

MIKROBITOKSIINIALTISTUS MOLEKYYLITASOLLA JA YHTEISVAIKUTUKSET MUIDEN HOMEALTISTEIDEN KANSSA

Merja Korkalainen¹, Jorma Mäki-Paakkanen¹, Martin Täubel¹, Pirkka Kirjavainen¹, Arto Koistinen², Anne Hyvärinen¹, Hannu Komulainen¹, Matti Viluksela^{1,3}

¹Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, Terveyden suojelu, Kuopio

²Itä-Suomen yliopisto, SIB Labs, Kuopio

³Itä-Suomen yliopisto Ympäristötieteen laitos, Kuopio

TIIVISTELMÄ

Tutkimuksessa selvitettiin, miten erilaiset kosteusvauriorakennusten altisteet pieninäkin pitoisuuksina aiheuttivat vasteita solumalleissa ja mitkä olivat keskeisimmät vaikuttavat komponentit – mikrobiksiinit, homeiden ja bakteerien rakenneosat vai nämä yhdessä. Tutkittaviksi valittiin suomalaisissa kosteusvauriorakennuksissa yleisimmin esiintyviä toksineita, joilla altistettiin ihmisen monosyyttisolulinjasta erilaistettuja makrofageja ja hiiren makrofagisoluja yksittäin tai yhdessä mikrobien rakenneosien kanssa. Tuloksista havaittiin, että toksiinien yksin aiheuttamat tulehdusvasteet olivat huomattavasti pienempiä verrattuna yhteiskäsittelyjen aikaansaamiin vasteisiin. Tulokset osoittavat, että tutkitut hometaloaltisteet voivat voimistaa toistensa vaikutuksia, millä saattaa olla merkitystä niiden aiheuttamien terveyshaittojen syntymisessä.

TAUSTA

Sisäilman laadulla on keskeinen merkitys ihmisen terveyteen. Merkittävä sisäilman laatuun vaikuttava tekijä on rakennuksen kosteus ja siitä johtuva homeen (homesienet, bakteerit ja muut mikro-organismit) kasvu /1/2/. On osoitettu, että asuminen tai työskentely kosteusvauriorakennuksessa lisää astman, hengitystie-, silmä- ja iho-oireiden, toistuvien tulehdusten ja monien autoimmuunisairauksien riskiä /2/3/4/. Jopa 800 000 suomalaisen arvioidaan päivittäin altistuvan kosteus- ja homevaurioiden aiheuttamille sisäilman epäpuhtauksille joko kodeissa, työpaikoilla, kouluissa tai päiväkodeissa /5/.

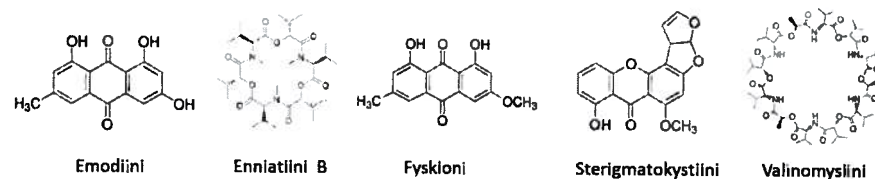
Hometalomikrobien toksisuus on todettu sekä epidemiologisissa että kokeellisissa tutkimuksissa /1/2/. Koe-eläintutkimuksissa hometalojen mikrobialtistuksen on todettu vaikuttavan hengityselimiin ja aiheuttavan tulehdusta ja systeemistä immunotoksisuutta. *In vitro* -kokeissa kyseiset mikrobit vaikuttavat sytokiinituotantoon ja aiheuttavat solutoksisuutta ja ohjelmoitua solukuolemaa mm. makrofagi- ja hengitystiesoluissa. Syy-seuraussuhteen mekanismeista hometaloaltistuksen ja siitä johtuvien terveyshaittojen välillä ei ole pystytty osoittamaan. Erityisen vähän tutkimustietoa on altisteiden yhteisvaikutuksista, mutta myös yksittäisten toksiinien toksisuusprofiilit tunnetaan huonosti.

Tässä tutkimuksessa selvitetään hometaloaltisteiden aiheuttamia vasteita molekyyli- ja solutasolla. Ihmisen monosyyttisolulinjasta erilaistettuja makrofageja ja hiiren makrofageja altistetaan homeiden ja bakteerien tuottamille toksineille sekä mikrobien soluseinien aktiivisille rakenneosille, β -glukaanille ja endotoksiini lipopolysakkaridille (LPS). Näiden toksiinien ja rakennekomponenttien vaikutuksia solujen elinkykyyn, tulehdusvasteisiin liittyviin sytokiineihin ja perimävaurioihin tutkitaan yksittäin ja yhteisaltistusten jälkeen.

MENETELMÄT

Toksiinit ja mikrobin rakenneosat

Tutkittavat toksiinit valittiin siten, että ne edustavat rakenteeltaan ja ominaisuuksiltaan erilaisia kosteusvauriorakennuksissa esiintyviä mikrobeja/homeiöitä (kuva 1). Nämä valitut toksiinit ovat myös niitä, jotka esiintyvät yleisimmin kosteusvauriorakennuksista kerätyissä näytteissä Suomessa ja muualla Euroopassa /6/7/. Emodiini, enniatiini B, fyskioni ja sterigmatokystiini ovat homeiden tuottamia toksiineita, kun taas valinomysiini on bakteeritoksiini.



Kuva 1. Tutkimuksessa käytettyjen mallitoksiinien rakenteet.

Endotoksiinit, joiden malliaine tässä tutkimuksessa oli lipopolysakkaridi (LPS), ovat gram-negatiivisten bakteerien ulkomembraanin pääasiallisimpia rakennekomponentteja ja sisä-ilmassa ne esiintyvät tavallisesti liittyneinä pölypartikkeleihin ja ilman aerosoleihin. LPS:n tiedetään aiheuttavan voimakkaan immuunivasteen normaaleissa nisäkkösoluissa. β -D-glukaanit, joiden malliaine tässä tutkimuksessa oli curdlan, esiintyvät lähes kaikkien home-sientien ja joidenkin bakteerien soluseinän pääasiallisimpana rakennekomponenttina. Niillä on monenlaisia immuunijärjestelmää aktivoivia vaikutuksia.

Altistusmalli

Tutkimuksessa käytettiin ihmisen monosyyttisolulinjaa THP-1 ja hiiren makrofagisolulinjaa RAW264.7 (American Type Culture Collection). Soluja kasvatettiin standardoituissa olosuhteissa soluviljelymediumeissa, joihin oli lisätty fetaaliseerumia ja antibiootteja sekä humaanisoluille myös glutamiinia ja merkaptotetanolia. Altistusta varten solut jaettiin kuoppalevyille tiettyyn tiheyteen. Ennen altistuksen aloittamista THP-1 -solut erilaistettiin makrofageiksi 48 h ajan, jonka jälkeen soluille vaihdettiin altistusmedium. Altistusmedium sisälsi joko yksittäisiä toksiineita, LPS:ää tai curdlania tai näiden yhdistelmiä. Toksiinit olivat liuotettuina DMSO:hon, joten soluja altistettiin myös pelkälle 0.1 % DMSO:lle taustan kontrolloimiseksi. Kaikille altisteille määritettiin ensin aika- ja annosvasteet, joiden perusteella valittiin myöhemmin käytetyt altistusajat ja pitoisuudet.

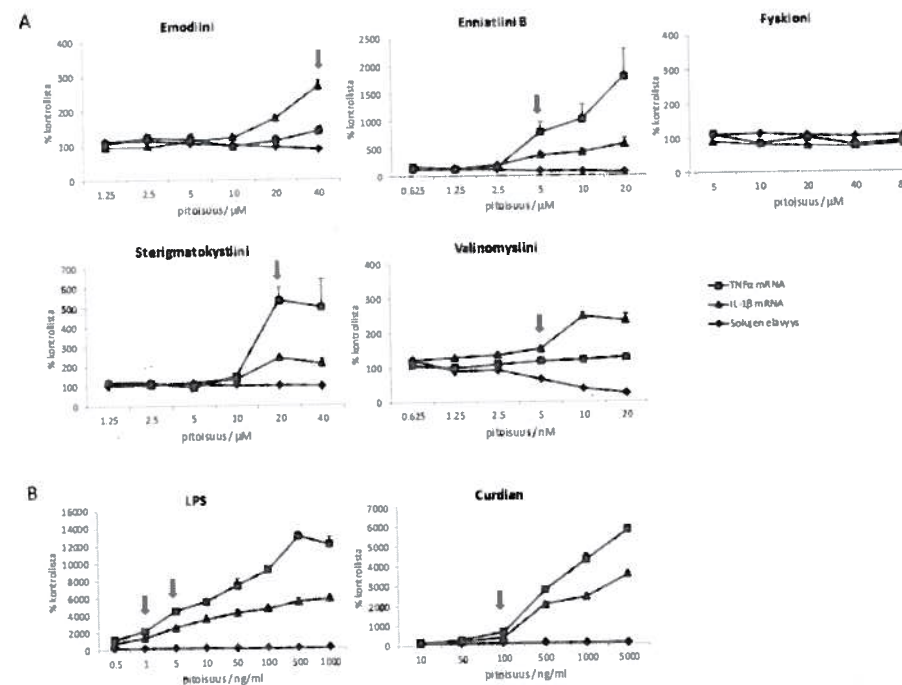
Analyysit

Toksiinien sytotoksista vaikutuksia solujen elävyyteen tutkittiin WST1-testillä (Roche). Tulehdusta käynnistävien sytokiinien (TNF α ja Il-1 β) erittymistä soluista määritettiin käyttämällä kaupallisia ELISA-sytokiinikiteitä (R&D Systems). Geeniekspressiomääritykset tehtiin kvantitatiivisella RT-PCR-menetelmällä. Komeetatestiä käytettiin genotoksisten vaikutusten selvittämiseen. Altistettujen solujen kuvaukset tehtiin pyyhkäisy- ja läpäisyelektronimikroskopiolla (Sigma HDVP scanning electron microscope, Carl Zeiss ja JEM-2100F transmission electron microscope, Jeol).

TULOKSET

Kaikille tutkittaville toksiineille samoin kuin LPS:lle ja curdlanille määritettiin ensin aika- ja annosvasteet sytotoksisuudelle sekä tulehdusvasteita käynnistävien geenien TNF α ja Il-1 β ilmentymiselle. Annosvasteista (kuva 2) havaitaan, että tutkittavista toksiineista

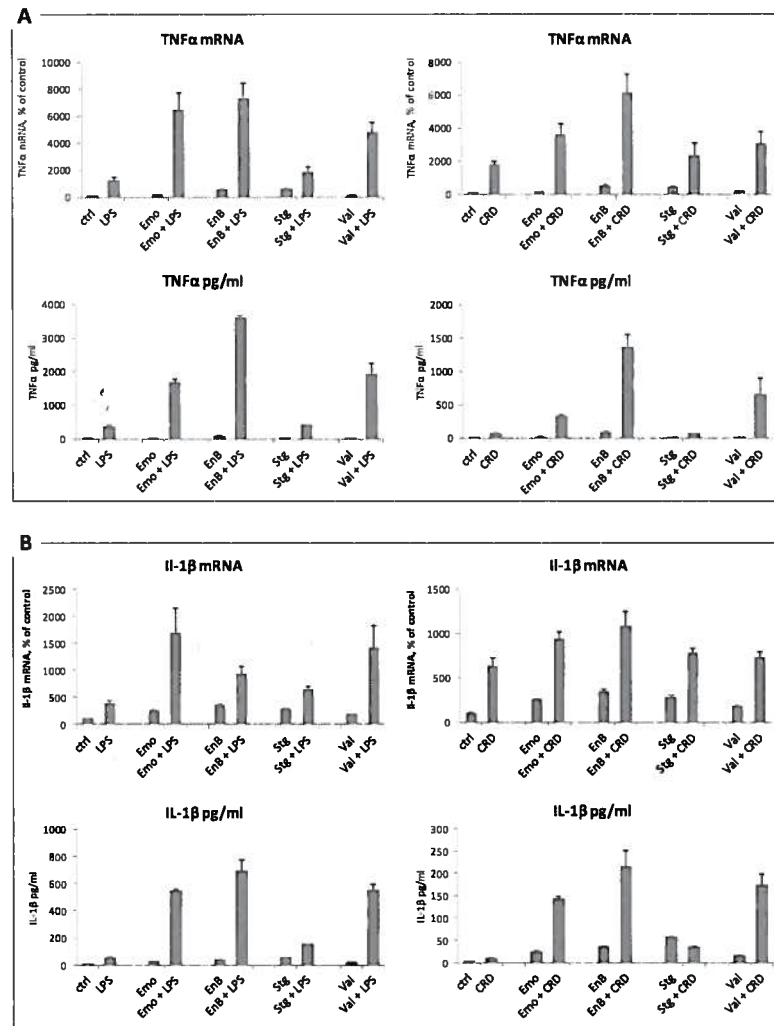
voimakkaimmat vasteet TNF α :n ja Il-1 β :n mRNA-tasoihin aiheuttivat ionoforiset toksiinit enniatiini B ja valinomysiini (valinomysiiniä tutkittiin nanomolaarisina pitoisuuksina, kun muiden toksiinien pitoisuudet olivat mikromolaarisia). Nämä samat toksiinit olivat myös sytotoksisempia kuin muut. Tutkittavista toksiineista ainoastaan fyskioni ei aiheuttanut mitään sytokiini- tai sytotoksisista vastetta. Toksiineihin verrattuna curdlan ja LPS aiheuttivat huomattavasti suuremmat sytokiinivasteet, mutta solujen elävyyteen niillä ei ollut juurikaan vaikutusta edes suurimmilla pitoisuuksilla. Annosvastekeiden perusteella valittiin pitoisuudet, joita käytettiin yhteisaltistuskokeissa. Toksiineista valittiin sellaiset pitoisuudet, jotka aiheuttivat tulehdusvasteen, mutta eivät olleet liian toksisia soluille. Curdlanista ja LPS:stä valittiin alhaisimmat tulehdusvasteen herättävät pitoisuudet, jotta toksiinien vaikutus ei jäisi niiden voimakkaan vaikutuksen alle.



Kuva 2. A. Toksiinien annosvasteet mitattuina 3 h altistuksen jälkeen makrofageiksi erilaistetuissa THP-1 -soluissa. Tulokset on yhdistetty kahdesta tai kolmesta erillisestä kokeesta, joissa solujen elävyyksikokeissa oli 6 rinnakkaista ja geeniekspressiokokeissa 3 rinnakkaista näytettä. B. LPS:n ja curdlanin annosvasteet mitattuina 3 h altistuksen jälkeen. Kuviin on merkitty nuolilla ne pitoisuudet, jotka valittiin käytettäväksi yhteisaltistuksissa.

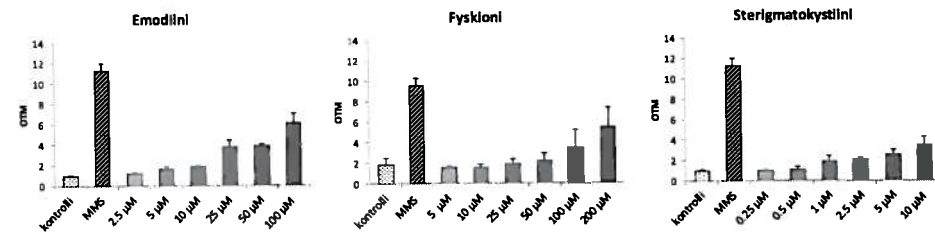
Toksiineilla altistetuista soluista määritettiin myös TNF α - ja Il-1 β -sytokiinien erittymistä soluista, mutta annosvasteita ei saatu määritettyä, koska sytokiinien määrät olivat enimmäkseen liian pieniä mitattaviksi. Sytokiinien tuotto lisääntyi mitattaviin määriin vasta, kun soluja altistettiin yhdessä toksiinien sekä curdlanin ja LPS:n kanssa (kuva 3). LPS:n kanssa emodiinilla, enniatiini B:llä ja valinomysiinillä oli selviä synergistisiä vaikutuksia, koska yhteisvaikutus oli suurempi kuin yksittäisten altisteiden yhteenlaskettu summa. Tämä todettiin sekä geeni- että proteiinitasolla. Curdlanin kanssa samantyyppisiä

vaikutuksia nähtiin vain TNF α :n ilmentymisessä (kuva 3A); IL-1 β :n kohdalla vaikutukset olivat vain additiivisia (kuva 3B). Sterigmatokystiini yhdessä mikrobin rakenneosien kanssa ei aiheuttanut voimistuneita vasteita, eikä niitä havaittu myöskään sytotoksisuusmäärittelyissä millään yhteisaltistuksilla.



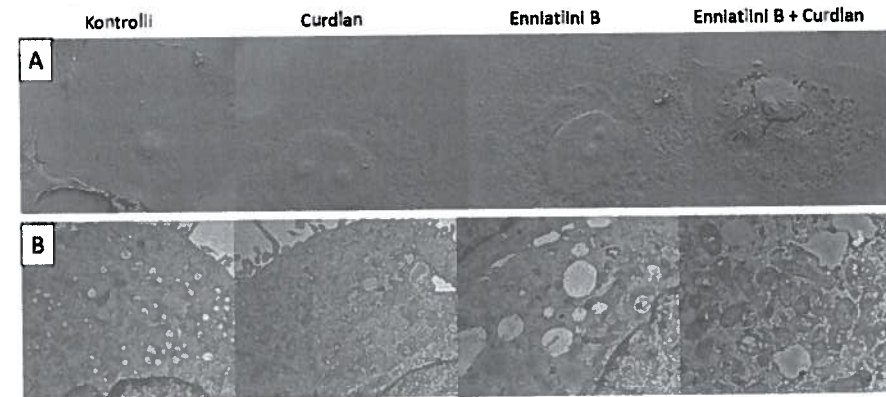
Kuva 3. Toksiinien ja mikrobin rakenneosien yhteiskäsittelyjen vaikutukset proinflammatoristen sytokiinien TNF α (A) ja IL-1 β (B) mRNA:n ilmentymiseen ja vastaavien sytokiinien tuottoon. mRNA-tasot on mitattu 3 h ja sytokiinien tuotto 24 h altistuksen jälkeen makrofageiksi erilaistetuista THP-1 -soluista. Tulokset ovat keskiarvoja 2-6 toistokokeesta, joissa jokaisessa oli 3 rinnakkaista näytettä.

Perimään kohdistuvia annosvasteisia, komeattatestillä havaittuja muutoksia todettiin emodiinilla, fyskionilla ja sterigmatokystiinillä (kuva 4). Lopullisia tuloksia yhteisaltistuksista, joita on tehty LPS:n kanssa, ei vielä ole saatavissa.



Kuva 4. Emodiinin, fyskionin ja sterigmatokystiinin komeattavasteet RAW264.7-soluissa 3 h altistuksen jälkeen. Positiivisena kontrollina oli metyylimetaanisulfonaatti (MMS) 15 μ g/ml ja negatiivisena kasvatusmedium, jossa DMSO:ta 0.1 %. Tulokset ovat keskiarvoja kolmesta erillisestä kokeesta.

Pyyhkäisy- ja läpäisyelektronimikroskooppikuviin valittiin esimerkkitoiksi enniatiini B, jolla näyttää olevan vaikutuksia niin aktiivisten makrofagien pintaan kuin myös solun sisärakenteisiin (kuva 5). Enniatiini B:llä altistetun solun pintaan oli muodostunut reikiä (kuva 5A), mikä johtunee sen ionoforisista ominaisuuksista. Solun sisällä enniatiini B aiheutti lysosomien turpoamista ja tummenemista (kuva 5B), kuten hiiren makrofageilla on aiemmin raportoitu /8/. Yhteiskäsittely curdlanin kanssa voimisti näitä vaikutuksia.



Kuva 5. Pyyhkäisy- (A) ja läpäisyelektronimikroskooppikuvat (B) enniatiini B:llä ja curdlanilla altistetuista makrofageiksi erilaistetuista THP-1 -soluista (5000X-suurennus).

JOHTOPÄÄTÖKSET

Tuloksista havaitaan, että yksittäiset mallitoksiinit eivät aiheuttaneet suuria vasteita tulehdusta käynnistävien sytokiinien ilmenemiseen geenitasolla. Vastaavasti samojen sytokiinien tuotto yksin toksiineilla altistetuista makrofageista oli erittäin vähäistä, useimmiten jopa alle mittausrajojen. Näiden suomalaisissa kosteusvauriorakennuksissa yleisesti esiintyvien toksiinien suorat vaikutukset tulehdusvasteita käynnistävien sytokiinien ilmenemiseen näyttävät siten olevan vähäisiä. Tilanne muuttuu kuitenkin huomattavasti, kun toksiinialtistus tehdään yhdessä mikrobin aktiivisten rakenneosien kanssa. Yhteisvaikutus alhaisilla curdlan- ja LPS-pitoisuuksilla niin geeni- kuin proteiinitasolla oli suurempi kuin yksittäisten altisteiden yhteenlaskettu vaste. Näitä synergistisiä vaikutuksia havaittiin emodiinilla, enniatiini B:llä ja valinomysiinillä. Samantyyppisiä yhteisvaikutuksia curdlanin ja LPS:n kanssa on aikaisemmin raportoitu joillakin

toksiineilla ja mikrobeilla /9/10/ , mutta ei tässä tutkimuksessa käytetyillä, suomalaisissa kosteusvauriorakennuksissa yleisesti esiintyvillä toksiineilla.

Tulokset osoittavat, että tutkitut homealga- ja homebakteerit voivat voimistaa toistensa vaikutuksia, millä saattaa olla merkitystä niiden aiheuttamien terveyshaittojen synnyssä.

KIITOKSET

Arja Moilanen ja Arja Kinnunen ansaitsevat kiitokset erinomaisesti suoritetuista laboratoriotöistä.

LÄHDELUETTELO

1. IOM (Institute of Medicine) (2004) Damp Indoor Spaces and Health. National Academy of Science Press, Washington D.C.
2. WHO Regional Office for Europe (2009) WHO guidelines for indoor air quality: dampness and mould. Copenhagen, WHO Regional Office for Europe.
3. Kanchongkittiphon W, Mendell MJ, Gaffin JM, Wang G, Phipatanakul W. (2015) Indoor Environmental Exposures and Exacerbation of Asthma: An Update to the 2000 Review by the Institute of Medicine. *Environ. Health Perspect.* 123: 6-20.
4. Mendel M, Mirer A, Cheung K, Tong M, Douwes J. (2011) Respiratory and Allergic Health Effects of Dampness, Mold, and Dampness-Related Agents: A Review of the Epidemiologic Evidence *Environ. Health Perspect.* 119: 748-756.
5. Eduskunnan tarkastusvaliokunta, mietintö 1/2013, Rakennusten kosteus- ja homeongelmat.
6. Täubel M, Sulyok M, Vishwanath V, Bloom E, Turunen M, Järvi K, Kauhanen E, Krska R, Hyvärinen A, Larsson L, Nevalainen A. (2011) Co-occurrence of toxic bacterial and fungal secondary metabolites in moisture-damaged indoor environments. *Indoor Air* 21: 368-75.
7. Peitzsch M, Sulyok M, Täubel M, Vishwanath V, Krop E, Borràs-Santos A, Hyvärinen A, Nevalainen A, Krska R, Larsson L. (2012) Microbial secondary metabolites in school buildings inspected for moisture damage in Finland, The Netherlands and Spain. *J. Environ. Monit.* 14: 2044-2053.
8. Gammelsrud A, Solhaug A, Dendelé B, Sandberg WJ, Ivanova L, Kocbach Bølling A, Lagadic-Gossmann D, Refsnes M, Becher R, Eriksen G, Holme JA (2012) Enniatin B-induced cell death and inflammatory responses in RAW 267.4 murine macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 261: 74-87.
9. Huttunen K, Pelkonen J, Nielsen KF, Nuutinen U, Jussila J, Hirvonen MR. (2004) Synergistic interaction in simultaneous exposure to *Streptomyces californicus* and *Stachybotrys chartarum*. *Env. Health Perspect.* 112: 659-665.
10. Kankkunen P, Rintahaka J, Aalto A, Leino M, Majuri ML, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (2009) Trichothecene mycotoxins activate inflammatory response in human macrophages. *J. Immunol.* 182: 6418-6425.