

치올기 함유 저분자 화합물과의 반응성을 이용하는 간단한 *in chemico* 피부감작성 시험법의 개발 가능성 평가

김건호, 차동호, 구형모, 박재성, 정재훈, 황진선, 네팔마헤시, 정태천*

영남대학교 약학대학

A Possible Simple *in Chemico* Test to Identify Skin Sensitizers and Non-Sensitizers by Using Low Molecular Weight Compounds Containing Thiol Group

Geon Ho Kim, Dong Ho Cha, Hyung Mo Gu, Jae Sung Park, Jae Hoon Jeong,
Jin Sum Hwang, Mahesh Raj Nepal, Tae Cheon Jeong*

College of Pharmacy, Yeungnam University, Gyeongsan, Korea

ABSTRACT. For the initiation of skin sensitization reaction, a sensitizer should react with endogenous proteins. During the haptenization of a sensitizer with proteins, it is also possible for a sensitizer to react with small molecules that contain either amino or thiol group, indicating a possibility to develop a simple skin sensitization test using the reactivity of test compounds with thiol-containing low molecular weight compounds. In the present study, 10 compounds that contain a thiol group were pre-tested to determine whether the reactivity with a thiol-detecting monobromobimane would be in concentration-dependent manners. Subsequently, among thiol compounds, a simple spectrofluorometrical method to identify skin sensitizers *in chemico* was tested with glutathione, an endogenous substance that contains amino and thiol groups. To fluorometrically quantitate the remaining thiol-containing compounds following a reaction with skin sensitizers, monobromobimane was employed. The conditions optimized included: incubation conditions of thiol compounds including glutathione with monobromobimane, molar ratios of thiol compounds to monobromobimane, optimal concentration and incubation time of monobromobimane, and pH and incubation time with test compounds. With a tentatively optimized conditions, 4 skin sensitizers and 2 non-sensitizers were tested to know whether the method could correctly identify skin sensitizers and non-sensitizers. The results indicated a good possibility. Although further optimization is required, it would be a useful screening tool for determining skin sensitization potential of test compounds, because the present method employs a simple endogenous thiol compound as an acceptor for sensitizers with a spectrofluorometric detection system requiring neither experimental animals nor cell cultures.

KEY WORDS: skin sensitization, glutathione, monobromobimane, spectrofluorometry, *in chemico*

Introduction

실험동물을 사용하는 국소립프절시험을 비롯하여,

실험동물을 전혀 사용하지 않는 다양한 *in vitro* 피부 감작성 평가 시험방법이 개발되어 화장품 개발 연구에 널리 사용되고 있다 (Basketter et al., 1999; 2000; Cockshott et al., 2006; Gerberick et al., 2004; 2007a; 2007b; 2009; Kimber et al., 2002; 2010). 이들 시험법은 비교적 높은 예측력을 나타내지만, 국소립프절시험은 여전히 동물을 사용해야 하는 문제점이 있고, 합성 펩타이드와 감작성 물질 간의 반응성을 평가하는 direct peptide reactivity assay (DPRA)의 경우 고속 액체 크로마토그래피와 같은 고가의 복잡한 분석기기와 더불어 합성 펩타이드를 사용해야 하기 때

Received: 6 November 2020
Revised: 18 December 2020
Accepted: 22 December 2020

* Corresponding author: Tae Cheon Jeong
College of Pharmacy, Yeungnam University,
Gyeongsan 712-749, Korea
Tel: 053-810-2819; Fax: 053-810-4654
E-mail: taecheon@ynu.ac.kr

문에 기존의 실험동물 사용자들에게는 이러한 대체시험법을 활용한 연구의 수행에 어려움이 따르고 있는 것이 현실이다 (Gerberick et al., 2007a; 2007b; Kimber et al., 2002; 2010). 즉, 동물실험을 대체하는 시험기술을 보편적인 독성학 연구실에서 활용할 수 있도록 널리 보급하기 위해서는 시험의 예측력을 어느 정도 확보하면서 실험 단계를 가능한 한 최소화하고 많은 연구실에서 갖추고 있는 보편적인 분석장비를 사용하는 기술의 개발이 필요한 것으로 판단된다.

간편하면서도 예측력이 높은 시험법을 개발하는 것은 매우 어려운 작업이지만, 화학물질에 의해 유발되는 피부감작성의 경우 저분자 감작성물질과 단백질 간의 합텐화 과정이 존재하여 개발 가능성이 비교적 높은 것으로 보인다 (Ahlfors et al., 2003; Gerberick et al., 2007a; 2007b). 일반적으로 피부 감작성 물질이 피부의 단백질과 결합하여 항원성을 가지게 될 때, 아미노기나 치올기를 가진 다양한 종류의 저분자량의 내인성 물질도 동시에 반응성이 큰 감작성물질과 결합이 일어날 것으로 예측할 수 있다. 비록 생체 내 저분자 화합물과 감작성 물질 간의 반응은 피부감작성 반응의 진행과는 무관하지만 화학적 반응성 측면에서는 DPRA 시험과 마찬가지로 감작성 물질과 치올기를 가진 저분자 화합물과의 반응이기 때문에 이러한 특성을 피부감작성 시험법 개발에 응용이 가능할 수 있음을 의미하는 것으로 판단된다. 만약, 치올 함유 저분자 화합물과 기존에 알려진 감작성 물질 간의 반응성이 비감작성 물질과의 반응성보다 크게 나타난다면 적절한 cut-off 값을 설정하여 충분히 피부감작성 시험법으로 개발이 가능할 것이므로 이에 대한 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

즉, 먼저 치올기를 가진 저분자 화합물과 피부 감작성 여부를 평가할 시험물질을 일정시간 반응시키고 미반응의 치올기 화합물을 정량함으로써 시험물질의 반응성의 정도를 시험할 수 있다. 치올기 화합물을 정량적으로 검출할 수 있는 많은 종류의 시약이 상업적으로 구할 수 있는 장점도 있어서 시험조건을 최적화하는 데에도 장점이 많은 것으로 보인다. 그리고 치올기 검출 시약 중 형광분석이 가능한 물질을 사용한다면 동물대체시험법의 개발에 항상 문제가 되고 있는 시험물질의 색깔에 의한 간섭작용도 피할 수 있는 장점이 있다. 따라서, 본 연구에서는 치올 함유 저분자 화합물 10종에 대하여 이들을 정량적으로 검출할 수 있는 형광시약인 monobromobimane과의 반응성을 먼저 살펴 본 다음, 이 시험계가 감작성 물질을 판별할 수 있는 시험법으로의 개발 가능성이 있는지를 평가해 보고

자 하였고, 예비시험의 결과 시험에 사용한 10종의 화합물이 모두 검출이 가능할 것으로 나타난 결과를 바탕으로 먼저 생체 내 물질 중 친전자성 물질과의 반응이 잘 알려진 glutathione에 대하여 일련의 시험조건을 부분적으로 최적화한 다음 잘 알려진 4종의 감작성 물질과 2종의 비감작성 물질에 대하여 시험법으로의 개발 가능성이 있는지 살펴보았다. 또한 시험 플랫폼은 시험관이 아닌 96-well plate를 적용하여 시험물질 사용량을 줄이고 1회 시험에 여러 시험물질을 동시에 평가할 수 있는 시험법으로 개발해 보고자 하였다.

Materials and Methods

1. 재료

Glutathione을 비롯한 순도 95% 이상의 10종 치올 화합물, 2,4-dinitrochlorobenzene, cinnamaldehyde, lactic acid, 그리고 isopropanol은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다. Monobromobimane, eugenol, 그리고 dimethyl sulfoxide (DMSO)는 TCI (Tokyo, 일본)에서 구입하였고, acetonitrile은 J.T. Baker (Philipsburg, NJ, 미국)에서 구입하였다. 그 밖의 시약도 시판 특급 시약을 사용하였으며, 각 화합물은 별도의 정제 과정 없이 그대로 실험에 사용하였다.

2. 치올 화합물과 monobromobimane 간의 반응 최적화

치올 화합물 일정 농도(100 μ L)를 0.1 M potassium phosphate 완충용액(pH 8) 또는 0.1 M ammonium acetate 완충용액(pH 10)에 녹여 형광 간섭이 없는 흑색의 96-well plate (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, 독일)에 분주하고, 시험물질 또는 시험물질을 녹인 용매(acetonitrile 또는 DMSO, 50 mL)를 추가한 다음, 일정 온도 조건에서 일정 시간 동안 암소에서 혼합액을 반응시켰다. 이 때 반응시간 동안 반응액의 부피를 유지하기 위하여 밀봉용 접착 테이프로 각 well을 밀봉하였다. 반응이 종료되면, 일정 농도의 monobromobimane (0.1 M potassium phosphate, pH 8, 50 μ L)을 가하여 30분간 반응시켜 남아 있는 치올화합물을 형광계(Tecan Spark M10 plate reader)를 이용하여 465 nm 파장(excitation, 360 nm)에서 정량하였다. 관찰된 형광도는 relative fluorescence unit (RFU)로 결과에 표시하였다.

3. 실험결과의 계산

시험물질과 반응 후 미반응의 glutathione을 mono-bromobimane과 반응시켜 얻은 형광값(RFU)으로부터 구하여 다음 식을 이용하여 시험물질에 의하여 감소된 glutathione의 양을 산출하였다: % 감소량 = 100 x (X - Y)/X. 이때 'X'는 용매군의 형광값에 해당하였으며, 'Y'는 시험물질군의 형광값이었다. 그리고 % 감소량이 0 미만인 경우는 0으로, 100 초과인 경우 100으로 간주하여 계산하였다.

Results and Discussion

피부감작성 반응은 4 가지의 주요 과정, 즉 저분자 감작성 물질과 체내 단백질과의 결합, 피부 각질세포의 활성화, 수지상 세포에 의한 항원의 표현 및 T-세포의 활성화에 의한 감작성 반응의 단계로 일어나는 면역반응의 일종이다(Kimber et al., 2010; Nepal et al., 2018). 따라서, 체내 단백질이 가진 시스테인 잔기의 치올기와 감작성 물질의 결합은 피부감작성 반응의 필수 요소이며, OECD에서 검증된 DPRA 시험법도 합성 펩타이드를 이용한 시험물질과의 반응성을 이용한 방법이다(Gerberick et al., 2007a; 2007b). 치올 화합물과 감작성 물질 간의 반응성을 평가하기 위해서는 먼저 반응 후 남아있는 치올 화합물을 정량적으로 검

출할 수 있는 방법의 확립이 필요하였다. Glutathione을 비롯한 치올 화합물의 검출을 위한 방법으로 흡광도법과 형광도법 등 다양한 방법이 제시되어 있다(Ellman, 1959; Rudyk and Eaton, 2014). 흡광도 측정 방법을 이용하는 대체시험법 개발 시 발생하는 여러 문제점 중에는 다양한 시험물질의 색간섭에 의한 부정확한 예측력 또는 시험계 적용이 불가능해지는 점을 고려하여, 본 연구에서는 형광법을 이용한 치올 화합물 검출방법을 시도해 보고자 문헌조사를 통하여 monobromobimane을 치올기 검출 시약으로 선택하였다(Rudyk and Eaton, 2014).

먼저 monobromobimane으로 치올 화합물을 정량적으로 검출할 수 있는지를 확인하기 위하여 glutathione을 비롯한 8종의 화합물을 평가하였다(Fig. 1과 2). 여러 농도의 치올 화합물을 pH 10 조건에서 시험물질의 용매로 사용할 DMSO (20%) 존재 하에 monobromobimane 용액과 반응시키고 형광도를 측정된 결과, 모든 치올 화합물은 100 μM까지 직선성을 보이며 형광도가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 100 μM 이상에서는 포화되는 결과를 나타내었다(Fig. 2). 이러한 결과는 매우 낮은 치올 화합물의 농도 범위에서도 정량적 검출이 가능함을 의미하여, 시험조건의 최적화 후 감작성 물질과의 반응정도를 높은 감도로 정량할 수 있음을 의미하는 결과로 판단되었다.

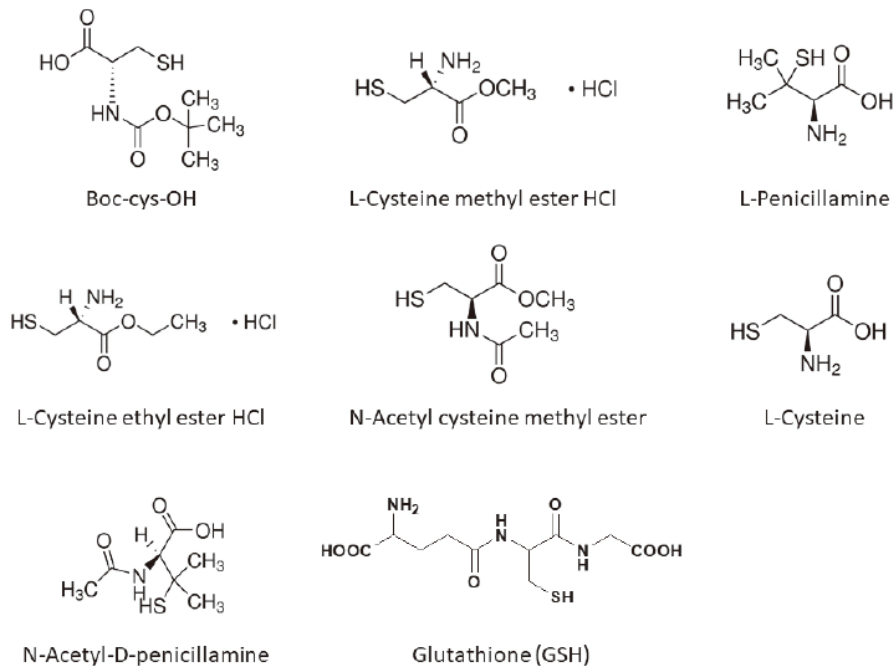


Fig 1. Structures of low molecular weight compounds containing thiol group tested in the present study

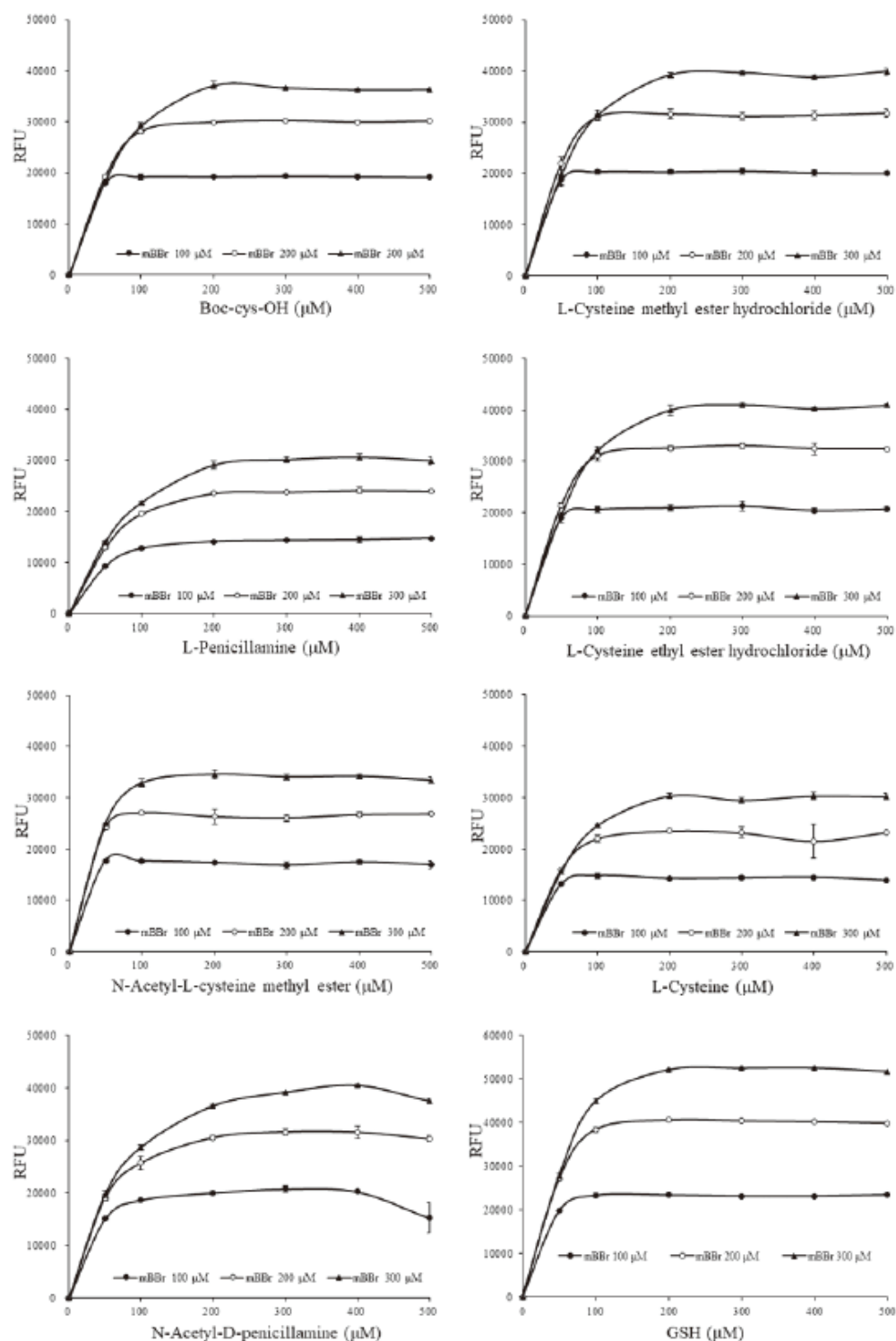


Fig 2. Reactivity of thiol-containing compounds with monobromobimane. Given concentrations of thiol-containing compounds in 0.1 M ammonium acetate buffer, pH 10, with 20% DMSO were incubated with given concentrations of monobromobimane in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8) for 30 min in the dark at room temperature. The reaction was conducted in a black 96-well plate with 150 μ l glutathione and 50 μ l monobromobimane. The relative fluorescence unit (RFU) was determined at 465 nm with the excitation at 360 nm. Each value represents the mean RFU + S.D. of triplicate determinations

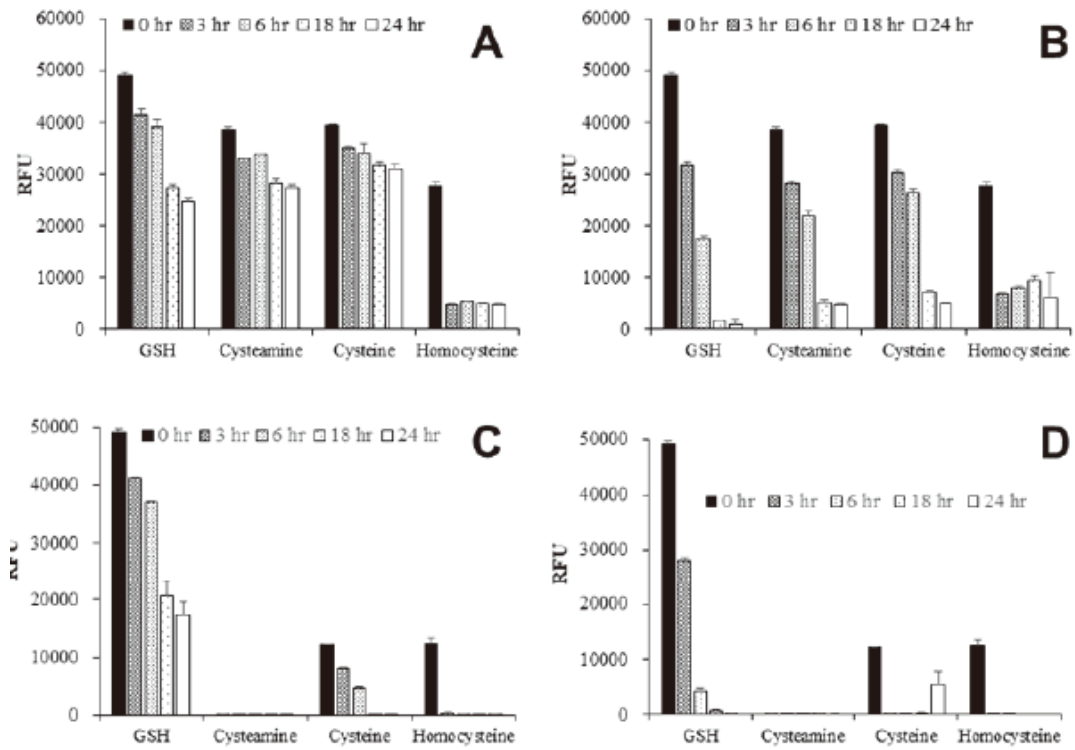


Fig 3. Effects of temperature on the stability of 4 thiol-containing compounds. Four thiol-containing compounds (100 μ M) in 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 10) with 20% DMSO (A, B) or in 0.1M potassium phosphate buffer (pH 8) with 33% acetonitrile (C, D) were incubated for the given time intervals at either 4°C (A, C) or room temperature (B, D). And then, 200 μ M monobromobimane in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8) was incubated for 30 min at room temperature. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate determinations

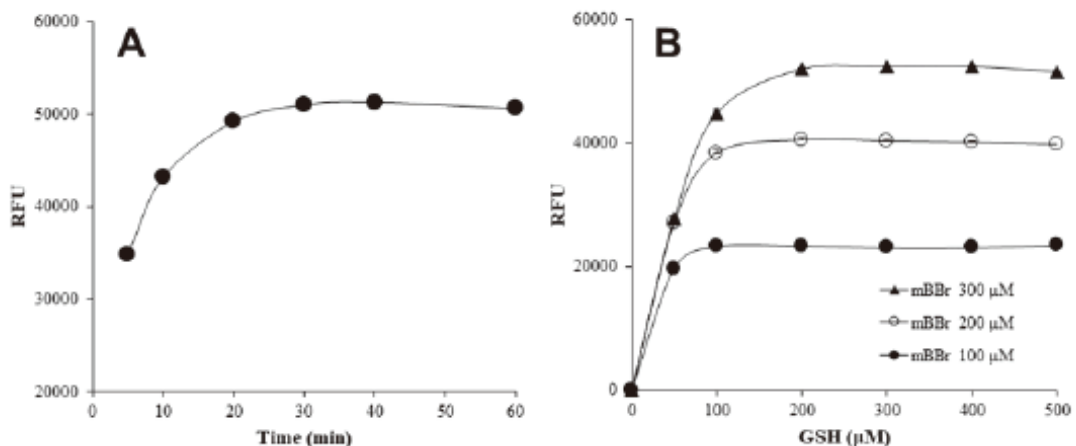


Fig 4. Reactivity of glutathione (GSH) with monobromobimane in the presence of acetonitrile. (A) GSH at 100 μ M in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8) containing 33% acetonitrile were incubated with 200 μ M monobromobimane in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8) for the give time interval at room temperature. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate determinations. (B) The given concentrations of GSH in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8) containing 33% acetonitrile were incubated with the given concentrations of monobromobimane in 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 8) for 30 min at room temperature. Each value represents the mean \pm S.D. of triplicate determinations

다음에는 glutathione 및 cysteine과 더불어 cysteamine 과 homocysteine 등 내인성 치올 화합물 2가지를 추가로 선정하여 용매로 활용할 예정인 DMSO와 acetonitrile 존재 하에 반응의 안정성을 각각 평가하였다(Fig. 3). 즉, 치올 화합물과 감작성 물질의 반응 시간을 최적화 하기 위하여 100 μ M의 치올 화합물을 용매인 DMSO 또는 acetonitrile 존재 하에 3 - 24 시간 동안 4°C와 상온 조건에서 반응시킨 다음, monobromobimane 용액과 30분간 반응시켰다. 실험결과, 치올 화합물과 monobromobimane의 반응성은 저온 조건에서 더 안정하였으며, 반응시간이 증가할수록 안정성이 감소하였다. 또한 평가한 용매의 농도는 달랐지만 DMSO를 추가한 경우가 acetonitrile 보다 반응의 안정성이 더 오래 유지되는 것을 알 수 있었다. 한편, 저온 조건에서는 두 용매 모두에 대하여 glutathione의 안정성이 제일 오래 유지되는 것으로 나타났으며, glutathione의 경우 두 용매 모두에서 24 시간 후에도 어느 정도 형광도를 유지하고 있어 4 화합물 중 glutathione을 이용한 시험조건의 최적화 연구를 먼저 실시하는 것으로 결정하였다. 한편, 두 용매 모두 적용가능성이 확인되어 본 연구에서는 먼저 acetonitrile을 이용한 연구를 진행하였고, 추후 DMSO를 이용한 연구도 진행될 예정이며, 그 결과는 추후 보고할 예정이다.

이어서 glutathione을 acetonitrile 존재 하에 시간에 따른 monobromobimane과의 반응성을 살펴본 결과, 반응 20분 후부터 최고값을 나타내는 것을 확인하였고, 반응 시작 후 60분까지 안정한 값을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 또한 glutathione은 33% acetonitrile 존재 하에 pH 8에서도 100 μ M까지 반응성이 직선성을 보이는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 따라서, 이후 감작성 물질을 평가하는 실험에서 100 μ M의 glutathione (pH 8)을 33% acetonitrile을 시험물질에 대한 용매로 사용하여 4°C에서 반응시킨 다음, 남아있는 glutathione을 monobromobimane을 반응시켜 정량하는 것으로 결정하였고, monobromobimane과의 반응은 결과의 안전성을 고려하여 30분으로 설정하였다.

이렇게 잠정적으로 결정한 시험조건에서 감작성 물질과 비감작성 물질을 구분할 수 있는지를 살펴보고자, 2,4-dinitrochlorobenzene을 감작성 물질로, lactic acid를 비감작성 물질로 선정하여 glutathione과의 반응성을 반응 시간 별로 평가해 보았다(Fig. 5). 즉, 100 μ M의 glutathione과 시험물질을 1:15, 1:30 및 1:60의 비율(acetonitrile의 농도는 각각 5, 10 및 20%)로 혼합하여 일정시간 동안 반응시킨 다음, monobromobimane

과 반응시켜 시험물질과 glutathione 간의 반응의 정도를 glutathione의 % 감소량으로 산출해 보았다. 그

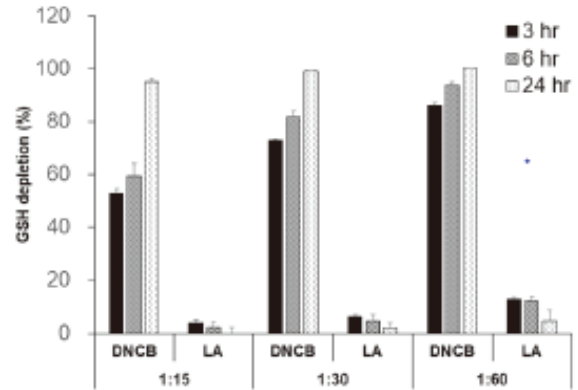


Fig 5. An optimization of concentration of test compounds and incubation time with glutathione (GSH). GSH at 100 μ M was incubated with either molar ratio of 1:15, 1:30, or 1:60 of test compounds in acetonitrile for either 3, 6, or 24 hr at 4°C. The final concentrations of acetonitrile in GSH:test compounds of 1:15, 1:30, and 1:60 were 5%, 10%, and 30%, respectively. And then, 200 μ M monobromobimane was incubated for 30 min at room temperature. Each bar represents the mean % depletion of GSH + S.D. of triplicate determinations. The % depletion of GSH was calculated with the formula of (X-Y)/Xx100, where X was mean RFU of control without test chemicals but vehicle and Y was the RFU of test chemicals. DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; LA, lactic acid

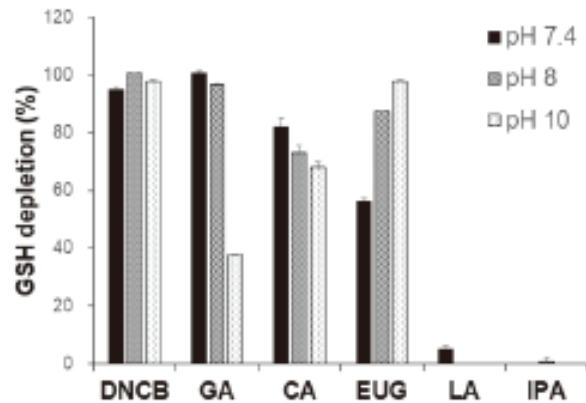


Fig 6. Effects of pH on the depletion of GSH by 6 test compounds. GSH at 100 μ M in either 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4 or 8.0) or 0.1 M ammonium acetate buffer (pH 10) was incubated with a molar ratio of 1:60 of individual test compounds in 20% acetonitrile (final) at 4°C for 24hr. And then, 200 μ M monobromobimane was incubated for 30 min at room temperature. Each bar represents the mean % depletion of GSH + S.D. of triplicate determinations. DNCB, 2,4-dinitrochlorobenzene; GA, glutaraldehyde; CA, cinnamaldehyde; EUG, eugenol; LA, lactic acid; IPA, isopropanol

결과 반응시간 및 glutathione:시험물질의 비에 관계 없이 2,4-dinitrochlorobenzene은 glutathione과 강하게 반응하는 결과를 보여주었고, lactic acid에 의한 glutathione 감소는 매우 미미함을 알 수 있었다(Fig. 5). 이는 monobromobimane을 이용한 glutathione의 형광분석법을 감작성 물질 평가에 활용할 수 있는 가능성을 제시하는 예비 결과로 판단되었다. 또한, 시험물질과 glutathione의 반응은 24 시간 반응시키는 것이 감작성 물질과 비감작성 물질의 구별하는 가장 뚜렷한 결과를 나타내는 것으로 판단되었다. 따라서, 이후 실험에서는 시험물질의 반응시간은 냉장 조건에서 24 시간으로 설정하였고, glutathione과 시험물질 간의 반응비는 1:60으로 결정하여 진행하였다.

마지막으로, 4종의 감작성 물질(2,4-dinitrochlorobenzene, glutaraldehyde, cinnamaldehyde 및 eugenol)과 2종의 비감작성 물질(lactic acid와 isopropanol)에 대하여 pH 별 반응성의 차이를 살펴보았다(Fig. 6). 즉, 100 mM의 glutathione과 각 시험물질을 1:60의 비율(acetonitrile 최종 농도는 20%)로 pH 7.4, 8.0 및 10의 조건에서 24 시간 4°C에서 반응시킨 다음, 200 μM의 monobromobimane과 30 분간 반응시켜 시험물질에 의한 glutathione의 % 감소량을 산출하였다. 그 결과 모든 조건에서 감작성 물질과 glutathione 간의 반응성이 비감작성 물질의 반응성 보다 크게 나타나 추후 시험조건을 더 세밀하게 최적화하고 다양한 종류의 시험물질에 본 시험계를 적용해서 평가해 볼 수 있는 가능성을 보여주었다. Fig. 7에 제시한 잠정적인 시험조건을 이용하여 추후 다양한 감작성 물질에 대한

평가를 수행하여 본 시험법의 예측력을 평가할 수 있을 것으로 판단된다.

본 연구에서는 실험동물이나 세포배양계를 사용하지 않을 뿐 아니라 고가의 분석장비 없이 1회에 20 종 정도의 시험물질을 대상으로 간편하게 피부감작성 여부를 판정할 수 있는 시험법을 개발하고자 하였다. 본 시험계는 치올 화합물과 이를 형광분석할 수 있는 monobromobimane을 이용하여 흡광도 측정을 이용하는 다른 피부감작성 시험에서 문제가 될 수 있는 색간섭에 의한 시험결과의 방해를 최소화할 수 있는 장점도 가지고 있는 것으로 판단된다. 친핵성 치올기에 대한 화학물질의 반응성을 측정함으로써 화학물질이 유발하는 피부 감작성 유발의 가능성을 평가할 수 있는 것은 저분자 감작성물질의 합텐화 과정이 존재하기 때문이다(Gerberick et al., 2004). 다른 용매의 사용과 여러 시험조건의 추가 적인 최적화 연구가 필요한 상황이지만, 본 시험법은 매우 단순하고 간편하여 많은 후보물질을 대상으로 피부감작성 여부를 스크리닝하는 시험계로의 활용가능성을 입증한 것으로 판단되며, 새로운 피부감작성 평가법으로의 개발 가능성을 보여 준 점이 가장 큰 의의라고 판단된다.

본 시험계는 피부감작성 반응의 과정은 아니지만 단백질과 감작성 물질 간의 반응과정을 충분히 모방할 수 있는 시험계가 될 수 있다. 이러한 가능성은 시스테아민을 이용한 본 연구자의 반응성 연구에서도 가능성을 입증한 바가 있었다(Nepal et al., 2018). 즉, 시스테아민은 내인성의 저분자 물질이지만, 단백질 또는 glutathione과 같이 치올기를 가지고 있어 반응성이

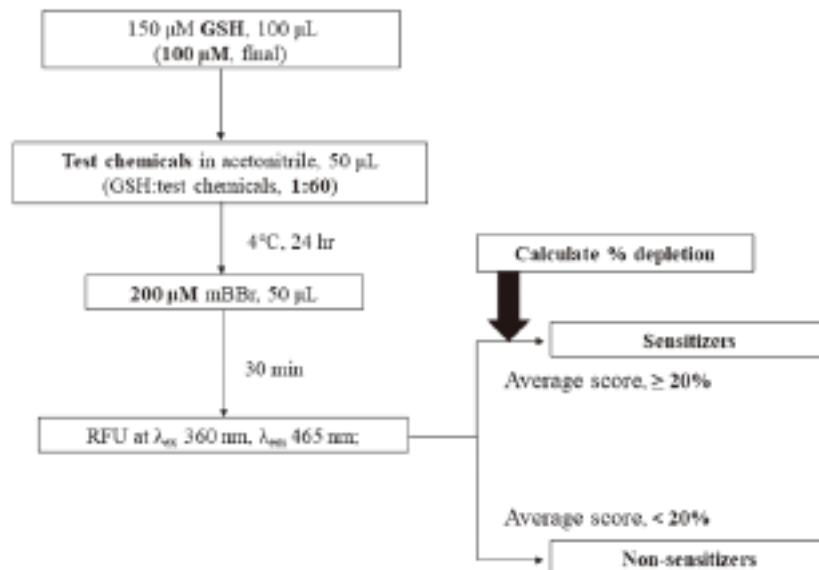


Fig 7. A proposed experimental conditions for the present assay method

높은 감작성 물질과 쉽게 반응할 수 있으며, 30 종의 시험물질을 이용한 시험에서 민감도 100%, 특이도 82% 및 정확도 93%를 보여 예측력 또한 감작성 평가에 충분한 것으로 나타났다(Nepal et al., 2018). 한편, DPRA 시험법에서는 치유키 함유 펩타이드와 함께 lysine과 같은 아민기 함유 펩타이드와의 반응성을 같이 평가하고 있는 바, 향후 저분자 아민화합물과 감작성 물질 간의 반응성도 평가해 볼 예정이다. 아민 화합물과의 반응성도 감작성 여부의 평가에 긍정적인 결과를 얻게 된다면, DPRA 시험법 처럼 치유키 화합물과 아민 화합물에 대한 반응성을 함께 평가하는 시험법으로 발전시켜 본 시험법의 예측력을 더 증가시키고자 한다.

Acknowledgements

본 연구는 한국연구재단의 지원을 받아 진행되었기에 감사드립니다 (과제번호2017RIDIA3B033313).

References

- Ahlfors SR, Sterner O and Hansson C. (2003). Reactivity of contact allergenic haptens to amino acid residues in a model carrier peptide, and characterization of formed peptide-hapten adducts. *Skin Pharmacology and Physiology* 16: 59-68.
- Basketter DA, Blaikie L, Dearman RJ, Kimber I, Ryan CA, Gerberick GF, Harvey P, Evans P, White IR, and Rycroft RJG. (2000). Use of the local lymph node assay for the estimation of relative contact allergenic potency. *Contact Dermatitis* 42: 344-348.
- Basketter DA, Lea LJ, Dickens A, Briggs D, Pate I, Dearman RJ and Kimber I. (1999). A comparison of statistical approaches to the derivation of EC3 values from local lymph node assay dose responses. *Journal of Applied Toxicology* 19: 261-266.
- Cockshott A, Evans P, Ryan CA, Gerberick GF, Betts CJ, Dearman RJ, Kimber I, and Basketter DA. (2006). The local lymph node assay in practice: a current regulatory perspective. *Human & Experimental Toxicology* 25: 387-394.
- Ellman OH. (1959). Tissue sulfhydryl group. *Archives of Biochemistry et Biophysics* 82: 70-77.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Bailey RE, Chaney JG, Morrall SW, and Lepoittevin JP. (2004). Development of a peptide reactivity assay for screening contact allergens. *Toxicological Sciences* 81: 332-343.
- Gerberick GF, Ryan CA, Dearman RJ, and Kimber I. (2007a). Local lymph node assay (LLNA) for detection of sensitization capacity of chemicals. *Methods* 41: 54-60.
- Gerberick GF, Vassallo JD, Foertsch LM, Price BB, Chaney JG, and Lepoittevin JP. (2007b). Quantification of chemical peptide reactivity for screening contact allergens: A classification tree model approach. *Toxicological Sciences* 97: 417-427.
- Gerberick GF, Troutman JA, Foertsch LM, Vassallo JD, Quijano M, Dobson RL, Goebel C, and Lepoittevin JP. (2009). Investigation of peptide reactivity of pro-hapten skin sensitizers using a peroxidase-peroxide oxidation system. *Toxicological Sciences* 112(1): 164-174.
- Kimber I, Dearman RJ, Basketter DA, Ryan CA, and Gerberick GF. (2002). The local lymph node assay: past, present and future. *Contact Dermatitis* 47: 315-328.
- Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, Gerberick GF, Ryan CA, Basketter DA, Lea LJ, House RV, Ladics GS, Loveless SE, and Hastings KL. (2010). Assessment of the skin sensitization potential of topical medicaments using the local lymph node assay: An interlaboratory evaluation. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 53: 563-579.
- Nepal MR, Shakya R, Kang MJ, Jeong TC. (2018) A simple in *chemico* method for testing skin sensitizing potential of chemicals using small endogenous molecules. *Toxicology Letters* 289: 75-85.
- Rudyk O, Eaton P. (2014). Biochemical methods for monitoring protein thiol redox states in biological systems. *Redox Biology* 2: 803-813.