

TAVOITE

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli selvittää voidaanko huono sisäilma tunnistaa mittaamalla sisäilmasta kerättyjen huurrevesinäytteiden toksisuus ihmisluissa.

TAUSTA

Huono sisäilma aiheuttaa monenlaisia oireita ihmisissä. Sisäilmatutkimus on kuitenkin haasteellista, sillä sisäilma saattaa olla hyvinkin kompleksinen seos mikrobitekijöistä, rakennusmateriaaleista ja siivousaineista haittuvia yhdisteitä jne. Kemialliset analyysit ovat tällöin hankalia ja kalliita kun ei tiedetä mitä etsiä.

MENETELMÄ

Huurrevesinäytteiden keruu sisäilmasta

E-keräimen kehittäminen (www.sisailmatutkimuspalvelut.fi) on mahdollistanut uudenlaisen työkalun kehittämisen sisäilmatutkimukseen. E-keräimessä sisäilman vesimolekyylit härmistyvät huurreteeksi hiilihappojään avulla. Huurre sulatetaan vedeksi, joka on valmis analysoitavaksi. (Kuva 1)

Sisäilmanäytteet kerättiin yksityiskodeista, kesämökeiltä, julkisista tiloista kuten kouluista ja terveyskeskuksista sekä liikehuoneistoista. Syitä sisäilman testaukselle olivat mm. oireilu, haju, myynti/ostotilanne jne. Osa kohteista oli uusia asuntoja. Yhteensä näytteitä kerättiin testausta varten 1161 kpl noin 500 eri kohteesta.

Huurrevesinäytteiden solutoksisuuden testaus

Solutoksisuustesteillä tarkoitetaan testejä, joissa mitataan testattavan materiaalin vaikutuksia solun perusominaisuuksiin tai rakenteisiin kuten esimerkiksi solukalvojen eheyteen ja energia-aineenvaihduntaan. Solutoksisuustestien edellytyksenä on, että tutkittava materiaali on liukoissa muodossa, tai se on liuotettavissa/suspendoitavissa. Sisäilmasta kerätyt vesinäytteet mahdollistavatkin sisäilman toksisuuden tutkimisen solutoksisuustestein. Kun halutaan arvioida sisäilman potentiaalisia vaikutuksia ihmisessä, tarvitaan ihmisen biologiaan perustuvia toksisuustestejä. Tässä tutkimuksessa käytettiin kolmea eri solutyyppiä, jotka kaikki olivat ihmisperäisiä; THP-1 –monosyyttejä¹ ja –makrofageja, jotka edustivat puolustusjärjestelmän soluja sekä BJ-fibroblastisoluja, jotka ovat kaikkialla elimistössä esiintyviä sidekudossoluja. Solut hankittiin ATCC:ltä (American Type Culture Collection).

Solut altistettiin huurrevesinäytteille 1:10 laimennoksena eripituisia aikoja; 1, 3, 24 ja 48 h. Altistuksen jälkeen solujen elävyys mitattiin käyttämällä solukalvon eheyttä kuvaavaa neutraalipunaa sisäaivotto-testiä (NRU) sekä mitokondrioiden aktiivisuutta kuvaavaa WST (water-soluble tetrazolium salt) -1 –testiä. Muodostuneen värin intensiteettiä (absorbanssi) mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 450 nm. Molemmista testeistä mitattu absorbanssi on suoraan verrannollinen elävien solujen määrään. (Kuva 2)

Sytokiinien määrittäminen

Osasta huurrevesinäytteistä tutkittiin niiden vaikutus pro-inflammatoristen (mm. IL-1 beta, IL-12, IL-18, TNF-alpha, IFN-gamma) ja anti-inflammatoristen (mm. IL-4 ja IL-12), sekä mm. astmaan

Tulosten analysointi ja sisäilman haitallisuuden luokittelu

Tulokset laskettiin kuolleiden solujen prosentuaalisena osuutena kontrolliin (verrokki, jossa solut oli käsitelty puhtaalla vedellä) verrattuna. Tulokset laskettiin ja analysoitiin vain siinä tapauksessa, että ne läpäisivät testille asetetut tekniset hyväksymiskriteerit. Lisäksi näyte luokiteltiin toksiseksi vain mikäli näytteellä käsitellyn solujen elävyys erosi tilastollisesti merkittävästi kontrollista.

TULOKSET

Tutkittuista solutyypeistä THP-1 makrofaagit osoittautuivat herkkimiksi. THP-1-makrofagisolulla tehtävä WST-1 –testi ja 24 tunnin altistusaika vakintuikin rutiinistestiksi sillä testattiin kaikki 1161 näytettä. Näistä toksisia oli yli puolet, 639 näytettä. Lievästi toksisia näytteitä oli 185, kohtalaisesti toksisia 384 ja huomattavan toksisia 29.

Kuvan 3 taulukkoon on koottu tulokset 24 huurrevesinäytteestä, jotka olivat kaikki kohteista, joissa ihmiset kertomansa mukaan oireilivat. Näistä 24 näytteestä 21 oli toksisia makrofageille. Fibroblasteille oli toksisia 3-6, käytetystä testistä riippuen. Makrofageille toksista näytteistä 19 aiheutti tulehdusreaktioihin liittyvien sytokiinin aktivoitumista. Muutama näyte indusoi astmaan liittyvien sytokiinin, IL-4 ja IL-5, eritystä. IL-4:n eritysmiseen liittyi myös monosyyttien liikkasvu, ns. monosytoosi.

Monosytoosi (monosyyttien liikkasvu) esiintyi varsin yleisesti. Kuvan 4 taulukossa on esitetty 6 tilannetta, joissa huurre-

YHTEENVETO

Huurrevesinäytteiden toksisuuden tutkiminen makrofageilla on osoittautunut toimivaksi ja toistettavaksi menetelmäksi, jolla voidaan osoittaa sisäilman myrkyllisyys verrattuna puhtaaseen veteen. Menetelmä on lupaava työkalu sisäilmatutkimuksiin.

Edullisuutensa takia sillä voi olla potentiaalia laajoihin sisäilman laadun selvityksiin isoissa kohteissa. Näin se voisi täydentää ja monipuolistaa nykyistä sisäilmatutkimusta.

FICAM on yhteistyössä SEA Oy:n kanssa kehittänyt nopean testin, jonka avulla voidaan testata sisäilman haitallisuus ihmisluissa. Testi mittaa sisäilman kokonaishaitallisuutta erottelamatta ongelman aiheuttajaa. Tuloksen pohjalta voidaan arvioida pitääkö lisämäärityksiä suorittaa ongelman aiheuttajan löytymiseksi.

Näytteenotto paikalta mitattiin lämpötila (T) ja ilman suhteellinen kosteus (RH%). Lämpötila vaihteli välillä 21.00±2.00°C ja ilman suhteellinen kosteus välillä 39±13%. Kuivalla pakkasäällä näytteitä ei keräty. (Ilman suhteellisen kosteuden ollessa alhainen, useat epäorgaaniset aineet ovat kiteisessä muodossa. Tällöin niiden vesipitoisuus on pieni (tai olematon), eivätkä ne kulkeudu ilman kosteuden mukana kerääjään.)

Näytteiden testaus tapahtui noin viikon sisällä näytteen keruusta.

sia aikoja; 1, 3, 24 ja 48 h. Altistuksen jälkeen solujen elävyys mitattiin käyttämällä solukalvon eheyttä kuvaavaa neutraalipunaa sisäaivotto-testiä (NRU) sekä mitokondrioiden aktiivisuutta kuvaavaa WST (water-soluble tetrazolium salt) -1 –testiä. Muodostuneen värin intensiteettiä (absorbanssi) mitattiin spektrofotometrisesti aallonpituudella 450 nm. Molemmista testeistä mitattu absorbanssi on suoraan verrannollinen elävien solujen määrään. (Kuva 2)

Testissä oli aina mukana myös puhdas vesinäyte, joka toimii verrokina. Positiivisina kontrollina käytettiin dinitroklorobentseeniä (DNCB), nikkeli II sulfaattia (positiiviset kontrollit myös OECD 442E:ssä), trikloaania sekä SDS:ää. Lisäksi kohteista tutkittiin myös ulkoilmänäytteitä. Joskus sisäilmasta mitattu toksisuus oli selitettävissä ulkoilman toksisuudella (esim. kohteen lähellä oli runsaasti liikennettä). Tavallisimmin ulkoilmänäytteet eivät kuitenkaan olleet toksisia puhtaaseen veteen verrattuna.

yhdistetty sytokiini IL-5:n eritykseen. Sytokiinit mitattiin 24-tunnin huurrevesialtistuksen jälkeen makrofagien kasvatusmediusta käyttäen ProcartaPlexin Cytokine Panel 11plexiä.

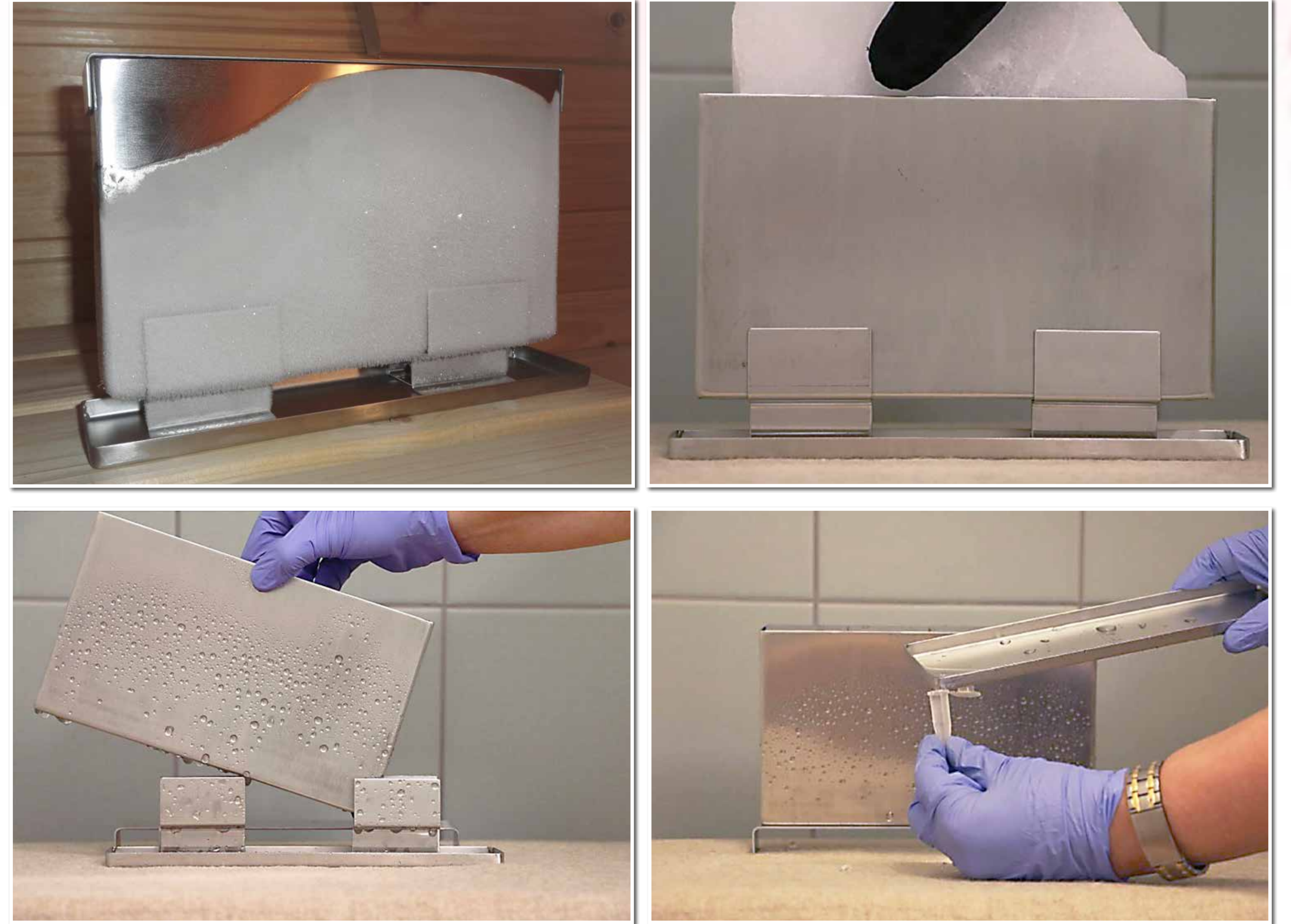
Mikäli sisäilmanäyte oli haitallinen ihmisluille, haitallisuus luokiteltiin seuraavasti:

Lievä toksisuus: alle 5 % soluista on kuollut
Kohtalainen toksisuus: 5-15 % soluista on kuollut
Huomattava toksisuus: yli 15 % soluista on kuollut

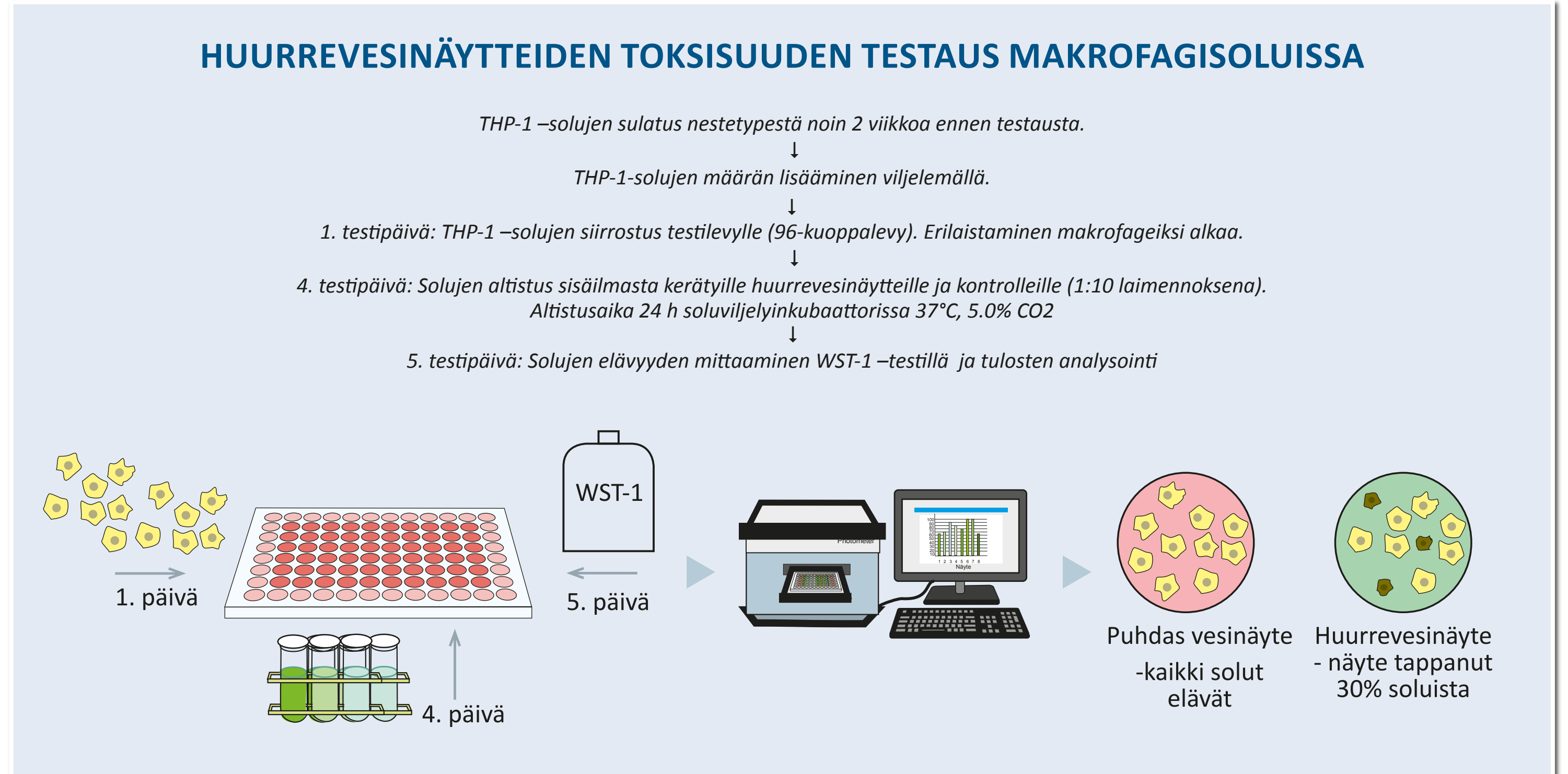
vesinäyte aiheutti monosytoosia, mutta ei vaikuttanut makrofagien elävyyteen tai oli niille toksinen (väheni elävien solujen määrää). Monosytoosi tarkoittaa usein immunologista aktivoitumista ja liittyy elimistön ”hälytystilaan”. Käyttämällä THP-1 monosyyttejä ja makrofageja yhdessä saatettaisiin tunnistaa huono sisäilma vielä herkemmin kuin käyttämällä pelkästään THP-1 -makrofageja.

Osasta THP-1 –makrofageilla ja WST-1 –testillä testatuista näytteistä (72 kpl) kuului hankkeeseen, jossa tutkittiin siivouksen vaikutusta sisäilman laatuun kolmessa pääkaupunkiseudun koulussa/lastentarhassa keräämällä kustakin koulusta 8 eri huurrevesinäytettä muutamien kuukausien välein. Aluksi tiloja siivottiin normaalisti ja sitten siirryttiin vesisiivouksen kautta ohjeiden mukaiseen, maltillisempaan siivousaineiden annosteluun. Sisäilmanäytteiden toksisuus väheni huomattavasti siivouskäytön muuttamisen myötä. (Kuva 5)

Tulokset sytokiini tuotannon kiihtymisestä, monosytoosista ja makrofagien toksisuudesta, sekä näiden yhteydestä toisiinsa ovat vasta alustavia, samoin kuin se kuinka niitä voitaisiin hyödyntää sisäilman laadun ja sen mahdollisten terveysriskien arvioinnissa. Voidaan kuitenkin todeta, että tämä tutkimus on antanut viitteitä ihmislupojen biologisten testien potentiaalista tunnistaa sisäilmaan liittyviä riskejä ja niiden mahdollisia terveysvaikutuksia.



Kuva 1: Huurrevesinäytteen keruu tapahtuu standardoidusti E-keräimellä. E-keräin jäädytetään hiilihappojään avulla. Sisäilman vesimolekyylit härmistyvät keräjänpintaan. Huurre sulatetaan vedeksi, joka kerätään talteen analysointia varten.



Kuva 2: Huurrevesinäytteen testaus THP-1 makrofageilla käyttäen WST-1 –testiä.

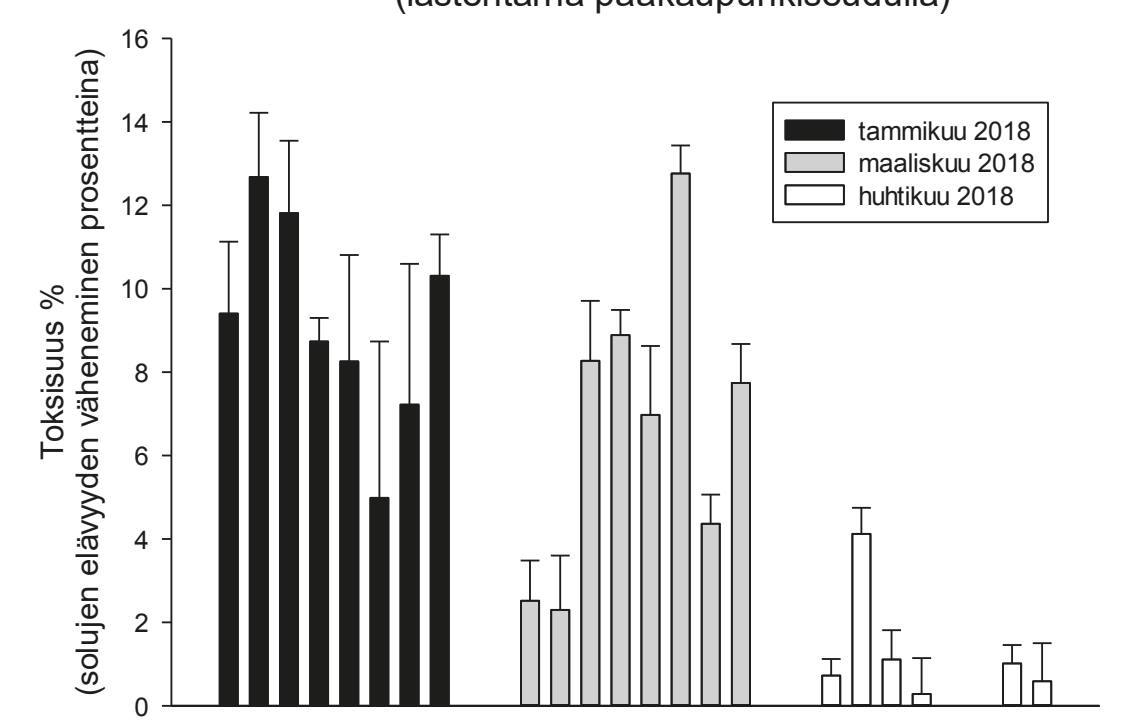
Näytteen koodi	BJ fibroblastit NRU -testi	BJ fibroblastit WST-1 -testi	THP-1 makrofagit WST-1-testi	THP-1 monosyytit WST-1-testi	Sytokiinien tuotanto
328/1	Ei	Ei	Huomattava		IL-1 beta, TNF-alpha, IL-12 ↑
328/2	Ei	Ei	Kohtalainen		TNF-alpha, IFN gamma, IL-12 ↑
329/1	Ei	Ei	Kohtalainen		IL-1 beta, TNF-alpha ↑
329/2	Ei	Ei	Kohtalainen		IL-1 beta, TNF-alpha ↑
330/1	Ei	Ei	Ei		Ei vaikutusta
330/2	Ei	Ei	Ei		IL-1 beta, TNF-alpha ↑
330/3	Ei	Ei	Kohtalainen		IFN gamma, IL-12 ↑
330/4	Ei	Ei	Kohtalainen		IL-1 beta, IFN gamma ↑
330/5	Ei	Ei	Kohtalainen		Ei vaikutusta
330/6	Ei	Ei	Kohtalainen		IL-1 beta, IFN gamma ↑
332/1	Ei	Ei	Lievä		IL-1 beta ↑
332/2	Ei	Ei	Lievä		IL-1 beta ↑
338/1	Ei	Ei	Kohtalainen	Ei	IL-1 beta ↑
338/2	Ei	Ei	Kohtalainen	Monosytoosi?	IL-1 beta, TNF-alpha, IFN gamma, IL-12, IL-4 ↑
338/3	Ei	Kohtalainen	Kohtalainen	Ei	Ei vaikutusta
341/1	Ei	Ei	Kohtalainen	Kohtalainen	IL-1 beta ↑
341/2	Kohtalainen	Ei	Kohtalainen	Kohtalainen	IL-12, IFN-gamma ↑
341/3	Kohtalainen	Lievä	Lievä	Kohtalainen	TNF-alpha, IFN gamma ↑
341/4	Ei	Lievä	Lievä	Ei	IL-1 beta, TNF-alpha, IL-18, IFN gamma, IL-12, IL-5 ↑
341/5	Kohtalainen	Ei	Kohtalainen	Ei	IL-1 beta, TNF-alpha ↑
341/6	Ei	Lievä	Ei	Ei	Ei vaikutusta
342/1	Ei	Lievä	Kohtalainen	Kohtalainen	IL-1 beta, TNF-alpha ↑
342/2	Ei	Lievä	Lievä	Kohtalainen	IL-1 beta, TNF-alpha ↑

Kuva 3: Huurrevesinäytteiden toksisuus testattuna eri solutyypeillä käyttäen eri solutoksisuustestejä (WST-1 tai NRU), sekä huurrevesinäytteiden indusoima sytokiinin tuotanto. Ei=e toksisuutta; Lievä (toksisuus)=soluista kuolee alle 5%; Kohtalainen (toksisuus)=soluista kuolee 5-15%; huomattava (toksisuus)=soluista kuolee yli 15%

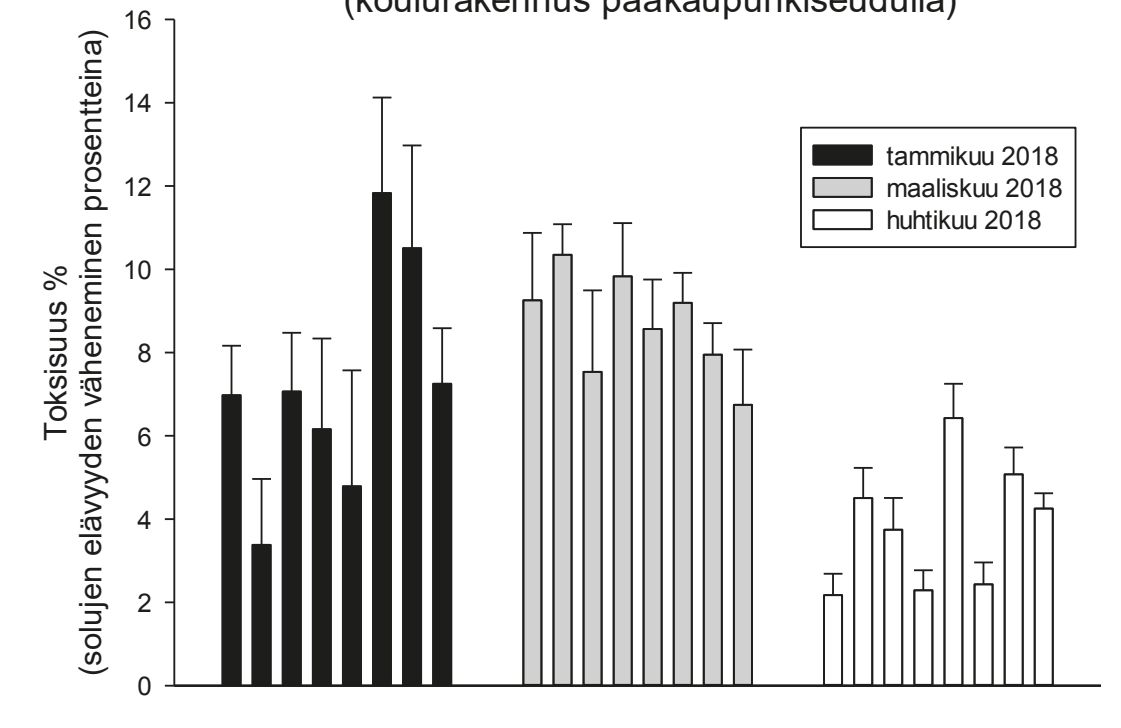
THP-1 makrofagit	THP-1 monosyytit	Kuvaus näytteenotto paikasta
Lievä toksisuus <5%	Solujen poikkeava lisääntyminen 5.20%	Juuri remontoitu kohde, halutaan selvittää remonttimateriaalien vaikutussisäilmaan
Kohtalainen toksisuus 5-15%	Solujen poikkeava lisääntyminen 5.10%	Tilassa takkapuita
Kohtalainen toksisuus 5-15%	Solujen poikkeava lisääntyminen 3.50%	Lapsset ovat sairastuneet
Ei toksinen	Solujen poikkeava lisääntyminen 6.00%	Oireilu
Ei toksinen	Solujen poikkeava lisääntyminen 6.50%	Oireilu, mustia pilkkuja seinässä
Lievä toksisuus <5%	Solujen poikkeava lisääntyminen 6.50%	Tunkkainen ilma

Kuva 4: Makrofagien ja monosyyttien erilaiset vastheet huurrevesinäytteisiin.

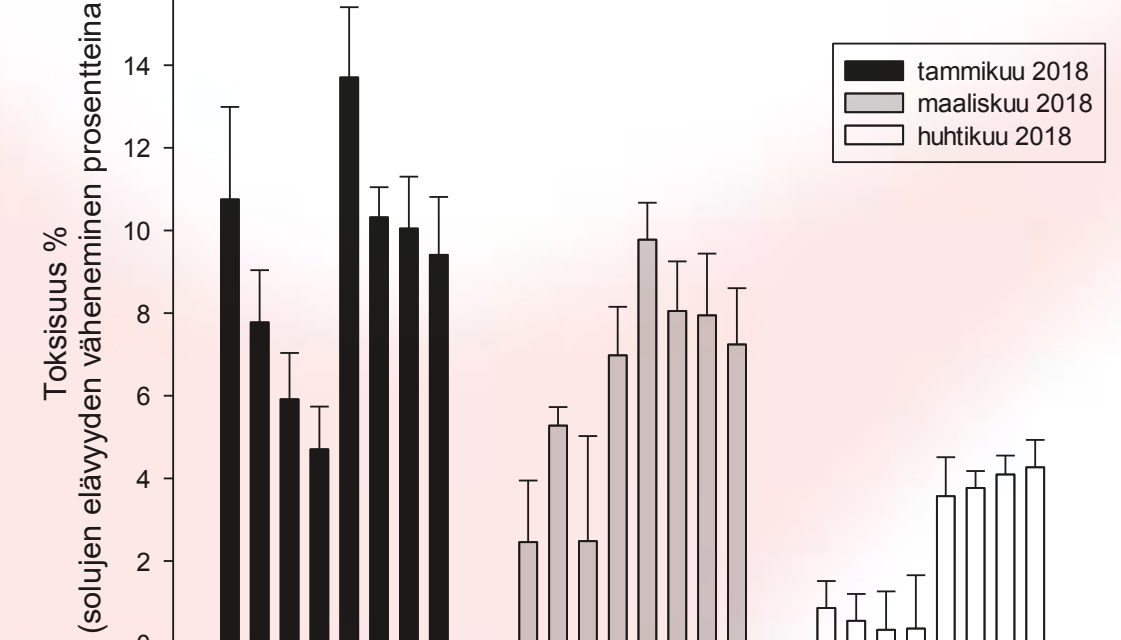
Sivouksen vaikutus sisäilman myrkyllisyyteen (lastentarha pääkaupunkiseudulla)



Sivouksen vaikutus sisäilman myrkyllisyyteen (koulurakennus pääkaupunkiseudulla)



Sivouksen vaikutus sisäilman myrkyllisyyteen (koulurakennus pääkaupunkiseudulla)



Kuva 5: Sivouksen vaikutus sisäilman toksisuuteen. Tiloja siivottiin aluksi normaalisti. Sitten siivousmenetelmää muutettiin siten, että käytettyjen siivousaineiden määrä väheni. Samalla väheni sisäilman toksisuus.

¹THP-1-soluja käytetään myös viranomaisten hyväksymässä ihoherkistävyydestä OECD Test No. 442E: In Vitro Skin Sensitisation. In series: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: Health Effects.