

Metody *in vitro* i *in silico* jako alternatywa do badań *in vivo* w przemyśle kosmetycznym

In vivo and in silico methods as an alternative to in vivo tests in the cosmetics industry

| WSTĘP

Produkty kosmetyczne to zazwyczaj mieszaniny składające się nawet z kilkudziesięciu substancji chemicznych. Najczęściej występujące w nich alergeny to substancje zapachowe, barwniki i konserwanty. Ze względu na ich szkodliwy wpływ na skórę niezbędne jest wykonywanie badań sprawdzających bezpieczeństwo stosowania tych substancji na skórę. Spośród metod wykorzystywanych do wykonywania badań możemy wyróżnić:

- *in vivo* - na organizmie żywym, co wymaga udziału zwierząt, przy czym należy pamiętać o różnicach w reakcjach zachodzących w organizmie zwierzęcym i organizmie ludzkim;
- *in vitro* - w warunkach laboratoryjnych, ze

względu na coraz bardziej rozbudowane modele naskórka, z powodzeniem zastępują badania na organizmach żywych;

- *in silico* - bazujące na modelach i obliczeniach komputerowych danego związku, nie mają jednak możliwości zastąpienia badań z udziałem zwierząt lub badań *in vitro* [1].

Do niedawna testy oceny bezpieczeństwa substancji kosmetycznych były wykonywane z udziałem zwierząt. Jednym z najbardziej znanych był opracowany w 1944 roku test Draize'a. Polegał on na podaniu testowanej substancji bezpośrednio do oka królika albinosa. Następnie podczas 72-godzinnej obserwacji sprawdzano wystąpienie objawów

Natalia Totko-Borkusiewicz
Akademia Wychowania Fizycznego im. Bronisława Czecha w Krakowie, Wydział Rehabilitacji Ruchowej
Aleja Jana Pawła II 78
31-571 Kraków

M: +48 502 585 512
E: ntotko@gmail.com

» 108

| STRESZCZENIE

W większości produktów kosmetycznych znajduje się wiele substancji chemicznych. Niektóre z nich: substancje zapachowe, barwiące czy konserwanty, mogą powodować w kontakcie ze skórą wiele reakcji niepożądanych. Pojawiła się potrzeba opracowania metod pozwalających na zbadanie bezpieczeństwa składników chemicznych występujących w produktach kosmetycznych.

Do niedawna badania oceny bezpieczeństwa substancji chemicznych były przeprowadzane na zwierzętach. Jednak w obliczu zasady 3R stworzonej w 1959 roku oraz rozwoju, jaki dokonał się w dziedzinie związanej z metodami alternatywnymi, coraz częściej zaczęto korzystać z dostępnych testów bazujących na modelach *in vitro* lub *in silico*. Powstałe metody alternatywne wykorzystują modele zrekonstruowanej ludzkiej tkanki, tj. EpiSkin, EpiDerm, SkinEthic, EpiOcular, izolowane oczy kurcze czy też rogówki bydłce.

Celem pracy było przedstawienie aktualnego stanu metod alternatywnych w przemyśle kosmetycznym oraz zaprezentowanie wybranych testów.

Słowa kluczowe: metody alternatywne, zasada 3R, test Draize'a, przemysł kosmetyczny

| ABSTRACT

Commercially available cosmetics consist of numerous chemicals. Some of them, ie. fragrances, colorants or preservatives may result in a number of reactions while in contact with the skin. It forced to develop several methods to investigate the safety of chemicals as components used in cosmetics.

Until recently, studies assessing the safety of chemicals were carried out using animals. However, in the face of the 3R principle created in 1959 and the development that has been made in the areas of alternative methods, the available tests based on models *in vitro* or *in silico* have been increasingly developed. The resulting alternative methods utilize models of reconstructed human tissue, ie. EPISKIN, EpiDerm, SkinEthic, EpiOcular, isolated chicken eyes or bovine corneas.

The following article presents the current status of alternative methods used in the cosmetics industry and a brief discussion on selected tests.

Key words: alternative methods, 3R principal, Draize's test, cosmetic industry

otrzymano / received

16.06.2016

poprawiono / corrected

24.07.2016

zaakceptowano / accepted

18.08.2016

zmętnienia, owrzodzenia, zaczerwienienia, krwawienia oka, a także obrzęku spojówki i tęczęwki [2].

Test ten miał za zadanie nie tylko wykazanie potencjału drażniącego substancji, ale również określenie czasu potrzebnego do zniwelowania i ustąpienia powstałych uszkodzeń [3].

| ZASADA 3R

W dniu 11 marca 2014 roku na terenie Unii Europejskiej wprowadzono zakaz używania do produkcji kosmetyków substancji testowanych na zwierzętach. Warto jednak zaznaczyć, że zakaz ten dotyczy metod i substancji, dla których już istnieją metody alternatywne. Dodatkowo należy pamiętać, że w przypadkach takich jak ocena toksykokinetyki lub toksyczności ostrej za metodę alternatywną można uznać taką, która w dalszym ciągu angażuje zwierzęta, ale w których ich ilość została znacznie zmniejszona, a sama metoda stała się bardziej humanitarna [4].

Idea powstania metod alternatywnych opiera się na tak zwanej „Zasadzie 3R”. Odnosi się ona do trzech pojęć:

- **replacement** – czyli zastąpienie lub całkowite wykluczenie z badań modeli zwierzęcych i zastąpienie ich modelami *in vitro* lub *in silico*;
- **reduction** – czyli maksymalna redukcja liczby wykorzystywanych żywych zwierząt przy jednoczesnym zachowaniu dokładności wyników;
- **refinement** – czyli udoskonalanie metod w celu ciągłego zmniejszania bólu i cierpienia wykorzystywanych do badań zwierząt [5,6].

Wszystkie metody alternatywne zostają poddane procesowi walidacji, który potwierdza niezawodność, przydatność i wiarygodność danej metody [7].

Za metody alternatywne można uznać również te, które wciąż pozostają w trakcie procesu walidacji.

Spis i objaśnienie metod alternatywnych, dla których proces walidacji został ukończony, opisują protokoły Organizacji do spraw Współpracy Gospodarczej i Rozwoju OECD (*Organisation for Economic Co-Operation and Development*), mającej na celu promowanie działań zmierzających ku poprawie sytuacji gospodarczej na całym świecie [7].

Najnowszy raport techniczny dotyczący aktualnego statusu metod alternatywnych w przemyśle kosmetycznym został opublikowany w styczniu 2014 roku. Dokument zawiera zarówno metody w fazie badań, jak i w pełni ukończone.

| TESTY ALTERNATYWNE

| Ocena działania żrącego względem tkanki skórnej

Działanie żrące na skórę powoduje wystąpienie nieodwracalnych uszkodzeń na poziomie naskórka i skóry właściwej. W tabeli 1 przedstawiono zestawienie metod alternatywnych dla sprawdzenia działania żrącego.

Tabela 1 Wybrane testy wykorzystywane w ocenie działania żrącego substancji względem tkanki skórnej

Lp.	Metoda	Aktualny status	Wytoczne międzynarodowe wg OECD
1.	Test CORROSITEX, w którym miarą działania żrącego jest zdolność substancji do przenikania przez biobarierę złożoną z macierzy uwodnionego kolagenu	Ukończony	OECD TG 435 [24]
2.	Testy wykorzystujące modele naskórka i skóry ludzkiej: EpiSkin, EpiDerm, SkinEthic, EST-1000	Ukończone	OECD TG 431 [25]
3.	Test szczurzej przezskórnej elektrycznej rezystancji Rat TER OECD TG 430	Ukończony	OECD TG 430

Źródło: [7]

Na szczególną uwagę zasługują testy wykorzystujące modele zrekonstruowanego naskórka i skóry ludzkiej EpiSkin, EpiDerm, SkinEthic oraz EST-1000 Skin Corrosivity Test.

- EpiSkin to model naskórka powstały z ludzkich keratynocytów pochodzących od dawców poddających się operacjom plastycznym. Dzięki temu model ten pod względem rozwarstwiania komórek naskórka, przylegania warstwy podstawnej do podłoża, a także ilości komórek ziarnistych i grubości warstwy rogowej wiernie odpowiada skórze człowieka. Zapewnia to bardzo wysoką czułość i specyficzność metody [7, 9].
- Epiderm to trójwymiarowy, zróżnicowany model skóry, do stworzenia którego bazę stanowią komórki skóry pochodzące z napełtków noworodków. Sprawdza się on w testowaniu zarówno substancji ciekłych, jak i stałych przy zachowaniu pełnej morfologii naskórka przez okres 3 tygodni.
- SkinEthic to model ludzkich keratynocytów hodowanych na podłożu obojętnym w odpowiednio przygotowanej pożywce chemicznej. Tego rodzaju modele pozwalają na przeprowadzenie badań przez duże koncerny kosmetyczne, mogą angażować bowiem wiele substancji badanych oraz dużą ilość odczynników sprawdzających [10].

Do testowania bardziej zróżnicowanych substancji wykorzystuje się model SkinEthic. Umożliwia badanie substancji w formie stałej, półstałej oraz ciekłej, a także rozpuszczalnych i nierozpuszczalnych w wodzie. Oceny dokonuje się poprzez ocenę stanu mitochondriów po 30-, 60- lub 240-minutowym czasie ekspozycji modelu na działanie badanej substancji [8].

| Ocena działania drażniącego względem tkanki skórnej

Działaniem drażniącym na skórę określa się wywołanie uszkodzenia przez daną substancję chemiczną trwającego krócej niż 4 godziny. Do niedawna testem sprawdzającym działanie drażniące na skórę był wspomniany już test Draize'a. Badania wykonane w 2004 roku przez Amerykański Komitet Doradczy do spraw Alternatywnych Metod Toksykologicznych (*US Scientific Advisory Committee on Alternative Toxicological Methods*) wykazały jednak małą dokładność badania oraz brak precyzyjności w przełożeniu wyników na warunki skóry ludzkiej. Z tego względu powstały nowe metody angażujące modele zrekonstruowanego naskórka ludzkiego (tabela 2) [11].

Tabela 2 Wybrane testy wykorzystywane w ocenie działania drażniącego substancji na skórę

Lp.	Metoda	Aktualny status	Wytyczne międzynarodowe wg OECD
1.	Testy <i>in vitro</i> z wykorzystaniem zrekonstruowanego ludzkiego naskórka – EpiDerm, EPISKIN, SkinEthic oraz LabCyte EPI-MODEL 24 <i>SIT</i>	Ukończone	OECD TG 439 [41]
2.	Testy <i>in vitro</i> z wykorzystaniem zrekonstruowanego naskórka ludzkiego (RhE). Koreański model naskórka	W trakcie	-

Źródło: [7]

Test z wykorzystaniem LabCyte EPI-MODEL 24 powstał przy wsparciu Japońskiego Stowarzyszenia Alternatyw dla Doświadczeń na Zwierzętach JSAAE (*Japanese Society for Alternatives to Animal Experiments*). Podobnie jak w przypadku modelu EpiDerm, komórki do budowy modelu są pozyskiwane z nąpletków noworodków. Model posiada cechy naskórka ludzkiego, jest wielowarstwową strukturą z pełni zróżnicowanym nabłonkiem [12].

I Ocena działania fototoksycznego substancji

Fototoksyczność to reakcja, na którą składa się jednocześnie działanie substancji chemicznej oraz promieni UV na skórę. Zjawisko to dotyczy zarówno kosmetyków, jak i leków, a nawet niektórych składników żywności.

Tabela 3 Wybrane testy stosowane w ocenie działania fototoksycznego substancji

Lp.	Metoda	Aktualny status	Wytyczne międzynarodowe wg OECD
1.	Test wychwyty czerwieni obojętnej – 3T3 NRU (<i>Neutral Red Uptake</i>)	Ukończony	OECD TG 432 [45]
2.	Test hamowania wzrostu drożdży oraz test fotolizy krwinek czerwonych	W trakcie ewaluacji	-
3.	Test wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz badanie fotostabilności	W trakcie ewaluacji	-

Źródło: [7]

Metodami alternatywnymi z zakresu fototoksyczności jest

- w pełni ukończony i zwalidowany test wychwyty czerwieni obojętnej – 3T3 NRU (*Neutral Red Uptake*) oraz dwa testy w trakcie ewaluacji;
- test hamowania wzrostu drożdży oraz test fotolizy krwinek czerwonych;
- test wytwarzania reaktywnych form tlenu oraz badanie fotostabilności (tabela 3).

Test wychwyty czerwieni obojętnej jest na terenie Unii Europejskiej metodą obowiązkową przy badaniu działania fototoksycznego. Badanie prowadzi się na mysich fibroblastach i stanowi ono porównanie wyników działania cytotoksycznego substancji poddanych promieniowaniu UV do wyników działania cytotoksycznego substancji bez udziału promieniowania UV [13].

I METODY BADANIA TOKSYCZNOŚCI SUBSTANCJI WOBEC GAŁKI OCZNEJ

Ludzka gałka oczna jest skomplikowanym organem o zróżnicowanej budowie. Najbardziej narażonymi na uszkodzenia toksyczne strukturami są jednak rogówka i spojówka. Pierwotnie stosowanym testem do badania działania toksycznego wobec gałki ocznej był test Draize'a. Ze względu jednak między innymi na jego niską precyzję zastąpiono go bardziej humanitarnymi metodami alternatywnymi (tabela 4).

Tabela 4 Wybrane testy stosowane w ocenie toksyczności substancji wobec gałki ocznej

Lp.	Metoda	Aktualny status	Wytyczne międzynarodowe wg OECD
1.	Badanie zmętnienia i przepuszczalności rogówki bydłej BCOP (<i>Bovine Corneal Opacity and Permeability</i>)	Ukończony	OECD TG 437 [49]
2.	Test na izolowanym oku kurzym ICE (<i>Isolated Chicken Eye</i>)	Ukończony	OECD TG 438 [50]
3.	Ocena histopatologiczna	Ukończony	OECD GD 160 [51]
4.	Test cytotoksyczności SIRC CVS (<i>Crystal Violet Staining Assay</i>) – test barwienia fioletu krystalicznego	W trakcie walidacji	-
5.	Test cytotoksyczności – trójwymiarowy model tkanki skórnej MATREX	W stadium planowania	-
6.	Test cytotoksyczności – test krótkotrwałej ekspozycji STE (<i>Short Time Exposure</i>)	W trakcie ewaluacji	-
7.	Środki znieczulające, przeciwbólowe do rutynowego stosowania w TG 405	Ukończony	OECD uaktualnione TG 405 (2012)
8.	Test uwalniania fluoresceiny FLT (<i>Fluorescein Leakage Test</i>)	Ukończony	OECD TG 460 [52]
9.	Zrekonstruowane modele ludzkiej tkanki do oceny podrażnienia oka EpiOcular EIT (<i>Eye Irritation Test</i>), Skin Ethic HCE (<i>Human Corneal Epithelium</i>)	W trakcie walidacji	-

Źródło: [7]

- Badanie zmętnienia i przepuszczalności rogówki bydłej BCOP (*Bovine Corneal Opacity & Permeability Assay*). Test ten został opracowany w 1992 roku i wykorzystuje wyizolowane bydłe rogówki będące produktem ubocznym pozyskiwanym z rzeźni. Właściwości drażniące w stosunku do gałki ocznej są ustalane na podstawie wpływu substancji na zmętnienie rogówki oraz jej przepuszczalność. Zmiany te mogą świadczyć o denaturacji białka lub utracie funkcji barierowej tkanek w rogówce. Dzięki tej metodzie badane substancje można podzielić na mocno i umiarkowanie drażniące [14-16].
- Test na izolowanym oku kurzym ICE (*Isolated Chicken Eye*). Służy do określania toksyczności zarówno dla pojedynczych substancji, jak i ich mieszanin [17]. Materiał wykorzystywany do badań w tym przypadku pozyskiwany jest z uboju drobiu i musi być pozbawiony wszelakich uszkodzeń i zmętnień oraz dostarczony do laboratorium w ciągu godziny. Na dostarczonym materiale po 10-sekundowej ekspozycji na substancję potencjalnie szkodliwą dokonuje się obserwacji pod względem wystąpienia zmętnienia, obrzęku, uszkodzenia nabłonka, a także uszkodzeń powierzchni gałki ocznej [17, 19].

- Ocena histopatologiczna

Ocena histopatologiczna jest kolejnym etapem testów BCOP oraz ICE. Polega ona na analizie materiału wykorzystanego w omówionych testach, sfotografowaniu go oraz odpowiednim opisaniu. Metoda ta została oficjalnie zatwierdzona w 2011 roku i od tego momentu stanowi dodatkowy punkt końcowy dla testów oceniających działanie toksyczne na gałkę oczną [20].

- Test uwalniania fluoresceiny – FLT

Test FLT został wprowadzony w 2012 roku i dotyczy badania substancji wywołujących stałe i nieodwracalne uszkodzenia gałki ocznej, np. alkohole, kwasy karboksylowe, aminy, oleje mineralne. Negatywny wynik testu dla danej substancji skutkuje koniecznością przeprowadzenia dalszych badań, w celu potwierdzenia braku działania drażniącego, wynik dodatni świadczy natomiast o silnym charakterze drażniącym tej substancji [21].

| METODY TESTOWANIA DZIAŁANIA UCZULAJĄCEGO (IMMUNOTOKSYCZNEGO) SUBSTANCJI

Immunotoksyczność jest negatywnym efektem, jaki mogą wywołać substancje chemiczne na układ odpornościowy. Najczęstszym schorzeniem będącym skutkiem immunotoksyczności jest kontaktowe zapalenie skóry stanowiące do 4% wszystkich konsultacji dermatologicznych. Składnikami, które najczęściej powodują immunotoksyczność, są środki nawilżające, barwniki i substancje zapachowe [19, 22].

W tabeli 5 przedstawiono niektóre metody badań potencjału uczulającego: badanie lokalnych węzłów chłonnych u myszy LLNA (*Local Lymph Node Assay*); test LLNA – ograniczone podejście (*rLLNA*); badanie lokalnych węzłów chłonnych u myszy – test w wersji nieradioaktywnej (*LLNA: BrdU-ELISA*); bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów DPRA (*Direct Peptide Reactivity Assay*); badanie aktywacji ludzkich linii komórkowych hCLAT (*Human Cell Line Activation*); badanie działania uczulającego na skórę z wykorzystaniem linii mieloidalnej U937 MUSST (*Myeloid U937 Skin Sensitization Test*) oraz metoda Keratinosens.

Tabela 5 Wybrane testy stosowane w ocenie działania uczulającego substancji

Lp.	Metoda	Aktualny status	Wytyczne międzynarodowe wg OECD
1.	Badanie lokalnych węzłów chłonnych u myszy LLNA	Ukończony	OECD TG 429 [70]
2.	Test LLNA – ograniczone podejście (rLLNA)	Ukończony	OECD TG 429 [70]
3.	Badanie lokalnych węzłów chłonnych u myszy – test w wersji nieradioaktywnej (LLNA: BrdU-ELISA)	Ukończony	OECD TG 442B [71]
4.	Bezpośrednie oznaczanie reaktywności peptydów DPRA, badanie aktywacji ludzkich linii komórkowych hCLAT oraz badanie działania uczulającego na skórę z wykorzystaniem linii mieloidalnej U937 MUSST	W trakcie ewaluacji	-
5.	Metoda Keratinosens	W trakcie walidacji	-

Źródło: [7]

Jedną z najszybszych metod jest metoda Keratinosens wykorzystująca linię komórkową o tej właśnie nazwie. Jest to

przesiewowy test *in vitro* sprawdzający odpowiedź keratynocytów na działanie białka chroniącego komórki przed stresem oksydacyjnym (Nrf2) [23].

| PODSUMOWANIE

Pozostałe dziedziny, względem których prowadzone są badania nad alternatywnymi metodami badań, to toksyczność ostra, toksykokinetyka, genotoksyczność, a także działanie kancerogenne.

Pomimo powstania metod alternatywnych, które idealnie odzwierciedlają zależność pomiędzy substancją chemiczną a skórą, niektóre z wymienionych dziedzin wciąż wymagają udziału zwierząt.

| LITERATURA

1. J. Dulak: *Metody alternatywne do badań na zwierzętach*, Przegląd Filozoficzny – nowa seria, 2(94), 2015, 276-286.
2. Organisation for Economic Co-Operation and Development. *Test Guideline. Test No. 405: Acute Eye Irritation/Corrosion*, 2012.
3. X. Guo, X.F. Yang, Y. Yang, R. Hans, J.H. Cai, J.Y. Xue, H.X. Tan, X.P. Xie, X.K. Xiong, J.M. Huang: *Prediction of ocular irritancy of 26 chemicals and 26 cosmetic products with isolated rabbit eye (IRE) test*, Biomedical and Environmental Sciences, 25(3), 2012, 359-366.
4. *Dyrektywa 76/768/EEC* z dnia 11 marca 2014.
5. <http://www.forschung3r.ch/en/publications/bu7.html> (dostęp z dnia 24.09.2016).
6. <http://www.nc3rs.org.uk/page.asp?id=7> (dostęp z dnia 24.09.2016).
7. http://ihcp.jrc.ec.europa.eu/our_labs/eurl-ecvam/validation-regulatory-acceptance (dostęp z dnia 24.09.2016).
8. F. Netzlauff, C.M. Lehr, P.W. Wertz, U.F. Schaefer: *The human epidermis models EpiSkin, SkinEthic and EpiDerm: an evaluation of morphology and their suitability for testing phototoxicity, irritancy, corrosivity, and substance transport*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 60(2), 2005, 167-168.
9. *Sub-categorisation of skin corrosive chemicals by the EpiSkin™ reconstructed human epidermis skin corrosion test method according to UN GHS: Revision of OECD Test Guideline 431*.
10. *INVITTOX Protocol SKINETHIC™ Skin Corrosivity Test, ECVAM database service on alternative methods to animal experimentation*, 4.
11. A. Miles, A. Berthet, N.B. Hopf, M. Gilliet, W. Raffoul, D. Vernez, P. Spring: *A new alternative method for testing skin irritation using a human skin model: a pilot study*, Toxicology In Vitro – Journal, 28(2), 2014, 240-247.
12. H. Kojima, M. Katoh, S. Shinoda, S. Hagiwara, T. Suzuki, R. Izumi, Y. Yamaguchi, M. Nakamura, T. Kasahawa, A. Shibai: *A catch-up validation study of an in vitro skin irritation test method using reconstructed human epidermis LabCyte EPI-MODEL24*, Journal of Applied Toxicology, 34(7), 2014, 766-774.
13. Organisation for Economic Co-Operation and Development. *Test Guideline 432: In Vitro 3T3 NRU Phototoxicity Test*, 2004.
14. Organisation for Economic Co-Operation and Development. *Test Guideline 437: Bovine Corneal Opacity and Permeability Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage*, 2013.
15. <http://www.iivs.org/scientific-services/laboratory-services/ocular-irritation/bcop/> (dostęp z dnia 3.04.2014).
16. <http://www.iivs.org/home/scientific-services/laboratory-services/ocular-irritation/bcop/step-by-step/1/> (dostęp z dnia 3.04.2014).
17. Organisation for Economic Co-Operation and Development *Test Guideline 438: Isolated Chicken Eye Test Method for Identifying i) Chemicals Inducing Serious Eye Damage and ii) Chemicals Not Requiring Classification for Eye Irritation or Serious Eye Damage*, 2013.
18. M.K. Prinsen, M.E. Schipper, M.V. Wijnands: *Histopathology in the isolated chicken eye test and comparison of different stainings of the cornea*, Toxicology In Vitro – Journal, 25(7), 2011, 1475-1479.
19. P. González-Muñoz, L. Conde-Salazar, S. Vañó-Galván: *Dermatitis alérgica de contacto a cosméticos*, Acta Dermo-Sifiliograficas, 105(9), 2013, 822-832.
20. *Overview of Histopathology in Ocular Safety Testing*, Ocular Histopathology Overview, 2011. <https://pdfs.semanticscholar.org/f5b9/3e588dc36a93a7eeea5f510fd49c5898d-1ba.pdf> (dostęp z dnia 15.04.2014).
21. *European Union Reference Laboratory for alternatives to animals testing*, <https://ec.europa.eu/jrc/en/network-bureau/european-union-reference-laboratory-alternatives-animal-testing> (dostęp z dnia 15.04.2014).
22. J. Torp Madsen, K. Ejner Andersen: *Airborne allergic contact dermatitis caused by methylisothiazolinone in a child sensitized from wet wipes*, Contact Dermatitis, 70(3), 2014, 183-184.
23. R. Emter, J.W. van der Veen, G. Adamson, J. Ezendam, H. van Loveren, A. Natsch: *Gene expression changes induced by skin sensitizers in the KeratinoSens™ cell line: Discriminating Nrf2-dependent and Nrf2-independent events*, Toxicol In Vitro, 27(8), 2013, 2225-2232.