UNIVERZITA KARLOVA

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra Farmakologie a toxikologie

PŘÍPRAVA NOVÉ METODIKY PRO SCREENING CHELÁTORŮ KOBALTU

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Hradec Králové 2020

Monika Moravcová

Prohlašuji, že tato práce je mým původním autorským dílem. Veškerá literatura a další zdroje, z nichž jsem při zpracování čerpala, jsou uvedeny v seznamu použité literatury a v práci řádně citovány. Tato práce nebyla použita k získání jiného či stejného titulu.

V Hradci Králové dne

Monika Moravcová

Ráda bych na tomto místě poděkovala doc. PharmDr. Přemyslu Mladěnkovi, Ph.D. za odborné konzultace, cenné připomínky a věnovaný čas. Zároveň bych chtěla poděkovat svým blízkým za veškeré rady, podporu a trpělivost.

ABSTRAKT

Univerzita Karlova

Farmaceutická fakulta v Hradci Králové

Katedra farmakologie a toxikologie

Studentka: Monika Moravcová

Školitel: doc. PharmDr. Přemysl Mladěnka, Ph.D.

Název diplomové práce: Příprava nové metodiky pro screening chelátorů kobaltu

Kobalt jakožto součást vitaminu B_{12}, je nezbytným mikronutrientem pro živé organismy včetně lidí. Jeho přebytek je však spojen s patologickými stavy. Otrava kobaltem může být způsobena například vystavením kovovému prachu kobaltu během výroby těžkých kovů nebo následkem koroze kovových endoprotéz kyčle. U pacientů intoxikovaných kobaltem se může vyvinout řada projevů včetně neurologického poškození, hypotyreózy nebo kardiomyopatie.

Cílem této práce je připravit standardizovaný, rychlý, levný, ale přesný způsob screeningu chelátorů kobaltu. Pro tento účel byla použita spektrofotometrická detekce pomocí disodné soli kyseliny 1-nitroso-2-nafthol-3,6-disulfonové jako indikátoru. Nejprve bylo zjištěno, že přidáním kobaltových iontů dojde k jasnému bathochromnímu posunu maximální absorbance indikátoru. Vztah mezi absorbancí a koncentrací kobaltu byl vysoce lineární od 470 do 560 nm při všech 4 testovaných podmínkách pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Citlivost metody byla 500 nM při pH 4,5 a při vyšších pH byla metoda ještě více senzitivní. Byla také zjištěna dlouhodobá stabilita reagencií. Na závěr byla metodika prověřena na známých chelátorech. EDTA chelatovala ionty Co^{2+} s pravděpodobnou stechiometrií 3:2. 8-hydroxychinolin a jeho derivát nitroxolin byly také poměrně silnými chelátory, zatímco kvercetin nevykázal žádnou chelataci a baikalein byl pouze relativně slabým chelátorem.

Závěrem lze říct, že byla vyvinuta kompetitivní metoda pro screening chelatace kobaltu. Tento postup, pokud je mi známo, nebyl dosud k dispozici.

ABSTRACT

Charles University
Faculty of Pharmacy in Hradec Králové
Department of Pharmacology & Toxicology
Student: Monika Moravcová
Supervisor: Assoc. Prof. Přemysl Mladěnka, Pharm.D., Ph.D.
Title of thesis: Preparation of a Novel Method for Screening of Cobalt Chelators

Cobalt as a structural part of the vitamin B_{12} is an essential microelement for living organisms including humans. However, its excess is associated with pathological conditions. Cobalt poisoning can be caused for example by exposure to cobalt metal dust during the production of hard metals or follow the corrosion of metal hip prosthesis. Patients intoxicated by cobalt can develop different manifestations including neurological impairment, hypothyroidism or cardiomyopathy.

The aim of this work is to prepare a standardized, rapid, cheap but precise method for the screening of cobalt chelators. For this purpose, spectrophotometric detection using 1-nitroso-2-nafphhol-3,6-disulfonic acid disodium salt as the indicator was used. Firstly, it was found that the addition of cobalt ions led to a clear bathochromic shift of the maximum absorbance of the indicator. The relationship between the absorbance and cobalt concentration was highly linear from 470 to 560 nm at all 4 tested pH conditions (4.5, 5.5, 6.8 and 7.5). The sensitivity of the method was 500 nM at pH 4.5 and the method was even more sensitive at higher pH conditions. Long-term stability of the reagents was also documented. Finally, the methodology was tested on known chelators. EDTA chelated Co^{2+} ions with a probable stoichiometry of 3:2. 8-hydroxyquinoline and its derivative nitroxoline were also relatively strong chelators, while quercetin showed no chelation and baicalein was only a relatively weak chelator.

In conclusion, a competitive method for screening of cobalt chelation was developed. This approach, as far as I know, has not been available previously.

OBSAH

1. Seznam zkratek 1
2. Úvod 2
3. Teoretická část 3
3.1 Farmakokinetika kobaltu 3
3.2 Oxidační stres 7
3.3 Intoxikace kobaltem 9
3.4 Chelatační terapie 11
3.5 Zkoumané chelátory 12
3.5.1 EDTA 12
3.5.2 8-hydroxychinoliny 12
3.5.3 Flavonoidy 13
4. Cíl práce 14
5. Experimentální část 15
5.1 Materiál 15
5.1.1 Chemikálie 15
5.1.2 Přístroje a pomůcky 17
5.2 Metodika pro výběr vhodného indikátoru Co^{2+} 17
5.2.1 Příprava základních roztoků 17
5.2.2 Příprava pracovních roztoků 18
5.2.3 Experimentální stanovení vhodného indikátoru 18
5.3 Metodika pro nalezení vhodné vlnové délky pro měření 19
5.3.1 Příprava základních roztoků 19
5.3.2 Příprava pracovních roztoků 19
5.3.3 Experimentální stanovení vhodné vlnové délky pro měření. 20
5.4 Metodika pro stanovení citlivosti indikátoru 21
5.4.1 Příprava základních roztoků 21

5.4.2 Příprava pracovních roztoků 21
5.4.3 Experimentální stanovení citlivosti indikátoru 21
5.5 Metodika pro posouzení stability činidel 22
5.5.1 Příprava základních roztoků 22
5.5.2 Příprava pracovních roztoků 23
5.5.3 Experimentální ověření stability činidel 23
6. Výsledky 25
6.1 Výběr vhodného indikátoru Co^{2+} 25
6.2 Nalezení vhodné vlnové délky pro měření 26
6.3 Stanovení citlivosti indikátoru 29
6.4 Posouzení stability činidel 31
6.5 Testování potenciálních chelátorů kobaltu 34
7. Diskuse 40
8. Závěr 43
9. Literatura 44

1. SEZNAM ZKRATEK

8HQ – 8-hydroxychinolin

DMSO – dimethylsulfoxid

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

HEPES – kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová

Na_2EDTA – disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové

Na_2NFDSA – disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové

NaHEPES – sodná sůl kyseliny 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonové

NFDSA – kyselina 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonová

ROS – reaktivní formy kyslíku

SOD – superoxid dismutáza

2. ÚVOD

Kobalt je stopovým prvkem přítomným v lidském těle jako součást vitamínu B_{12} v množství okolo 1 mg. Jeho nedostatek může vést až k perniciózní anémii. Na druhou stranu, vyšší hladiny kobaltu jsou pro organismus toxické a mohou vyústit i v otravu, která se projevuje od kožních poruch, polycytémie a hypotyreózy, až po toxicitu CNS (ztráta sluchu a zraku) a kardiomyopatii *(Leyssens et al. 2017, Packer 2016, Paustenbach et al. 2013)*.

Chlorid kobaltnatý byl dříve používán k léčbě anémie, ale jeho současné použití je omezeno na doplňky stravy, radiodiagnostiku a částečně pro homeopatii. Stále se zneužívá jako doping pro vyvolání erytropoézy, což je alternativa ke krevnímu dopingu *(Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013)*.

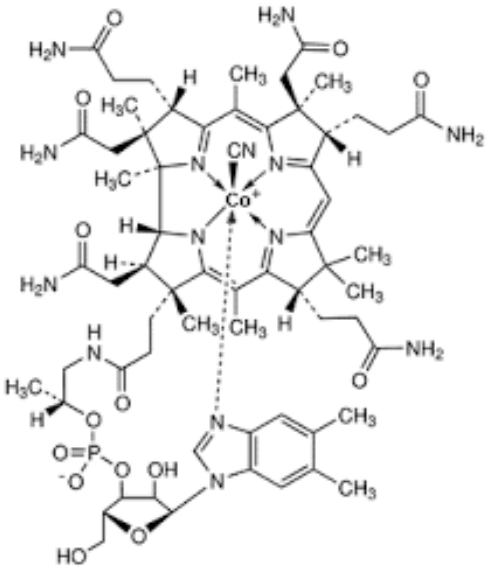
Kobalt se dále používá v kloubních protézách a zubních implantátech, ze kterých může být uvolněn *(Fox et al. 2016, Leyssens et al. 2017, Packer 2016, Paustenbach et al. 2013, Pelclova et al. 2012)*. Jsou zdokumentovány i potenciálně fatální případy uvolňování kobaltu z hlavy endoprotéz kyčle *(Fox et al. 2016, Pelclova et al. 2012)*. K otravám kobaltem však může dojít i v průmyslu, např. kovovým prachem kobaltu při zpracování těžkých kovů společně s karbidem wolframu *(Leyssens et al. 2017)*.

Ačkoliv se intoxikace kobaltem jeví jako potenciálně reversibilní, exkrece kobaltu z lidského těla je příliš pomalá – během prvních 24 hodin se eliminuje asi 20% kobaltu, zbytek se váže na tkáně a albumin a pomalu se vylučuje s eliminačním poločasem v rozmezí od 6 do 800 dnů *(Paustenbach et al. 2013, Tvermoes et al. 2013)*. Odstranění kobaltu chelatačními látkami je považováno za logickou první linii léčby. Klinicky se při intoxikaci kobaltem používá několik neselektivních chelatačních látek *(Pelclova et al. 2012, Pazzaglia et al. 2011)*, neexistuje však žádná studie ukazující na jednoznačné urychlení eliminace kobaltu chelátory. Navíc, jak je známo, není žádná dostupná metoda pro rychlé a jednoduché analytické testování chelátorů kobaltu *(Leyssens et al. 2017)*. A cílem mé diplomové práce je právě příprava nové metody screeningu chelátorů kobaltu.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 FARMAKOKINETIKA KOBALTU

Kobalt jakožto centrální atom v molekule vitaminu B_{12}, kyanokobalaminu (**Obr. 1**), je nezbytným stopovým prvkem potřebným k tvorbě červených krvinek. Jak poukazuje *Morrison a Campbell (1963)*, vitamin B_{12} je pro člověka esenciální – nedokážeme si ho sami syntetizovat jako přežvýkavci z anorganického kobaltu. Jeho doporučená denní dávka pro dospělého člověka je 2,4 µg, z čehož 0,1 µg je tvořeno kobaltem. Kobalt se však nedostává do těla pouze jako součást vitaminu B_{12}, i samotný kobalt se může vyskytovat v potravinách, potravních doplňcích, ale kromě gastrointestinálního traktu může do těla proniknout přes kůži, inhalačně, nebo se uvolnit z implantátů *(Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013)*.



Obr. 1 – Strukturní vzorec vitaminu B_{12} (kyanokobalaminu)

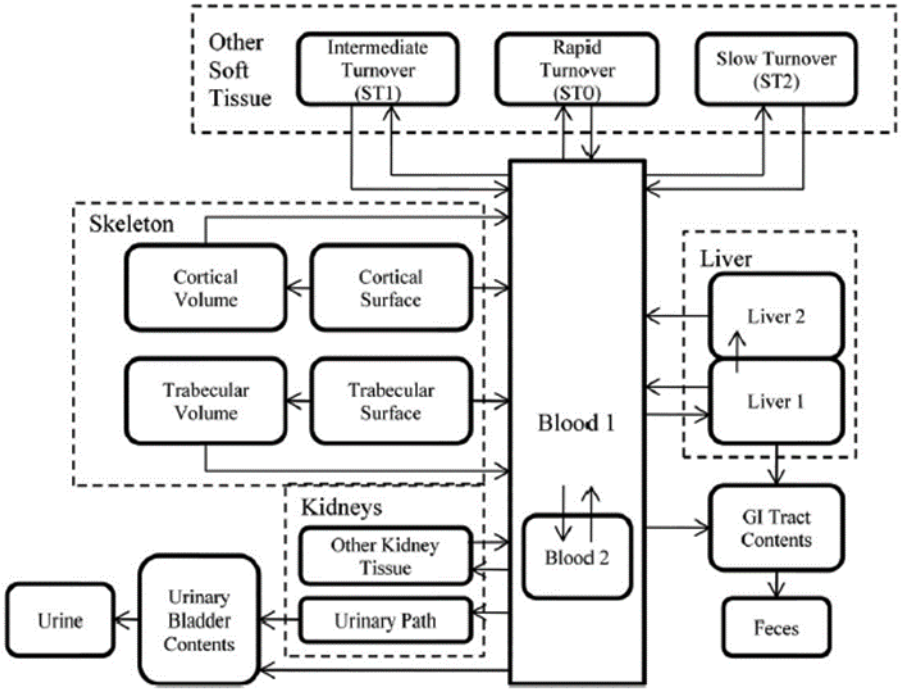
V běžné populaci je za zdroj kobaltu považována především potrava. Stovky potravinových produktů obsahují kobalt v různém množství. Nejvyšší průměrná koncentrace kobaltu byla nalezena v čokoládě, másle, kávě, rybách, ořechách, zelené listové zelenině a čerstvých obilovinách. Zdroji vitaminu B_{12} jsou především masné a mléčné výrobky. Stopové prvky obsažené v potravinách

včetně kobaltu, však mohou mít původ ve znečištěném životním prostředí (průmyslová i jiná antropogenní znečištění půdy, vody apod.), nebo v procesu zpracování a balení potravin. Kobalt, stejně jako vitamin B_{12}, lze suplementovat potravními doplňky. Užívání kobaltu bylo v minulosti doporučováno některými homeopatickými lékaři např. pro korekci nadměrného vylučování estrogenu, které se nejednou objevilo u žen podstupujících hormonální substituční terapii. Sloučeniny kobaltu mohou do těla proniknout mimo jiné i inhalační cestou, uvolnit se z implantátu, či prostoupit do kůže a způsobit zde lokální reakce *(Leyssens et al. 2017, Paustenbach et al. 2013)*.

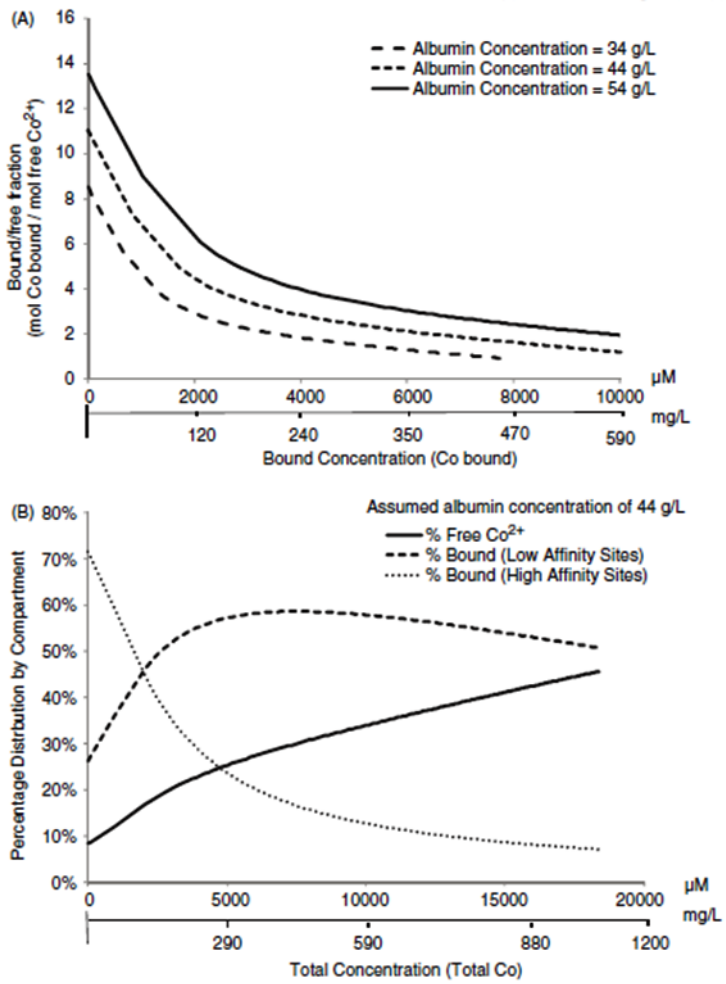
Gastrointestinální absorpce kobaltu u lidí je dle studie *Tvermoes et al. (2013)* přibližně 25% požité dávky, ale interindividuální rozdíl je zde značný (5-97%) – závisí na několika faktorech: přijímaná dávka, typ a především rozpustnost sloučeniny kobaltu a nutriční stav jedince (např. nedostatek železa zvyšuje absorpci kobaltu). Dále taktéž záleží na tom, zda je kobalt přijímán isolovaně na lačno nebo s potravou, případně s doplňky stravy a léčivy, např. množství vstřebaného kobaltu je sníženo podáváním společně s aminokyselinami *(Paustenbach et al. 2013)*. Zdá se, že mechanismus gastrointestinální absorpce kobaltu spočívá v saturovatelném procesu v proximálním jejunu, kobalt se začíná ze střeva vstřebávat prostupem kobaltu přes mukózu a následně přenosem z enterocytů do krevního řečiště. Kobalt a železo pravděpodobně sdílí podobný mechanismus gastrointestinální absorpce, proto lidé s nedostatkem železa, anémií nebo zvýšenými nároky na železo vykazují vyšší podíl vstřebaného kobaltu *(Leyssens et al. 2017)*. Protože ionty Co^{2+} a Fe^{2+} jsou si průměrem atomu i valenčními vlastnostmi velmi podobné, mohou o různá vazebná místa biomolekul „soutěžit“ – kompetice např. probíhá na transportéru dvojmocného železa (DMT1 – divalent metal transporter 1) *(Paustenbach et al. 2013)*.

U lidí je kobalt z krve distribuován především do jater, ledvin, srdce a sleziny, v menší míře ho lze nalézt i v kostech, vlasech, lymfě, mozku a slinivce břišní (**Obr. 2**). Co^{2+} se v krvi váže na albumin a α_2-makroglobulin, ale i na jiné krevní proteiny, např. na haptoglobin, který slouží jako přenašeč volného hemoglobinu, dále se může vázat i na lipoproteiny. Co^{3+} je schopen se navázat na transferin a zabránit tak navázání železa *(Paustenbach et al. 2013)*. Takto

vázaný kobalt je biologicky méně dostupný – nepřechází do tkání. Pouze volné kationy kobaltu mohou prostoupit z krve do okolních tkání a kumulovat se zde. Část kobaltu je v krvi rovněž transportována do červených krvinek transportním mechanismem pro vápník a ireversibilně se zde váže na hemoglobin. Životnost lidských červených krvinek u normálního jedince je asi 120 dnů, po tuto dobu zde kobalt může být vázán, a je tak zpomalena jeho eliminace z plné krve *(Finley et al. 2013)*. Hladina volného kobaltu v krvi záleží na jeho celkové hladině v lidském těle (**Obr. 3**) *(Paustenbach et al. 2013)*.



Obr. 2 – Model pro distribuci anorganického kobaltu v lidském těle: Model ukazuje sekreci Co z různých tělních kompartmentů a jeho exkreci za předpokladu kinetiky prvního řádu. Převzato z Paustenbach et al. (2013).



Obr. 3 – Grafy predikující vázanou a volnou frakci Co^{2+}: A: Poměr vázané/volné frakce Co pro tři různé hladiny albuminu (34, 44 a 54 g/l); **B:** Předpokládané rozdělení kobaltu v krvi jako jednom kompartmentu při hladině albuminu 44g/l na tři části: volný kobalt, pevně vázaný kobalt na albumin (vazebná místa s vysokou afinitou) a volněji vázaný kobalt na albumin (vazebná místa s nižší afinitou). Převzato z Paustenbach et al. (2013).

Lze tvrdit, že do 24 hodin po podání dávky kobaltu je 20% absorbované dávky eliminováno z lidského těla, zbytek je však eliminován mnohem pomaleji kvůli výše zmíněnému navázání kobaltu na albumin a jiné krevní proteiny, ale i kvůli průniku kobaltu a následnému ireverzibilnímu navázání na červené krvinky. Eliminační poločas pro zbylý kobalt se pohybuje v rozmezí 6-800 dní *(Paustenbach et al. 2013, Tvermoes et al. 2013)*. Po perorálním podání se neabsorbovaný kobalt vyloučí primárně stolicí, zatímco absorbovaná frakce je vyloučena močí a v menší míře rovněž stolicí *(Paustenbach et al. 2013)*.

Vitamin B_{12} se do lidského těla vstřebává jinou cestou vyžadující sekreci vnitřního faktoru v gastrointestinálním traktu, čímž se liší od absorpce anorganického kobaltu. Vitamin B_{12} je dále v buňkách metabolizován na methylkobalamin nebo deoxyadenosylkobalamin, uložen v játrech, a nakonec vyloučen močí a stolicí *(Paustenbach et al. 2013)*.

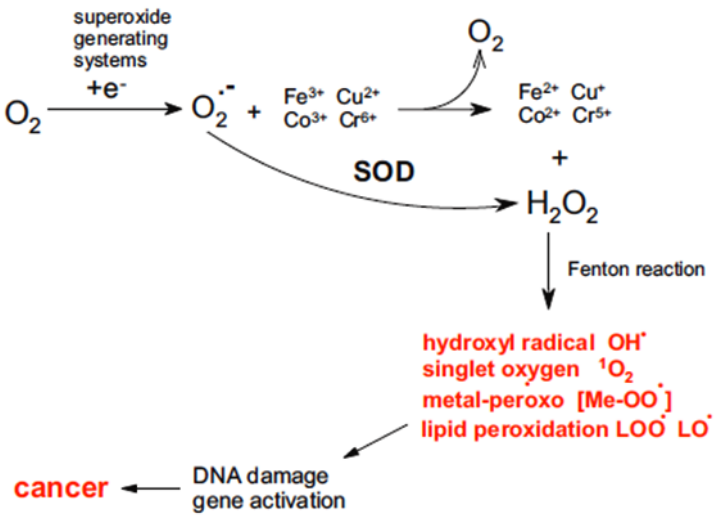
3.2 OXIDAČNÍ STRES

Kobalt – centrální atom vitaminu B_{12} je sice pro člověka nezbytný, ale stejně jako většina kovů je ve vyšších dávkách toxický. Možné molekulární mechanismy toxicity kobaltu závisejí na koncentraci a zahrnují alteraci homeostázy vápníku a železa, interakce se signálním systémem pro regulaci erytropoézy, zastavení vychytávání jodu štítnou žlázou, narušení mitochondriální funkce a Krebsova cyklu, indukci genotoxických účinků a možné poruchy procesů opravy DNA, peroxidaci lipidů a oxidační stres, konkrétně tvorbu reaktivních forem kyslíku, jako jsou vysoce reaktivní hydroxylové a superoxidové radikály. Je možné, že tyto mechanismy mohou být propojeny, tj. aktivace tvorby reaktivních forem kyslíku vede k peroxidaci lipidů, oxidačnímu stresu a dalším následkům (poškození DNA) *(Hanna et al. 1992, Jomova a Valko 2011, Leyssens et al. 2017)*.

Mezi hlavní mechanismy aktivace kyslíku kovovými ionty patří Fentonova reakce [rovnice 1], a Haber-Weissova reakce [rovnice 2] (**Obr. 4**). Jedná se v podstatě o jeden děj, druhá reakce zohledňuje i účast superoxidu. Substráty jsou molekulární kyslík, superoxidový radikál a peroxid vodíku *(Jomova a Valko 2011, Kasprzak 2002)*.

$$M^{n+} + H_2O_2 \rightarrow M^{(n+1)} + OH^- + {}^{\bullet}OH \qquad \text{rovnice 1}$$

$$H_2O_2 + O_2^{-\bullet} \xrightarrow{M^{n+}} O_2 + OH^- + {}^{\bullet}OH \qquad \text{rovnice 2}$$



Obr. 4 – Dráhy redoxně aktivních kovů schopných vyvolat oxidační stres: Převzato z Jomova a Valko (2011).

Hlubší výzkum ukázal, že kobaltové částice v suspenzi přímo s peroxidem vodíku prostřednictvím Fentonovy reakce nereagují. V přítomnosti kyslíku vzniká radikálový meziprodukt Co^{+}-$OO^{\bullet}$ [rovnice 3], který se v přítomnosti enzymu superoxid dismutázy (SOD) rozkládá na H_2O_2 a Co^{+} [rovnice 4] *(Jomova a Valko 2011, Leonard et al. 1998)*.

$$Co + O_2 \rightarrow Co^{+} + O_2^{-\bullet} \rightarrow Co^{+}\text{-}OO^{\bullet} \qquad \text{rovnice 3}$$

$$Co^{+}\text{-}OO^{\bullet} \xrightarrow{SOD} H_2O_2 + Co^{+} \qquad \text{rovnice 4}$$

Co^{+} podstupuje už výše zmíněnou Fentonovu reakci [rovnice 1] – reaguje s H_2O_2 za vzniku volných hydroxylových radikálů [rovnice 5].

$$Co^{+} + H_2O_2 \rightarrow Co^{2+} + {}^{\bullet}OH + OH^{-} \qquad \text{rovnice 5}$$

Jsou známy ale i publikace, které ukazují, že samotný Co^{2+} neprodukuje signifikantní množství hydroxylových radikálů z H_2O_2. Dle *Mao et al. (1996)* může být tato nízká účinnost produkce hydroxylových radikálů způsobena vysokým oxidačním potenciálem (E°) Co^{3+}/Co^{2+} [rovnice 6]. Oxidační potenciál Co^{2+} však může být změněn chelatací Co^{2+}, proto v přítomnosti určitých chelátorů či jiných molekul, na které se váže, může dojít prostřednictvím Fentonovy reakce k výrazné produkci hydroxylových radikálů [rovnice 7] *(Jomova a Valko 2011, Leonard et al. 1998, Mao et al. 1996, Shi et al. 1993)*.

$$Co^{3+} + e^- \rightarrow Co^{2+} \qquad E° = 1{,}84\ V \qquad \text{rovnice 6}$$

$$[Co^{2+}\text{-chelát}] + H_2O_2 \rightarrow [Co^{3+}\text{-chelát}] + {}^{\bullet}OH + OH^- \qquad \text{rovnice 7}$$

Biologické chelátory jako je glutathion a Gly-Gly-His dokážou chelatovat Co^{2+}, ten je ale v jejich přítomnosti schopný produkovat $^{\bullet}OH$ z H_2O_2. Na rozdíl od glutathionu a Gly-Gly-His, několik typických kovových chelátorů, jako je deferoxamin, 1,10-fenantrolin nebo kyselina diethylentriaminpentaoctová, jsou schopny inhibovat Co^{2+} zprostředkovanou tvorbu hydroxylových radikálů. Deferoxamin sice potlačí produkci $^{\bullet}OH$, podporuje však tvorbu nitroxidového radikálu, z H_2O_2 v přítomnosti 1,10-fenantrolinu vzniká $^1O_2$, ten hraje velkou roli v Co^{2+} zprostředkovaném poškození DNA *(Leonard et al. 1998, Mao et al. 1996, Shi et al. 1993)*.

3.3 INTOXIKACE KOBALTEM

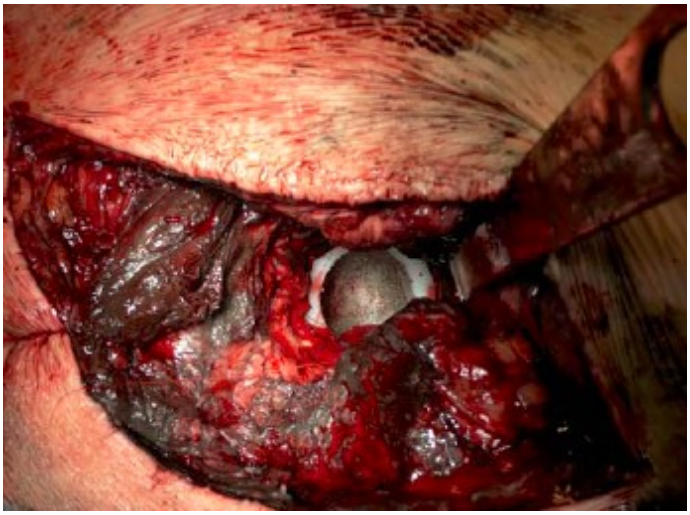
Jak již bylo zmíněno výše, kobalt je ve vyšších dávkách pro člověka toxický. Následky toxicity kobaltu jsou různé a závisí na koncentraci kobaltu v krvi nebo tkáních. Obvyklé hladiny kobaltu v séru/krvi jsou v rozmezí 0,1 až 0,4 µg/l, což je často pod hranicí detekce běžně používaných metod. Avšak perorální užívání nízkých dávek kobaltu vede ke krevním hladinám v řádu jednotek µg/l až do téměř 100 µg/l v závislosti na dávce a interindividuální variabilitě. Dle biokinetického modelu je nepravděpodobné, že by se nežádoucí účinky vyskytly při koncentracích kobaltu v krvi pod 300 µg/l (100 µg/l při dodržení

bezpečnostního faktoru 3) u zdravých jedinců. Při vyšších koncentracích se mohou objevit známky intoxikace *(Leyssens et al. 2017, Tvermoes et al. 2013)*.

Otrava kobaltem se může projevit příznakem jako je například hypotyreóza, kožní reakce nebo atrofie varlat. Velmi vysoké hladiny kobaltu můžou dokonce způsobit toxicitu CNS včetně poškození zraku a sluchu, reverzibilní, ale rychle progresivní kardiomyopatii, která může končit až smrtí, poškození DNA, potlačení jaterních hemoproteinů, zejména cytochromu P450, a přispívat tak k chronickým krevním poruchám. Kobalt ve vysokých koncentracích je považován za karcinogenní. Inhalace prachu obsahujícího kobalt je spojena se zdravotními poruchami jako je astma z povolání, pneumokonióza tvrdých kovů, plicní fibróza, ale také se zmíněnou kardiomyopatií *(Alinaghi et al. 2019, Devlin et al. 2013, Fox et al. 2016, Hanna et al. 1992, Kasprzak 2002, Leyssens et al. 2017, Packer 2016, Paustenbach et al. 2013)*.

Ke kobaltovým intoxikacím dochází při nadměrné expozici kobaltem. Tak tomu může být v průmyslu, především v těžkém průmyslu, kde se kobalt společně s wolframem a karbidem wolframu využívá při zpracovávání těžkých kovů, ale např. i v průmyslu stavebním, či při broušení diamantů nebo míchání pigmentových barev *(Leyssens et al. 2017)*. Kobalt je dále obsažen v zubních implantátech a kloubních protézách, ze kterých se může postupně uvolňovat *(Fox et al. 2016, Leyssens et al. 2017, Packer 2016, Paustenbach et al. 2013, Pelclova et al. 2012)*. Jsou zaznamenány i potenciálně fatální důsledky uvolňování kobaltu z hlavy endoprotéz kyčle (**Obr. 5 a 6**) *(Fox et al. 2016, Pelclova et al. 2012)*. Zcela specifickým zdrojem intoxikace kobaltem byla přibližně v polovině šedesátých let dvacátého století také kobaltem obohacená piva, kdy se kobalt používal ke stabilizaci pivní pěny *(Shaper 1979, Paustenbach et al. 2013)*.

Obr. 5 – Čtyřicetiprocentní abraze kovové hlavice kyčelního kloubu: Převzato z Pelclova et al. (2012).



Obr. 6 – Metalóza v okolí kovové hlavice kyčelního kloubu obsahující kobalt, chrom a titan: Převzato z Pelclova et al. (2012).

3.4 CHELATAČNÍ TERAPIE

Zatím neexistuje žádný guideline pro léčbu kobaltové otravy, ani u pacientů s intoxikací kobaltem v důsledku jeho uvolnění z endoprotéz. Odstranění kobaltu z těla je však považováno za logickou první linii léčby intoxikace, existuje ale jen velmi málo kazuistik spojených s léčbou toxicity kobaltu chelatační terapií – konkrétně využití 2,3-dimerkapto-1-propansulfonové kyseliny *(Pelclova et al. 2012)* a ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA)

(Pazzaglia et al. 2011). Podávání těchto chelátorů, vždy v kombinaci s revizí a náhradou endoprotéz, vedlo ke zlepšení klinických výsledků, ale průběh zotavování nebyl uspokojivý. Léčba chelatačními činidly pomalu snižovala koncentraci kobaltu v séru nebo krvi, ale léčba byla spojena s nepříznivými vedlejšími účinky v důsledku nedostatečné selektivity chelátorů vůči kobaltu. Pro snížení hladiny kobaltu namísto chelatace může být použita i terapeutická výměna plasmy, jejíž výsledky se zdají být ale podobné chelatační terapii *(Grant et al. 2016)*. Proto stále existuje potřeba najít vhodnější přístup k léčbě při intoxikaci kobaltem *(Devlin et al. 2013)*, potenciálně založený na selektivním chelátoru kobaltu.

3.5 ZKOUMANÉ CHELÁTORY

3.5.1 EDTA

Kyselina ethylendiamintetraoctová je známým silným neselektivním chelátorem kovů *(Catapano et al. 2018, Říha et al. 2013)*. Svými chelatačními schopnostmi ochránila myši před smrtí na akutní intoxikaci kobaltem *(Llobet et al. 1985)*. Její účinek na vylučování kobaltu z těla potkanů a hladinu kobaltu v jejich tkáních při opakovaném parenterálním podávání byl ale spíše jen mírný *(Llobet et al. 1988)*. Dokonce existuje i kazuistika spojená s léčbou toxicity kobaltu chelatační terapií pomocí EDTA *(Pazzaglia et al. 2011)*. Podávání chelátoru v kombinaci s revizí a náhradou endoprotézy vedlo sice ke zlepšení klinických výsledků, ale průběh zotavování nebyl uspokojivý.

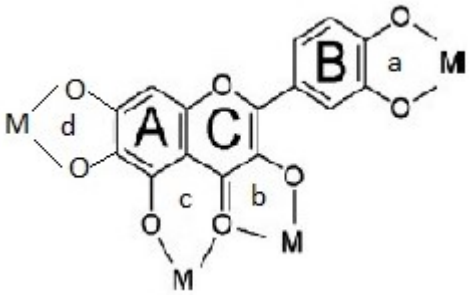
3.5.2 8-HYDROXYCHINOLINY

Z této skupiny látek byl konkrétně otestován 8-hydroxychinolin a nitroxolin. 8-hydroxychinoliny jsou malé planární lipofilní molekuly odvozeny od dusíkaté heterocyklické sloučeniny chinolinu. Rovněž patří mezi neselektivní chelátory kovů *(Říha et al. 2013)*. A právě díky těmto svým vlastnostem se zkoušejí v řadě indikací z důvodu možných antineurodegenerativních, antimikrobiálních, protizánětlivých, protirakovinných a antidiabetických účinků *(Oliveri et al. 2012, Prachayasittikul et al. 2013)*. Jako nejnadějnější se jeví jejich testování jako modulátory homeostázy kovů u Alzheimerovy choroby a jiných

neurodegenerativních onemocnění *(Knez et al. 2015, Ritchie et al. 2003, Van Hau et al. 2019)*.

3.5.3 FLAVONOIDY

Flavonoidy představují velkou skupinu polyfenolických sloučenin, jež spadají do rostlinných sekundárních metabolitů. Jsou deriváty 2-fenyl-1-benzopyran-4-onu a dle jejich základní chemické struktury je lze rozdělit do několika skupin: flavony, flavonoly, flavanony, flavanonoly a flavanoly. V této práci byly otestovány chelatační vlastnosti flavonu baikaleinu a flavonolu kvercetinu. Je možné, že flavonoidy mají různé zdraví prospěšné vlastnosti – antioxidační, antimikrobiální, protizánětlivé, protirakovinné, vazoaktivní nebo hepatoprotektivní *(Říha et al. 2014, Kumar a Pandey 2013)*. Tyto účinky jsou vysvětlovány vychytáváním reaktivních forem kyslíku (ROS), schopností chelatovat přechodné kovy, blokovat několik enzymů produkujících ROS a specificky interagovat s dalšími cíli – přímý antiagregační a vasodilatační potenciál *(Říha et al. 2014, Mladěnka et al. 2010)*. Existuje řada publikací popisujících jejich schopnost chelatovat měď *(Fernandez et al. 2002, Mladěnka et al. 2010, Říha et al. 2014)* a železo *(Fernandez et al. 2002, Mladěnka et al. 2010, Mladěnka et al. 2011)*. Za nejdůležitější vazebná místa se považují a) katecholický kruh B, b) 3-hydroxy-4-keto poloha, c) 5-hydroxy-4-keto vazné místo a d) 6,7-dihydroxy substituce (**Obr. 7**), přičemž u baikaleinu je nejúčinnější právě dihydroxyskupina v kruhu A, respektive trihydroxyskupina, protože baikalein má hydroxyskupinu i v poloze 5 *(Mladěnka et al. 2011, Říha et al. 2014)*.



Obr. 7 – Schéma flavonoidů – nejdůležitější vazebná místa pro chelataci kovů (M): Velká písmena A, B, C označují převládající označení struktury flavonoidů a malá písmena a, b, c, d slouží k označení nejběžnějších míst pro chelataci kovů. Modifikováno dle Mladěnka et al. (2010).

4. CÍL PRÁCE

Cílem mé diplomové práce je připravit spektrofotometrickou detekci jakožto standardizovanou, rychlou, levnou, ale přesnou metodu pro screening potenciálních chelátorů kobaltu při různých vybraných patofyziologicky relevantních pH podmínkách (pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) s cílem do budoucna tuto metodiku využít k iniciálnímu hledání antidota, tj. vhodného chelátoru kobaltu, který by mohl být použit během intoxikace kobaltem.

5. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5.1 MATERIÁL

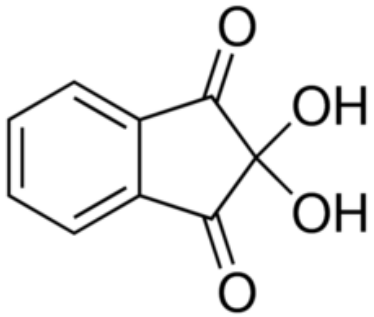
5.1.1 CHEMIKÁLIE

- chlorid kobaltnatý ($CoCl_2$)
- spektrofotometrické indikátory kobaltu:
    - ninhydrin
    - disodná sůl kyseliny 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonové (Na_2NFDSA) – forma hydrátu
- testované látky – známé chelátory kovů:
    - 8-hydroxychinolin (8HQ) a jeho derivát nitroxolin
    - disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA)
    - flavonoidy kvercetin a baikalein
- chemikálie pro přípravu pufrů:
    - kyselina 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonová (HEPES) a její sodná sůl (NaHEPES) pro přípravu HEPES pufrů o pH 6,8 a 7,5 – HEPES pufry o pH 6,8 a 7,5 konkrétně obsahovaly 15 mM NaHEPES a 71,7 mM HEPES (pH 6,8), respektive 14,3 mM HEPES (pH 7,5)
    - kyselina octová a octan sodný pro přípravu acetátových pufrů o pH 4,5 a 5,5 – octanové pufry o pH 4,5 a 5,5 obsahovaly vždy 15 mM octanu sodného a 27,3 mM kyseliny octové (pH 4,5), respektive 2,7 mM kyseliny octové (pH 5,5)

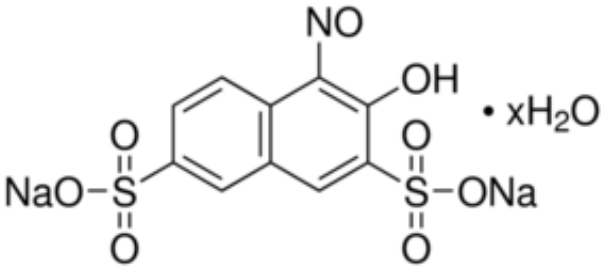
Výše zmíněné látky byly zakoupeny od Sigma-Aldrich, Německo.

- dimethylsulfoxid (DMSO) a methanol – Lach-Ner, Česká republika
- superčistá voda – připravena pomocí přístroje Milli-Q RG (Merck Millipore, Massachusetts, USA)

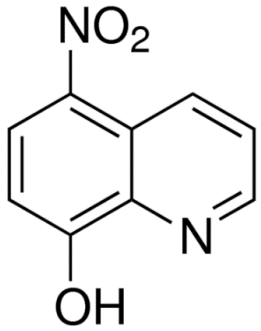
Níže jsou uvedeny strukturní vzorce použitých indikátorů a testovaných látek (Obr. 8).



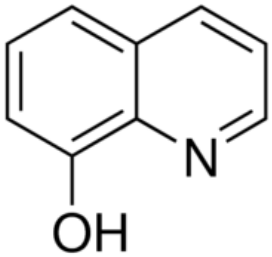
ninhydrin



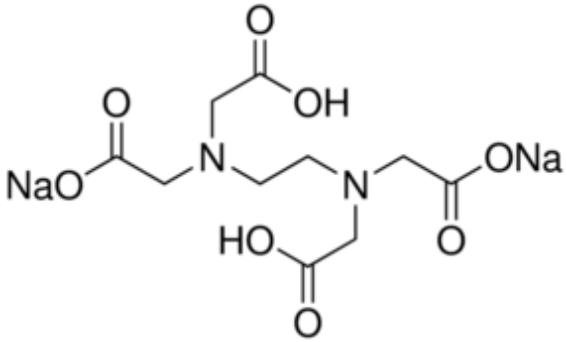
Na_2NFDSA



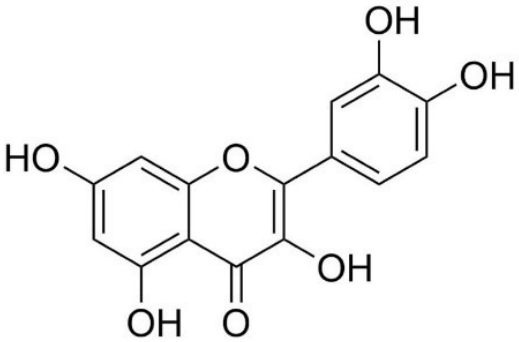
nitroxolin



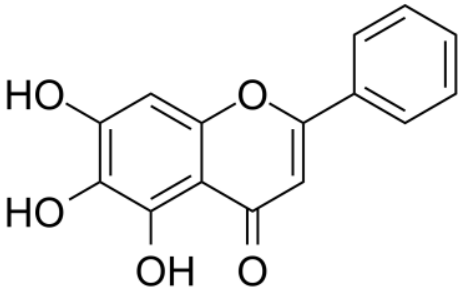
8HQ



Na_2EDTA



kvercetin



baikalein

Obr. 8 – Strukturní vzorce indikátorů a testovaných látek

5.1.2 PŘÍSTROJE A POMŮCKY

- spektrofotometr Helios gama (Spectronic Unicam, Spojené Království)
- spektrofotometr pro mikrotitrační destičky SYNERGY HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTec Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA)
- analytické váhy Kern ALT 220-4NM (Kern & Sohn GmbH, Balingen, Německo)
- vortex mixér IKA Vortex Genius 3 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)
- třepačka pro mikrotitrační destičky IKA® MS 3 digital (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)

- automatické pipety (Brand, Německo)
- vícekanálová pipeta (Biohit, Německo)
- semi-mikro polystyrenové UV kyvety (BrandTech Scientific Inc, Spojené Království)
- mikrotitrační destičky – 96 jamek (Brand, Německo)

5.2 METODIKA PRO VÝBĚR VHODNÉHO INDIKÁTORU Co^{2+}

5.2.1 PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍCH ROZTOKŮ

$CoCl_2$ (chlorid kobaltnatý)

Základní 5 mM roztok byl připraven rozpuštěním navážky $CoCl_2$ (M_w 129,84 g/mol) v potřebném objemu superčisté vody.

Ninhydrin

Základní roztok byl připraven o koncentraci 5 mM – navážka ninhydrinu (M_w 178,14 g/mol) byla rozpuštěna v množství methanolu.

Kyselina 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonová, disodná sůl (Na_2NFDSA)

Navážka Na_2NFDSA (Mw 377, 25 g/mol) byla rozpuštěna v superčisté vodě, aby výsledná koncentrace byla 5 mM.

5.2.2 Příprava pracovních roztoků

Potřebný objem připraveného 5 mM základního roztoku $CoCl_2$ byl zředěn superčistou vodou na koncentrace 250 a 100 μM.

Ze základního 5 mM roztoku ninhydrinu byly připraveny 1,25 mM, 500, 250, 100 a 50 μM roztoky zředěním methanolem.

Základní 5 mM roztok Na_2NFDSA byl zředěn superčistou vodou na koncentrace 500, 250, 100 a 50 μM.

5.2.3 Experimentální stanovení vhodného indikátoru

Provedení experimentu:

- Nejprve jsem změřila spektrum samotných spektrofotometrických indikátorů kobaltu – ninhydrinu a Na_2NFDSA – při vlnových délkách 200-800 nm po 1 nm.
    - u ninhydrinu jsem proměřila spektra u tří rozdílných koncentrací – 250, 100 a 50 μM
    - u Na_2NFDSA jsem změřila spektra při koncentracích 250 a 50 μM
    - jako blank byl použit čistý methanol pro ninhydrin a superčistá voda pro Na_2NFDSA
- Poté jsem smíchala různě koncentrované roztoky ninhydrinu/Na_2NFDSA spolu s různě koncentrovanými roztoky $CoCl_2$ dle rozpisu (**Tab. 1**). U těchto nově vzniklých roztoků jsem rovněž proměřila spektra při vlnových délkách 200-800 nm po 1 nm oproti blanku voda-methanol (1:1) u roztoků pouze s ninhydrinem a $CoCl_2$. Pokud byl v roztoku přítomen i pufr, jako blank byl použit methanol, superčistá voda a pufr pH 7,5 v příslušném poměru (1:1:3). Roztoky s Na_2NFDSA byly měřeny oproti superčisté vodě.

Tab. 1 – Rozpis mísení roztoků:

ninhydrin			Na_2NFDSA			$CoCl_2$			pufr pH 7,5
c [μM]	V [μl]	c_f [μM]	c [μM]	V [μl]	c_f [μM]	c [μM]	V [μl]	c_f [μM]	V [μl]
500	500	250				100	500	50	
1250	300	250				250	300	50	900
5000	300	1000				5000	300	1000	900
			500	500	250	100	500	50	
			100	500	50	100	500	50	

c – koncentrace roztoku, V – objem roztoku, c_f – finální koncentraci dané látky v roztoku

5.3 METODIKA PRO NALEZENÍ VHODNÉ VLNOVÉ DÉLKY PRO MĚŘENÍ

5.3.1 PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍCH ROZTOKŮ

$CoCl_2$ (chlorid kobaltnatý)

Roztok byl připraven dle stejného postupu jako v podkapitole 5.2.1.

Kyselina 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonová, disodná sůl (Na_2NFDSA)

Příprava roztoku byla provedena stejně jako v podkapitole 5.2.1.

5.3.2 PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ

Ze základního 5 mM roztoku $CoCl_2$ byly připraveny 300, 240, 180, 120, 60 a 30 μM roztoky zředěním superčistou vodou.

Základní 5 mM roztok Na_2NFDSA byl zředěn superčistou vodou na koncentraci 1,8 mM.

5.3.3 Experimentální stanovení vhodné vlnové délky pro měření

Experiment byl proveden duplicitně ve čtyřech různých pH prostředích – 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5.

Provedení experimentu:

- Do jednotlivých jamek mikrotitrační destičky jsem napipetovala 150 µl pufru, 50 µl DMSO jakožto rozpouštědla jednotlivých potenciálních chelátorů kobaltu, 50 µl vodného roztoku $CoCl_2$ o různých koncentracích, nebo 50 µl superčisté vody (blank) dle rozpisu níže (Tab. 2), a 50 µl 1,8 mM Na_2NFDSA (finální koncentrace 300 µM).

Tab. 2 – Rozpis koncentrací Co^{2+} v jednotlivých jamkách:

přidaná koncentrace Co^{2+} [µM]	300	240	180	120	60	30	0
finální koncentrace Co^{2+} [µM]	50	40	30	20	10	5	0

- Takto připravenou mikrodestičku jsem umístila na 2 minuty do třepačky pro mikrodestičky a následně změřila spektrum v čase 0 a 5 minut v rozmezí vlnových délek 400-650 nm po 1 nm – oblast, kde samotný indikátor již neabsorbuje, ale komplex NFDSA-kobalt ano.
- Pomocí Excelu jsem spočítala sklon přímky a lineární regresi pro vztah mezi absorbancí a koncentrací kobaltu v čase 0 a 5 minut.

5.4 METODIKA PRO STANOVENÍ CITLIVOSTI INDIKÁTORU

5.4.1 PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍCH ROZTOKŮ

$CoCl_2$ (chlorid kobaltnatý)

Základní roztok chloridu kobaltnatého byl připraven dle postupu v podkapitole 5.2.1.

Kyselina 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonová, disodná sůl (Na_2NFDSA)

Základní 6 mM roztok byl připraven rozpuštěním navážky Na_2NFDSA (Mw 377, 25 g/mol) v potřebném objemu superčisté vody.

5.4.2 PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ

5 mM základní roztok $CoCl_2$ byl zředěn superčistou vodou na koncentrace 15 μM – 100 nM podle výsledků experimentů na citlivost.

Část základního 6 mM roztoku Na_2NFDSA byla zředěna superčistou vodou na koncentraci 1,8 mM, zbylé množství 6 mM roztoku bylo dále použito při samotném experimentu.

5.4.3 EXPERIMENTÁLNÍ STANOVENÍ CITLIVOSTI INDIKÁTORU

Celý experiment proběhl ve všech pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) duplicitně. Otestovala se citlivost indikátoru Na_2NFDSA o dvou různých koncentracích – 1,8 a 6 mM (finální koncentrace 300 a 1000 μM).

Citlivost se v každém pH stanovovala individuálně. Nejprve jsem u všech čtyřech pH provedla první měření, kde jsem si nahodile vybrala pět koncentrací kobaltu a změřila citlivost indikátoru oproti blanku – superčisté vodě (**Tab. 3**). Na základě těchto výsledků jsem u jednotlivých pH provedla nová měření s dalšími koncentracemi kobaltu, abych se dobrala konečné citlivosti indikátoru.

Tab. 3 – Rozpis koncentrací Co^{2+} v jednotlivých jamkách při prvním měření:

přidaná koncentrace Co^{2+} [μM]	15,0	10,0	5,0	3,0	1,5	0
finální koncentrace Co^{2+} [μM]	2,50	1,67	0,83	0,50	0,25	0

Provedení experimentu:

- Do jamek mikrotitrační destičky jsem nejprve napipetovala 150 μl pufru, poté jsem přidala 50 μl DMSO, 50 μl vodného roztoku $CoCl_2$ o různých koncentracích, nebo 50 μl superčisté vody (blank), a 50 μl 1,8 mM Na_2NFDSA (finální koncentrace 300 μM), nebo 50 μl 6 mM indikátoru (finální koncentrace 1000 μM).
- Ihned po přidání Na_2NFDSA jsem změřila spektrum v čase 0 v rozmezí vlnových délek 470-575 nm po 1 nm a po 5 minutách jsem měření zopakovala.
- Pomocí T-testu jsem vyhodnotila nejnižší koncentraci kobaltu, kterou lze detekovat oproti blanku změnami absorbance u jednotlivých pH.

5.5 METODIKA PRO POSOUZENÍ STABILITY ČINIDEL

5.5.1 PŘÍPRAVA ZÁKLADNÍCH ROZTOKŮ

$CoCl_2$ (chlorid kobaltnatý)

Příprava základního roztoku chloridu kobaltnatého byla provedena podle postupu v podkapitole 5.2.1.

Kyselina 1-nitroso-2-naftol-3,6-disulfonová, disodná sůl (Na_2NFDSA)

5 mM základní roztok Na_2NFDSA byl připraven stejně jako v podkapitole 5.2.1.

5.5.2 PŘÍPRAVA PRACOVNÍCH ROZTOKŮ

Z 5 mM základního roztoku chloridu kobaltnatého byl zředěním superčistou vodou připraven roztok o koncentraci 300 μM.

1,8 mM roztok Na_2NFDSA byl přichystán ze základního roztoku tohoto indikátoru zředěním superčistou vodou.

5.5.3 EXPERIMENTÁLNÍ OVĚŘENÍ STABILITY ČINIDEL

Na začátku tohoto experimentu (den 0) jsem si připravila čtyři základní roztoky činidel – dva 5 mM roztoky chloridu kobaltnatého (A_0, B_0) a dva 5 mM roztoky Na_2NFDSA (C_0, D_0). Takto vzniklé roztoky jsem si rozředila na požadované koncentrace (viz podkapitola 5.5.2) a změřila spektrum komplexu kobalt-indikátor vzorku A_0+C_0 i B_0+D_0 v rozmezí vlnových délek 470-570 nm po 5 nm v čase 0 a 5 minut. Tyto „původní“ základní 5 mM roztoky činidel byly skladovány v lednici při teplotě 4 °C a zředěny na požadované koncentrace před každým dalším měřením.

Před každým následujícím měřením, které probíhalo zhruba v týdenních intervalech, jsem si připravila další čtyři „čerstvé“ základní roztoky – dva 5 mM roztoky chloridu kobaltnatého (A_1, B_1) a dva 5 mM roztoky Na_2NFDSA (C_1, D_1), které byly následně rozředěny společně se čtyřmi „původními“ základními roztoky činidel na požadované koncentrace (viz podkapitola 5.5.2).

Provedení experimentu:

- Do čtyř jamek mikrotitrační destičky jsem napipetovala 150 μl pufru (pH 7,5) a 50 μl DMSO.
- Následně jsem do prvních dvou jamek odměřila 50 μl 300 μM roztoků kobaltu, které byly připraveny z „původních“ základních roztoků chloridu kobaltnatého (roztok A_0 do jedné jamky a roztok B_0 do jamky druhé). Do zbývajících dvou jamek jsem napipetovala 50 μl 300 μM roztoků Co^{2+}, které byly připraveny zředěním superčistou vodou z „čerstvých“ základních roztoků $CoCl_2$ (roztok A_1 do jedné jamky a roztok B_1 do jamky druhé).

- 50 µl 1,8 mM „původních“ roztoků Na_2NFDSA jsem umístila do prvních dvou jamek (roztok C_0 do první jamky a roztok D_0 do jamky druhé). Do třetí a čtvrté jamky jsem odměřila 50 µl 1,8 mM „čerstvých“ roztoků indikátoru (roztok C_1 do třetí jamky a roztok D_1 do jamky poslední). Roztoky Na_2NFDSA (C_0, D_0, C_1, D_1) korespondují v jamkách s roztoky Co^{2+} (A_0, B_0, A_1, B_1) – rozpis níže (**Tab. 4**).
- Po přidání indikátoru jsem u všech vzorků změřila absorbanci v rozmezí vlnových délek 470-570 nm po 5 nm v čase 0 a 5 minut. Porovnala jsem spektra „čerstvých“ činidel s „původními“ (z daného dne i ze dne 0).

Tab. 4 – Rozpis mísení roztoků:

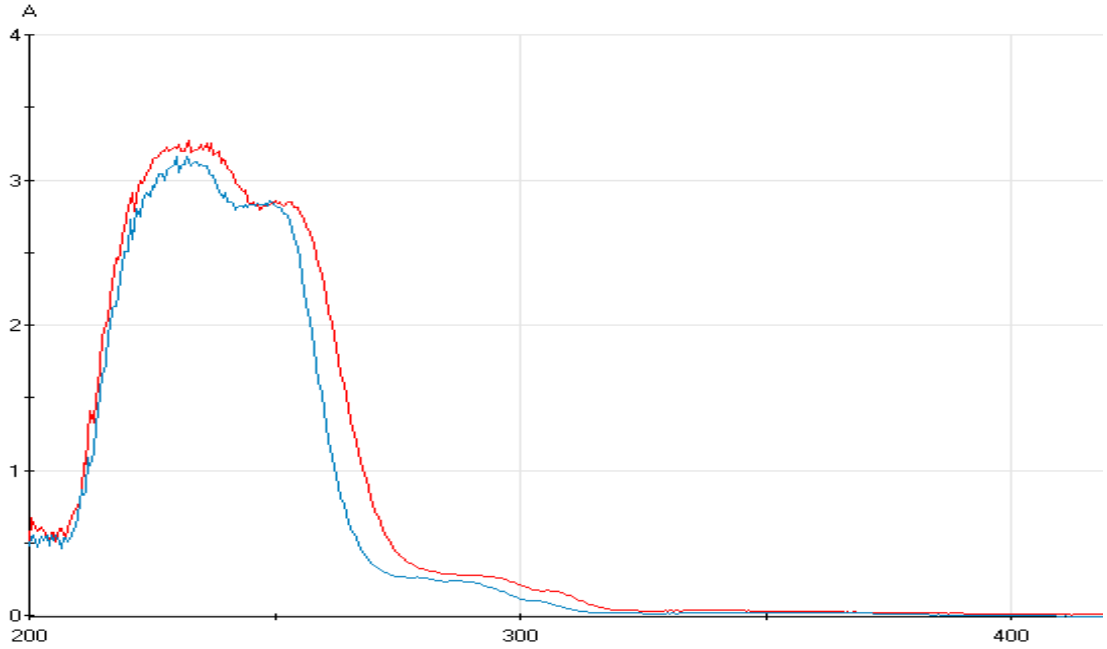
Co^{2+} A_0	**Co^{2+} B_0**	**Co^{2+} A_1**	**Co^{2+} B_1**
+ NA_2NFDSA C_0	**+ NA_2NFDSA D_0**	**+ NA_2NFDSA C_1**	**+ NA_2NFDSA D_1**

$A_0/B_0/C_0/D_0$ – roztoky připravené v den 0 („původní“), naředěné čerstvě před každým měřením; $A_1/B_1/C_1/D_1$ – „čerstvé“ roztoky připravené a naředěné před každým měřením; v den 0 byly změřeny pouze dva vzorky (A_0+C_0/B_0+D_0)

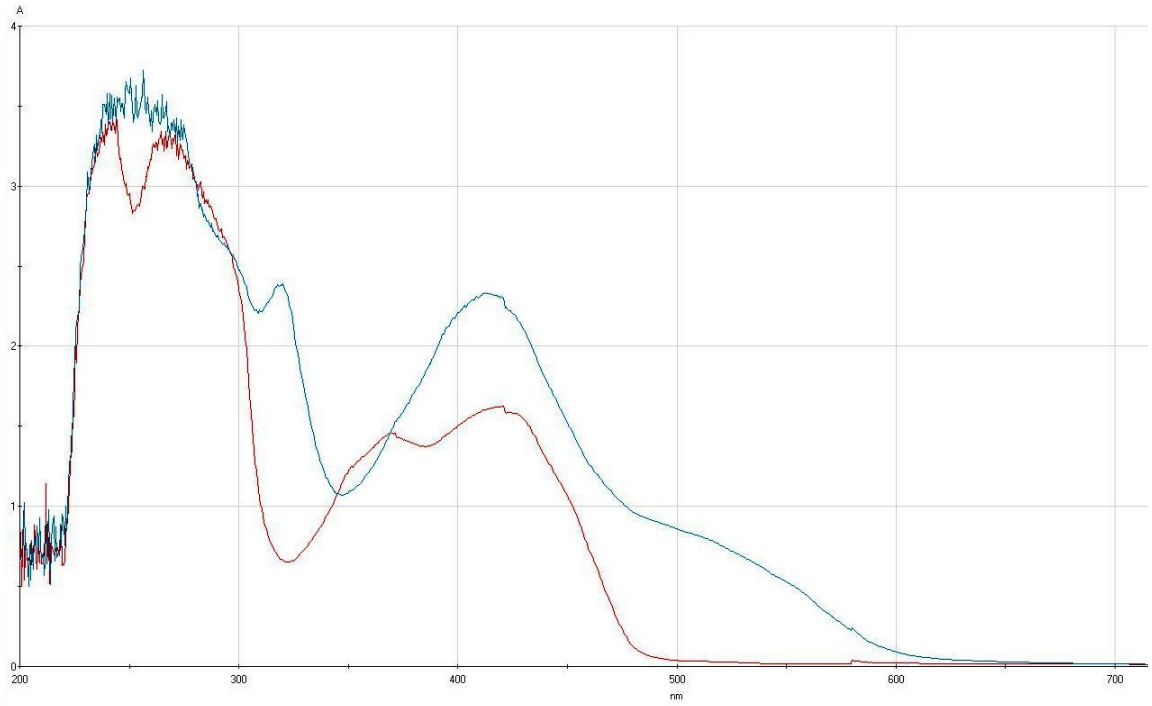
6. VÝSLEDKY

6.1 VÝBĚR VHODNÉHO INDIKÁTORU Co^{2+}

Prvním krokem bylo najít vhodný indikátor kobaltu. Na základě studií *Mahmood et al. (2012)* a *Reshetnyak et al. (2012)* jsem vybrala a posléze otestovala dva spektrofotometrické indikátory kobaltu – ninhydrin a Na_2NFDSA. Nejprve jsem porovnala spektra samotných indikátorů se spektry indikátor-kobalt v rozmezí vlnových délek 200-800 nm při měření po 0,5 nm. Ninhydrin komplex s kobaltem nevytvořil (**Obr. 9**), ani když byl celý experiment proveden v prostředí o pH 7,5, ve kterém se dá očekávat vyšší chelatace *(Mahmood et al. 2012)*. Proto nemohl být tento indikátor použit v dalších měřeních. Zato Na_2NFDSA se ukázala jako vhodný indikátor. Ve spektru NFDSA-kobalt byl vidět znatelný posun maximální absorbance indikátoru z maxim vlnových délek 244,5; 264,5; 369,5 a 421 nm na 256,5; 320; 412,5 a 500 nm (**Obr. 10**).



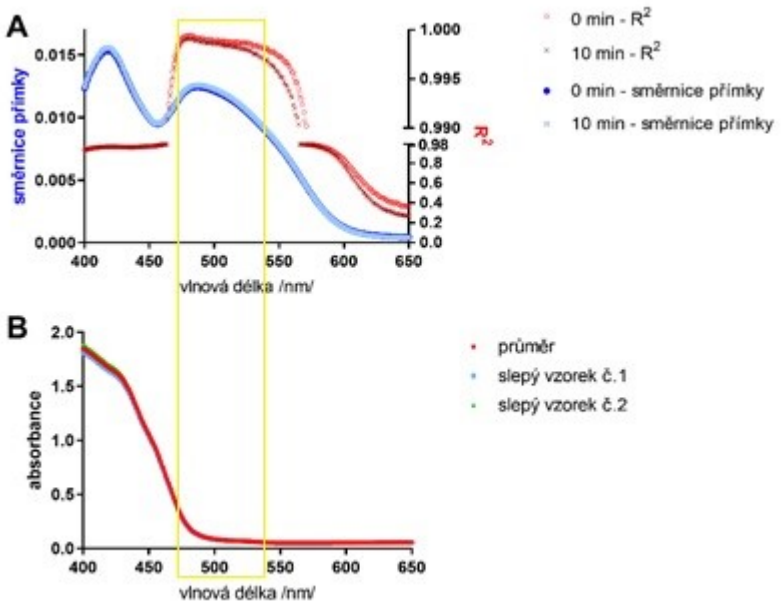
Obr. 9 – Spektra ninhydrinu (modře) a ninhydrin-kobalt (červeně): Originální záznam z přístroje; na ose x vlnová délka [nm], na ose y absorbance.



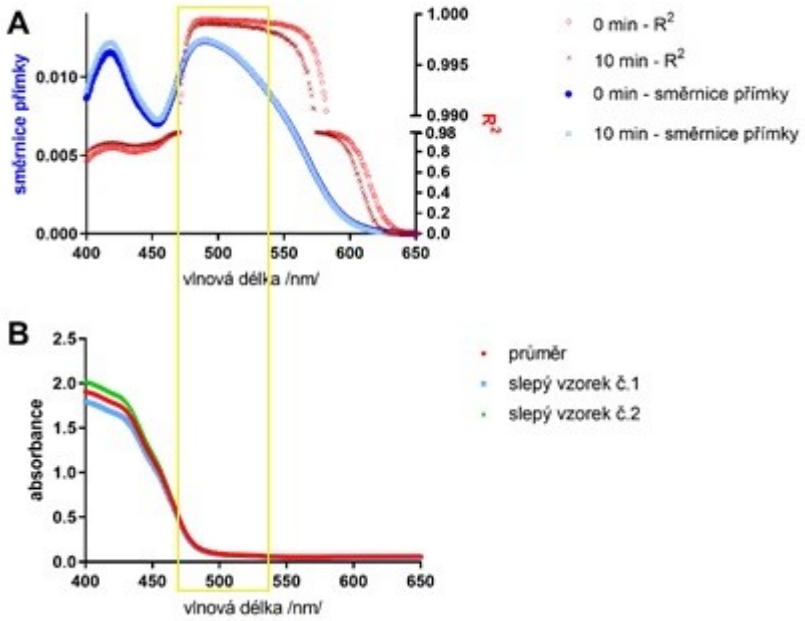
Obr. 10 – Spektra Na_2NFDSA (růžově) a NFDSA-kobalt (modře): Originální záznam z přístroje; na ose x vlnová délka [nm], na ose y absorbance.

6.2 NALEZENÍ VHODNÉ VLNOVÉ DÉLKY PRO MĚŘENÍ

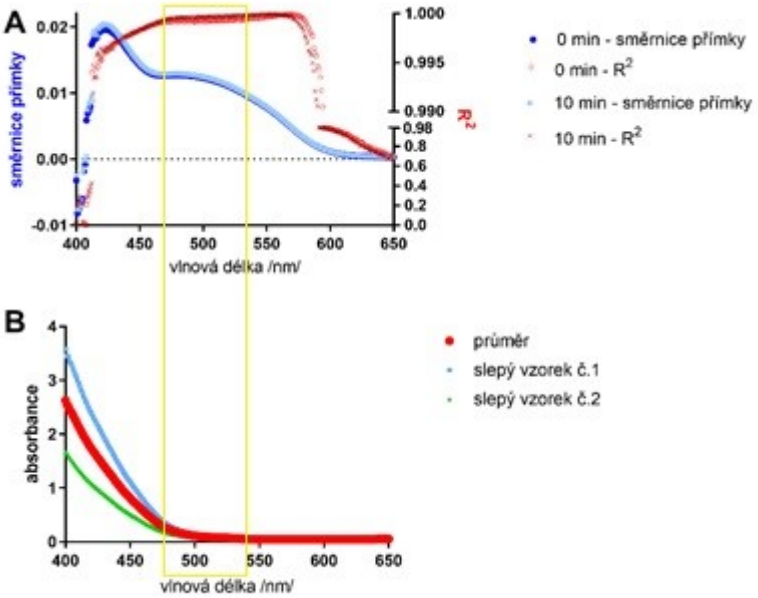
Následně bylo zapotřebí nalézt ideální vlnovou délku pro měření při čtyřech různých pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5). Hledala jsem oblast, kde samotný indikátor již neabsorbuje, ale komplex NFDSA-kobalt ano. Změřila jsem proto spektra indikátoru a komplexu v rozmezí vlnových délek 400-650 nm po 1 nm při čtyřech odlišných pH a porovnala je. Ideální vlnová délka pro všechna pH, 470-540 nm, byla určena na základě dvou kritérií – a) linearitě a b) sklonu přímky (směrnici) (**Obr. 11-14**). Jak linearita, tak směrnice se týkají matematického vztahu mezi hodnotou absorbance a koncentrací kobaltu. Tyto parametry jsou klíčové. Čím vyšší je směrnice, tím je metodika citlivější, tj. při každém zvýšení koncentrace kobaltu se absorbance zvýší více při vyšší směrnici než při nižší. Naopak linearita je parametrem přesnosti, tj. jak přesně lze naměřenou absorbanci vztáhnout ke koncentraci kobaltu.



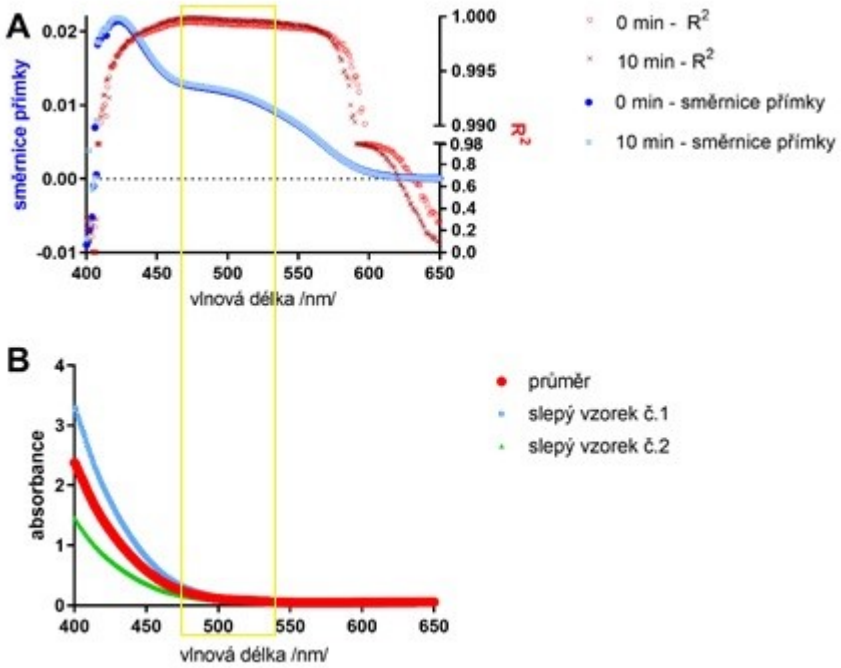
Obr. 11 – Absorbance komplexu kobalt-NFDSA a Na_2NFDSA při pH 7,5: A: Směrnice přímky a linearita vztahu absorbance při různých vlnových délkách a koncentrace kobaltu; **B:** Spektrum samotného indikátoru pro porovnání. Ideální oblast vlnových délek pro měření je zvýrazněna žlutě ohraničeným obdélníkem.



Obr. 12 – Absorbance komplexu kobalt-NFDSA a Na_2NFDSA při pH 6,8: A: Směrnice přímky a linearita vztahu absorbance při různých vlnových délkách a koncentrace kobaltu; **B:** Spektrum samotného indikátoru pro porovnání. Ideální oblast vlnových délek pro měření je zvýrazněna žlutě ohraničeným obdélníkem.



Obr. 13 – Absorbance komplexu kobalt-NFDSA a Na_2NFDSA při pH 5,5: A: Směrnice přímky a linearita vztahu absorbance při různých vlnových délkách a koncentrace kobaltu; **B:** Spektrum samotného indikátoru pro porovnání. Ideální oblast vlnových délek pro měření je zvýrazněna žlutě ohraničeným obdélníkem.



Obr. 14 – Absorbance komplexu kobalt-NFDSA a Na_2NFDSA při pH 4,5: A: Směrnice přímky a linearita vztahu absorbance při různých vlnových délkách a koncentrace kobaltu; **B:** Spektrum samotného indikátoru pro porovnání. Ideální oblast vlnových délek pro měření je zvýrazněna žlutě ohraničeným obdélníkem.

6.3 STANOVENÍ CITLIVOSTI INDIKÁTORU

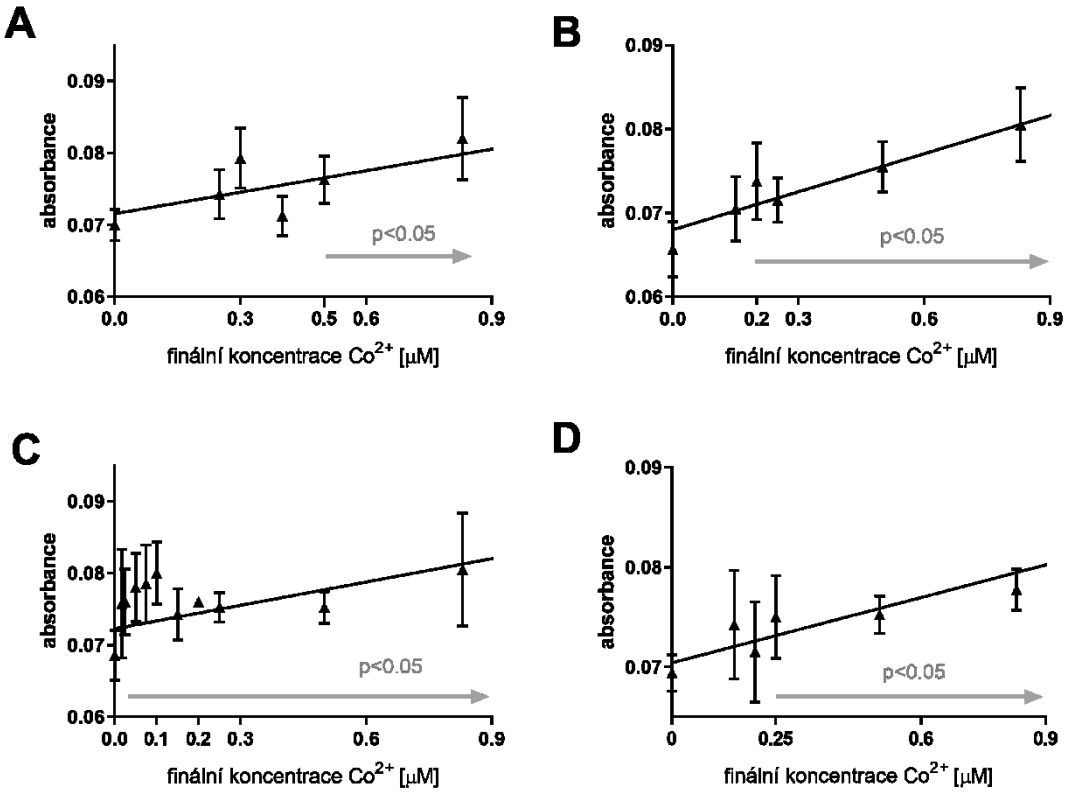
V další fázi jsem změřila, jakou nejnižší koncentraci Co^{2+} lze detekovat při použití této metodiky. Pro porovnání byly otestovány dvě koncentrace indikátoru Na_2NFDSA: 300 μM a 1000 μM, a to v různých pH podmínkách (pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) ve dvou časech (t = 0 a t = 5 min.). Vyšší citlivost byla dosažena u nižší koncentrace indikátoru. Senzibilita Na_2NFDSA je dále ovlivněna pH prostředí a měřenou vlnovou délkou spektra, v čase je prakticky stabilní. Pro přehlednost jsou výsledky citlivosti při jednotlivých podmínkách uvedeny v tabulkách níže (Tab. 5 a 6). Ilustrativně je citlivost zobrazena při jedné vlnové délce (Obr. 15).

Tab. 5 – Citlivost Na_2NFDSA o koncentraci 300 μM

	čas 0		**čas 5 min.**	
pH	citlivost [μM]	rozmezí vlnových délek [nm]	citlivost [μM]	rozmezí vlnových délek [nm]
4,5	0,5	488-506	0,83	470-516
5,5	0,2	485-575	0,2	478-575
6,8	0,025	488-554	0,025	490-540
7,5	0,25	490-526	0,25	487-506

Tab. 6 – Citlivost Na_2NFDSA o koncentraci 1000 μM

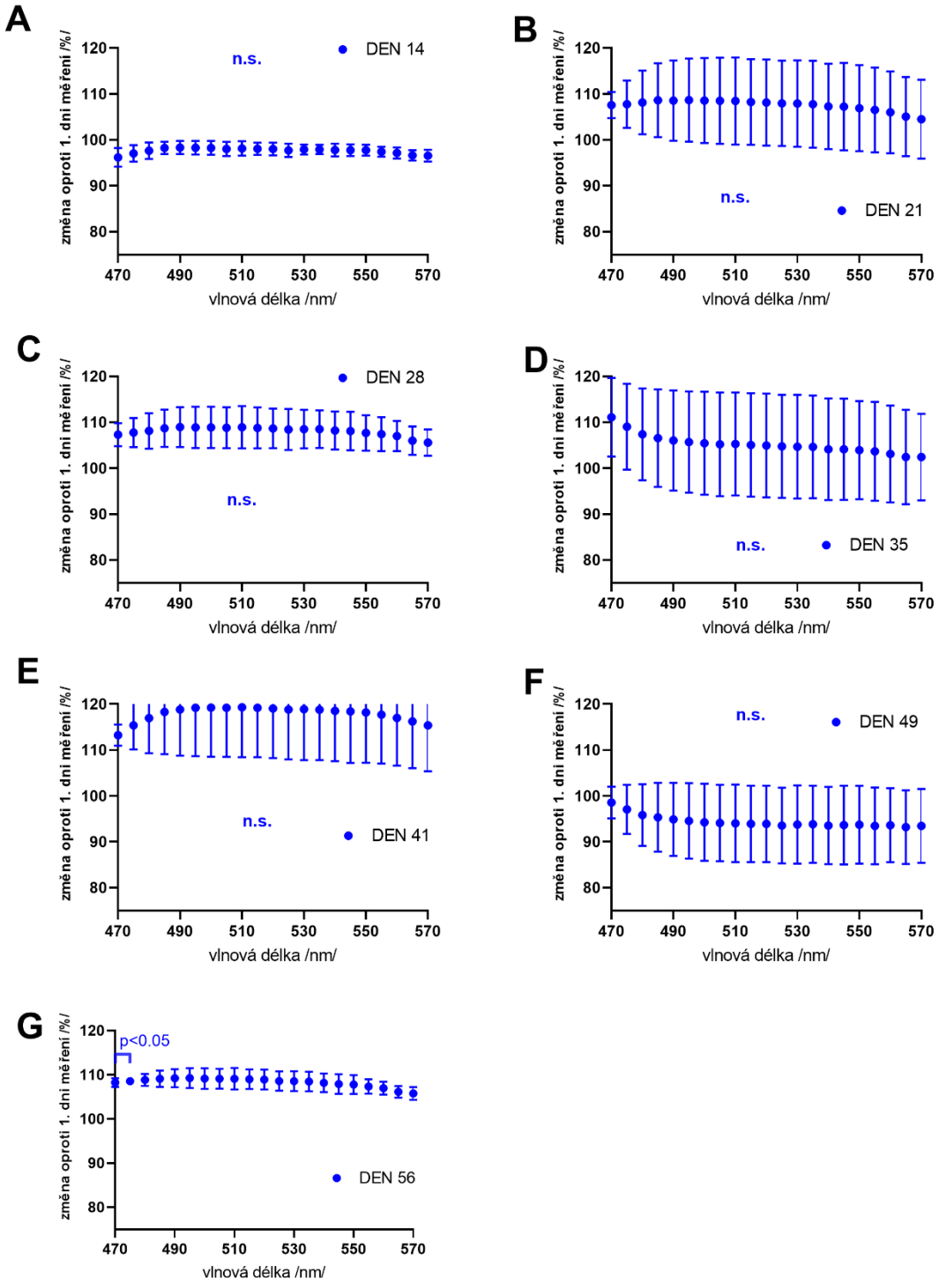
	čas 0		**čas 5 min.**	
pH	citlivost [μM]	rozmezí vlnových délek [nm]	citlivost [μM]	rozmezí vlnových délek [nm]
4,5	1,5	500-544	1,5	491-544
5,5	0,25	542-562	0,25	541-560
6,8	0,65	487-575	0,65	496-575
7,5	0,65	539-555	0,65	533-565



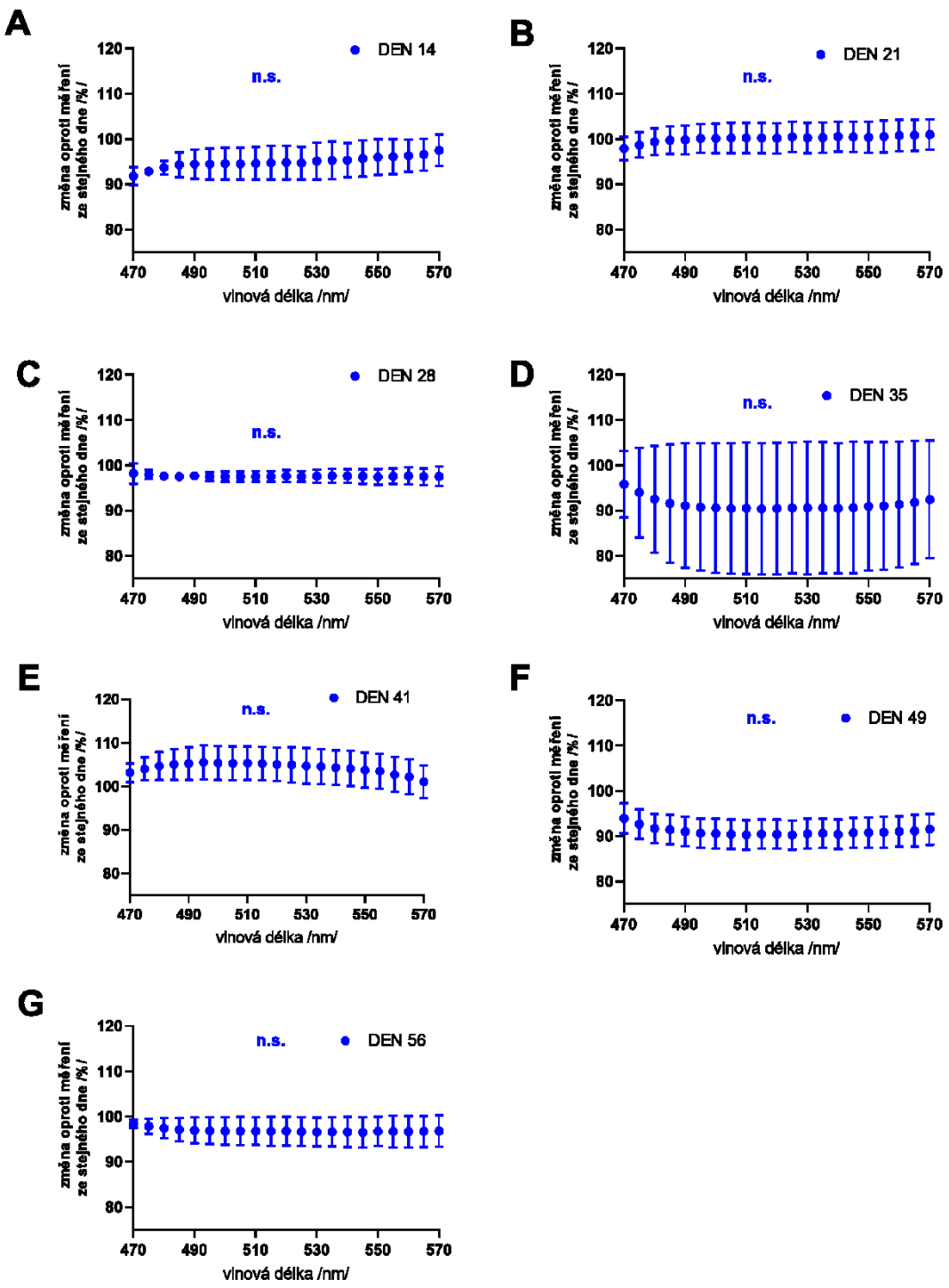
Obr. 15 – Ilustrativní obrázek citlivosti Na_2NFDSA o koncentraci 300 μM při vlnové délce 499 nm: A: pH 4,5; **B:** pH 5,5; **C:** pH 6,8; **D:** pH 7,5.

6.4 POSOUZENÍ STABILITY ČINIDEL

Z ekonomických i časových důvodů bylo součástí přípravy metodiky i posouzení stability činidel $CoCl_2$ (označeno A, B) a Na_2NFDSA (označeno C, D). Postup zahrnoval přípravu duplicitních roztoků v čase den 0 (A_0/B_0 a C_0/D_0), které byly následně proměřovány zhruba v týdenních intervalech společně s čerstvě připravenými roztoky činidel (A_1/B_1 a C_1/D_1). Byla změřena jejich spektra, tj. Na_2NFDSA vždy s ionty kobaltu v rozmezí vlnových délek 470-570 nm po 5 nm a následně mezi sebou porovnána. A_0+C_0, B_0+D_0 ze dne měření bylo porovnáno s prvním měřením A_0+C_0, B_0+D_0 – den 0 (**Obr. 16**) a také s měřením čerstvých roztoků A_1+C_1, B_1+D_1 z téhož dne (**Obr. 17**). Ukázalo se, že absorbance se oproti prvnímu dni spíše nepatrně zvyšovaly, ale dosáhly statistické významnosti až při posledním měření, a to u dvou vlnových délek. Naproti tomu porovnání měření oproti novým vzorkům ze stejného dne ukázala na stabilitu reagencií po celou dobu měření, tj. 56 dní.



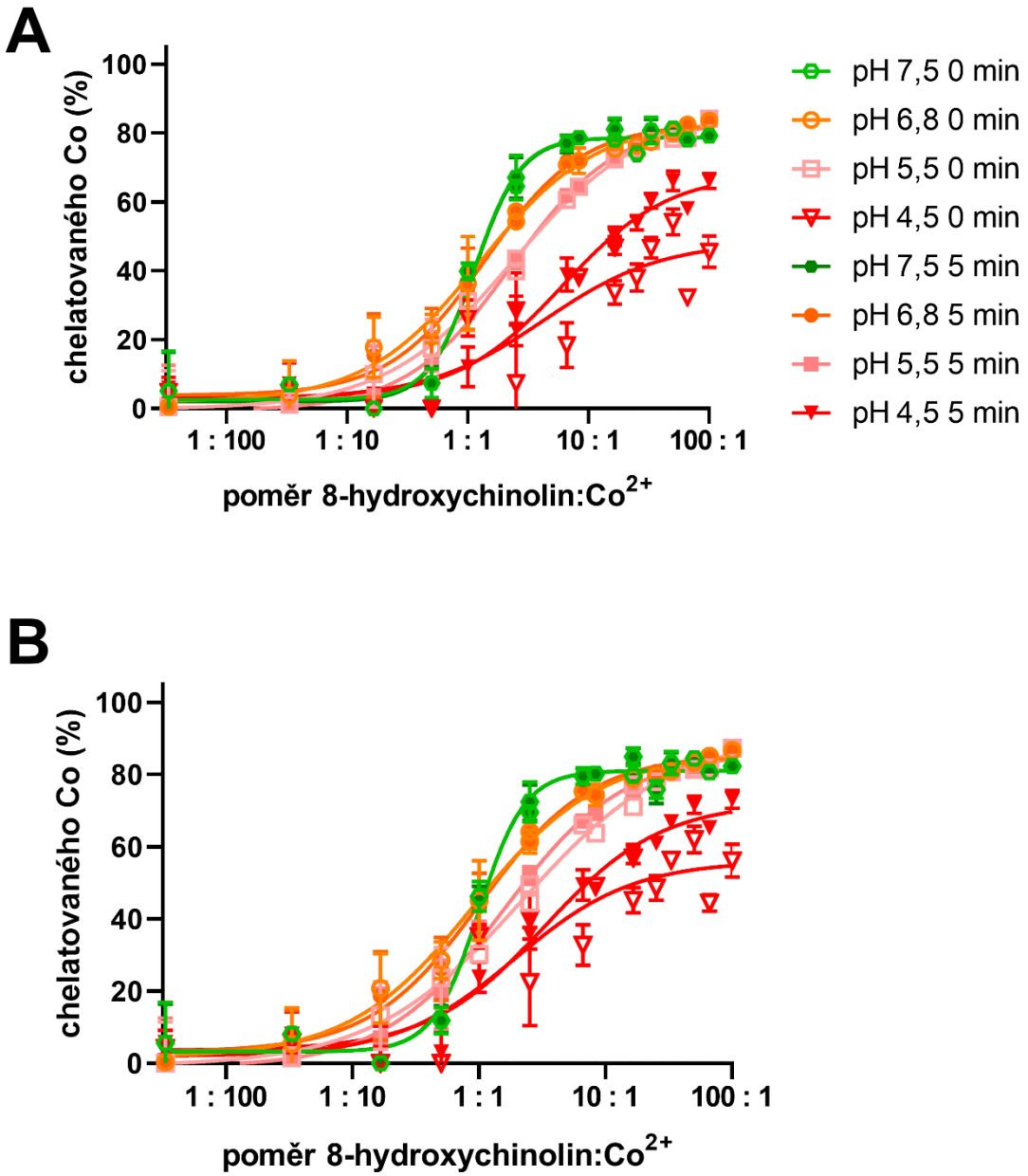
Obr. 16 – Stabilita absorbance činidel nově naředěných a činidel připravených 1. dne experimentu: Grafy byly připraveny porovnáním spekter A_0+C_0, B_0+D_0 ze dne měření oproti spektrům A_0+C_0, B_0+D_0 z 1. dne měření (den 0): **A:** den 14; **B:** den 21; **C:** den 28; **D:** den 35; **E:** den 41; **F:** den 49; **G:** den 56.



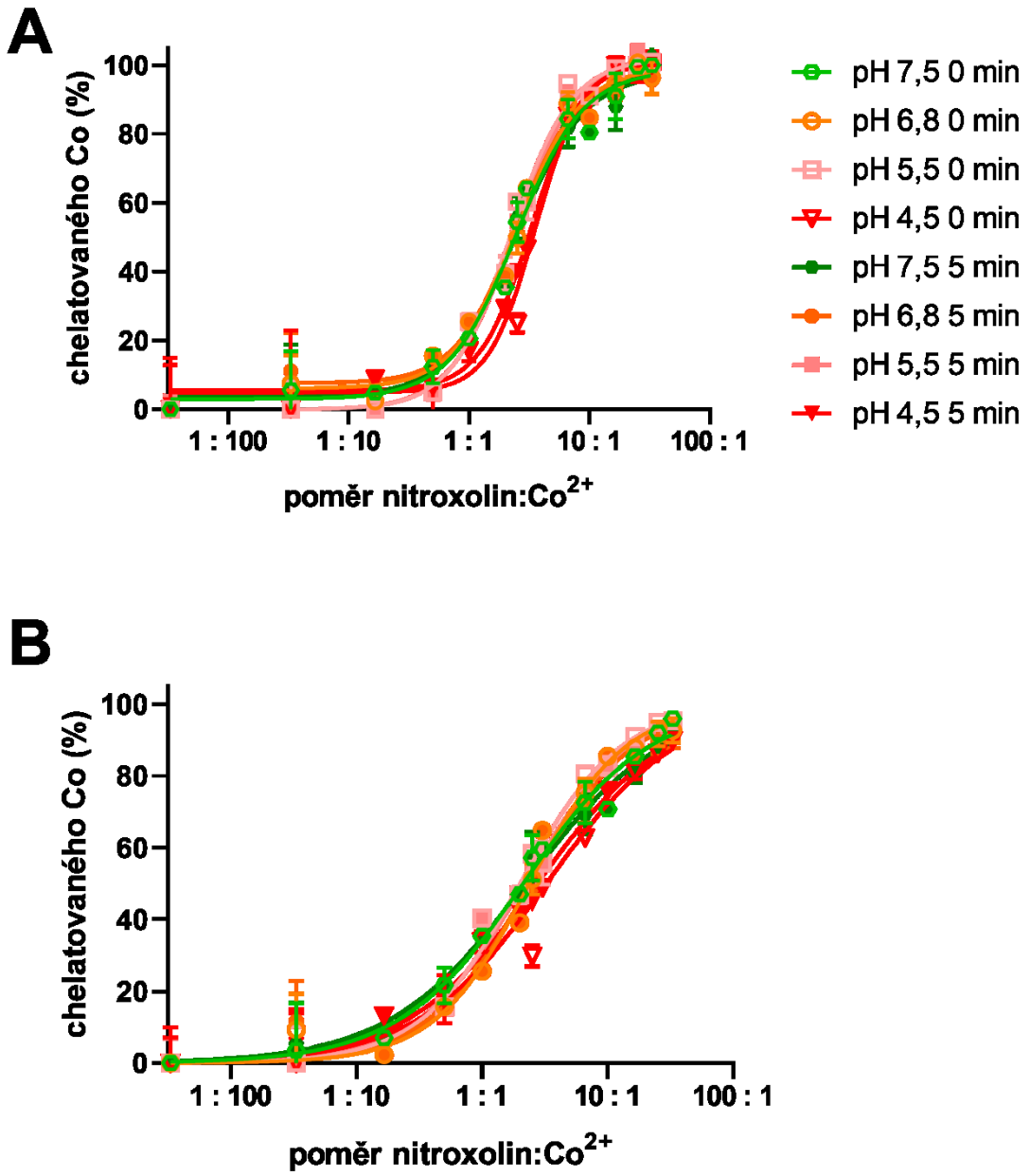
Obr. 17 – Stabilita absorbance činidel nově naředěných a činidel připravených 1. dne experimentu při měření ve stejných dnech: Grafy byly připraveny porovnáním spekter A_0+C_0, B_0+D_0 oproti spektrům A_1+C_1, B_1+D_1 ze stejného dne měření**: A:** den 14; **B:** den 21; **C:** den 28; **D:** den 35; **E:** den 41; **F:** den 49; **G:** den 56.

6.5 TESTOVÁNÍ POTENCIÁLNÍCH CHELÁTORŮ KOBALTU

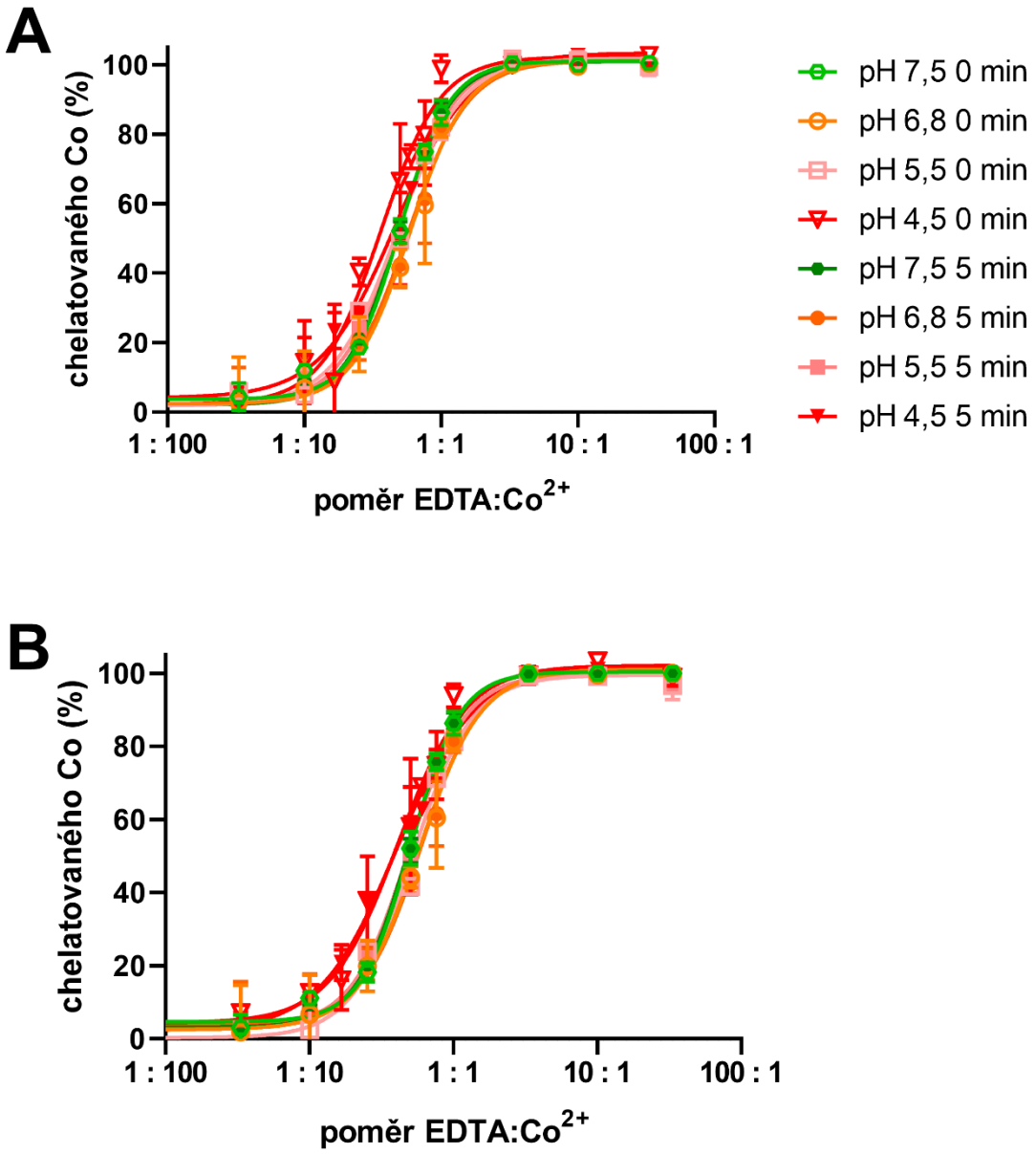
Pro ověření vhodnosti metodiky bylo vybráno pět známých chelátorů kovů – tři syntetické: 8-hydroxychinolin (8HQ), nitroxolin, disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové (Na_2EDTA) (**Obr. 18-20**) a dva flavonoidy: kvercetin a baikalein (**Obr. 21 a 22**). U všech byla chelatace stanovena podle volných, tj. nezchelatovaných iontů kobaltu při dvou vybraných vlnových délkách (490 a 540 nm) ve čtyřech různých pH prostředích (pH 4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) a čase 0 a 5 minut. Z testovaných chelátorů se jako nejsilnější jeví Na_2EDTA. V poměru 1:1 EDTA:Co^{2+} dosáhla cca 66% chelatace, to naznačuje, že tvoří komplex 3:2. I u ostatních testovaných látek byla v poměru 1:1 znatelná chelatace při obou měřených vlnových délkách (490 a 540 nm). Na druhou stranu, tato míra chelatace byla u těchto dalších látek relativně malá – při vyšších pH u nitroxolinu cca 20-25%, u 8-hydroxychinolinu 40%. Navíc, na rozdíl od Na_2EDTA, bylo u nitroxolinu dosaženo 100% chelatace iontů kobaltu až při poměru více jak 10:1, u 8-hydroxychinolinu jí nebylo dosaženo vůbec. Z tohoto pohledu jde o středně silné chelátory. Naopak kvercetin nevykázal žádnou chelataci a baikalein byl pouze relativně slabým chelátorem, který byl sice schopen navázat přibližně 50% iontů kobaltu, ale až při poměru baikalein:Co^{2+} 10:1 v pH 7,5, 50:1 při pH 6,8 a 5,5, u pH 4,5 nebylo dosaženo ani této míry chelatace.



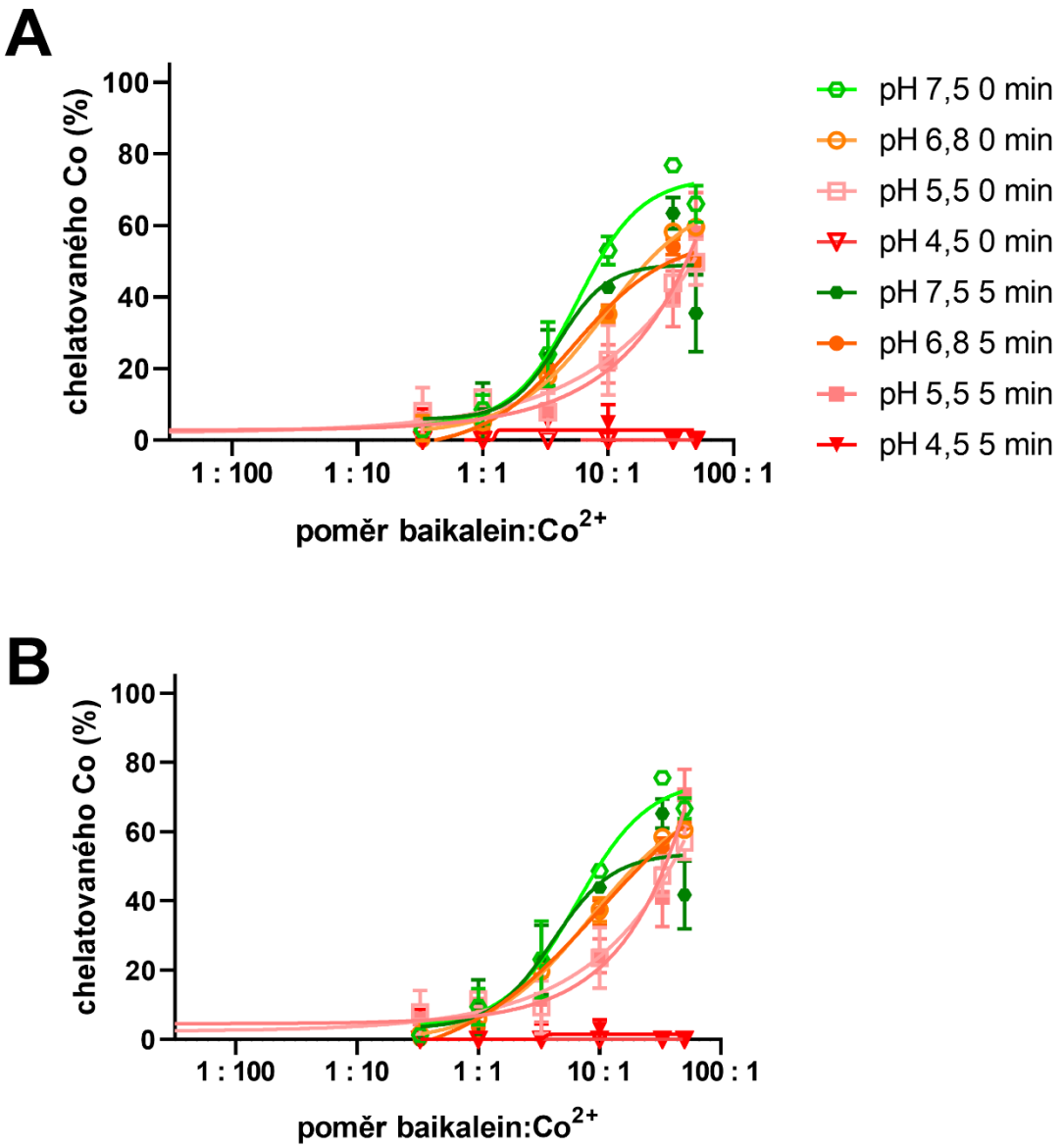
Obr. 18 – Účinnost chelatace kobaltu 8-hydroxychinolinem: Míra chelatace byla vypočítána podle absorbance při dvou vlnových délkách **A:** při 490 nm; **B:** při 540 nm.



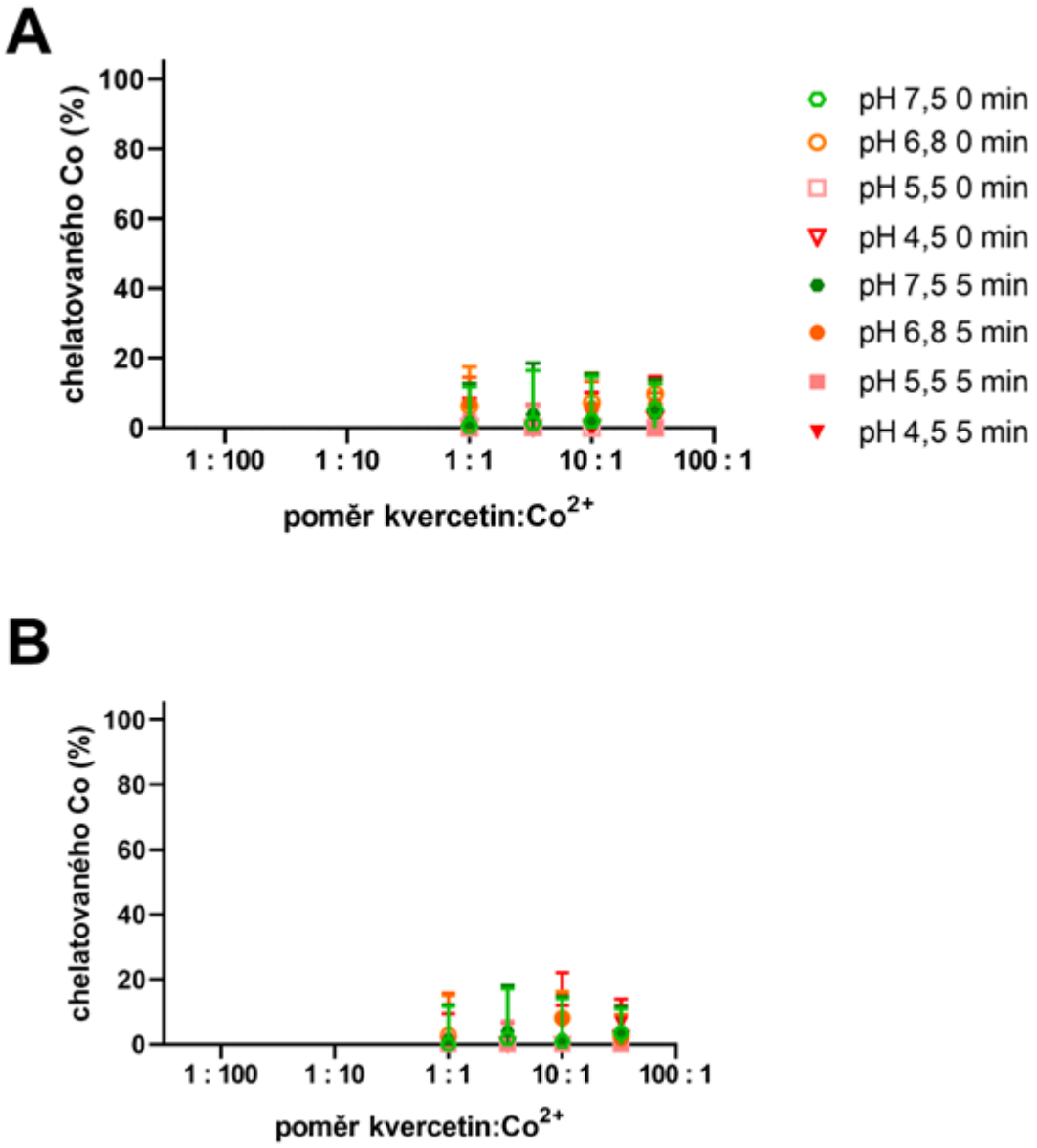
Obr. 19 – Účinnost chelatace kobaltu nitroxolinem: Míra chelatace byla vypočítána podle absorbance při dvou vlnových délkách **A:** při 490 nm; **B:** při 540 nm.



Obr. 20 – Účinnost chelatace kobaltu Na_2EDTA: Míra chelatace byla vypočítána podle absorbance při dvou vlnových délkách **A:** při 490 nm; **B:** při 540 nm.



Obr. 21 – Účinnost chelatace kobaltu baikaleinem: Míra chelatace byla vypočítána podle absorbance při dvou vlnových délkách **A:** při 490 nm; **B:** při 540 nm.



Obr. 22 – Účinnost chelatace kobaltu kvercetinem: Míra chelatace byla vypočítána podle absorbance při dvou vlnových délkách **A:** při 490 nm; **B:** při 540 nm.

7. DISKUSE

Cílem práce bylo připravit spektrofotometrickou detekci jakožto standardizovanou, rychlou, levnou, ale přesnou metodu pro screening potenciálních chelátorů kobaltu. Inspirováno studií *Catapano et al. (2018)* se podařilo vyvinout metodu, která je založená na stanovení zbylých nezchelatovaných iontů kobaltu pomocí vhodného indikátoru. Na základě studie *Mahmood et al. (2012)* byl otestován první možný indikátor – ninhydrin. Bylo však zjištěno, že ninhydrin s kobaltem komplex netvoří (**Obr. 9**), nemohl být proto dále použit jako indikátor v dalších měřeních. Tento nález byl překvapením, protože zmíněná publikace přímo popisuje ninhydrin jako vhodný spektrofotometrický indikátor pro kobalt. Vysvětlení není jasné, mohlo jít o přídavek nějakého dalšího činidla, které nebylo v práci specifikováno, nebo o chybnou intepretaci. Pro další testování byl na základě literatury vybrán další možný indikátor – Na_2NFDSA *(Reshetnyak et al. 2012)*. V tomto případě už došlo k jednoznačnému posunu spektra a bylo pokračováno ve studii. Metodiku se povedlo úspěšně standardizovat. Citlivost se jeví jako dobrá. Možnost použít ke stanovení řadu vlnových délek je výhodná, protože některé látky jsou samy zbarvené nebo jsou barevné jejich komplexy, a mohou tak v dané UV-VIS oblasti absorbovat. To je i případ flavonoidů *(Mabry et al. 1970)*. Dobrou zprávou je, že tato metoda je evidentně u flavonoidů použitelná, protože nedošlo k žádné interferenci. Kvercetin vůbec nechelatoval. Pokud by došlo k interferenci, tak by se daly očekávat falešně pozitivní výsledky, ale ty mohou být na základě těchto výsledků vyloučeny. Existuje samozřejmě alternativa k dalšímu ověření, a to použít některý z jiných indikátorů podle literatury jako jsou např. thiokyanatan amonný *(Young a Hall 1946)*, 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-(diethylamino)fenol *(Sözgen a Tütem 2004)*, dithizon *(Öztürk et al. 2000)*, 1-(2-thiazolylazo)-2-nafthol *(Morandi et al. 2012, Niazi a Yazdanipour 2008)* a xylenolová oranž *(Guo et al. 2017)*.

Citlivost indikátoru byla paradoxně vyšší při nižší koncentraci – 300 μM Na_2NFDSA než u 1000 μM indikátoru. Důvodem asi bude, že v nižší koncentraci nebyla v oblasti ideálních vlnových délek pro účely této studie pozorována žádná absorbance, zatímco při použití vyšší koncentrace může pík vlastního indikátoru mírně zasahovat i do těchto vlnových délek a snižovat tak citlivost metodiky.

Při posuzování stability činidel – $CoCl_2$ a Na_2NFDSA se ukázalo, že se absorbance oproti prvnímu dni měření (den 0) spíše nepatrně zvyšovaly, ale při porovnání oproti novým vzorkům ze stejného dne se ukázala stabilita reagencií po celou dobu testování, tj. 56 dní. Vzhledem k době měření stability (březen až květen) lze předpokládat, že absorbance závisí na teplotě. Testování se odehrávalo sice jen v prostředí pH 7,5, ale šlo o stabilitu, tak je velmi pravděpodobné, že obdobné výsledky platí i pro další pH (4,5; 5,5 a 6,8). Toto ověření má důležitý ekonomický dopad, protože není potřeba neustále připravovat nové vzorky a vyhazovat zbytky nepoužitých.

V posledním kroku byla metodika ověřena na známých chelátorech. Ze zkoušených chelátorů se jako nejsilnější jevila EDTA, respektive její disodná sůl, která v poměru 1:1 EDTA:Co^{2+} dosáhla 66% chelatace. Její slabinou však je, že není selektivním chelátorem, ale dokáže na sebe navázat i další kovy *(Catapano et al. 2018, Říha et al. 2013)*. Další dvě testované látky – 8-hydroxychinolin a nitroxolin, které jsou odvozeny od dusíkaté heterocyklické sloučeniny chinolinu, lze označit za středně silné chelátory. Nitroxolin, derivát 8HQ, jenž má navíc nitroskupinu v poloze 5, je silnějším chelátorem než samotný 8-hydroxychinolin, který nedosáhl 100% chelatace ani při vyšším poměru 8HQ:Co^{2+}. Nicméně, i 8-hydroxychinoliny patří mezi neselektivní chelátory *(Říha et al. 2013)*. Baikalein, flavon s třemi hydroxyskupinami, konkrétně v poloze 5, 6 a 7, sice vykázal silnou chelatační schopnost pro železo, srovnatelnou s klinicky používaným deferoxaminem *(Mladěnka et al. 2011)*, a pro měď *(Říha et al. 2014)*, ale kobaltových iontů na sebe navázal přibližně pouze 50%, a to až při poměru 10:1 v pH 7,5, 50:1 při pH 6,8 a 5,5, u pH 4,5 nedosáhl ani tohoto stupně chelatace. Druhým testovaným flavonoidem byl výše zmíněný kvercetin, flavonol s navázanými hydroxyskupinami v poloze 3, 5, 7, 3´ a 4´, který je rovněž jako baikalein silným chelátorem železa, ale pouze při neutrálním nebo slabě kyselém pH *(Mladěnka et al. 2011)*. Dokáže vytvořit komplex i s mědí v poměru 1:1 nebo 1:2 kvercetin:měď *(Říha et al. 2014)*. Ani jedna z pěti testovaných chelatačních látek není vůči kobaltu selektivní. Chelatační terapie je však považována za vhodnou léčbu při intoxikaci kobaltem, proto stále existuje potřeba najít selektivní chelátor kobaltu.

U testovaných chelatačních látek by bylo vhodné otestovat podobně jako ve studii *Catapano et al. (2019)* jejich potenciál podnítit tvorbu hydroxylových radikálů prostřednictvím Fentonovy reakce, tedy ověřit, zda nemůže být vazba na kobalt spíše nevýhodná, a zjistit jejich stechiometrii. Tyto studie budou probíhat v budoucnu, skupině se již totiž podařilo standardizovat metodiku pro kobalt vázanou Fentonovou reakci a má k dispozici ověřené metodiky na stanovení stechiometrie komplexu *(Filipský et al. 2013)*.

8. ZÁVĚR

Závěrem lze tedy shrnout, že se podařilo připravit spektrofotometrickou detekci jakožto standardizovanou, rychlou, levnou, ale přesnou metodu pro screening potenciálních chelátorů kobaltu, která je založená na stanovení zbylých nezchelatovaných iontů kobaltu pomocí spektrofotometrického indikátoru kobaltu Na_2NFDSA.

Ideální vlnové délky pro všechna pH (4,5; 5,5; 6,8 a 7,5) byly stanoveny v rozmezí 470 až 540 nm. Bylo zjištěno, že citlivost indikátoru je vyšší u nižší koncentrace Na_2NFDSA (300 μM) – při pH 4,5 byla citlivost metody 500 nM a při vyšších pH byla metoda ještě více senzitivní, a používaná činidla $CoCl_2$ a Na_2NFDSA byla stabilní po celou dobu měření, tj. 56 dní.

Ze zkoušených chelátorů kobaltu je nejsilnější Na_2EDTA. 8-hydroxychinolin a nitroxolin jsou středně silnými chelátory. Baikalein je pouze relativně slabým chelatačním činidlem a kvercetin nevykázal žádnou schopnost navázat na sebe kobalt.

9. LITERATURA

ALINAGHI F., BENNIKE N.H., EGEBERG A., THYSSEN J.P., JOHANSEN J.D. Prevalence of contact allergy in the general population: A systematic review and meta-analysis. Contact Dermatitis 2019; 80: 77-85.

CATAPANO M.C., TVRDÝ V., KARLÍČKOVÁ J., MERCOLINI L., MLADĚNKA P. A simple, cheap but reliable method for evaluation of zinc chelating properties. Bioorganic Chemistry 2018; 77: 287-292.

CATAPANO M.C., PROTTI M., FONTANA T., MANDRIOLI R., MLADĚNKA P., MERCOLINI L. An Original HPLC Method with Coulometric Detection to Monitor Hydroxyl Radical Generation via Fenton Chemistry. Molecules 2019; 24: 3066.

DEVLIN J.J., POMERLEAU A.C., BRENT J., MORGAN B.W., DEITCHMAN S., SCHWARTZ M. Clinical Features, Testing, and Management of Patients with Suspected Prosthetic Hip-Associated Cobalt Toxicity: a Systematic Review of Cases. Journal of Medical Toxicology 2013; 9: 405-415.

FERNANDEZ M.T., MIRA M.L., FLORÊNCIO M.H., JENNINGS K.R. Iron and copper chelation by flavonoids: an electrospray mass spectrometry study. Journal of Inorganic Biochemistry 2002; 92: 105–111.

FILIPSKÝ T., ŘÍHA M., HRDINA R., VÁVROVÁ K., MLADĚNKA P. Mathematical calculations of iron complex stoichiometry by direct UV–Vis spectrophotometry. Bioorganic Chemistry 2013; 49: 1–8.

FINLEY B.L. et al. 31-Day Study of Cobalt(II) Chloride Ingestion in Humans: Pharmacokinetics and Clinical Effects. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A 2013; 76: 1210-1224.

FOX K.A., PHILLIPS T.M., YANTA J.H., ABESAMIS M.G. Fatal cobalt toxicity after total hip arthroplasty revision for fractured ceramic components. Clinical Toxicology 2016; 54(9): 874-877.

GRANT M.L., KARP J.K., PALLADINO M., LE N., HALL N., HERMAN J.H. Does therapeutic plasma exchange have a role in the treatment of prosthetic hip-associated cobalt toxicity? A case report and literature review. Transfusion 2016; 56: 2368-2373.

GUO Y. et al. Simultaneous spectrophotometric determination of trace copper, nickel and cobalt ions in water samples using solid phase extraction coupled with partial least squares approaches. Spectrochimia Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 2017; 173: 532-536.

HANNA P.M., KADIISKA M.B., MASON R.P. Oxygen-Derived Free Radical and Active Oxygen Complex Formation from Cobalt(II) Chelates in Vitro. Chemical Research in Toxicology 1992; 5: 109-115.

JOMOVA K., VALKO M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. Toxicology 2011; 283: 65-87.

KASPRZAK K.S. Oxidative DNA and Protein Damage in Metal-Induced Toxicity and Carcinogenesis. Free Radical Biology and Medicine 2002; 32(10): 958-967.

KNEZ D. et al. Structure-based development of nitroxoline derivatives as potential multifunctional anti-Alzheimer agents. Bioorganic & Medicinal Chemistry 2015; 23: 4442–4452.

KUMAR S., PANDEY A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. The Scientific World Journal 2013. Article ID: 162750.

LEONARD S. et al. Cobalt-mediated generation of reactive oxygen species and its possible mechanism. Journal of Inorganic Biochemistry 1998; 70: 239-244.

LEYSSENS L., VINCK B., VAN DER STRAETEN C., WUYTS F., MAES L. Cobalt toxicity in humans – A review of the potential sources and systemic health effects. Toxicology 2017; 387: 43-56.

LLOBET J.M., DOMINGO J.L., CORBELLA J. Comparison of Antidotal Efficacy of Chelating Agents upon Acute Toxicity of Co(II) in Mice. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 1985; 50(2): 305-308.

LLOBET J.M., DOMINGO J.L., CORBELLA J. Comparative Effects of Repeated Parenteral Administration of Several Chelators on the Distribution and Excretion of Cobalt. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology 1988; 60(2): 225-233.

MABRY T.J., MARKHAM K.R., THOMAS M.B. The Ultraviolet Spectra of Flavones and Flavonols. In: The Systematic Identification of Flavonoids. Springer, Berlin 1970: 41-61.

MAHMOOD K. et al. Spectrophotometric estimation of cobalt with ninhydrin. Saudi Journal of Biological Sciences 2012; 19: 247-250.

MAO Y., LIU K.J., JIANG J.J., SHI X. Generation of Reactive Oxygen Species by Co(II) from H_2O_2 in the Presence of Chelators in Relation to DNA Damage and 2'-deoxyguanosine Hydroxylation. Journal of Toxicology and Environmental Health 1996; 47: 61-75.

MLADĚNKA P., ZATLOUKALOVÁ L., FILIPSKÝ T., HRDINA R. Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. Free Radical Biology & Medicine 2010; 49: 963-975.

MLADĚNKA P. et al. In vitro analysis of iron chelating activity of flavonoids. Journal of Inorganic Biochemistry 2011; 105: 693-701.

MORADI R., JAMEH-BOZORGHI S., NIAZI A. Extraction and Simultaneous Determination Ions Copper and Cobalt by Spectrophotometric and Chemometrics Methods. APCBEE Procedia 2012; 3: 65-69.

MORRISON A.B., CAMPBELL J.A. Trace Elements in Human Nutrition. Canadian Medical Association Journal 1963; 88: 523-527.

NIAZI A., YAZDANIPOUR A. Simultaneous spectrophotometric determination of cobalt, copper and nickel using 1-(2-thiazolylazo)-2-naphtol by chemometrics methods. Chinese Chemical Letters 2008; 19: 860-864.

OLIVERI V., GIUFFRIDA M.L., VECCHIO G., AIELLO C., VIALE M. Gluconjugates of 8-hydroxyquinolines as potential anti-cancer prodrugs. Dalton Transactions 2012; 41: 4530-4535.

ÖZTÜRK B.D., FILIK H., TÜTEM E., APAK R. Simultaneous derivative spectrophotometric determination of cobalt(II) and nickel(II) by dithizone without extraction. Talanta 2000; 53: 263-269.

PACKER M. Cobalt Cardiomyopathy: A Critical Reappraisal in Light of a Recent Resurgence. Circulation: Heart Failure 2016; 9: e003604.

PAUSTENBACH D.J., TVERMOES B.E., UNICE K.M., FINLEY B.L., KERGER B.D. A review of the health hazards posed by cobalt. Critical Reviews in Toxicology 2013; 43(4): 316-362.

PAZZAGLIA U.E., APOSTOLI P., CONGIU T., CATALANI S., MARCHESE M., ZARATTINI G. Cobalt, chromium and molybdenum ions kinetics in the human body: data gained from a total hip replacement with massive third body wear of the head and neuropathy by cobalt intoxication. Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery 2011; 131: 1299-1308.

PELCLOVA D., SKLENSKY M., JANICEK P., LACH K. Severe cobalt intoxication following hip replacement revision: Clinical features and outcome. Clinical Toxicology 2012; 50: 262-265.

PRACHAYASITTIKUL V., PRACHAYASITTIKUL S., RUCHIRAWAT S., PRACHAYASITTIKUL V. 8-Hydroxyquinolines: a review of their metal chelating properties and medicinal applications. Drug Design, Development and Therapy 2013; 7: 1157-1178.

RESHETNYAK E.A., IVCHENKO N.V., NIKITINA N.A. Photometric determination of aqueous cobalt (II), nickel (II), copper (II) and iron (III) with 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid disodium salt in gelatin films. Central European Journal of Chemistry 2012; 10(5): 1617-1623.

RITCHIE C.W. et al. Metal-Protein Attenuation With Iodochlorhydroxyquin (Clioquinol) Targeting Aβ Amyloid Deposition and Toxicity in Alzheimer Disease. A Pilot Phase 2 Clinical Trial. Archives of Neurology 2003; 60: 1685-1691.

ŘÍHA M., KARLÍČKOVÁ J., FILIPSKÝ T., MACÁKOVÁ K., HRDINA R., MLADĚNKA P. Novel method for rapid copper chelation assessment confirmed low affinity of D-penicillamine for copper in comparison with trientine and 8-hydroxyquinolines. Journal of Inorganic Biochemistry 2013; 123: 80-87.

ŘÍHA et al. In vitro evaluation of copper-chelating properties of flavonoids. RSC Advances 2014; 4: 32628-32638.

SHAPER A.G. Cardiovascular disease and trace metals. Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences 1979; 205: 135-143.

SHI X., DALAL N.S., KASPRZAK K.S. Generation of Free Radicals from Model Lipid Hydroperoxides and H_2O_2 by Co(II) in the Presence of Cysteinyl and Histidyl Chelators. Chemical Research in Toxicology 1993; 6: 277-283.

SÖZGEN K., TÜTEM E. Second derivative spectrophotometric method for simultaneous determination of cobalt, nickel and iron using 2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-diethylaminophenol. Talanta 2004; 62: 971-976.

TVERMOES B.E., FINLEY B.L., UNICE K.M., OTANI J.M., PAUSTENBACH D.J., GALBRAITH D.A. Cobalt whole blood concentrations in healthy adult male volunteers following two-weeks of ingesting a cobalt supplement. Food and Chemical Toxicology 2013; 53: 432-439.

VAN HAU T. et al. Repurposing of Nitroxoline Drug for the Prevention of Neurodegeneration. Chemical Research in Toxicology 2019; 32: 2182−2191.

YOUNG R.S., HALL A.J. Colorimetric Determination of Cobalt with Ammonium Thiocyanate. Industrial and Engineering Chemistry Analytical Edition 1946; 18(4): 264-266.