

TYÖPERÄISEN ÄRSYTYSEKSEEMAN JA  
KOSKETUSALLERGIAN EROTUSDIAGNOSTIIKKAAN  
SOVELTUVIEN UUSIEN  
MERKKIAINEIDEN KARTOITTAMINEN

*Loppuraportti*

Nanna Fyhrquist, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

**Hankkeen nimi:**

TYÖPERÄISEN ÄRSYTYSEKSEEMAN JA KOSKETUS-ALLERGIAN  
EROTUSDIAGNOSTIIKKAAN SOVELTUVIEN UUSIEN MERKKIAINEIDEN  
KARTOITTAMINEN

**Hankenumero:** 113314

**Vastuullinen tutkija:**

Nanna Fyhrquist, FT, dosentti, yliopistotutkija

Unit of Systems Toxicology

Institute of Environmental Medicine (IMM)

Nobels väg 13 (Box 210)

17177 Stockholm

Sweden

**Tutkimusryhmä:**

Harri Alenius, FT, professori, IMM, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

Dario Greco, FT, professori, Tampereen Yliopisto, Tampere, Finland

Alina Suomalainen, FM, tutkija, Helsingin Yliopisto, Helsinki, Finland

Sari Suomela, LT, erikoislääkäri, Työterveyslaitos, Helsinki, Finland

Kristiina Aalto-Korte, LT, dos, ylilääkäri, Työterveyslaitos, Helsinki, Finland

Maria Pesonen, LT, apulaisylilääkäri, Työterveyslaitos, Helsinki, Finland

ISBN 978-951-51-4858-2 (nid.)

ISBN 978-951-51-4859-9 (PDF)

# SISÄLLYSLUETTELO

<b>1</b>	<b>TIIVISTELMÄ</b> .....	<b>5</b>
<b>2</b>	<b>JOHDANTO</b> .....	<b>7</b>
<b>2.1</b>	<b>LÄHTÖKOHTA JA TAUSTAT</b> .....	<b>7</b>
2.1.1	Ärsytyskosketusihottuma ("ICD").....	8
2.1.2	Allerginen kosketusihottuma ("ACD").....	8
2.1.3	Käsi-ihottuma.....	9
2.1.4	Kosketusekseen altisteet ja niiden vaikutukset immuunijärjestelmään .....	10
2.1.5	Systeemibiologian hyödyntäminen biolääketiedessä.....	12
2.1.6	Transkriptomiikka.....	12
2.1.7	Bioinformatiikka ja systeemibiologia.....	12
<b>2.2</b>	<b>TAVOITTEET, TULOSTEN HYÖTY JA SOVELLETTAVUUS</b> .....	<b>13</b>
2.2.1	Tutkimuksen tavoitteet .....	13
2.2.2	Tulosten hyöty ja sovellettavuus.....	14
2.2.3	Käyttö epikutaanitestauksessa.....	14
2.2.4	Käyttö käsi-ihottuman tutkimuksessa .....	15
<b>2.3</b>	<b>SUUNNITELLUT TEHTÄVÄT JA MENETELMÄT</b> .....	<b>15</b>
2.3.1	Tutkimusstrategia .....	15
2.3.2	Potilaat ja ryhmien valintakriteerit.....	16
2.3.3	Tutkimusnäytteiden otto .....	17
2.3.4	Transkriptomiikka.....	18
2.3.5	Bioinformatiikka ja systeemibiologia.....	19
2.3.6	Histologia ja immunohistokemia.....	19
2.3.7	Eettiset näkökohdat .....	20
2.3.8	TIEDOTUS JA MUU TIEDON HYÖDYNTÄMINEN.....	20
<b>3</b>	<b>MATERIAALIT JA MENETELMÄT</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1</b>	<b>Potilaskeräys</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2</b>	<b>Potilasnäytteiden käsittely ja analyysi</b> .....	<b>22</b>
3.2.1	Ihonäytteiden mikrosiruanalyysit.....	22
3.2.2	Klusterointianalyysi .....	23
3.2.3	Geeniverkostoanalyysi.....	23
3.2.4	Biomarkkereiden tunnistaminen.....	24
3.2.5	Sirutulosten validointi qPCR:llä .....	24
3.2.6	Ihonäytteiden miRNA-mikrosiruanalyysit.....	24
3.2.7	Ihonäytteiden immunohistokemialliset värjäykset .....	24
<b>4</b>	<b>TULOKSET</b> .....	<b>26</b>
<b>4.1</b>	<b>Kosketusallergeenit aiheuttavat T-solujen ja DC-solujen kerääntymistä ihoon</b> .....	<b>26</b>
<b>4.2</b>	<b>Allergeenit ja ärsyttävät aineet aktivoivat ihossa tuhansia genejä</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3</b>	<b>Klusteri-analyysi paljastaa kaikkien altistusten ryhmittymisen joko allergeeneihin tai ärsyttäviin aineisiin</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4</b>	<b>Geeniverkostot paljastavat toiminnallisia eroja allergeenien ja ärsyttävien aineiden välillä</b> <b>30</b>	
<b>4.5</b>	<b>GARF-algoritmiin perustuva luokittelu tarjoaa luotettavia biomarkkerimalleja erottelemaan kosketusallergian ärsytykseemasta</b> .....	<b>30</b>
<b>4.6</b>	<b>Biomarkkerien validointi erillisessä potilasryhmässä</b> .....	<b>32</b>
<b>4.7</b>	<b>Testireaktion voimakkuus assosioituu geenien ekspressiotasoihin</b> .....	<b>32</b>

<b>5</b>	<b>TULOSTEN TARKASTELU .....</b>	<b>32</b>
5.1	Hankkeen toteuttamiseen osallistuneiden nimet .....	34
5.2	Toteutuneet kulut.....	34
5.3	Hankkeen työskentelystä ja sen johtamista.....	35
5.4	Toteutetut ja sisäiset ja ulkoiset tiedotustoimet .....	36
5.5	Raportointiaikana syntyneet julkaisut tai muut tuotokset .....	36
<b>6</b>	<b>KIRJALLISUUSLUETTELO.....</b>	<b>38</b>

## 1 TIIVISTELMÄ

Viihästyneet kosketusallergiat ovat väestössä tavallisia: 1966-2007 välisenä aikana julkaistujen väestötutkimuksien mediaaniprevalenssi 15–69 -vuotiailla on 20 %. Kosketusallergian aiheuttajia tunnetaan n. 4000 ja suuri osa niistä voi aiheuttaa työperäistä allergista kosketusihottumaa. Allerginen kosketusihottuma on ärsytyskosketusihottuman jälkeen toiseksi tärkein ammatti-ihotautidiagnoosi Suomessa: Työperäisten sairauksien rekisterin mukaan vuosina 2005–2010 n. 1/3 hyväksytyistä ammatti-ihotaudeista oli allergisia kosketusihottumia ja n. 40% ärsytysihottumia. Ärsytysihottuma syntyy ihoon kohdistuvasta ärsytyksestä, joka voi olla joko kemiallinen tai fysikaalinen. Ärsytysihottuma ja allerginen ihottuma ovat kliinisesti samankaltaisia sairauksia, joiden erottelu perustuu allergiatesteihin, altistumisselvityksiin ja seurantaan. Kosketusallergiaa tutkitaan epikutaanitestillä, jonka ongelmana on erottaa allergiset reaktiot epäspesifeistä ärsytysreaktioista. Tämä ongelma korostuu tutkittaessa potilaiden omia työpaikalta ja kotoa tuotuja tuotteita. Ainoa tehokas keino hallita kosketusallergian oireita on välttää ihokosketusta aiheuttajakemikaaliin. Tarkka diagnoosi vaatii hankalissa tapauksissa toistuvia epikutaanitestejä, kontrollipotilaiden tutkimista ja monimutkaisia altistumisselvityksiä.

Tutkimuksen ensimmäisessä vaiheessa otettiin TTL:n ammatti-ihotautitutkimuksissa olevilta potilailta ihokoepaloja muutaman allergeenin aiheuttamista tyypillisistä allergisista epikutaanitestireaktioista ja ärsyttävällä testiaineella aiheutetusta ärsytysreaktiosta. Tämän vaiheen tavoitteena oli tunnistaa systeemibiologisen lähestymistavan avulla kosketusallergiaan liittyviä biologisia merkkiaineita tai merkkiaineprofileja. Ihokoepalojen tulehdustapahtumia tutkittiin transkriptomiikan keinoin. Transkriptomiikasta kerätyt havainnot rakennettiin systeemibiologian keinoin kosketusallergia-oireilua selittäväksi malliksi, joka mahdollisti oireiluun liittyvien biomerkkiaineiden tai merkkiaineprofileiden tunnistamisen. Tutkimuksen toisessa vaiheessa TTL:n ammatti-ihotautitutkimuksissa olevilta potilailta otettiin ihokoepaloja samalla tavalla kuin ensimmäisessä vaiheessa, muutaman allergeenin aiheuttamista tyypillisistä allergisista epikutaanitestireaktioista ja ärsyttävällä testiaineella aiheutetusta ärsytysreaktiosta. Tämän vaiheen tavoitteena oli vahvistaa siruanalyysin tuloksia qPCR:llä. Tunnistettujen merkkiaineiden diagnostisia hyödyntämis-mahdollisuuksia testataan jatkossa myös iholta otetuista teppinäytteistä ja verinäytteistä, ja menetelmää on tarkoitus optimoida kustannustehokkaaksi.

Uusi menetelmä erottaa allerginen reaktio ärsytysreaktiosta yksinkertaistaa epikutaanitestausta erityisesti potilaiden omia aineita tutkittaessa. Jos koepalatutkimuksen tulos ei viittaa allergiaan, voidaan uusintatestauksista luopua. Samoin jos ihottumasta otetussa koepalassa ei ole allergiaan viittaavaa löydöstä, voidaan tietyissä tapauksissa epikutaanitestauksesta luopua kokonaan. Toistuvissa ja kroonisissa ihottumissa uudet ihotestaukset ja altistumisselvitykset olisivat tarpeen vain jos ihokoepalalöydös viittaa allergiseen mekanismiin.

## 2 JOHDANTO

### 2.1 LÄHTÖKOHTA JA TAUSTAT

Kemiallisten tekijöiden aiheuttamia ammattitauteja ilmoitetaan vuosittain Työperäisten sairauksien rekisteriin noin 2000 tapausta eli 0,8 tapausta 1000 työssä käyvää kohden. Suurin tautiryhmä on ihotaudit, joihin kuuluvat allergiset ihottumat ja ärsytysihottumat. Ärsytysihottuma syntyy ihoon kohdistuvasta ärsytyksestä, joka voi olla joko fysikaalinen tai kemiallinen. Lähes yhtä yleinen allerginen kosketusihottuma syntyy herkistymisen kautta. Kosketusallergia on pysyvä, koska allergian kehittymisen seurauksena elimistössä syntyy pysyvä reagoititavan muutos.

Allerginen ja ärsytyskosketusihottuma ovat ekseeman eri muotoja ja kliinisesti samankaltaisia sairauksia, joiden erottelu ei ole yksinkertaista (1-3). Diagnoosi perustuu kliiniseen taudinkuvaan, esitietoihin ja ihotesteihin. Epikutaanitestien tuloksen luku vaatii kokemusta ja testeissä on huomattavia virhemahdollisuuksia.

Allergisen kosketusihottuman tärkein hoito on aiheuttajan (allergeenin) välttäminen. Monesti potilas altistuu tietämättään allergeeneille, jolloin ihottuma voi kroonistua. Jos kosketusekseemaa ei hoideta tai sitä ei saada hallintaan, siitä voi kehittyä pitkäaikainen, hankala ja elämänlaatua huomattavasti alentava iho-ongelma. Ekseema voi vaikeuttaa tai estää työntekoa, ja kosketusallergiat on tärkeä ottaa huomioon ammatinvalinnassa.

Työperäisten ihosairauksien arvioidaan aiheuttavan Euroopan Unionin alueella 5 miljardin euron vuosittaiset kustannukset, jotka aiheutuvat hoidosta, erilaisista korvauksista ja työajan menetyksestä. Yksilötasolla pitkäaikaiset iho-oireet voivat johtaa työn menetykseen ja pitkäaikaistyöttömyyteen (European Agency for Safety and Health at Work, EU-25 report, 2008).

Ammatti-ihottuman osoittamiseksi on ammattitautilain mukaisesti osoitettava syy-yhteys ihottuman ja työpaikalla tapahtuneen altistumisen välillä. Koska työpaikassa on useita erilaisia altisteita, ja mahdollisia aiheuttajia tunnetaan tuhansia, tarkka ammattitautidiagnostiikka vaatii usein toistuvia ihotestauksia ja monimutkaisia altistumisselvityksiä. Ihotautilääkäreiltä puuttuu diagnostinen työkalu, jolla voidaan luotettavasti tunnistaa allerginen kosketusihottuma ihottumasta tai testireaktiosta otetusta koepalasta. Ammattitautidiagnoosin teko vaatiikin tällä

hetkellä ihotautilääkäriltä pitkää kokemusta. Systemibiologiset tutkimusmenetelmät tarjoavat houkuttelevan tavan löytää uusia markkereita parantamaan ammatti-ihottumien ja muiden ekseemojen diagnostiikkaa.

### 2.1.1 Ärsytyskosketusihottuma ("ICD")

Ärsytyskosketusihottuma (ärsytyskosketusekseema, "ICD") johtuu ihon sarveiskerroksen vaurioitumisesta ulkoisen tekijän vaikutuksesta. Vaurioita aiheutuu erilaisilla mekanismeilla. Ärsytysihottuma on yleinen sairaus väestössä, ja se voi syntyä sekä työperäisten että kotiin ja vapaa-aikaan liittyvien altisteiden aiheuttamana. Työperäinen ärsytysihottuma on tärkein ammatti-ihotautiryhmä Suomessa. Työperäisten sairauksien rekisterin mukaan vuosina 2005–2010 hyväksyttiin 1260 työperäistä ärsytyskosketusihottumaa, mikä oli 41 % kaikista hyväksytyistä ammatti-ihotaudeista. Tavallisia työperäisen ärsytysihottuman syitä ovat märkätyö, likainen työ, elintarvikkeiden käsittely, pesuaineet, liuottimet, öljyt, monet muovikemikaalit, betoni ja sementti, ihon hautuminen tiiviin suojakäsineen alla ja ihon poikkeava hankautuminen. Työperäisen ärsytysihottuman diagnoosi on kliininen eli se perustuu tyypilliseen taudinkuvaan ja taudinkulkuun.

Käytännön kliinisessä työssä tehdään allergeitit (prick-testit ja epikutaanitit) allergioiden poissulkemiseksi. Ihoa ärsyttävät tekijät ovat tavallisia myös työpaikan ulkopuolella kotona ja harrastuksissa. Nämä tekijät pahentavat kaikkea käsi-ihottumaa, vaikka pääasiallinen syy olisi allerginen tai sisäsyntyinen rakenteellinen tekijä.

### 2.1.2 Allerginen kosketusihottuma ("ACD")

Allerginen kosketusihottuma (allerginen kosketusekseema, "ACD") syntyy viivästyneen soluvälitteisen kosketusallergian pohjalta. Viivästyneet kosketusallergiat ovat väestössä tavallisia: 1966-2007 välisenä aikana julkaistujen väestötutkimuksien mediaaniprevalenssi 15–69 -vuotiailla on 20 % (4). Viivästyneen kosketusallergian aiheuttajia (allergeeneja) tunnetaan n. 4000. Useimmat allergeenit voivat aiheuttaa työperäistä allergista ekseemaa. Allerginen kosketusihottuma on ärsytyskosketusihottuman jälkeen toiseksi tärkein ammatti-ihotautidiagnoosi Suomessa: Työperäisten sairauksien rekisterin mukaan vuosina 2005–2010 n. 1/3 hyväksytyistä ammatti-ihotaudeista oli allergisia kosketusihottumia (1023 tapausta).



Allergisen kosketusihottuman diagnostinen testi on epikutaanitesti, joka kestää n. viikon ja vaatii 3-4 käyntiä testilaboratoriossa. Testin määrää ja tulkitsee yleensä epikutaanitestaukseen perehtynyt ihotautilääkäri. Fyysisesti rasittavissa ammateissa tutkittava joutuu tavallisesti olemaan sairauslomalla koko testin ajan. Uusi testi tehdään yleensä aikaisintaan 2 kuukauden kuluttua edellisestä testauskerrasta. Epikutaanitesti on ihon altistustutkimus, jossa aiheutetaan ihon pienelle testialueelle allerginen kosketusihottuma. Menetelmään liittyy runsaasti virhelähteitä ja tulkinta vaatii kokemusta. Menetelmän ongelma on erottaa spesifit allergiset reaktiot epäspesifeistä ärsytysreaktioista. Monet tunnetut allergeenit ovat ihoa ärsyttäviä, ja testireaktioiden tulkinta ei ole aina helppoa kokeneellekaan ihotautilääkärille. Allergisen ja ärsytysreaktion erottaminen on hankalinta lievissä reaktioissa, joissa testialueella on punoitusta ja infiltraatiota, mutta ei näppyjä eikä rakkuloita. Ammattitautidiagnostiikassa pyritään mahdollisimman tarkkaan diagnoosiin ihottuman aiheuttajasta, jotta oireita voitaisiin ehkäistä tehokkaasti. Mitä perusteellisemmin tutkitaan, sitä useampi ihottuma paljastuu allergiseksi. Tarkkaan ammatti-ihotautidiagnostiikkaan kuuluu potilaan työpaikan ja kodin tuotteiden tutkiminen epikutaanitestein. Koska omat tuotteet eivät ole standardoituja testiaineita, on niiden aiheuttamien reaktioiden tulkinta aina jossain määrin epävarmaa. Allergeenin selvitys vaatii yleensä useampia epikutaanitestejä ja kontrollipotilaiden tutkimista. Kliinisessä työssä olisi suurta hyötyä, jos epäselvästä testireaktiosta voitaisiin ottaa koepala ja katsoa onko kyseessä viivästynyt kosketusallergia.

Allerginen ja ärsytyskosketusihottuma ovat ekseeman eri muotoja. Ihon ekseemareaktiossa olennainen histologinen muutos on ns. spongiforminen ihotulehdus riippumatta reaktion syystä (allergia, ärsytys tai sisäsyntyinen). Käytännön ihotautidiagnostiikassa ekseemasta ei oteta koepalaa, ellei kyse ole erotusdiagnostiikasta muiden ihosairauksien kuten psoriaasin suhteen. Nykyiset suositukset eivät tue koepalojen ottoa epikutaanitestireaktioista käytännön allergiadiagnostiikassa. Immunohistokemialliset tekniikatkaan eivät ole toistaiseksi tuoneet apua käytännön diagnostiikkaan allergisten ja ärsytysreaktioiden erottelemiseksi (5).

### 2.1.3 Käsi-ihottuma

Käsi-ihottuma on yleinen sairaus: teollistuneissa maissa n. 10 %:lla aikuisväestöstä on ollut käsi-ihottumaa viimeisen vuoden aikana (6), ja ihottumariskialoilla, esim. kampaajilla, käsi-

ihottuman esiintyvyys on huomattavasti suurempi, ainakin 20–30 % työntekijöistä kärsii käsi-ihottumasta. Käsi-ihottuma johtaa sairauslomiin (yli 7 päivää) n. 20%:ssa tapauksia ja työn vaihtoon n. 10%:ssa tapauksia (6).

Käsi-ihottuma ei ole yhtenäinen sairaus, vaan sen etiologia on moninainen. Ympäristön ärsyttävät tekijät pahentavat käsi-ihottumaa riippumatta sen etiologiasta, mutta ne voivat olla myös ihottuman pääsiallinen syy, jolloin kyseessä on ärsytyskosketusihottuma. Viivästyneet kosketusallergiat ilmenevät usein käsi-ihottumana, jolloin kyseessä on allerginen kosketusihottuma. Vallitsevan käsityksen mukaan käsiekseema voi syntyä myös välittömän IgE-välitteisen allergian pohjalta, jolloin kyseessä on proteiinikosketusihottuma. Atooppinen käsi-ihottuma johtuu atooppisesta ihon rakenteesta. Henkilöllä katsotaan olevan atooppinen ihonrakenne, jos hän on ollut atooppista ihottumaa aikaisemmin tai hänellä on sen oireita tutkimushetkellä. Atopiaan liittyvää käsi-ihottuma voi ilmetä ns. atoopikon ärsytysihottumana tai atooppisena kroonisena käsi-ihottumana.

Käsi-ihottuman syynä voi olla useampi edellä mainituista tekijästä yhtä aikaa (esim. ärsytys, kosketusallergia ja atooppinen ihon rakenne yhdessä). Ärsytyskosketusihottuma ja allerginen kosketusihottuma ovat pääasiassa ulkosyntyisiä eli eksogeenisiä sairauksia. Atooppinen ihon rakenne on esimerkki sisäsyntyisestä eli endogeenisestä tekijästä. Lisäksi on olemassa myös muuta ei-atooppisella pohjalla syntynyttä sisäsyntyistä käsi-ihottumaa, ns. krooninen epäspesifinen käsi-ihottuma, jonka etiologia on epäselvä. Käsi-ihottumia ei voi yleensä erottaa toisistaan ihottuman ulkonäön perusteella. Käsi-ihottuman tarkempi diagnoosi perustuu esitietoihin, ihotesteihin (epikutaanitesti ja ihopistotesti), sekä taudinkulun ja altistumisen analysointiin. Työterveyslaitoksen melko tuoreessa isossa työperäisen käsi-ihottuman aineistossa tärkein tekijä ennusteen kannalta oli ihottuman kesto diagnoosihetkellä, mikä korosta aikaisen diagnoosin merkitystä (7). Allergisella käsi-ihottumalla on usein hyvä ennuste, jos aiheuttaja voidaan poistaa.

#### 2.1.4 Kosketusekseeman altisteet ja niiden vaikutukset immuunijärjestelmään

Ihoa ärsyttäviä tekijöitä ovat jatkuva käsien pesu, kosteus, pöly ja lika, kuumuus tai kylmyys, mekaaninen hankaus, kypsentämättömien ruoka-aineiden käsittely (esim. kasvikset, liha, kala), tiiviit suojakäsineet, kemikaalit (esim. liuottimet ja öljyt), emäksiset aineet (esim. betoni,

sementti, kalkki), pesu- ja puhdistusaineet, sekä voiteiden ja kosmetiikan ainesosat. Ärsytykseema on monisyinen sairaus, jonka puhkeaminen riippuu sekä ulkoisista tekijöistä, kuten altisteen ominaisuudet, altistumäärä, altistuksen pituus, että sisäisistä tekijöistä, kuten ikä, geneettinen tausta, sukupuoli ja aikaisempi sairastelu (2). Ärsytysihottumia jaetaan useaan eri tyyppiin, riippuen ihottuman aiheuttajan ominaisuudesta. Vahvasti ärsyttävät aineet saavat tyypillisesti aikaan akuuttia ärsytysihottumaa, kun taas heikommin ärsyttävät aineet voivat aiheuttaa viivästynyttä akuuttia ärsytysihottumaa tai ärsytysreaktiota (8). Ärsytysihottuman tautimekanismeja tunnetaan varsin puutteellisesti, ja eri altisteet laukaisevat eri tulehdussignaalireittejä ihosta (9, 10). Kudosvaurioiden lisäksi ärsyttävä aine voi muuttaa solujen toimintaa niin että ne alkavat tuottaa histamiineja, happiradikaaleja tai sytokiineja. Akuuttiin ärsytysihottumaan liittyy tulehdusta, kun taas krooniseen ärsytykseemaan liittyy tyypillisesti keratinosyyttien hyperproliferaatiota.

Allerginen kosketusihottuma on soluvälitteisen allergian aiheuttamaa, johon liittyy immunologinen muisti. Viivästyneen (tyyppi IV) yliherkkyyksireaktion aiheuttajat ovat yleensä pienmolekyyllisiä kemikaaleja eli hapteneja, jotka tunkeutuvat helposti ihoon. Yleisin kosketusallergeeni kehittyneissä maissa on nikkeli, jolle on herkistynyt lähes 20 % nuorista naisista, ja seuraavaksi yleisin allergia on hajusteallergia. Kumin vulkanoimisaineet eli kumikemikaalit, erilaiset muovikemikaalit (kuten epoksihartsi), metallit koboltti ja kromi, hiusväri parafenyleenidiamiini ja säilöntäaine (kloori)metyyli-isotiatsolinoni ovat tärkeitä allergeeneja työelämässä. Hapteenit toimivat allergeeneina vasta sitouduttuaan elimistön omaan valkuaisaineeseen, esimerkiksi ihon proteiineihin tai veren albumiiniin. Synnynnäinen immuunijärjestelmä tunnistaa haptenin, tai hapteni-proteiiniyhdistelmän joko toll-like (TLR) tai NOD-like (NLR) reseptoreiden kautta, jotka aktivoivat MyD88 ja/tai TRIF signaalireittejä sekä inflammasomikompleksia, johtaan usean tulehdusvälittäjäaineen paikalliseen tuotantoon. Myös soluvaurion yhteydessä vapautuneet endogeeniset vaarasignaalit kuten happiradikaalit ja ATP voivat käynnistää tulehduksen samoja signaalireittejä pitkin. Tuoreimpien tutkimustulosten mukaan inflammasomin aktivoituminen voisi olla yhteinen tekijä kaikille herkistäville aineille (11). Paikallisen tulehduksen seurauksena ihon dendriittisolut aktivoituvat, ja kulkeutuvat imusolmukkeisiin esittelemään ihosta kerättyjä hapteni-proteiiniyhdistelmiä T-soluille. Hapteneita tunnistaneet, aktivoituneet T-solut kulkeutuvat takaisin ihoon, jossa edistävät tulehdusta tuottamalla sytokiineja ja tuhoamalla hapteneille altistuneita keratinosyyttejä, johtaan kosketusallergialle tyypilliseen ihottumaan (12).

Sekä haptenei että ärsytystä aiheuttava aine käynnistää ihotulehdusta välittävien geenien ilmentymistä ihossa, kuten IL-1alpha, TNF, ja IFN-gamma (1). Kemokiinit CXCL9 ja CXCL10 indusoituvat vain kontaktiallergiassa (13, 14), mutta nämä tutkimukset rajoittuivat muutamiin geneihin. Kokonaisvaltaista geenien ekspressiotutkimusta on tehty nikkeliallergiasta (15), sekä kahdesta ärsytystä aiheuttavasta aineesta (10). Varsinkin solustressiin ja tulehdukseen liittyvien geenien ekspressio lisääntyi sekä kontaktiallergiassa että ärsytykseessä. Kahden tutkimuksen tuloksia ei kuitenkaan voida vertailla keskenään, koska ne on tehty eri kudoksista ja eri aikapisteissä.

#### 2.1.5 Systeemibiologian hyödyntäminen biolääketiedessä

Systeemibiologia on nopeasti kasvava tutkimusala, jonka menetelmiä ja tuloksia sovelletaan usealla biolääketieteen alueella. Perinteinen lähestymistapa, jossa tutkitaan yhtä geeniä tai kerrallaan, korvautuu kokonaisvaltaisella lähestymistavalla, jossa kaikkia genejä tutkitaan samanaikaisesti. Lähestymistavan edut ovat merkittävät, sillä useimpien biologisten tapahtumien takana ei ole yksittäisen geenin toiminta vaan geenien monitahoinen vuorovaikutusverkosto.

#### 2.1.6 Transkriptomiikka

Transkriptomiikka tutkii samanaikaisesti tuhansien lähetti-RNA (mRNA) molekyylien ilmentymistasoja (geeniekspressiota) tutkittavassa kudoksessa tai solussa. Geeniekspression määrittämiseen voidaan käyttää tällä hetkellä pääsääntöisesti kahta eri tekniikka - mikrosirumenetelmää ja syväsekvensointia. **Mikrosirumenetelmä** perustuu mikroskooppilasille asetetuista kymmenistä tuhansista geenikoettimista joihin hybridisoidaan tutkimusnäytteen RNA:sta valmistettua komplementaarista DNA:ta (cDNA). Menetelmä on herkkä ja spesifinen ja mahdollistaa kokonaisvaltaisen kymmenien tuhansien geenien ekspressioprofiilin määrittämisen tutkittavasta kudoksesta. DNA mikrosirutekniikalla pystyy keräämään tietoa geenien toiminnasta koko genomien mittakaavassa.

#### 2.1.7 Bioinformatiikka ja systeemibiologia

Uudet, jopa koko genomien kattavat tutkimusmenetelmät (esim. yllä mainittu transkriptomiikka) tuottavat valtavan määrän tietoa. Tämän tietotulvan hyödyntäminen

edellyttää uudenlaisten matemaattisten menetelmien käyttöä. Useista tietolähteistä kerätyt havainnot yhdistetään bioinformaattisen analysoinnin avulla laskennallisiksi malleiksi, joiden avulla pyritään ymmärtämään sairauksien mekanismeja ja kehittämään diagnostiikkaan soveltuvia merkkiaineita. Karkeasti jaoteltuna systeemibiologisesta lähestymistavasta voidaan erottaa kolme informaation käsittelyn tasoa. Ensimmäinen taso koostuu osien (esim. geenien) tunnistamisesta. Toisella tasolla tutkitaan, miten osat toimivat, esimerkiksi miten geenit ilmentyvät suhteessa toisiinsa ja minkälaisia komplekseja proteiinit muodostavat. Kolmas taso on systeemitaso, jolla tutkitaan, miten yhdessä toimivat osat toteuttavat erilaisia tehtäviä. Systeemibiologia antaa ainutlaatuisia työvälineitä tautimekanismien ymmärtämiseen ja diagnostiikkaan soveltuvien merkkiaineiden tunnistamiseen.

## 2.2 TAVOITTEET, TULOSTEN HYÖTY JA SOVELLETTAVUUS

### 2.2.1 Tutkimuksen tavoitteet

Tutkimuksen tavoitteena on tunnistaa systeemibiologisen lähestymistavan avulla kosketusallergiaan liittyviä biologisia merkkiaineita tai merkkiaineprofileja, joiden avulla voidaan parantaa diagnostiikkaa.

Tutkimushypoteesi

*Altistuminen kosketusihottumaa aiheuttavalle ärsykkeelle aiheuttaa ihon välittäjäaineprofiilissa muutoksia. Välittäjäaineprofiilit eroavat allergisoituneiden ja ei-allergisoituneiden kesken, ja siten profileja voidaan hyödyntää diagnostiikkaa parantavien merkkiaineiden tunnistamisessa.*

Projektin osatavoitteet ovat:

I. Tutkia kosketusallergia-oireiluun liittyviä ihon tulehdustapahtumia **transkriptomiikan** keinoin.

II. Rakentaa transkriptomiikasta kerätyt havainnot **systeemibiologian** keinoin kosketusallergia-oireilua selittäväksi malliksi, joka mahdollistaa oireiluun liittyvien **biomerkkiaineiden** tai **merkkiaineprofilien** tunnistamisen.

III. Tutkimuksessa kartoitetaan systeemibiologian keinoin merkkiaineita, jotka soveltuvat kosketusallergian ja ärsytykseeseen erotusdiagnoosiin epikutaanitestireaktioista ja ihottuma-alueelta otetuissa koepaloissa. Lopullinen diagnostinen menetelmä on tutkimusmenetelmä, joka voidaan tehdä missä tahansa patologian laboratoriossa. Menetelmä helpottaa erityisesti ammatti-ihotautidiagnostiikkaa, mutta sitä voidaan käyttää kaikkien kosketusallergiaepäilyjen tutkimisessa.

Moniammatillinen tutkimusryhmämme koostuu kliinisen työlääkätieteen, biolääketieteen sekä systeemibiologian erikoisosaajista ja yhdistää ainutlaatuisella tavalla viimeisimmän tiedon ja biolääketieteen menetelmät käytännön työterveysongelman ratkaisemiseksi.

#### 2.2.2 Tulosten hyöty ja sovellettavuus

Vaikka ymmärrystä kosketusallergian altisteista ja patomekanismeista on merkittävästi lisääntynyt, edelleenkin ei ole luotettavia biologisia markkereita erottamaan ärsytyskosketuseksemaa allergisesta kosketusekseemasta.

Tässä tutkimuksessa hyödynnetään ainutlaatuisella tavalla uusimpia biolääketieteen menetelmiä ja systeemibiologista lähestymistapaa kosketusihottumien diagnostiikan parantamisessa. Tutkimuksessa kartoitetaan kosketusekseemaan liittyviä biologisia merkkiaineita, joiden avulla voidaan tunnistaa allerginen kosketusihottuma ihottumasta tai testireaktiosta otetussa koepalassa. Tutkimus auttaa myös selvittämään ärsytyskosketusekseeman ja allergisen kosketusekseeman syntymekanismia. Modernin systeemibiologian keinoin on mahdollista rakentaa ihon tulehdusprofiilista malli, joka antaa viitteitä oireilun mahdollisesta aiheuttajasta. Profiilista voidaan mm. päätellä, onko oireilussa kysymys luonnollisen immunitetin toimintahäiriöstä, tai immunologisen muistin käynnistymiseen johtavista signaalireiteistä.

#### 2.2.3 Käyttö epikutaanitestauksessa

Epikutaanitestin ongelmana on erottaa spesifit allergiset reaktiot epäspesifistä ärsytysreaktioista. Monet tunnetut allergeenit ovat myös ärsyttäviä, ja testireaktioiden tulkinta

ei ole aina helppoa kokeneellekaan tulkitsijalle. Epäselviä reaktioita joudutaan usein testaamaan uudelleen. Erityisen ongelmallista on potilaiden omien aineiden tutkiminen. Mahdollisten uusien allergeenin selvitys vaatii toistuvia epikutaanitestejä ja kontrollitutkimuksia. Jos biomarkeritutkimuksen avulla voidaan luotettavasti erottaa allerginen testireaktio ärsytysreaktiosta, voitaisiin monessa tapauksessa tutkimukset lopettaa aikaisemmin, ja keskittää monimutkaiset selvitykset niihin potilaisiin, joilla allergeeni on mahdollista löytää.

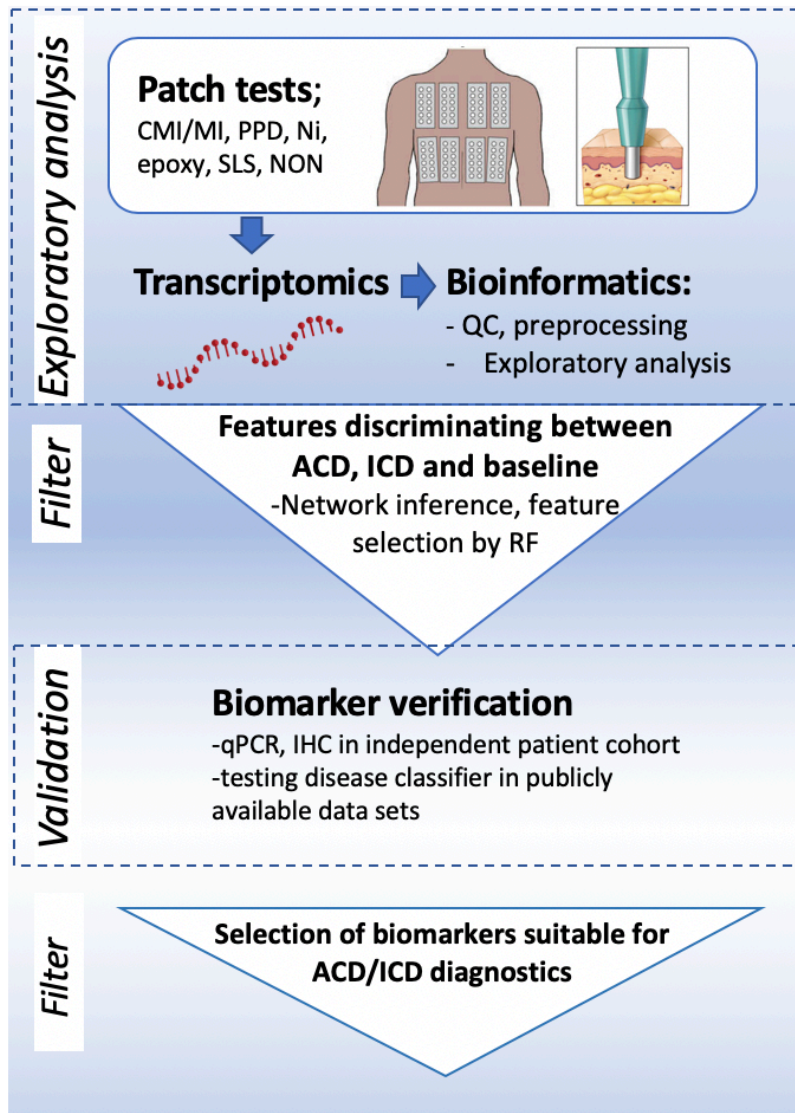
#### 2.2.4 Käyttö käsi-ihottuman tutkimuksessa

Käsi/kyynärvarsi-ihottuma on tavallinen ongelma työterveyslääkärin ja ihotautilääkärin vastaanotolla ja oireilu on usein toistuvaa tai pitkäaikaista. Vain osa käsi-ihottumista on allergista kosketusihottumaa. Erotusdiagnostisesti tärkeitä tauteja ovat ärsytyskosketusihottuma ja endogeeniset ekseemat (esim. käsien atooppinen ihottuma). Ihotautilääkärin suorittama epikutaanitestaus on käsi-ihottuman perustutkimus, mutta yhdellä testikerralla ei voida sulkea pois kaikkia mahdollisia syitä. Ihottuman toistuessa herää jatkuvasti kysymys, onko jokin kosketusallergia jäänyt huomaamatta tai onko kokonaan uusi kosketusallergia ehtinyt kehittyä aiemman testauskerran jälkeen. Jos pienen ihobiopsian avulla pystytään poissulkemaan luotettavasti allerginen kosketusihottuma käsi-ihottuman tai muun ihottuman taustalta, voitaisiin luopua kalliista ja aikaavievistä epikutaanitesteistä allergeenin selvittämiseksi. Kosketusallergiadiagnoosin jälkeen henkilö yrittää välttää ihokosketusta allergian aiheuttajaan eli allergeeniin. Välttäminen on usein vaikeaa ja henkilö saattaa altistua allergeenille tietämättään. Altistumisen selvittely on monimutkaista ja vaatii yleensä kokemusta ja ammattitaitoa. Jos ihottumasta otettu koepalalöydös ei viittaa allergiseen reaktioon, ei altistumista tarvitsisi selvittää enempää.

### 2.3 SUUNNITELLUT TEHTÄVÄT JA MENETELMÄT

#### 2.3.1 Tutkimusstrategia

Tutkimuksen kokonaisasetelma ja osatutkimuksien liittyminen toisiinsa on esitetty kaaviossa seuraavalla sivulla (kuva 1).



**Kuva 1.** Tutkimuksen kokonaisuasetelma. ACD=kosketusallergia, ICD=ärsytykseema. CMI\_/MI= (kloori)metyyli-isotiatsolinoni, PPD= parafenyleenidiamiini, Ni= nikkeli, epoxy= epoksihartsi, SLS= natriumlauryylisulfaatti, NON= nonaanihappo).

### 2.3.2 Potilaat ja ryhmien valintakriteerit

Tutkimukseen valitaan Työterveyslaitoksessa ammatti-ihotauditutkimuksissa olevia potilaita ja muodostetaan heistä potilas- ja kontrolliryhmät. Kliinisten ryhmien valinnassa on ensiarvoisen tärkeää, että ryhmän sisäinen vaihtelu on mahdollisimman vähäistä. Kliininen materiaali jaetaan seuraavasti:



**Vaihe I. Tutkimusmateriaali: Potilaat joilla on todettu viivästynyt kosketusallergia (n=30).** Ryhmään valitaan tutkittavia joille on todettu kosketusallergiaa epoksihartsille (epoksi), parafenyleenidiamiinille (PPM), tai (kloori)metyyli-isotiatsolinonille (CMI).

**Vaihe II. Tutkimustulosten validointi: Potilaat joilla on todettu viivästynyt kosketusallergia (n=30).** Ryhmään valitaan tutkittavia joille on todettu kosketusallergiaa epoksihartsille (epoksi), parafenyleenidiamiinille (PPM), tai (kloori)metyyli-isotiatsolinonille (CMI).

**Vaihe III.** Potilasnäytteet, joiden avulla arvioidaan löytyneiden markkereiden käyttökelpoisuutta käytännön diagnostiikassa (koepalat ihottuma-alueelta ja erilaisista epikutaanitestireaktioista).

TTL:n ihotautilääkärit S. Suomela, M. Pesonen ja K. Aalto-Korte valitsevat tutkittavat henkilöt. Ryhmään I otettavilla tutkittavilla tulee olla ihotestillä todettu herkistyminen joko epoksihartsille, parafenyleenidiamiinille tai (kloori)metyyli-isotiatsolinonille. Ryhmään II otettavien henkilöiden tulee olla samanikäisiä kuin ryhmän I tutkittavat ( $\geq 18$ v.), ja kaikissa ryhmissä tulee sukupuolet olla tasaisesti edustettuina. Ryhmien I ja II tutkittavilla ei saa olla laaja-alaista ekseemaa tai muuta ihosairautta.

### 2.3.3 Tutkimusnäytteiden otto

**Verinäyte** otetaan ennen ihotestiä, tai vaihtoehtoisesti kuukautta ihotestin jälkeen laskimoverestä plasma- ja PBMC-näytteitä varten. Solut erotetaan plasmasta standardisti sentrifugoimalla, plasma kerätään ja säilötään  $-20^{\circ}\text{C}$ :ssa Luminex-analyysejä varten. Solut pakastetaan 10% DMSO:hon solutöitä varten.

Tutkittaville tehdään normaaliin tapaan **epikutaanitestit** selkään:

- 1) Ryhmät I ja II
  - a. kaikille tutkittaville tehdään normaaliin epikutaanitestaukseen sisältyvä perussarja, joka sisältää tutkittavat allergeenit: 1% epoksihartsia, 1% parafenyleenidiamiini ja 0.02% (kloori)metyyli-isotiatsolinoni tai vaihtoehtoisesti 1% nikkelisulfaatti.

- b. Lisäksi tehdään epikutaanitesti kahdelle ärsytystä aiheuttavalle aineelle, 1% natrium lauryylisulfaatti (SDS, sodium lauryl sulfate) ja 5% NON (nonanioc acid)).

Ryhmässä I ja II otetaan allergisen testireaktion alueelta kaksi 3mm:n **ihobiopsiaa** 48h ihotestin laiton jälkeen, ja vastaavat näytteet SDS:llä tai NON:lla indusoidusta ärsytysreaktiosta. Kunkin reaktion toinen 3mm:n pala säilytetään RNAlater liuoksessa transkriptomiikkaa varten, ja toinen jäädytetään kuivajäissä OCT- seoksessa histologisia ja immunohistokemiallisia analyyseja varten. Kultakin koehenkilöltä otetaan kahdesta paikasta kustakin kaksi 3mm:n palaa eli yhteensä neljä ihobiopsianäytettä per tutkittava.

Ryhmässä III otetaan TTL:n ammatti-ihotautitutkimuksen yhteydessä 4mm ihokoepaloja ihottuma-alueilta, terveeltä iholta, ja/tai epikutaanitestireaktioista. Lisäksi potilailta kerätään samoilta alueilta ihon ylimpiä solukerroksia käyttämällä teippistriippaustekniikkaa (16). Näytteitä kerätään tyypillisistä eri allergeenien aiheuttamista allergisista epikutaanitestireaktioista, epäselvistä reaktioista ja ärsytysreaktioista. Biomarkkeritutkimuksen tulosta verrataan ihotautilääkärin loppuarvioon kunkin testireaktion luonteesta ammattitautiselvitysten päättyessä. Näytteitä otetaan myös ihottuma-alueilta ja verrataan biomarkkeritutkimuksen tulosta ihotautilääkärin loppuarvioon kyseisen ihottuman luonteesta.

#### 2.3.4 Transkriptomiikka

Ihon lähetti-RNA profiilit määritetään palvelutoimintana DNA-siruanalyysien avulla Biomedicum Helsingin yliopiston mikrosiruyksikössä. Ihobiopsioista eristetään RNA joka käännetään komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA). cDNA leimataan fluoresoivilla väriaineilla ja hybridisoidaan siruihin, jotka koostuvat mikroskooppilasille asetetuista tuhansista geenikoettimista. Hybridisaation jälkeen geenisiru luetaan laserpohjaisella mikroskoopilla, ja sirun fluoresenssi kuvaa testi- ja vertailunäytteiden cDNA jaksojen hybridisoitumista kussakin sirun testipisteessä. Testipisteestä vähennetään taustafluoresenssi ja pisteen informaatio muutetaan lukuarvoksi. Testi- ja vertailunäytteen väliset intensiteettierot normalisoidaan ja kullekin geenille saadaan suhdeluku. Suhdeluku kertoo geenin ilmentymisen vilkkaudesta testinäytteessä suhteessa vertailunäytteeseen.

### 2.3.5 Bioinformatiikka ja systeemibiologia

DNA-siruanalyysi tuottaa valtavan määrän tietoa. Tämän tiedon hallintaan ja analysoimiseen tarvitaan bioinformatiikan ja systeemibiologian laskennallisia työkaluja. Bioinformaattisella tietojenkäsittelyllä on tässä hankkeessa kolme pyrkimystä: 1) Ensimmäisessä vaiheessa tutkimusaineisto ja tulokset varastoidaan ja järjestetään sellaiseen muotoon, että ovat helposti ja mielekkäästi tutkijoiden laskennallisten työkalujen ulottuvilla. 2) Toisessa vaiheessa pyritään analysoimaan ryhmäkohtaisia ekspressioprofiileja ja sitä kautta tunnistamaan diagnostiikkaan soveltuvia merkkiaineita. 3) Vaativimmassa systeemibiologisessa vaiheessa tuloksista pyritään muodostamaan laskennallinen ärsytykseeseen ja kosketusallergian oireilua ja altistumisen vaikutuksia kuvaava malli. Tilastollisesti luokittelemalla potilas- ja verrokkiaineiston tuloksia, pyritään hakemaan pienin määrä muuttujia jotka erottavat allergisen ihottuman ärsytysihottumasta. Systeemibiologinen analysointi selittää kosketusihottuma-oireilun mekanismeja ja antaa myös viitteitä oireilun mahdollisista syistä. Bioinformaattisen ja systeemibiologien analysoinnin lopputuloksena on kliiniseen diagnostiikkaan soveltuvien biomerkkiaineiden tunnistaminen ihosta. Koska olemme keränneet kustakin ryhmästä ihonäytteiden lisäksi myös verinäytteet, niin testaamme tunnistettujen merkkiaineiden diagnostisia hyödyntämismahdollisuuksia myös verestä Luminex-menetelmää hyödyntäen. Veren analysointiin soveltuu todennäköisesti ainoastaan pieni osa löydettyistä merkkiaineista, mutta onnistuessaan verianalyysien helppous puoltaa myös tämän lähestymistavan huomioonottamista (katso kohdan 3.1 kaavio). Tutkimusryhmällämme on pitkä kokemus omiikkapohjaisten analyysien bioinformaattisesta ja systeemibiologisesta analysoinnista (D. Greco).

### 2.3.6 Histologia ja immunohistokemia

Ihonäytteiden perushistologian lisäksi analysoimme ihoon kulkeutuneita tulehdussoluja. Verifioimme immunovärjäyksillä transkriptomiikan avulla identifioituja uusia merkki aineita ja pyrimme paikantamaan niiden ilmentymistä ihokudoksessa sekä tunnistamaan soluja jotka tuottavat niitä. OCT:hen jäädytetyt ihonäytteet tarjoavat myös mahdollisuuden erotella ihon eri kerroksia lasermikrodissektiotekniikalla ja määrittää näistä erikseen geenien ekspressiotasoja

joko reaali-aikaisella qPCR:llä tai siruilla. Ihon ylin kerros orvaskesi koostuu pääasiassa keratinosyyteistä, joiden toimesta kosketusihottumat todennäköisesti saavat alkunsa. Verinahassa taas on fibroblastien ja muiden tukisolujen lisäksi ihoon kulkeutuneita eri tyyppin tulehdussoluja. Työterveyslaitoksella on rutiinisti käytössä oleva lasermikrodissektiolaite sekä reaali-aikainen qPCR laitteisto.

### 2.3.7 Eettiset näkökohdat

Tutkimukselle haetaan HUS:n koordinoivan toimikunnan edellyttämät eettiset arviot ja luvat. Koehenkilöitä koskevista tiedoista tehdään henkilötietolain mukainen rekisteriseloste. Tutkimuksen lääketieteellisenä johtajana toimii dos. ylilääkäri Kristiina Aalto-Korte.

### 2.3.8 TIEDOTUS JA MUU TIEDON HYÖDYNTÄMINEN

Alkuperäiset tutkimustulokset julkaistaan ihotautien alojen kansainvälisissä julkaisusarjoissa, ja niitä esitetään alan kansainvälisissä kokouksissa. Hankkeesta tiedotetaan myös systeemibiologiaa soveltavien alojen julkaisusarjoissa. Kliinisesti tärkeimmät tulokset julkaistaan suomalaisissa lääketieteen julkaisuissa.

Tutkimuksista laaditaan myös yleistajuisia raportteja työterveyshuollon ja työsuojelun toimialan lehdissä. Tutkimuksen edistymisestä annetaan tietoja myös rahoittajille ja viranomaisille. Hankkeen tärkeimmistä löydöksistä ja niiden hyödyntämismahdollisuuksista pyritään myös tiedottamaan laajasti median välityksellä (TV, radio jne).

## 3 MATERIAALIT JA MENETELMÄT

### 3.1 Potilaskeräys

Potilaskeräys päättyi 27.9.2016. Päättyneessä potilaskeräyksessä hoitava lääkäri (Kristiina Aalto-Korte, Maria Pesonen tai Sari Suomela) pyysivät kaikkia tutkimuskriteerit täyttäviä ammatti-ihotautien poliklinikalla ensikäynnillä olevia potilaita osallistumaan tutkimukseen. Lähes kaikilta (n=6 biopsiapotilasta + n=2 hankausnäytepotilasta puuttuu) suostumuksensa antaneilta on otettu verinäyte. Ihonäytteen ja hankausnäytteen oton ajankohdista oli sovittu ammatti-ihotautien poliklinikan hoitajien ja tutkimuslaboratorion henkilökunnan kesken. Iho-

ja hankausnäytteen oton valmistelun ja oton, reaktioiden valokuvauksen ja valokuvien tallennuksen sekä potilasohjauksen toimenpiteen jälkeen teki Sari Suomela ammatti-ihotautien poliklinikalla. Sari Suomela piti kirjaa otetuista näytteistä ja koordinoi allergeenien valinnan kunkin potilaan kohdalla. Kukin hoitava lääkäri täytti potilaastaan haastattelu- ja statuskaavakkeen, jotka Sari Suomela arkistoi. Sari Suomela kokosi tutkimuspotilaista kerätyt kliiniset tiedot sekä allergisten reaktioiden ja ärsytysreaktioiden vahvuuden excel-taulukkoon muodossa, jota voidaan käyttää tilastoanalyysien pohjana.

27.9.2016 mennessä kerättiin näytteitä 146 potilaalta. Potilailta on enimmillään kerätty 50 ml verinäyte, sekä neljä koepalaa (kaksi allergia/allergeenireaktiosta ja kaksi ärsytysreaktiosta (joko natriumlauryylisulfaatti tai nonaanihappo)). Yhdeltä potilaalta on kerätty verinäytteen ohella vain ärsytysreaktionäytteet ja kahdelta potilaalta otettiin näyte ihottumasta (näistä toiselta otettiin näyte myös muun kuin tutkimusallergeenin aiheuttamasta reaktiosta). Pelkät ihon hankausnäytteet mikrobiomia varten antoi 10 potilasta. Neljä potilasta perui myöhemmin osallistumisensa tutkimukseen, yhdeltä ei saatu esiin aiemmin todettua epoksiallergiaa.

Potilaista 14:llä oli allergia epoksihartsille, 17:llä kloorimetyyli-isotiatsolinoni/metyyli-isotiatsolinonille (CMI/MI), 16:lla nikkelimelle ja yhdellä parafenyleenidiamiinille (PPD). Ärsytysnäytteitä kerättiin 25 epoksihartsikontrolliksi (17 S- ja kahdeksan N-reaktiota), 28:lta CMI/MI-kontrolliksi (kymmenen S ja 18 N) sekä 13:lta nikkelikontrolliksi (kahdeksan S ja viisi N) ja kahdelta PPD-kontrolliksi (kaksi S) ajatellulta potilaalta. Kahdeltatoista potilaalta otettiin näyte muun kuin tutkimusallergeenin aiheuttamasta allergisesta reaktiosta ja yhdeltä potilaalta ärsytysnäyte (S) ja negatiiviseksi jäänyt reaktiokohta muulle kuin tutkimusallergeenille (musta kumi).

Verinäytteitä á 50 ml, n=138 (toinen putki plasmaa ja toinen PBMC)

Mikrobiomi, 3 kpl/per tutkittava, n=32 x3

ICD-tutkittavien ärsytys- ja allergeenilla stimuloitujen biopsiat: n=69 x4

ACD-tutkittavien allergia- ja ärsytysbiopsiat: n=61 x4, 1 x2

Ihottumanäyte: n=2 (toinen PAD allergiselta, toinen RNA 4mm näyte allergiselta)

## 3.2 Potilasnäytteiden käsittely ja analyysi

### 3.2.1 Ihonäytteiden mikrosiruanalyysit

Eristimme ihopalojen RNA:n ja DNA:n AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal –kitillä (Qiagen, kat. nro. 80224) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Määritimme puhdistettujen RNA:n ja DNA:n konsentraatiot NanoDrop1000 –spektrofotometrillä (Thermo Scientific) ja Qubit 3.0 –fluorometrillä (Agilent technologies). Lisäksi olemme määrittäneet RNA:n laadun Bioanalyzerilla (Agilent technologies), missä RIN > 7.5 on kelvollinen laatu mikrosiruanalyyseihin. Konsentraatiot olivat hyviä ja laadut erinomaisia tähän suurimmalla osalla näytteistä (keskimäärin 2 ug RNA:ta, 5 ug DNA:ta, RIN>9).

Agent	a/i	PR	+++	++	+	Age	F%
CMI_MI	a	12	0	3	9	38	58
epoxy	a	9	4	1	4	49	33
nickel	a	11	4	4	3	40	91
PPD	a	6	2	1	3	38	100
NON	i	19	1	3	15	44	53
SLS	i	25	3	3	19	42	60

PPD=paraphenylenediamine

Epoxy=epoxy resin

Ni= nickel

CMI\_MI=methylchloroisothiazolinone,methylisothiazolinone

NON= nonanoic acid

SLS=sodium lauryl sulfate

**Kuva 2.** Kerätyt potilasnäytteet ja kliininen data. a/i= allerginen tai ärsytysreaktio , PR=positiivinen testireaktio, Age=ryhmän keskimääräinen ikä, F%= osuus naisia tutkimushenkilöistä.

Yhdeksän selvää (+, ++ tai +++) epoksireaktiota, 12 CMI/MI –reaktiota, kuusi PPD-reaktiota, 13 nikkeli-reaktiota, 26 SLS-reaktiota, 19 NON-reaktiota, sekä 14 kontrolli-ihonäytettä, yhteensä 99 näytettä valittiin siruanalyyseihin. Näytteistä eristetty RNA käännettiin cDNA:ksi, ja cDNA käännettiin edelleen cRNA:ksi käyttäen 'SurePrint G3 Human Gene Exp v3 Array' kittiä (Agilent technologies). Näytteitä leimattiin Cy3:lla ja Cy5:lla, ja hybridisoitiin SurePrint G3 Human Gene Exp v3 laseille (Agilent technologies). Pesujen jälkeen lasien fluoresenssia mitattiin iScan skannerilla (Agilent Technology), ja luettiin Agilent Feature Extraction –ohjelmalla. Laatuvaatimuksia läpäisseet sirut, yhteensä 82 näytettä (kuva 2.), analysoitiin R –

ohjelmalla käyttäen Bioconductorin limma pakettia. Dataa normalisoitiin, negatiiviset kontrollit ja matalaintensiteettialukkeet suodatettiin pois, mahdolliset virhelähteet (confounders) poistettiin Combat ohjelmalla, ja alukkeet tunnistettiin geneiksi Ensemble gene ID -ohjelmalla. Esikäsiteltyä dataa tarkasteltiin pääkomponenttianalyysillä ja dendrogrammeilla, ja ryhmien välillä eri tavalla ilmentyviä geenejä ( $FC > +/-1.5$ , Benjamin Hochberg korjattu  $p < 0.01$ ) tunnistettiin sovittamalla jokaiselle geenille lineaarinen malli. Geeniprofiileihin rikastettuja toimintoja tunnistettiin käyttämällä EnrichR [REF], BACA [REF] ja Ingenuity pathway -analyysiä (IPA).

### 3.2.2 Klusterointianalyysi

Näytteet ryhmitettiin niiden ilmentymisprofiilien mukaan käyttämällä k-keskiarvoa ( $k = 3$ ) ja hierarkkisia klusterointialgoritmeja. Ryhmien visualisointiin käytettiin pääkomponenttianalyysiä (PCA) ja lämpökarttaa. PCA: ta käytettiin koko geeniekspressiotietokannalle, kun taas lämpökartta luotiin käyttämällä geenien ekspressioprofiileja.

### 3.2.3 Geeniverkostoanalyysi

INFORM (Inference of NetwOrk Response Modules) -työkalua käytettiin koekspressioverkkojen tuottamiseen. INFORM-ohjelmassa oleva R-Shiny-sovellus suorittaa laskennalliset vaiheet, joita tarvitaan geeniekspressiomoduulien rakentamiseen. Ensin rakennetaan robusti geeni-koekspressioverkko käyttämällä useampia laskutapoja (Marbach et al., 2012), jonka jälkeen geeniverkosta tunnistetaan moduuleja (geeniryhmiä), käyttämällä moduuleja tunnistavia algoritmeja. Jokaisen geenin merkitystä eli "tärkeyttä" moduulissa testataan laskennallisesti, tarkastamalla geenien etäisyyksiä, ilmentymistasoja ja p-arvoja, sekä testamaalla kaikkia geenien välisiä yhteyksiä. Lisäksi suoritetaan jokaiselle moduulille biologisten funktioiden rikastusanalyysi.

### 3.2.4 Biomarkkereiden tunnistaminen

Geenilistoista haettiin luokitteluanalyysin avulla biomarkkereita tunnistamaan joko allergista ihottumaa tai ärsytysreaktiota. haettiin feature selection ja luokitteluanalyysin avulla. Käyttämällä random forest analyysia, tunnistettiin geenejä jotka pystyivät virheettömästi luokittelemaan ihoreaktiota kolmeen kategoriaan: allergiseksi reaktioksi, ärsytysreaktioksi tai normaaliksi ihoksi. Luokitteluanalyysia validoitiin viiteen kertaan, käyttäen eri harjoitusaineistoja, joita testattiin uudessa datassa. Luokittelusuoritus arvioitiin neljällä eri parametrilla: "Precision", "Recall", "F-Measure", ja "Accuracy rate".

### 3.2.5 Sirutulosten validointi qPCR:llä

Biomarkkereiden validointi suoritettiin real time (RT) qPCR: llä, erillisessä potilasryhmässä. RT qPCR-analyysissä 300 ng RNA: ta käänteiskopioitiin cDNA: ksi käyttäen High Capacity cDNA Reverse Transcription -kittiä (Life Technologies) valmistajan ohjeiden mukaisesti. Reaktio suoritettiin 25 ul: ssa, 25 ° C: ssa 20 minuutin ajan, mitä seurasi 37 ° C, 120 minuutin ajan. BATF: n, PRC1: n, CD47: n, EXO1: n, FASLG: n ja RRM2: n mRNA-tasot analysoitiin RT RT-PCR: llä käyttäen Taqman-kemiaa ja 7500 Fast Real-Time PCR -ohjelmaa (Applied Biosystems, Life Technologies). Näytteiden normalisointia varten mitattiin 18S rRNA: n, ACTB: n (beeta-aktiini) ja GAPDH:n ekspressiotasoja. Koetin- ja alukesarjat ostettiin Life Technologiesilta. Tulokset ilmaistaan suhteellisina yksikköinä (RU), joita laskettiin CT-menetelmällä valmistajan ohjeiden mukaisesti (17).

### 3.2.6 Ihonäytteiden miRNA-mikrosiruanalyysit

Samojen näytteiden RNA:ta on myös ajettu miRNA –mikrosiruilla (SurePrint Human miRNA Microarrays, Agilent). Näiden tulosten analyysit ovat meneillään.

### 3.2.7 Ihonäytteiden immunohistokemialliset värjäykset

RNA ja DNA-näytteiden lisäksi samoista ihoreaktioista otettiin talteen näytteitä myös formaliiniin. Histologiaa ja immunokemiallisia analyyseja varten paraffiiniin valettuja formaliininäytteitä on leikattu Anatomian laitoksella Helsingin Yliopistolla ja värjätty



HUSlabissa. Jokaisesta näytteestä leikattiin yhdeksän leikettä, joita sijoitettiin laselle numerojärjestyksessä. Leikkeitä värjättiin seuraavasti: 1. H&E, 2. CD4, 3. CD3, 4. CD8, 5. H&E, 6. CD11c, 7. Langerin, 8. H&E, 9. MBP. Värjättyjä näytteitä on seuraavaksi tarkoitus analysoida, kuvata ja digitalisoidaan, jonka jälkeen niitä analysoidaan tietokonealgoritmien avulla yhteistyössä Johan Lundinin ryhmän kanssa FIMM:llä. Digitalisoinnin ja tietokoneanalyysin avulla voidaan yhdistää leikkeitä ja siten eri värjäyksiä, jolloin saadaan histologisten muutosten lisäksi tietoa eri valkosolutyypin määrästä, ja sijainnista.

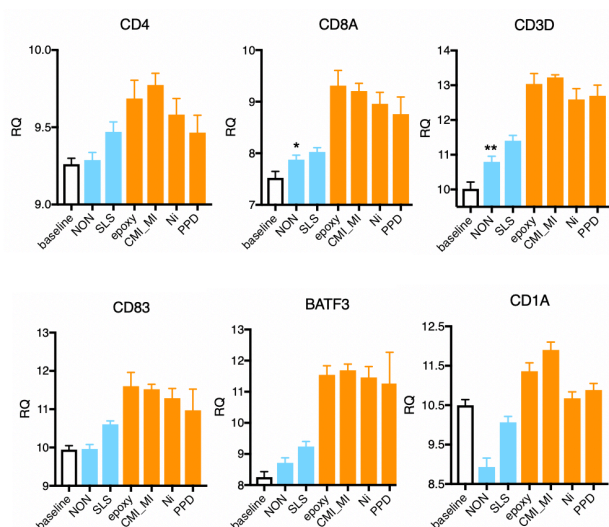
## 4 TULOKSET

### 4.1 Kosketusallergeenit aiheuttavat T-solujen ja DC-solujen kerääntymistä ihoon

Ärsyttävät aineet aiheuttivat tyypillisesti punoitusta, rakkuloita ja ihon halkeilua. Kosketusallergeenit puolestaan aiheuttivat punoitusta, rakkuloita ja kutinaa herkistyneissä yksilöissä. Testireaktion intensiteettiä arvioitiin asteikolla 1+, 2+ tai 3+ riippuen testikohdan punoituksesta ja rakkuloiden määrästä.

Ihonäytteitä kerättiin testialueista standardoidun protokollan mukaisesti. Samasta ihoalueesta otettiin kaksi näytettä; toinen histologiaa ja immuunohistokemiallisia analyyseja varten, ja toinen geeniekspressiotasojen analyysia varten. Histologiaa varten, ihobiopsia käsiteltiin formaliinissa, valettiin parafiiniin, leikattiin leikkeiksi ja värjättiin H&E värjäyksellä, sekä immunohistokemiallisesti, värjäten spesifisiä markkereita, mukaan lukien CD3, CD4, CD8 ja CD11c .

Ärsyttävä aine, kuten SLS, aiheuttaa sekä ihon ylimmän kerroksen, epidermiksen, paksuuntumiseen, että CD3+, CD4+ ja CD8+ T-solujen kertymää epidermukseen ja dermikseen. Allergeeni, kuten CMI/MI, nikkeli tai epoksi, aiheutti vielä runsaampaa T-solujen kerääntymistä, sekä CD11C positiivisten, antigeenia presentoivien dendriittisolujen kerääntymistä epidermukseen ja alla olevaan dermikseen. Epidermiks oli paksuuntunut, ja monesti vaurioitunut, ja varsinkin CD8+ T sytotoksisten solujen kerääntyminen ihossa oli suhteessa runsaampaa verrattuna ärsytysreaktioon. Kuvassa 3 näkyy geeniekspressiotasoina eri solumarkkereiden ilmentymistä ihonäytteissä.



**Kuva 3.** Solumarkkereiden ilmentyminen ihonäytteissä: T-solumarkkereita (CD4, CD8A, CD3D) ja antigeenia esittelevien dendriittisolujen markkereita (CD83, BATF3, CD1a).

## 4.2 Allergeenit ja ärsyttävät aineet aktivoivat ihossa tuhansia geenejä

Ihonäytteitä kerättiin standardoidun protokollan mukaisesti, ja säilytettiin RNA later liuoksessa, kunnes ihonäytteistä eristettiin RNA, josta mitattiin globaalit geeniekspressiotasot. Transkriptomit määriteltiin siten että jokainen geeni ylitti ”false discovery rate” (FDR) tasoa 0.05, sekä ”fold change” tasoa 1.5. Näin CMI\_MI:lle tunnistettiin yli 3000 eri tavalla säädeltyä geeniä (= ”differentially expressed genes (DEGs)”), epoksille runsaat 2800 geeniä, nikkelille yli 2600 geeniä ja PPD:lle noin 1800 geeniä, sekä SLS:lle liki 1500 geeniä ja NON:lle 750 geeniä, verrattuna normaaliin ihoon. Yli puolet näistä geneistä olivat aktivoituneet, NON-reaktioissa jopa 75%, ja alle puolet oli säädelty normaaliin ihoon verrattuna alemmalle tasolle.

Biologisten toimintojen rikastumista eri aineiden geeniprofiileissa tarkastettiin, käyttäen ”EnrichR”, ”GO Enrichment Analysis”, sekä ”Ingenuity Pathway analysis (IPA)” ohjelmia. Osoittautui, että allergeenien kohdalla, mm. ”TREM-1 signaali”, ”dendriittisolujen maturaatio”, ”Th1 signaali”, ”ROS tuotanto makrofaageissa” ja ”IL-1 signaali” olivat merkittävästi rikastuneet. Ärsyttävien aineiden kohdalla, ”solusyklin liittyvät toiminnot”, ja ”aryyli-hiilivetyreseptoriin (AHR) liittyvä signaali”, olivat rikastuneet. Geenien ilmentymisprofiilien perusteella IPA ennusti IFN $\gamma$  ja TNF:ää ylävirran säätelijöiksi allergeenien aiheuttamissa reaktioissa, kun taas FOXM1, ERBB2 ja MITF olivat säätelijöitä ärsytysreaktioissa.

Ryhmiä geeniprofiilien välistä päällekkäisyyttä analysoitiin, ja todettiin että neljä testattua allergeenia, CMI\_MI, epoksi, nikkeli ja PPD, jakoivat keskenään noin 640 geeniä. Ärsyttävät aineet, NON ja SLS, puolestaan jakoivat keskenään noin 200 geeniä. CMI\_MI:lle tunnistettiin yli 470 ainutlaatuista geeniä, kun taas SLS:e tunnistettiin noin 90. Kaikki altistusryhmät jakoivat, verrattuna normaaliin ihoon, keskenään 148 geeniä.

Toiminnallisten analyysien mukaan kaikkien altistusryhmien yhteiset 148 geeniä liittyivät funktioihin kuten ”dendriittisolujen migraatio”, ”lymfosyyttien migraatio” sekä ”leukosyyttien aktivaatio”. Tähän geenijoukkoon kuuluivat mm. ADAM10, CCL21, CCR2, CCR5, CCR7, CD47, CD48, GZMB, KRT16 sekä S100-proteiiniperhe (S100A8, S100A9, S100A11). Monet näistä geneistä olivat geeniprofiileissa kaikista voimakkaimmin säädeltyjä, joko ylös-, tai alaspäin.

Allergeenien yhteiset 640 geeniä puolestaan olivat rikastuneet toiminnoille ”vaste sytokiineille”, ja ”lymfosyyttien aktivaatio”. Näihin geeneihin kuuluivat muun muassa T- ja B-solujen toimintoihin liittyviä markkereita (CCR4, CCL17, CD19, CD40, CD8A, CD8B, CTLA4, LAG3, CXCL10), dendriittisoluihin liittyviä markkereita (CD83, CD40), sytokiineja (IL2, IL3, IL4, IL13, CCL8), tyypin 1 interferoni-signaalointiin liittyviä markkereita (MX1, JAK2, IRF1, IRF4, BATF2), sekä luontaiseen immuunijärjestelmään liittyviä geenejä (AIM2, CD180, NOD1, NFKB2, MAPK4, MAPK3K14).

CMI\_MI -altistus tuotti suurin määrä joko aktivoituneita tai inhiboituneita geenejä, joista huomaamme erityisesti IL17F:n ja CD1A:n aktivaation. Nikkeli puolestaan sääteli yksin IL27:a, ja epoksi sääteli IL31:a. Sekä CMI\_MI että nikkeli, mutta eivät muut allergeenit, säätelivät IL9:a, IL22:a, IL26:a, IL36B:a, Foxp3:a ja CCL26:a. Ainoastaan nikkeli ja epoksi säätelivät TLR2:a. Lisäksi, nikkeli, epoksi, CMI\_MI, mutta ei PPD, säätelivät IL-1b:a; IL19:a, IL20, IL24 ja IL33:a.

Kahden ärsyttävän aineen säätämien 217 geenin joukosta löytyivät mm. solusykliin liittyviä geenejä, kuten PCR1 ja EXO1. Lisäksi IL36G ja S100A2 olivat niitä harvoja geenejä, joita yksinomaan ärsyttävät aineet, mutta eivät allergeenit, aktivoivat. Lisäksi SLS, jolla oli paljon yhteistä allergeenien kanssa, vaikutti samalla tavalla kuin allergeenit tiettyihin tekijöihin, indusoiden mm. IL18:n, IL23:n, IL32:n, sekä CXCL1:n ilmentymistä, sekä vähentäen FLG:n ja FLG2:n ilmentymistä. SLS:n vaikutus näihin geeneihin oli kuitenkin huomattavasti heikompi kuin minkä tahansa kosketusallergeenin.

#### 4.3 Klusteri-analyysi paljastaa kaikkien altistusten ryhmittymisen joko allergeeneihin tai ärsyttäviin aineisiin

Klusterointianalyysi käyttäen k-means alogritmia, paljasti neljän allergeenin ryhmittymisen keskenään, sekä kahden ärsyttävän aineen ryhmittymisen omaksi ryhmäksi. Tulosta visualisoitiin pääkomponenttianalysilla, osoittaen kolme ryhmää, selvästi erillään toisistaan: normaali iho, ärsytysreaktiot ja allergeenit. Analyysi osoitti siten myös sen, että geeniekspressioprofiileista olisi mahdollista löytää biomarkkereita erottamaan usean eri altisteen aiheuttamaa allergista ihoreaktiota, ärsytysreaktiosta. Vastaavalla tavalla myös hierarkkinen klusterointi, eri algoritmi, paljasti näytteiden ryhmittymisen kolmeen ryhmään, eli normaaliin ihoon, sekä allergisiin reaktioihin että ärsytysreaktioihin.

Seuraavaksi yhdistimme kaikki neljät allergeenit yhdeksi kategoriaksi, jota kutsuimme ”ACD:ksi”. Kaksi ärsyttävää ainetta yhdistimme toiseksi kategoriaksi: ”ICD”. Tämä mahdollisti kahden kategorian geenien tunnistamisen. Geenitasolla, nämä olivat mm. CXCL1, CXCL10, MMP12 ja BATF3 ”ACD” - ryhmässä, sekä SERPINB3/4, S100A8 ja S100A9 ”ICD” - ryhmässä. Lisäksi KRT77:n, FLG:n sekä IL37:n ilmentyminen oli voimakkaasti estynyt molemmissa ryhmissä verrattuna normaaliin ihoon (kuva 4). Toiminnallisen analyysin mukaan mm. "tyypin I interferonien signalointi", "T-solujen aktivointi" sekä "apoptoottinen signalointi" olivat rikastuneet ”ACD” -ryhmässä, kun taas ”solusyklin säätely” ja ”leukosyyttien kulkeutuminen” olivat rikastuneet ”ICD” -ryhmässä.

ACD_BASELINE			ICD_BASELINE			ACD_ICD		
ID	logFC	adj.P-val	ID	logFC	adj.P-val	ID	logFC	adj.P-val
GZMB	4,51	5,66E-07	SERPINB3	3,64	1,15E-08	IL3	2,68	1,05E-03
MMP12	4,35	1,21E-04	SERPINB4	3,46	4,26E-09	WFDC12	2,41	3,86E-03
CH25H	3,52	2,71E-07	S100A8	3,17	1,35E-09	BATF3	2,28	1,05E-03
PLAC8	3,43	1,20E-07	CLC	3,11	2,96E-07	CYP4Z2P	2,13	5,19E-03
BATF3	3,29	3,03E-07	S100A9	2,96	3,80E-11	CYP4Z1	2,12	5,12E-03
IL7R	3,29	2,17E-05	CH25H	2,90	5,65E-13	GZMA	1,92	2,18E-03
CXCL1	3,22	9,36E-04	PI3	2,63	8,77E-08	HSPA6	1,90	1,86E-04
CLC	3,16	2,89E-03	GZMB	2,56	1,74E-07	CD69	1,84	9,71E-03
S1PR4	3,05	1,02E-06	MMP1	2,42	8,48E-04	NFE2	1,74	4,48E-03
GPR171	3,02	4,89E-07	FGFBP1	2,33	3,88E-07	IL4	1,74	5,84E-03
CCL17	3,00	1,72E-03	SPRR1B	2,32	5,52E-07	TNFRSF11B	1,71	7,88E-03
CCR7	2,99	3,08E-06	IL36G	2,28	4,49E-07	SOCS1	1,69	2,35E-03
CXCL10	2,97	9,50E-03	S100A7	2,26	3,33E-07	BATF	1,60	3,29E-03
CD69	2,94	2,86E-06	CLEC4G	2,22	5,83E-07	SAMD9L	1,60	7,40E-03
CD3D	2,88	4,89E-07	AKR1B10	2,20	3,15E-06	IL2RB	1,53	5,80E-03
SELE	2,86	3,68E-08	PTX3	2,19	1,30E-05	BIRC3	1,53	8,18E-03
RGS1	2,84	7,02E-06	KRT16	2,17	1,38E-05	XCL1	1,53	9,31E-03
CD2	2,82	5,62E-07	AKR1B15	2,15	1,51E-06	HAPLN3	1,53	5,85E-03
SOCS3	2,81	4,98E-06	PLA2G2A	2,13	2,33E-05	SOCS2	1,50	8,79E-04
ADAM8	2,80	6,45E-05	BIRC5	2,13	1,10E-09	RGS16	1,47	1,05E-03
TBC1D10C	2,76	3,67E-07	PBK	2,12	1,07E-10	PTPN7	1,43	1,05E-03
IL3	2,73	9,03E-05	PCLAF	2,12	4,67E-10	CSF2	1,43	2,74E-03
OASL	2,73	3,40E-05	CDKN3	2,11	2,02E-12	TNFSF14	1,42	1,31E-03
IL13	2,72	1,09E-03	PLAC8	2,10	1,78E-09	GZMK	1,42	8,92E-03
BATF	2,72	1,20E-07	DLGAP5	2,10	1,80E-11	GADD45B	1,41	5,05E-05
CCRS	2,72	2,67E-07	UBE2C	2,10	1,14E-10	FASLG	1,39	2,72E-04
GZMA	2,71	1,02E-06	MELK	2,06	2,59E-13	IRF1	1,38	5,80E-03
CLEC4G	2,67	6,22E-04	CCNB1	2,05	5,23E-11	LINC00892	1,37	1,05E-03
GPR65	2,64	3,38E-07	RRM2	2,04	7,21E-13	CD96	1,34	3,13E-03
DSC1	-2,14	1,95E-03	RAB26	-1,49	1,93E-08	AKR7L	-0,70	3,29E-03
ACTA2	-2,16	8,91E-06	NFE2	-1,54	2,61E-07	ATP5G1P5	-0,71	3,13E-03
TSPAN8	-2,16	1,52E-03	KCTD4	-1,54	6,77E-07	ILVBL	-0,71	7,37E-03
TIMP3	-2,18	3,06E-05	EEF2K	-1,57	3,92E-13	B9D1	-0,76	9,40E-03
SUTRK4	-2,18	2,63E-05	RNASE7	-1,58	8,33E-08	MCM10	-0,80	5,80E-03
MYLK	-2,21	9,43E-06	LCE1A	-1,66	1,24E-11	NUDT8	-0,83	3,13E-03
WISP2	-2,22	6,94E-04	KRT2	-1,68	3,20E-03	WDR34	-0,83	7,37E-03
OSR2	-2,23	7,28E-06	CRCT1	-1,74	1,71E-05	PALMD	-0,90	4,47E-03
MVD	-2,24	1,79E-03		-1,92	3,94E-09	ARLSA	-0,97	9,53E-03
KRT15	-2,24	1,75E-03	CHP2	-1,98	2,88E-04	CLCA2	-1,15	3,86E-03
ERV3-1	-2,24	3,98E-03	KRT77	-2,00	3,00E-04	NXPH4	-1,31	3,02E-03
CA6	-2,27	6,79E-03	AZGP1	-2,02	3,04E-08	PSAT1	-1,45	7,73E-03
FOXI1	-2,30	1,65E-04	LCE1C	-2,11	3,24E-10	BPIFC	-1,50	5,80E-03
LCE6A	-2,40	8,83E-03	FLG	-2,22	1,80E-04	PXMP4	-1,58	7,37E-03
DGAT2	-2,41	2,97E-03	BTC	-2,39	1,35E-09	RDH12	-1,61	1,05E-03
OGN	-2,44	2,22E-04	FLG2	-2,52	5,74E-04	METTL7A	-1,61	1,05E-03
AZGP1	-2,48	8,95E-05	WFDC12	-2,67	3,33E-10	LINC02265	-1,63	8,79E-04
KPRP	-2,50	7,56E-03	LOR	-2,68	6,53E-06	SLPI	-1,65	5,80E-03
PCP4	-2,54	1,78E-04	C1orf68	-2,95	7,57E-07	BASP1P1	-1,76	2,98E-03
GSTM5	-2,54	1,46E-05	LCE3B	-3,17	1,74E-12	ELOVL4	-1,94	3,13E-03
SELENOP	-2,57	1,18E-05	KPRP	-3,56	1,71E-10	FABP5P10	-1,97	2,18E-03
ARG1	-2,64	8,88E-03	LCE6A	-3,58	6,66E-11	IGFL3	-2,26	7,43E-03
SCGB1B2P	-2,84	1,12E-03	LCE2D	-3,59	3,85E-11	IL36G	-2,48	7,88E-03
FLG	-2,86	7,62E-03	LCE2A	-3,60	1,66E-11	KRT78	-2,50	8,19E-04
ANGPTL1	-2,88	1,25E-04	LCE1E	-3,86	8,20E-12			
SP5	-3,03	1,18E-05	LCE2B	-3,93	8,49E-12			
PM20D1	-3,15	8,03E-03	LCE1B	-4,03	3,45E-11			
CHP2	-3,21	1,08E-03	LINC00302	-4,05	2,31E-12			
SUT3	-3,35	1,90E-04	IL37	-4,91	2,02E-12			
KRT77	-3,50	4,57E-04	LCE5A	-5,00	8,25E-10			

Kuva 4. Top30 ylös- ja alaspäin säädetyt geenit ACD ja ICD -ryhmissä.

#### 4.4 Geeniverkostot paljastavat toiminnallisia eroja allergeenien ja ärsyttävien aineiden välillä

Geeniverkostoista voidaan oppia uutta siitä, millä tavalla geenien toiminnot liittyvät toisiinsa, ja mahdollisesti säätelevät toisiaan. Sairauksiin assosioituvat geeniverkostot voivat puolestaan auttaa ymmärtämään patomekanismeihin liittyvää biologiaa. Käyttäen INFORM-työkalua, laadimme geeniverkostoja ”ACD” ja ”ICD” -ryhmien geeniprofiileista (kuva 12). INFORM tunnistaa lisäksi toimintoihin liittyviä geenimoduuleja, sekä laskee jokaisen geenin ja geenien välisten yhteyksien merkityksellisyyden ko. moduuleissa.

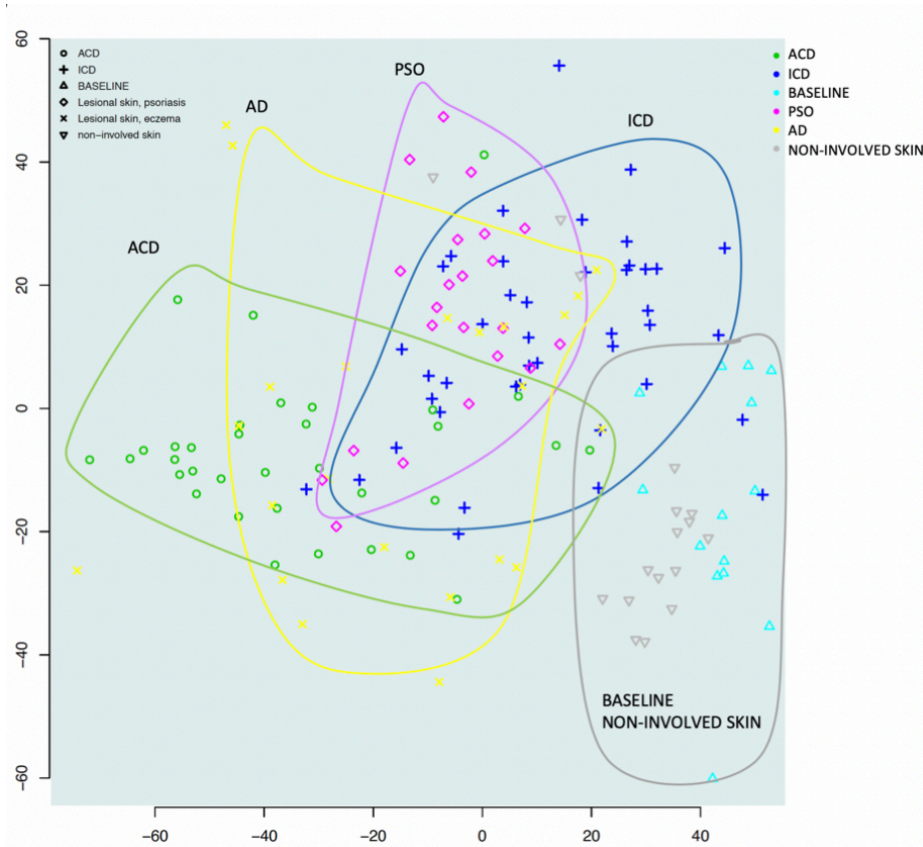
INFORM algoritmien perusteella laadimme listat geneistä, järjestettyinä merkityksellisyytensä mukaisesti. Vertailimme ”ACD”:tä tai ”ICD”:tä normaaliin ihoon, sekä toisiinsa. ”ACD”:n tai ”ICD”:n vertailu normaaliin ihoon tuotti kaksi melko samankaltaista geenilistaa. ”ACD”: n ja ”ICD”: n vertailussa, geeniverkostoon muodostui neljä moduulia, joista kahdet päämoduulit, M2 ja M4, olivat toiminnallisesti rikastettuja T-solujen aktivaation, sekä sytokiini tuotannon ja sytokiinivasteen säätelyn suhteen.

#### 4.5 GARF-algoritmiin perustuva luokittelu tarjoaa luotettavia biomarkkerimalleja erottelemaan kosketusallergian ärsytykseemasta

Yksiulotteisilla tilastollisilla menetelmillä (kuten esim. Bayesilainen tilastotiede) tunnistetut biomarkkerit tuottavat monesti pettymyksiä, kun eivät toimikaan odotetusti validointitesteissä. Sen sijaan moniulotteiset menetelmät, jotka osaavat ottaa huomioon geenien välisiä synergioita ja antagonismeja (eli vuorovaikutuksia), mahdollistavat yhdistettyjen biomarkkeriparien tai -ryhmien tunnistamisen, jotka ovat osoittautuneet suoriutuvan testeissä selkeästi yksittäisiin biomarkkereihin verrattuna paremmin. Tässä työssä käytimme strategiaa, jossa yhdistimme geneettistä algoritmia Random Forest luokittelijaan (Genetic Algorithm Random Forest, GARF). GARF mahdollisti useamman ominaispiirteen osa-alueen tutkimisen, antaen mahdollisuuden tunnistaa useampaan muuttujaan perustuvia biomarkkereita.

Käyttäen GARF-algoritmia, tunnistimme 28 uutta geeniparia/ryhmää, joilla oli korkea luokittelutarkkuus ACD:lle, ICD:lle ja normaalille iholle. Geenisetit käsittivät kahdesta

kolmeen geeniä, jotka pystyivät erottamaan eri ihoreaktioita tarkkuudella, joka vaihteli välillä 86% - 94%. Kaikkia geenisettejä validoitiin qPCR:lla erillisessä potilasryhmässä.



**Kuva 5.** Pääkomponenttianalyysi ACD:n, AD:n, PSO:n, ICD:n ja kontrollinäytteiden geeniprofiileista. ACD= kosketusallergia, ICD= ärsytykseema, AD=atooppinen ekseema, PSO=psoriaasi, baseline/non-involved skin= normaali iho.

Geenisetit testattiin kahden aikaisemmin julkaistun tutkimuksen transkriptomi-datassa. Toinen niistä käsitti 618 näytettä normaalista ihosta sekä psoriasis (PSO) leesioista että atooppisen dermatitin (AD) leesiosta (Fyhrquist *et al*, Nature Communications, in revision). Toinen tutkimus käsitti 47 näytettä normaalista ihosta ja allergeenitestireaktioista (GSE18206) (18). Kullekin 28 biomarkkerisetiille (geeniparille tai kolmen geenin ryhmälle) ajettiin 500 puun Random Forest luokittelija tutkimuksemme koko aineistossa (90 näytettä). Tällä tavalla luodut mallit testattiin sen jälkeen muiden kahden muun tutkimuksen näytteissä, mukaan lukien kontrollit (normaalit ihot). Kaksi geenisettiä tunnistivat oikein näytteet GSE60028 - tutkimuksessa suurella tarkkuudella (80%), mukaan lukien allergiset reaktiot sekä tiuramille että koboltille, joita ei ollut alun perin mukana meidän tutkimuksessa, jonka pohjalta biomarkkerisetit luotiin. Toisessa tutkimuksessa 10 eri biomarkkerisettiä tunnistivat näytteet

odotetusti kontrollinäytteiksi (normaalit ihot). Psoriasis tai atooppien ekseema sen sijaan jäivät näillä biomarkkereilla tunnistamatta, ja näyttäisi siis siltä, että uudet biomarkkerisetimme tunnistavat spesifisesti vain ACD:n tai ICD:n kaltaista ihoreaktiota, sekoittamatta niitä muihin ihosairauksiin. Neljän eri ihotulehdustilan geeniprofiileissa näyttääkin olevan selkeitä eroja (kuva 5), joiden pohjalta biomarkkerimme todennäköisesti toimivat.

#### 4.6 Biomarkkerien validointi erillisessä potilasryhmässä

Biomarkkereiden validointi on välttämätöntä laadunvarmistuksen ja toistettavuuden kannalta. Mikrosiruilla analysoidut biomarkkerit validoitiin erillisessä potilasryhmässä reaaliaikaisella qPCR -analyysillä (kuva 15B). Lisäksi niiden validointi immunohistokemiallisin menetelmin proteeinitasolla on meneillään.

#### 4.7 Testireaktion voimakkuus assosioituu geenien ekspressiotasoihin

CMI\_MI-ryhmässä lapputestien ihoreaktiot olivat kliinisen mittapuun mukaan enimmäkseen lieviä tai keksivahvoja (1 + ja 2 + -reaktioita) (Kuva 2). Tässä ryhmässä tunnistettiin siitä huolimatta, verrattuna muihin ryhmiin, suurin määrä geenejä, jotka ilmentyivät vähintään yhtä korkeille tasoille. Testireaktioiden voimakkuudet oletettiin korreloivan positiivisesti varsinkin tulehdusgeenien ekspressiotasoihin. Esimerkiksi GZMB, osoitti selkeän positiivisen korrelaation reaktion voimakkuuden suhteen, kaikissa allergeeni-ryhmissä..

## 5 TULOSTEN TARKASTELU

ACD:n erottaminen ICD:stä ja muista ihosairauksista, kuten atooppinen ekseema tai psoriasis, on edelleen haaste ihotautilääkäreille, varsinkin ihotulehduksen muututtua krooniseksi. Tämän takia luotettavien biomarkkereiden tunnistaminen, parantamaan diagnostiikkaa, on tärkeää. Suurin osa ACD-tutkimuksista ovat tähän mennessä lähinnä keskittyneet veren analyysiin, sekä hapteni -spesifisiin T-soluihin. Ihotulehduksen diagnostiikkaan kuitenkin tarvitaan tietoa ihon paikallisista tekijöistä, mahdollistamaan uuden menetelmän kehittäminen diagnostiikkaa varten. Aiemmat tutkimukset, joissa on käytetty erilaisia menetelmiä arvioimaan kontaktiallergeenien ja muiden ärsyttävien aineiden vaikutusta ihoon ja immuunijärjestelmään, ovat tuottaneet varsin vaihtelevia tuloksia, mikä myös viittaisi siihen, että eri



kosketusallergeenit, sekä jopa eri potilaat, saattavat vaatia räätälöityjä testejä ja/tai testien yhdistelmiä.

Näin ollen, koska vain muutama tutkimus on tähän asti analysoinut ihoa, fokusta tulee siirtää enemmässä määrin ihoon. Useimmat tällä hetkellä saatavilla olevat tutkimukset ovat määritelleet vain rajallisen määrän biomarkkereita, keskittyen yhteen tai muutamaan allergeeniin tai ilmiöön. Tässä työssä analysoimme neljän kosketusallergeenin sekä kahden ärsyttävän aineen vaikutusta ihon globaaliin geenien ilmentymiseen. Käyttämällä ohjaamatonta (”unsupervised”), dataan perustuvaa klusterianalyysia, havaitsimme että neljä, ominaisuuksiltaan täysin erilaista kosketusallergeenia, muodostivat selkeästi oman ryhmänsä, kun taas ärsyttävät aineet muodostivat toisen, selkeästi erillään olevan ryhmän. Tämä havainto oli lupaava sen suhteen, että altisteiden aiheuttamat geeniprofiilit voisivat auttaa erottamaan kahta reaktiotyyppiä, kosketusallergiaa ja ärsytykseemaa, toisistaan. Geeniverkostoanalyysien avulla tunnistimme toiminnallisesti tärkeitä geenejä, jotka todennäköisesti vaikuttavat vahvasti muiden geenien toimintaan ja vuorovaikutukseen. Identifioimme luokitteluanalyysin avulla biomarkerikombinaatioita, joiden avulla pystyimme suurella tarkkuudella erottelemaan allergista kosketusekseema ärsytykseemasta sekä muista ihotulehduksista. Lisäksi, sekä geeniverkostoanalyysin että luokitteluanalyysin määrittämien geenien ilmentymistasot korreloivat positiivisesti ihon lapputestireaktiovahvuuden kanssa, osoittaen geenien kliinistä merkitystä.

Kroonisen ihottuman diagnosointi voi olla kliininen haaste. Lapputesti on ainoa käytettävissä oleva diagnostinen testi kosketusallergioille, ja ärsytykseemalla ei ole testejä lainkaan. Valitettavasti lapputestit ovat epävarmoja, koska ne eivät ole standardoituja, ja tuloksen lukeminen on subjektiivista. Valitettavasti diagnoosi on epäselvä huolimatta perusteellisista tutkimuksista ja toistuvista testeistä. Tämä vie paljon aikaa ja resursseja samaan aikaan, kun toistuviin testauksiin liittyy uusia altistuksia sekä potilaalle kohtuullinen riski kehittää uusia allergioita. Diagnoosin puute tarkoittaa myös sitä, että ihottuman hoito vaikeutuu, koska aiheuttajaa ei ole tiedossa. Elinympäristössämme esiintyy lähes 4000 kemikaalia, jotka voivat aiheuttaa uusia allergioita, ja uusia kemikaaleja tulee jatkuvasti ulosmarkkinoille, vaikeuttaen diagnoosin tekemistä entisestään.

Pyrimme käyttämään tämän tutkimuksen tuloksia luomaan perustan uudelle ja tehokkaammalle diagnostiselle testille sekä kosketusallergioille että ärsytykseemalle, perustuen ihon geeniekspressioprofiileihin. Käyttämällä pieni määrä geenipareja tai -ryhmiä

biomarkkereina, ihotulehdusta tunnistetaan joko kosketusallergiaksi tai ärsytykseemmäksi. Menetelmä optimoidaan, testaamalla vähemmän invasiivista näytteen keräilyä, eli teippastrippausta. Lisäksi kokeillaan kustannustehokkaampia ja nopeampia PCR-menetelmiä. Nopeampi diagnoosi mahdollistaa sen, että potilas voi aikaisemmin välttää ekseeman aiheuttajia, ekseemaa voidaan hoitaa oikeaoppisesti, sekä voidaan vähentää uusien allergioiden kehittymisen riskiä toistuvien allergeestien vuoksi. Lisäksi on tärkeää tunnistaa nopeasti ja luotettavasti ärsytykseemaa, koska sen kroonistuminen, voi pahimmassa tapauksessa johtaa kosketusallergian kehittymiseen sekä pysyvään muutokseen immuunijärjestelmässä.

## 5.1 Hankkeen toteuttamiseen osallistuneiden nimet

Työterveyslaitoksen kokonaistyöajanseurannan mukaan hankkeeseen ovat osallistuneet (ja raportoineet työtuntuja): erik. lääkäri Kristiina Aalto-Korte, professori Harri Alenius, sairaanhoitaja Sari Fischer, erikoistutkija/yliopistotutkija Nanna Fyhrquist, tutkija Satu Hämäläinen, asiantuntija Sirpa Hyttinen, erik. lääkäri Maria Pesonen, laboratorionhoitaja Tuula Riihimäki, sairaanhoitaja Suvi-Päivikki Salo, sairaanhoitaja Pia Seelbach, erik.lääkäri Sari Suomela, erik. laboratoriomestari Päivi Tuominen, sairaanhoitaja Hannele Viljanmaa, laboratorionhoitaja Sauli Savukoski, laboratorionhoitaja Tanja Katovich, tutkija Alina Suomalainen, laboratorionhoitaja Terhi Vesa, ja bioinformatikko Margarita Walliander. Professori Dario Greco ja professori Vittorio Fortino osallistuivat projektiin omalla työajallaan.


## 5.2 Toteutuneet kulut

Työsuojelurahaston myöntämästä määrärahoista on Helsingin Yliopistossa raportointikaudella 1.1.2017 – 31.12.2017 käytetty hanketta varten palkattavien palkkoihin 31072,67 euroa, henkilösivukuluihin 7497,89 ja 7600,16 euroa, yhteensä 15098,05 euroa, ja yleiskuluihin 6214,54 euroa. Lisäksi materiaaleihin ja muihin kuluihin on kulunut yhteensä 4986,62 euroa, ja ostopalveluihin 6424,12. Yhteensä kuluja on ollut projektin loppuun saakka 63 796,00 euroa (kuva 18).

Yhteensä koko hankkeeseen on kulunut kokonaisuudessaan 350 547 euroa. Tästä Työsuojelurahaston rahoitusosuus on ollut yhteensä 173 135 euroa (49,39%), ja hakija on käyttänyt omista resursseistaan 177 412 euroa (50,61%) (kuva 19).

WBS	Tilinnumero	Toteutuneet proj. alku -12.2018	EUR
4705090	TSR / TTL Kosketusekseema Fyhrquist	Tulos	56 195,84
4705090	TSR / TTL Kosketusekseema Fyhrquist	Palkat yhteensä CAFI100050	31 072,67
4705090	TSR / TTL Kosketusekseema Fyhrquist	Henkilösivukulut CAFI100300	7 497,89
4705090	TSR / TTL Kosketusekseema Fyhrquist	Aineet ja tarvikkeet CAFI100400	4 986,62
4705090	TSR / TTL Kosketusekseema Fyhrquist	Ostetut palvelut CAFI100600	6 424,12
4705090	TSR / TTL Kosketusekseema Fyhrquist	Yleiskustannukset CAFI100900	6 214,54
47047944	TSR Ärsytykseema vastinraha 2016 / Fyh	Tulos	7 600,16
47047944	TSR Ärsytykseema vastinraha 2016 / Fyh	Henkilösivukulut CAFI100300	7 600,16
<b>Kokonaistulos</b>			<b>63 796,00</b>

Kuva 18. Helsingin Yliopiston raportoidut kulut raportointikaudella 1.1-31.12.2017.



**Työsuojelurahasto**  
Arbetsarskyddsfonden  
The Finnish Work Environment Fund

**Hankkeen talouden loppuraportti**

Ohje: \*

---

Hankkeen numero <b>113314</b>		Hankkeen nimi <b>Työperäinen ärsytykseeseen ja kosketusalter</b>	
Raportointikauden viimeinen päivä <b>31.12.2017</b>		Liitteet: Ohje: *	
<input checked="" type="checkbox"/> Arvonlisäverovelvollisuus Ohje: *		<input checked="" type="checkbox"/> Sisäinen kustannusraportti <input type="checkbox"/> Tositteet <input type="checkbox"/> Tilintarkastajan lausunto	
<input checked="" type="checkbox"/> Hakija on arvonlisäverovelvollinen		<input type="checkbox"/> Hakija ei ole arvonlisäverovelvollinen <input type="checkbox"/> Hakijalla on oikeus alv-tilityksissään vähentää hankkeeseen liittyvien ostojen alv:t	

Ohje laskentataulukosta:	Toteutunut		Ohje:		Talousarvio		Ohje:		
	A Työsuojelurahaston toteutunut rahoitusosuus	B Muu ulkopuolinen rahoitus	C Hakijan oma rahoitusresurssien käyttö	D Toteutuneet kokonaiskulut	E Osallistujien resurssipanostus	F Työsuojelurahaston talousarvion mukainen rahoitus	G Talousarvion kokonaiskulut	H Vertaus D/G, %	
1	Hakijan kiinteät palkat		49914,00	49914,00			64700,00	77,14	
2	Henkilösivukulut		28451,00	28451,00			36900,00	77,10	
3	Hanketta varten palkattavien palkat	54261,00		54261,00		63600,00	63600,00	85,31	
4	Henkilösivukulut	26692,00		26692,00		31800,00	31800,00	83,93	
5	Matkakulut	198,00	1030,00	1228,00		0,00	5000,00	24,56	
6	Materiaalikulut	74190,00	49274,00	123464,00		76880,00	96880,00	127,44	
7	Ostetut palvelut	6944,00	159,00	7103,00					
8	Muut kulut			0,00					
9	Tiedotus- ja hyödyntämiskulut			0,00					
10	Yleiskulut	10850,00	48584,00	59434,00		12720,00	75620,00	78,59	
11	<b>Yhteensä</b>	<b>173135,00</b>	<b>0,00</b>	<b>177412,00</b>	<b>350547,00</b>	<b>0,00</b>	<b>185000,00</b>	<b>374500,00</b>	<b>93,60</b>
12	Toteutuneen rahoituksen %-jakauma	49,39 %	0,00 %	50,61 %	100 %				
13	Talousarvion rahoituksen %-jakauma	49,39 %							

Vakuutan, että tieliselvitys sisältää ainoastaan hankkeeseen liittyviä kuluja, jotka perustuvat organisaation viralliseen kirjanpitoon. Selvityksessä on otettu huomioon mahdolliset tulot, alennukset, hyvitykset ja vastalaskut, eikä sellaisia tulla tekemään tämän tilityksen jälkeen. **Arvonlisäverovelvollisen hakijan kuluihin ei sisälly arvonlisäveroa.**

Paikka ja päivämäärä: **Helsinki 19.12.2018**

Allekirjoitus (Allekirjoittajalla tulee olla hakijaorganisaation nimenkirjoitusoikeus): **Carita Aschan**

Nimen selvitys: **Carita Aschan**

Asema: **johtaja**

Työsuojelurahasto Annankatu 34-36 B, 00100 HELSINKI Puhelin (09) 6803 3311 Faksi (09) 6803 3315 Kottisivu http://www.tsr.fi Sähköposti info@tsr.fi Y-tunnus 0305726-4

Kuva 19. Hankkeen talouden loppuraportti.

### 5.3 Hankkeen työskentelystä ja sen johtamista

Kokonaisuudessaan hanke on edennyt hyvin, hankkeen tavoitteet tunnistaa ja validoida kosketusekseemaa tunnistavia biomarkkereita on saavutettu. Seuraava askel tässä hankkeessa on validoida ko. markkereita sekä kehittää niiden pohjalta toimiva ja kustannustehokas diagnostinen menetelmä. Siihen hankkeeseen Ruotsin FORTE on jo myöntänyt rahaa vuosiksi 2019-2021. Työterveyslaitoksella tapahtuneista muutoksista huolimatta, joiden seurauksena hanketta on siirretty Helsingin Yliopistolle Meilahteen, hanke on edennyt hyvin. Hankkeen johtaminen on sujunut mutkattomasti, aktiivisen ja joustavan yhteistyön ansiosta.

#### 5.4 Toteutetut ja sisäiset ja ulkoiset tiedotustoimet

Keväällä 2016 tutkimushanketta esitettiin Suomen Allergologi ja Immunologi-yhdistyksen järjestämän koulutuksen yhteydessä Helsingissä 18.3.2016. Nanna Fyhrquist esitti projektin mikrosirutuloksia otsikolla ”Uusia biomarkkereita allergisen ekseeman ja ärsytykseeman erotusdiagnostiikassa”, ja Sari Suomela piti esitystä projektiin liittyvästä potilastyöstä otsikolla ”Käsiekseema kliinisenä ongelmana: Allergiaa vai ärsytystä?”. Syksyllä 2016 Sari Suomela raportoi suullisessa esityksessä ensimmäisiä tuloksia kansainvälisessä kokouksessa (European Society of Contact Dermatitis, Manchester, Iso-Britannia). Kesällä 2018 Nanna Fyhrquist raportoi posterin muodossa tuloksia EAACI:n kokouksessa Münchenissä. Vuonna 2018-2020 hankkeen tuloksia raportoidaan edelleen kansainvälisissä julkaisusarjoissa. Projektin näytteistä on myös analysoitu mikrobien esiintyvyyttä, mukaan lukien cutavirus ja polyomavirus. Lisäksi tuloksista laaditaan yleistajuisia raportteja työterveyshuollon ja työsuojelun toimialan lehdissä. Hankkeen tärkeimmistä löydöksistä pyritään myös tiedottamaan laajasti median välityksellä (TV, radio, internet).

#### 5.5 Raportointiaikana syntyneet julkaisut tai muut tuotokset

1. “New findings in allergic contact dermatitis”. Fyhrquist N, Lehto E, Lauerma A. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2014 Oct;14(5):430-5. doi: 10.1097/ACI.0000000000000092. PMID: 25054832.
2. “The gene profiles of four different contact sensitizers and two irritants”. Suomela S, Fortino V, Vendelin J, Lehto E, Lauerma A, Pesonen M, Aalto-Korte K, Greco D, Alenius H, Fyhrquist N: *Contact Dermatitis* 2016, 75, suppl. 1. page 43.
3. “Mapping of new biomarkers differentiating occupational allergic contact dermatitis and irritant contact dermatitis” Working group: PhD Nanna Fyhrquist, Prof. Harri Alenius, Associate Prof. Dario Greco, MD, PhD Sari Suomela, Associate Prof. Kristiina Aalto-Korte, MD, PhD Maria Pesonen at Finnish Institute of Occupational Health, Helsinki, Finland. StanDerm COST, Working Group 1, meeting abstract in Berlin 10<sup>th</sup> February, 2015:

4. "Cutavirus DNA in malignant and non-malignant skin of cutaneous T-cell lymphoma and organ transplant patients but not of healthy adults". Väisänen E, Fu Y, Koskenmies S, Fyhrquist N, Wang Y, Keinonen A, Mäkisalo H, Väkevä L, Pitkänen S, Ranki A, Hedman K, Söderlund-Venermo M. *Clin Infect Dis.* 2018 Sep 20. doi: 10.1093/cid/ciy806. [Epub ahead of print]
5. "Occurrence of newly discovered human polyomaviruses in skin of liver transplant recipients and their relation with SCC in situ and actinic keratosis". Y. Wang<sup>1,\*</sup>, A. Keinonen<sup>2</sup>, S. Koskenmies<sup>2</sup>, S. Pitkänen<sup>2</sup>, N. Fyhrquist<sup>3,4</sup>, M. Sadeghi<sup>1,5</sup>, H. Mäkisalo<sup>6</sup>, M. Söderlund-Venermo<sup>1</sup>, K. Hedman<sup>1,7</sup>, *Transplant International*, in press.
6. "Robust gene expression-based biomarkers for the discrimination of contact allergens and irritants". Vittorio Fortino, Sari Suomela, Alina Suomalainen, Veer Marwah, Erja Lehto, Johanna Vendelin, Antti Lauerma, Maria Pesonen, Kristiina Aalto-Korte, Dario Greco, Harri Alenius, Nanna Fyhrquist. Manuscript under preparation.
7. "Key genes distinguishing irritant and allergic contact dermatitis from other types of dermatitis". V Fortino, S Suomela, A Suomalainen, V Marwah, E Lehto, J Vendelin, A Lauerma, M Pesonen, K Aalto-Korte, D Greco, H Alenius, N Fyhrquist. *Allergy* Volume 73, Issue S105. Abstracts from the European Academy of Allergy and Clinical Immunology Congress, 26-30 May 2018, Munich, Germany.

## 6 KIRJALLISUUSLUETTELO

1. S. Hoefakker *et al.*, In vivo cytokine profiles in allergic and irritant contact dermatitis. *Contact Dermatitis* **33**, 258-266 (1995).
2. E. Corsini, C. L. Galli, Epidermal cytokines in experimental contact dermatitis. *Toxicology* **142**, 203-211 (2000).
3. N. Fyhrquist-Vanni, H. Alenius, A. Lauerma, Contact dermatitis. *Dermatol Clin* **25**, 613-623, x (2007).
4. J. P. Thyssen, A. Linneberg, T. Menne, J. D. Johansen, The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* **57**, 287-299 (2007).
5. J. M. Lachapelle, L. Marot, in *Contact Dermatitis*, P. J. Frosch, T. Menné, J.-P. Lepoittevin, Eds. (Springer, Berlin, 2006), pp. 107-116.
6. J. P. Thyssen, J. D. Johansen, A. Linneberg, T. Menne, The epidemiology of hand eczema in the general population--prevalence and main findings. *Contact Dermatitis* **62**, 75-87 (2010).
7. T. Malkonen *et al.*, Long-term follow-up study of occupational hand eczema. *The British journal of dermatology* **163**, 999-1006 (2010).
8. C. Y. Levin, H. I. Maibach, Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? *Int Immunopharmacol* **2**, 183-189 (2002).
9. A. Grangsjö, A. Leijon-Kuligowski, H. Torma, G. M. Roomans, M. Lindberg, Different pathways in irritant contact eczema? Early differences in the epidermal elemental content and expression of cytokines after application of 2 different irritants. *Contact Dermatitis* **35**, 355-360 (1996).
10. A. Clemmensen *et al.*, Genome-wide expression analysis of human in vivo irritated epidermis: differential profiles induced by sodium lauryl sulfate and nonanoic acid. *J Invest Dermatol* **130**, 2201-2210 (2010).
11. D. H. Kaplan, B. Z. Igyarto, A. A. Gaspari, Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol* **12**, 114-124 (2012).
12. N. Fyhrquist, H. Wolff, A. Lauerma, H. Alenius, CD8+ T cell migration to the skin requires CD4+ help in a murine model of contact hypersensitivity. *PLoS One* **7**, e41038 (2012).
13. S. Meller *et al.*, Chemokine responses distinguish chemical-induced allergic from irritant skin inflammation: memory T cells make the difference. *J Allergy Clin Immunol* **119**, 1470-1480 (2007).
14. J. Flier *et al.*, Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J Pathol* **194**, 398-405 (2001).
15. M. B. Pedersen, L. Skov, T. Menne, J. D. Johansen, J. Olsen, Gene expression time course in the human skin during elicitation of allergic contact dermatitis. *J Invest Dermatol* **127**, 2585-2595 (2007).
16. N. R. Benson *et al.*, An analysis of select pathogenic messages in lesional and non-lesional psoriatic skin using non-invasive tape harvesting. *J Invest Dermatol* **126**, 2234-2241 (2006).
17. T. D. Schmittgen, K. J. Livak, Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* **3**, 1101-1108 (2008).
18. N. Dhingra *et al.*, Molecular profiling of contact dermatitis skin identifies allergen-dependent differences in immune response. *J Allergy Clin Immunol* **134**, 362-372 (2014).