat yskä, hengenahdistus ja kuume. Suomessa sairausta esiintyy useimmiten työperäisesti maanviljelijöillä, jotka altistuvat homeisille heinille ja oljille. Sienistä sairautta aiheuttavat ainakin *Absidia corymbifera*, *Aspergillus Fumigatus*, *Eurotium amstelodami* ja *Wallemia sebi.asper*. (Selman ja muut 2010.) Myös aktinobakteerit, kuten *Micropolyspora faeni* ja *Thermoactinomyces vulgaris*, aiheuttavat allergista alveoliittia (Putus 2017). Orgaanisten pölyjen aiheuttama toksinen oireyhtymä on oireiltaan alveoliitin kaltainen sairaus, joka syntyy merkittävän määrän biologisia pienhiukkasia ($>10^9$ itiötä/m³) päästessä hengitykseen. Allergisen alveoliitin ja pölyjen aiheuttaman toksisen oireyhtymän erottaminen toisistaan diagnostisesti voi olla hankalaa. (Hurraß ja muut 2017.)

Mikrobien aiheuttamat poskiontelotulehdukset jaotellaan oireiden pituuden ja tulehduksen invasiivisuuden perusteella. Hengenvaarallista akuuttia invasiivista poskiontelotulehdusta esiintyy pitkälti vain immuunipuolustuksen häiriöistä kärsivillä, ja sen yleisimpiä aiheuttajia ovat *Aspergillus*-suvun homeet sekä *Zygomycota*-sienikaaren sienet. Sairauden kulku kestää usein alle neljä viikkoa ja sen oireita ovat veritulpat, verenvuoto ja kudoksen kuoliot. Krooniset invasiiviset poskiontelotulehdukset kehittyvät yli 12 viikon ajan. Sairauden tyypillisiä merkkejä ovat sienirihmastojen kerääntyminen, verisuonten invaasiot ja tulehdusreaktiot nenän sivuonteloissa. Immuunipuolustuksen häiriöt liittyvät myös krooniseen invasiiviseen

poskiontelotulehdukseen. *A. fumigatusta* esiintyy yli 50 %:sta kudoksenäytteistä. Noninvasiivisista poskiontelotulehduksista yleisimpiä ovat aspergillooma, eli sienipallo, ja allerginen bronkopulmonaarinen aspergilloosi, joiden molempien aiheuttajana ovat *Aspergillus*-homeet. Sienipallo on sienikasvuston muodostama massa poskionteloissa, joka diagnosoidaan useimmiten pelkästään histologian tai mikroskopian perusteella. Sairaudesta on yleensä täysin oireeton. Allerginen bronkopulmonaarinen aspergilloosi on harvinainen immunologinen keuhkosairaus, jossa havaitaan IgE- ja IgG-herkistymistä. Sairaudesta diagnosointiin on ehdotettu viittä kriteeriä: tyypin I yliherkistymistä, nenän polyyppitautia, sairaudesta tyypillisiä röntgentuloksia, sienisolujen läsnäoloa kudoksissa ja sienipartikkeleita sisältävää allergista limaa. Kosteusvaurioilla saattaa olla yhteys sairauteen ainakin prognoosin osalta. (Chakrabarti ja muut 2009; Hurraß ja muut 2017.)

Kosteus- ja homevaurioihin liittyvistä oireista kiistellyimpiä ovat autoimmuunisairaudet ja neurologiset oireet. Krooninen tulehduksellinen ääreishermoston sairaus on autoimmuunisairaus, jossa immuunipuolustus tuhoaa hermosäikeiden myeliiniä, mikä johtaa lihasvoimien heikkenemiseen. Sairaudesta patogeneesi on huonosti tunnettu, eikä sen yhteyttä homeisiin ole todistettu uskottavasti. (Bush ja muut 2006; Chang ja Gershwin 2019). Kosteusvauriomikrobien uskotaan aiheuttavan nivelreumaa, mutta aiheesta on rajallisesti tietoa. (Hurraß ja muut 2017). Sienien mykotoksiinien on todettu aiheuttavan reumaa hiirillä stimuloimalla makrofageja ja T-auttajasoluja (Jahreis ja muut 2017). Mykotoksiinien aiheuttamat myrkytykset, eli mykotoksitoosit, johtuvat ihmisillä saastuneen ruuan nauttimisesta. Kosteusvaurioiden yhteydessä mykotoksiinien konsentraatiot eivät välttämättä ole tarpeeksi korkeat mykotoksitoosin syntymiseen, eikä tiedossa ole voiko myrkytys syntyä edes hengitysteiden välitse. (Bush ja muut 2006; Hurraß ja muut 2017.) Potilaiden usein raportoimien neurologisten oireiden alkuperää ei tunneta, mutta uusien tutkimusten mukaan oireet saattavat johtua osaksi aivojen hippokampuksen synnynnäisen immunitetin aktivoitumisesta. Homeita hengittäneiden hiirten hippokampuksen immuunipuolustuksen aktivoituminen korreloi muistihäiriöiden, kipuherkkyiden ja ahdistuneisuuden kanssa. (Harding ja muut 2020).

5.2 Kosteusvauriolle altistumisen toteaminen

Suomessa sisäilmasairaudelle ei ole omaa diagnoosia, ja työperäisenä diagnoosina hyväksytään tällä hetkellä vain astma. Kosteusvaurioiden altistumisen toteamiseen on kuitenkin erilaisia menetelmiä, joita voidaan käyttää terveyshaittojen diagnosointiin tai oireiden alkuperän tutkimiseen. Usein näistä ensimmäinen on altistuneiden oirekyselyt.

Oirekyselyillä saadaan nopeasti kartoitettua kosteusvaurion kokonaistilanne sekä altistuneiden kokemat oireet ja näkemykset sisäilman laadusta. Näin voidaan muodostaa syy–seuraussuhteita oireiden ja altistumisen välille, ja sulkea pois muut mahdolliset sairaudet. Kosteusvaurio voidaan paikallistaa käyttämällä CAD ja GIS-ohjelmia, jotka perustuvat altistuneiden henkilöiden sijoittamiseen kohderakennuksen pohjapiirrookseen. Suomessa kosteusvaurioiden suhteen validoituja oirekyselyitä ei ole, sillä esimerkiksi Työterveyslaitoksen käyttämä Örebro-kysely on tehty SBS:n oireiden toteamiseen, eikä siinä tiedustella infektiosairauksista tai lääkärin toteamista astman tai allergian oireista. Professori Tuula Putus on kehittänyt Örebro-kyselyn pohjalta oman oirekyselynsä, joka on Työterveyslaitoksen kyselyä kattavampi. Majvik II –suosituksessa altistumisen aiheuttamien sairauksien diagnosointi sekä hoitamisen vastuu on jaettu perusterveydenhuollon ja erikoislääkärien välillä. Perusterveydenhuolto vastaa perusverikokeiden ottamisesta, röntgentutkimuksista, yksinkertaisista keuhkofunktio tutkimuksia ja lääkityksestä. Potilas lähetetään erikoislääkärille, jos hänellä on yliherkkyysnuhaa, kroonista nuhaa tai muutoin selittämättömiä silmän sidekalvontulehduksia ja jatkuvaa äänen käheyttä. Erikoislääkärien vastuulle jäävät vaativimmat kliiniset kokeet. (Putus 2017)

Kliinisiin testeihin kuuluvat allergologiset ihopistotestit, vasta-ainetutkimukset, syventävät keuhkofunktio tutkimukset, joita ovat spirometria sekä diffuusiokapasiteetin mittaaminen, ja autoimmuunisairauksien tutkiminen (Putus 2017). Ihopistotestit ovat yleisin ja nopein tapa allergioiden diagnosointiin. Niissä allergeenitippa pudotetaan käden iholle, joka lävistetään pistotestilansetilla. Allergiareaktio näkyy iholla syntyvänä paukamana, jonka koko kertoo allergiareaktion voimakkuudesta. (Hurraß ja muut 2017.) Suomessa ihopistotesteissä mitataan herkistymistä lähinnä ulkoilman homeille ja *Saccharomyces cerevisiae*-hiivalle. Vasta-ainetutkimuksissa mitataan seerumin mikrobispesifisiä vasta-aineita, joiden esiintyminen saattaa kertoa altistumisesta kyseiselle mikrobille. IgE-vasta-aineet liittyvät allergiareaktioihin, ja ne kertovat ärsytys- ja inflammaatioreaktioista. IgG-vasta-aineet kertovat altistumisesta johtuvasta pitkäaikaisesta vasteesta, sillä näillä vasta-aineilla on pitkä puoliintumisaika. Molempien vasta-aineiden on todettu korreloivan altistumisen oireiden kanssa, mutta Majvik II –suosituksessa suositellaan IgG-vasteiden mittaamista vain ryhmätasolla. Työterveyslaitos analysoi vasta-aineita ELISA-menetelmällä, jota varten Työterveyslaitoksella on seitsemän eri mikrobipaneelia. Työterveyslaitos on lopettanut

IgG-analyysit, ja tarjoaa nykyisin vain IgE-analyysijä. (Putus 2017). Suomessa IgG-analyysijä tarjoaa Kliininen tutkimusyksikkö TROSSI (Atosuo ja muut 2020).

Vauriorakennusten mikrobivaurioiden toteamista käytetään diagnosoinnin apuna sekä siivous- ja korjaustarpeiden kartoittamisessa. Tämäkin on haastavaa, sillä elävien mikrobien lisäksi myös kuolleet mikrobit, itiöiden vapauttama hienopöly, mikrobien pintarakenteet ja aineenvaihduntatuotteet voivat aiheuttaa oireita. Merkittävä osa mikrobeista selviää siivoustoimenpiteistä, kuten kuivatuksesta ja desinfektiosta. Näistä syistä kaikkien altisteiden mittaaminen on mahdotonta, ja viljelyyn perustuvilla menetelmillä saadaan esiin vain 1–10 %:ia mikrobeista. Tästä huolimatta mikrobinäytteiden viljely on yhä tärkein mikrobivaurioiden mittaamenetelmä ja sitä käytetään riskinarvioinnissa. Valitettavasti viljelyssä käytettävät kasvualustat ovat valikoivia ja ne suosivat vain tiettyjä nopeakasvuisia lajeja. Mikrobien viljely on myös hidasta eikä sen avulla voida havaita kuolleita soluja. Viljelyn lisäksi muita mittaamenetelmiä ovat erilaiset PCR-tekniikat sekä mikrobien tuottamien entsyymien ja pintarakenteiden mittaaminen. Valitettavasti millekään näistä menetelmistä ei ole vakiintuneita viitearvoja suomalaisissa aineistoissa. *E. coli*-lux koetinsoluja on käytetty pölynäytteiden toksisuusanalyysissä, ja tulokset ovat korreloineet viljelymenetelmien ja altistuneiden oireiden kanssa. (Putus 2017).

6. Tutkimustavoitteet

Tutkimusryhmämme on aiemmin käyttänyt kehittämäänsä rekombinanttia *Escherichia coli* K-12 pEGFP_{lux}ABCDEamp (*E. coli*-lux) (Atosuo ja muut 2013) lyhyen aikavälin toksisuusmittauksiin, joissa on tutkittu sisäilmavaurioisten kohteiden pölynäytteiden toksisuutta sekä erilaisten antibakteriaalisten yhdisteiden toimivuutta (Atosuo ja Lilius 2011; Suominen ja muut 2016, 2020). Vastikään Atosuo on todennut komplementtisysteemin CP:n merkittävästi aktivoituneen mikrobivaurioille altistuneiden seeruminäytteissä. Tässä tutkimuksessa AP:n ei todettu aktivoituneen näytteissä, mutta reaktiotien eristämiseen käytettiin EGTA:a, joka vaikuttaa negatiivisesti koetinsolujen kasvuun, ja näin myös bioluminesenssisignaaliin. EGTA myös vaatii korkean seerumipitoisuuden, mikä voi aiheuttaa vääriä positiivisia. LP:tä ei tässä tutkimuksessa vielä saatu eristettyä. (Atosuo ja muut 2021.)

Tutkielmani ensimmäinen ja tärkein tavoite oli kokeellisesti eristää komplementtisysteemin eri reaktiotiet hyödyntäen *E. coli*-lux koetinsoluja. Tätä varten oli löydettävä sopivat seerumipitoisuudet sekä toimivat yhdistelmät ja konsentraatiot komplementin reaktioteitä salpaavia vasta-aineita. Vasta-aineita käyttämällä voidaan kiertää aiemmin käytetyn EGTA:n vaikutus koetinsolujen kasvuun. Bioluminesenssiin perustuva menetelmä voisi olla lupaava uusi keino komplementtisysteemin toiminnan mittaamiseen. Mikrobitappokinetiikkojen avulla saataisiin myös uutta tietoa reaktioteiden *in-vivo* osasta gram-negatiivisten bakteerien tappamisessa.

Reaktioteiden eristämisen jälkeen voitaisiin siirtyä toiseen tutkimustavoitteeseen, eli komplementtisysteemin reaktioteiden toiminnan tutkimiseen sisäilmavaurioille altistuneiden seeruminäytteistä. Tappokinetiikkojen avulla voitaisiin todeta onko jokin komplementin reaktioteistä muita aktiivisempi sisäilmavaurioille altistuneilla. Erityisen mielenkiinnon kohteena on LP, jonka tiedetään aktivoituvan sieniperäisistä rakenteista (Speth ja muut 2008). Menetelmää voitaisiin käyttää apuna sisäilmavaurioiden aiheuttaman matalatasoisen tulehdustilan diagnosoimisessa, mikäli huomattavia ja toistettavia eroja komplementin toiminnassa löydettäisiin.

Kolmas tutkimustavoite erilaisten immunologisten tekijöiden yhteisvaikutusta komplementin kanssa. Tämän tutkielman aikana testattiin vain immunoglobuliini IgG:n vaikutusta CP:n antimikrobiaaliseen vaikutukseen. Aiemmin menetelmällä on tutkittu myös CRP:tä ja seerumin amyloidi A:ta (engl. *serum amyloid A*, SAA).

II Kokeellinen osa

7. Materiaalit ja menetelmät

7.1 *E. coli*-lux bakteripreparaatti

Muunnellun lusiferaasigeenin (pEGFP_{lux}ABCDEamp) sisältävän plasmidin omaavaa rekombinanttia *E. coli* K-12 kantaa käytettiin koetinsoluna seerumin komplementtisysteemin aktiivisuuden mittaamisessa. Operonin ekspressio tuottaa lusiferaasiholoentsyymiä, jolloin koetinsolut tuottavat bioluminesenssia ilman eksogeenistä substraattia. Tämä kanta on nimetty *E. coli*-lux:iksi.

E. coli-lux:ia kasvatettiin 150 ml Luria Bertani meediumissa (LB_{amp}) (10 g tryptoni (Neogen), 5 g hiivauute (Neogen), 5 g NaCl (Sigma-Aldrich) ja 100 µg/ml ampisilliini (Sigma)). Kasvatusta inkuboitiin ravistimessa (90 rpm) 37 °C, kunnes bakteerisuspensio oli saavuttanut eksponentiaalisen kasvun vaiheen. Tämä todettiin bakteerisuspension OD_{620nm} ollessa 0,316 (GE Ultrospec™ 7000, GE Healthcare Life Sciences) ja bioluminesenssisignaalin ollessa 1,8 x 10⁷ CPS (Hidex Triathler liquid scintillation counter, Hidex). Solut kerättiin sentrifugoimalla (3000 rpm, 10 min), ne resuspensoitiin 5 ml LB_{amp} (25 % glyseroli), solut jaettiin Eppendorf-putkiin ja pakastettiin -80 °C. Kaikki kasvatusmeediumit sisälsivät ampisilliinia (100 µg/ml) selektiopaineen ylläpitämiseksi.

7.2 Seerumipooli ja potilasnäytteet

Neljän terveen vapaaehtoisen seerumeista valmistettiin seerumipooli, mikä jaettiin Eppendorf-putkiin ja pakastettiin -80 °C. Seerumipoolin on tarkoitus edustaa tervettä populaatiota komplementin reaktioteiden salpaamisessa ja eristämisessä.

Tutkimuksen käytössä oli 36 seeruminäytettä Varsinais-Suomen alueen sisäilmavauriokohteissa oleskelleilta henkilöiltä. Altistuneiden verinäytteet kerättiin 8 ml VACUETTE™ seerumigeeliputkiin (Greiner Bio-One). Potilasnäytteet valmistettiin sentrifugoimalla (540 g, 10 min), ne jaettiin Eppendorf-putkiin ja pakastettiin -80 °C. Näytteet kerättiin potilaiden yhä työskennellessä tai asuessa rakennuksissa. Kaikki tutkimukseen osallistuvat henkilöt ovat vapaaehtoisia aikuisia.

Tutkimuksen eettisyys: Tutkimuksella on Varsinaissuomen Sairaanhoidopiirin Kuntayhtymän Eettisen toimikunnan puoltava lausunto (ETMK Dnro: 59 /1801/2019)

7.3 Komplementtisysteemin aktiivisuuden mittaaminen

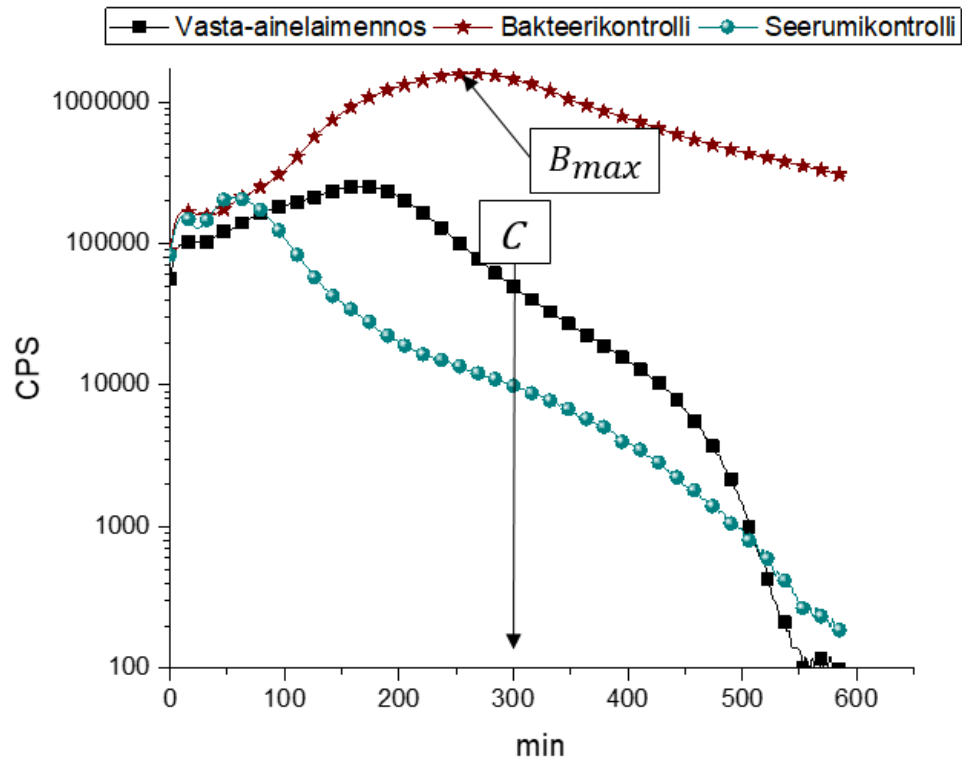
Komplementtisysteemin aktiivisuutta mitattiin reaktioissa, jotka tehtiin kuoppalevyllä (Optiplate™ - 96, PerkinElmer). Reaktiot tehtiin 100 µl tilavuuteen, ja aluksi kaivoihin pipetoitiin 25 µl seerumilaimennosta ja 25 µl per vasta-ainelaimennos (tai muu vaikutin). Esimerkiksi reaktioteitä eristettäessä käytettiin kahta eri vasta-ainetta, joten molempia pipetoitiin 25 µl. Vain yhtä vasta-ainetta käytettäessä reaktio täytettiin 25 µl vedellä. Seerumilaimennokset tehtiin 2x HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Sigma Aldrich). Vasta-aineet laimennettiin veteen. Seerumilaimennosta ja vasta-aineita inkuboitiin sekoituksessa 15 min, RT. Reaktiot käynnistettiin 25 µl bakteerilaimennosta (1/600 2x HBSS). Lopullisessa reaktiossa HBSS on yksinkertaista. Komplementtisysteemin AP:ta mitattiin vasta-aineiden lisäksi myös EGTA:n avulla. Reaktion EGTA oli peräisin HBSS_{EGTA}:sta (10 % EGTA). Bioluminesenssi mitattiin luminometrillä (Hidex Sense Plate Reader, Hidex) 37 °C. Mittaukset tehtiin 2 min välein ja ajot kestivät joko 400 min tai 600 min.

Tutkimuksissa käytetyt vasta-aineet on taulukoitu (taulukko 1). Tulokset osiossa käsitellään vain niitä vasta-aineita, joita päädyttiin käyttämään komplementin reaktioteiden eristämisessä.

Taulukko 1. Käytetyt vasta-aineet. Yhdessä vasta-aineessa ei ollut kerrottu konsentraatiota.

Reaktiote	Vasta-aine	Konsentraatio	Valmistaja
CP	C1q Monoclonal Antibody (3R9/2)	1,09 mg/ml	Invitrogen
CP	C1r Monoclonal Antibody (269104)	0,5 mg/ml	Invitrogen
CP, LP	Anti-C2 Antibody (E-7)	1,0 mg/ml	Invitrogen
CP, LP, AP	Complement C3 Polyclonal Antibody	1,0 mg/ml	Bioss Antibodies
CP, LP	Primary Mouse Anti-Complement Factor C4 (35A12)	Tuntematon	Life Technologies Europe
CP, LP	Complement C4 (gamma chain) Monoclonal Antibody	1,0 mg/ml	Bioss Antibodies
AP	Complement Factor B Monoclonal Antibody (KT21)	1,0 mg/ml	Invitrogen
AP	Complement Factor B Monoclonal Antibody (313011)	0,5 mg/ml	Invitrogen
AP	Complement Factor D Mouse anti-Human (13)	1,0 mg/ml	Invitrogen
LP	Human MBL Antibody (285602)	0,5 mg/ml	R&D Systems
LP	MBL, Human, mAb 3E7	100 µg/ml	Hycult Biotech
AP	Anti-Propertidin Antibody (C-4)	200 µg/ml	Santa Cruz Biotechnology
CP	Anti-Human IgG (Fc specific) antibody	2,0 mg/ml	Sigma

Kinetiikkatulokset esitettiin kasvukäyrinä, joissa bioluminesenssisignaalin logaritmi (mittaukset sekunnissa, CPS) on ajan funktiona (kuva 6). Mittauksissa on mukana bakteerikontrolli ilman seerumilaimennosta sekä kokoseerumin aktiivisuudesta kertova seerumikontrolli ilman vasta-aineita.



Kuva 6. Tyypillinen kinetiikkakuvaaja. Kinetiikkakuvaajissa verrataan komplementtisysteemin aktiivisuutta inhiboivien vasta-aineiden vaikutusta kokoseerumin seerumikontrolliin sekä seerumittomaan bakterikontrolliin. Kuvaajassa on havainnollistettu bakterikontrollin maksimisignaali B_{max} sekä annosvasteen mittauspiste 300 min kohdalla C .

Kinetiikkakuvaajien lisäksi tulokset esitettiin annosvasteina 300 min ajankohdalta.

Vasta-aineiden annosvasteet laskettiin kaavalla:

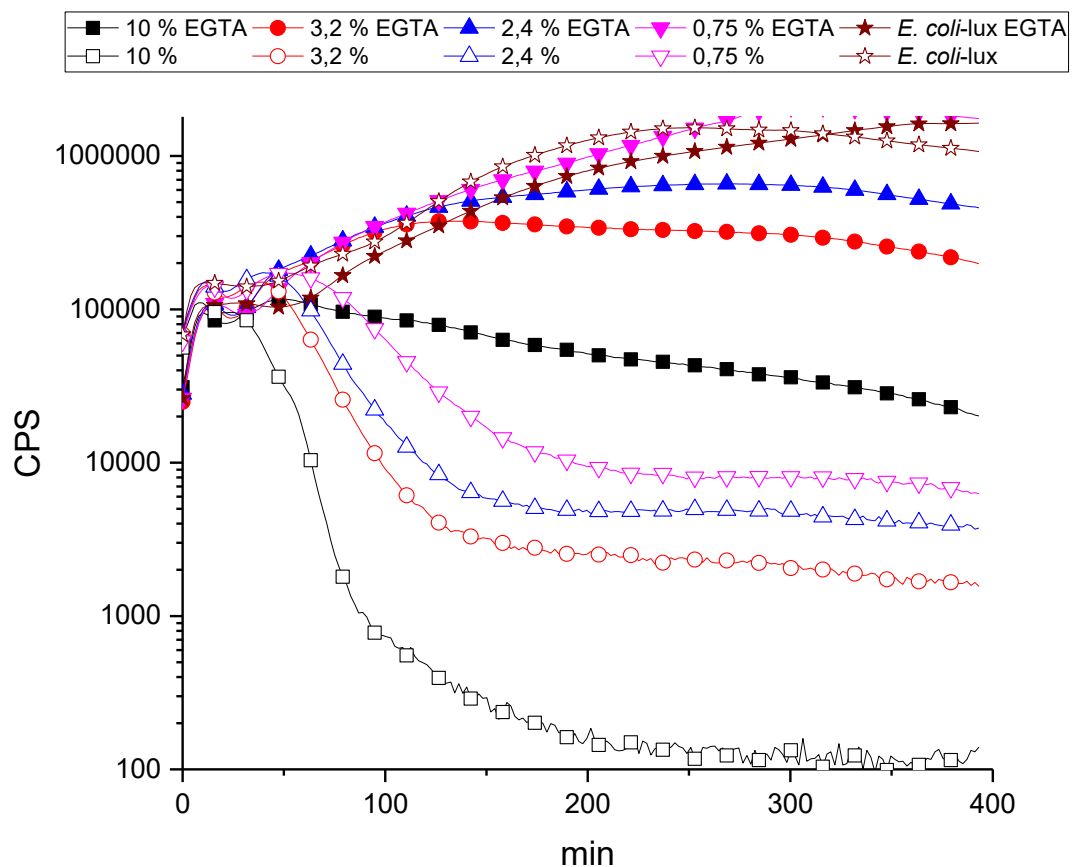
$$\frac{B_{max} - C}{B_{max}} * 100 \%$$

missä B_{max} on bakterikontrollin maksimi CPS ja C on tutkittavan seerumireaktion CPS 300 minuutin kohdalla. Tulos kertoo seeruminäytteen tappoprosentin suhteessa bakterikontrollin maksimisignaaliin. Mittauspisteeksi valittiin sellainen ajankohta, jossa kaikki reaktiotiet varmasti ovat ehtineet käynnistyä. Mittauksen loppua kohden kaivoreaktioista saattaa haihtua nestettä, mikä vältetään aikaisella mittauspisteellä.

8. Tulosten tarkastelu

8.1 Seerumilaimennosten valinta

Sopivien seerumilaimennosten valinnassa lähtökohtana pidettiin tutkimusryhmässä aiemmin käytettyjä laimennoksia kokoseerumille (0,5 %) ja seerumille HBSS_{EGTA}:ssa (2,5 %) (Atosuo ja muut 2021). Molemmista seerumityypeistä tehtiin laimennossarjat (kuva 7), joiden avulla etsittiin sopiva seerumilaimennos, joka EGTA-seerumilla antaa bakteerikontrollista selvästi erottuvan vasteen, mutta mikä ei ole liian väkevä kokoseerumin kanssa käytettäväksi. Tätä laimennosta käytettäisiin reaktioteiden eristämisessä sekä potilasnäytteiden AP:n analysoimisessa. Laimennokseksi valittiin 2,5 %. Kokoseerumin kanssa käytetyksi laimennokseksi valittiin 0,6 %. Tätä laimennosta käytettäisiin vasta-aineiden valinnassa sekä potilasnäytteiden CP:n ja LP:n analysoinnissa.

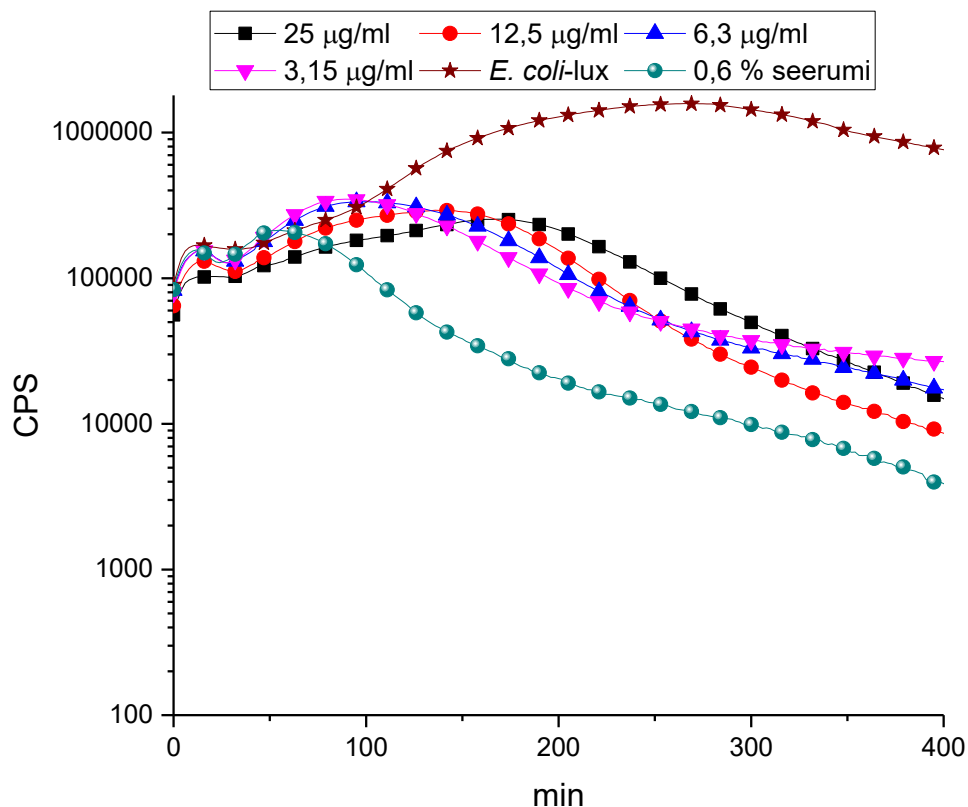


Kuva 7. Kokoseerumin ja EGTA-seerumin laimennossarjat. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla luminesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli-lux* = Bakteerikontrolli ilman seerumia.

8.2 Vasta-aineiden valinta

8.2.1 CP:n salpaaminen

C1q:n inhibition on todettu tehokkaasti salpaavan CP:n toiminnan (Roos ja muut 2001; Nordkamp ja muut 2014; McGonigal ja muut 2016), joten C1q valikoitui ensimmäiseksi tutkimuskohteeksi CP:n salpaamiseksi. Anti-C1q:sta (C1q Monoclonal Antibody 3R9/2, 1,09 mg/ml, Invitrogen) valmistettiin laimennossarja, jonka vaikutusta 0,6 %:sen seerumin antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen tutkittiin (kuva 8). Reaktioteiden onnistunut salpaaminen pitäisi näkyä seerumikontrollia korkeampana lumesenssisignaalina, joka johtuu eroista elinkelpoisten koetinsolujen lukumäärästä. Vasta-ainekonsentraation noustessa tämän signaalin odotetaan lähestyvän bakteerikontrollia. Kuvaajasta nähdään korkeimpien konsentraatioiden (25 µg/ml ja 12,5 µg/ml) aiheuttavan saturaatiota, joten jatkotutkimuksia varten anti-C1q:n konsentraatioksi valittiin 6,3 µg/ml. Saturaation syynä saattaa olla immuunikompleksien muodostuminen, jonka vuoksi seerumiin jää vapaata C1q:ta.

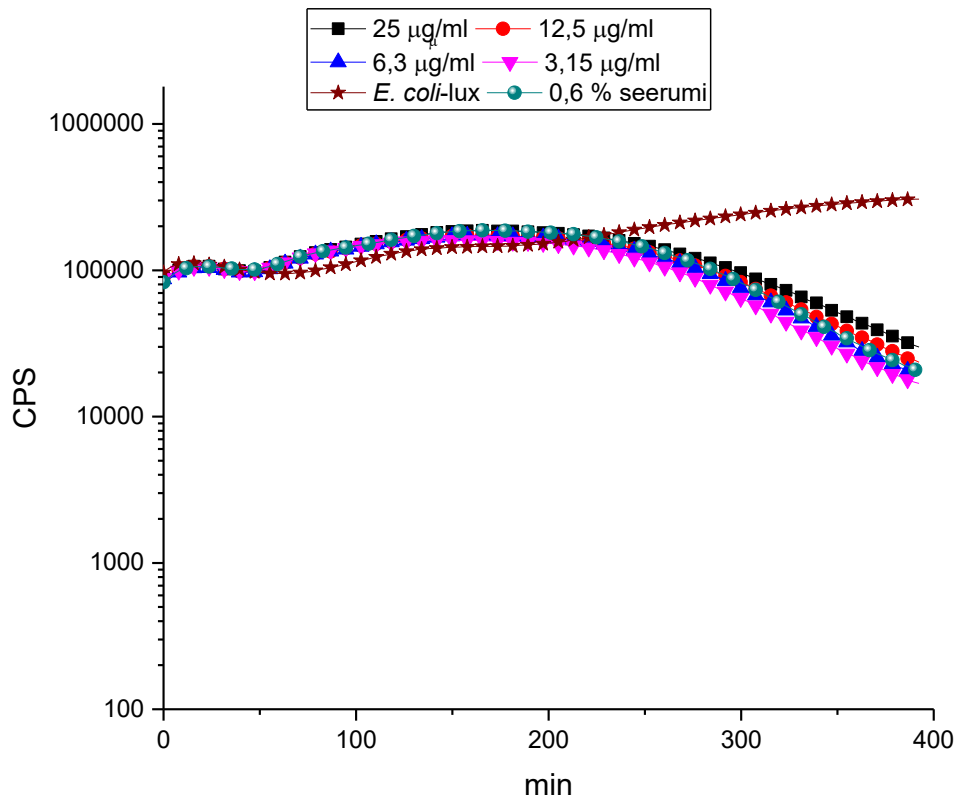


Kuva 8. Anti-C1q -laimennossarja. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla lumesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli-lux* = Bakteerikontrolli ilman seerumia. 0,6 % seerumi = Seerumikontrolli ilman vasta-aineita.

8.2.2 LP:n salpaaminen

LP:n tiedetään aktivoituvan MBL:n, fikoliinien ja kollektiinien toimesta (Garred ja muut 2016), joten LP:n salpaamisen ongelmaksi muodostui kaikkien näiden komponenttien inhibitio. Tässä tutkimuksessa MBL:n määriteltiin olevan LP:n pääasiallinen aktivoija. Tämä rajoitus tehtiin käytännön syistä, sillä kaikkien initiaatiokomponenttien inhiboiminen olisi ollut työlästä, eikä fikoliinien ja kollektiinien toiminnasta ole yhtä paljon tietoa kuin MBL:stä. Yksi potentiaalinen inhibointikohde olisi voinut olla MASP2, joka kompleksoituu sekä MBL:n että fikoliinien kanssa (Dobó ja muut 2018).

Anti-MBL:stä (Human MBL Antibody, 0,5 mg/ml, R&D Systems) valmistettiin laimennossarja, jonka vaikutusta 0,6 %:sen seerumin antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen tutkittiin (kuva 9). LP:n salpaamisen vaikutus seerumin antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen on vähäinen, sillä jopa 25 µg/ml anti-MBL konsentraation käyrä ei merkittävästi eroa seerumikontrollista. Jatkotutkimuksia varten Anti-MBL:n 25 µg/ml konsentraatio valittiin käytettäväksi 2,5 %:sta seerumia vaativissa reaktioteiden eristämisisissä sekä potilasnäytteiden AP:n antimikrobiaalisen aktiivisuuden mittaamisessa. Anti-MBL:n 12,5 µg/ml konsentraatiota käytetään potilasnäytteiden CP:n analysoimisessa, sillä niissä seerumipitoisuus on vain 0,6 %. Näin saataisiin myös säästettyä vasta-ainetta, sillä Anti-MBL:n saatavuus on tutkimuksia eniten rajoittava tekijä.

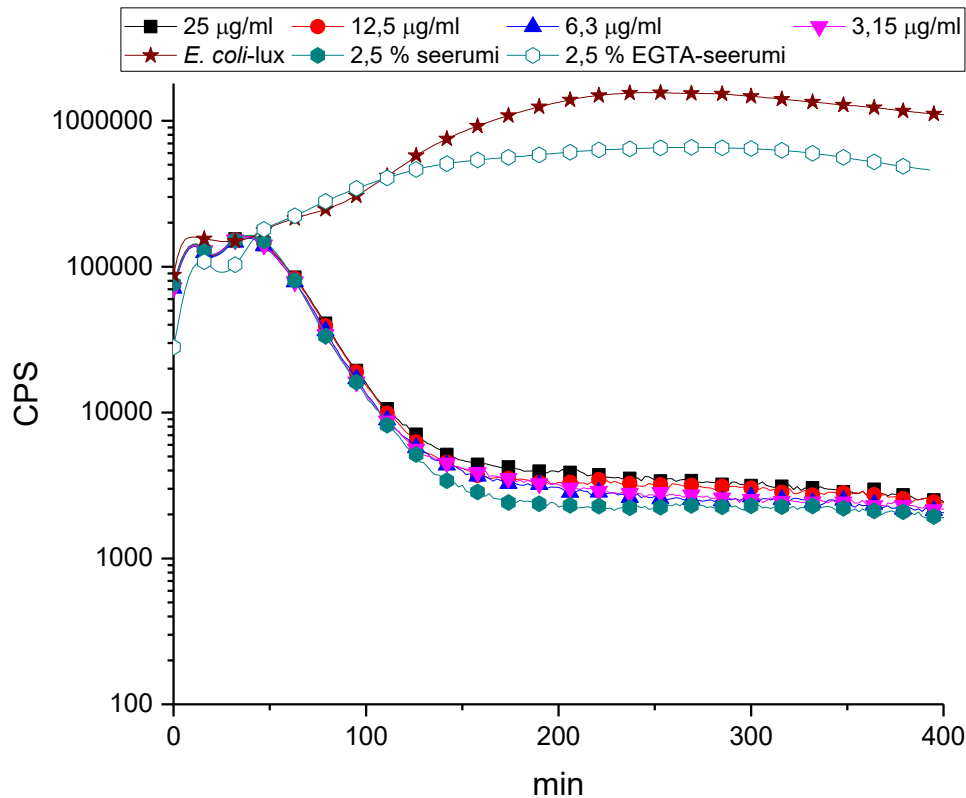


Kuva 9. Anti-MBL –laimennossarja. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla luminesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli-lux* = Bakteerikontrolli ilman seerumia. 0,6 % seerumi = Seerumikontrolli ilman vasta-aineita.

8.2.3 AP:n salpaaminen

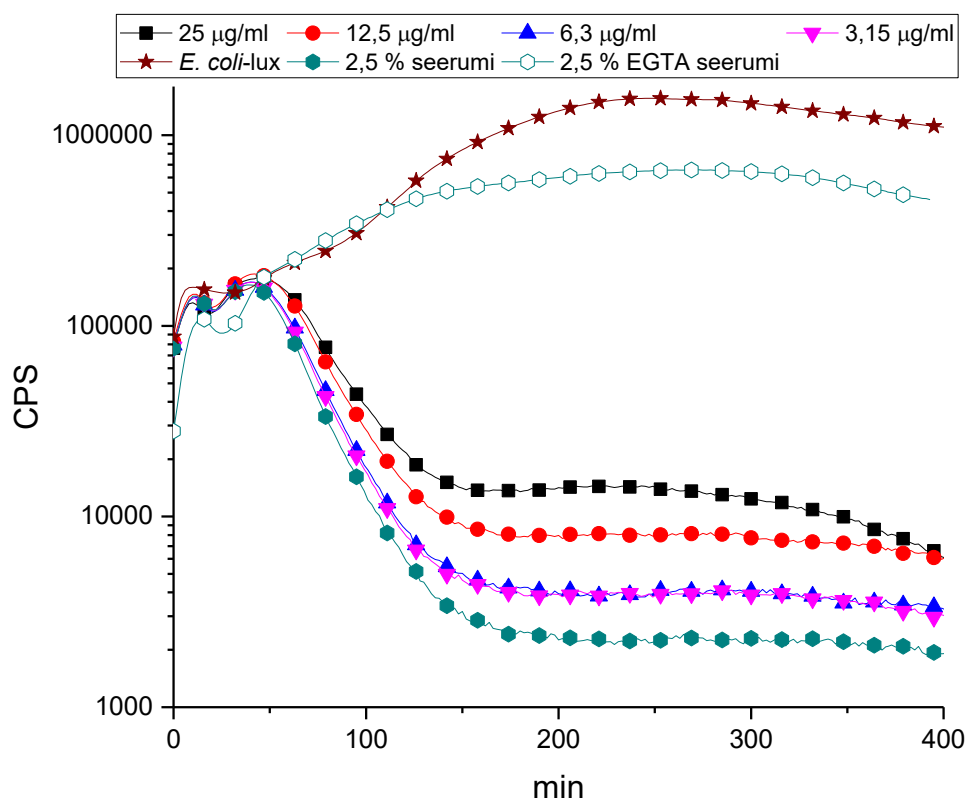
AP:n salpaamisen potentiaaliset kohdekomponentit olivat fB, fD ja properdiini. AP:n salpaaminen päätettiin tehdä 2,5 %:lla seerumilla, sillä AP:n eristämistä vasta-aineilla verrattaisiin AP:n eristämiseen EGTA:n avulla. Tutkimukset aloitettiin kokeilemalla fB:n salpaamista, mutta tulokset olivat vaihtelevia. fB:n korkea konsentraatio seerumissa (200–250 µg/ml) vaatisi myös korkean vasta-ainepitoisuuden. fD:tä on pidetty AP:n toiminnan pullonkaulana, sillä sen konsentraatio seerumissa on alhainen (1–4 µg/ml). fD-inhibiittoreiden soveltumista komplementtisysteemiin liittyvien autoimmuunisairauksien terapiassa tutkitaan. (Dobó ja muut 2018).

Anti-fD:stä (Complement Factor D Mouse anti-Human, 1 mg/ml, Invitrogen) valmistettiin laimennossarja, jonka vaikutusta 2,5 %:sen seerumin antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen tutkittiin (kuva 10). Tutkimushypoteesin mukaan AP:lla olisi merkittävästi LP:tä korkeampi antimikrobiaalinen vaikutus koetinsoluja vastaan. Tätä ei kuitenkaan nähty anti-fD:n kanssa, koska tulokset eivät merkittävästi eronneet seerumikontrollista, joten vasta-aineen ei uskottu onnistuneesti salvanneen AP:ta.



Kuva 10. Anti-fD –laimennossarja. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla luminesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli lux* = Bakteerikontrolli ilman seerumia. 2,5 % seerumi = Seerumikontrolli ilman vasta-aineita. Vertailun vuoksi mukana myös EGTA-seerumilla eristetty AP.

Properdiini stabiloi AP:n C3-konvertaasia ja sen uskotaan voivan myös itsenäisesti aktivoida komplementtisysteemiä (Oikonomopoulou ja muut 2012). Hiirimalleilla on todettu rekombinantin polymerisoituneen properdiinin suojaavan *Neisseria meningitidis* ja *Streptococcus pneumoniae* infektiolta (Dobó ja muut 2018). Anti-properdiinista (Anti-Properdin Antibody C-4, 200 µg/ml, Santa Cruz Biotechnology) valmistettiin laimennossarja, jonka vaikutusta 2,5 %:sen seerumin antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen tutkittiin (kuva 11). Anti-properdiinin todettiin salpaavan AP:n toiminnan. Jatkotutkimuksia varten päätettiin käyttää korkeinta 25 µg/ml konsentraatiota vain CP:n ja LP:n kokeelliseen eristämiseen, joka tehdään 2,5 %:lla seerumilla. Potilasnäytteiden analyysissä voitaisiin käyttää 12,5 µg/ml pitoisuutta.



Kuva 11. Anti-properdiini-laimennossarja. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla luminesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli-lux* = Bakteerikontrolli ilman seerumia. 2,5 % seerumi = Seerumikontrolli ilman vasta-aineita. Vertailun vuoksi mukana myös EGTA-seerumilla eristetty AP.

8.2.4 Vasta-aineiden annosvasteet

Salpaamiseen käytettyjen vasta-aineiden annosvasteet taulukoitiin tappoprosentteina (Taulukko 2). Vertailun vuoksi taulukko sisältää myös kussakin mittauksessa käytetyn kokoseerumin annosvasteen.

Taulukko 2. Vasta-aineiden annosvasteet 300 min ajankohdalta.

Vasta-aine	25 ug/ml	12,5 ug/ml	6,3 ug/ml	3,15 ug/ml	Kokoseerumi
Anti-C1q	99,20 %	96,90 %	98,50 %	97,90 %	99,10 %
Anti-MBL	73,50 %	77,10 %	79 %	82,20 %	90,10 %
Anti-fD	99,80 %	99,80 %	99,80 %	99,80 %	99,80 %
Anti-Propertiini	99,20 %	99,50 %	99,70 %	99,80 %	99,80 %

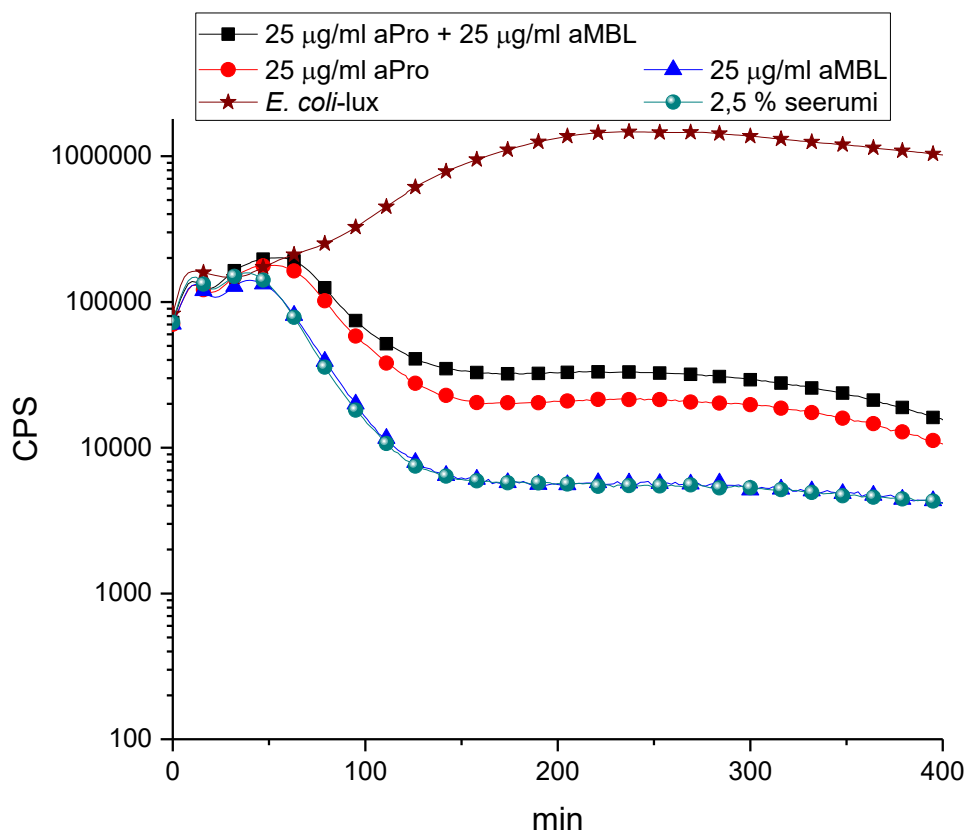
Tehdyissä mittauksissa bakteerikontrollin bioluminesenssisignaali on niin korkea, että seeruminäytteiden annosvasteet eroavat toisistaan usein vain prosentin sadasosilla. Anti-MBL:n tulokset poikkeavat tästä, sillä kyseinen mittaus on tehty virheellisesti 25 °C lämpötilassa eikä 37 °C, joka on seerumin komplementtisysteemille optimaalinen

lämpötila. Siksi anti-MBL:n annosvasteita on hankala verrata muihin vasta-aineisiin. Anti-C1q:n annosvasteet eivät saturaation takia käyttäydy konsentraatiojärjestyksessä, joten kyseisen vasta-aineen vaikutusta komplementin toimintaan on parasta seurata kinetiikkakuvaajasta. Anti-fD:llä annosvasteet pysyvät 99,80 tappo-%:ssa, mistä voidaan päätellä ettei vasta-aine ole inhiboinut AP:n toimintaa millään konsentraatiolla. Anti-fD:stä poiketen anti-properdiinin tappoprosentit laskevat suhteessa vasta-aineen konsentraatioon. AP:n inhiboiva vaikutus on korkeimmillaan vasta-aineen 25 µg/ml konsentraatiolla, mikä näkyy myös kinetiikkatuloksista.

8.3 Reaktioteiden eristäminen

8.3.1 CP:n eristäminen

CP:n eristämässä seurattiin 25 µg/ml anti-properdiinin ja 25 µg/ml anti-MBL:n vaikutusta 2,5 %:sen seerumin tappokinetiikkoihin yhdessä ja erikseen (kuva 12). Yhdessä vasta-aineet salpaavat AP:n ja LP:n, jolloin seerumiin jää enää komplementin CP. Erikseen anti-properdiinin ja anti-MBL:n kinetiikkatulokset vastaavat reaktioteiden salpaamisessa saatuja tuloksia. Vasta-aineilla on selvä yhteisvaikutus, mitä ei välttämättä odottaisi, kun vertaa anti-MBL:n omaa käyrää seerumikontrolliin. CP on siis saatu eristettyä tällä yhdistelmällä vasta-aineita. CP:n käyrän muoto myötäilee seerumikontrollin käyrän muotoa, mutta eroaa siitä selvästi luminesenssisignaalin intensiteetin suhteen. CP yksinään ei siis välitä komplementtisysteemin antimikrobiaalista vaikutusta. Potilasnäytteiden 0,6 %:lla seerumilla käytettäisiin molemmista vasta-aineista 12,5 µg/ml laimennosta.



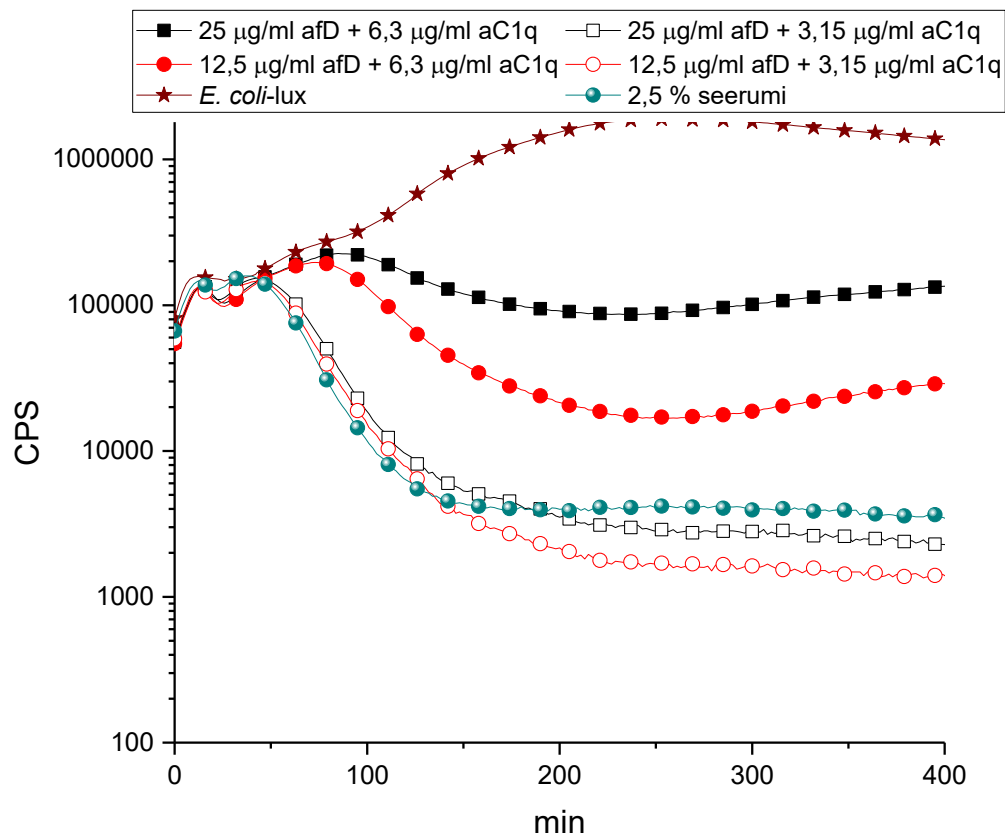
Kuva 12. CP:n eristäminen. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla luminesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli-lux* = Bakteerikontrolli ilman seerumia. 2,5 % seerumi = Seerumikontrolli ilman vasta-aineita. aPro = Anti-properdiini. aMBL = Anti-MBL.

8.3.2 LP:n eristäminen

LP:n eristäminen aloitettiin kokeilemalla eri konsentraatioiden yhdistelmiä anti-C1q:ta ja anti-properdiinia, jotka olivat molemmat toimineet reaktioteidensä salpaamisessa. Anti-C1q salpasi seerumin CP:n ja anti-properdiini salpasi AP:n, jolloin seerumiin jäisi enää komplementin LP. Valitettavasti vasta-aineet eivät toimineet yhdessä, sillä niillä ei nähty samanlaista yhteisvaikutusta kuin CP:n eristämässä. Sen sijaan yhdessä näillä vasta-aineilla havaittiin samanlainen saturaatiovaikutus, kuin korkeilla anti-C1q:n konsentraatioilla CP:n salpaamisessa. Koska CP:n salpaamiseksi ei ollut muita vasta-aineita, päätettiin AP:n salpaamiseen tässä eristämässä kokeilla anti-fD:tä.

Anti-C1q:sta ja anti-fD:stä kokeiltiin eri konsentraatioita yhdessä ja erikseen (kuva 13). Kuvaajasta voidaan tehdä seuraavat päätelmät: LP:n eristäminen 2,5 %:ssa seerumissa vaatii 6,3 µg/ml anti-C1q:ta salpaamaan CP:n, ja anti-fD:llä on tähän salpaamiseen väkevyyteensä verrannollinen vaikutus. LP:n eristäminen onnistui ja vasta-aineiden konsentraatioiksi potilasnäytteiden analyysiin valittiin 6,3 µg/ml anti-C1q ja 12,5 µg/ml

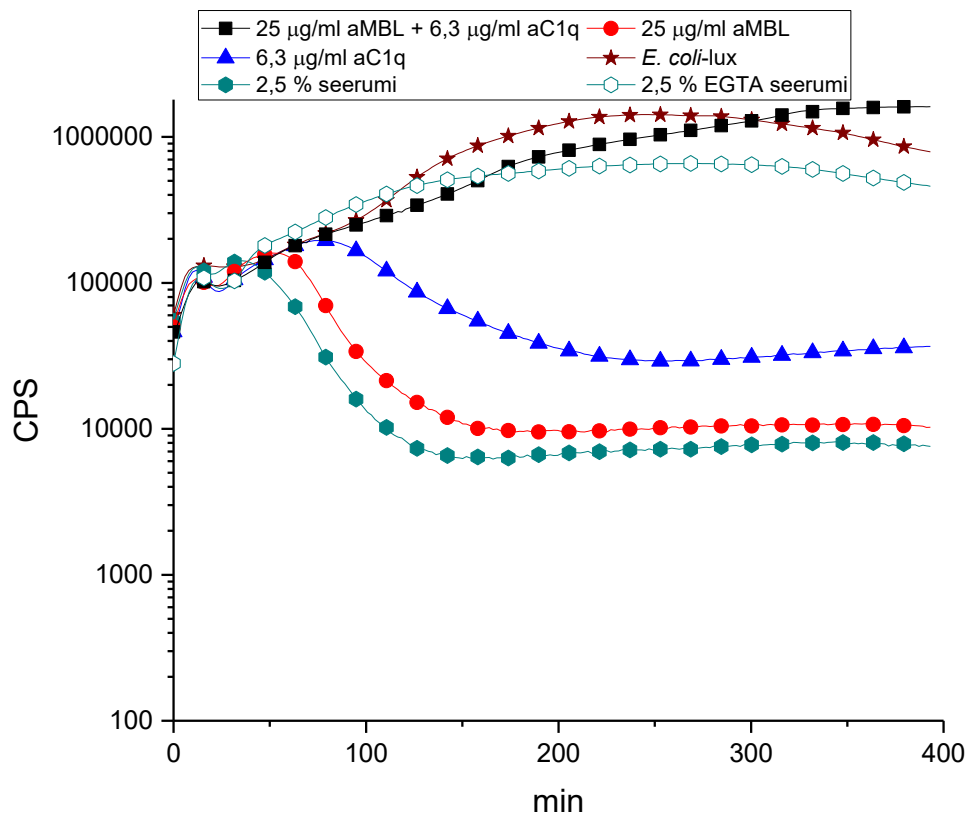
anti-fD. Sitä, miksi anti-fD salpaa AP:n vain, kun reaktiossa on mukana myös anti-C1q:ta ei tiedetä.



Kuva 13. LP:n eristäminen. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla luminesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli*-lux = Bakterikontrolli ilman seerumia. 2,5 % seerumi = Seerumikontrolli ilman vasta-aineita. afD = Anti-fD. aC1q = Anti-C1q.

8.3.3 AP:n eristäminen

AP:n eristämiseen käytettiin 25 $\mu\text{g/ml}$ LP:n salpaavaa anti-MBL:ää ja 6,3 $\mu\text{g/ml}$ CP:n salpaavaa anti-C1q:ta (kuva 14). Vasta-aineilla oli huomattava yhteisvaikutus, sillä reaktion käyrän luminesenssisignaali myötäili jopa bakterikontrollin käyrää. Näiden tulosten mukaan AP:lla ei olisi vähäisen inhibition lisäksi merkittävää antimikrobiaalista vaikutusta koetinsoluja vastaan. AP:n eristämisen todettiin onnistuneen.

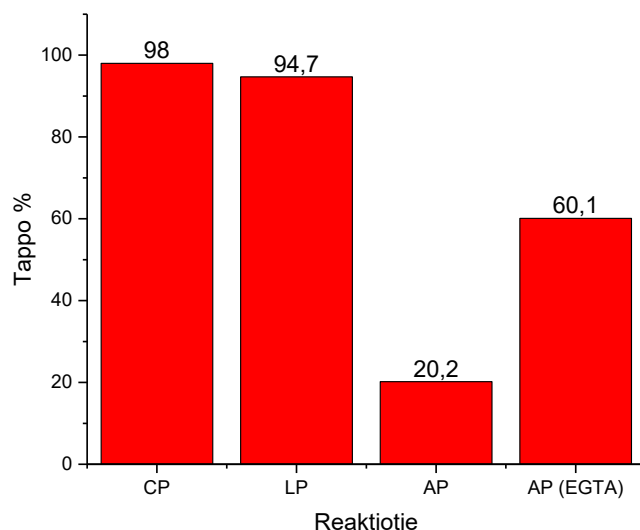


Kuva 14. AP:n eristäminen. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla luminesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli-lux* = Bakteerikontrolli ilman seerumia. 2,5 % seerumi = Seerumikontrolli ilman vasta-aineita. aMBL = Anti-MBL. aC1q = Anti-C1q. Vertailun vuoksi mukana myös EGTA-seerumilla eristetty AP.

8.3.4 Eristettyjen reaktioteiden annosvasteet

Eristettyjen reaktioteiden annosvasteet 300 minuutin kohdalla laskettiin tappoprosentteina (pylväskuvaaja 1). AP:n poikkeuksellisen alhaisen 20,2 tappo-%:n mukaan AP:lla ei juurikaan ole bakteriosidista vaikutusta koetinsoluja vastaan. 2,5 %:lla EGTA-seerumilla eristetyn AP:n 60,1 tappo-% on sekin eristettyjen CP:n ja LP:n tappoprosentteja selvästi matalampi. CP:n ja LP:n annosvasteiden erotus (3,3 tappo-%:ia) on sekin huomattava, kun ottaa huomioon bakteerikontrollin korkean bioluminesenssisignaalin, minkä vuoksi prosentin sadasosienkin erot annosvasteissa ovat merkitseviä. Kinetiikkakuvaajat ovat silti kätevämpi keino verrata näiden kahden reaktiotien antimikrobiaalista vaikutusta etenkin pitemmällä aikavälillä.

Pylväskuvaaja 2. Reaktioteiden annosvasteet 300 min ajankohdalta. Vertailun vuoksi mukana on myös 2,5 %:lla EGTA-seerumilla eristetty AP.



8.4 Potilasnäytteiden analysointi

Sisäilmavaurioiden vaikutusta seerumin komplementtisysteemin aktiivisuuteen tutkittiin 36 potilasnäytteen kanssa. Potilasnäytteistä 36 mitattiin CP:n, LP:n ja kokoseerumin tappokinetiikat, ja vain 12 AP:n tappokinetiikat. Tämä johtui mittauksia rajoittavan anti-MBL:n loppumisesta. Vertailun vuoksi AP eristettiin myös EGTA:n avulla. Potilasnäytteiden annosvasteet taulukoitiin (taulukko 3).

Taulukko 3. Potilasnäytteiden annosvasteet 300 min ajankohdalta.

Näyte	51	50	49	48	47	46	45	44	43
CP	87,3 %	93,4 %	97,3 %	95,8 %	97,2 %	98,4 %	86,4 %	91,2 %	97,2 %
LP	54,5 %	98,3 %	99,3 %	98,6 %	96,1 %	99,3 %	42,9 %	45,9 %	97,9 %
AP	7,1 %	97,9 %	97,1 %	99,3 %	65,9 %	94,9 %	-9,2 %	-14,9 %	77,9 %
AP-EGTA	77,8 %	65,6 %	86,0 %	74,0 %	62,3 %	57,2 %	7,6 %	48,4 %	45,8 %
Kokoseerumi	98,2 %	98,7 %	99,0 %	98,4 %	99,2 %	99,4 %	97,8 %	98,4 %	99,0 %
Näyte	42	41	40	39	38	37	36	35	34
CP	98,1 %	94,3 %	97,6 %	85,1 %	90,1 %	92,4 %	92,8 %	97,7 %	95,6 %
LP	97,7 %	41,9 %	97,5 %	33,6 %	98,3 %	88,0 %	95,9 %	98,9 %	98,5 %
AP	81,4 %	36,2 %	82,1 %	–	–	–	–	–	–
AP-EGTA	69,0 %	82,0 %	60,9 %	–	–	–	–	–	–
Kokoseerumi	99,4 %	98,5 %	99,0 %	97,4 %	98,1 %	98,6 %	98,3 %	98,6 %	98,4 %
Näyte	33	32	31	30	29	28	27	25	24
CP	96,4 %	96,4 %	96,4 %	84,7 %	96,5 %	91,9 %	93,2 %	93,1 %	91,1 %
LP	99,2 %	98,7 %	99,1 %	84,6 %	33,8 %	34,9 %	96,5 %	94,3 %	34,9 %
Kokoseerumi	98,4 %	98,3 %	99,1 %	95,4 %	99,2 %	98,0 %	98,7 %	98,6 %	99,1 %
Näyte	23	22	21	20	19	18	17	16	15
CP	94,2 %	93,7 %	74,0 %	86,1 %	83,5 %	94,9 %	96,7 %	83,3 %	97,0 %
LP	98,4 %	96,2 %	50,1 %	34,7 %	81,2 %	44,1 %	99,0 %	37,2 %	85,9 %
Kokoseerumi	99,0 %	98,9 %	98,1 %	97,9 %	97,3 %	98,9 %	99,2 %	97,0 %	99,4 %

Tuloksista voidaan päätellä CP:n olevan aktiivisin reaktiotie, sillä sen tappoprosentti on lähes jokaisella näytteellä yli 90 %:ia. Niissä näytteissä, joissa CP:n tappoprosentti on lähempänä 85 %:ia (näytteet 51, 45, 39, 30, 21, 20, 19, 16) havaitaan poikkeuksia myös muissa reaktioteissa. LP on seuraavaksi aktiivisin reaktiotie. Yli puolella näytteistä LP:n annosvaste on yli 90 tappo-%:ia, mikä vastaa seerumipoolilla tehdyn eristämisen annosvastetta. Toisaalta LP:n kohdalla nähdään selviä poikkeamia, näytteitä, joissa reaktiotie ei juurikaan ole aktiivinen (näytteet 51, 45, 44, 41, 39, 29, 28, 24, 21, 20, 18, 16). Nämä poikkeamat eivät aina esiinny yhdessä CP:n poikkeamien kanssa. Merkittävällä osalla potilaista LP on jopa hieman aktiivisempi kuin CP (näytteet 50, 49, 48, 46, 43, 38, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 27, 25, 23, 22, 17). AP on vähiten aktiivinen reaktiotie, mutta toisaalta AP:ta testattiin vain 12 potilasnäytteestä. Yli puolella näytteistä AP:n annosvasteet ovat alle 90 tappo-%:ia (näytteet 51, 47, 45, 44, 43, 42, 41, 40), ja näistä kahdessa AP:lla on koetinsoluja stimuloiva vaikutus (näytteet 45 ja 44). AP:n alhaiset annosvasteet eivät jokaisella näytteellä korreloi muiden reaktioteiden poikkeuksien kanssa. EGTA:n avulla eristetyn AP:n annosvasteet vaihtelevat eniten. Osassa näytteitä ne korreloivat vasta-aineiden avulla eristetyn AP:n tuloksien kanssa, mutta osassa ne poikkeavat toisistaan merkittävästi.

Potilasnäytteiden analysoimista varten tutkimuksen käytössä olivat potilailla teetetyt oirekyselyt, joiden avulla oireiden vakavuutta voitaisiin verrata eroihin reaktioteiden annosvasteissa. Oireet on taulukoitu (taulukko 4). Näytteet 50 ja 48 ovat samalta potilaalta. Näyte 48 on otettu oireilun aikana ja näyte 50 on otettu kuukausia myöhemmin, kosteusvauriolle altistumisen loputtua ja oireiden hävittyä. Näytteet 36 ja 37 on otettu samoilta henkilöiltä neljä kuukautta ensimmäisten näytteiden, 23 ja 22 tässä järjestyksessä, jälkeen. Heidän oireensa ovat edelleen jatkuneet.

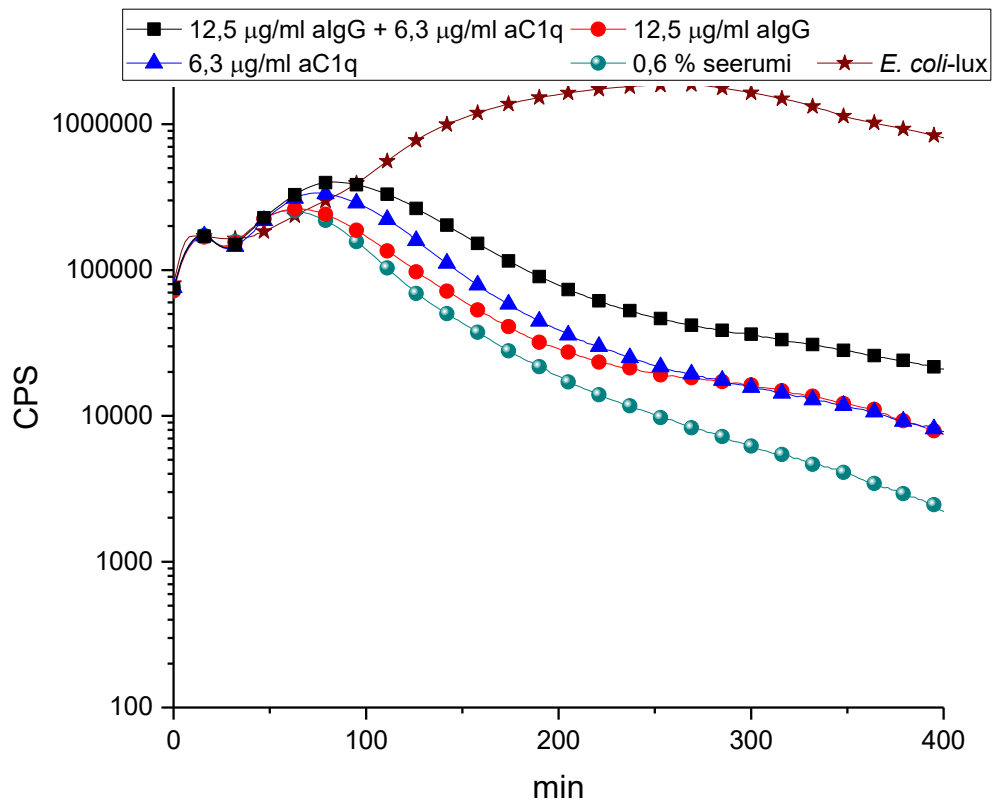
Taulukko 4. Potilaiden kokemat oireet. Toistetut potilasnäytteet mainittu erikseen.

Potilas	Oireet	Potilas	Oireet
51	Allergia, astma, kosketusihottuma, sähköherkkyys	33	Lihasoireet (hemiplegia), migreeni
50	Potilas 48. (Oireet hävinneet muuton jälkeen)	32	Reuma
49	Mahdolliset iho-oireet (psoriasis)	31	Nenäoireet, päänsärky, silmäoireet, äänihäiriöt
48	Neurologiset oireet (kasvokipu, lihasnykinä, huimaus)	30	Kuiva yskä, pitkittyneet infektiot
47	Astma, muistihäiriöt, väsymys, yliherkkyysnuha	29	Astma, kaikki altistumisen yleisoireet
46	Ei oireita	28	Ei oireita (ei oirekyselytietoja)
45	Hajuaistin herkistyminen, lihasoireet, päänsärky	27	Astma, kemikaaliyliherkkyys, neurologiset oireet
44	Hengenahdistus, limakalvojen ärsytys	25	Allergia, astma
43	Limakalvo-oireet, neurologiset oireet, silmäoireet	24	Allergiat, angioödeema, astma, diabetes, neuropatia
42	Allergiat, kuiva iho, äänihäiriöt	23	Keuhko-oireet, neurologiset oireet, kem.yliherkkyys
41	Astma, migreeni, nivelsäryt, äänihäiriöt	22	Iho-oireet, kemikaaliyliherkkyys, neurologiset oireet
40	Iho-oireet, neurologiset oireet, niveleoireet, sinusiitti	21	Astma, infektiot, niveleoireet, silmäoireet, väsymys
39	Kemikaaliyliherkkyys, äänihäiriöt	20	Nuha, silmäoireet, väsymys
38	Allergia, infektiokierre, ihon ja silmien oireet	19	Kuiva yskä
37	Potilas 22. (Oireet jatkuneet)	18	Äänihäiriöt
36	Potilas 23. (Oireet jatkuneet)	17	Lihasoireet, niveleoireet
35	Allerginen alveoliitti, osteopenia	16	Kasvojen ihottuma, kosketusallergia, väsymys
34	Keuhkosarkoidoosi	15	Astma, iho-oireet, reuma

8.5 Immunologiset tekijät

CP käynnistyy C1q:n sitoutuessa antigeeni–vasta-ainekompleksiin, joten immunoglobuliinien, ja erityisesti IgG:n ja IgM:n, voidaan olettaa aktivoivan CP:tä (Sarma ja Ward 2011). Voidaan siis olettaa, että seerumin IgG:n inhibointi heikentää myös CP:n antimikrobiaalista vaikutusta. Tätä tutkittiin yksinkertaisessa kokeessa, jossa verrattiin anti-IgG:n (Anti-Human IgG, 2 mg/ml, Sigma) ja anti-C1q:n vaikutusta seerumin antimikrobiaaliseen vaikutukseen yhdessä ja erikseen (kuva 15). Molemmista vasta-aineista testattiin vain yhtä konsentraatiota. Tulokset vastasivat hypoteesia, sillä vasta-aineilla nähtiin selvä yhteisvaikutus, joka inhiboi CP:tä. Näiden alustavien

tulosten perusteella menetelmää voitaisiin käyttää myös muiden immunoglobuliinien vaikutukseen CP:n tappokinetiikoihin.



Kuva 15. Anti-IgG:n ja anti-C1q:n yhteisvaikutus. X-akselilla aika minuutteina. Y-akselilla luminesenssisignaali mittauksina sekuntissa. *E. coli-lux* = Bakterikontrolli ilman seerumia. 0,6 % seerumi = Seerumikontrolli ilman vasta-aineita. algG = Anti-IgG. aC1q = Anti-C1q.

CRP on akuutin faasin proteiini, joka sitoutuu patogeeneiden pintarakenteisiin ja aktivoi CP:tä. CRP:n opsonisaation tiedetään myös tehostavan patogeeneiden fagosytoosia *in vitro* ilman komplementtisysteemin osallistumista. (Suresh ja muut 2006.) CRP:n mahdollista yhteisvaikutusta CP:n kanssa tutkittiin alustavasti, mutta kokeet tehtiin bakteeripreparaatilla, joka oli menettänyt jopa 80 %:ia luminesenssistaan. Tämän vuoksi näitä kuvaajia ei liitetä tähän tutkielmaan ja tuloksiin on suhtauduttava skeptisesti. Kokeissa bakteerit opsonisoitiin ihmisen CRP:llä (Human CRP, 2,6 mg/ml, EMD Millipore), mikä johti luminesenssin kasvuun suhteessa CRP:n konsentraatioon. Tulokset eivät vastanneet odotuksia, sillä CRP:n odotettiin aktivoivan seerumin komplementin CP:tä, mikä näkyisi luminesenssisignaalin laskuna.

SAA-proteiinit ovat CRP:n kaltoin akuutin faasin proteiineja, joiden ekspressio nousee tulehdusreaktion yhteydessä. Veressä SAA:t toimivat apoliproteiineina, jotka sitovat ja

kuljettavat HDL-kolesterolia pois kudoksista. Vapaa SAA voi muodostaa liukenemattomia fibrillejä, jotka voivat kroonisten tulehdussairauksien seurauksena johtaa amyloidoosiin. SAA-proteiinien fysiologista tehtävää tulehdusreaktiossa ei tunneta, mutta ne saattavat toimia sytokiinien kaltaisesti ja säädellä akuutin faasin reaktiota. (Sack Jr 2018.) Niiden tiedetään myös opsonisoivan gram-negatiivisia bakteereita (Shah ja muut 2006). Happamassa ympäristössä SAA on antimikrobiaalinen gram-positiiviselle *Staphylococcus aureukselle*, jonka solukalvon toimintaa se häiritsee. (Zheng ja muut 2020).

Ihmisen SAA:n (Apo-SAA, 1 mg/ml, 0,1 % etikkahappo, Sigma-Aldrich) vaikutusta koetinsoluihin tutkittiin laimennossarjojen avulla, mutta käytössä ollut bioluminesenssiltaan heikentynyt bakteeripreparaatti on vaikuttanut tuloksiin. Siksi näitä kuvaajia ei julkaista tässä tutkielmassa. Alustavista tuloksista nähtiin SAA:lla yksinään jo olevan huomattava antimikrobiaalinen vaikutus koetinsoluihin. SAA:lla ja 0,6 % seerumilla havaittiin olevan antimikrobiaalinen yhteisvaikutus, joka voimistui suhteessa SAA:n konsentraatioon, mikä saattaa kertoa SAA:n opsonisaatiovaikutuksesta.

9. Pohdinta

Tämä tutkielma on suoraa jatkumoa tutkimusryhmän aikaisemmille julkaisuille, jotka ovat käsitelleet seerumin komplementtisysteemin antimikrobiaalisen vaikutuksen mittaamista (Kilpi ja muut 2009) sekä komplementin aktivoitumista sisäilmavaurioille altistuneiden potilaiden seeruminäytteissä (Atosuo ja muut 2021). *E. coli*-lux koetinsolujen bioluminesenssiin perustuva menetelmä on automatisoitu, halpa ja se tuottaa reaaliaikaista dataa, joten sitä on ehdotettu vaihtoehdoksi perinteisille komplementin hemolyytisille testeille. Komplementtisysteemin funktionaalisen analyysin suhteen menetelmässä oli kuitenkin runsaasti optimoitavaa – AP:n eristämiseen käytetty kelatoiva EGTA on epäspesifinen inhibiittori, joka komplementtisysteemin lisäksi vaikuttaa myös koetinsolujen elinkelpoisuuteen ja kasvuun. Lisäksi komplementin LP:n antimikrobiaalista aktiivisuutta ei vanhalla menetelmällä voitu mitata. (Atosuo 2015.) Tutkielmani päätarkoituksena oli löytää sellaiset komplementin komponenttien vasta-aineet, niiden konsentraatiot ja yhdistelmät, joilla komplementtisysteemin reaktiotiet voitaisiin spesifisesti eristää ilman EGTA:a. Vasta-aineita hyödyntämällä saataisiin myös tärkeää tietoa LP:n aktiivisuudesta, jota on historiallisesti vähätelty.

Tutkielman aikana kokeiltiin yhteensä 13 eri vasta-aineen vaikutusta komplementin reaktioteiden salpaamiseen. Lopulta näistä vain neljää päädyttiin käyttämään reaktioteiden eristämisessä. Ennako-odotusten mukaisesti anti-C1q:n todettiin olevan tehokas CP:n salpaaja, mistä kertoo myös muihin vasta-aineisiin nähden alhainen eristämistä varten valittu konsentraatio 6,3 µg/ml. LP:n salpaavalla anti-MBL:llä ei ollut merkittävää vaikutusta seerumipoolin komplementtisysteemin antimikrobiaaliseen vaikutukseen, sillä edes korkeilla vasta-ainekonsentraatioilla tappokinetiikat eivät merkittävästi poikenneet seerumikontrollista. Tulos vastasi odotuksia, sillä komplementin funktionaalisissa analyyseissä LP:n on todettu olevan vähiten aktiivinen reaktiotie (Palarasah ja muut 2011). Toisin kuin AP:n ja CP:n toiminnan puutosten, ei LP:n puutosten tiedetä aikuisilla altistavan bakteri-infektioille. Vastasyntyneiden immuniteetti on aikuista heikompi, ja LP:n puutokset heille sepsiksen riskitekijä. (Degn ja muut 2011.) Varhaisten tulosten perusteella anti-properdiini valittiin AP:n salpaajaksi. Eristykseen valituilla vasta-aineiden konsentraatioilla anti-properdiinin annosvaste oli 0,7 tappo-%:ia anti-C1q:ta matalampi, mikä on huomattava ero. Tämä vastasi odotuksia, sillä kirjallisuuden mukaan CP on AP:ta moninkertaisesti aktiivisempi (Kilpi ym. 2009).

Reaktioteiden salpaamisen perusteella valitut vasta-aineyhdistelmät toimivat CP:n ja AP:n eristämässä, mutta anti-properdiinin ja anti-C1q:n avulla ei saatu eristettyä LP:tä. Siksi aiemmin AP:n salpaamiseen soveltumattomaksi todettua anti-fD:tä päätettiin kokeilla LP:n eristämiseen yhdessä anti-C1q:n kanssa. Yllättäen anti-fD:n havaittiin salpaavan AP:ta vain, kun reaktiossa oli mukana riittävä konsentraatio anti-C1q:ta. LP:n eristämisen todettiin onnistuneen, mutta tämän yllättävän yhteisvaikutuksen syytä ei saatu selville. Huomattavin ero eristettyjen reaktioteiden annosvasteissa oli AP:lla, jonka annosvaste oli vain 20,2 tappo-%:ia. Annosvasteen ja kinetiikkakuvaajan perusteella AP:lla ei olisi bakteriosidista vaikutusta koetinsoluja vastaan. EGTA-seerumilla eristetyn AP:n 60,1 tappo-% on sekin CP:n (98,0 tappo-%) ja LP:n (94,7 tappo-%) tuloksiin verrattaessa matala. CP:n ja LP:n annosvasteet erosivat vain 3,3 tappo-%:ia, joten näitä reaktioteitä on parempi analysoida kinetiikkakuvaajien avulla, joista nähdään CP:llä olevan voimakkaampi bakteriosidinen vaikutus pitemmällä aikavälillä. Reaktioteiden eristämisen voidaan lopullisesti onnistuneen potilasnäytteiden annosvasteiden perusteella. Näissä tuloksissa nähtiin kokoseerumin olevan aina annosvasteeltaan korkein (97,0–99,4 tappo-%), mikä kertoo sen sisältävän kaikki komplementin reaktiotiet, kuten luonnollisesti oletettiin. CP oli reaktioteistä aktiivisin (puolilla näytteistä yli 90 tappo-%), LP seuraavaksi aktiivisin ja AP vähiten aktiivinen. EGTA:n avulla eristetyn AP:n tulokset vaihtelevat paljon, ja niitä on vaikea tulkita. Tämän perusteella EGTA:n käytöstä pitäisi luopua komplementtisysteemin funktionaalisessa analyysissä tällä menetelmällä. EGTA:n uskotaan negatiivisesti vaikuttavan *E. colin* kasvuun, proteiinisynteesiin ja solusyklin toimintaan (Holland ja muut 1999). Allekirjoittaneen mielestä kinetiikkakuvaajat kertovat paljon enemmän kuin yksittäiseen ajankohtaan perustuvat annosvasteet. Annosvasteet ovat käteviä useamman eri näytteen analysointiin.

Voitiinko sisäilmavaurioille altistuminen nähdä reaktioteiden annosvasteista? Tutkimushypoteesin mukaan vauriorakennusten mikrobit, ja etenkin homeet ja hiivat, saattaisivat aktivoitua LP:tä, mikä näkyisi annosvasteissa. 17 näytteessä LP:n annosvaste oli hieman CP:ta korkeampi (suurin ero 8,2 tappo-%). Tämän tuloksen perusteella LP saattaisi olla tärkeämmässä osassa immuunipuolustustamme, kuin on aiemmin oletettu. Tämän väitteen toteamiseen tarvitaan vielä lisätutkimuksia. Toisaalta LP:n annosvasteet vaihtelivat paljon, sillä 12 näytteessä annosvaste oli huomattavan alhainen (33,6–54,5 tappo-%). Tämä lukumäärä on selvästi korkeampi kuin arvio LP:n puutosten yleisyydestä, 5–10 %:ia. LP:n hemolyyttisen aktiivisuuden tiedetään vaihtelevan paljon

(Palarasah ja muut 2011), joten se johtuvatko nämä tulokset tästä luonnollisesta vaihtelusta vai immuunipuolustuksen muutoksista potilailla on epäselvää. Suuressa osassa näytteistä LP:n alhaiset annosvasteet korreloivat muidenkin reaktioteiden ja kokoseerumin matalien annosvasteiden kanssa, joten näiden potilaiden (51, 45, 44, 41, 39, 21 18,16) immuunipuolustuksen voidaan todeta olevan muita matalampia. Muutaman potilaan komplementtisysteemi vaikuttaa toimivan tavallisesti ilman LP:ta (24 ja 18). Potilaiden kokemat oireet eivät vakavuudeltaan korreloi poikkeuksellisen korkean tai matalan LP:n aktiivisuuden kanssa. Esimerkiksi muuton jälkeen oireettomaan potilaan 50. LP on yhä CP:ta aktiivisempi. Toisella oireettomalla potilaalla 29. LP:n annosvaste on vain 33,8 tappo-%:ia. Vaikeastikin oireilevilla potilailla LP:n annosvasteet vaihtelevat merkittävästi. Ei siis ole lainkaan selvää aktivoituuko LP altistumisen yhteydessä vai ovatko erot reaktiotiessä täysin synnynnäisiä. Joidenkin autoimmuunisairauksien yhteydessä komplementin eri reaktioteiden komponenttien todetaan puuttuvan, mikä on selitetty näiden komponenttien kulumisella komplementin reaktioissa (Chen ja muut 2010). Onko mahdollista, että potilaiden LP onkin aktivoitunut, mutta reaktiotien komponentit ovat vain kuluneet seerumista, jolloin reaktiota ei nähdäkään tällä menetelmällä? Miten mahdollinen matala-tasoinen tulehdusreaktio todetaan näistä tuloksista?

AP:ta mitattiin vain 12 näytteestä, koska anti-MBL oli mittauksia eniten rajoittava vasta-aine. Välillä vasta-ainetilauksia jouduttiin odottaa jopa kuukauden. Tästä pienestä otannasta nähtiin AP:n annosvasteiden vaihtelevan eniten, ja reaktiotien olevan kaikkein vähiten bakteriosidinen koetinsoluja vastaan. Kolmessa näytteessä (51, 45, 44) annosvasteet olivat alle 10 tappo-%:ia. AP:n matalat annosvasteet eivät aina korreloineet muiden reaktioteiden puutteiden kanssa. Alustavien tulosten perusteella AP ei siis ole aktivoitunut sisäilmavaurioiden takia, mutta näytteitä pitäisi testata lisää. Oireiden vakavuus ei korreloi AP:n annosvasteiden kanssa, sillä esimerkiksi neurologisista oireista kärsivällä potilaalla 49. AP on kaikkein aktiivisin reaktiotie. AP:n antimikrobiaalisen vaikutuksen suhteen kokonaan puutteelliset potilaat 45. ja 44. eivät ole oireettomia. EGTA:n avulla eristetyt AP:n annosvasteet olivat kyseenalaisia, kuten edellä jo mainittiin. Esimerkiksi potilailla 48. ja 45., joiden kaikki muut reaktiotiet olivat antimikrobiaalisesti aktiivisia, olivat EGTA:n avulla eristetyt AP:n annosvasteet vain 74,0 tappo-%:ia ja 57,2 tappo-%:ia. Potilaalla 51. kaikki reaktiotiet olivat poikkeuksellisen matalia annosvasteidensa suhteen, mutta EGTA:n annosvaste oli silti 77,8 tappo-%:ia.

Immunologiset tekijät ja niiden vaikutus komplementtisysteemin antimikrobiaaliseen aktiivisuuteen oli lyhyt sivuprojekti, josta vain anti-IgG:llä tehdyt mittaukset tehtiin tämän tutkielman aikana. Anti-IgG:llä ja anti-C1q:lla oli negatiivinen yhteisvaikutus seerumin tappokinetiikkoihin. Sekä IgG että C1q osallistuvat CP:n initiaatioon, jota nämä vasta-aineet inhiboivat. Valitettavasti mittaus oli hyvin suppea, sillä siinä käytettiin vain yhtä konsentraatiota molemmista vasta-aineista. Jatkossa menetelmän avulla voitaisiin tutkia myös muiden immunoglobuliinien osuutta CP:n initiaatiossa. Aktivoivatko IgA, IgD ja IgE myös CP:tä? Entä vastaako jokin tietty immunoglobuliinien luokka CP:n aktivoitumisesta sisäilmavaurioille altistuneiden seerumissa? Tutkielmaa edeltävissä kokeissa tutkittiin akuutin faasin proteiinien CRP:n ja SAA:n antimikrobiaalista vaikutusta sekä sitä, miten ne toimivat yhdessä seerumin komplementin kanssa. Nämä mittaukset tehtiin bakteeripreparaatilla, joka oli menettänyt jopa 80 %:ia bioluminesenssistaan, mikä teki tulosten tulkinnasta vaikeaa. Kokeiden tuloksista on lyhyesti kerrottu edeltävässä osiossa, eikä niitä ole tarpeen käsitellä enempää tässä tutkielmassa. Kyseiset kokeet pitäisi toistaa tutkielmassa käytetyllä bakteeripreparaatilla. Erityisesti SAA olisi immunologisen tutkimuksen kannalta mielenkiintoinen tutkimuskohde, sillä sen osuutta immuunipuolustuksessa ei tunneta (Sack Jr 2018).

Edellä käsiteltyjen tulosten perusteella voidaan käytetyn menetelmän sanoa soveltuvan komplementtisysteemin reaktioteiden aktiivisuuksien erojen mittaamiseen. Komplementin komponentteja spesifisesti inhiboivat vasta-aineet olivat selvästi EGTA:a luotettavampia reaktioteiden eristämisessä, ja niiden avulla myös LP:n aktiivisuus saatiin esille. Reaktioteiden matalat annosvasteet usein korreloivat toistensa kanssa, minkä uskotaan kertovan immuunipuolustuksen heikentymisestä. Toistaiseksi ei voitu päätellä onko jokin tietty reaktiotie aktivoitunut sisäilmavaurioille altistumisen seurauksena. Havaitut erot reaktioteiden aktiivisuuksissa saattavat olla synnynnäisiä. Tiedossa ei ole, että vastaavanlaista tutkimusta olisi tehty aiemmin, mikä tekee tulosten tulkinnasta entistäkin haastavampaa.

Menetelmässä ja tulosten analyysissä on vielä runsaasti kehitettävää. Ensinnäkin tervettä populaatiota edustava seerumipooli pitäisi tehdä useammasta kuin neljästä seeruminäytteestä, jotta seerumipooli varmasti vastaisi terveen ja komplementin suhteen puutoksettoman henkilön komplementtisysteemin aktiivisuutta. Menetelmällä saatuja annosvasteita voitaisiin myös verrata komplementtisysteemin hemolyyttisiin kokeisiin

tai entsyymivälitteisiin immunosorbenttimäärytyksiin. Jos menetelmän avulla eristettyjen reaktioteiden aktiivisuudet korreloisivat muiden komplementtisysteemin funktionaalista aktiivisuutta mittaavien menetelmien kanssa, saataisiin lopullinen varmuus käytetyn menetelmän toimivuudesta. LP:n salpaamiseen voitaisiin kokeilla vasta-aineita MASP1:lle tai MASP2:lle, jotka osallistuvat reaktiotien initiaatioon ja kompleksoituvat myös ainakin osan fikoliineista sekä kollektiineista kanssa (Dobó ja muut 2018). Tämä voisi mahdollistaa koko LP:n antimikrobiaalisen vaikutuksen mittaamisen – toisin kuin vain MBL:n inhibointi. Annosvasteiden taulukointi on välttämätön keino suurten näytemäärien analysoimisessa, mutta tappoprosenttien erot voivat olla pieniä ja tuloksia on työlästä verrata toisiinsa. Yksittäisen ajankohdan tappoprosentti ei myöskään kerro tappokinetiikoista, kuten komplementtiaktiivisuuden käynnistymisajasta tai koetinsolujen mahdollisesta bifaasisesta kasvusta, mitään. Ehkä, jos mittauksissa käytettäisiin laimeampaa bakteerilaimennosta, matalamman bioluminesenssisignaalin avulla voitaisiin saada selkeämpiä eroja annosvasteissa. Mahdollisesti reaktioista voitaisiin laskea kahden eri ajankohdan annosvasteet. Esimerkiksi 600 min ajolla vasteet 200 min ja 400 min kohdilta. Toisaalta näin vain tuotetaan lisää käsiteltävää dataa, ellei näistä annosvasteista oteta keskiarvoa.

E. coli-lux koetinsolujen bioluminesenssiin perustuvat komplementin funktionaaliset mittaukset ovat potentiaalinen tapa mitata sisäilmavaurioille altistumisen aiheuttamia muutoksia komplementin reaktioteiden aktiivisuuksissa. Jatkossa mittauksia pitäisi tehdä suuremmalla otannalla, ja näitä mittauksia täytyisi toistaa, jotta saataisiin tietää menetelmän toistettavuus. Erytyistä huomiota pitäisi kiinnittää potilasnäytteiden käsittelyyn (keräys, sulatus, sekoitus ja inkubointi vasta-aineiden kanssa). Tuloksia pitäisi verrata kontrollinäytteisiin, jotka otettaisiin terveiltä vapaaehtoisilta. Tämä vertailu voitaisiin tehdä esimerkiksi sokottamalla, eli altistuneiden potilasnäytteet voitaisiin yrittää tunnistaa annosvasteiden avulla kontrollinäytteistä. Tämä olisi hyvin uskottava tapa todistaa menetelmän toimivuus lopullisesti. Samalla reaktioteiden aktiivisuuksien yhteys oireiden vakavuuteen olisi paljon helpompi selvittää. Tutkimuksia on nyt helppo jatkaa, sillä reaktioteiden eristämiseen käytettävät vasta-aineet on jo valittu, eli vasta-aineita voidaan siis tilata sitä mukaan, kun niitä tarvitaan. Tutkimusmenetelmä on myös helppo opettaa uusillekin työntekijöille. Sisäilmavaurioiden terveysvaikutusten tutkimisen lisäksi menetelmällä voidaan myös jatkaa immunoglobuliineilla ja akuutin faasin proteiineilla tehtävää tutkimusta.

Lähteet

- Atosuo, J. (2015) Novel Cellular Luminescence Probes for Immunological and Toxicological Assessments 98.
- Atosuo, J., Karhuvaara, O., Suominen, E., Vilén, L., Nuutila, J. & Putus, T. (2020) Indoor exposure to *Streptomyces albus* and *Aspergillus versicolor* elevates the levels of spore-specific IgG, IgG1 and IgG3 serum antibodies in building users — A new ELISA-based assay for exposure assessment. *Sci Total Environ* **698**:134335.
- Atosuo, J., Karhuvaara, O., Suominen, E., Vilén, L., Nuutila, J. & Putus, T. (2021) Indoor-related microbe damage induces complement system activation in building users. *Innate Immun* **27**:15–22.
- Atosuo, J., Lehtinen, J., Vojtek, L. & Lilius, E.-M. (2013) *Escherichia coli* K-12 (pEGFP_{lux}ABCDEamp): a tool for analysis of bacterial killing by antibacterial agents and human complement activities on a real-time basis. *Luminescence* **28**:771–779.
- Atosuo, J. & 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. & Lilius, E.M. (2011) The real-time-based assessment of the microbial killing by the antimicrobial compounds of neutrophils. *ScientificWorldJournal* **11**:2382–2390.
- Bayly-Jones, C., Bubeck, D. & Dunstone, M.A. (2017) The mystery behind membrane insertion: A review of the complement membrane attack complex. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **372**.
- Betlem, K., Hoksbergen, S., Mansouri, N., Down, M., Losada-Pérez, P., Eersels, K., van Grinsven, B., Cleij, T.J., Kelly, P., Sawtell, D., Zubko, M., Banks, C. & Peeters, M. (2018) Real-time analysis of microbial growth by means of the Heat-Transfer Method (HTM) using *Saccharomyces cerevisiae* as model organism. *Phys Med* **6**:1–8.
- Borchers, A.T., Chang, C. & Eric Gershwin, M. (2017) Mold and Human Health: a Reality Check. *Clin Rev Allergy Immunol* **52**:305–322.
- Brodli, E., Winkler, A. & Macheroux, P. (2018) Molecular Mechanisms of Bacterial Bioluminescence. *Comput Struct Biotechnol J* **16**:551–564.
- Bruce, N., Perez-Padilla, R. & 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.
- Bush, R.K., Portnoy, J.M., Saxon, A., Terr, A.I. & Wood, R.A. (2006) The medical effects of mold exposure. *J Allergy Clin Immunol* **117**:326–333.
- Chakrabarti, A., Denning, D.W., Ferguson, B.J., Ponikau, J., Buzina, W., Kita, H., Marple, B., Panda, N., Vlaminc, S., Kauffmann-Lacroix, C., Pharm, M., Das, A., Singh, P., Taj-Aldeen, S.J., Kantarcioglu, A.S., Handa, K.K., Gupta, A., Thungabathra, M., Shivaprakash,

- M.R., Bal, A., Fothergill, A. & Radotra, B.D. (2009) Fungal Rhinosinusitis: A Categorization and Definitional Schema. *Laryngoscope* **119**:1809–1818.
- Chang, C. & 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. *J Allergy Clin Immunol* **125**:S3–S23.
- Chen, M., Daha, M.R. & Kallenberg, C.G.M. (2010) The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimmun* **34**:J276–J286.
- Davis, A., Mejia, P. & Lu, F. (2008) Biological activities of C1 inhibitor. *Mol Immunol* **45**:4057–4063.
- Day, M. & Schultz, R. (2010) An Overview of the Immune System. *Vet Immunol* **357**:9–18.
- Degn, S.E., Jensenius, J.C. & Bjerre, M. (2011) The lectin pathway and its implications in coagulation, infections and auto-immunity. *Curr Opin Organ Transplant* **16**:21–27.
- Dobó, J., Kocsis, A. & Gál, P. (2018) Be on target: Strategies of targeting alternative and lectin pathway components in complement-mediated diseases. *Front Immunol* **9**.
- Dunkelberger, J.R. & Song, W.C. (2010) Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell Res* **20**:34–50.
- Eed, H.R., Abdel-Kader, N.S., El Tahan, M.H., Dai, T. & Amin, R. (2016) Bioluminescence-sensing assay for microbial growth recognition. *J Sensors* **2016**.
- Elvington, M., Liszewski, M.K. & Atkinson, J.P. (2016) Evolution of the complement system: from defense of the single cell to guardian of the intravascular space. *Immunol Rev* **274**:9–15.
- Frank, A.L. & Joshi, T.K. (2014) The Global Spread of Asbestos. *Ann Glob Heal* **80**:257–262.
- Garred, P., Genster, N., Pilely, K., Bayarri-Olmos, R., Rosbjerg, A., Ma, Y.J. & Skjoedt, M.O. (2016) A journey through the lectin pathway of complement—MBL and beyond. *Immunol Rev* **274**:74–97.
- González-Martín, J., Kraakman, N.J.R., Pérez, C., Lebrero, R. & Muñoz, R. (2021) A state-of-the-art review on indoor air pollution and strategies for indoor air pollution control. *Chemosphere* **262**.
- Gullstrand, B., Mårtensson, U., Sturfelt, G., Bengtsson, A.A. & Truedsson, L. (2009) Complement classical pathway components are all important in clearance of apoptotic and secondary necrotic cells. *Clin Exp Immunol* **156**:303–311.
- Harding, C.F., Pytte, C.L., Page, K.G., Ryberg, K.J., Normand, E., Remigio, G.J., DeStefano, R.A., Morris, D.B., Voronina, J., Lopez, A., Stalbow, L.A., Williams, E.P. & Abreu, N. (2020) Mold inhalation causes innate immune activation, neural, cognitive and emotional dysfunction. *Brain Behav Immun* **87**:218–228.
- Hazan, R., Que, Y.A., Maura, D. & Rahme, L.G. (2012) A method for high throughput determination of viable bacteria cell counts in 96-well plates. *BMC Microbiol* **12**:1.
- Holland, I.B., Jones, H.E., Campbell, A.K. & Jacq, A. (1999) An assessment of the role of

- intracellular free Ca²⁺ in *E. coli*. *Biochimie* **81**:901–907.
- Holme, J.A., Øya, E., Afanou, A.K.J., Øvrevik, J. & Eduard, W. (2020) Characterization and pro-inflammatory potential of indoor mold particles. *Indoor Air* **30**:662–681.
- Hurraß, J., Heinzow, B., Aurbach, U., Bergmann, K.C., Bufe, A., Buzina, W., Cornely, O.A., Engelhart, S., Fischer, G., Gabrio, T., Heinz, W., Herr, C.E.W., Kleine-Tebbe, J., Klimek, L., Köberle, M., Lichtnecker, H., Lob-Corzilius, T., Merget, R., Mülleneisen, N., Nowak, D., Rabe, U., Raulf, M., Seidl, H.P., Steiß, J.O., Szewczyk, R., Thomas, P., Valtanen, K. & Wiesmüller, G.A. (2017) Medical diagnostics for indoor mold exposure. *Int J Hyg Environ Health* **220**:305–328.
- Jahreis, S., Kuhn, S., Madaj, A.-M., Bauer, M. & Polte, T. (2017) Mold metabolites drive rheumatoid arthritis in mice via promotion of IFN-gamma- and IL-17-producing T cells. *Food Chem Toxicol an Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc* **109**:405–413.
- Janeway, C.A. & Medzhitov, R. (2002) Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**:197–216.
- Kemper, C. & Atkinson, J.P. (2007) T-cell regulation: with complements from innate immunity. *Nat Rev Immunol* **7**:9–18.
- Kilpi, M.K., Atosuo, J.T. & Lilius, E.-M.E. (2009) Bacteriolytic activity of the alternative pathway of complement differs kinetically from the classical pathway. *Dev Comp Immunol* **33**:1102–1110.
- Kirschfink, M. & Mollnes, T.E. (2003) Modern Complement Analysis. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**:982–989.
- Kolter, R., Siegele, D.A. & Tormo, A. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Annu Rev Microbiol* **47**:855–874.
- Kvell, K., Cooper, E.L., Engelmann, P., Bovari, J. & Nemeth, P. (2007) Blurring borders: innate immunity with adaptive features. *Clin Dev Immunol* **2007**:83671.
- Lagier, J.C., Edouard, S., Pagnier, I., Mediannikov, O., Drancourt, M. & Raoult, D. (2015) Current and past strategies for bacterial culture in clinical microbiology. *Clin Microbiol Rev* **28**:208–236.
- Li, L., Mendis, N., Trigui, H., Oliver, J.D. & Faucher, S.P. (2014) The importance of the viable but non-culturable state in human bacterial pathogens. *Front Microbiol* **5**:1–1.
- Lilley, T.M., Ruokolainen, L., Meierjohann, A., Kanerva, M., Stauffer, J., Laine, V.N., Atosuo, J., Lilius, E.-M. & Nikinmaa, M. (2013) Resistance to oxidative damage but not immunosuppression by organic tin compounds in natural populations of Daubenton's bats (*Myotis daubentonii*). *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* **157**:298–305.
- Litvack, M.L. & Palaniyar, N. (2010) Soluble innate immune pattern-recognition proteins for clearing dying cells and cellular components: Implications on exacerbating or resolving inflammation. *Innate Immun* **16**:191–200.
- Loutfi, H., Pellen, F., Le Jeune, B., Lteif, R., Kallassy, M., Le Brun, G. & Abboud, M. (2020)

- Real-time monitoring of bacterial growth kinetics in suspensions using laser speckle imaging. *Sci Rep* **10**:1–10.
- Maier, R.M. (2009) Bacterial Growth .
- Matsushita, M. (2009) Ficolins: Complement-activating lectins involved in innate immunity. *J Innate Immun* **2**:24–32.
- McCusker, C. & Warrington, R. (2011) Primary immunodeficiency. *Allergy Asthma Clin Immunol* **7 Suppl 1**:S11.
- McGonigal, R., Cunningham, M.E., Yao, D., Barrie, J.A., Sankaranarayanan, S., Fewou, S.N., Furukawa, K., Yednock, T.A. & 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.
- Meri, S. (2016) Self-nonsel self discrimination by the complement system. *FEBS Lett* **590**:2418–2434.
- Mold, C., Gewurz, H. & Du Clos, T.W. (1999) Regulation of complement activation by C-reactive protein. *Immunopharmacology* **42**:23–30.
- Narang, R., Mohammadi, S., Ashani, M.M., Sadabadi, H., Hejazi, H., Zarifi, M.H. & Sanati-Nezhad, A. (2018) Sensitive, Real-time and Non-Intrusive Detection of Concentration and Growth of Pathogenic Bacteria using Microfluidic-Microwave Ring Resonator Biosensor. *Sci Rep* **8**:1–10.
- Necchi, F., Saul, A. & Rondini, S. (2017) Development of a high-throughput method to evaluate serum bactericidal activity using bacterial ATP measurement as survival readout. *PLoS One* **12**:1–15.
- Nonaka, M. & Sekiguchi, R. (2013) Complement System: Evolution. *eLS*.
- Nordkamp, M.J.M.O., Boross, P., Yildiz, C., Jansen, J.H.M., Leusen, J.H.W., Wouters, D., Urbanus, R.T., Hack, C.E. & Meyaard, L. (2014) Inhibition of the classical and lectin pathway of the complement system by recombinant LAIR-2. *J Innate Immun* **6**:284–292.
- Oikonomopoulou, K., Reis, E.S. & Lambris, J.D. (2012) Complement System and Its Role in Immune Responses. *eLS*.
- Palarasah, Y., Nielsen, C., Sprogøe, U., Christensen, M.L., Lillevang, S., Madsen, H.O., Bygum, A., Koch, C., Skjodt, K. & Skjoedt, M.O. (2011) Novel assays to assess the functional capacity of the classical, the alternative and the lectin pathways of the complement system. *Clin Exp Immunol* **164**:388–395.
- Pangburn, M.K. (2000) Host recognition and target differentiation by factor H, a regulator of the alternative pathway of complement. *Immunopharmacology* **49**:149–157.
- Pettigrew, H.D., Selmi, C.F., Teuber, S.S. & Gershwin, M.E. (2010) Mold and human health: Separating the wheat from the chaff. *Clin Rev Allergy Immunol* **38**:148–155.
- Putus, T. (2017) *Home ja terveys*. 3. edn. Suomen Ympäristö- ja Terveysalan Kustannus Oy, Pori.

- Roberts, A.P. & Phillips, R. (1983) The relative importance of the classical and alternative complement pathways in serum bactericidal activity against *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **16**:69–74.
- Rolfe, M.D., Rice, C.J., Lucchini, S., Pin, C., Thompson, A., Cameron, A.D.S., Alston, M., Stringer, M.F., Betts, R.P., Baranyi, J., Peck, M.W. & Hinton, J.C.D. (2012) Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *J Bacteriol* **194**:686–701.
- Roos, A., Nauta, A.J., Broers, D., Faber-Krol, M.C., Trouw, L.A., Drijfhout, J.W. & Daha, M.R. (2001) Specific Inhibition of the Classical Complement Pathway by C1q-Binding Peptides. *J Immunol* **167**:7052–7059.
- Sack Jr, G.H. (2018) Serum amyloid A – a review. *Mol Med* **24**:1–27.
- Sarma, J.V. & Ward, P.A. (2011) The complement system. *Cell Tissue Res* **343**:227–235.
- Schreiber, R.D., Morrison, D.C., Podack, E.R. & Müller-Eberhard, H.J. (1979) Bactericidal activity of the alternative complement pathway generated from 11 isolated plasma proteins*. *J Exp Med* **149**:870–882.
- Scott, D., Dikici, E., Ensor, M. & Daunert, S. (2011) Bioluminescence and its impact on bioanalysis. *Annu Rev Anal Chem* **4**:297–319.
- Seelen, M.A., Roos, A., Wieslander, J., Mollnes, T.E., Sjöholm, A.G., Würzner, R., Loos, M., Tedesco, F., Sim, R.B., Garred, P., Alexopoulos, E., Turner, M.W. & Daha, M.R. (2005) Functional analysis of the classical, alternative, and MBL pathways of the complement system: Standardization and validation of a simple ELISA. *J Immunol Methods* **296**:187–198.
- Selman, M., Lacasse, Y., Pardo, A. & Cormier, Y. (2010) Hypersensitivity pneumonitis caused by fungi. *Proc Am Thorac Soc* **7**:229–236.
- Shah, C., Hari-Dass, R. & Raynes, J.G. (2006) Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria. *Blood* **108**:1751–1757.
- Skattum, L. & Truedsson, L. (2015) Complement: Deficiency Diseases. *eLS* 1–9.
- Speth, C., Rambach, G., Würzner, R. & Lass-Flörl, C. (2008) Complement and fungal pathogens: An update. *Mycoses* **51**:477–496.
- Su, H.R. (1996) S-Protein/Vitronectin Interaction with the C5b and the C8 of the Complement Membrane Attack Complex. *Int Arch Allergy Immunol* **110**:314–317.
- Suominen, E., Atosuo, J. & Lilius, E.-M. (2016) Indoor air toxicity assessment using *E. coli-lux*. *Indoor Air Proc* 2016.
- Suominen, E.N., Putus, T. & 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**:e04232.
- Suresh, M. V, Singh, S.K., Ferguson Jr, D.A. & Agrawal, A. (2006) Role of the property of C-reactive protein to activate the classical pathway of complement in protecting mice from

- pneumococcal infection. *J Immunol* **176**:4369–4374.
- Thurman, J.M. & Holers, V.M. (2006) The Central Role of the Alternative Complement Pathway in Human Disease. *J Immunol* **176**:1305–1310.
- Van Tran, V., Park, D. & 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**.
- 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**:26.
- Vignesh, P., Rawat, A., Sharma, M. & Singh, S. (2017) Complement in autoimmune diseases. *Clin Chim Acta* **465**:123–130.
- Vinet, L. & Zhedanov, A. (2011) A “missing” family of classical orthogonal polynomials. *J Phys A Math Theor* **44**:37–54.
- VOJTEK, L., DOBES, P., BUYUKGUZEL, E., ATOSUO, J. & HYRSL, P. (2014) Bioluminescent assay for evaluating antimicrobial activity in insect haemolymph. *EJE* **111**:335–340.
- Wang, H., Ricklin, D. & Lambris, J.D. (2017) Complement-activation fragment C4a mediates effector functions by binding as untethered agonist to protease-activated receptors 1 and 4. *Proc Natl Acad Sci* **114**:10948 LP – 10953.
- Zheng, H., Li, H., Zhang, J., Fan, H., Jia, L., Ma, W., Ma, S., Wang, S., You, H., Yin, Z. & Li, X. (2020) Serum amyloid A exhibits pH dependent antibacterial action and contributes to host defense against *Staphylococcus aureus* cutaneous infection. *J Biol Chem* **295**:2570–2581.
- Zhu, Y., Thangamani, S., Ho, B. & Ding, J.L. (2005) The ancient origin of the complement system. *EMBO J* **24**:382–394.