

TIIVISTELMÄRAPORTTI (SUMMARY REPORT)

INKAPASITOIVAT AINEET: kapsaisiinit ja klooripikriini – toksisuuden mekanismit ja niihin liittyvät altistumisen biomarkkerit

Tutkimusryhmä: Professori Kirsi Vähäkangas/ Itä-Suomen yliopisto/ Kirsi.Vahakangas@uef.fi (Tutkimuksesta vastaava tutkija), Maija Pesonen, Sotilaslääketieteen keskus (SOTLK), /Itä-Suomen yliopisto, Mia Halme ja Paula Vanninen/Kemiallisen asean kieltosopimuksen instituutti (VERIFIN), Matti Hemmilä ja Heikki Seulanto/ Puolustusvoimien teknillinen tutkimuslaitos, Markku Pasanen/ Itä-Suomen yliopisto, Tapio Kuitunen/ SOTLK.

Tiivistelmä /

Tutkimus on monivuotinen Sotilaslääketieteen keskuksen, VERIFIN:in, Puolustusvoimien teknillisen tutkimuslaitoksen ja Itä-Suomen yliopiston yhteistyöhanke (projektikoodi: MAT805). Pää tavoitteena työssä on löytää toimintakykyä alentaville aineille, kapsaisiineille ja klooripikriinille altistumista mittaavia biomarkkereita, joita voidaan käyttää Puolustusvoimien työntekijöiden työsuojelussa ja terveyden seurannassa. Tutkimuksessa on käytetty toksisuuden kohde- kudoksia (hengitystiet ja silmä) edustavia ihmisperäisiä soluviljelymalleja ja kudokset sekä useita biolääketieteen ja kemian menetelmiä (mm. TEM, geenilastut, immunoblottaus, HPLC-MS/MS ja UHPLC-MS/MS). Vuoden 2011 aikana on selvitetty klooripikriinin ja kapsaisiinin toksisia vaikutuksia solujen hienorakenteeseen sekä mRNA:n ja proteiinien ilmentymiseen. Edelleen kapsaisiinin metaboliatutkimusta varten on kehitetty analyyttiset HPLC-MS/MS-menetelmät yleisimmille esiintyvillä kapsaisiini-analogeilla (kapsaisiini, dihydrokapsaisiini ja nonivamidi). Parhailtaan on meneillään selvitys kapsaisiinin ja klooripikriinin metaboliasta ihmisloluissa. Metabolia- ja molekyyllitason tutkimusten perusteella valitaan lupaavimmat ehdokkaat altistumisen biomarkkereiksi ja näille kehitetään ja validoidaan analyyttiset menetelmät.

1. Johdanto / (Tutkimuksen aihepiirin kuvaus ja laajempi merkitys)

Tämä tutkimus on biolääketieteen alaan kuuluva yhteistyöhanke, jossa selvitetään inkapasioivien aineiden, kapsaisiinin ja klooripikriinin metaboliatuotteita ja molekyyllitason vaikutusmekanismeja elimistön sisäistä altistumista mittaavien merkkiaineiden, ns. biomarkkereiden kehittämiseksi. Menetelmiä altistumisen määrittämiseksi tarvitaan 1) altistumisen ja sairauksien välisen yhteyden selvittämiseksi ja 2) altistumistasojen määrittämiseksi mahdollisesti altistuneilla. Tutkimuksella on ensisijaisesti merkitystä sotilaiden työsuojelulle.

Kapsaisiinit ja klooripikriini ovat ärsyttäviä ja toimintakykyä alentavia yhdisteitä, joiden mahdollisia pitkäaikaisia toksisia vaikutuksia tunnetaan huonosti. Kapsaisiineja käytetään pippurisumutteissa mellakan torjuntaan ja poliisin, sekä Puolustusvoimien erilaisissa virkatehtävissä. Klooripikriiniä käytetään Puolustusvoimissa materiaalitestaukseen, mutta sillä on käyttöä myös pestisidinä. Molempien yhdisteiden ärsyttävät vaikutukset kohdistuvat lähinnä hengitysteihin, silmiin ja hermokudokseen (Pesonen ym. 2010). Välitön vaikutus altistumisesta pienelle annokselle pippurisumutteita on aivastelu ja yskiminen. Suurempi annos voi aiheuttaa limakalvoturvotusta, supistumista ja erityksen lisääntymistä keuhkoputkissa, mikä johtaa hengenahdistukseen. Näiden äkillisten vaikutusten mekanismina on tulehduksen välittäjäaineiden vapautuminen. Mahdollisia pitkäaikaisvaikutuksia ja niiden mekanismeja ei sen sijaan tunneta. Klooripikriinille altistumisen välitön vaikutus on voimakas ärsytys silmissä, hengitysteissä, iholla ja suolen limakalvolla. Tämä kudoksen tulehdusreaktio voi johtaa hengitysvaikeuksiin ja pahoinvointiin. Kirjallisuudessa on kuvattu myös kuolemantapauksia

Postiosoite	MATINE Puolustusministeriö PL 31 00131 HELSINKI	Sähköposti	matine@defmin.fi
Käyntiosoite	Eteläinen Makasiinikatu 8 00130 HELSINKI	WWW-sivut	www.defmin.fi/matine
Puhelinvaihe	(09) 16001	Y-tunnus	FI01460105
Pääsihteeri	(09) 160 88310	OVT-tunnus/verkkolaskuosoite Itellan operaattorivälittäjä-tunnus	003701460105 003710948874
Suunnittelusihteeri	(09) 160 88314	Verkkolaskuoperaattori	Itella Information Oy
Toimistos sihteeri	050 5555 837	Yhteyshenkilö/Itella	helpdesk@itella.net
Faksi kirjaamo	(09) 160 88244		

keuhkopöhön seurauksena. Solututkimuksissa on saatu viitteitä genotoksisesta eli perimää vahingoittavasta vaikutuksesta. Myöskään klooripikriinin pitkäaikaisvaikutuksia ei tunneta.

Tarkinta tietoa altistumisesta yksilötasolla saadaan biomarkkereita hyödyntävillä biomonitoimintimenetelmillä, joilla mitataan elimistön sisäistä altistumista (Angerer ym. 2007). Elimistön sisäisen altistumisen mittaamisessa ei ole väliä, mitä kautta aine joutuu elimistöön, vaan koko elimistön altistuminen tulee huomioiduksi. Biomonitoimintimenetelmät perustuvat tutkimustietoon aineiden käyttäytymisestä elimistössä, mm. metaboliasta ja kudokseen sitoutumisesta. Lisäksi voidaan käyttää kudoksessa tapahtuvien mahdollisesti sairauteen liittyvien aikaisten muutosten määrittämistä. Biomonitoimintimenetelmien ja biomarkkereiden kehittäminen edellyttää siis tutkimusta altistumiseen liittyvistä molekyyllitason muutoksista ja aineiden vierasainemetaboliasta.

Biomarkkerin kehittämiseen liittyy sopivan mitattavan molekyylin, esimerkiksi metaboliitin tai kudoksessa reagoivan, tietyn proteiinin identifioiminen. Tutkittavalle molekyyllille pitää kehittää luotettava, kvantitatiivinen määrittäminen. Sen lisäksi on tutkittava, minkälaisesta näytteestä (virtsa, veri, posken limakalvo tms.) molekyyli on parhaiten osoitettavissa altistumisen jälkeen. Lopuksi tarvitaan biomarkkerin validointi varmasti altistuneilla ihmisillä. Lupaavia uusia menetelmiä ovat toksikogenomiikkaan perustuvat menetelmät, joissa tutkitaan suurta määrää mRNA-molekyylejä ja niiden muutosprofiilia (McHale ym. 2010). Tällainen profiili voi toimia altistumisen merkkiaineena, mutta se voi antaa viitteitä myös mahdollisista molekyyllitason mekanismeista.

2. Tutkimuksen tavoite ja suunnitelma / (Tutkimuskysymysten tarkempi erittely ja suunnitelma tutkimuksen toteutuksesta)

Tutkimuksen päätavoite on löytää kapsaisiineille ja klooripikriinille altistumista ilmentäviä biomarkkereita, joita voidaan käyttää Puolustusvoimien rauhanturvatehtävissä tai muissa virkatehtävissä työskentelevien työsuojeluun. Tutkimus koostuu kolmesta osa-alueesta: WP1 (work package1) sisältää molekulaaristen mekanismien ja metabolian selvittelyn, WP2 kvantitatiivisten analyysimenetelmien kehittämisen ja WP3, sen tutkimisen soveltuvatko kehitetyt menetelmät biomarkkereiksi. Näistä kahta (WP1 ja WP2) on tehty vuoden 2011 aikana. Biomarkkereiden tunnistamiseksi on selvitetty klooripikriinin ja kapsaisiinin molekyyllitason vasteita, ja kapsaisiinin metaboliaa sekä kehitetty analyysimenetelmät pippurisumutteen kolmen keskeisen kapsaisiini-rakennearanalogin mittaamiseksi.

3. Aineisto ja menetelmät / (Tutkimuksen teoreettisen viitekehyksen kuvaus, käytetty materiaali ja menetelmät)

Tutkittavat kemikaalit ovat reaktiivisia yhdisteitä, joiden elinajat elimistössä ovat lyhyitä. Tämän vuoksi yhdisteet sinänsä eivät sovi hyvin altistumisen seurantaan. Kemiaalliset aineet voivat kuitenkin aiheuttaa kudoksissa sellaisia molekyyllitason vasteita, joita voidaan käyttää altistumisen toteamiseen. Tässä tutkimuksessa toksisten mekanismien selvittelyyn on käytetty ihmisperäisiä toksisuuden kohdekudoksista peräisin olevia (hengitystiet, silmä ja hermoakseli, maksa) soluja ja kudokset (mikrosomit, sytosolifraktiot). Altistusten aiheuttamia muutoksia proteiineissa on mitattu käyttäen elektroforeesia ja eroteltujen proteiinien tunnistamiseen immunoblottausta. Lisäksi on käytetty mikroskooppitekniikoita mm. transmissioelektronimikroskopiaa sekä ihmisen koko genomin sisältävää geenilastutekniikkaa altistumisesta johtuvan geenien ilmenemisen aktivaation ja/tai hiljenemisen selvittelyssä. Reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumista on tutkittu käyttäen fluoresoivaa leimaa ja monileimallista. Tutkittavien yhdisteiden metaboliaa on selvitetty kudokset (mikrosomit, sytosolifraktiot) tunnistamiseen on käytetty fraktioita mm. kiinteäfaasi-uuttoa sekä muita moderneja kemiallisen analytiikan menetelmiä (LC-MS ja LC-MS/MS UHPLC, HPLC-MS/MS-tekniikoita ja tarkan massan laitetta).

4. Tulokset ja pohdinta / (Saavutetut tulokset ja arvio tulosten oikeellisuudesta, kattavuudesta, merkityksestä, hyödynnettävyydestä)

A. Vaikutusmekanismien selvittely

Vaikutusmekanismeja on tutkittu pääasiassa silmän verkkokalvon ja hengitysteiden epiteelisoluissa ja pisimmälle työssä on edetty klooripikriinin vaikutusten tutkimuksessa. Tulokset osoittavat, että klooripikriini aiheuttaa vaurion spesifisesti solujen endoplasmiseen retikulumiin (Kuva 1). Tässä solujen kalvoverkostossa tapahtuu proteiinien ja lipidien biosynteesiä sekä proteiinien prosessointia ja solun kalsiumin säätely. Elektronimikroskopian perusteella voidaan päätellä, että klooripikriinin aiheuttamasta vauriosta seuraa häiriötä juuri näihin solun toimintoihin. Edelleen proteiini-analyysit osoittivat, että klooripikriini aiheutti muutoksia useiden proteiinien ilmentymisessä (kummastakin solutyypistä tutkittiin noin 15 proteiinia). Erityisesti muutoksia nähtiin endoplasmisen retikulumin (ER) toimintaan liittyvissä proteiineissa IRE1 α - ja Gadd 153. Muutokset näissä proteiineissa liittyvät ER-stressiin ja niitä pidetään ER-stressin markkereina (Yoshida 2007). Lisäksi muutoksia nähtiin sekä p53-proteiinissa (Kuva 2) että MAP-kinaseissa. Nämä reagoivat perimään toksisesti vaikuttaviin, DNA:ta vaurioitaviin tai muulla tavalla solua rasittaviin signaaleihin kuten tulehdukseen. Klooripikriini aiheutti myös voimakasta oksidatiivista stressiä, mikä todettiin mittaamalla suoraan altistuksen jälkeen reaktiivisten happiyhdisteiden muodostumista soluviljelmissä sekä oksidatiivisen stressin kudosmarkkerin (hemioksygenaasi) määrän nousua. Alustavat geenilastuanalyysit osoittavat muutoksia solujen jakautumiseen, DNA-vaurioon ja sytokiinieritykseen liittyvissä geeneissä eli vahvistavat ainakin osittain mikroskooppi- ja proteiini-analyysissä saatuja tuloksia klooripikriinin vaikutuksista. Vasteet olivat hyvin samanlaisia sekä hengitysteiden että retinan epiteelisoluissa eli klooripikriini näyttää vaurioittavan selvimmin solujen endoplasmista retikulumia, aiheuttaen ns. ER-stressiä ja morfologisia muutoksia kalvoverkoston. Klooripikriinin aiheuttamien muutosten taustalla voi olla kloorin vapautuminen klooripikriinin rakenteesta, mutta myös jollakin klooripikriinin metaboliitilla, joka mahdollisesti muodostuu ER:ssä metabolian tuotteena voi olla merkitystä. Klooripikriinin metaboliaa tutkitaan vuoden 2012 aikana.

Kapsaisiinien vaikutusmekanismia on tutkittu pääasiassa hengitysteiden epiteelisolussa käyttäen altistuksissa kahta pippurisumutteen yleisintä analogia (kapsaisiini ja dihydrokapsaisiini) yhdessä sekä potenteinta analogia, kapsaisiinia yksinään. Tulokset osoittavat, että kapsaiinin sytotoksuus voimistuu dihydrokapsaiinin vaikutuksesta eli yhteisvaikutus on voimakkaampi kuin kapsaiinin vaikutus yksinään. Edelleen tulokset osoittavat, että kapsaisiinilla ja dihydrokapsaiininilla yhdessä, ja kapsaisiinilla yksinään on vaikutusta p53 tuumorisuppressori-proteiiniin. Tämän proteiinin aktivoituminen liittyy DNA-vaurioon ja solusyklin muutoksiin. Kapsaisiinien vaikutusmekanismien tutkimus on vielä kesken. Sitä jatketaan ja laajennetaan syksyn 2011 ja vuoden 2012 aikana. Tutkimuksesta on valmistumassa Heta Salon opinnäytetyö (pro gradu), jota hän jatkaa väitöstutkimuksena Itä-Suomen yliopistossa.

B. Metaboliatutkimukset ja analyttisten menetelmien kehitys

Kapsaiinin metabolia

Kapsaisiinien metabolian tutkimista varten pystytettiin nestekromatografia-massaspektrometriaan (LC-MS) ja tandem-massaspektrometriaan (LC-MS/MS) perustuvat analyysimenetelmät. Analyyseissä käytetään kahta erilaista laitteistoa; UHPLC-MS(kolmoiskvadrupolia) ja HPLC-MS(ioniloukku), jotka mahdollistavat sekä nopeat analyysit että tarvittaessa uusien rakenteiden spesifisen identifikaation MSⁿ-tekniikalla. Ionisaatio-tekniikkana käytetään sähkösumustusionisaatiota (electrospray, ESI).

Analyysimenetelmät pystytettiin kapsaisiinille ja sen kahdelle analogille, dihydrokapsaisiinille ja nonivamidille, käyttäen erotukseen C18 käänteisfaasikolonnia. Koska analogit ovat rakenteellisesti hyvin samanlaisia, ne myös eluoituvat kolonnista lähes samaan aikaan (eli retentioajat ovat lähes samat). MS/MS-tekniikkaa käytettäessä tämä ei kuitenkaan aiheuta ongelmia, vaan yhdisteet saadaan identifioitua erikseen. Loppuvuonna 2011 menetelmää testataan vielä spesifisemmällä fenyylikolonnilta, jotta analogien lisäksi myös metaboliitit ja mahdolliset proteiinikonjugaatit erottuisivat paremmin. Kehitetyn menetelmän herkkyyttä testattiin laimennussarjalla (1, 5, 10, 25, 50 ja 100 ng/ml), mikä antoi lineaarisen korrelaation ja sen määrittärajaksi oli jopa alle 1 ng/ml (n. 3,3 nM).

Kvantitatiivista analyysimenetelmää varten syntetisoidaan deuterium-leimattu (*d*3-) sisäinen standardi. *d*3-vanilliinin valmistamiseksi kokeiltiin useita kirjallisuudesta löydettyjä menetelmiä. Parhaaksi menetelmäksi osoittautui 3,4-dihydroksibentsaldehydin metylointi kalium tert-butylaatin läsnä ollessa ja saadun yhdisteen muuntaminen vastaavaksi hydroksyyliamiiniksi. Saadun yhdisteen pelkistäminen vedyttämällä palladiumkatalyytin läsnä ollessa tuotti *d*3-vanillyyliamiinia noin 20% saannolla. Nyt synteesiprojektissa valmistetaan erilaisia rasvahappoklorideja, joista pystytään valmistamaan useimmat tunnetuista kapsaisiinimetaboliiteista.

Kapsaisiinien metabolian tutkiminen aloitettiin altistamalla sian maksan mikrosomeja *in vitro*. Mikrosomifraktiota käytetään altistuskokeissa, sillä se sisältää tärkeimmät vierasainemetaboliassa esiintyvät entsyymit. Ensimmäisessä koesarjassa testattiin aikavasteet 0, 5, 10, 20 ja 60 minuuttia, sekä kapsaisiinin annosvasteet 0, 1, 10 ja 100 µM. Näytteissä käytettiin noin 1 mg/ml proteiinikonsentraatiota (mikrosomeja). Altistuskoe näytteet analysoidaan kehitetyillä LC-MS ja LC-MS/MS menetelmillä. Analyysien tulokset valmistuvat loppuvuodesta 2011 ja tutkimusta jatketaan soluultistuksin alkuvuodesta 2012, jolloin niistä laaditaan myös julkaisukäsikirjoitus. Työ on osa FM Mia Halmeen väitöskirjatutkimusta Helsingin yliopistossa.

Sinappikaasun metabolia

Sinappikaasun metabolian tutkimusta on jatkettu *in vitro* altistuskokeilla. Sian, hiiren ja rotan maksan sytosolifraktioita ja maksahomogenaattia on altistettu sinappikaasulle eri konsentraatioissa ja aikavasteissa tarkoituksena löytää aiemmin uhrien ja altistettujen eläinten virtsasta löytyneet β-lysaasimetaboliitit, joille edellisenä tutkimusvuonna kehitettiin ja validoitiin analyysimenetelmä (Halme ym. 2011). Näiden metaboliittien syntymiseen vaaditaan glutationikonjugaatio sinappikaasumolekyylin molempiin päihin. Tutkimuksissamme kuitenkin selvisi, että *in vitro* kokeissa sinappikaasu hydrolysoituu osittain ja päätuotteena onkin vain osittainen glutationi-konjugaatti. Molempien konjugaattien rakenteet selvitettiin LC-MS² ja LC-MS³ analyysillä, sekä tarkaanmassaan laitteella (UPLC-Q-TOF). Tutkimusta jatketaan vielä muuttamalla *in vitro* altistusnäytteiden koostumusta ja tuloksista kirjoitetaan julkaisukäsikirjoitus alkuvuonna 2012. Työ on osa FM Mia Halmeen väitöskirjatutkimusta Helsingin yliopistossa.

5. Loppupäätelmät /

(Kriittinen tarkastelu tutkimuksen tuloksista ja aikaansaannoksista tavoitteisiin nähden, keskeiset havainnot riittävän yleistajuisesti kiteytettynä, näkymät ja suositukset tutkimuksen jatkosta)

Hankkeessa olemme (2009-2010) jo kehittäneet validoidun biomarkkerin määrittämenetelmän sinappikaasulle altistumisen mittaamiseksi virtsanäytteistä (Halme ym. 2010). Projektimme tavoitteena on kehittää vastaavat menetelmät kapsaisiini- ja klooripikriini-altistumisen mittaamiseen. Tässä jatkotyössä on tutkittu näiden kahden aineen toksisuuden mekanismeja ja metaboliaa, ja kehitetty analyttisiä menetelmiä. Toksisuutta on selvitetty useilla eri taasoilla, mm. on selvitetty vaikutuksia toksisia soluvasteita välittävien geenien ilmentymiseen

geenilastuilla (mRNA taso), ja solujen morfologiaan sekä solustressille reagoivien proteiinien ilmentymiseen. Solutason ja metaboliaan kohdistuvien tutkimusten valmistuttua voidaan siirtyä biomarkkereiden identifiointiin ja mittausmenetelmien kehitystyöhön. Saadut tulokset - ja kokemukset sinappikaasun validointiprosessista - viittaavat siihen, että pystymme jatkossa kehittämään Puolustusvoimien käyttöön tutkittaville aineille altistumista ja haitallisia kudovasteita ilmentäviä biomarkkereita. Kudovasteet saattavat olla pitkäaikaisia ja aineelle ominaisia ja kehitettävät menetelmät siten hyödyllisiä kroonisen altistumisen määrittämiseksi.

6. Tutkimuksen tuottamat tieteelliset julkaisut ja muut mahdolliset raportit / (Lyhyt kuvaus julkaisun keskeisestä sisällöstä sekä täydelliset bibliografiset tunnistetiedot (kirjoittajat; julkaisun nimi; sarjan, julkaisun tai journalin nimi ja numero; julkaisija; paikka; vuosi))

Artikkelit vertaisarviointia käyttävissä kansainvälisissä lehdissä:

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 article), *Frontiers in Predictive Toxicology* 2010/doi: 10.3389.

Artikkeli on yleiskatsaus, joka käsittelee kapsaisiinien, klooripikriinin ja sinappikaasun farmakokinetiikkaa ja toksisuutta sekä mahdollisia biomarkkereita.

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.

Artikkeli on kahden sinappikaasumetaboliitin (β -lyasimetaboliitit) validointityö, jossa on kehitetty menetelmä näiden metaboliittien mittaamiseksi ihmisen virtsanäytteistä.

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. Käsikirjoitus, lähdyssä lehteen.

Artikkeli käsittelee klooripikriinin molekulaarisia vaikutuksia silmän retinan epiteelisoluissa.

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.

Työssä on identifioitu sinappikaasun metaboliitteja altistetuista solufraktiosta.

Pesonen M., Pasanen M., Halme M., Vanninen P., Seulanto H., Hemmilä M., Kuitunen T., Vähäkangas K. 2011. Biomarkerit inkapasoitovien ja ärsyttävien yhdisteiden tunnistajina. *Ann Med Milit Fenn*, vol 86, No 2, 9-12.

Artikkeli on yleiskatsaus, joka käsittelee kemiallisen altistumisen mittaamista, altistumisen biomarkkereita ja biomarkkereiden kehittämistä.

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* 3,



11-14.

Artikkeli on yleiskatsaus pippurisumutteiden toksisuudesta.

Salo H. Capsaicin-induced cell stress responses in human lung epithelial cells. Progradu/ Itä-Suomen yliopisto.

Työssä on identifioitu kapsaisiini-altistuksen aiheuttamia muutoksia solun stressiproteiineissa mm. p53 proteiinissa hengitysteiden epiteelisoluissa.

Referenssit

Angerer J., Ewers U., Wilhelm M. 2007. Human biomonitoring: State of the art. International Journal of Hygiene and Environmental Health 210, 201-228.

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.

McHale CM, Zhang L, Hubbard AE & Smith MT. 2010. Toxicogenomic profiling of chemically exposed humans in risk assessment. Mutat Res 705: 172-183, 2010

Pesonen M., Vähäkangas K., Halme M., Vanninen P., Seulanto H., Hemmilä M., Pasanen M., Kuitunen T. 2010. Capsaicinoids, chloropicrin and sulfur mustard: possibilities for exposure biomarkers (Review article), Frontiers in Predictive Toxicology /doi: 10.3389.

Yoshida H. 2007. ER stress and diseases. FEBS Journal 274, 630-658.

MATINE-hankkeen loppulaskutuksen edellytyksenä on loppuraportointi, joka koostuu tälle pohjalle laaditusta Tiivistelmäraportista sekä erillisestä vapaamuotoisesta Kustannuslaskutuksesta. (Tiivistelmäraportti korvaa aiemmin vaaditut Loppuraportin ja Tiivistelmän).

Tiivistelmäraportti keskittyy hankkeen tieteellisiin aikaansaannoksiin tiedon käytettävyyttä ja sovellettavuutta korostaen. Tutkimustulosten osalta MATINE kannustaa avoimeen tieteelliseen kansainväliseen tai kansalliseen julkaisutapaan ja/tai muuhun aktiiviseen omatoimiseen julkaisemiseen (esim. tutkimuslaitoksen omissa sarjoissa); näissä julkaisuissa tulee MATINE mainita rahoittajana.

Tiivistelmäraportin tulee olla itsenäinen esitys MATINE:n rahoittaman tutkimushankkeen tavoitteista, sisällöstä, toteutuksesta ja tuloksista. **Tiivistelmäraportti on pituudeltaan 6-10 sivua ja se julkaistaan sellaisenaan MATINE:n verkkosivuilla.** Tiivistelmäraportti kirjoitetaan Word-tiedostoon joko suomeksi tai englanniksi. Poikkeustapauksissa jolloin hankkeessa käsitellään tai hankkeessa on syntynyt maanpuolustuksellisista syistä salassa pidettävää tietoa, tulee tiivistelmäraportin laadinnassa rajoittua julkaiselle tasolle.

Kirjoita teksti harmaalle alueelle pohjaan tehdyn jaottelun mukaisesti otsakkeen alle (poista otsikosta tarpeeton engl. / suomenkielinen vaihtoehto). Fontti Verdana 10. Omia väliotsakkeita



saa käyttää jäsentelyn tueksi. Käytä otsakkeissa ja tekstissä pohjan tyylejä. Kohtaan Tiivistelmä/Abstract on tarkoitus tehdä koko tutkimusta lyhyesti kuvaava teksti, jonka lukemalla saa käsityksen tutkimuksen sisällöstä.

Tutkimuksen johtaja voi halutessaan pyytää asiantuntijalausunnon hanketta seuranneelta ja-ostolta tai hallinnonalan edustajalta hankkeen tulosten sovellettavuudesta ja relevanssista toimialalla.

MATINEn sihteeristö pyytää MPKK:n kirjastosta julkaisulle sähköisen ISBN tunnuksen (PDF), jolloin tiivistelmäraporttiin voidaan viitata julkaisuna. Verkkojulkaisun ISSN numero on 1797-3457.