

## INKAPASITOIVAT AINEET: kapsaisiinit ja klooripikriini mekanismit ja niihin perustuvat biomarkerit

MATINE-rahoitus 66392€ v. 2011

TOXMEMO-yhteistyöhanke 17.11.2011

Sotilaslääketieteen Keskus, SOTLK  
Kemiallisen aseiden kieltosopimuksen instituutti, VERIFIN  
Puolustusvoimien Teknillinen Tutkimuslaitos, PVTT  
Itä-Suomen yliopisto, Kuopion kampus

## TUTKIMUSRYHMÄ

### Hankkeen johtajat:

professori Kirsi Vähäkangas, Itä-Suomen Yliopisto  
dos Tapio Kuitunen, SOTLK

### Muu johtoryhmä:

Paula Vanninen, professori, VERIFIN  
Markku Pasanen, professori, Itä-Suomen Yliopisto  
Matti Hemmilä, tutkimusajohtaja, PVTT  
Heikki Seulanto, erikoistutkija, PVTT

### Muut tutkijat:

Mia Halme, tohtorikoulutettava, VERIFIN  
Harri Kiljunen, kemisti, VERIFIN  
Heta Salo, opiskelija  
Maija Pesonen, dos., Itä-Suomen Yliopisto/SOTLK

## Tutkimuksen tausta: kemialliset uhkakuvat

- Merkittävimmät uhkakuvat rauhanaikana ovat:
    - onnettomuudet vaarallisten kemikaalien käytössä, valmistuksessa, varastoinnissa ja kuljetuksessa - altistuneiden ja sairastuneiden määrä voi olla suuri
    - vaarallisten kemikaalien salakuljetus, välittäminen, valmistaminen tai levittäminen rikollisessa tarkoituksessa
    - Kemiallisen aseiden kieltosopimus ei ole täysin poistanut mahdollisuutta käyttää kiellettyiksi luokiteltuja kemikaaleja rikollisiin tarkoituksiin
      - Tokion terrori-iskut 1990-luvulla
  - Sotilaallisessa kriisinhallintatehtävissä
    - Improvisoidut C-aseet
- Inkapsitoivat aineet ovat kiistanalainen ryhmä Kemiallisen aseiden kieltosopimuksen suhteen:
- aineet kielletty aseina sodassa, mutta sallittu kansallisesti lain ja järjestyksen ylläpidossa

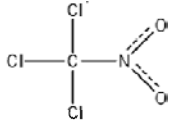
## Tutkimuksen tausta ja tavoitteet

klooripikriini ja kapsaisiini

- Päätaavoite on löytää matalaa altistumistasoa ilmentäviä biomarkkereita, joita voitaisiin käyttää Puolustusvoimien rauhanturvatehtävissä tai muissa vironomaistehtävissä toimivien työsuojeluun
- Kemiallisen altistumisen biomarkeri (osoittaa elimistön sisäisen altistumisen)
  - esim. kemikaali itse, metaboliitti tai muu reaktiotuote (addukti makromolekyylien kanssa)
  - spesifinen, stabiili

### Tutkimuksen tausta inkapasoivat aineet

- KLOORIPIKRIINI**
  - teollisuuskemikaali ja pestisidi, käytetty kyynelkaasuna
  - voimakkaasti hengitysteitä ja silmiä ärsyttävä, hyvin myrkyllinen yhdiste, altistuminen voi johtaa keuhkoödeemaan




KLOORIPIKRIINI

### Tutkimuksen tausta inkapasoivat aineet

**KAPSAISIINIIT:**

- käytetään pippurisumutteissa
- hengitysvaikeudet
- tilapäinen näön menetys



↓



Kapsaisiini noin 69% sumutteen kapsaisiineista




Dihydrokapsaisiini 22% sumutteen kapsaisiineista

### Tutkimuksen tausta ja tavoitteet

Spesifiset tavoitteet:

- Selvittää kapsaisiinin ja klooripikriinin vaikutusmekanismeja ihmisperäisissä altistumiselle relevantissa solulinjoissa käyttäen proteiiniin analyysimenetelmiä ja geenilastutekniikkaa (hengitystiet, silmä, hermokudos)
- Selvittää kapsaisiinin ja klooripikriinin metaboliaa ja mahdollisia interaktiotuotteita yleisimmin altistuissa kudoksissa sekä kehittää kvantitatiivisia analyttisiä menetelmiä (LC-MS/MS-tekniikka) metaboliiteille ja interaktiotuotteille




### MENETELMISTÄ

toksisuusmekanismien ja metabolian selvittely

**Kemiallinen aine**

**Soluviljelmät**

**Ennen- ja jälkeen:** Proteiinin määrä

**Mikroskoopia:** Solujen määrä ja morfo

**Käytännölliset erikokeet:** OTC, vaurio, hapen väkivalta, kuolleisuus, Mitokondriofunktio, Glukosyyliproteiini tms.

**Proteiini tunnustetaan vasta-ainatien avulla**

**Retinan epiteelisolut**

**Bronkioepiteeli**

**Metabolian tunnistus:** Ennen- ja jälkeen, metabolit

**metabolit**

**LC-MS/MS**


**Metabolit:** DNA- ja proteiini- tasoilla

M. Pesonen, T. Kultunen, M. Halme et al. 2011

### Saavutetut tulokset

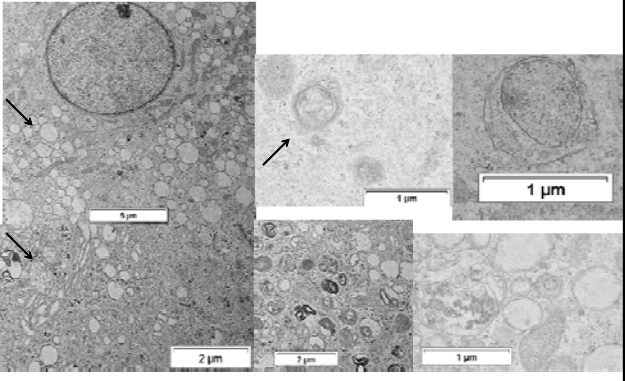
#### Metabolia ja analyttiset menetelmät

- Biomarkkeri sinappikaasulle  
Validoitu LC-MS/MS -menetelmä sinappikaasun  $\beta$ -lyasimetaboliiteille (MSMTESE ja SBMSE) käyttäen deuterium-leimattua sisäistä standardia (d6-SBMSE)
  - Matrisina humaanin virtsa
  - Menetelmä käyty biolääketieteellisten näyttöiden pätevyystestissä 2010
- Sinappikaasun metabolian tutkiminen *in vitro*
  - Maksafraaktioiden ja maksahomogenaatin altistus (sika, hiiri, rotta, ihminen)
  - LC-MS ja LC-MS/MS analyyseissä löytyi kaksi glutationi-adduktia
- UHPLC- ja HPLC-MS/MS menetelmien pystytys ja optimointi kapsasiinille, dihydrokapsasiinille ja nonivamidelle
  - Deuterium-leimatun sisäisen standardin synteesi on menneillään
- Kapsasiinin metabolian tutkiminen *in vitro*
  - Tulokset loppuvuonna 2011



### Saavutetut tulokset:

#### Toksisuuden mekanismit/ transmission elektronmikroskopia (TEM)

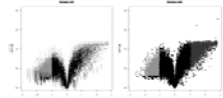


### Saavutetut tulokset

#### geenilastututkimus


**EPITEELISOLUT** alistettu klooripikriinillä  
29559 probes above detection threshold  
13991 genes  
Empirical bayes <0.05, 106 up and 242 downregulated

**Klooripikriinialistutus:**  
Retinan epiteelisolut  
Bronkoepiteelisolut



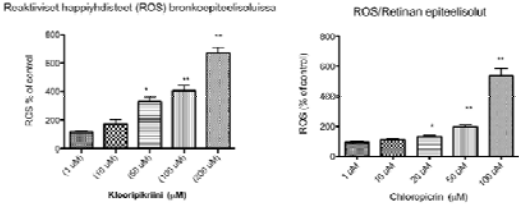
Empirical bayes listat KEGG +/- 1.5 x muutos filtroinnin jälkeen

KEGG	count	p-value
MAPK-signalling pathway	12	2.8E-3
p53-signaling pathway	4	9.1E-3
ErbB-signaling pathway	4	1.6E-1
Cell cycle	4	3.1E-1
Endocytosis	5	3.3E-1
Cytokine receptor interaction	6	4.0E-1
Prion diseases	2	4.3E-1
Maturity onset diabetes of the young	2	3.3E-1
Jak-STAT-signaling pathway	4	4.4E-1
Melanogenesis	3	4.6E-1

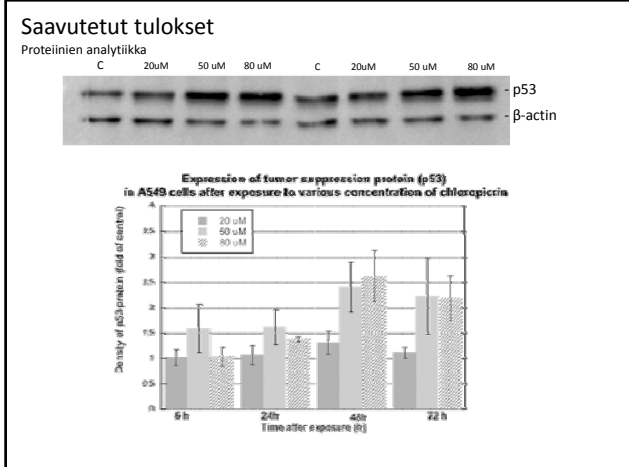


### Saavutetut tulokset

#### Reaktiivisten happiradikaalien (ROS) muodostuminen retinan ja bronkusten epiteelissä klooripikriinialistuksen jälkeen



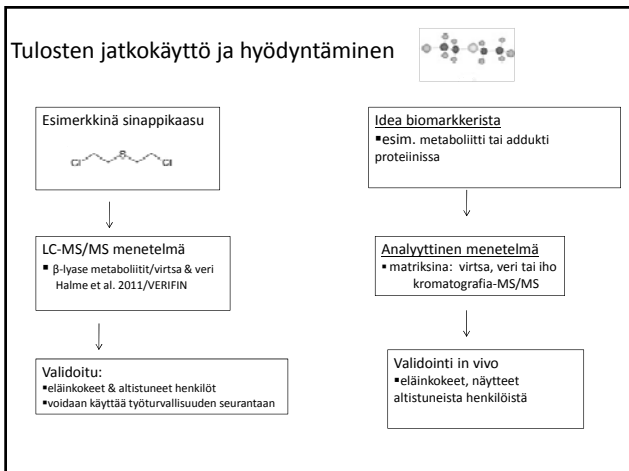
Mean  $\pm$  SD, data are representative from four independent experiments, 3-4 replicates in each concentration



### Saavutetut tulokset

yhteenveto proteiinanalytikasta (markkeriproteiineja klooripikriinialistuksessa)

	Bronkusepiteeli	Retinan epiteeli
<b>Endoplasminen retikulum:</b>		
IRE1α (inostol requiring protein 1)	+	+
Gadd 153 (growth arrest)	-	+
HSP70 (heat shock protein 70)	+	+
LC 3A/B (microtubule-associated light chain, autophagosomes)	+	+
<b>MAP-kiinasiit (autofagosomien muodostuminen)</b>		
Fosfo ERK1/2	+	+
Tot. fosfo ERK ½	+	+
P38	-	+
<b>Muut proteiinit</b>		
Tumorisuppressori p53	+	+
Fosfo p53Ser 46	-	-
Fosfo p53Ser 15	-	-
Heme oxygenase-1	-	+
Caspase-4	-	-
Caspase-3	-	+
AMPK	-	+



### Tutkimuksesta valmistuneet julkaisut

**Referoidut lehdet:**

- Pesonen M., Vähäkangas K., Halme M., Vanninen P., Seulanto H., Hemmilä M., Pasanen M., Kuitunen T. Capsaicinoids, chloropicrin and sulfur mustard: possibilities for exposure biomarkers (review), *Frontiers in Predictive Toxicology* 2010/doi: 10.3389.
- Halme M., Karjalainen H., Kiljunen P., Vanninen P. 2011. Development and validation of efficient stable isotope dilution LC-MS/MS method for verification of β-lyase metabolites in human urine after sulfur mustard exposure. *Journal of Chromatography B*. 879, 908-914.
- Pesonen M., Pasanen M., Loikkanen J., Hemmilä M., Seulanto H., Kuitunen T., Vähäkangas K. 2011. Chloropicrin induces endoplasmic reticulum stress in human retinal pigment epithelial cells. Manuscript.

**Muita julkaisuja:**

- Halme M., Pesonen M., Kiljunen H., Vanninen P. 2010. Studying β-lyase pathway of sulfur mustard *in vitro*: LC-MS/MS analysis of exposed cell fractions. Poster LC-MS Symposiumissa, Montreux, Sveitsi.
- Pesonen M., Pasanen M., Halme M., Vanninen P., Seulanto H., Hemmilä M., Kuitunen T., Vähäkangas K. 2011. Biomarkerit inkapasoivien ja ärsyttävien yhdisteiden tunnistamiseksi. *Ann Med Milit Fenn*, vol 86, No 2, 9-12.
- Pasanen M., Pesonen M., Vähäkangas K., Halme M., Vanninen P., Seulanto H., Hemmilä M., Kuitunen T. 2011. Pippurisumutteiden kapsaisiinit ja toksiset vasteet. *Ann Med Milit Fenn*, lähetetty.
- Salo H. Capsaicin-induced cell stress responses in human lung epithelial cells. *Progradu/ Itä-Suomen yliopisto*