

ИНФОРМАТИВНОСТЬ СЕНСОРОВ АКТИВАЦИИ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ NF-κB И AP-1 ПРИ ОЦЕНКЕ ДЕРМАТОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ *IN VITRO*

Т. В. Толстова ✉, В. К. Пурецкий, П. М. Кожин, Н. Г. Лузгина, А. Л. Русанов

Научно-исследовательский институт биомедицинской химии имени В. Н. Ореховича, Москва, Россия

Для сертификации новых фармацевтических, химических или косметических продуктов необходимо тестирование на токсичность, в том числе дерматотоксичность. Модели *in vitro* исследований считают наиболее перспективными, и ряд таких тестов внедрен в практику сертификационных испытаний. Новые возможности для регистрации раннего ответа клеток на повреждение могут предоставить клеточные сенсоры, основанные на визуальной количественной регистрации изменений активности сигнальных путей, задействованных в реализации такого ответа. NF-κB и AP-1 — два важных фактора транскрипции белков, активность которых возрастает в клетке при повреждении, воспалении и изменении редокс-баланса. Целью исследования было разработать клеточные сенсоры на основе immortalized кератиноцитов человека линии HaCaT, которые экспрессируют зеленый флуоресцентный белок (GFP) при активации сигнальных путей NF-κB (HaCaT/NF-κB) или AP-1 (HaCaT/AP-1), и изучить их информативность при регистрации дозозависимого ответа на воздействие индукторов соответствующих сигнальных путей. Результаты показали, что уровень флуоресценции клеток HaCaT/NF-κB дозозависимо изменялся в $6,05 \pm 0,51$ и $5,53 \pm 0,52$ раз при воздействии TNFα или LPS (в концентрациях от 0 до 80 нг/мл). Биосенсор HaCaT/AP-1 также реагировал на воздействие Cd(NO₂)₂ (в концентрациях от 0 до 40 мкМ) и ультрафиолетового излучения типа А (УФ-А) (от 0 до 40 Дж/см²), однако позволял регистрировать его качественно, но не количественно. Флуоресценция клеток сенсора возрастала в $1,51 \pm 0,24$ и $1,66 \pm 0,43$ раз соответственно. Разработанные клеточные сенсоры могут быть использованы для оценки цитотоксического действия тестируемых веществ на клетки кожи человека *in vitro* и изучения механизмов цитотоксичности.

Ключевые слова: кератиноциты, биосенсор, дерматотоксичность

Финансирование: работа выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований в Российской Федерации на долгосрочный период (2021–2030 годы) (№ 122022800481-0).

Вклад авторов: Т. В. Толстова — проведение эксперимента, сбор, анализ и интерпретация данных, написание статьи, оформление рисунков; В. К. Пурецкий — проведение эксперимента, оформление рисунков; П. М. Кожин — анализ литературы, написание статьи, оформление рисунков; Н. Г. Лузгина — концепция и дизайн работы, написание статьи; А. Л. Русанов — планирование исследования, написание статьи, общее руководство исследованием.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Викторовна Толстова
ул. Погодинская, д. 10, с. 8, г. Москва, 119121, Россия; tolstova@ibmc.msk.ru

Статья получена: 11.12.2023 **Статья принята к печати:** 16.02.2024 **Опубликована онлайн:** 27.02.2024

DOI: 10.24075/vrgmu.2024.007

INFORMATION CAPACITY OF THE NF-κB AND AP-1 SIGNALING ACTIVATION SENSORS IN *IN VITRO* ASSESSMENT OF DERMATOTOXIC EFFECTS

Tolstova TV ✉, Pureczky VK, Kozhin PM, Luzgina NG, Rusanov AL

Institute of Biomedical Chemistry, Moscow, Russia

Toxicity testing, including testing for skin toxicity, is essential for certification of novel pharmaceutical, chemical, and skincare products. The *in vitro* assessment models are considered to be the most promising; a number of such tests have been introduced into practice of approval testing. The new possibilities of detecting the early cellular response to damage can be provided by the cell-based sensors built upon visual quantification of the changes in activity of the signaling pathways involved in realization of such response. NF-κB and AP-1 represent two important protein transcription factors, the increase in activity of which in the cell is associated with damage, inflammation or redox balance alteration. The study was aimed to develop the cell-based sensors built upon the HaCaT immortalized human keratinocyte cell line that express green fluorescent protein (GFP) when the NF-κB (HaCaT/NF-κB) or AP-1 (HaCaT/AP-1) signaling pathway is activated, as well as to assess their information capacity when recording the dose-dependent response to the exposure to inducers of appropriate signaling pathways. The findings showed that the HaCaT/NF-κB cell fluorescence levels changed by 6.05 ± 0.51 and 5.53 ± 0.52 times upon exposure to TNFα or LPS (at a concentration of 0–80 ng/mL) in a dose dependent manner. The HaCaT/AP-1 biosensor also responded to the exposure to Cd(NO₂)₂ (at a concentration of 0–40 μM) and ultraviolet A (UVA) (0–40 J/cm²), however, it enabled qualitative, but not quantitative detection. The sensor cell fluorescence increased by 1.51 ± 0.24 and 1.66 ± 0.43 times, respectively. The cell-based sensors developed can be used to assess cytotoxic effects of the test substances on the human skin cells *in vitro* and study the cytotoxicity mechanisms.

Keywords: keratinocytes, biosensor, skin toxicity

Funding: the work was performed within the framework of the Program for Basic Research in the Russian Federation for a long-term period (2021–2030) (№ 122022800481-0).

Author contribution: Tolstova TV — experimental procedure, data acquisition, analysis, and interpretation, manuscript writing, illustrations; Pureczky VK — experimental procedure, illustrations; Kozhin PM — literature review, manuscript writing, illustrations; Luzgina NG — study concept and design, manuscript writing; Rusanov AL — study planning, manuscript writing, overall guidance for the study.

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana V. Tolstova
Pogodinskaya, 10, s. 8, Moscow, 119121, Russia; tolstova@ibmc.msk.ru

Received: 11.12.2023 **Accepted:** 16.02.2024 **Published online:** 27.02.2024

DOI: 10.24075/brsmu.2024.007

Одним из ограничений внедрения в оборот новых фармацевтических субстанций, химических веществ и косметической продукции является риск развития повреждений или раздражения кожных покровов. В связи с этим сертификационная оценка безопасности данных

продуктов подразумевает обязательное тестирование на дерматотоксичность.

Известен ряд стандартизованных тестов *in vivo*, одобренных Организацией экономического сотрудничества и развития (OECD) и регламентированных ГОСТ РФ. В

частности, для оценки дерматотоксичности широкое применение нашли протоколы OECD № 429 на основе анализа локальных лимфатических узлов мышей [1], № 406 — максимизационный тест на морских свинках Магнуссона и Клигмана [2], а также Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека, в том числе «Испытания по оценке кожной сенсibilизации» (ГОСТ 32375-2013) [3] и «Определение токсичности при повторном/многократном кожном поступлении. 28/21-дневный тест» (ГОСТ 32642-2014) [4] и др.

Однако исследования неблагоприятных эффектов препаратов с использованием животных приобретают все больше ограничений [5], в то время как тесты *in vitro*, основанные на использовании клеток человека, видоспецифичны, лучше воспроизводимы и обладают достаточной достоверностью [6, 7]. В частности, исследование повреждений и/или раздражений глаз могут быть проведены с использованием реконструированного роговице-подобного эпителия человека (EpiOcular™ (MatTek; США), МСТТ HCE™ (Biosolution; Южная Корея)) [8, 9], а коррозионных свойств — на реконструированном эпидермисе человека (EpiSkin™ (L'Oréal; Франция), epiCS® (Phenion; Германия)) [10, 11].

Одним из этапов исследования биобезопасности тестируемых соединений является оценка цитотоксичности, например, в отношении иммортализованных кератиноцитов человека HaCaT, с помощью колориметрических или флуориметрических анализов (МТТ-тест, окрашивание аннексином V или трипановым синим) [12]. Однако цитотоксические эффекты могут заключаться не только в изменении метаболической активности или гибели клеток, но и в активации ряда сигнальных путей. Перспективный подход для регистрации цитотоксических эффектов — использование генетически модифицированных клеток, несущих репортерные гены под контролем чувствительных к стрессу промоторов [13–15]. Например, для оценки сенсibilизирующего действия тестируемых веществ на кожу человека активно используют тест KeratinoSens™, который представляет собой клеточную линию, содержащую репортерный ген люциферазы под контролем элемента антиоксидантного ответа — гена *AKR1C2* [16].

Транскрипционные факторы, такие как NF-κB и AP-1, участвуют в клеточном ответе на широкий спектр стимулов: тяжелые металлы, ультрафиолет, цитокины, инфекционные агенты и др., и могут представлять интерес в качестве биомаркеров цитотоксического воздействия [15, 17]. Так, важный транскрипционный фактор NF-κB регулирует транскрипцию белков, участвующих в воспалительном ответе, иммунном ответе, окислительном стрессе, апоптозе. AP-1 играет ключевую роль в пролиферации, дифференцировке, старении и гибели клеток. Флуоресцентный биосенсор на основе линии преадипоцитов 3T3-L1, стабильно экспрессирующий GFP при активации пути NF-κB, ранее был использован для регистрации противовоспалительных эффектов антиоксидантов растительного происхождения [18]. Разработанная ранее клеточная модель стенки тонкого кишечника человека на основе клеток линии Saco-2 обеспечивала дозозависимую регистрацию активации транскрипционного фактора NF-κB под действием кадмия [15]. Клеточный биосенсор на основе HT-29 с регуляторным элементом для транскрипционного фактора AP-1 и геном, кодирующим флуоресцентный белок mCherry, успешно применяли для скрининга токсичности тяжелых металлов [17]. Однако клеточные сенсоры, регистрирующие

активацию сигнальных путей NF-κB и AP-1, при оценке дерматотоксических эффектов в тестах *in vitro* ранее не исследовали.

Цель исследования — разработать клеточные сенсоры на основе иммортализованных кератиноцитов человека линии HaCaT, экспрессирующих зеленый флуоресцентный белок (GFP) при активации сигнальных путей NF-κB (HaCaT/NF-κB) или AP-1 (HaCaT/AP-1) и изучить их информативность при регистрации дозозависимого повреждения клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Трансдукция клеточной линии HaCaT лентивирусной конструкцией с регуляторными элементами для транскрипционных факторов NF-κB/AP-1 и геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок

Культирование клеток HaCaT (CLS Cell Lines Service, 300493; Германия) проводили в питательной среде DMEM/F12 (Gibco; США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco; США), 0,1% GlutaMAX™ и пенициллина/стрептомицина в объеме 100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно (Gibco; США) в CO₂-инкубаторе (MCO-20AIC Sanyo; Япония) при температуре 37 ± 1 °С, влажности 90 ± 10% и концентрации CO₂ 5,0 ± 1,0%. Замену питательной среды производили каждые 48 ч. По достижении 80% конfluence, клетки диссоциировали 0,25%-м раствором трипсин-ЭДТА («Пан-Эко»; Россия) и ресуспендировали в свежей культуральной среде.

Трансдукцию клеток проводили с помощью наборов Signal Lenti Reporter Assay (QIAGEN; США), содержащих лентивирусные частицы с индуцируемым NF-κB/AP-1 GFP-репортером. Концентрация лентивирусных частиц составляла 2 × 10⁷ частиц/мл. Для проведения трансдукции клетки высевали в количестве 4 × 10⁴ клеток на лунку в 24-луночный планшет (Corning; США) и инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе (MCO-20AIC; Sanyo, Япония).

Через 18 ч среду отбирали, добавляли лентивирусные частицы в объеме 80 мкл, что соответствовало множественности трансфекции 40, и 6 мкл SureENTRY Transduction Reagent (QIAGEN; США) для улучшения эффективности трансфекции. Общий объем раствора доводили до 600 мкл. Инкубировали в течение 24 ч в CO₂-инкубаторе (MCO-20AIC; Sanyo, Япония). В контрольной лунке среду заменяли на 600 мкл полной культуральной среды. После этого среду с лентивирусными частицами заменяли на DMEM/F12 (Gibco; США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (Gibco; США), пенициллина/стрептомицина в объеме 100 ед./мл и 100 мкг/мл соответственно и 0,1% GlutaMAX (Gibco; США).

Селекция трансдуцированных клеток с GFP-репортером, индуцируемым NF-κB и AP-1

Для селекции использовали антибиотик пурамицин (InvivoGen; США), к которому были устойчивы трансдуцированные клетки. Для оценки устойчивости нетрансдуцированных клеток HaCaT (дикого типа) к пурамицину применяли МТТ-тест. Для этого клетки высаживали в 96-луночные планшеты (Corning; США) по 2 × 10³ клеток в 200 мкл среды на лунку в DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки и GlutaMAX (Gibco; США). Затем вносили 0; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 и 8,0 мкг/мл пурамицина и культивировали клетки в течение

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР

Ген	Последовательность праймера 1 (Forward)	Последовательность праймера 2 (Reverse)
<i>GAPDH</i>	TCGACAGTCAGCCGCATCTTCTTT	ACCAAAATCCGTTGACTCCGACCTT
<i>NFKB1</i>	CATGGCAGACGATGATCCC	ATTTGAAGGTATGGGCCAT
<i>RelA</i>	CTGTCTTTCTCATCCCATCTT	TCCTCTTTCTGCACCTTGTC
<i>C-JUN</i>	ATGGTCAGTTATACTCCTCCTC	CCTCCTGAAACATCGCACTATC

10 дней, заменяя среду в лунках каждые 96 ч. Ежедневно исследовали клетки с помощью фазово-контрастного светового микроскопа Primovert (Carl Zeiss; Германия).

По истечении срока воздействия отбирали из лунок питательную среду с пуромицином (опыт) или питательную среду (контроль), промывали фосфатно-солевым буфером с pH 7,4 (PBS; «ПанЭко», Россия) и добавляли 200 мкл свежей полной питательной среды, содержащей 0,5 мг/мл МТТ. Инкубировали в течение 2 ч в CO₂-инкубаторе MCO-20AIC (Sanyo; Япония) при температуре 37 °C и 5% CO₂. Затем отбирали среду, промывали 200 мкл PBS и добавляли в каждую лунку 100 мкл диметилсульфоксида (ДМСО; Helicon, Россия). После 15 мин перемешивания на шейкере (150–200 об./мин, в темноте) измеряли оптическую плотность растворов на длине волны 595 нм (за вычетом фонового поглощения на длине волны 655 нм) с помощью планшетного спектрофотометра iMark (BioRad; США). Жизнеспособность определяли по формуле:

$$\frac{\text{ОП опытных лунок} - \text{ОП среды}}{\text{ОП контрольных лунок} - \text{ОП среды}} = 100\%,$$

где ОП — оптическая плотность.

Сортировка трансдуцированных клеток с GFP-репортером, индуцируемым NF-κB и AP-1

Для сортировки полученные после селекции популяции трансдуцированных клеток рассаживали на чашку Петри

диаметром 100 мм (Corning; США) или культуральный матрас T75 (Corning; США) в концентрации 4×10^5 клеток на чашку. При достижении 70–80% конfluence заменяли среду на содержащую активатор сигнального пути NF-κB — 20 нг/мл фактора некроза опухоли альфа (TNFα) (чистота > 95%; Elabscience, Китай) или AP-1 — Cd(NO₃)₂ в концентрации 10 мкМ. Через 24 ч инкубации клетки обрабатывали 0,25%-м раствором трипсина-ЭДТА, осаждали при 300 g 5 мин и ресуспендировали в 1 мл свежей питательной среды для последующей сортировки GFP-положительных клеток.

Сортировку GFP-положительных клеток проводили при помощи клеточного сортера BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences; США). Анализируемую клеточную популяцию определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния для исключения дебриса и дуплетов. В качестве негативного контроля (контроля автофлуоресценции) использовали нетрансдуцированные клетки. В результате сортировки получали трансдуцированные клеточные линии с максимальным уровнем флуоресцентного белка в ответ на индукцию.

Исследование дозозависимого изменения интенсивности флуоресценции трансдуцированных клеток HaCaT при активации путей NF-κB/AP-1

Трансдуцированные клетки HaCaT высевали в 96-луночный планшет по 7×10^3 клеток на каждую лунку, затем инкубировали в течение ночи в CO₂-инкубаторе

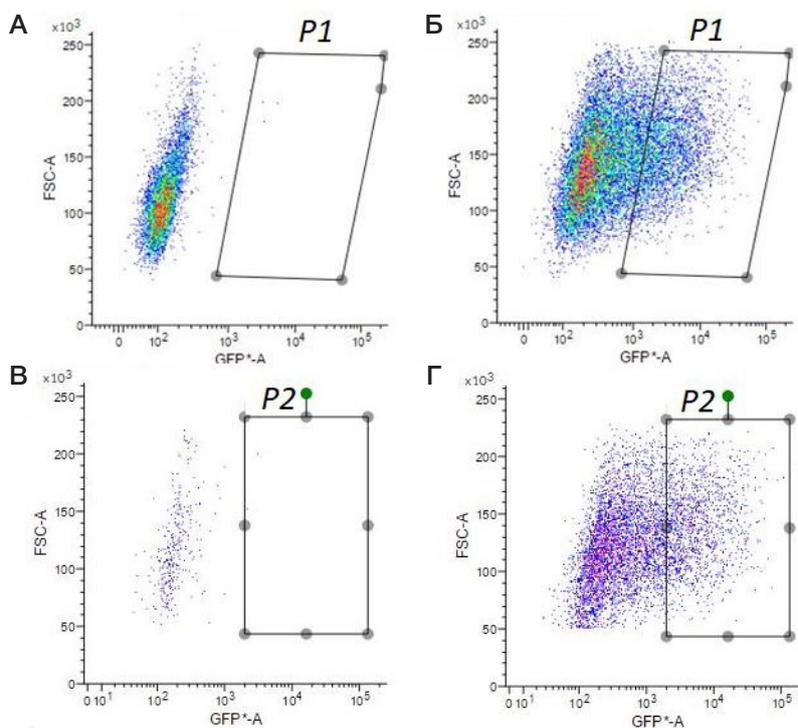


Рис. 1. Интенсивность флуоресценции трансдуцированных клеток: контрольные клетки (А, В) и трансдуцированные клетки с высокой интенсивностью флуоресценции (Б, Г) в ответ на стимуляцию 20 нг/мл TNFα для HaCaT/NF-κB (гейт P1) и 10 мкМ Cd(NO₃)₂ для HaCaT/AP-1 (гейт P2) в течение 24 ч

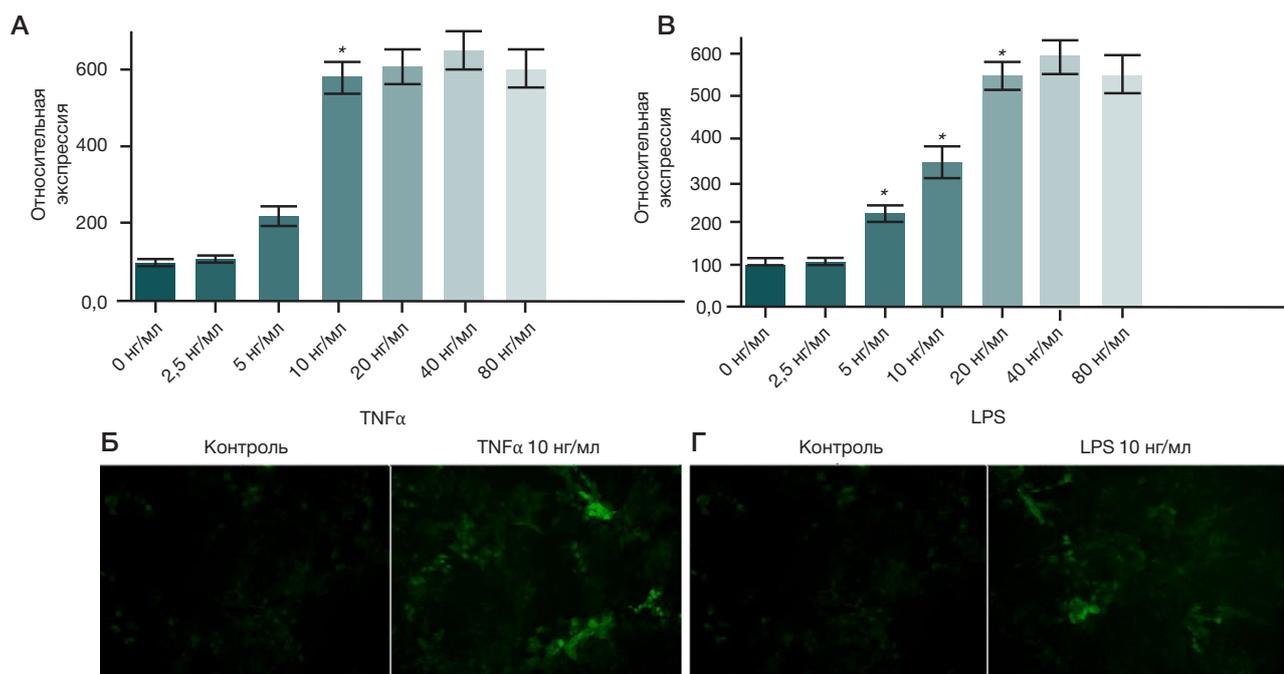


Рис. 2. Изменение относительной флуоресценции клеток линии HaCaT/NF- κ B при воздействии TNF α (А, Б) и LPS (В, Г). Результаты флуориметрии (А, В) и флуоресцентная микроскопия (Б, Г). * — статистически значимые отличия от предыдущей концентрации, $p < 0,05$

MCO-20AIC (Sanyo; Япония) при температуре 37 °C. К клеткам добавляли различные концентрации тестовых веществ: TNF α и липополисахарид (LPS) (чистота $\geq 99\%$; Servicebio, Китай) — для активации NF- κ B; Cd(NO $_3$) $_2$ — для активации AP-1. Было также исследовано влияние ультрафиолетового излучения (УФ-А) с длиной волны 365 нм на уровень флуоресценции трансдуцированных клеток HaCaT/AP-1. Интенсивность флуоресценции фиксировали на многофункциональном ридере Infinite M200 (Tecan; Швейцария) с длинами волн возбуждения 477 нм и эмиссии 507 нм для флуоресценции и длиной волны 600 нм для абсорбции. Вычисляли среднюю интенсивность флуоресценции в клетках (за вычетом средней интенсивности флуоресценции фона без клеток) по отношению к контрольным клеткам без индукторов (100%). Микрофотографии биосенсора в интактном и активированном состояниях были получены на флуоресцентном микроскопе ZOE (Bio-Rad; США). Полученные фотографии обрабатывали с помощью графической программы ImageJ (NIH; США).

Анализ экспрессии целевых генов методом полимеразной цепной реакции

Полученные результаты измерения интенсивности флуоресценции сравнивали с результатами исследования экспрессии генов, полученных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, различных субъединиц белка NF- κ B (*RelA* — субъединица p65; *NFKB1* — субъединица p50) и AP-1 (*C-JUN*). Для этого выделяли РНК (с использованием набора для выделения РНК на колонках «Биолабмикс»; Россия) согласно протоколу производителя и измеряли ее количество на приборе NanoDrop 2000c (Thermo Scientific; США). Реакцию обратной транскрипции с 1 мкг РНК проводили с помощью MMLV RT kit («Евроген»; Россия) согласно протоколу производителя. ПЦР осуществляли с помощью qPCRmix-HS SYBR+LowROX («Евроген»; Россия). Праймеры представлены в табл. 1. В качестве референсного гена использовали *GAPDH*.

Анализ данных

Полученные результаты обрабатывали с помощью языка программирования для статистической обработки данных R. Различия между группами определяли с помощью *t*-критерия с поправкой Бенджамини-Хохберга на множественное сравнение. Статистически значимыми различия считали при $p < 0,05$. Данные представлены в виде $M \pm m$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Трансдукция, селекция и сортировка клеток HaCaT

Клетки HaCaT были трансдуцированы с использованием лентивирусной конструкции Signal Lenti Reporter Assay (QIAGEN; США), содержащей лентивирусные частицы с индуцируемым NF- κ B/AP-1 GFP-репортером. В результате оценки цитотоксического действия пуромидина с помощью МТТ-теста была выбрана рабочая концентрация антибиотика (минимальная концентрация, вызывающая полную гибель исходных клеток) для селекции трансдуцированных клеток, соответствующая 1000 нг/мл. Селекцию проводили в течение 10 дней, заменяя культуральную среду каждые 3 дня.

На следующем этапе мы проводили сортировку трансдуцированных клеток после активации с помощью 20 нг/мл TNF α для HaCaT/NF- κ B и 10 мкМ Cd(NO $_3$) $_2$ для HaCaT/AP-1 в течение 24 ч. В результате активации соответствующих сигнальных путей функциональные трансдуцированные клетки начинают вырабатывать GFP, что было зафиксировано с помощью проточной цитометрии. Сортировку GFP-положительных клеток проводили при помощи клеточного сортера BD FACSMelody™ Cell Sorter (BD Biosciences; США). Анализируемую клеточную популяцию определяли по параметрам прямого и бокового светорассеяния для исключения дебриса и дуплетов (рис. 1). В качестве негативного контроля (контроля автофлуоресценции) использовали нетрансдуцированные

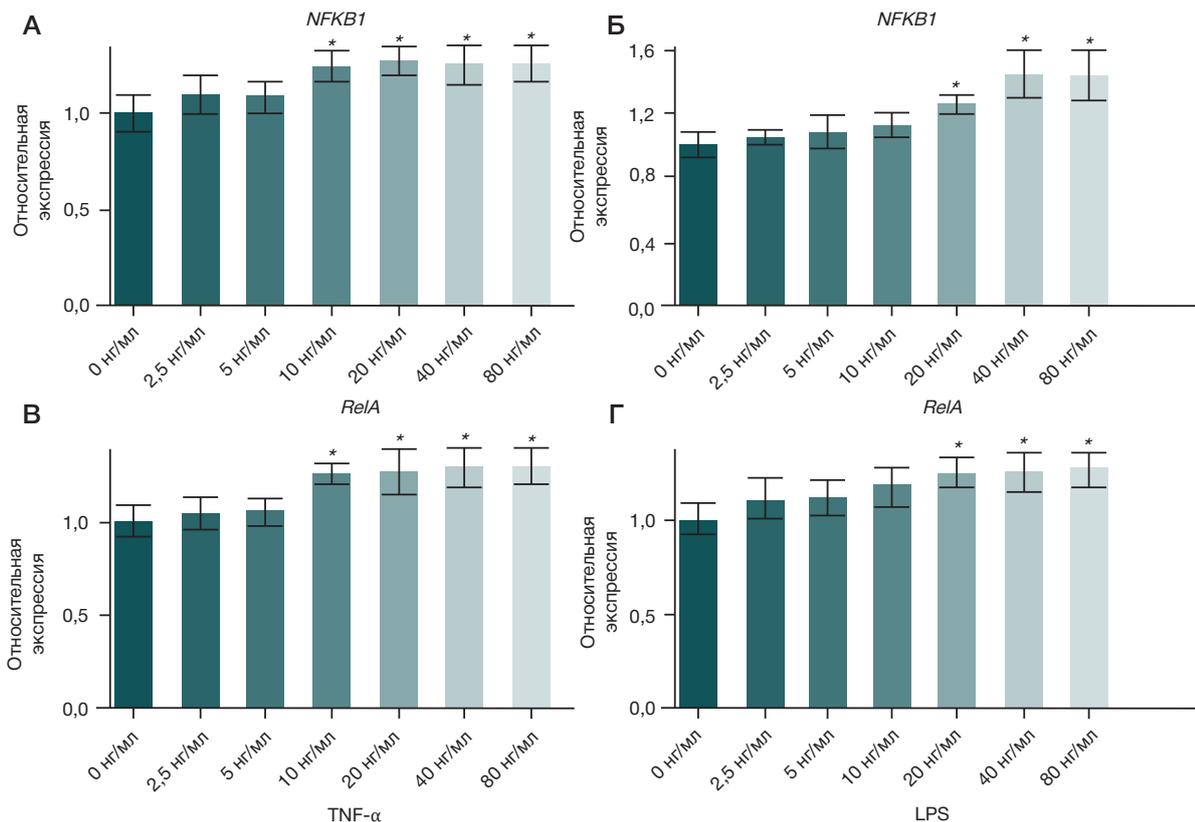


Рис. 3. Оценка активации генов субъединиц транскрипционного фактора NF-κB. Относительная экспрессия мРНК генов *RelA* и *NFKB1* под воздействием TNFα (А, Б) и LPS (В, Г). * — статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0,05$

клетки (рис. 1А, В). Трансдуцированные клеточные линии с максимальным уровнем флуоресценции в ответ на индукцию (гейт *P1*, рис. 1Б; гейт *P2*, рис. 1Г) были отобраны для последующего анализа работы биосенсора.

Исследование дозозависимого изменения интенсивности флуоресценции трансдуцированных клеток HaCaT при активации пути NF-κB с использованием TNFα и LPS

Полученные в результате селекции и последующей сортировки клетки линии HaCaT, трансдуцированные лентивирусной конструкцией, содержащей GFP-репортер, индуцируемый NF-κB, исследовали на дозозависимое изменение интенсивности флуоресценции методом флуориметрии с использованием различных концентраций известных индукторов данного сигнального пути — TNFα и LPS (далее — индукторы). К трансдуцированным клеткам добавляли различные концентрации индукторов, после чего фиксировали интенсивность флуоресценции клеток сенсора на многофункциональном ридере Infinite M200 (Tecan; Швейцария) и исследовали микрофотографии, полученные с помощью флуоресцентного микроскопа ZOE (Bio-Rad; США). Так, для активации NF-κB к клеткам вводили TNFα и LPS в концентрациях 0–80 нг/мл для обоих веществ. В результате инкубации с индукторами фиксировали изменение интенсивности флуоресценции (рис. 2). Кроме того, при воздействии TNFα уже в концентрации 5 нг/мл по появлению флуоресцирующих в зеленой области спектра клеток фиксировали активацию сигнального пути NF-κB. При увеличении концентрации TNFα вплоть до 10 нг/мл увеличивались интенсивность флуоресценции и количество флуоресцирующих клеток (рис. 2А, Б).

При воздействии LPS достоверное увеличение интенсивности флуоресценции и, соответственно, активация сигнального пути NF-κB также выявлены при минимальной исследуемой концентрации 5 нг/мл. Зависимость интенсивности флуоресценции от концентрации обоих использованных индукторов выходила на плато при концентрации выше 20 нг/мл (рис. 2В, Г).

Полученные данные измерения интенсивности флуоресценции сравнивали с результатами исследования экспрессии генов различных субъединиц белка NF-κB (*RelA* — субъединица p65; *NFKB1* — субъединица p50) (рис. 3). Показано, что воздействие TNFα приводит к увеличению экспрессии мРНК генов *RelA* и *NFKB1*, но статистически значимые различия по сравнению с контролем были получены только для концентрации 10 нг/мл, без дальнейшего роста экспрессии (рис. 3А). При воздействии LPS (рис. 3Б) обнаружена аналогичная тенденция: статистически значимое увеличение экспрессии мРНК генов *RelA* и *NFKB1* происходило только при воздействии LPS в концентрации 20 нг/мл без статистически значимого изменения экспрессии при дальнейшем увеличении концентрации.

Исследование дозозависимого изменения интенсивности флуоресценции трансдуцированных клеток HaCaT при активации пути AP-1

Для оценки информативности клеточного сенсора, позволяющего фиксировать активность сигнального пути AP-1, мы использовали индукторы, вызывающие нарушение редокс-баланса клеток — Cd(NO₃)₂ и УФ-А. Мы фиксировали зависимость интенсивности флуоресценции биосенсора от концентрации Cd(NO₃)₂ или интенсивности излучения (рис. 4; табл. 2). Полученные данные об активации

Таблица 2. Изменение флуоресценции клеток линии HaCaT/AP-1 под воздействием Cd(NO₃)₂

Cd(NO ₃) ₂ , мкМ	Относительная интенсивность флуоресценции, %	УФ-А, Дж/см ²	Относительная интенсивность флуоресценции, %
0	100 ± 13	0	100 ± 16
5	115 ± 18	6	135 ± 18
10	121 ± 16	12	168 ± 21*
20	172 ± 49*	18	151 ± 24*
40	166 ± 43*		

Примечание: * — статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0,05$.

пути AP-1 сравнивали с результатами исследования экспрессии гена *C-JUN*, кодирующего субъединицу белка AP-1.

Показано, что воздействие Cd(NO₃)₂ приводит к увеличению флуоресценции клеток HaCaT/AP-1 при концентрации 20 мкМ до 40 мкМ. Однако изменение флуоресценции не было дозозависимым. Вероятно, при увеличении концентрации Cd(NO₃)₂ проявлялись цитотоксические эффекты данного индуктора, что приводило к снижению количества жизнеспособных флуоресцирующих клеток. При этом экспрессия мРНК *C-JUN* повышалась уже при воздействии 5 мкМ, однако не зависела от дозы воздействия при увеличении концентрации (табл. 2; рис. 4А).

Также исследовали ответ клеток сенсора на 24-часовое воздействие различных доз УФ-излучения с длиной волны 365 нм. Полученные результаты измерения интенсивности флуоресценции также сравнивали с результатами исследования экспрессии гена *C-JUN*, кодирующего субъединицу белка AP-1. Значительное увеличение интенсивности флуоресценции клеток сенсора наблюдали при дозе воздействия УФ в дозе 12–18 Дж/см² (достоверно в сравнении с клетками контроля). Интенсивность флуоресценции значимо отличается от контроля при увеличении дозы воздействия вплоть до 18 Дж (табл. 2; рис. 4Б). В то же время увеличение экспрессии мРНК гена *C-JUN* наблюдали при воздействии на клетки исследованных доз УФ-А. Однако изменения не носили дозозависимый характер.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Разработка тестов *in vitro* для оценки биобезопасности химических соединений (ХС) является актуальной задачей,

поскольку исследования на животных приобретают все больше ограничений в последнее время [5, 19]. Поскольку кератиноциты первыми сталкиваются с повреждающими агентами и участвуют в иммунном ответе, они представляют собой перспективную модель для скрининга дерматологических эффектов. При этом линия иммортализованных кератиноцитов HaCaT представляет собой удобную альтернативу первичным клеткам для токсикологических исследований *in vitro* [12]. Так, клетки линии HaCaT демонстрируют нормальный морфогенез и экспрессируют все основные поверхностные маркеры первичных кератиноцитов, а также могут быть дифференцированы при стимуляции и экспрессируют специфические маркеры дифференцировки, такие как кератин 14, кератин 10 и инволюкрин, при этом могут переключаться между дифференцированным и базальным состоянием путем изменения концентрации Ca²⁺ в культуральной среде [20, 21]. Однако при использовании линии клеток HaCaT важно принимать во внимание наличие GOF (от англ. gain-of-function) мутаций в гене *TP53*, которые приводят к повышенной скорости пролиферации и нарушениям терминальной стадии дифференцировки [22]. Тем не менее, клетки HaCaT не требуют наличия в среде культивирования факторов роста и/или дифференцировки, обладают неограниченным потенциалом пролиферации и демонстрируют стабильный фенотип независимо от количества пассажей, в отличие от первичных кератиноцитов [23]. Таким образом, клетки линии HaCaT являются перспективной экспериментальной моделью для исследования различных физиологических процессов, происходящих в кератиноцитах человека, в том числе при анализе токсикологических эффектов ХС.

При разработке тест-систем для идентификации раздражения считается перспективным обеспечение

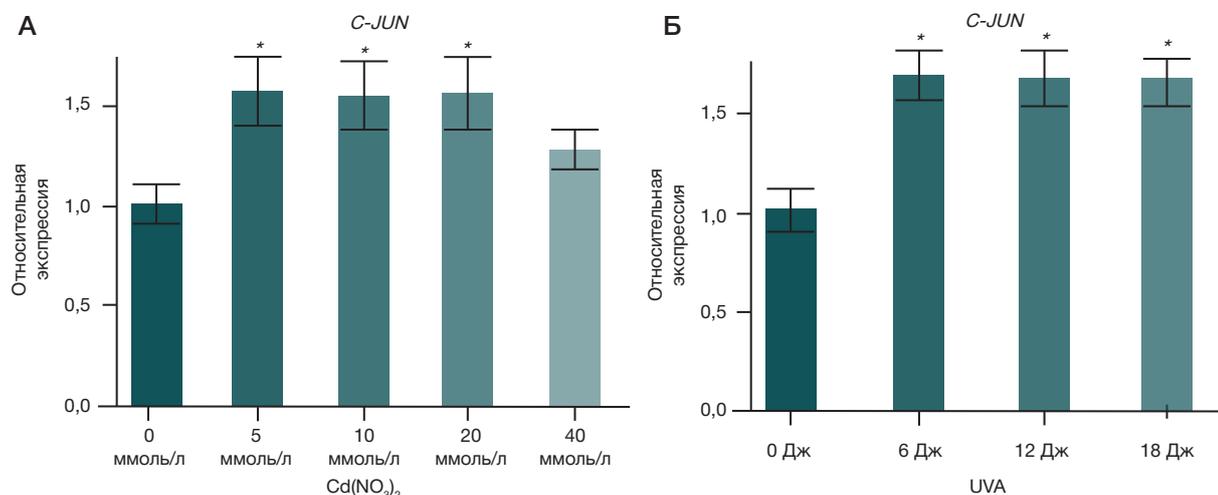


Рис. 4. Оценка активации гена субъединицы транскрипционного фактора AP-1. Относительная экспрессия мРНК гена *C-JUN* под воздействием Cd(NO₃)₂ (А) и УФ-А (Б). * — статистически значимые отличия от контрольной группы, $p < 0,05$

возможности анализа конкретных биомаркеров, ассоциированных с повреждением [6, 24]. Это позволяет делать заключение не только о степени потенциальной цитотоксичности тестируемого вещества, но и о молекулярных механизмах ее реализации.

В настоящее время в центре внимания находятся те подходы, которые направлены на изучение ранней реакции клеток на повреждение, предпочтительно с помощью мониторинга в реальном времени. Такие подходы представляют собой перспективную альтернативу стандартным измерениям конечного эффекта воздействия, например, основанных на обнаружении специфических метаболических процессов с помощью колориметрических или флуориметрических анализов (МТТ-тест, окрашивание трипановым синим и др.). Так, на сегодняшний день известны тесты, например, STACK (от англ. *scalable time-lapse analysis of cell death kinetics*), позволяющие выполнять высокопроизводительный анализ динамики процесса повреждения клеток в реальном времени [25]. В частности, флуоресценцию используют для идентификации популяций живых и мертвых клеток с помощью флуоресцентной микроскопии и тщательной оптимизации процедур анализа изображений. Однако цитотоксические эффекты могут не только включать в себя гибель клеток, но и быть связанными с развитием кожной сенсibilизации, одним из ключевых событий формирования которой, согласно OECD-сертифицированным тестам, является активация специфических сигнальных путей в кератиноцитах (например, *Keap1/Nrf2-ARE*, *NF-κB* и др.) [26].

Для оценки потенциального повреждающего действия тестируемых веществ в тестах клеточного ответа при оценке их потенциальной биобезопасности на молекулярно-биологическом уровне, в данной работе были разработаны клеточные сенсоры на основе immortalized кератиноцитов человека *HaCaT* с регуляторными элементами для транскрипционных факторов *NF-κB* и *AP-1* и геном, кодирующим зеленый флуоресцентный белок GFP. В результате доставки данных генетических конструкций клетки вырабатывали GFP при активации соответствующего сигнального пути. При этом интенсивность флуоресценции измеряли количественно. Несмотря на то что пик экспрессии белка GFP в клетках достигается через 24 ч с момента события, детектируемого с его помощью, динамика экспрессии GFP в клетках хорошо известна и точно описана. В этой связи клеточные сенсоры на основе GFP позволяют оценивать динамику клеточного ответа на тестируемое воздействие. При этом необходимо учитывать отсроченный эффект появления флуоресценции и самого клеточного события [15].

Несмотря на то что транскрипционные факторы *NF-κB* и *AP-1* являются одними из наиболее частых участников реализации процессов повреждения клеток на молекулярном уровне, проведенный экспериментальный анализ показал различные возможности разработанных сенсоров *HaCaT/NF-κB* и *HaCaT/AP-1* в регистрации дозозависимых эффектов известных индукторов соответствующих сигнальных путей в клетках. Полученный клеточный сенсор с репортерной конструкцией,

ассоциированной с активацией *NF-κB*, продемонстрировал возможность чувствительной дозозависимой регистрации активности данного сигнального пути в модельных клетках эпидермиса человека в тесте *in vitro*. Уровень экспрессии GFP-белка биосенсорной конструкции, ассоциированной с активацией сигнального пути *NF-κB*, измеренный с помощью флуориметрии, хорошо коррелировал с изменением экспрессии целевых мРНК, измеренных методом ПЦР в реальном времени. В свою очередь, клеточный сенсор *HaCaT/AP-1* позволял зафиксировать факт активации индукторами соответствующего сигнального пути, однако регистрация дозозависимых эффектов индукторов оказалась невозможной.

Также следует обратить внимание, что информативность результатов тестирования с использованием обоих сенсоров снижалась по мере увеличения концентрации использованных индукторов. Это, вероятно, связано со значительным снижением количества жизнеспособных клеток сенсора в данных условиях, что не позволяет корректно оценивать результаты измерения флуоресценции. В этой связи до проведения тестов с использованием сенсоров *HaCaT/NF-κB* и *HaCaT/AP-1* целесообразно провести МТТ-тест или иной аналогичный тест, позволяющий установить концентрации тестируемых веществ, приводящие к гибели клеток сенсора. Это позволит более корректно оценивать ранние события в клетках в ответ на действие тестируемых веществ, в том числе субтоксического характера.

ВЫВОДЫ

В данной работе разработаны биосенсоры на основе immortalized кератиноцитов *HaCaT*, содержащих генетические системы активации флуоресцентного белка-репортера GFP, экспрессия которого дозозависимо возрастает при активации сигнальных путей *AP-1* и *NF-κB*, ассоциированных с повреждением клеток эпидермиса человека. Проведено экспериментальное определение чувствительности разработанных биосенсоров. Исследована возможность количественной регистрации интенсивности активации клеток сенсоров в ответ на воздействие индукторов. Установлено, что изменение флуоресценции *HaCaT/NF-κB* наблюдается при воздействии низких концентраций *TNFα* или LPS, что согласуется с изменением экспрессии генов *RelA* и *NFKB1*, и имеет дозозависимый характер. Клетки с биосенсором *HaCaT/AP-1* также реагируют на воздействие *Cd(NO₃)₂* и УФ-А увеличением интенсивности флуоресценции и экспрессии целевых генов, однако зафиксировать дозозависимые эффекты данных индукторов на клетки сенсора не удалось. Разработанные клеточные сенсоры могут найти применение в области оценки цитотоксических эффектов тестируемых веществ на клетки кожи человека в тестах *in vitro*, а также в фундаментальных исследованиях механизмов цитотоксичности. При этом сенсор *HaCaT/NF-κB* представляется наиболее перспективным с точки зрения возможности регистрации дозозависимых эффектов повреждающих веществ.

Литература

1. OECD, Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2010. Accessed: Dec. 07, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en.
2. OECD, Test No. 406: Skin Sensitisation. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2022. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en.
3. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсбилизации: ГОСТ 32375-2013. Введ. 01-08-2014. М.: Изд-во стандартов, 2014.
4. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном накожном поступлении. 28/21-дневный тест. ГОСТ 32642-2014. Введ. 01-08-2014. М.: Изд-во стандартов, 2014.
5. Caloni F, De Angelis I, Hartung T. Replacement of animal testing by integrated approaches to testing and assessment (IATA): a call for in vivitrosi. Arch Toxicol. 2022; 96 (7): 1935–1950. DOI: 10.1007/s00204-022-03299-x.
6. Test Methods, PETA Science Consortium International e.V. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: <https://www.thepsci.eu/test-methods/>.
7. Bergmann MM, Caubet J-C. Role of in vivo and in vitro Tests in the Diagnosis of Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCAR) to Drug. Curr Pharm Des. 2019; 25 (36): 3872–80. DOI: 10.2174/1381612825666191107104126.
8. OECD, Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2023. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-492-reconstructed-human-cornea-like-epithelium-rhce-test-method-for-identifying-chemicals-not-requiring-classification-and-labelling-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264242548-en.
9. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Методы испытаний с применением реконструированного рогового эпителия человека (RhCE) для определения химической продукции, не требующей классификации опасности как вызывающей раздражение или серьезное повреждение глаз. ГОСТ 34735-2021. Введ. 01.05.2024. М.: Изд-во стандартов, 2021.
10. OECD, Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2019. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method_9789264264618-en.
11. Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Разъедание кожи in vitro. Методы с использованием реконструированного человеческого эпидермиса. ГОСТ 32634-2020. Введ. 01.07.2021. М.: Стандартинформ, 2021.
12. Русанов А. Л., Лузгина Н. Г., Лисица А. В. Цитотоксичность додецилсульфата натрия в отношении кератиноцитов линии HaCaT: сравнительный анализ различных методов оценки жизнеспособности клеток. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017; 163 (2): 256–60.
13. Арсланбаева Л. Р., Жердева В. В., Ивашина Т. В., Винокуров Л. М., Русанов А. Л., Савицкий А. П. Генетически кодируемая Fret-пара на основе тербийсвязывающего пептида и красного флуоресцентного белка. Прикладная биохимия и микробиология. 2010; 46 (2): 166–71.
14. Rusanov AL, Savitsky AP. Fluorescence resonance energy transfer between fluorescent proteins as powerful toolkits for in vivo studies. Laser Physics Letters. 2011; 8 (2): 91–102. DOI: 10.1002/lapl.201010107.
15. Русанов А. Л., Лузгина Е. Д., Вахрушев И. В., Наход К. В., Лузгина Н. Г. Клеточная модель стенки тонкого кишечника человека на основе генетически модифицированных клеток линии Caco-2. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2018; 3: 201–4.
16. Emter R, van der Veen JW, Adamson G, Ezendam J, van Loveren H, Natsch A. Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. Toxicol In Vitro. 2013; 27 (8): 2225–32. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.09.009.
17. Guo H, Ji J, Sun J, Zhang Y, Sun X. Development of a living mammalian cell-based biosensor for the monitoring and evaluation of synergetic toxicity of cadmium and deoxynivalenol. Science of the Total Environment. 2021; 771: 144823. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144823.
18. Shen Q, et al. Adipocyte reporter assays: Application for identification of anti-inflammatory and antioxidant properties of mangostin xanthenes. Mol Nutr Food Res. 2014; 58 (2): 239–47. DOI: 10.1002/mnfr.201300181.
19. Buchanan V. H.R.2565 — 117th Congress (2021-2022): FDA Modernization Act of 2021. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: <http://www.congress.gov/bills/117th-congress/house-bill/2565>.
20. Deyrieux AF, Wilson VG. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. Cytotechnology. 2007; 54 (2): 77–83. DOI: 10.1007/s10616-007-9076-1.
21. Micallef L, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. Exp Dermatol. 2009; 18 (2): 143–51. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x.
22. Rusanov AL, et al. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. Data. 2022; 7 (3). DOI: 10.3390/data7030027.
23. Rusanov AL, Romashin DD, Zgoda VG, Butkova TV, Luzgina NG. Protein dataset of immortalized keratinocyte HaCaT cells and normal human keratinocytes. Data in Brief. 2021; 35: 106871. DOI: 10.1016/j.dib.2021.106871.
24. Sergachev I, Rusanov A, Trushkin E, Sakharov D, Marx U, Tonevitsky A. Fluorescent optical fiber sensors for cell viability monitoring. Analyst. 2013; 138 (14): 4066–9. DOI: 10.1039/c3an00248a.
25. Forcina GC, Conlon M, Wells A, Cao JY, Dixon SJ. Systematic quantification of population cell death kinetics in mammalian cells. Cell Syst. 2017; 4 (6): 600–10. DOI: 10.1016/j.cels.2017.05.002.
26. OECD, Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2022. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en.

References

1. OECD, Test No. 429: Skin Sensitisation: Local Lymph Node Assay. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2010. Accessed: Dec. 07, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-429-skin-sensitisation_9789264071100-en.
2. OECD, Test No. 406: Skin Sensitisation. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2022. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-406-skin-sensitisation_9789264070660-en.
3. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке кожной сенсбилизации: ГОСТ 32375-2013. Введ. 01-08-2014. М.: Изд-во стандартов, 2014. Russian.
4. Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Определение токсичности при повторном/многократном накожном поступлении. 28/21-дневный тест.

- GOST 32642-2014. Vved. 01-08-2014. M.: Izd-vo standartov, 2014. Russian.
5. Caloni F, De Angelis I, Hartung T. Replacement of animal testing by integrated approaches to testing and assessment (IATA): a call for in vitro. *Arch Toxicol.* 2022; 96 (7): 1935–1950. DOI: 10.1007/s00204-022-03299-x.
 6. Test Methods, PETA Science Consortium International e.V. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: <https://www.thepsci.eu/test-methods/>.
 7. Bergmann MM, Caubet J-C. Role of in vivo and in vitro Tests in the Diagnosis of Severe Cutaneous Adverse Reactions (SCAR) to Drug. *Curr Pharm Des.* 2019; 25 (36): 3872–80. DOI: 10.2174/1381612825666191107104126.
 8. OECD, Test No. 492: Reconstructed human Cornea-like Epithelium (RhCE) test method for identifying chemicals not requiring classification and labelling for eye irritation or serious eye damage. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development, 2023. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-492-reconstructed-human-cornea-like-epithelium-rhce-test-method-for-identifying-chemicals-not-requiring-classification-and-labelling-for-eye-irritation-or-serious-eye-damage_9789264242548-en.
 9. Metody ispytaniy po vozdeystviyu himicheskoy produkcii na organizm cheloveka. Metody ispytaniy s primeneniem rekonstruirovannogo rogovogo jepitelija cheloveka (RhCE) dlja opredelenija himicheskoy produkcii, ne trebujushhej klassifikacii opasnosti kak vyzyvajushhej razdrashenie ili ser'eznoe povrezhdenie glaz. GOST 34735-2021. Vved. 01.05.2024. M.: Izd-vo standartov, 2021. Russian.
 10. OECD, Test No. 431: In vitro skin corrosion: reconstructed human epidermis (RHE) test method. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2019. Accessed: Dec. 06, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-431-in-vitro-skin-corrosion-reconstructed-human-epidermis-rhe-test-method_9789264264618-en.
 11. Metody ispytaniy po vozdeystviyu himicheskoy produkcii na organizm cheloveka. Raz'edanie kozhi in vitro. Metody s ispol'zovaniem rekonstruirovannogo chelovecheskogo jepidermisa. GOST 32634-2020. Vved. 01.07.2021. M.: Standartinform, 2021. Russian.
 12. Rusanov AL, Luzgina NG, Lisica AV. Citotoksichnost' dodecilsul'fata natrija v otnoshenii keratinocitov linii HaCaT: sravnitel'nyj analiz razlichnyh metodov ocenki zhiznesposobnosti kletok. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny.* 2017; 163 (2): 256–60. Russian.
 13. Arslanbaeva LR, Zherdeva VV, Ivashina TV, Vinokurov LM, Rusanov AL, Savickij AP. Geneticheski kodiruemaja Fret-para na osnove terbijsvjazyvajushhego peptida i krasnogo fluorescentnogo belka. *Prikladnaja biohimija i mikrobiologija.* 2010; 46 (2): 166–71. Russian.
 14. Rusanov AL, Savitsky AP. Fluorescence resonance energy transfer between fluorescent proteins as powerful toolkits for in vivo studies. *Laser Physics Letters.* 2011; 8 (2): 91–102. DOI: 10.1002/lapl.201010107.
 15. Rusanov AL, Luzgina ED, Vahrushev IV, Nahod KV, Luzgina NG. Kletochnaja model' stenki tonkogo kishechnika cheloveka na osnove geneticheski modifitsirovannyh kletok linii Saco-2. *Kletochnye tehnologii v biologii i medicine.* 2018; 3: 201–4. Russian.
 16. Emter R, van der Veen JW, Adamson G, Ezendam J, van Loveren H, Natsch A. Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events. *Toxicol In Vitro.* 2013; 27 (8): 2225–32. DOI: 10.1016/j.tiv.2013.09.009.
 17. Guo H, Ji J, Sun J, Zhang Y, Sun X. Development of a living mammalian cell-based biosensor for the monitoring and evaluation of synergetic toxicity of cadmium and deoxynivalenol. *Science of the Total Environment.* 2021; 771: 144823. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.144823.
 18. Shen Q, et al. Adipocyte reporter assays: Application for identification of anti-inflammatory and antioxidant properties of mangostin xanthenes. *Mol Nutr Food Res.* 2014; 58 (2): 239–47. DOI: 10.1002/mnfr.201300181.
 19. Buchanan V. H.R.2565 — 117th Congress (2021-2022): FDA Modernization Act of 2021. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: <http://www.congress.gov/bill/117th-congress/house-bill/2565>.
 20. Deyrieux AF, Wilson VG. In vitro culture conditions to study keratinocyte differentiation using the HaCaT cell line. *Cytotechnology.* 2007; 54 (2): 77–83. DOI: 10.1007/s10616-007-9076-1.
 21. Micallef L, et al. Effects of extracellular calcium on the growth-differentiation switch in immortalized keratinocyte HaCaT cells compared with normal human keratinocytes. *Exp Dermatol.* 2009; 18 (2): 143–51. DOI: 10.1111/j.1600-0625.2008.00775.x.
 22. Rusanov AL, et al. Impact of p53 Knockout on Protein Data Set of HaCaT Cells in Confluent and Subconfluent Conditions. *Data.* 2022; 7 (3). DOI: 10.3390/data7030027.
 23. Rusanov AL, Romashin DD, Zgoda VG, Butkova TV, Luzgina NG. Protein dataset of immortalized keratinocyte HaCaT cells and normal human keratinocytes. *Data in Brief.* 2021; 35: 106871. DOI: 10.1016/j.dib.2021.106871.
 24. Sergachev I, Rusanov A, Trushkin E, Sakharov D, Marx U, Tonevitsky A. Fluorescent optical fiber sensors for cell viability monitoring. *Analyst.* 2013; 138 (14): 4066–9. DOI: 10.1039/c3an00248a.
 25. Forcina GC, Conlon M, Wells A, Cao JY, Dixon SJ. Systematic quantification of population cell death kinetics in mammalian cells. *Cell Syst.* 2017; 4 (6): 600–10. DOI: 10.1016/j.cels.2017.05.002.
 26. OECD, Test No. 442D: In Vitro Skin Sensitisation: ARE-Nrf2 Luciferase Test Method. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2022. Accessed: Jul. 25, 2023. Available from: https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-442d-in-vitro-skin-sensitisation_9789264229822-en.