

Disertacijos

Kontaktinė alergija sunkiesiems metalams: rizikos veiksniai ir patogeneziniai mechanizmai

CONTACT ALLERGY TO HEAVY METALS: RISK FACTORS AND PATHOGENESIS

KOTRYNA LINAUSKIENĖ

VU MF Klinikinės medicinos institutas, Krūtinės ligų, imunologijos ir alergologijos klinika

Disertacija apginta viešajame gynimo tarybos posėdyje 2022 m. kovo mėn. 24 d. Vilniaus universiteto ligoninėje Santaros klinikų Pulmonologijos ir alergologijos centre.

Mokslinis vadovas:

prof. dr. Laura Malinauskienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Mokslinė konsultantė:

prof. dr. Marlène Isaksson (Lundo universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Gynimo taryba:

prof. dr. Rūta Dubakienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Matilda Bylaitė-Bučinskienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

dr. Rūta Druiteikienė (Fizinių ir technologijos mokslų centras, gamtos mokslai, fizika – N 002),

prof. dr. Violeta Kvedarienė (Vilniaus universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001),

prof. dr. Radosław Spiewak (Krokuvos Jogailos universitetas, medicinos ir sveikatos mokslai, medicina – M 001).

Straipsnyje pateikiami esminiai disertacijos rezultatai.

The dissertation was defended at a public meeting of the Dissertation Defense Panel on 24th March 2022 in the Vilnius University Hospital Santaros Clinics, Center of Pulmonology and Allergology.

Academic supervisor:

Prof. Dr. Laura Malinauskienė (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

Academic consultant:

Prof. Dr. Marlène Isaksson (Lund University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The Defense Panel:

Prof. Dr. Rūta Dubakienė (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Matilda Bylaitė Bučinskienė (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001),

Dr. Rūta Druiteikienė (Center of Physical Sciences and Technology, Natural Sciences, Physics – N 002),

Prof. Dr. Violeta Kvedarienė (Vilnius University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001),

Prof. Dr. Radosław Spiewak (Jagellonian University, Medical and Health Sciences, Medicine – M 001).

The article presents the main results of the dissertation.

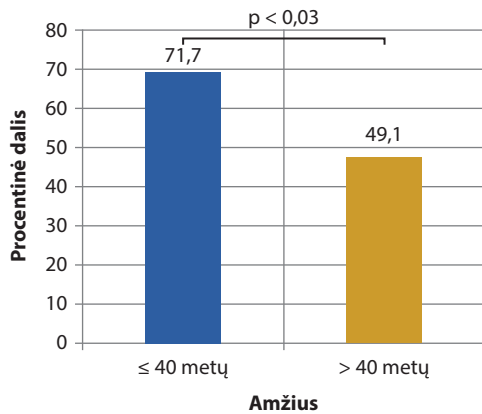
DOI: <https://doi.org/10.37499/PIA.965>

IVADAS

Alergija metalams ilgą laiką buvo ir tebėra dažniausia kontaktinė alergija tarp sergančiųjų dermatitu ir bendrojoje populiacijoje. Su metalais dažnai kontaktuoja įvairių profesijų atstovai, pvz., mechanikai, statybininkai, suvirintojai, kompiuterinės technikos surinkėjai, įrankių gamintojai, kasininkai ir kt. [1–3]. Šiame moksliniame darbe nagrinėjama, kaip kontaktinė alergija pasireiškia tarp metalo apdirbimo sektoriuje dirbančių žmonių. Darbą sudaro atskiri klinikiniai ir eksperimentiniai tyrimai.

KLAUSIMYNAS IR ODOS LOPO MĖGINIAI SU EUROPOS BAZINE SERIJA

Pradžioje buvo apklausti 185 metalo apdirbimo įmonės darbuotojai (154 darbininkai ir 31 administracijos darbuotojas). Jie atsakė į specialiai tyrimui sudarytos anketos klausimus, pateikdami informaciją apie varginančius odos sutrikimus. Apklausos rezultatai parodė, kad mažiau nei 20 metų darbo stažą turintys metalo apdirbimo sektoriaus darbuotojai dažniau turėjo odos sutrikimų nei ilgiau toje pačioje pozicijoje dirbantieji ir kad odos sutrikimus dažniausiai sukelia kontaktas



1 pav. Skundai dėl odos simptomų pagal darbininkų amžių

su alyva ir kitais techniniais skysčiais, naudojamais darbo vietoje (1 lentelė). Tęsiant tyrimą, ant 135 metalo apdirbimo sektoriaus darbuotojų (75 darbininkų ir 60 administracijos darbuotojų) nugaros buvo užklijuoti odos lopo mėginiai su Europos bazinės serijos kontaktiniais alergenais. Bent viena teigiama mėginio reakcija pasireiškė 28,9 proc. tiriamųjų (2 lentelė). Įsijautrinimas kobalto chloridui statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp darbininkų ir administracijos darbuotojų (teigiami lopo testai / tirti asmenys: 6 / 75 ir 0 / 60 atitinkamai, $p = 0,03$). Moterys, nepriklausomai nuo atliekamo darbo, buvo statistiškai dažniau įsijautrinusios nikelio sulfatui nei vyrai (18,75 proc. ir 4,22 proc. atitinkamai, $p = 0,01$). Iš tirtų Europos bazinės serijos kontaktinių alergenų, penki dažniausi nustatyti kontaktiniai alergenais buvo nikelio sulfatas (11,11 proc.), Peru balzamas (5,93 proc.), kobalto chloridas (4,4 proc.), kvapiųjų medžiagų mišinys I (3,7 proc.) ir metildibromoglutaronitrilas (2,96 proc.).

Dirbant įgytas alerginis arba iritacinis kontaktinis dermatitas buvo įtartas 11 iš 75 darbininkų. Jaunesni (< 40 metų amžiaus) darbuotojai statistiškai reikšmingai dažniau skundėsi odos simptomais nei vyresni ($p = 0,03$) (1 pav.), viena to priežastis – jaunesnio amžiaus darbininkai labiau atkreipia dėmesį į sveikatos problemas nei vyresni ilgiau dirbantys asmenys, kurie dažniausiai darbo metu pripranta prie darbo sąlygų, atsainiau žiūri į apsaugos ir profilaktikos priemones. Tai pat galimas „sveiko darbuotojo“ efektas, kuomet turintys odos sutrikimų darbuotojai išeina iš darbo ir lieka odos sutrikimų neturintys arba juos toleruojantys asmenys. Tai galėtų būti viena priežasčių, kodėl ilgą darbo stažą turintys asmenys rečiau skundėsi odos sutrikimais. Lyginant

1 lentelė. Apibendrinti klausimyno rezultatai pagal dermatito sritį ir įtariamą pažeidimo priežastį

Skundai	Darbininkai, N = 154		Administracijos darbuotojai, N = 31		Reikšmingumo lygmuo, p
	n (proc.)	95 proc. PI	n (proc.)	95 proc. PI	
Veido bėrimas	70 (45,5)	37,8–53,3	5 (16,1)	6,6–33,1	0,0024
Rankų bėrimas	66 (42,9)	35,3–50,7	4 (12,9)	4,5–29,4	0,0019
Kojų bėrimas	2 (1,3)	0–4,9	3 (9,7)	2,56–25,6	0,03
Kitas bėrimas	0/0	–	1 (3,2)	0–17,5	
Įtariamie veiksniai:					
Alyva, kiti techniniai skysčiai	31 (20,1)	14,5–27,2	1 (3,2)	0–17,5	0,01
Detergentai	24 (15,6)	10,6–22,2	9 (29,0)	15,9–46,7	0,04
Šaltis	58 (37,7)	29,7–44,8	8 (25,8)	13,4–43,4	0,2
Karštis	47 (30,5)	23,7–38,2	7 (22,5)	11,1–40,1	0,36
Metalai	13 (8,4)	4,8–14,0	0 / 0	–	0,13
Bižuterija	1 (0,6)	0–3,9	2 (6,5)	0,7–21,7	0,07
Oda	0 / 0	–	0 / 0	–	–
Guma	2 (1,3)	0–4,9	2 (6,5)	0,7–21,7	0,13

N – apklaustųjų skaičius; n – teigiamai atsakiusių skaičius; PI – pasikliautinas intervalas. Chi kvadrato (χ^2) arba Fišerio tikslusis testas (jei $n \leq 5$). Statistiškai reikšmingi rezultatai ($p < 0,05$) paryškinti.

2 lentelė. MOAHLFAP indeksas – tiriamosios grupės aprašymas

Savybės	Europos bazinė serija					
	Visi tiriamieji		Darbininkai		Administracijos darbuotojai	
	N	Teigiamos reakcijos, n (proc.)	N	Teigiamos reakcijos, n (proc.)	N	Teigiamos reakcijos, n (proc.)
Vyrai	135	71 (52,6)	75	52 (69,3)	60	19 (31,7)
Su darbu susiję	135	11 (8,1)	75	11 (14,7)	60	0 (0)
Atopinis dermatitas	135	2 (1,5)	75	0 (0)	60	2 (3,3)
Rankos	135	11 (8,2)	75	10 (13,3)	60	1 (1,7)
Kojos	135	0 (0)	75	0 (0)	60	0 (0)
Veidas	135	16 (11,9)	75	5 (6,7)	60	11 (18,3)
Amžius > 40 metų	135	81 (60,0)	75	48 (64,0)	60	33 (55,0)
Teigiamumas (≥ 1 teigiama reakcija)	135	39 (28,9)	75	25 (33,3)	60	14 (23,3)

N – tiriamųjų skaičius; n – teigiamų reakcijų skaičius.

atlikto tyrimo rezultatus su Bavarijos regiono (Vokietija) metalo apdirbimo įmonių darbuotojų duomenimis, didžiausias kontaktinės alergijos dažnis taip pat buvo pastebėtas jauname amžiuje – 15–24 metų amžiaus grupėje [4]. Pažymėtina tai, kad dažniausiai metalo apdirbimo pramonėje kontaktinė alergija pasireiškia per pirmuosius ketverius darbo metus [4].

Lyginant odos lopo mėginių rezultatus su bendrąja Europos populiacija, EDEN tyrimo dalyviais, tarp kurių buvo ir metalo apdirbimo įmonių darbuotojų, pastebėta, kad metalo įmonių darbuotojai statistiškai reikšmingai dažniau yra įsijautrinę kobalto chloridui

Disertacijos

3 lentelė. Vidutinis nikelio, kobalto ir chromo išsiskyrimas į dirbtinį prakaitą per vieną dieną ir savaitę ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)

	Išsiskyres kiekis iš tyrimo mėginį	Nustatytas kiekis ant darbininkų pirštų	Leistinos ribos	Dermatito simptomus galinti sukelti riba įsijautrinusiems asmenims	Įjautrinimo kiekis
Nikelis	0,0257* $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{sav.}$	0,0297* $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	< 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{sav.}$ [7]	0,0075–10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [38, 39]	1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [39]
Kobaltas	< 0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{sav.}$	< 0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	NR	0,066–1,95 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [40]	2,3–226 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [41]
Chromas	0,0057* $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{sav.}$	0,0056* $\mu\text{g}/\text{cm}^2$	0,3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [42]	0,01–0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [42]	0,02–1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [42]

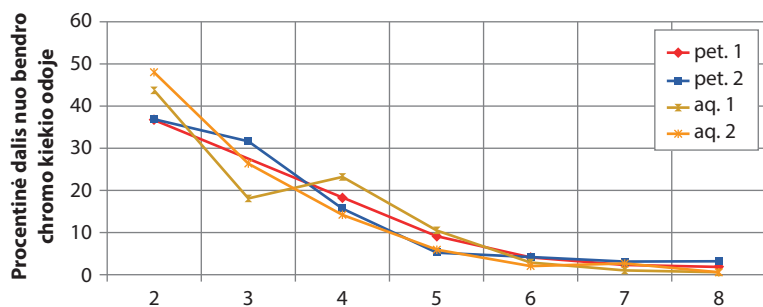
*maksimalus nustatytas kiekis mūsų tyrime. NR – nėra reguliavimo.

ir kalio dichromatui [5]. Tai rodo, kad įsijautrinimas šiems metalams galimai yra susijęs su profesija.

PIRŠTŲ MERKIMO MĒGINYS

Iš odos lopo tyrime dalyvavusių 135 darbuotojų 88 darbuotojai (50 darbininkų ir 38 administracijos darbuotojų) dar dalyvavo vadinamajame piršto merkimo mėginio eksperimente. Piršto merkimo mėginio metodas naudojamas norint aptikti ant paviršiaus esančias metalų liekanas, daleles. Palyginus su kitais metodais, pvz., kai mėginiai imami servetėle arba lipnia juosta, šis metodas yra techniškai paprastesnis, o rezultatai tikslūs ir patikimi. Buvo paimti 176 mėginiai nuo 88 dalyvių smiliaus ir nykščio. Šie mėginiai buvo ištirti induktyviai susietos plazmos masių spektrometru, bendradarbiaujant su Fizinių ir technologijos mokslų centro Branduolinių technologijų skyriaus mokslininkais (Vilnius, Lietuva). Nikelio buvo aptikta visuose mėginiuose, tačiau be statistinio reikšmingumo tarp darbovietės arba lyties. Didžiausi nikelio kiekiai buvo aptikti ant žaliavinės medžiagos operatorių (0,0174 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), vinių kaitintojų (0,0160 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$), informacinių technologijų skyriaus darbuotojų (0,0297 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) ir gamybos kontrolieriaus (0,0153 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) pirštų paviršiaus. Aptikto kobalto kiekio mediana statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp darbininkų ir administracijos darbuotojų (0,004 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ir 0,001 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, $p = 0,04$). Pirštų merkimo mėginio metu nustatyto chromo kiekio mediana statistiškai reikšmingai nesiskyrė tarp darbo vietų, tačiau pastebėta pokyčio tendencija tarp lyčių: 0,0013 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ vyrams ir 0,0007 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ moterims ($p = 0,06$). Šiame tyrime pirmą kartą pirštų merkimo metodas buvo pritaikytas kobaltui ir chromui ant pirštų paviršiaus aptikti.

Kontaktinė alergija nikeliiui yra dažnesnė nei bet kuriam kitam metalui. Europos Sąjungoje nikelio išsiskyrimas iš metalinių objektų, skirtų tiesiogiai ir ilgesnį laiką liestis su oda, yra ribojamas REACH direktyva iki < 0,5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ per savaitę į dirbtinį prakaitą ir iki 0,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ per savaitę bižuterijos papuošalams [6, 7]. Plačiai paplitusi klaidinga nuomonė, kad reglamentantas apima tik tokius daiktus, kaip papuošalai,



2 pav. Procentinis chromo kiekio pasiskirstymas odoje 30 μm pjūvyje skirtingame odos gylyje, neatsižvelgiant į likusį kiekį ant viršaus arba receptoriaus fazėje

Aq. – vanduo, Pet. – vazelinai. Skaičiai X skalėje žymi skirtingus sluoksnius: 2 – viršutinį ir 7,8 – apatinį sluoksnių.

diržų sagtys ir kt., kuriuos asmuo gali dėvėti. Tačiau įrankiams ir instrumentams, kurie liečiasi su oda ilgesnį laiką, taip pat yra taikoma REACH direktyva. Žinoma, kad dermatito, arba kitaip pažeisto vientiso odos barjero vietoje kontaktinio dermatito išsivystymo slenkstis yra žymiai mažesnis. Mūsų tyrime nustatytas nikelio kiekis ant pirštų paviršiaus (3 lentelė) jau įsijautrinusiam nikeliiui asmeniui gali sukelti odos uždegimą, alerginio kontaktinio dermatito simptomus. Daugelis metalo apdirbimo įmonės darbuotojų dirba be darbo apsaugos priemonių arba pirštinių, nuolat liedsdami metalo gaminius ir įvairius įrankius ir nesuprasdami įsijautrinimo rizikos. Taigi, prevencinis švietimas, aiškinant darbuotojams, kaip sumažinti alergijos riziką, labai svarbus ir, deja, kol kas nepakankamas.

Mūsų tyrime didžiausias kobalto kiekis buvo nustatytas ant vinių kaitintojų ir žaliavinės medžiagos operatorių pirštų paviršiaus. Panašius rezultatus paskelbė ir kiti autoriai, didžiausius kiekius nustatę ant metalo presavimo ir žaliavinės medžiagos operatorių pirštų. Šių profesijų darbuotojai dažniausiai kontaktuoja su neapdorotomis žaliavomis.

Chromas yra netirpus metalas, tačiau jo korozija dirbtiniame prakaito arba kitame skystyje pasireiškia įvairių druskų susidarymu ir taip padidina įjautrinančias savybes. Žinoma, kad šešiavalentės chromo druskos yra labiau tirpios ir įjautrinančios nei trivalentės. Chromo įjautrinimo galimybes tyrinėjo Menné su bendraautoriais, vėliau Bregnbak su bendraautoriais ir nustatė, kad chromo išsiskyrimas iš galutinio pro-

dukto turi neviršyti 0,02–0,05 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ [8, 9]. Tai yra saugi riba, labai sumažinanti įsijautrinimo chromui riziką. Šešiavalentis chromas turi didžiausią įtaką kontaktinės alergijos ir alerginio kontaktinio dermatito išsivystymui [9–11]. Mūsų tyrime chromo kiekis ant pirštų tarp administracijos darbuotojų ir darbininkų nesiskyrė. Daugiausia chromo aptikta ant žaliavinės medžiagos operatorių ir vinių kaitintojų pirštų paviršiaus. Tai patvirtina ir kitų autorių paskelbtus tyrimų duomenis, kuomet didžiausias chromo kiekis buvo nustatytas tiesioginį ir ilgalaikį kontaktą su metalo lydiniams turintiems darbuotojams [12].

METALŲ IŠSISKYRIMAS Į DIRBTINĮ PRAKAITĄ

Žinoma, kad jau sudirgintos odos ilgalaikis kontaktas su metalais gali sukelti alerginį kontaktinį dermatitą [13]. Todėl buvo atliktas eksperimentas, imituojantis ilgalaikį – paros ir savaitės trukmės – vielos ir vinių kontaktą su dirbtiniu prakaitu. Į dirbtinį prakaitą iš vielos ir vinių išsiskyrusių metalų (nikelio, kobalto ir chromo) kiekis buvo išmatuotas Lundo universiteto Profesinės ir aplinkos dermatologijos skyriaus laboratorijoje Skåne universiteto ligoninėje (Malmė, Švedija), naudojant atominės absorbcijos spektrometrą. Nikelio, kobalto ir chromo kiekio išsiskyrimas iš vinių, vielos ir žaliavinės medžiagos buvo matuotas praėjus 24 val. ir po septynių parų. Šis eksperimentas parodė, kad per savaitę iš vinių ir vielos į dirbtinį prakaitą išsiskyrusio nikelio kiekio padidėjimas yra statistiškai reikšmingas ($p = 0,04$). Visi tirti metalai (nikelis, chromas ir kobaltas) išsiskyrė iš tirtų objektų, kontaktuojant su dirbtiniu prakaitu, o vidutinis koncentracijos kiekis didėjo ilgėjant kontakto laikui. Tyrimo metu buvo aptiktas kobaltas, nors žaliavinės medžiagos specifikacijos dokumentuose kobaltas sudėtyje nebuvo nurodytas. Svarbu paminėti, kad vis dar nėra kobalto išsiskyrimą iš objektų, skirtų ilgesnį laiką tiesiogiai liestis su oda, reglamentuojančių teisės aktų.

CHROMO PENETRACIJA PER ODA NAUDOJANT SKIRTINGAS TERPES

Chromo druskos yra žinomos kaip įsijautrinimą sukkeliantis profesinio alerginio kontaktinio dermatito priežastinis veiksnys [9, 14]. Siekiant geriau suprasti chromo prasiskverbimo per odą ypatybes, buvo atliktas Franz tipo difuzinės celės eksperimentas, naudojant dvi skirtingas terpes (vazeliną ir vandenį) su chromo druskomis [15]. Eksperimentas atliktas Lundo universiteto Profesinės ir aplinkos dermatologijos skyriaus laboratorijoje Skåne universitetinė ligoninė (Malmė, Švedija), naudojant kiaulės ausies odą kaip žmogaus odos atitikmenį. Chromas buvo aptiktas abiejų terpių Franz tipo difuzinės celės recipientų fazėse. Chromo pasiskirstymas kiaulės ausies odos sluoksniuose mažai priklausė nuo naudotos terpės ir abiem atvejais buvo

panašus. Kiaulės odos donorinis paviršius po eksperimento buvo nuvalytas servetėle, siekiant išsiaiškinti, kiek chromo liko neprasisakverbusio. Chromo nebuvo aptikta ant servetėlės, kuria nuvalytas kiaulės odos, paveiktos vandenine terpe, paviršius. Tai rodo, kad servetėlių arba kiti odos paviršiaus tyrimo metodai, kai naudojamos vandeninės chromo druskos darbo aplinkoje, gali būti nepatikimi metodai paviršiui tirti.

Tyrimo nustatyta, kad chromas lengvai prasiskverbia naudojant tiek vazeliną, tiek vandeninę terpe, tačiau, naudojant vandeninę terpe, procesas vyksta greičiau. Tai patvirtina mūsų atlikto paviršiaus nuvalymo mėginio rezultatai, kuriuose chromo neaptikta. To ir galima buvo tikėtis, nes chromas vazelino pagrindo terpėje pasiskirstęs hidrofobinėje aplinkoje, todėl mažiau chromo jonų tiesiogiai kontaktuoja su odos paviršiumi, taip ribojamas chromo jonų kiekis, galintis prasiskverbti per odą. Eksperimente, naudojant vazelino pagrindo mėginį odos paviršiuje, buvo aptiktas nemažas (7–50 proc.) likutinis atominio chromo kiekis (2 pav.), o vandeninėje terpėje ištirpusios chromo druskos prasiskverbė per odą ir paviršiuje atominio chromo neaptikta. Panašius rezultatus gavo ir Gammelgaard su kolegomis per 160 val. trukusį eksperimentą, kai ant žmogaus odos buvo užtepta didesnės koncentracijos kalio dichromato druska ir taikytas lipnios juostelės metodas mėginiams nuo odos paviršiaus surinkti [16, 17].

Atlikdami eksperimentą akceptorinėje terpėje, aptikome didelį chromo kiekį nepriklausomai nuo pasirinktos terpės (vazelino ar vandens). Žinomi du pagrindiniai prasiskverbimo per odą keliai [18, 19]. Pirmas – transepiderminis kelias, kai medžiagos difunduoja per tarpląstelinius raginio sluoksnio tarpus arba ragines ląsteles; antras kelias vyksta per odos priedus, kai difuzija vyksta per plaukų folikulus, riebalines ir prakaito liaukas. Paprastai prasiskverbimas vyksta abiem keliais. Odos sritys, kuriose yra gausu plaukų folikulų (galva, pažastys ir kt.), labiau pralaidžios įvairioms cheminėms medžiagoms nei kitos, mažiau plaukuotos odos dalys [19, 20]. Be to, lipofilinės molekulės prasiskverbia į odą greitai, o hidrofilinės lėčiau. Tai gali paaiškinti, kodėl, naudojant chromo druskas vazelino pagrindo terpėje, odoje radome mažiau chromo, bet didesnę jo kiekį nustatėme receptoriniame skystyje. Tai reiškia, kad lipofilinėje terpėje chromas lengvai patenka į odą ir prasiskverbia per ją. Šie rezultatai gali reikšmingai pasitarnauti apskaičiuojant teorinį atominio chromo kiekį, kuris gali sukelti kontaktinę alergiją arba alerginio kontaktinio dermatito simptomus jau įsijautrinusiems asmenims. Atlikto eksperimento rezultatai rodo, kad toksikologiniai skaičiavimai, atliekami vandeniniams chromo druskų tirpalams, turėtų būti tikslesni nei lipofilinėms terpėms [17].

Minėtame eksperimente buvo naudota šaldyta

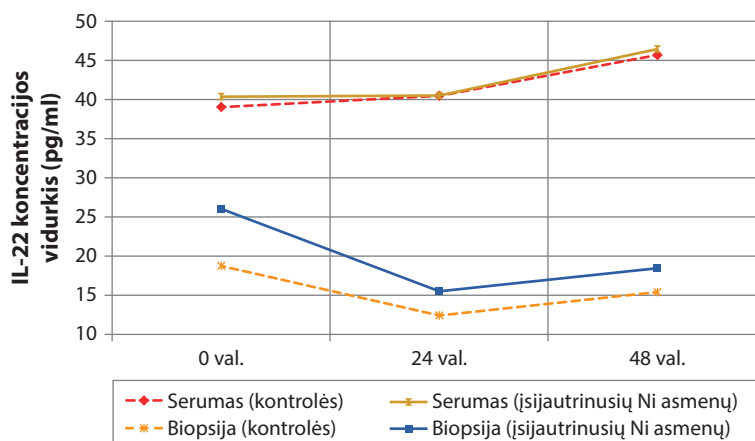
Disertacijos

kiaulės ausies oda. Yra tyrimų, kurie nagrinėjo šaldymo poveikio įtaką odos raginio sluoksnio vientisumui, tiriant įvairius medicininius prietaisus ir įrankius (pvz., chirurgines adatas) [21]. Tyrėjai, nagrinėję šalčio poveikį odos barjerinei funkcijai ir metaboliškai stabilių cheminių medžiagų prasiskverbimui per odą, nustatė, kad šaldymas barjerinei funkcijai įtakos neturėjo.

CITOKINAI ALERGINIO KONTAKTINIO DERMATITO PATOGENEZĖJE

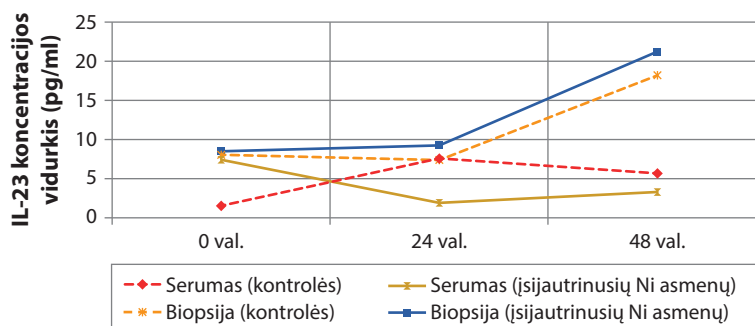
Alerginio kontaktinio dermatito mechanizmas aktyviai tyrinėjamas jau kelis dešimtmečius, tačiau pagrindiniai alerginio kontaktinio dermatito imunologiniai mechanizmai vis dar neaiškūs [22, 23]. Daugeliu atvejų iritacinis ir alerginis kontaktinis dermatitai yra kliniškai ir histologiškai panašūs, taip pat nebuvo nustatyta biožymenų, leidžiančių juos atskirti serologiškai [23]. Žinoma, kad po to, kai antigenas prasiskverbia į raginį odos sluoksnį, jis citotoksiškai veikia keratinocitus ir skatina juos išskirti signalines molekules – citokinus ir chemokinus. Siekiant geriau suprasti alerginio kontaktinio dermatito patogenezę, buvo tirta 10 savanorių: penki įsijautrinę nikeliui ir penki sveiki. Šių tiriamųjų buvo paprašyta eksperimento metu nevirtoti maisto, kuriame gausu nikelio, ir skardinėse konservuotų maisto produktų. Iš tiriamųjų tris kartus kas 24 val. buvo imami kraujo mėginiai, atliktos odos biopsijos ir naudojant „ELISA Invitrogen“ („Thermo Fisher Scientific“, „Bender MedSystems GmgH“, Viena, Austrija) rinkinius, kiekybiškai nustatyti žmogaus interferono γ (IFN γ), interleukino (IL) 1 α , IL-1 β , IL-9, IL-13, IL-17A, IL-22 ir IL-23 kiekiai. Šių citokinių pasirinkimą lėmė literatūroje aprašytas galimas jų vaidmuo kontaktinio dermatito patogenezėje. Dėl nedidelio mėginių kiekio biopsijose tirti IL-17A, IL-22 ir IL-23.

Šio tyrimo metu, praėjus 24 val. po odos lopo mėginių užklajavimo, visiems penkiems nikeliui alergiškiems tyrimo dalyviams nustatyta teigiama reakcija (1+) į nikelio sulfatą. Po 48 val. trims nikeliui įsijautrinusiems tiriamiesiems nustatyta 2+ teigiama reakcija ir dviem – 3+ teigiama reakcija. Visiems kontrolinės grupės tiriamiesiems nikelio sulfato mėginys buvo neigiamas. Visuose nikeliui alergiškų ir kontrolinės grupės tiriamųjų kraujo serumo mėginiuose neaptikta IL-1 β , IL-9 ir IL-13. IL-1 α , IL-17A ir IFN γ nustatyti visuose serumo mėginiuose, tačiau jų koncentracija buvo mažesnė nei 4 pg/ml. IL-17A koncentracija visose odos biopsijos mėginiuose buvo < 4 pg/ml,



3 pav. IL-22 koncentracijos vidurkis (pg/ml) serumo ir biopsijos mėginiuose

IL-22 – interleukinas 22, Ni – nikelis.



4 pav. IL-23 koncentracijos vidurkis (pg/ml) serumo ir biopsijos mėginiuose

IL-23 – interleukinas 23, Ni – nikelis.

nepriklausomai nuo mėginio paėmimo laiko. IL-22 ir IL-23 nustatyti didesniais kiekiais, lyginant su kitais interleukinais, tačiau statistiškai reikšmingo skirtumo tarp mėginio paėmimo laiko arba įsijautrinimo nikeliui nebuvo (3 ir 4 pav.).

Yra nemažai informacijos apie imunologinį alerginio kontaktinio dermatito mechanizmą, tačiau daugelis žinių grindžiamos pelių modeliais arba *in vitro* eksperimentais, todėl stinga *in vivo* tyrimų. Šio *in vivo* eksperimento metu pasirinkti tirti jau anksčiau kitų autorių minėti kaip galimi alerginio kontaktinio dermatito patogenezėje dalyvaujantys citokinai [24]. Šiame eksperimente nustatytas žemas IL-17A kiekis kraujo serume ir odos biopsinėje medžiagoje, nors priešingus rezultatus gavo Silvestre su kolegomis, kurie tyrė lėtinio dermatito pažeistos odos mėginius [25]. Šiuos skirtingus rezultatus padeda paaiškinti Schmidt ir kolegų atlikto tyrimo rezultatai, kuriuose didelis IL-17A kiekis nustatytas odos mėginiuose, pakartotinai paveiktuose kontaktinio alergeno [26]. Lygiai taip pat didelės IFN γ ir IL-1 β koncentracijos nustatytos tose buvusio dermatito vietose, kuriose oda buvo pakartotinai veikiamą kontaktinio alergeno [26, 27]. Keletas *in vitro* tyrimų, kai žmogaus keratinocitai ir periferinis kraujas buvo

stimuliuojami nikeliu, parodė IL-17 raišką nikelio paveiktose odos biopsinės medžiagos mėginiuose [28].

Nikeliui įsijautrinusių ir kontrolinės grupės tiriamųjų kraujo serume aptikome panašius IL-22 kiekius (3 pav.), tačiau galime išvelgti koncentracijos didėjimo tendenciją tarp įsijautrinusių nikeliui. *In vitro* eksperimentų, atliktų Larsen su kolegomis metu, nustatyta IL-22 raiška įjautrintos nikeliui ir nikeliu paveiktos odos be uždegimo mėginiuose [29]. Tai paaiškintų mūsų eksperimente gautus panašius įsijautrinusiųjų ir kontrolinės grupės rezultatus. Gali būti, kad IL-22 yra nespecifinis epidermio pažeidimo citokinas, nes jis minimas atopinio dermatito ir psoriazės patogenezės mechanizmuose [30].

Priešuždegiminis citokinas IL-23 yra IL-12 šeimos narys, kurį ekspresuoja T limfocitai ir natūralios žudikės (angl. *natural killer*, NK, ląstelės) [28, 31]. IL-23 svarbus Th17 limfocitų vystymuisi ir galimai dalyvauja alerginio kontaktinio dermatito patogenezėje. Jis būtinas IL-22 raiškai, Th17 limfocitų brendimui ir dauginimuisi. Atliktų *in vitro* tyrimų metų rasta padidėjusi IL-23 raiška, kuomet žmogaus keratinocitai buvo veikiami kontaktiniais alergenais [32]. Tai nustatome ir mūsų *in vivo* eksperimento biopsinės medžiagos mėginiuose (4 pav.). Tačiau nepastebėjome reikšmingo skirtumo tarp nikeliui įsijautrinusiųjų arba kontrolinės grupės asmenų mėginių, todėl tai gali būti ženklas, kad kaip ir IL-22, IL-23 nėra specifinis alerginiam kontaktiniam dermatitui ir yra nespecifinis epidermio pažeidimo citokinas.

Šiame eksperimente nustatėme mažą IFN γ kiekį kraujo serume praėjus 48 val., kai buvo užklijuotas mėginys su nikeliu kontrolinės grupės tiriamiesiems, bei radome kiek aukštesnę koncentraciją ir vieną netipinę vertę tarp nikeliui įsijautrinusių tiriamųjų. Atliekant eksperimentus ir naudojant imunohistocheminį metodą, Ulfgren su kolegomis taip pat neaptiko IFN γ nikeliu paveiktos odos biopsiniuose mėginiuose tarp įjautrintos nikeliui ir kontrolinės grupės mėginiuose per 6–72 val. nuo eksperimento pradžios [33]. Silvestre su kolegomis, tyrinėję lėtinio dermatito pažeistos odos biopsijos mėginius, nustatė didelius IFN γ kiekius [25]. Žinoma, kad IFN γ gaminamas, dirginant pažeistus keratinocitus, jis aktyvina uždegimines ląsteles iritacinio ir alerginio kontaktinių dermatitų atvejais. Tokią tendenciją galima išvelgti ir mūsų atlikto eksperimento atveju, atkreipiant dėmesį į kontrolinės grupės mėginius, praėjus 48 val. nuo eksperimento pradžios.

Daug dėmesio IL-1 tyrimams skyrė Bonfeld su kolegomis, kurie pradžioje tyrimus atliko su pelėmis, vėliau ir žmonėmis [34]. Yra tyrimų, kuriuose stebėtas IL-1 β koncentracijos padidėjimas alerginio kontaktinio dermatito metu ūminėje fazėje [35, 36]. Nustatyta, kad blokuojant IL-1 β , mažėja atsakas į kontaktinius alergenų. Mūsų tyrimo metu kraujo serumo mėginiuose

nenustatėme IL-1 α ir IL-1 β reikšmingos raiškos trimis skirtingais laikotarpiais tiek nikeliui įsijautrinusiems, tiek kontrolinės grupės tiriamiesiems. IL-1 šeima yra susijusi su įgimtu imuninių atsaku, kuris svarbus ūminiu ir lėtiniu uždegimo laikotarpiu. Rustemeyeris su kolegomis nustatė IL-1 α ir IL-1 β koncentracijos padidėjimą praėjus 6 val. po odos lopo mėginio užklijuvimo, todėl tikėtina, kad, praėjus 24 val., kai paėmėme biopsiją ir kraujo mėginius, šie interleukinai nebeišskiriami [37]. Schmidt ir kolegų eksperimento metu ta pati odos vieta, praėjus 21 dienai, pakartotinai buvo paveikta nikelio sulfatu. Tuomet išmatavę IL-1 β ir IL-17 koncentracijas, autoriai nustatė jų padidėjimą [26].

Šio darbo eksperimente IL-9 tirtas kraujo serumo mėginiuose trimis skirtingais laiko momentais. IL-9 kiekis buvo neišmatuojamas tiek nikeliui įsijautrinusių, tiek kontrolinės grupės tiriamųjų kraujo serumuose. Todėl, vertinant šuos rezultatus, darome prielaidą kad ūminio odos uždegimo metu galimas lokalus IL-9 padidėjimas be sisteminio šio citokino poveikio.

IL-13 yra vienas iš pagrindinių citokinių, tiesiogiai ir netiesiogiai reguliuojantis genus, susijusius su įgimta odos barjerine funkcija [31]. Mūsų tyrimo metu kraujo serume buvo neišmatuojamas IL-13 kiekis tiek nikeliui alergiškų, tiek kontrolinės grupės tiriamųjų asmenų mėginiuose. Tačiau Silvestre su kolegomis nustatė didesnius IL-13 kiekius lėtinės egzemos odos biopsijos mėginiuose nei ūminės egzemos pacientų mėginiuose. Mūsų gauti rezultatai kitokie greičiausiai dėl skirtingos tiriamosios medžiagos, t. y. atliktas periferinio kraujo mėginio tyrimas, bei mėginių ėmimo laiko, nes mūsų tyrimo tikslas buvo imunologiniai įvykiai per 48 val. nuo mėginio užklijuvimo, kai vystosi alerginis kontaktinis dermatitas.

Šis eksperimentas turi kelis trūkumus. Pirmiausia, tyrime dalyvavo nedidelis tiriamųjų skaičius. Buvo tirti tik kai kurie citokinai, kurių pasirinkimas buvo pagrįstas literatūros duomenimis. Tyrimo tikslas buvo nagrinėti pirmąsias 48 efektorinės alerginio kontaktinio dermatito fazės valandas odoje, kuri prieš tai neturėjo kontakto su tiriamu kontaktiniu alergenu bei nebuvo pažeista lėtinio uždegimo. Taigi, viena vertus, mūsų rezultatams gali turėti mažiau įtakos kiti veiksniai, tačiau realiame gyvenime tikriausiai sąveika tarp skirtingų ekspozicijų ir pradinės odos barjerinės funkcijos būklės gali turėti įtakos alerginio kontaktinio dermatito išsivystymui. ELISA metodas citokinių analizei buvo pasirinktas dėl didelio jautrumo ir specifiškumo, plataus analitinio diapazono ir patvirtinto rezultatų kartotinumų, nors sudėtingesnė proteominė analizė galėtų suteikti platesnį vaizdą apie uždegiminių procesus. Nepaisant minėtų trūkumų, atlikto eksperimento rezultatai patvirtino iritacinio ir alerginio kontaktinio dermatito panašumus.

Disertacijos

APIBENDRINIMAS

- Jaunesni nei 40 metų amžiaus metalo apdirbimo įmonės darbuotojai dažniau skundėsi odos sutrikimais nei vyresni. Įsijautrinimas kobaltui tarp darbininkų buvo labiau paplitęs nei bendrojoje populiacijoje arba dermatitu sergančių pacientų, galbūt, tai atspindi padidėjusį profesinį poveikį. Vis dar reikalingas darbuotojų švietimas odos saugos ir apsauginių priemonių naudojimo tema.
- Iš vinių ir vielos skirtingomis koncentracijomis gali išsiskirti nikelis, kobaltas ir chromas. Aptikti nikelio ir chromo kiekiai gali sukelti alerginį kontaktinį dermatitą jau įsijautrinusiems darbuotojams. Todėl darbo vietoje reikia imtis prevencinių priemonių. Kobalto gali būti lydiniuose, net jei jis nepaminėtas žaliavinės medžiagos dokumentuose, todėl bent jau teoriškai tai gali būti dermatito rizikos veiksnys, kai oda pažeista.
- Pirštų merkimo metodas buvo naudojamas kobaltui ir chromui aptikti ant pirštų pirmą kartą. Panašu, kad tai paprastas ir patikimas metodas. Tačiau, norint tai pagrįsti, reikia atlikti daugiau tyrimų, kad šis metodas galėtų būti alternatyva tiriant kitų metalų poveikį odai standartizuotomis eksperimentinėmis sąlygomis tiek bendroje, tiek darbo aplinkoje.
- Chromo pasiskirstymas odoje yra panašus naudojant vazeliną ir vandenį, tačiau, naudojant vazeliną, odoje nustatyta chromo koncentracija buvo beveik du kartus mažesnė, lyginant su vandeniniu mėginiu. Reikia daugiau tyrimų su daugiau mėginių, kad būtų galima nustatyti, kuris nešiklis duotų nuoseklesnius rezultatus. Tam tikrose profesijose, kuriose vandens tirpaluose naudojamos chromo druskos, mėginių ėmimas rūgštine servetėle arba pirštų merkimo mėginiu gali būti netikslus, nes paviršiuje chromo neaptikta (visas pateko į odą arba ją praėjo). Nepaisant to, abu nešikliai yra tinkami odos lopo mėginiam, nes chromas buvo aptiktas odoje.
- Šiame tyrime pateikiami duomenys apie pasirinktus citokinus, svarbius kontaktinei alergijai, ir jų vaidmenį ankstyvuosiuose uždegiminiuose procesuose. Norint geriau suprasti pagrindinius mechanizmus, reikia atlikti daugiau realaus gyvenimo ir eksperimentinių tyrimų.

STRAIPSNIAI, KURIOSE PASKELBTI DISERTACIJOS REZULTATAI

1. **Linauskienė K, Malinauskienė L, Blažienė A.** Metals are important contact sensitizers: an experience from Lithuania. *Biomed Res Int.* 2017;2017:3964045.
2. **Linauskiene K, Isaksson M, Malinauskiene L.** Heavy metals and the skin: Sensitization patterns in Lithuanian metalworkers. *Contact Dermatitis.* 2020;83(6):450–7.
3. **Linauskiene K, Dahlin J, Ezerinskis Z, Isaksson M, Sapolaite J, Malinauskiene L.** Occupational exposure to nickel, cobalt,

and chromium in the Lithuanian hard metal industry. *Contact Dermatitis.* 2021;84(4):247–53.

4. **Linauskiene K, Dahlin J, Ezerinskis Z, Isaksson M, Sapolaite J, Malinauskiene L.** The penetration of chromium: an up-to-date 0.5% potassium dichromate vehicle comparison. *Dermatitis.* 2021 – Volume – Issue –.

LITERATŪRA

1. **Mirabelli MC, Zock JP, Bircher AJ, Jarvis D, Keidel D, Kromhout H, et al.** Metalworking exposures and persistent skin symptoms in the ECRHS II and SAPALDIA 2 cohorts. *Contact Dermatitis.* 2009;60(5):256–63.
2. **Bock M, Schmidt A, Bruckner T, Diepgen TL.** Occupational skin disease in the construction industry. *Br J Dermatol.* 2003;149(6):1165–71.
3. **Geier J, Lessmann H, Schnuch A, Uter W.** Contact sensitizations in metalworkers with occupational dermatitis exposed to water-based metalworking fluids: results of the research project “FaSt”. *Int Arch Occup Environ Health.* 2004;77(8):543–51.
4. **Gruvberger B, Isaksson M, Frick M, Pontén A, Bruze M.** Occupational dermatoses in a metalworking plant. *Contact Dermatitis.* 2003;48(2):80–6.
5. **Schuttelaar MLA, Ofenloch RF, Bruze M, Cazzaniga S, Elners P, Gonçalo M, et al.** Prevalence of contact allergy to metals in the European general population with a focus on nickel and piercings: The EDEN Fragrance Study. *Contact Dermatitis.* 2018;79(1):1–9.
6. **Lidén, C, Bruze M, Thyssen JP, Menne T.** Metals. In: *Johansen SD, Frosch PJ, Lepoittevin JP.* *Contact Dermatitis.* 2011, Springer-Verlag Heidelberg: Heidelberg, Germany: 644–62.
7. (ECHA) European Chemicals Agency. *Prolonged Contact with the Skin—Definition Building for Nickel.* 2014. Helsinki. Finland.
8. **Bregnbak D, Thyssen JP, Jellesen MS, Zachariae C, Johansen JD.** Experimental skin deposition of chromium on the hands following handling of samples of leather and metal. *Contact Dermatitis.* 2016;75(2):89–95.
9. **Bregnbak D, Johansen JD, Jellesen MS, Zachariae C, Menné T, Thyssen JP.** Chromium allergy and dermatitis: prevalence and main findings. *Contact Dermatitis.* 2015;73(5):261–80.
10. **Wahlberg JE.** Percutaneous absorption of trivalent and hexavalent chromium (51Cr) through excised human and guinea pig skin. *Dermatologica.* 1970;141(4):288–96.
11. **Hansen MB, Johansen JD, Menné T.** Chromium allergy: significance of both Cr(III) and Cr(VI). *Contact Dermatitis.* 2003;49(4):206–12.
12. **Julander A, Skare L, Mulder M, Grandér M, Vahter M, Lidén C.** Skin deposition of nickel, cobalt, and chromium in production of gas turbines and space propulsion components. *Ann Occup Hyg.* 2010;54(3):340–50.
13. **Novak-Bilić G, Vučić M, Japundžić I, Meštrović-Štefekov J, Stanić-Duktaj S, Lugović-Mihić L.** Irritant and allergic contact dermatitis – skin lesion characteristics. *Acta Clin Croat.* 2018;57(4):713–20.
14. **Uter W, Larese Filon F, Rui F, Balato A, Wilkinson M, Kręćisz B, et al.** ESSCA results with nickel, cobalt and chromium, 2009–2012. *Contact Dermatitis.* 2016;75(2):117–21.
15. **Franz TJ.** Percutaneous absorption on the relevance of in vitro data. *J Invest Dermatol.* 1975;64(3):190–5.
16. **Gammelgaard B, Fullerton A, Avnstorp C, Menné T.** In vitro evaluation of water and petrolatum as vehicles in chromate patch testing. *Contact Dermatitis.* 1992;27(5):317–8.
17. **Gammelgaard B, Fullerton A, Avnstorp C, Menné T.** Permeation of chromium salts through human skin in vitro. *Contact Dermatitis.* 1992;27(5):302–10.
18. **Berard F, Marty JP, Nicolas JF.** Allergen penetration through the skin. *Eur J Dermatol.* 2003;13(4):324–30.
19. **Supe S, Takudage P.** Methods for evaluating penetration of drug into the skin: A review. *Skin Res Technol.* 2021;27(3):299–308.
20. **Schaefer H, Lademann J.** The role of follicular penetration. A differential view. *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* 2001;14:23–7.
21. **Ranamukhaarachchi SA, Lehnert S, Ranamukhaarachchi SL, Sprenger L, Schneider T, Mansoor I, et al.** A micromechanical comparison of human and porcine skin before and after preservation by freezing for medical device development. *Sci Rep.* 2016;6:32074.

22. **Scheinman PL, Vocanson M, Thyssen JP, Johansen JD, Nixon RL, Dear K, et al.** Contact dermatitis. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7(1):38.
23. **Brites GS, Ferreira I, Sebastião AI, Silva A, Carrascal M, Neves BM, et al.** Allergic contact dermatitis: From pathophysiology to development of new preventive strategies. *Pharmacol Res*. 2020;162:105282.
24. **Levin CY, Maibach H.** Irritant contact dermatitis: is there an immunologic component? *Int Immunopharmacol*. 2002;2:193–9.
25. **Silvestre MC, Reis VMSD.** Evaluation of the profile of inflammatory cytokines, through immunohistochemistry, in the skin of patients with allergic contact dermatitis to nickel in the acute and chronic phases. *An Bras Dermatol*. 2018;93(6):829–35.
26. **Schmidt JD, Ahlström MG, Johansen JD, Dyring-Andersen B, Agerbeck C, Nielsen MM, et al.** Rapid allergen-induced interleukin-17 and interferon- γ secretion by skin-resident memory CD8⁺ T cells. *Contact Dermatitis*. 2017;76(4):218–27.
27. **Kim MK, Kim KB, Yoon K, Kacew S, Kim HS, Lee BM.** IL-1 α and IL-1 β as alternative biomarkers for risk assessment and the prediction of skin sensitization potency. *J Toxicol Environ Health A*. 2018;81(17):830–43.
28. **Topal FA, Zuberbier T, Makris MP, Hofmann M.** The role of IL-17, IL-23 and IL-31, IL-33 in allergic skin diseases. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2020;20(4):367–73.
29. **Larsen JM, Bonfeld CM, Poulsen SS, Geisler C, Skov L.** IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2009;123(2):486–92.
30. **Ma HL, Liang S, Li J, Napierata L, Brown T, Benoit S, et al.** IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest*. 2008;118(2):597–607.
31. **Akdis M, Aab A, Altunbulakli C, Azkur K, Costa RA, Cramer R, et al.** Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases. *J Allergy Clin Immunol*. 2016;138(4):984–1010.
32. **Schmidt-Weber CB, Akdis M, Akdis CA.** TH17 cells in the big picture of immunology. *J Allergy Clin Immunol*. 2007;120(2):247–54.
33. **Ulfgren AK, Klareskog L, Lindberg M.** An immunohistochemical analysis of cytokine expression in allergic and irritant contact dermatitis. *Acta Derm Venereol*. 2000;80(3):167–70.
34. **Yeung K, Mraz V, Geisler C, Skov L, Bonfeld CM.** The role of interleukin-1 β in the immune response to contact allergens. *Contact Dermatitis*. 2021;85(4):387–97.
35. **Mattii M, Ayala F, Balato N, Filotico R, Lembo S, Schiattarella M, et al.** The balance between pro- and anti-inflammatory cytokines is crucial in human allergic contact dermatitis pathogenesis: the role of IL-1 family members. *Exp Dermatol*. 2013;22(12):813–9.
36. **Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, et al.** Activation of the IL-1 β -processing inflammasome is involved in contact hypersensitivity. *J Invest Dermatol*. 2007;127(8):1956–63.
37. **Peiser M, Tralau T, Heidler, Api AM, Arts JH, Basketter DA, J et al.** Allergic contact dermatitis: epidemiology, molecular mechanisms, in vitro methods and regulatory aspects. Current knowledge assembled at an international workshop at BfR, Germany. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69(5):763–81.
38. **Banfield CC, Basketter DA, Powell SM.** Cutaneous reactivity of the hands in nickel-sensitive patients with hand eczema. *Contact Dermatitis*. 1998;38(6):316–8.
39. **Fischer LA, Johansen JD, Menné T.** Nickel allergy: relationship between patch test and repeated open application test thresholds. *Br J Dermatol*. 2007;157(4):723–9.
40. **Fischer LA, Johansen JD, Voelund A, Lidén C, Julander A, Midander K, et al.** Elicitation threshold of cobalt chloride: analysis of patch test dose-response studies. *Contact Dermatitis*. 2016;74(2):105–9.
41. **Allenby CF, Basketter DA.** Minimum eliciting patch test concentrations of cobalt. *Contact Dermatitis*. 1989;20(3):185–90.
42. **Basketter DA, Angelini G, Ingber A, Kern PS, Menné T.** Nickel, chromium and cobalt in consumer products: revisiting safe levels in the new millennium. *Contact Dermatitis*. 2003;49(1):1–7.