

PUHDISTUSKEMIKAALIEN AIHEUTTAMA TOKSISUUS SOLUVILJELMÄSSÄ

Merja Korkalainen¹, Arja Moilanen¹, Leila Kakko^{2,3}, Maria Andersson³, Hanna Leppänen¹, Martin Täubel¹, Raimo Mikkola³, Anne Hyvärinen¹, Emmanuelle Castagnoli³ ja Heidi Salonen³

¹Terveyden ja hyvinvoinnin laitos, Ympäristöterveys, Kuopio

²Tampereen ammattikorkeakoulu

³Aalto-yliopisto, Rakennustekniikan laitos, Helsinki

TIIVISTELMÄ

Puhdistusaineita käytetään laajasti niin kodeissa kuin ammattikäytössä. Niiden kemikaaleilla saattaa kuitenkin olla haitallisia vaikutuksia liian suurina pitoisuuksina käytettynä. Tässä tutkimuksessa arvioimme viiden yleispuhdistusaineen aiheuttamaa toksisuutta ihmisen puolustusjärjestelmän soluilla mittaamalla solutoksisuutta ja tulehdusreaktioiden käynnistymistä. Kun soluja altistettiin ylläpitosiivoukseen tarkoitettuja suosituspitoisuuksia suuremmille pitoisuuksille, solutoksisuus lisääntyi huomattavasti. Tulokset osoittavat, että käytännön siivoustyössä on tärkeää käyttää valmistajan suosittelemaa puhdistusaineen annostelua, koska puhdistusaineiden toksisuus näyttää selvästi lisääntyvän suuremmilla pitoisuuksilla.

TAUSTAA

Puhdistusaineet sisältävät monia kemikaaleja, joita tarvitaan mm. pintajännityksen vähentämiseen, pH:n säätämiseen, desinfiointiin, liuottamiseen, valkaisuun, hankaaviin ominaisuuksiin, hajustamiseen ja tuotteen säilymisen parantamiseen. Osa näistä kemikaaleista voi olla terveydelle haitallisia, etenkin jos puhdistusainetta käytetään toistuvasti suurempina pitoisuuksina kuin tuotteen valmistaja on suositellut.

Puhdistusaineiden kemikaaleille altistutaan ihokosketuksen, suun ja hengityksen kautta. Altistumisesta voi aiheutua herkistymistä ja allergioita, mutta myös erilaisia hengitystieoireita ja astmaa on raportoitu puhdistusaineita runsaasti käyttävillä siivoojilla /1–2/. Toistaiseksi ei tiedetä, mitkä puhdistuskemikaalit ja -tuotteet ovat haitallisimpia, mutta ainakin valkaisu- ja desinfiointiaineiden käyttö, ammoniakki ja suihkemuodossa käytettävät tuotteet on tutkimuksissa yhdistetty hengitystiesairauksiin /3/. Puhdistuskemikaaleista mahdollisesti aiheutuvat terveyshaitat riippuvat altistumisen määrästä eli siitä, miten vahvoja aineita käytetään ja miten usein niille altistutaan. Suomessa desinfioivien ja valkaisevien puhdistusaineiden käyttö on kuitenkin vähäisempää Etelä-Eurooppaan verrattuna /4/.

Tässä tutkimuksessa tutkittiin viiden yleispuhdistusaineen aiheuttamaa toksisuutta useina eri laimennoksina, joista mukaan otettiin aina alin ylläpitosiivoukseen suositeltu pitoisuus. Toksisuutta testattiin ihmisen puolustusjärjestelmän soluilla mittaamalla solutoksisuutta ja tulehdusreaktioiden käynnistymistä. Tutkimus oli osa Suomen Akatemian rahoittamaa Siivousmenetelmien kehittäminen haitallisen kemiallisen ja mikrobiologisen altistumisen vähentämiseksi koulurakennuksissa -projektia (CleanSchool, 330150 ja 330151).

MENETELMÄT

Siivousaineet ja niiden laimennokset

Tutkimuksessa testattiin viittä erilaista yleispuhdistusainetta, jotka ovat yleisimmin käytettyjä pääkaupunkiseudun kouluissa. Nämä kaikki siivousaineet soveltuvat käsi- ja konemenetelmin tehtävään ylläpitosiivoukseen sekä pintapesuun.

Puhdistusaineista tehtiin laimennossarja PBS-liuokseen siten, että solujen altistusmediumiin saatiin taulukossa 1 ilmoitetut pitoisuudet. PBS-liuosta käytettiin siten myös negatiivisena kontrollina yhdessä pelkän kasvatusmediumin kanssa. Testattavat pitoisuudet oli suunniteltu niin, että altistuksissa oli mukana ylläpitosiivoukseen suositeltu alin pitoisuus, joka puhdistusaineilla A ja C oli 0,04 %, puhdistusaineella B 0,02 % ja puhdistusaineilla D ja E 0,1 %. Tämä mahdollisti puhdistusaineiden keskinäisen vertailun, koska niiden laimentamattomat vahvuudet ovat erilaisia.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytetyt puhdistusaineet, niiden ylläpitosiivoukseen suositellut pitoisuudet ja solujen altistuksessa käytetyt pitoisuudet. Alin suositeltu pitoisuus on alleiviivattu.

Puhdistus- aine	pH	Ylläpitosiivoukseen suositellut pitoisuudet (%)	Altistuksissa käytetyt pitoisuudet (%)
A	8,2	> <u>0,04</u>	0,5, 0,1, <u>0,04</u> , 0,01, 0,001, 0,0001
B	8	<u>0,02</u> –0,12	0,5, 0,1, <u>0,02</u> , 0,01, 0,001, 0,0001
C	10,5	<u>0,04</u> –0,2	0,5, 0,1, <u>0,04</u> , 0,01, 0,001, 0,0001
D	8,5	<u>0,1</u> –0,5	0,5, <u>0,1</u> , 0,04, 0,01, 0,001, 0,0001
E	10,5	<u>0,1</u> –0,5	0,5, <u>0,1</u> , 0,04, 0,01, 0,001, 0,0001

Solumalli ja altistukset

Tutkimuksessa käytettiin ihmisen monosyyttisolulinjaa THP-1 (American Type Culture Collection), joka erilaistettiin makrofageiksi eli syöjäsoluiksi. Makrofagit ovat puolustusjärjestelmän soluja, jotka osallistuvat elimistöön tunkeutuneiden vierasaineiden ja mikrobin poistamiseen ja ne vastaavat mm. tulehdusvasteisiin liittyvien sytokiinin tuottamisesta /5/. Soluja kasvatettiin standardoiduissa olosuhteissa RPMI-1640-solukasvatus-mediumissa, johon oli lisätty fetaaliseen serumia, glutamiinia ja antibiootteja /6/.

Altistuksia varten solut jaettiin 96- ja 24-kuoppalevyille tiheyteen 375 000 solua/ml siten, että 96-kuoppalevyjen kuoppiin lisättiin 200 µl ja 24-kuoppalevyjen kuoppiin 1 ml solusupensiota. Monosyyttinä olevat solut erilaistettiin makrofageiksi 50 nM PMA:ta (forboli-12-myristaatti-13-asetatti) sisältävässä kasvatusmediumissa 24 h ajan. Erilaistamisen aikana THP-1-monosyyttisolut muuttuivat suspensiossa kasvavista soluista pohjaan kiinnittyviksi makrofagisoluiksi.

Solujen altistaminen aloitettiin pipetoimalla puhdistusaineista tehtyjä laimennoksia suoraan kasvatusmediumiin, 10 µl 96-kuoppalevyjen kuoppiin ja 50 µl 24-kuoppalevyjen kuoppiin. Puhdistusaineiden laimennossarja oli tehty niin, että soluille saatiin taulukossa 1 ilmoitettut pitoisuudet. Soluja altistettiin 24 h ajan kahdessa erillisessä kokeessa. Ensimmäisessä kokeessa solujen altistusmedieissa testattiin pitoisuudet 0,1, 0,01, 0,001 ja 0,0001 % ja toisessa pitoisuudet 0,5, 0,1, 0,04 (tai 0,02) ja 0,01 %. Jokaista laimennosta pipetoitiin kuutena rinnakkaisena näytteenä 96-kuoppalevyjen kuoppiin ja kolmena rinnakkaisena 24-kuoppalevyjen kuoppiin.

Analysit

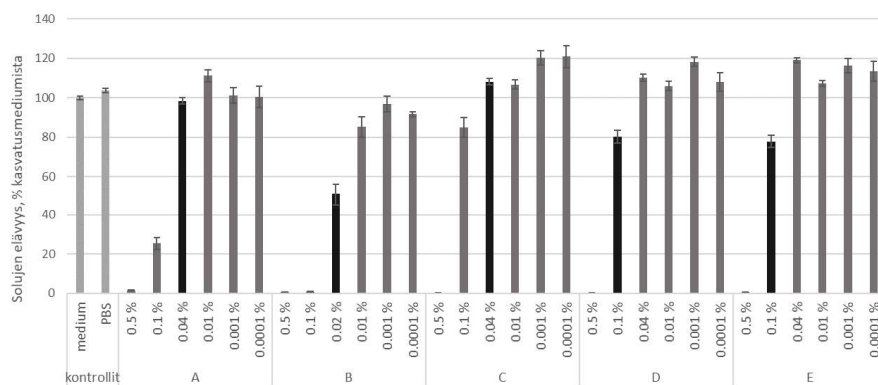
Altistetuista soluista määritettiin solujen elävyys WST-1-testillä heti altistuksen päätyttyä käyttämällä Cell Proliferation reagenssia (Roche). Altistuksen loputtua 96-kuoppalevyillä kasvavilta soluilta poistettiin altistusmedium ja tilalle lisättiin WST-1-reagenssi. Soluja inkuboitiin 1 h ajan, jonka jälkeen kuoppalevyiltä mitattiin absorbanssit 450 nm:ssä kuoppalevylukijalla (Enspire Plate Reader). WST-testi mittaa solujen metabolista aktiivisuutta, joka on verrannollinen solujen elävyyteen.

Tulehdusta käynnistävien eli inflammatoristen TNF α - ja IL-1 β -sytokiinien erittymistä altistetuista soluista mitattiin 24-kuoppalevyiltä kerätyistä medieista Duo ELISA TNF α - ja IL-1 β -kiteillä (R&D Systems).

TULOKSET JA NIIDEN TARKASTELU

Vaikutukset solujen elävyyteen

Solumallissamme testatut puhdistusaineet tappoivat lähes kaikki solut 0,5 % pitoisuudessa (kuva 1). Sen sijaan pitoisuudet 0,01–0,0001 % eivät enää olleet toksisia soluille, vaan joissakin tapauksissa jopa kiihdyttivät solujen kasvua. Solutoksisin puhdistusaine oli B, joka valmistajan suosittelemissa alimmassa ylläpitoiivouspitoisuudessa 0,02 % tappoi lähes puolet soluista. Vähiten toksisista puhdistusaineista D ja E kaikki solut selvisivät hengissä niille suositellussa 0,1 %:n ylläpitoiivouspitoisuudessa. Solutoksisuus lisääntyi huomattavasti kaikilla puhdistusaineilla, kun altistuksissa käytettiin suosituspitoisuuksia suurempia pitoisuuksia.

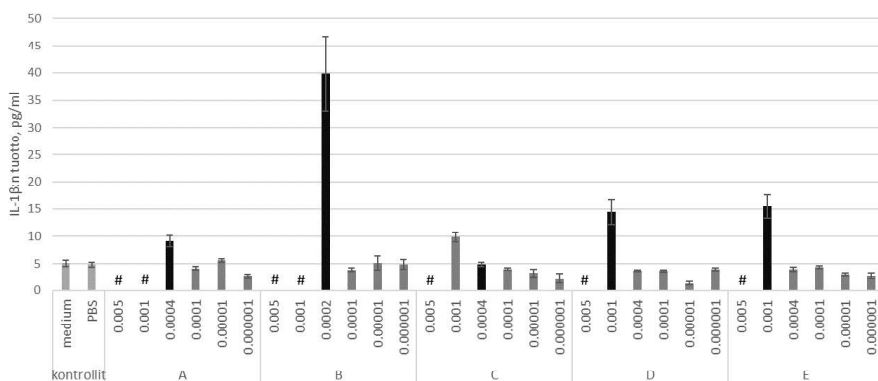


Kuva 1. Puhdistusaineista A-E tehtyjien laimennosten vaikutus THP-1-makrofagisolujen elävyyteen 24 tunnin altistuksen jälkeen. Elävyys on laskettu prosentteina pelkän kasvatusmediumin antamasta vasteesta ja kuuden rinnakkaisen näytteen keskivirhe on

piirretty palkkeihin. Valmistajien suosittelemat alimmat ylläpitoiivoukseen tarkoitetut pitoisuudet on merkitty mustilla palkeilla.

Vaikutukset sytokiinien tuottoon

Puhdistusainelaimennoksilla altistetuista soluista mitattiin tulehdusta käynnistävien sytokiinien TNF α ja IL-1 β erittymistä. Puhdistusaineiden herättämä TNF α -vaste oli kuitenkin niin vähäinen, että kuvassa 2 on esitetty vain IL-1 β :n erittyminen altistetuista THP-1-soluista. Kuvassa 2 ei esitetä niiden puhdistusainelaimennosten aikaansaamia IL-1 β -vasteita, joissa yli 50 % soluista oli kuollut, koska mittaus niissä tapauksissa ei anna luotettavaa tulosta.



Kuva 2. Puhdistusaineista A-E tehtyjen laimennosten vaikutus IL-1 β -sytokiinin erittymiseen THP-1-makrofagisoluihin 24 h altistuksen jälkeen. Kolmen rinnakkaisen näytteen keskiarvo on piirretty palkkeihin. Valmistajien suosittelemat alimmat ylläpitoiivoukseen tarkoitetut pitoisuudet on merkitty mustilla palkeilla. Liian suuren solutoksisuuden takia hylätyt vasteet on merkitty #-merkillä.

Puhdistusaine B tuotti selvästi suurimman IL-1 β -vasteen alimmassa suositellussa ylläpitoiivouspitoisuudessa. Myös puhdistusaineiden D, E ja A herättämät vasteet alimmassa suositellussa ylläpitoiivouspitoisuuksissa olivat kontrollitasoa suurempia, kun taas puhdistusaine C aikaansai vasteen vasta alinta ylläpitoiivouspitoisuutta korkeammassa pitoisuudessa eli 0,1 % pitoisuudessa. Ylläpitoiivouspitoisuutta laimeammassa pesuainepitoisuuksissa (0,01–0,001 %) altistettut solut eivät erittäneet IL-1 β -sytokiinia kontrollitasoa enempää.

Puhdistusaineiden vertailua

Verrattaessa keskenään eri puhdistusaineiden herättämiä vasteita alimmassa suositellussa ylläpitoiivouspitoisuuksissa suurimman solutoksisen ja inflammatorisen vasteen aiheutti puhdistusaine B. Puhdistusaineet D ja E olivat vain kohtuullisen toksisia ja puhdistusaine A pystyi aiheuttamaan ainoastaan lievän inflammatorisen vasteen. Puhdistusaine C oli ainoa, joka ei aiheuttanut ollenkaan toksisuutta suositellussa ylläpitoiivouspitoisuudessaan.

Puhdistusaineiden keskinäiseksi toksisuusjärjestykseksi tuli $C < A < D < E < B$. On huomattavaa, että sama järjestys saatiin niin solutoksisuuden mittauksessa kuin mitattaessa tulehdusreaktiota käynnistävien sytokiinien tuottoa.

Tulosten tarkastelu

Tuotteiden valmistajien ylläpitosiivoukseen suosittelemat pitoisuudet sattuivat tutkimuksessamme alueelle, jossa yksikään testatuista puhdistusaineista ei tappanut yli puolta soluista. Solutoksisuus lisääntyi huomattavasti vasta ylitettäessä suositellut pitoisuudet. Näissä suuremmissa pitoisuuksissa immunotoksisia vaikutuksia ei voitu enää luotettavasti määrittää, mutta jo ylläpitosiivoukseen pitoisuudessa saatiin mitattava vaste, joka sitten heikkeni normaalitasolle pienempiin pitoisuuksiin mentäessä.

Tässä tutkimuksessa käytimme alimpia ylläpitosiivoukseen suositeltuja pitoisuuksia, mutta pintapesuun ja kiinnittyneen lian poistoon suositellut pitoisuudet ovat suurempia. Siten siivoojien altistuminen niissä työvaiheissa on suurempaa. Käytännön siivoustyössä saattaa myös helposti tapahtua niin, että laimennoksia tehdään erätarkasti tai pesuaineita käytetään suositeltuja määriä enemmän. Liian suurista käyttömääristä tuskien on haittaa tilojen käyttäjille, mutta siivoojien altistuminen on tällöin suurempaa.

Tutkimuksen tuloksia ei voi kuitenkaan suoraan soveltaa ihmisiin. Käytetty ihmisen puolustusjärjestelmän solumalli on herkkä reagoimaan myös vähemmän toksisille altisteille. Soluviljelmässä altisteet viedään suoraan soluille, mikä eroaa ihmisten altistumisesta, joka puhdistusaineiden kemikaaleille tapahtuu pääasiassa hengityksen kautta.

Puhdistusaineiden kemikaaleille altistumista olisi mahdollista alentaa vähentämällä käytettyjä kemikaalimääriä ja siirtymällä osittain käyttämään pelkkää vespesua. Työsuojelurahaston rahoittaman SIBI (Siivouskemikaalien ja biosidien vaikutukset sisäilman laatuun koulu- ja päiväkotirakennuksissa) - tutkimushankkeen tulosten mukaan hyvään siivoustulokseen päästiin myös ilman päivittäistä puhdistusaineiden käyttöä. Vähäiset kemikaalimäärät eivät myöskään huonontaneet sisäilman laatua //.

JOHTOPÄÄTÖKSET

Tulokset osoittavat, että siivouksessa on tärkeää käyttää valmistajan suositteleman annostelun mukaisia puhdistusainepitoisuuksia, koska toksisuus näyttää selvästi lisääntyvän suuremmilla pitoisuuksilla. Tässä tutkimuksessa käytettiin alimpia ylläpitosiivoukseen suositeltuja pitoisuuksia, mutta joihinkin työvaiheisiin, kuten pintapesuun, suositellut pitoisuudet ovat suurempia. On kuitenkin huomattava, että käytännössä puhdistusaineiden kemikaaleille altistutaan hengityksen kautta, eikä solutestin tuloksia voi näin ollen suoraan soveltaa ihmisiin kohdistuviin vaikutuksiin.

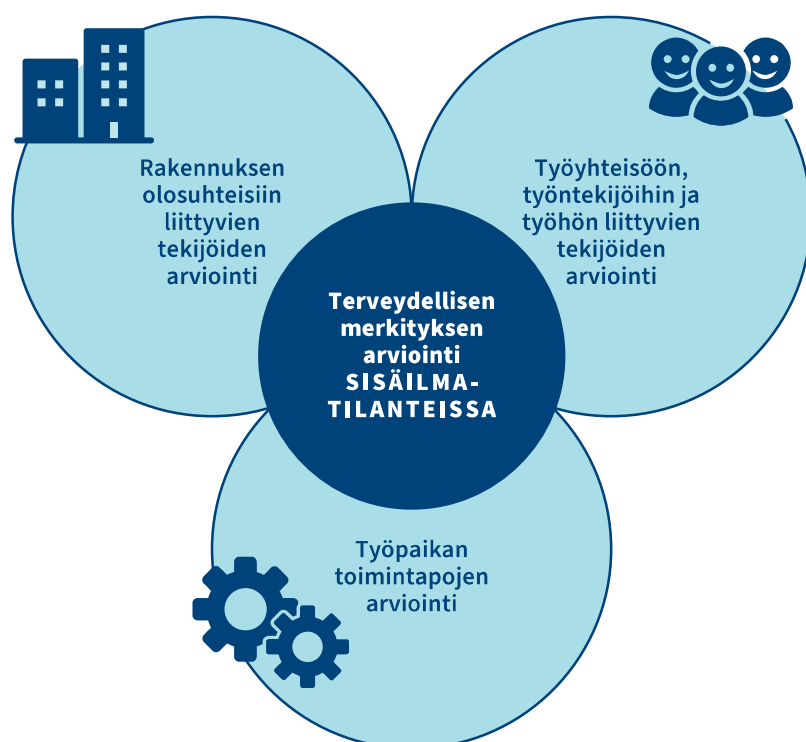
LÄHDELUETTELO

1. De Troeyer, K., De Man, J., Vandebroek, E., Vanoirbeek, J.A., Hoet, P.H., Nemery, B., Vanroelen, C., Casas, L., Ronsmans, S. (2022) Identifying cleaning products associated with short-term work-related respiratory symptoms: A workforce-based study in domestic cleaners. *Environ Int.* 162:107170.
2. De Matteis, S. Steven Ronsmans, S., Nemery, B. (2020) Respiratory Health Effects of Exposure to Cleaning Products (review). *Clinics in Chest Medicine* 41: 641-650.

3. Clausen, P.A., Frederiksen, M., Sejbæk, C.S., Sørli, J.B., Hougaard, K.S., Frydendall, K.B., Carøe, T.K., Flachs, E.M., Meyer, H.W., Schlünssen, V., Wolkoff, P. (2022) Chemicals inhaled from spray cleaning and disinfection products and their respiratory effects. A comprehensive review. *Int J Hyg Environ Health*. 229:113592.
4. Leppänen, H. (2017) Assessing microbial exposure in indoor environments by using house dust samples. Dissertation. Publications of the University of Eastern Finland 276.
5. Chanput, W., Mes, J.J., Wichers, H.J. (2014) THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.* 23: 37-45.
6. Korkalainen, M., Täubel, M., Naarala, J., Kirjavainen, P., Koistinen, A., Hyvärinen, A., Komulainen, H., Viluksela, M. (2017). Synergistic proinflammatory interactions of microbial toxins and structural components characteristic to moisture-damaged buildings. *Indoor Air*, 27: 13-23.
7. Mikkola, R., Alapieti, T., Kakko, L., Täubel, M., Järvi, K., Andersson, M.A., Reunanen, E., Leppänen, H., Vornanen-Winqvist, C., Hyvärinen, A., Salonen, H. (2020) Sisätiloissa käytettyjen siivouskemikaalien ja biosidien vaikutukset mitattuun ja koettuun sisäilman laatuun koulu- ja päiväkotirakennuksissa - Työsuojelurahaston hankkeen nro 117101 loppuraportti.
<https://aaltodoc.aalto.fi/handle/123456789/43349>

SISÄILMASTOSEMINAARI 2023

Messukeskus
14.3.2023



Sisäilmayhdistys ry

SIY Raportti 41

SISÄILMASTOSEMINAARI 2023

14.3.2023

Toimittajat:

Mervi Ahola
Anna Merikari

Sisäilmayhdistys ry

Puheenjohtaja prof. Risto Kosonen
Toiminnanjohtaja DI Mervi Ahola

Sisäilmastoseminaarin ohjausryhmä 2023:

Mervi Ahola
Ulla Haverinen-Shaughnessy
Kati Huttunen
Anne Hyvärinen
Paavo Kero
Hanna Keränen
Anne Korpi
Hannu Koskela
Risto Kosonen
Katri Leino
Tero Marttila
Sami Niemi
Pertti Pasanen
Juha Pekkanen
Anna-Mari Pessi
Anna Saarinen
Heidi Salonen
Piia Sormunen
Jorma Säteri
Marianna Tuomainen
Katja Tähtinen
Tuula Vasankari
Kirsi Villberg
Aki Vuokko
Mika Vuolle
Leif Wirtanen

Sisäilmayhdistys raportti 41

SISÄILMASTOSEMINAARI 2023
Mervi Ahola ja Anna Merikari (toim.)

Kannen kuva: Terveydellisen merkityksen arvioinnin osa-alueet sisäilmatilanteissa
(*Terveydellisen merkityksen arviointi sisäilmatilanteissa -ohje*, Työterveyslaitos 2022)
artikkelista *Terveydellisen merkityksen arviointi sisäilmatilanteissa*

Artikkeleiden sisällöstä vastaavat kirjoittajat, eikä niitä ole vertaisarvioitu.

SIY Sisäilmatieto Oy
ISSN 1237-1866
ISBN 978-952-5236-54-5
Painopaikka Grano Oy, Vaasa