



Työterveyslaitos | Arbetshälsoinstitutet
Finnish Institute of Occupational Health

Kosteusvaurio-oireilun merkkiaineet

DIAGNOSTISTEN MERKKIAINEIDEN KARTOITUS
KOSTEUSVAURIOPOTILAIDEN LIMAKALVOILTA
SYSTEEMIBIOLOGIAN KEINAIN

Raportin laatijat: Maili Lehto, Jukka Sund ja Harri Alenius

Tutkimusryhmä: Maili Lehto, Dario Greco, Jukka Sund, Paula Pallasaho, Hille Suojalehto, Kirsi Karvala, Petri Auvinen, Kati Järvi, Martin Täubel, Juha Pekkanen, Anne Hyvärinen, Harri Alenius



Kosteusvaurio-oireilun merkkiaineet

DIAGNOSTISTEN MERKKIAINEIDEN KARTOITUS
KOSTEUSVAURIOPOTILAIDEN LIMAKALVOILTA SYSTEEMIBIOLOGIAN
KEINOIN

LOPPURAPORTTI TYÖSUOJELURAHASTON HANKKEESTA 112260

Raportin laatijat: Maili Lehto, Jukka Sund, Harri Alenius

Tutkimusryhmä: Maili Lehto¹, Dario Greco¹, Jukka Sund¹, Paula Pallasaho¹,
Hille Suojalehto¹, Kirsi Karvala¹, Petri Auvinen², Kati Järvi³, Martin Täubel³,
Juha Pekkanen³, Anne Hyvärinen³, Harri Alenius¹

¹Työterveyslaitos, Helsinki

²Bioteekniikan Instituutti, Helsinki

³Terveyden ja Hyvinvoinnin laitos, Kuopio

Helsinki ja Kuopio



Työterveyslaitos

Systeemitoksikologia

PL 40

00251 Helsinki

www.ttl.fi

Toimitus: Maili Lehto

Kansi: Ella Smeds

© 2016 Työterveyslaitos ja kirjoittajat

Julkaisu on toteutettu Työsuojelurahaston tuella.

Tämän teoksen osittainenkin kopiointi on tekijänoikeuslain (404/61, siihen myöhemmin tehtyne muutoksineen) mukaisesti kielletty ilman asianmukaista lupaa.

ISBN 978-952-261-640-1 (nid.)

ISBN 978-952-261-639-5 (PDF)

Juvenes Print, Tampere 2016



TIIVISTELMÄ

Rakenteiden kosteusvauriot julkisissa rakennuksissa kuten kouluissa ovat jatkuvasti lisääntyneet Suomessa. Rakennusten korjauskulujen lisäksi kustannuksia aiheuttavat rakennuksissa työskentelevien sairauskulut ja mahdollinen työkyvyn menetys pahimmissa tapauksissa. Ammattitautidiagnostiikkaa varten ei kuitenkaan ole käytettävissä luotettavia biomarkkereita sen selvittämiseksi, mikä osuus kosteusvauriolla on oireilun ilmaantumiseen. Nykyään ammattiaistman diagnoosi voidaan tehdä perustuen PEF (Peak Expiratory Flow)-työpaikkaseurantaan. Kaikki työntekijät eivät kykene tähän luotettavasti ja tutkimukseen liittyy lisäksi merkittäviä herkkyys- ja spesifisyysongelmia. Näin ollen kosteusvaurio-oireiluun liittyvien spesifisten ja herkkien biologisten merkkiaineiden tai merkkiaineprofiilien tunnistaminen oireilevan henkilön verestä tai limakalvoilta olisi ensiarvoisen tärkeää.

Tässä Työsuojelurahaston rahoittamassa tutkimuksessa pyrittiin tunnistamaan kosteusvaurio-oireilun diagnostiikkaan soveltuvia biologisia merkkiaineita käyttäen hyväksi systeemibiologista lähestymistapaa. Koska kosteusvauriokohteissa esiintyy laajalti mikrobikasvustoa, tutkimushypoteesina oli, että kosteusvauriomikrobeille altistuminen aiheuttaisi nenän limakalvon sekä verisolujen tulehdusvälittäjäaineprofiileissa muutoksia. Profiilieroja kosteusvaurioille altistuneiden ja altistumattomien sekä toisaalta oireilevien ja oireettomien kesken voitaisiin sitten hyödyntää diagnostiikkaa parantavien merkkiaineiden tunnistamisessa.

Tutkimukseen osallistui oireilevia ja oireettomia opettajia viidestä kosteusvauriottomasta ja 11 kosteusvaurioituneesta koulusta. Kouluille oli tehty kattavat kuntotarkastukset ennen tutkimuksen aloitusta. Työntekijöiden jako oireilevien ja oireettomien ryhmiiin perustui itseraportointiin, ilman lääkärin vahvistusta. Koulujen opettajilta kerättiin verinäytteiden lisäksi epiteelisolunäytteet nenän ja silmän limakalvoilta sekä nenähuuhtelunäytteet. Nenäepiteelistä ja verisoluista eristetyille RNA-näytteille tehtiin transkriptomiikka-analyysi mikrosirumenetelmällä.

Nenäepiteelisolujen ja veren PBMC transkriptomiikka-analysointi paljasti ainoastaan suhteellisen pieniä tilastollisesti merkittäviä eroja eri geenien ilmentymisessä ja geenimuutosten voimakkuudessa, kun verrattiin kontrolli- ja vauriokoulujen oireettomia ja oireilevia opettajia. Vauriokouluissa ei voitu havaita biologisesti merkittäviksi luokiteltavia eroja oireiluun liittyen, kun taas kontrollikouluissa muutaman geenin ilmentyminen erosi oireettomien ja oireilevien kesken. Kun koulutyyppejä verrattiin keskenään erottelematta tutkimushenkilöitä oireettomiin ja oireileviin, niin monimuuttuja-korjauksen jälkeen ainoa merkittävästi eroava geeni ryhmien välillä oli serotoniini reseptori 7. Tilastollisesti eniten eroavien geenien reaaliaikainen PCR validointi ei kuitenkaan vahvistanut mikrosirutuloksia, minkä vuoksi tulosten käytännön merkitykseen on suhtauduttava varauksella.



Geenimuutosten voimakkuuden ja tilastollisen merkittävyyden pienuus mikrosiruanalyysissä selittyy mahdollisesti sillä, että tutkittava ilmiö ei ole tarpeeksi vahva ja selvärajainen, jotta käytetyllä koeasetelmalla ja tutkimusmenetelmillä olisi löydetty luotettavia kosteusvaurio-oireilulle tyypillisiä biomerkkiaineita. Mahdollisten heikkojen erojen havaitsemiseen olisi ehkä tarvittu suurempia ryhmäkokoja. Ongelmakohtana saattoi olla myös oireilun perustuminen itseraportointiin ja siitä mahdollisesti aiheutuvaan raportointivääristymään eikä lääkärin vahvistamaan tautidiagnoosiin. On myös mahdollista, että oireet olivat kliinisesti sen verran lieviä, että mikrosiruanalytiikan herkkyys ei riitä havaitsemaan luotettavasti heikkoja signaaleja geeniprofilissa.



ABSTRACT

The ever-increasing problem in Finland is moisture damages in homes and public buildings such as schools. They are expensive for the society, since in addition to repair expenses there are also medical expenses and sick leaves or even disabilities of employees. Indeed, reliable biomarkers are needed to resolve, what role moisture damages play in occupational diseases. Nowadays diagnosis of work related asthma can be performed by monitoring PEF (Peak Expiratory Flow) in work places. However, all employees are not able to do it trustworthy. Moreover, there are also remarkable sensitivity and specificity problems related to the method. Therefore, there is an urgent demand for specific and sensitive biological markers or profiles from blood or mucous epithelia of symptomatic subjects exposed to dampness of houses.

The aim of this research, supported by the Finnish Work Environment Fund, was to identify biological markers for diagnosis of symptoms related to moisture damages by using system biological approach. Because there are widely microbial growth in damp buildings, our research hypothesis was that exposure to moisture damages changes profiles of inflammatory mediators in nose mucosa and blood cells. Differences in profiles between exposed and unexposed or symptomatic and non-symptomatic can then be utilized in recognition of markers suitable for better diagnosis.

Both symptomatic and non-symptomatic teachers from five non-damaged schools and from 11 damaged schools participated the study. Conditions of schools were comprehensively inspected before starting the research. Employees' health status (symptomatic or non-symptomatic) was based on self-reporting, without a medical doctor's verification. Blood samples, epithelial cell samples from mucosa of nose and eye as well as nasal lavage fluids were collected from teachers. RNA was isolated from nose epithelial cells and blood cells and used for transcriptomics, analyzed by micro array method.

Transcriptomics of nose epithelial cells and blood PBMC cells revealed only minor statistically significant differences in the expression and fold changes of various genes, when compared symptomatic and non-symptomatic teachers in control schools and damaged schools. In damaged schools there were no biologically significant differences related to symptoms, whereas in control schools the expression of a few genes was different between non-symptomatic and symptomatic subjects. When school types were compared without differentiating according symptom status, the only significantly different gene was serotonin receptor 7 after multivariate correction. Validation of gene expression by real-time RT-PCR did not confirm micro array results, emphasizing that conclusions drawn must be dealt with caution.

Paucity of gene expression changes and statistical significance in micro array analysis can possibly be attributed to that the investigated phenomenon is not strong and clear enough that



the utilized research strategy and used methods are suitable to find biomarkers, which are reliable and typical for symptoms related to moisture damages. It is possible that group sizes should have been greater to detect possible slight differences. One problem might also be that symptom status was based on self-reporting, and not for diagnosis of a medical doctor. This can cause the reporting bias in some cases. It is also possible that symptoms are clinically so mild that sensitivity of micro array analysis is not enough to reliably detect weak signals in gene profiles.

SISÄLLYS

1	Lähtökohta ja taustat.....	3
1.1	Kosteusvaurioihin liittyvä oireilu	3
1.2	Kosteusvauriomikrobit ja niiden vaikutukset immuunijärjestelmään.....	4
1.3	Kosteusvaurio-oireilun diagnostiikkaan liittyviä ongelmia	5
1.4	Systeemibiologian hyödyntäminen biolääketieteessä	5
2	Tavoitteet	7
3	Menetelmät ja toteutus	8
3.1	Tutkimusstrategia	8
3.2	Tutkimusryhmien valintakriteerit.....	8
3.2.1	Tutkimusryhmien jaotteluperusteet	9
3.2.2	Koulujen valintaperusteet.....	9
3.2.3	Tutkittavien henkilöiden oirekyselyt ja kliiniset tiedot	10
3.3	Tutkimusnäytteiden otto.....	11
3.3.1	Nenäharjanäytteet.....	11
3.3.2	Nenähuuhtelunäyte.....	11
3.3.3	Verinäyte	11
3.4	Transkriptomiikka	12
3.4.1	DNA-mikrosiruanalyysi.....	12
3.4.2	Mikrosirutulosten validointi.....	12
3.4.3	Tilastollinen analyysi.....	13
4	Tulokset	14
4.1	Itseraportoituihin oireisiin liittyvät bioprofilierot nenäepiteelissä "terveiden" ja "sairaiden" koulujen opettajilla.....	14
4.2	Itseraportoituihin oireisiin liittyvät bioprofilierot verisoluissa "terveiden" ja "sairaiden" koulujen opettajilla.....	18
4.3	Bioprofilierot "terveiden" ja "sairaiden" koulujen opettajilla nenäepiteelissä, kun oireilua ei oteta huomioon	20



4.4	Transkriptomiikkatulosten validointi	21
5	Pohdinta	23
6	Johtopäätökset ja tulosten hyödyntäminen.....	25
Lähteet 26		

1 LÄHTÖKOHTA JA TAUSTAT

Kosteusvaurio-ongelmia aiheuttavat tyypillisesti putki-, katto- ym. vuodot, kosteuden kapillaarinen nousu maaperästä, puutteellinen salaojitus, rakennusten vaillinaisen kunnossapito ja huono ilmanvaihto sekä rakennusmateriaalien luonnollinen vanheneminen. Kosteusvauriot johtavat mikrobien kasvuun kostuneissa rakenteissa. Kosteusvauriomikrobien aiheuttamia ongelmia esiintyy käytännössä kaiken tyyppisissä rakennuksissa; kodeissa, kouluissa, päiväkodeissa ja työpaikoilla (1, 2). Ongelma on laaja ja lukuisat suomalaiset altistuvat kosteusvauriorakennuksissa mikrobeille, niiden aineenvaihduntatuotteille ja kostuneiden materiaalien päästöille. Sosiaali- ja terveysministeriön raportissa todetaan että esim. maamme keskussairaaloissa on lähinnä kosteusvaurioihin liittyen arviolta 370 miljoonan euron välitön korjaustarve (3). Myös kiinteistöjen vajaakäyttö kosteusvaurioiden takia on huomattava menoerä. Väestön kannalta ongelma tulee ensisijaisesti siitä, että kosteus- ja homevaurioihin on liittynyt tilojen käyttäjien oireilu ja sairastuminen. Taloudelliset vaikutukset moninkertaistuvat rakennusten kosteusvaurioissa, kun tilan käyttäjät sairastuvat tai menettävät työkykynsä.

1.1 Kosteusvaurioihin liittyvä oireilu

Kosteusvaurion on havaittu lukuisissa tutkimuksissa aiheuttavan terveyshaittoja kohteessa oleskeleville henkilöille (4, 5). Kosteusvaurioaltistumiseen liittyviä terveyshaittoja ovat mm. hengitystieoireet ja hengitystieinfektiot sekä astmaoireiden pahaneminen. On myös näyttöä yhteydestä astman syntyyn. Oireille on tyypillistä, että ne lieventyvät muualla oltaessa, tai kun kosteusvaurion perussy on korjattu ja altistuminen kosteusvauriomikrobeille tai muille kosteusvaurioon liittyville altisteille on poistettu.

Monilla kosteusvauriorakennuksissa altistuneilla on yleisoireita kuten päänsärkyä, kuumetta, väsymystä ja pahoinvointia (6). Yleisimpiä paikallisia ärsytysoireita ovat nenän ja nielun arkuus, äänen käheys, aivastelu, nenän tukkoisuus ja nuha. Lisäksi voi esiintyä nenän ja silmien kutinaa, silmien vetistystä ja punoitusta sekä ihon kutinaa, polttelua ja nokkosrokkia (urtikariaa). Ylähengitystieoireita ovat nenän, kurkun sekä kurkunpään (äänihuulien) oireet. Alempien hengitysteiden oireita ovat yskä, limannousu keuhkoista sekä hengenahdistus ja yskä.

Kosteusvauriorakennuksessa altistuneilla voi olla tavallista enemmän hengitystietulehduksia, tavanomaista flunssaa, nuhakuumetta, nielutulehduksia, keuhkoputkentulehdusta, poskiontelon tulehdusta ja jopa keuhkokuumetta. Homealtistus lisää astman kehittymisen riskiä, pahentaa olemassa olevan astman oireita ja usein lisää lääkityksen tarvetta. Koululaisista n. 5%:lla on homeallergia ihotestillä (prick-testi) mitattuna. Aikuisista 6%:lla on merkittävä määrä herkistymistä osoittavia IgE-vasta-aineita homeille ja muille kosteusvauriomikrobeille (7, 8), mutta IgE ei selitä kosteusvaurioihin yhdistyviä oireita.

Kosteusvaurioituneiden rakennusten sisäilmasta tai rakennusmateriaalinäytteistä mitatut mikrobi-itiöpitoisuudet eivät korreloi selvästi altistuneiden henkilöiden oireiden määrään. Tämän vuoksi ei sisäilman bioaerosoleille ole voitu antaa terveysperusteisia ohjearvoja. Yksilöllisessä herkkyydessä on eroja mm. atoopikot ja hengitystiesairaat voivat saada oireita muita herkemmin (5).

1.2 Kosteusvauriomikrobit ja niiden vaikutukset immuunijärjestelmään

Kosteusvauriokohteissa sisäilman sieni-itiöpitoisuudet ovat korkeampia ja lajisto monipuolisempaa kuin normaalissa tilanteessa (9). Teoreettisen mallin mukaan kosteusvaurion yhteydessä ensimmäisenä lisääntyvät primaariset homeet kuten *Aspergillus versicolor*, *Asp. penicillioides*, *Eurotium*, *Pen. brevicompactum*, *Pen. chrysogenum* ja *Wallemia sebi*. Tämän jälkeen vauriokohdassa alkaa ilmetä sekundaarisia homeita kuten *Cladosporidium cladosporioides*, *Cl. sphaerospermum*, *Asp. flavus* ja *Asp. versicolor*. Jos kosteusvaurio etenee, alkaa kohteessa esiintyä tertiäärisiä homeita kuten *Stachybotrys chartarum* ja *Fusarium spp.* sekä näiden lisäksi hiivoja ja aktinomykkeettejä. *S. chartarum* on useissa tutkimuksissa liitetty kosteusvaurioiden haitallisiin terveysvaikutuksiin (10). Homeiden lisäksi kosteusvaurioissa esiintyy myös runsaasti bakteereita ja alkueläimiä (11).

Mikrobikasvustosta vapautuu sisäilmaan immuunijärjestelmää aktivoivia hiukkasia ja yhdisteitä: homeitiöitä, mikrobisolujen rakennekomponentteja kuten endotoksiineja ja (1,3)- β -glukaania, ja mikrobitoraksiineja (12, 13). Näiden välityksellä kosteusvauriomikrobit voivat aktivoida immuunijärjestelmän. Esimerkiksi mikrobien soluseinärakenteet; gram-negatiivisilla bakteereilla lipopolysakkaridi (LPS) ja homeilla (1,3)- β -glukaani, aiheuttavat tulehdusvastetta. Tiedetään, että *S. chartarum* sisältää runsaasti (1,3)- β -glukaania (14) ja erilaisia sienimyrkkyjä, joilla on havaittu olevan toksisia vaikutuksia sekä soluviljelmissä että koe-eläimissä. Lisäksi mikrobirakenteet voivat aiheuttaa IgE-välitteistä yliherkkyyttä ja lisätä riskiä sairastua astmaan.

Aikaisemmissa tutkimuksissamme olemme käyttäneet mallikosteusvauriomikrobina *S. chartarumia*. Olemme havainneet, että *S. chartarum* yhdessä hiiriin indusoidun astmaattisen tilan kanssa johtaa vaikeaan allergista alveoliittia muistuttavaan keuhkon välikudoksen tulehdukseen (15). Olemme lisäksi osoittaneet, että *S. chartarum*in erittämä toksiini aktivoi voimakkaan tulehdusvälittäjäainetuotannon (IL-1 β ja IL-18) ihmisen makrofageissa yhdessä lipopolysakkaridin kanssa (16). Kosteusvaurioissa on homeiden lisäksi myös runsaasti bakteerikasvustoa, joten nämä löydökset saattavat osittain selittää *S. chartarum*in terveydelle haitalliset vaikutukset. Olemme myös raportoineet ja tuottaneet uutta tietoa immunologisista mekanismeista, joilla β -glukaania sisältävät kosteusvaurio-mikrobit saattavat aiheuttaa haitallisia terveysvaikutuksia. Olemme raportoineet, että β -glukaani tunnistetaan makrofagin pinnalla olevan dectin-1 resep-

torin välityksellä ja että tästä tunnistamisesta seuraa solun sisäisen inflammasomirakenteen aktivaatio ja voimakas tulehdusvälittäjäaineiden erityis (17). Lisäksi olemme selvittäneet ihmisen makrofagien kokonaisvaltaisen tulehdusvasteen β -glukaaneille bioinformatikkaa, proteomiikkaa ja transkriptomiikkaa hyödyntäen (18). Kosteusvaurioituneissa kohteissa altistutaan monille eri mikrobeille ja niiden tuottamille toksineille samanaikaisesti. On todennäköistä, että mikrobitoksiinit yhdessä soluseinärakenteiden kanssa pahentavat kosteusvauriomikrobeihin liittyviä terveyshaittoja merkittävästi.

1.3 Kosteusvaurio-oireilun diagnostiikkaan liittyviä ongelmia

Kosteusvaurioympäristön tiedetään vaikeuttavan astman oireita ja aiheuttavan ylähengitysteiden oireita, yskää ja hengityksen vinkunaa. On myös näyttöä yhteydestä astman syntyyn. Ei kuitenkaan tiedetä, mitkä mikrobikomponentit tai kosteusvaurioon liittyvät muut tekijät ovat ne tekijät, jotka todella aiheuttavat havaittuja terveysongelmia. Niinpä on erittäin vaikeaa arvioida kosteusvauriorakennuksen aiheuttamaa eri sairauksien lisäriskiä ja lähes mahdotonta yhdistää tietoja epäilyistä kiinteistöstä yksittäisen potilaan terveyteen. Kosteusvauriomikrobien terveysvaikutuksia potilaisiin ei myöskään useimmiten voida objektiivisesti mitata. Lääkäreillä tai muulla terveydenhuollon henkilökunnalla ei ole tällä hetkellä diagnostisia työkaluja tai biologisia merkkiaineita, joiden avulla voitaisiin osoittaa kyseisten oireiden aiheutuvan altistumisesta kosteusvauriomikrobeille tai niiden komponenteille. Ammattiasman diagnosoinniseksi on ammattitautilain mukaisesti osoitettava syy-yhteys astman ja työpaikalla tapahtuneen altistumisen välillä. Koska kosteusvaurioituneessa työpaikassa on useita erilaisia altisteita ja niiden vaikutus hengitysteihin tunnetaan puutteellisesti, ei tämän syy-yhteyden osoittaminen ole yksiselitteistä. Nykyisen uuden käytännön mukaan ammattiasmadiagnoosi voidaan tehdä perustuen PEF (Peak Expiratory Flow) -työpaikkaseurantaan. Kaikki potilaat eivät kuitenkaan onnistu tekemään PEF-työpaikkaseurantaa luotettavasti ja tutkimukseen liittyy myös merkittäviä herkyyteen ja spesifisyyteen liittyviä ongelmia

Yllä mainituista syistä kosteusvaurio-oireiluun liittyvien spesifisten ja herkkien biologisten merkkiaineiden tai merkkiaineprofiilin tunnistaminen oireilevan potilaan verestä tai limakalvolta olisi ensiarvoisen tärkeää.

1.4 Systeemibiologian hyödyntäminen biolääketieteessä

Systeemibiologia on nopeasti kasvava tutkimusala, jonka menetelmiä ja tuloksia sovelletaan usealla biolääketieteen alueella. Perinteinen lähestymistapa, jossa tutkitaan yhtä geeniä tai proteiinia kerrallaan, korvautuu kokonaisvaltaisella lähestymistavalla, jossa kaikkia geenejä tai niiden tuottamia proteiineja tutkitaan samanaikaisesti. Lähestymistavan edut ovat merkittävät,

sillä useimpien biologisten tapahtumien takana ei ole yksittäisen proteiinin toiminta vaan proteiinien monitahoinen vuorovaikutusverkosto.

Transkriptomiikka tutkii samanaikaisesti tuhansien lähetti-RNA (mRNA) molekyylien ilmentymistasoja (geeniekspressiota) tutkittavassa kudoksessa tai solussa. Geeniekspression määrittämiseen voidaan käyttää tällä hetkellä pääsääntöisesti kahta eri tekniikkaa - mikrosirumenetelmää ja syväsekvensointia.

Mikrosirumenetelmä perustuu mikroskooppilasille asetetuista tuhansista/kymmenistä tuhansista geenikoettimista, joihin hybridisoidaan tutkimusnäytteen RNA:sta valmistettua komplementaarista RNA:ta (cRNA).

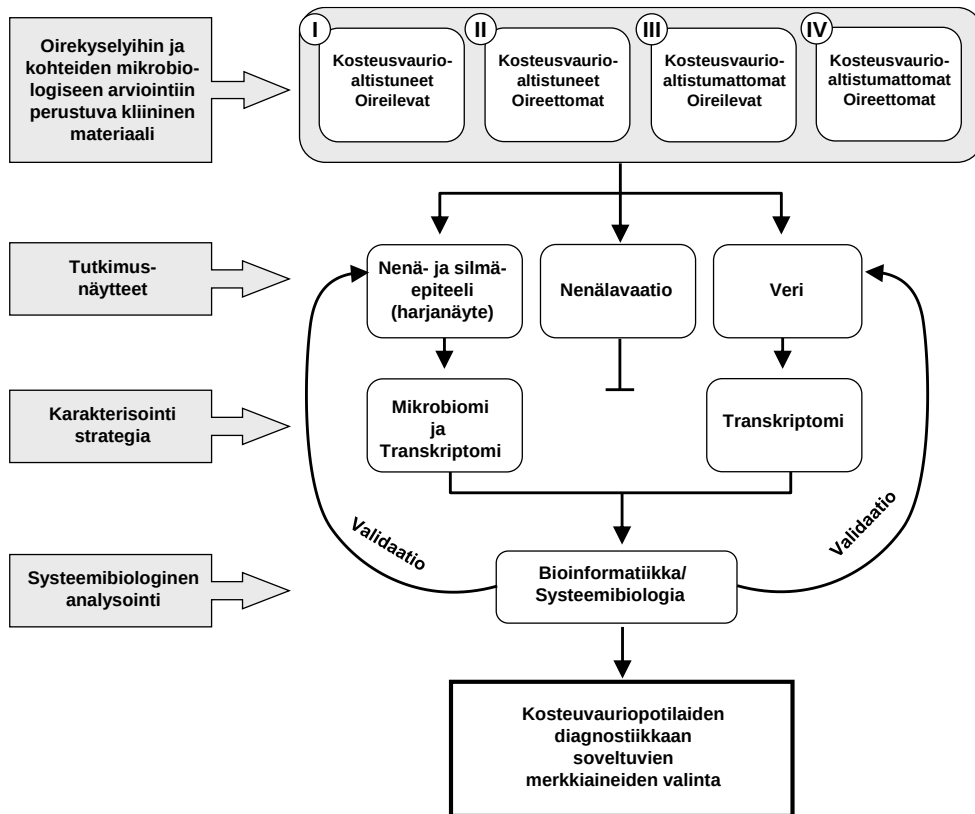
2 TAVOITTEET

Tutkimuksen tavoitteena oli tunnistaa systeemibiologisen lähestymistavan avulla kosteusvaurio- oireiluun liittyviä biologisia merkkiaineita tai merkkiaineprofiileja, joiden avulla voidaan parantaa diagnostiikkaa ja kehittää keinoja syy-seuraussuhteen varmistamiseksi kosteusvaurioaltistuksen ja epäillyn ammattitaudin välillä.

Tutkimushypoteesi oli, että kosteusvauriomikrobeille altistuminen aiheuttaa nenän limakalvon sekä verisolujen välittäjäaineprofiilissa muutoksia. Välittäjäaineprofiilien eroavuuksia kosteusvaurioaltistuneiden ja ei-altistuneiden, ja toisaalta oireellisten ja oireettomien kesken, ja siten saatuja profiileja voidaan hyödyntää diagnostiikkaa parantavien merkkiaineiden tunnistamisessa.

3 MENETELMÄT JA TOTEUTUS

3.1 Tutkimusstrategia



Kuva 1. Tutkimuksen kokonaisuasetelma ja osatutkimusten liittyminen toisiinsa.

3.2 Tutkimusryhmien valintakriteerit

Kliininen materiaali saatiin kriteerit täyttävissä kouluissa työskentelevistä opettajista. Kliinisesti hyvin karakterisoidut tutkimusryhmät valittiin kattavien oirekyselyiden perusteella, kun taas tutkittavien koulujen valinta perustui huolelliseen rakennustekniseen arviointiin.

3.2.1 Tutkimusryhmien jaotteluperusteet

- I. **Kosteusvauriokohteissa työskentelevät oireilevat työntekijät:** Tässä ryhmässä kaikki henkilöt työskentelivät kosteusvauriokohteessa. Kohteissa oli oltava merkittävä kosteus- ja mikrobivaurio, joka on todennettu rakennusselvityksessä. Näin ollen voidaan olettaa, että kaikki henkilöt olivat altistuneet työpaikan kosteusvauriomikrobeille, niiden osalle tai muille metaboliatuotteille. Kaikki ryhmän henkilöt ovat ilmoittaneet työpaikan kosteusvaurioon selkeästi liittyvistä hengitystieoireista terveystieteessä.
- II. **Kosteusvauriokohteissa työskentelevät oireettomat työntekijät:** Tässä ryhmässä kaikki henkilöt työskentelivät samoissa tiloissa, jotka on kuvattu yllä. Kaikki ryhmän henkilöt olivat siten altistuneet samoille kosteusvauriomikrobeille, niiden osalle tai muille metaboliatuotteille. Yllä olevasta ryhmästä poiketen henkilöt eivät ole terveystieteessä ilmoittaneet työpaikkaan liittyvää hengitysoireilua. Ryhmän I ja II henkilöt ovat erittäin hyvin vertailukelpoisia toisiinsa nähden - koska altistuminen on samalaista, niin ainoa erottava tekijä on oireilu.
- III. **Terveissä kohteissa työskentelevät oireilevat työntekijät:** Tässä ryhmässä kaikki henkilöt työskentelivät kohteissa, joissa ei ole havaittua ja raportoitua kosteusvauriota. Kohteen kaikki tilat oli myös huolellisesti rakennusteknisesti tarkastettu ja todettu terveiksi. Voidaankin olettaa, että kohteessa työskentelevät henkilöt eivät olleet altistuneet työskentelytiloissa kosteusvauriomikrobeille. Henkilöt ilmoittivat terveystieteessä hengitystieoireilua, joka ei liittynyt työpaikkaan tai kotiin. Ryhmä III toimii verrokkiaineistona kosteusvauriokohteissa työskenteleville oireileville työntekijöille (Ryhmä I). Ryhmiä vertailemalla voidaan tutkia kosteusvaurioaltistumisesta aiheutuvan ylähengitystieoireilun ja kosteusvaurioaltistumiseen liittymättömän ns. "epäspesifisen" ylähengitystieoireilun bioprofiilien välisiä eroja.
- IV. **Terveissä kohteissa työskentelevät oireettomat työntekijät:** Tässä ryhmässä kaikki henkilöt työskentelivät kohteissa, joissa ei ollut havaittu eikä raportoitu kosteusvauriota. Kohteessa työskentelevät henkilöt eivät olleet siten altistuneet työskentelytiloissa kosteusvauriomikrobeille. Yllä olevasta ryhmästä poiketen henkilöt eivät ilmoittaneet terveystieteessä työpaikkaan liittyvästä hengitysoireilusta. Ryhmä IV toimii verrokkiaineistona kosteusvauriokohteissa työskenteleville oireettomille työntekijöille (Ryhmä II). Ryhmiä vertailemalla voidaan tunnistaa kosteusvaurioaltistumiselle tunnusomaisia bioprofiileja, jotka eivät kuitenkaan liity ylähengitystieoireiluun.

3.2.2 Koulujen valintaperusteet

- I. **Vauriokoulut:** SISU-interventiotutkimukseen on valittu aikoinaan vakavasti vaurioituneita kouluja, jotka tullaan korjaamaan kahden vuoden aikana. Tutkimuskohteet on hankittu pääasiassa kuntien ja kaupunkien ympäristöterveysvalvontaviranomaisten

kautta. Tutkimuksen aluksi koulutettu tutkimusinsinööri teki kouluissa rakennusteknisen tutkimuksen käyttäen standardoitua tutkimusprotokollaa, tarkastuslistoja ja pinta-kosteusilmaisinta. Tutkimus sisälsi mm. rakennuksen teknisten ominaisuuksien, vaurioiden, niiden syiden, korjausten ym. havainnoinnin ja käyttäjien haastattelun. Rakennustekninen tarkastus määrittelee rakennuksen vauriotilanteen (kosteus- ja homevaurioiden määrä, laajuus, vakavuus ja sijainti) ja näin ollen kohteen sopivuuden tutkimuskohteeksi.

- II. **Kontrollikoulut:** Kontrollikohteet valittiin em. SISU-hankkeen kouluista, joissa ei ole havaittu tai raportoitu kosteusvaurioista. Tutkimusinsinööri on tehnyt kouluissa rakennusteknisen tutkimuksen kuten yllä ja kontrolleiksi valittiin kouluja, jotka todettiin rakennusteknisesti terveiksi.

3.2.3 Tutkittavien henkilöiden oirekyselyt ja kliiniset tiedot

Koulujen henkilökunnalle tehtiin terveystarkastus, joka keskittyi hengitystie- ja ns. yleisoireiden lisäksi muihin kosteusvauriorakennuksissa havaittuihin oireisiin ja sairauksiin. Osalle opettajista tehtiin myös uloshengitysilman typpioksidimittaus. Kyselykaavakkeen vastausten perusteella valittiin vapaaehtoiset osallistujat ja jaettiin heidät eri tutkimusryhmiin:

Ryhmän I oireilevat ovat tutkittavia, jotka ovat ilmoittaneet kyselykaavakkeessa saaneensa viimeisen kuukauden aikana vähintään viikottain koulurakennuksessa pahenevia ja vapaapäivien aikana helpottavia nenän tukkoisuusoireita tai nuhaa.

Ryhmän III oireilevat ovat tutkittavia, jotka ovat ilmoittaneet kyselykaavakkeessa saaneensa viimeisen kuukauden aikana vähintään viikottain nenän tukkoisuusoireita tai nuhaa, joka ei kuitenkaan liity koulurakennukseen tai muuhun asuinpaikkaan.

Ryhmien II ja IV oireettomat ovat tutkittavia, jotka eivät kyselykaavakkeessa ole ilmoittaneet kokeneensa hengitystieoireita viikottain eivätkä koe hengitystieoireiden pahenevan koulurakennuksessa tai helpottavan vapaapäivinä.

Tutkimukseen ei otettu mukaan niitä, joilla on allerginen nuha tai allerginen silmäoireisto eikä nenän polyyppitautia tai kroonista (>4vk) nuhaa tai nenän sivuonteloiden tulehdusta sairastavia. Tupakoivia ei otettu tutkimukseen. Tutkimukseen ei hyväksytty heitä, joiden kotona on esiintynyt näkyvää homekasvua tai homeenhajua viimeisen vuoden aikana. Tutkimukseen ei valittu myöskään henkilöitä, joilla kyselyn perusteella on voimakas somatisaatiotaipumus.

Ennen näytteenottoa varmistettiin, ettei tutkittava ole raskaana eikä hänellä ole akuuttia hengitystietulehdusta ja että terveystarkastuksen mukainen oireilu/oireettomuus status on tutkittavalla myös näytteenottohetkellä. Lääkärin toteamasta märkäisestä poskiontelotulehduksesta tai nenän leikkaushoidosta tuli olla kulunut vähintään 4 viikkoa. Lisäksi varmistettiin, että tutkittava työskenteli näytteenottoajankohtana samassa koulussa, jossa oireili eikä ole ollut sairauslomalla

edeltävään 2 viikkoon. Nenäsuihkeiden, antibioottien, antihistamiinien ja allergiasilmätippojen osalta varmistettiin asiaankuuluvat tauot ennen näytteenottoa.

3.3 Tutkimusnäytteiden otto

3.3.1 Nenäharjanäytteet

Nenän alakuorikon limakalvon yläosasta harjattiin kevyesti standardilla sytologiaan käytetyllä nukkatikulla (alaluomiepiteeli) tai nailonharjalla (nenäepiteeli). Harjaan jääneet solut asetettiin välittömästi RNA-later liuokseen, joka estää RNA:n hajoamisen ja mahdollistaa hyvälaatuisten näytteiden saannon. Nenäepiteelin RNA:ta käytettiin transkriptomiikka-analyysihin (katso alla). Mikrobiominäyte otettiin nenän alakuorikon yläosasta standardilla sytologiaan käytetyllä nukkatikulla. Näytteenoton jälkeen tikku laitettiin tyhjään Eppendorf putkeen, tikku katkaistiin putkeen ja säilytettiin -20°C:ssa mikrobiomianalyysiä varten.

Koska nenäharjanäytteen ottaminen on lähes haitaton (non-invasiivinen) tai hyvin vähän kajoava (invasiivinen) menetelmä potilaalle, niin nenäepiteelistä tehtävää merkkiaineiden määrittämistä voidaan käyttää teoriassa kosteusvauriosairauksien diagnostiikkaan.

3.3.2 Nenähuuhtelunäyte

Nenähuuhteluun käytettiin muokattua "nasal pool" metodia. Tässä menetelmässä 10 ml fosfaattipuskuroitua keittosuolaa (37°C) annostellaan nenäontelon etuosaan taipuisalla letkulla. Tämän jälkeen potilas sulkee sormilla puristamalla sieraimensa ja kumartuu eteenpäin n 60°. Suolaliuos työnnetään edestakaisin kolme kertaa. Menettely toistetaan vastakkaisella puolella, molemmat huuhtelunesteet kerätään samaan putkeen. Putket säilötään -70°C myöhempää käyttöä varten. Nenähuuhtelunäytettä voidaan käyttää tulevaisuudessa limakalvosta eritettävien proteiinien, eli niin sanotun sekretomin, tutkimiseen proteomiikan keinoin.

Nenähuuhtelu on käytännössä haitaton näytteenottomenetelmä potilaalle. Huuhtelunäytteestä tehtävä merkkiaineanalyysi on teoriassa siten kosteusvauriosairauksien diagnostiikkaan soveltuva menetelmä.

3.3.3 Verinäyte

Verinäytteet otettiin laskimoverestä BD Vacutainer CPT putkiin. Solut erotettiin plasmasta standardisti sentrifugoimalla. Veriplasma (Luminex analyysit) ja perifeerisen veren mononukleaariset solut (mahdollisuus solujen myöhempää stimulointiin solujen herättämisen jälkeen) kerätään ja pakastettiin myöhempiä analyysejä varten laboratoriossamme rutiinisti käytetyillä menetelmillä.

3.4 Transkriptomiikka

3.4.1 DNA-mikrosiruanalyysi

DNA-mikrosiruanalyysit tehtiin nenäharjanäytteiden epiteelisoluista ja laskimoveren mononukleaarista soluista (PBMC) eristetyille RNA näytteille. Nenän epiteelisolujen RNA eristettiin RNeasy Micro kitillä (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), kun taas PBMC soluille käytettiin Qiagenin miRNeasy Mini kittiä valmistajan ohjeiden mukaan. RNA:n määrä mitattiin sekä NanoDrop spektrometrillä (ND-1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, NC, USA) että Qubit 3.0 fluorometrillä (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Saadun RNA:n puhtausaste ja soveltuvuus siruanalyysiin varmistettiin Agilent Bioanalyzer 2100 laitteella (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Nenäepiteelin lähetti-RNA profiilit määritettiin DNA-siruanalyysien avulla Biotekniikan Institutiin DNA sekvensointi- ja genomiikkalaboratoriossa, kun taas periferiaveren solujen lähetti-RNA profiilit tehtiin Työterveyslaitoksella. Soluista eristettiin RNA, joka ensin käännettiin cDNA:ksi ja monistettiin modifioituksi cRNA:ksi, johon liitettiin väri (Cy3, Cy5 tai Alexa 488). Värjätyn näytteen hybridisoitiin mikroskooppilevyllä oleviin geenikoettimiin ja skannattiin. Geenikoettimina käytettiin nenän epiteelisoluille G4845A HD Human GE 4x44K v2 sirulaseja ja PBMC soluille G4851C G3 Human Gene Expression 8x60K v3 sirulaseja. Analyysissä käytettiin Agilentin valmistamia reagensseja ja laitteita, poikkeuksena oli nenäepiteeli-näytteiden RNA:n monistaminen, joka tehtiin Ambionin kitillä (Ambion Inc., Austin, Texas) ja skannattiin GenePix 4200 AL laitteella (Axon Instruments / Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) GenePixPro6.01-ohjelmalla. PBMC solujen skannaus tapahtui Agilent Feature Extraction 11.5.11 -ohjelmalla.

3.4.2 Mikrosirutulosten validointi

Mikrosirutulosten perusteella valittiin lupaavimmat geenit, jotka validoitiin reaaliaikaisella polymeraasiketjureaktiolla (PCR). Kokonais-RNA eristettiin nenäepiteeli- ja PBMC-näytteistä samalla tavalla kuin siruanalyysiin.

Komplementaarinen DNA (cDNA) syntetisoitiin 200 ng:sta RNA:ta 25 µl:n reaktiossa transkriptiokitin avulla käyttämällä sattumanvaraisia alukkeita (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Life Technologies). Synteesi tapahtui 2720 Thermal Cycler -laitteella (Applied Biosystems / Life Technologies) (25 °C / 10 min; 37 °C / 120 min).

PCR-alukkeet ja -koettimet ostettiin Applied Biosystemsiltä, ja reaaliaikainen PCR tehtiin 96-kuoppaisilla optisilla reaktiolevyillä käyttäen (7500 Fast Real-Time PCR system, Applied Biosystems)-laitetta. Monistukset tehtiin 11 µl:n tilavuudessa, johon oli lisätty 1 µl cDNA:ta sekä PCR-

alukkeet ja koettimet Quantan PCR – puskurissa valmistajan ohjeiden mukaan (Quanta Biosciences Inc., Gaithersburg, MD, USA). Tulosten normalisointi tapahtui endogeenisen 18S RNA:n avulla standardimenetelmällä (Applied Biosystems).

3.4.3 Tilastollinen analyysi

DNA-mikrosiruanalysistä saatu raakadata (GPR-muodossa) tuotiin R-ohjelmaan (v. 2.15) (R Core Team 2012) ja analysoitiin BioConductorin (19) limma-paketilla (20). Raakadatan laatu tarkistettiin ja mediaani raaka-intensiteetit muunnettiin log2:ksi ja normalisoitiin Quantile-menetelmällä. Samoja geenejä tunnistavien koettimien normalisoiduista arvoista laskettiin keskiarvot, jolloin muodostui lopullinen ilmentymismatriisi. Ilmentymismuutokset laskettiin sovittamalla arvot lineaariseen malliin ja laskemalla niistä moderoitu t-testi. Geenejä, joiden p-arvo oli < 0.01 ja logFC ilmentymismuutos > 10.581 , pidettiin biologisesti merkittävänä muutoksina.

Validaatiossa saadut tulokset analysoitiin GraphPad Prism 5 ohjelmalla (GraphPad Software Inc.) käyttämällä paritonta t-testiä tai Mann-Whitney U-testiä, jos ryhmien varianssit erosivat tilastollisesti merkitsevästi. P-arvoa < 0.05 pidettiin tilastollisesti merkittävänä.

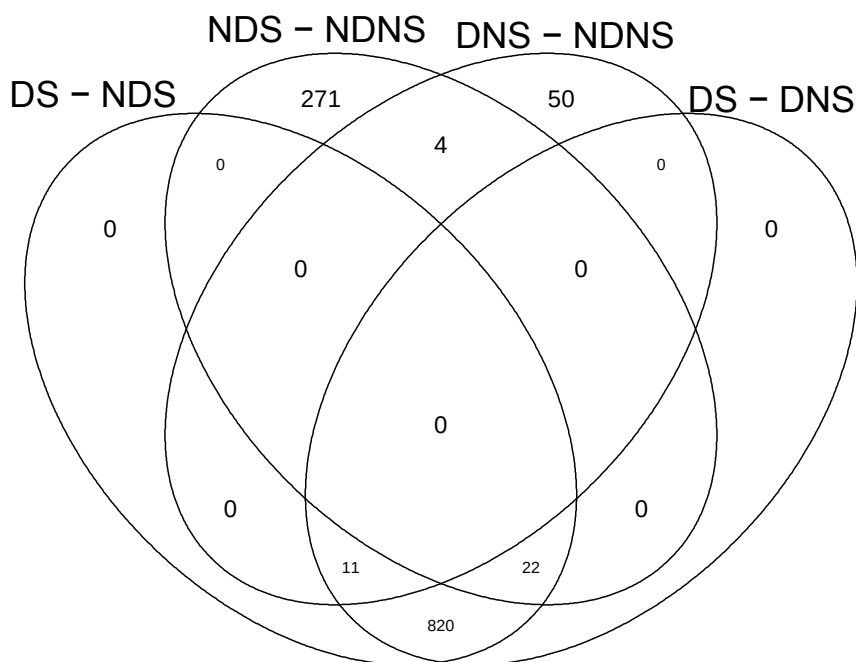
4 TULOKSET

4.1 Itseraportoituihin oireisiin liittyvät bioprofiilierot nenäepiteelissä "terveiden" ja "sairaiden" koulujen opettajilla

Tutkimusjoukossa oli alunalkaen 112 opettajaa, jotka olivat vastanneet terveystieteeseen ja joilta oli saatu nenäharjanäyte. Opettajia jäi jäljelle 96, kun poistettiin joukosta opettajat, joiden näytteistä saatiin vain vähän tai huonolaatuista RNA:ta (RIN < 8) ja jotka olivat tupakoineet lähiaikoina. Kun tutkittavista poistettiin opettajat, jotka eivät olleet vastanneet kaikkiin hengitystieoirekysymyksiin, opettajia jäi jäljelle 89. Miesten poisto aineistosta vähensi tutkittavien määrän 77 opettajaan, joiden epiteelinäytteille tehtiin mikrosiruanalyysit.

Kosteusvauriokartoituksen perusteella koulut luokiteltiin terveiksi (kosteusvauriottomat) ja sairiksi (kosteusvauriokoulut). Perustuen itseraportoituihin oireisiin kunkin koulutyyppin opettajat jaoteltiin alaryhmiin oireettomat (non-symptomatic, NS) ja oireelliset (symptomatic, S). Opettajat jakautuivat eri ryhmiin seuraavasti: terveiden koulujen oireettomia oli 9 ja oireilevia 9, kun taas vauriokouluissa oireettomia oli 20 sekä oireilevia 39.

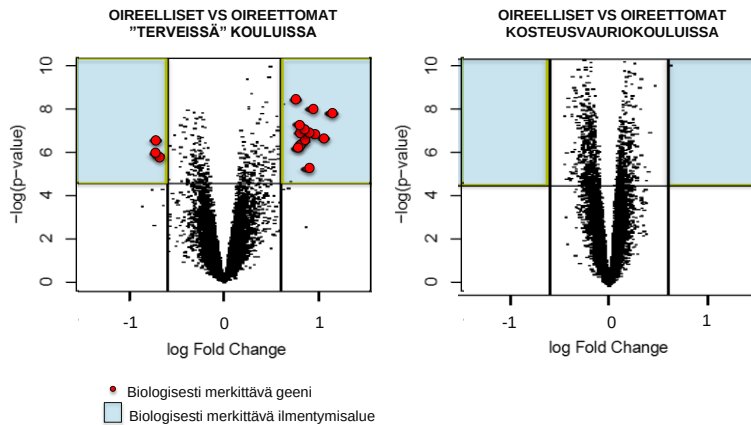
Kun alaryhmien geeniekspressiotasoa vertailtiin toisiinsa, niin havaittiin, että terveissä kouluissa oireellisten ja oireettomien opettajien vertailussa (non-damaged symptomatic vs non-damaged non-symptomatic; NDS vs NDNS; Kuva 2) tunnistettiin 297 tilastollisesti merkittävää geenimuutosta; näistä geeneistä 271 ei löytynyt mistään muusta ryhmästä. Oireettomien ja oireellisten geeniekspressiota vertailtaessa kosteusvauriokouluissa tunnistettiin 853 (damaged symptomatic vs damaged non-symptomatic; DS vs DNS) tilastollisesti merkittävää geenimuutosta. On kuitenkin huomioitava, että vauriokouluissa oli merkittävästi enemmän näytteitä (oireettomia n=20 ja oireellisia n=39) verrattuna terveisiin kouluihin (oireettomia n=9 ja oireilevia n=9), joka todennäköisesti selittää suuremman geenimuutosten lukumäärän kosteusvauriokouluissa verrattuna terveisiin kouluihin.



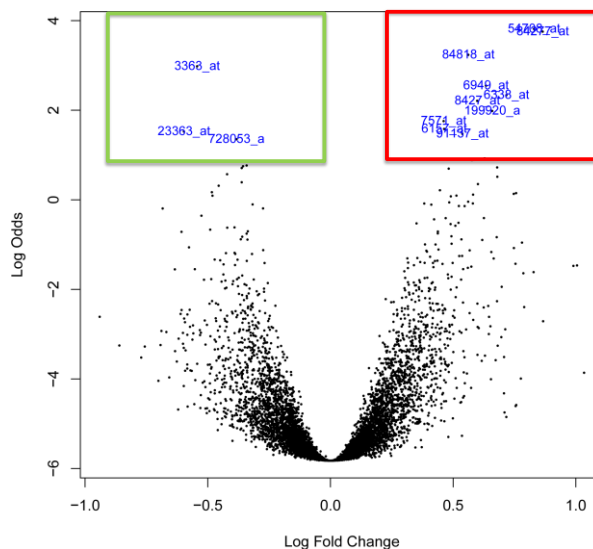
Kuva 2. Nenäepiteelinäytteet: tilastollisesti merkittävät geenimuutokset siruanalyysissä Venn-kuvaajalla esitettyinä. DS-NDS = oireilevat kosteusvauriokouluissa verrattuna oireileviin terveissä kouluissa; NDS-NDNS = oireilevat terveissä kouluissa verrattuna oireettomiin terveissä kouluissa; DNS-NDNS = oireettomat kosteusvauriokouluissa verrattuna oireettomiin terveissä kouluissa; DS-DNS = oireelliset kosteusvauriokouluissa verrattuna oireettomiin kosteusvauriokouluissa.

Vaikka tilastollisesti merkittäviä geenimuutoksia oireellisten ja oireettomien välillä oli kosteusvauriokouluissa enemmän kuin terveissä kouluissa, niin geenimuutoksen voimakkuus oli erittäin pieni (logFC), mikä kyseenalaistaa geenimuutoksen biologisen merkityksen. Kun geenimuutoksen voimakkuus otettiin analyysissä huomioon, niin havaittiin, että ainoastaan terveissä kouluissa opettajien geeniekspressio antoi viitteitä biologisesti merkittävistä geenimuutoksista oireilevilla, kun heitä verrattiin oireettomiin (Kuva 3). Kosteusvauriokouluissa ei havaittu biologisesti merkittäviä eroja oireilevien ja oireettomien opettajien välillä. Geenit, joiden -log p-arvo oli < 4.5 ja logFC ilmentymismuutos $> |0.58|$ (punaiset pallot kuvassa 3), luokiteltiin potentiaalisti biologisesti merkittäviksi geenimuutoksiksi.

Kun tulokset korjattiin monitestauksesta aiheutuvan tilastoharhan poistamiseksi (Benjamini and Hochberg False Discovery Rate -menetelmä), ainoastaan 13 geenin muutokset sairaiden ja terveiden koulujen oireilevien opettajien välillä jäivät edelleen tilastollisesti merkittäviksi (Kuva 4).



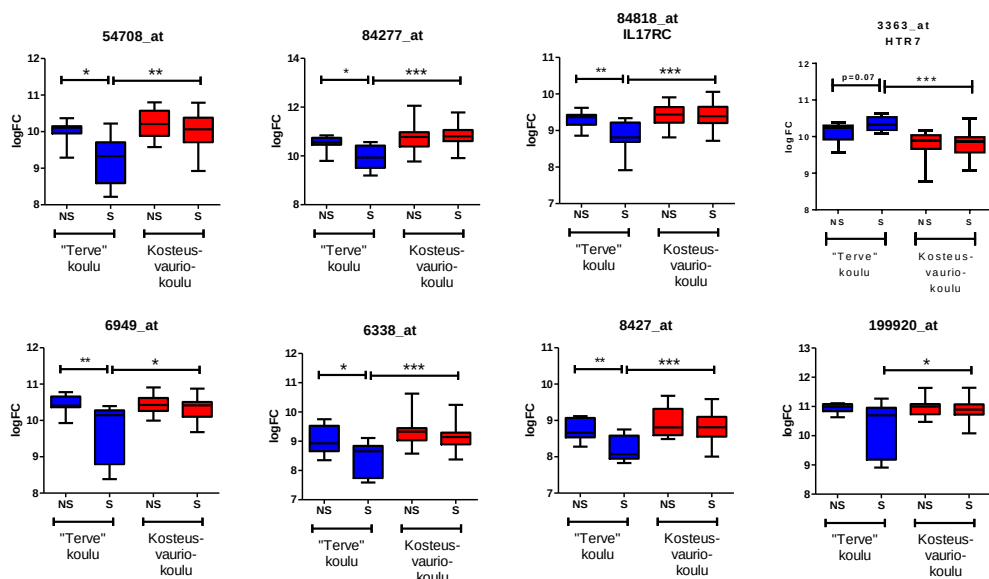
Kuva 3. Nenäpeiteelinäytteet: tilastolliset eroavuudet geeniekspressiossa terveissä ja sairaisissa kouluissa oireilun suhteen. Geenejä, joiden $-\log p$ -arvo oli < 4.5 ja $\log_2$ ilmentymismuutos $> |0.58|$ (punaiset pallot), pidettiin potentiaalisti biologisesti merkittävänä geenimuutoksina.



Kuva 4. Nenäpeiteelinäytteet: tilastolliset erot geeniekspressiossa terveiden ja sairaiden koulujen oireilevien välillä post-hoc korjauksen jälkeen (Benjamini and Hochberg monitestauskorjaus). Log Odds arvot kuvaavat tilastollista todennäköisyyttä ja FC (= Fold Change) arvot muutoksen voimakkuutta. Vihreän alueen geenien ekspressio on alentunut ja punaisen alueen kasvanut.

Kun tutkittiin monitestauskorjauksen jälkeen tilastollisesti merkittäväksi jäävien geenien ekspressiotasoa potilaskohtaisesti, havaittiin, että kosteusvauriokouluissa geeniekspressioissa ei ollut eroja oireilevien ja oireettomien opettajien välillä (Kuva 5). Toisaalta geenien ekspressiossa

havaittiin tilastollisesti merkitseviä eroja terveiden ja sairaiden koulujen oireilevien välillä. Esi-merkiksi IL17RC:n geeniekspressio oli alentunut terveiden koulujen oireilevilla verrattuna oireettomiin opettajiin samoissa kouluissa. Se oli myös matalampi terveiden koulujen oireilevilla kuin sairaiden koulujen opettajilla. HTR7 geenin ekspressio puolestaan oli koholla terveiden koulujen oireilevilla oireettomiin verrattuna. Tämän geenin ekspressio oli myös koholla terveiden koulujen oireellisilla verrattuna kosteusvauriokoulujen oireileviin.

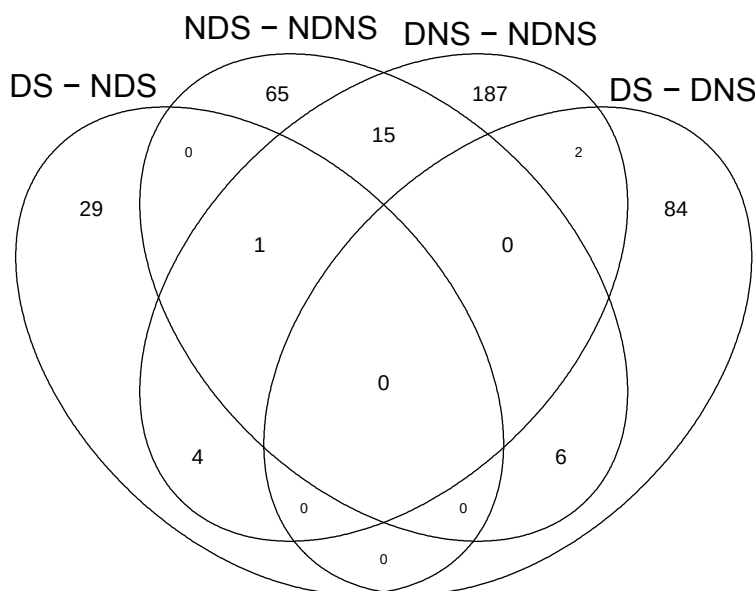


Kuva 5. Nenäepiteelinäytteet: yksittäisten geenien tilastolliset erot, kun terveitä kouluja verrattiin sairaisiin kouluihin oireilun suhteen. Geenit valittiin kuvassa 3 esitetyn tilastollisen analyysin perusteella. NS = oireeton (non-symptomatic), S = oireileva (symptomatic), log FC (= Fold Change).

4.2 Itseraportoituihin oireisiin liittyvät bioprofiilierot verisoluissa "terveiden" ja "sairaiden" koulujen opettajilla

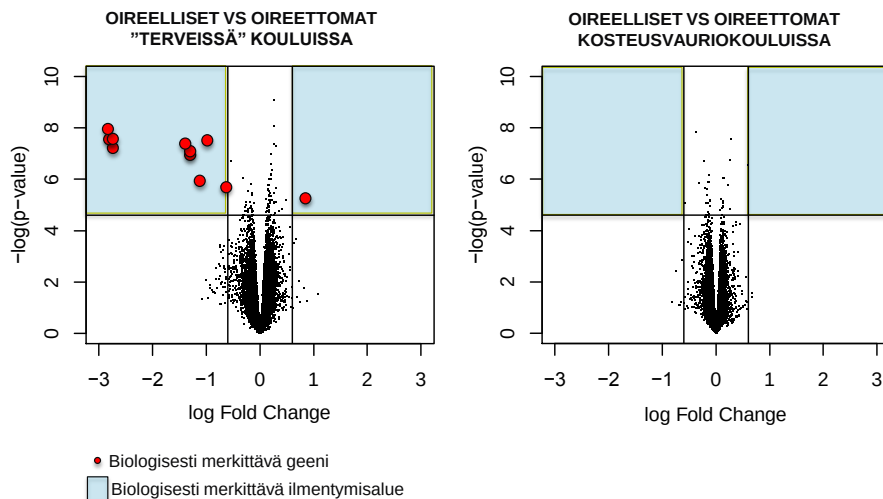
Geeniekspressioanalyysit tehtiin 52:lle PBMC soluista eristetylle RNA-näytteelle, jotka valittiin samoin kriteerein kuin nenäepiteelinäytteet. Tutkimusryhmien koot pyrittiin pitämään saman kokoisina, jotta virhe monimuuttuja-analyysissä olisi pienempi: lopullisessa analyysissä oli mukana terveistä kouluista 11 oireettoman ja 10 oireilevan sekä sairaista kouluista 15 oireettoman ja 16 oireilevan opettajan verinäytteet.

Kun alaryhmien geeniekspressiotasoa vertailtiin toisiinsa, niin havaittiin, että oireellisten ja oireettomien opettajien vertailussa (non-damaged symptomatic vs non-damaged non-symptomatic; NDS vs NDNS; Kuva 6) tunnistettiin 87 tilastollisesti merkittävää geenimuutosta terveissä kouluissa; näistä geeneistä 65 ei löytynyt mistään muusta ryhmästä. Oireettomien ja oireellisten geeniekspressiota vertailtaessa kosteusvauriokouluissa tunnistettiin 92 (damaged symptomatic vs damaged non-symptomatic; DS vs DNS) tilastollisesti merkittävää geenimuutosta; näistä geeneistä 84 ei löytynyt mistään muusta ryhmästä.



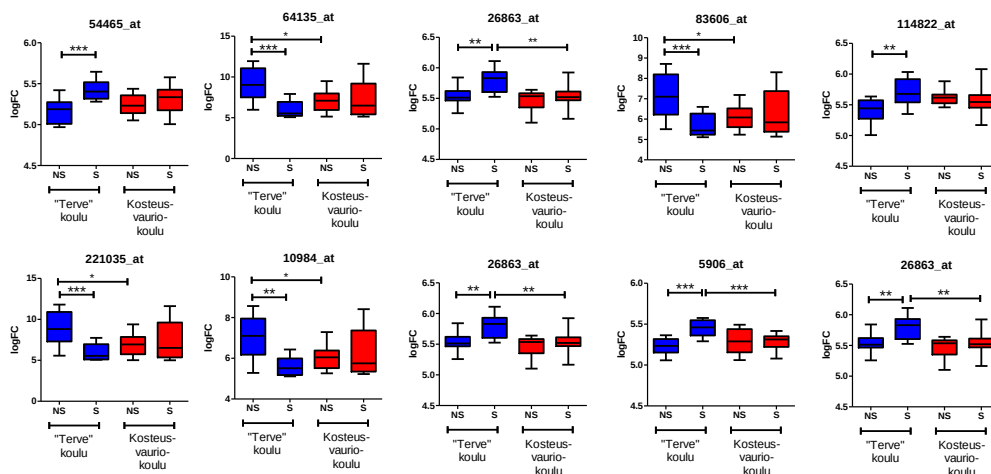
Kuva 6. Verisolunäytteet: tilastollisesti merkittävät geenimuutokset siruanalyysissä Venn-kuvaajalla esitetynä. DS-NDS = oireilevat kosteusvauriokouluissa verrattuna oireilevat terveissä kouluissa; NDS-NDNS = oireilevat terveissä kouluissa verrattuna oireettomat terveissä kouluissa; DNS-NDNS = oireettomat kosteusvauriokouluissa verrattuna oireettomat terveissä kouluissa; DS-DNS = oireilevat kosteusvauriokouluissa verrattuna oireettomat kosteusvauriokouluissa.

Kuten nenäepiteelinäytteissäkin, tilastollisesti merkittävien geenimuutosten voimakkuus (logFC) verisolunäytteissä kosteusvauriokohteissa oli erittäin pieni, mikä kyseenalaistaa geenimuutoksen biologisen merkityksen. Kun geenimuutoksen voimakkuus otettiin analyysissä huomioon, geeniekspressioissa havaittiin mahdollisia biologisesti merkittäviä eroavuuksia oireellisten ja oireettomien välillä ainoastaan terveissä kouluissa, kun taas kosteusvauriokouluissa geeniekspression voimakkuus oli hyvin pieni (Kuva 7).



Kuva 7. Verisolut: tilastolliset eroavuudet geeniekspressiossa terveissä ja sairaissa kouluissa oireilun suhteen. Geenejä, joiden $-\log p$ -arvo oli < 4.5 ja $\log_2$ ilmentymismuutos $> |0.58|$ (punaiset pallot), pidettiin potentiaalisti biologisesti merkittävinä geenimuutoksina.

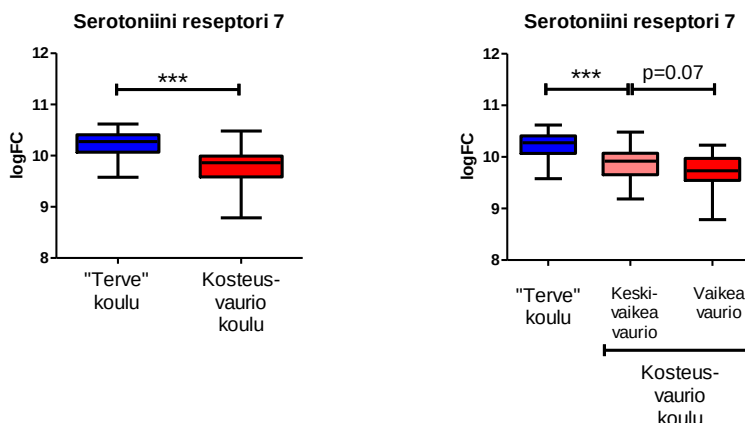
Analysoitaessa yksittäisten, potentiaalisti biologisesti merkittävien, geenien ekspressiota potilaskohtaisesti havaittiin, että kosteusvauriokouluissa ei esiintynyt eroja oireilevien ja oireilemattomien välillä (Kuva 8). Tilanne oli erilainen terveissä kouluissa, siellä joidenkin yksittäisten geenien ekspressio oli joko noussut tai laskenut oireilevilla verrattuna oireettomiin.



Kuva 8. Verisolut: yksittäisten geenien tilastolliset erot, kun verrattiin terveitä kouluja sairaisiin kouluihin oireilun suhteen. NS = oireeton (non-symptomatic), S = oireileva (symptomatic), log FC (= Fold Change).

4.3 Bioprofiilierot "terveiden" ja "sairaiden" koulujen opettajilla nenäepiteelissä, kun oireilua ei oteta huomioon

Hankkeessa arvioitiin myös kosteusvaurioaltistumisen merkitystä nenäepiteelin geeniekspressioon oireilua huomioimatta. Kun geenien ekspressiotasojen tilastollisessa analyysissä tehtiin monitestauskorjaus, joka ovat tarpeen tuhansia muuttujia sisältävän aineiston käsittelyssä, ainoastaan serotoniini reseptori 7 erosi merkittävästi terveiden ja sairaiden koulujen opettajilla nenäepiteelinäytteissä, kun oireilua ei otettu huomioon (Kuva 9). Geenin ekspressio oli alentunut kosteusvauriokouluissa verrattuna terveisiin kouluihin. Lisäksi havaittiin, että vaikeasti vaurioituneissa kouluissa lasku oli suurempaa kuin keskivaikeasti vaurioituneissa kouluissa, vaikka ero ei ollut tilastollisesti merkitsevä.



Kuva 9. Nenäepiteelinäytteet: serotoniinireseptori 7 geenin ekspressiotason eroavuus terveiden koulujen ja kosteusvauriokoulujen välillä – post-hoc korjauksen jälkeen. log FC (= Fold Change).

4.4 Transkriptomiikkatulosten validointi

DNA-mikrotulosten validointi tehtiin 134 nenäepiteeli- ja 157 PBMC-näytteellä. Validointi tehtiin usealle geenille (IFIH1, CCR9, DAGLA, REEP3, MARCH5, SPON1, SCNN1B, UBASH3A, CAMK4, IL17RC, CBX2, FBLN2, HTR7, SLC39A2, ACCN3, TNNT1, FCGR2B, CHEK1, ZFP1, GPR172B, RUND3C3B, ANKRD2, MYOZ1, OTOS, CALM1, MOSPD1, TCEAL6, TBPL1, CRCP, VPS36), jotka valittiin havaittujen tilastollisten erojen perusteella, kun eri koeryhmiä vertailtiin keskenään. Score-arvot laskettiin kaavalla $\log(p\text{-arvo}) \times |\log FC|$ ja geenit analysoitiin, kun score oli ≥ 2 . Lisäksi validoitiin geenit, jotka erosivat tilastollisesti merkitsevästi epiteelisolunäytteissä ennen post-hoc korjausta.

Validointi kvantitatiivista RT-PCR:ää käyttämällä paljasti, että mikrosiruanalysoinnissa tilastollisesti eronneet geenit eivät eronneetkaan enää tilastollisesti merkitsevästi eri ryhmien välillä suu-remmassa tutkimusmateriaalissa. Tämä johtuu todennäköisesti siitä, että geenimuutosten voimakkuus (logFC) ja tilastollinen merkittävyys mikrosiruanalyysissä oli vähäinen, myöskin tutkimusryhmien koko oli suhteellisen pieni.

Tutkimusryhmällemme on meneillään useita muita hankkeita, joissa olemme onnistuneesti validoineet mikrosiruanalyysissä tunnistetut geenimuutokset RT-PCR tekniikalla. Geenimuutosten voimakkuuden ja tilastollisen merkittävyyden suhteellinen pienuus mikrosiruanalyysissä on todennäköisesti seurausta siitä, että tutkittava ilmiö ei ole tarpeeksi vahva ja selvärajainen, jotta se voitaisiin havaita tämän tutkimuksen kaltaisessa koeasetelmassa ja tutkimusmenetelmillä.

Ilmiön vahvuuteen ja selvärajaisuuteen vaikuttaa toisaalta oireiden itseraportointiin liittyvä mahdollinen raportointiväärästymä, joka sekoittaa tutkittavia ryhmiä sekä kliinisten oireiden monimuotoisuus ja oireiden lievä vakavuusaste. Edelleen on otettava huomioon, että potilasryhmiä ei ole jaettu lääkärin tekemän diagnoosin mukaan, joka merkittävästi vaikuttaa ryhmäjaon selkeyteen. On myös mahdollista, että kosteusvaurioaltistumiseen liittyvät oireet välittyvät valtaosin keskushermoston ja neuraalisen järjestelmän kautta, jolloin kohdekudoksessa tai verisoluissa ei voida havaita erittäin heikkoja signaaleja luotettavasti mikrosirumenetelmällä.

5 POHDINTA

Kotien ja julkisten rakennusten kuten sairaaloiden, koulujen ja päiväkotien kosteusvauriot ovat viime vuosina olleet yhä kasvava ongelma Suomessa. Lukuisat suomalaiset altistuvatkin kosteusvauriorakennuksissa mikrobeille, niiden aineenvaihduntatuotteille ja kostuneiden materiaalien päästöille. Tähän liittyy tilojen käyttäjien oireilu ja sairastuminen sekä lisäksi mahdollinen työkyvyn menetys. Käytännössä on hyvin vaikeaa selvittää, kuinka paljon kosteusvaurioilla on vaikutusta oireiluun ja sairastumisiin, koska siihen soveltuvia diagnostisia työkaluja tai biologisia merkkiaineita, joiden avulla voitaisiin osoittaa yhteys kosteusvaurioiden ja terveysvaikutusten välillä, ei ole olemassa. Nykyisen käytännön mukaan ammattiastmadiagnoosi kosteusvauriokohteissa voidaan tehdä PEF (Peak Expiratory Flow)-työpaikkaseurannalla. Osa potilaista ei pysty tekemään tätä luotettavasti ja lisäksi tutkimukseen liittyy monia herkkyys- ja spesifisyysongelmia.

Tässä Työsuojelurahaston rahoittamassa projektissa olemme etsineet kosteusvaurio-oireiluun liittyviä spesifisiä biologisia merkkiaineita tai merkkiaineprofiileja. Lähtömateriaalina oli kontrolli- ja kosteusvauriokoulujen opettajilta saadut limakalvo- ja verinäytteet. Limakalvonäytteet, erityisesti nenäepiteelistä, valittiin tutkimuskohteeksi, koska ne ovat todennäköisin reitti, mitä kautta kosteusvauriorakennuksissa olevat mikrobit ja niiden komponentit samoin kuin hengitysilmassa olevat kostuneista rakenteista erittyvät tuotteet pääsevät vaikuttamaan elimistössä. Verinäytteistä on lisäksi mahdollista tutkia systeemisiä vaikutuksia, joita kosteusvauriot voisivat aiheuttaa altistuneissa ihmisissä. Kumpikin näytetyyppi on myös helposti saatavilla.

Nenäepiteelisolujen ja veren PBMC solujen transkriptomiikka-analyysissä mikrosiruilla havaittiin vain pieniä tilastollisesti merkitseviä eroja eri geenien ilmentymisessä verrattaessa keskenään terveiden ja sairaiden koulujen oireettomia ja oireilevia. Vauriokouluissa ei voitu havaita biologisesti merkittäväksi luokiteltavia eroja oireiluun liittyen, ja terveissä kouluissa voitiin havaita vähäisiä eroja muutaman geenin ilmentymisessä oireettomien ja oireilevien välillä. Vaikuttaisikin siltä, että itseraportointi ei ollut riittävä tapa erotella oireettomia oireilevista.

Kun koulutyyppejä verrattiin keskenään erottelematta opettajia oireettomiin ja oireileviin, niin monimuuttuja korjauksen jälkeen ainoaksi merkittävästi eroavaksi geeniksi paljastui nenäepiteelinäytteissä serotoniini reseptori 7. Eroavuudet serotoniinireseptorin ilmentymistasoissa kontrolli- ja kosteusvauriokoulujen opettajien limakalvoepiteelillä saattaa viitata hermoston rooliin kosteusvaurioaltistumisessa.

Tilastollisesti eniten eroavien geenien validointi huomattavasti suuremmalla määrällä tutkimushenkilöitä ei kuitenkaan vahvistanut mikrosiruanalyysituloksia, joten tuloksien käytännön merkitykseen on suhtauduttava varovaisesti. Tähän on voinut vaikuttaa se, että havaitut tilastolliset

erot ja geenimuutosten voimakkuus olivat suhteellisen pieniä. Mahdollisesti myös näytemäärien, erityisesti kontrollikouluista, olisi pitänyt olla suurempia, jotta olisi voitu havaita luotettavasti eroja eri tutkimusryhmien välillä.

On oletettavaa, että bioprofiilierot voidaan tunnistaa lääkärin diagnosoimista tautiryhmistä huomattavasti paremmin ja luotettavammin potilaan itseraportoituihin oireisiin verrattuna. Siksi tulevaisuudessa olisi tärkeää tutkia lääkärin diagnoosin saaneiden kosteusvauriopotilaiden bioprofiileja – esim. potilailla, joilla on todettu kosteusvaurioaltistumiseen liittyvä astma. Jatko-tutkimuksissa on myös mahdollista analysoida kerättyjen silmäharjanäytteiden bioprofiilia samoin kuin nenähuuhtelunäytteiden proteomiikkaa. Toinen jatkotutkimuslinja olisi katsoa, muuttuuko kerättyjen verisolujen bioprofiili, kun soluja stimuloidaan mikrobeilla tai mikrobi-komponenteilla. Tämä lähestymistapa voisi paljastaa jotakin oireilun taustalla vaikuttavista biokemiallisista mekanismeista. Epigeneettiset tekijät voivat myös vaikuttaa oireilun ilmaantumiseen, joten seuraavassa vaiheessa olisi syytä selvittää mahdollisia epigeneettisiä muutoksia.

Perimmäinen mekanismi itseraportoidun kosteusvaurio-oireilun taustalla jää edelleen epäselväksi, tutkimuksessa ei myöskään tunnistettu kosteusvaurio-oireilulle ominaisia ja luotettavia merkkiaineita. Näyttäisi myös siltä, että itseraportoituun kosteusvaurio-oireiluun ei liity tavanomainen kohdekudoksesta tai verestä mitattava tulehdustila, vaan osa ihmisistä reagoi kosteusvaurio-olosuhteisiin kokonaisvaltaisesti, esimerkiksi hermoston välityksellä. Tulevissa tutkimuksissa tulee huomioida kriittisesti myös psykososiaalisten tekijöiden merkitys ja syyosuus oireilun mahdollisena selittäjänä.

6 JOHTOPÄÄTÖKSET JA TULOSTEN HYÖDYNTÄMINEN

Tutkimuksessa havaittiin ainoastaan viitteitä mahdollisista biologisesti merkittävistä eroista terveissä kouluissa oireettomien ja oireellisten välillä, mutta ei vauriokouluissa. Tutkimustulos osoittaa, että oireiden itseraportointi erottelee huonosti limakalvon ja verisolujen biokemiallisia geeniprofiileja. Näin ollen bioprofiilien liittäminen itsekuvattuihin ylähengitystieoireisiin on hankalaa. On myös mahdollista, että kosteusvauriokouluissa on erityisen suuri raportointivääristymä oireiden kuvaamisessa- toisin sanoen osa opettajista, joilla ei ole kliinisesti selkeää syytä, kokee oireita ja raportoi niistä.

Erot serotoniinireseptorin ilmentymisessä kontrolli- ja kosteusvauriokoulujen opettajien limakalvoepiteelin välillä saattavat viitata hermoston liittymiseen tavalla tai toisella kosteusvaurioaltistumiseen. Koska geenien ilmentymiseroja ei voitu varmistaa suuremmassa potilasmateriaalissa, niin tulosten käytännön merkitykseen on kuitenkin suhtauduttava varauksella.

Kerätty näyteaineisto kontrolli- ja kosteusvauriokouluista mahdollistaa useita jatkotutkimusmahdollisuuksia koskien kosteusvaurio-oireilua ja mahdollisten biologisten merkkiaineiden etsintää. Jatkossa on mahdollista analysoida kerättyjen silmäharjanäytteiden bioprofiilia samoin kuin nenähuuhtelunäytteiden proteomikkaa. Voidaan myös selvittää, muuttuuko kerättyjen verisolujen bioprofiili, kun soluja stimuloidaan mikrobeilla tai mikrobikomponenteilla. Tutkimuspotilailta kerättyjä mikrobiominäytteitä voidaan myös analysoida ja epigenetiikan tutkiminen on myös mahdollista pakastetuista PBMC soluista.

Saamamme tulokset osoittavat, että tulehdusvasteen lisäksi tarvitaan mahdollisesti hermostolisten tekijöiden seulontaa systeemibiologisin keinoin, mikäli halutaan tarkempaa tietoa kosteusvauriomekanismeista ja löytää kosteusvauriodiagnostiikkaa helpottavia merkkiaineita ja bioprofiileja. Tulevissa tutkimuksissa on myös tärkeää tutkia lääkärin diagnoosin saaneiden kosteusvauriopotilaiden bioprofiileja – esimerkiksi potilailla, joilla on todettu kosteusvaurioaltistumiseen liittyvä astma.

LÄHTEET

1. Nevalainen A, Partanen P, Jaaskelainen E, Hyvärinen A, Koskinen O, Meklin T, et al. Prevalence of moisture problems in Finnish houses. *Indoor Air* 1998; 4:45-9.
2. Reijula K. Moisture-problem buildings with molds causing work-related diseases. *Adv Appl Microbiol* 2004; 55:175-89.
3. Reijula K. Sairaaloiden kunto ja ilmanvaihto. Sosiaali- ja terveystieteiden tutkimuskeskuksen työryhmämuistio 2005; 3.
4. Pekkanen J, Lampi J. Moisture and mold damages of buildings in relation to health. *Duodecim*. 2015; 131:1749-55.
5. Reijula K, Ahonen G, Alenius H, Holopainen R, Lappalainen S, Palomäki E, Reiman M. Rakennusten kosteus- ja homeongelmat. Eduskunnan tarkastusvaliokunnan julkaisu 1/2012.
6. Bornehag CG, Blomquist G, Gyntelberg F, Jarvholm B, Malmberg P, Nordvall L, et al. Dampness in buildings and health. Nordic interdisciplinary review of the scientific evidence on associations between exposure to "dampness" in buildings and health effects (NORDDAMP). *Indoor Air* 2001; 11:72-86.
7. Bush RK, Portnoy JM. The role and abatement of fungal allergens in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 107:S430-40.
8. Kurup VP, Shen HD, Banerjee B. Respiratory fungal allergy. *Microbes Infect* 2000; 2:1101-10.
9. Hyvärinen A. Characterizing moisture damaged buildings - environmental and biological monitoring. Kansanterveyslaitoksen julkaisuja A8 2002.
10. Hintikka EL. The role of stachybotrys in the phenomenon known as sick building syndrome. *Adv Appl Microbiol* 2004; 55:155-73.
11. Yli-Pirila T, Huttunen K, Nevalainen A, Seuri M, Hirvonen MR. Effects of co-culture of amoebae with indoor microbes on their cytotoxic and proinflammatory potential. *Environ Toxicol* 2007; 22:357-67.
12. Gorny RL, Reponen T, Willeke K, Schmechel D, Robine E, Boissier M, et al. Fungal fragments as indoor air biocontaminants. *Appl Environ Microbiol* 2002; 68:3522-31.
13. Tuomi T, Reijula K, Johnsson T, Hemminki K, Hintikka EL, Lindroos O, et al. Mycotoxins in crude building materials from water-damaged buildings. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66:1899-904.
14. Fogelmark B, Sjostrand M, Williams D, Rylander R. Inhalation toxicity of (1-->3)-beta-D glucan: recent advances. *Mediators Inflamm* 1997; 6:263-5.

15. Leino MS, Alenius HT, Fyhrquist-Vanni N, Wolff HJ, Reijula KE, Hintikka EL, et al. Intranasal exposure to *Stachybotrys chartarum* enhances airway inflammation in allergic mice. *Am J Respir Crit Care Med* 2006; 173:512-8.
16. Kankkunen P, Rintahaka J, Aalto A, Leino M, Majuri ML, Alenius H, et al. Trichothecene mycotoxins activate inflammatory response in human macrophages. *J Immunol* 2009; 182:6418-25.
17. Kankkunen P, Teirila L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol* 2010; 184:6335-42.
18. Öhman T, Teirilä L, Lahesmaa-Korpinen A-M, Cypryk W, Veckman V, Saijo S, Wolff H, Hautaniemi S, Nyman TA, Matikainen S. Dectin-1 pathway activates robust autophagy-dependent unconventional protein secretion in human macrophages. *J Immunol* 2014; 192:5952-62.
19. Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn W, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 2004; 5:R80
20. Smyth GK. Limma: linear models for microarray data. In: "Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor". Gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R, Huber W, Springer, New York, 2005; 397-420.

Kosteusvauriot ovat yleisiä rakennuksissa ja ne johtavat mikrobien kasvuun kostuneissa rakenteissa. Niihin liittyy tilojen käyttäjien oireilua ja sairastumisia. Nykyisin ei ole diagnostisia työkaluja tai biologisia merkkiaineita, joilla voitaisiin osoittaa oireiden aiheutuvan altistumisesta kosteusvauriomikrobeille.

Tässä Työsuojelurahaston rahoittamassa hankkeessa etsittiin systeemibiologisin menetelmin merkkiaineita kosteusvaurio-oireilulle. Tutkittavat olivat oireilevia tai oireettomia henkilöitä normaaleista tai kosteusvaurioituneista kouluista. Oireilutiedot perustuivat itseraportointiin ja näyttemateriaalina oli tutkittavien limakalvo- ja verinäytteet.

Transkriptomiikka-analyysillä havaittiin vähäisiä eroja oireilevien ja oireettomien välillä "terveissä" kouluissa, mutta ei vauriokouluissa. Monitetauskorjauksen jälkeen vain serotoniinireseptori 7 erosi merkittävästi normaali- ja vauriokoulujen opettajilla. Tulosten validointi ei kuitenkaan kyennyt vahvistamaan havaittuja eroja.