

**ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ  
И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**  
**CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF MEDICINAL COMPOUNDS  
AND BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-4-318-336>



УДК 543.06

**ОБЗОРНАЯ СТАТЬЯ**

**Биологические функции кобальта, токсикология  
и обнаружение в антидопинговом контроле**

**И.В. Пронина<sup>1,2,@</sup>, Е.С. Мочалова<sup>1</sup>, Ю.А. Ефимова<sup>3</sup>, П.В. Постников<sup>1,@b</sup>**

<sup>1</sup>Национальная антидопинговая лаборатория (Институт), Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 105005 Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва, 125315 Россия

<sup>3</sup>МИРЭА – Российский технологический университет (Институт тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова), Москва, 119571 Россия

@ Автор для переписки, e-mail: <sup>a</sup>[pronina@dopingtest.ru](mailto:pronina@dopingtest.ru), <sup>b</sup>[postnikov@dopingtest.ru](mailto:postnikov@dopingtest.ru)

**Аннотация**

**Цели.** В последнее десятилетие чрезвычайную популярность в спорте высших достижений приобрели стимуляторы кроветворения. Этот факт подтверждают и участившиеся громкие допинговые скандалы, связанные с их употреблением. Соли кобальта относятся к данному классу веществ, их использование приводит к увеличению кислородной емкости крови и к мощной стимуляции обменных процессов, что дает несомненные конкурентные преимущества. Применение солей кобальта регламентировано в соответствии с Запрещенным списком Всемирного антидопингового агентства. В настоящее время проблематике выявления злоупотреблений солями кобальта в антидопинговом контроле посвящено всего несколько работ. Лишь единичные лаборатории вводят определение солей кобальта в свою методологическую базу. Цель данного обзора состоит в том, чтобы обратить внимание научного сообщества на токсичность соединений кобальта, последствия их приема, фармакокинетику, проблематику и способы обнаружения ввиду их доступности на современном рынке и участившихся случаев злоупотребления ими.

**Результаты.** В представленном обзоре рассмотрены основные биологические функции кобальта и клеточные уровни воздействия, токсичность и симптоматика при отравлении его солями. Обобщены и систематизированы литературные данные по основным

используемым методам идентификации кобальта как допингового агента. Особое внимание уделено содержанию кобальта в биологически-активных добавках, при приеме которых спортсмен может сдать положительный допинг-тест на кобальт.

**Выводы.** На основе анализа перспективных подходов и методов определения кобальта, сделан вывод о несомненном преимуществе высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазмой для детекции кобальта как допингового агента. Отсутствие четких требований к методам идентификации со стороны ВАДА и обязательности определения кобальта, несомненно, делает привлекательным прием его солей недобросовестными спортсменами. Ввиду этого существует необходимость внедрения вышеуказанного метода в практику антидопинговых лабораторий в ближайшем будущем.

**Ключевые слова:** стимуляторы кроветворения, кобальт, БАД, HIF, антидопинговый контроль, масс-спектрометрия

*Для цитирования:* Пронина И.В., Мочалова Е.С., Ефимова Ю.А., Постников П.В. Биологические функции кобальта, токсикология и обнаружение в антидопинговом контроле. *Тонкие химические технологии.* 2021;16(4):318–336. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-4-318-336>

## REVIEW ARTICLE

# Biological functions of cobalt and its toxicology and detection in anti-doping control

Irina V. Pronina<sup>1,2,@a</sup>, Elena S. Mochalova<sup>1</sup>, Yuliya A. Efimova<sup>3</sup>, Pavel V. Postnikov<sup>1,@b</sup>

<sup>1</sup>National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University, Moscow, 105005 Russia

<sup>2</sup>Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, 125315 Russia

<sup>3</sup>MIREA – Russian Technological University (M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies), Moscow, 119571 Russia

@Corresponding author, e-mail: <sup>a</sup>[pronina@dopingtest.ru](mailto:pronina@dopingtest.ru), <sup>b</sup>[postnikov@dopingtest.ru](mailto:postnikov@dopingtest.ru)

### Abstract

**Objectives.** Over the last decade, hematopoietic stimulants have grown increasingly popular in elite sports. This is supported by the growing number of high-profile doping scandals linked to their use. A group of these stimulants includes cobalt salts, which cause an increase in the oxygen capacity of the blood as well as a powerful stimulation of metabolic processes, resulting in noticeable competitive advantages. The use of cobalt salts is regulated according to the Prohibited List of the World Anti-Doping Agency (WADA). Currently, only a few works have been dedicated to solving the problem of detecting the abuse of cobalt salts in anti-doping control. Only a few laboratories have included cobalt salt determination in their methodological bases. The purpose of this review is to attract the attention of the scientific community to the toxicity of cobalt compounds, consequences of their intake, and pharmacokinetics, as well as the problems in their detection methods due to their widespread availability in the modern market and the growing number of abuse cases.

**Results.** The main biological functions of cobalt, cellular levels of exposure, toxicity, and symptoms of cobalt salt poisoning are presented in detail in this review article. The data from the literature on the main methods for detecting cobalt as a doping agent have been generalized and systematized. There is a major focus on the amount of cobalt in dietary supplements that could cause an athlete to test positive for cobalt when they are consumed.

**Conclusions.** After analyzing promising cobalt detection approaches and methods, it was determined that high-performance liquid chromatography in combination with inductively coupled plasma mass spectrometry has an undeniable advantage for detecting cobalt as a doping agent. The lack of explicit WADA requirements for detection methods and the lack of its obligation to determine cobalt make it tempting for unscrupulous athletes to use its salts. Therefore, anti-doping laboratories must implement the abovementioned method as soon as possible.

**Keywords:** hematopoietic stimulants, cobalt, biological functions, dietary supplements, HIF, anti-doping control, toxic effect, mass spectrometry

**For citation:** Pronina I.V., Mochalova E.S., Efimova Yu.A., Postnikov P.V. Biological functions of cobalt and its toxicology and detection in anti-doping control. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2021;16(4):318–336 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-4-318-336>

## ВВЕДЕНИЕ

В течение многих десятилетий хлорид кобальта(II) эффективно использовался для терапевтического лечения анемий различного происхождения. Однако, кобальт и его соединения в высоких дозах весьма токсичны<sup>1</sup> и являются сильнейшими неорганическими ядами. Сульфат кобальта, например, обладает канцерогенным [1, 2] и мутагенным действием. Выявленные со временем побочные эффекты препаратов кобальта и последовавшее однозначное признание его в качестве канцерогена полностью исключили кобальт из списка современных клинически значимых стимуляторов эритропоэза и ограничивают его использование в экспериментах. Одновременно с этим, доступность препаратов на фармацевтическом рынке, удобный способ перорального применения, мощная стимуляция эритропоэза и тот факт, что валидированные методы определения растворимых солей кобальта в моче человека обычно не включаются в методологический арсенал современного антидопингового анализа, приводят к возникновению проблемы выявления факта применения кобальта в качестве допингового агента. Предполагаемое злоупотребление хлоридом кобальта в качестве допинга неоднократно обсуждалось ранее [3–5]. Антидопинговые правила, в данном случае, не только способствуют честной

конкуренции в спорте, но и выполняют задачу защиты спортсменов от воздействия веществ, опасность которых может быть недооценена. Согласно Запрещенному списку Всемирного антидопингового агентства (ВАДА) 2021 г. применение спортсменами солей кобальта жестко регламентируется в соответствии со статьей S2 «Пептидные гормоны, факторы роста, подобные субстанции и миметики», пунктом 1.2 «активаторы гипоксия-индуцируемого фактора (HIF)».

### Биологические функции кобальта как микроэлемента

Кобальт – природный микроэлемент со свойствами, подобными свойствам железа и никеля, вызывает заметный и стабильный полицитемический ответ [6, 7] посредством более эффективной транскрипции гена эритропоэтина. Действие хлорида кобальта в количестве 120 или 150 мг/день приводит к значительному увеличению (до 20%) гематокрита и гемоглобина в сравнении с их уровнями до приема препарата [7]. Поэтому, учитывая естественную склонность некоторых спортсменов экспериментировать с инновационными, незаконными и потенциально вредными для здоровья допинговыми средствами и методами, введение хлорида кобальта может вскоре стать наиболее подходящим дополнением или замещением для веществ, стимулирующих эритропоэз. Тем не менее, введение хлорида кобальта не лишено небезопасных последствий, которые включают токсическое воздействие на сердце, печень, почки, щитовидную железу и развитие онкологических процессов [2, 5].

Основной биологической ролью кобальта считается его присутствие в молекуле витамина B12 (цианокобаламина), в которой массовая доля кобальта составляет около 4%. Витамин B12 необходим для нормального функционирования нервной системы и принимает участие в процессе кроветворения.

<sup>1</sup> Нормы физиологических потребностей в энергии и пищевых веществах для различных групп населения Российской Федерации. Методические рекомендации. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2009. 36 с. [Normy fiziologicheskikh potrebnosti v energii i pishchevykh veshchestvakh dlya razlichnykh grupp naseleniya Rossiiskoi Federatsii. Metodicheskie rekomendatsii (Norms of physiological needs for energy and nutrients for various groups of the population of the Russian Federation. Guidelines). Moscow: Federal'nyi tsentr gigieny i epidemiologii Rospotrebnadzora; 2009. 36 p. (in Russ.)]

Недостаток кобальта приводит, в частности, к злокачественной (пернициозной) анемии у человека, так называемой болезни Адиссона-Бирмера. Количественное определение кобальта играет важную роль при дифференциации В12-дефицитной анемии от фолиеводефицитной, при которой концентрация кобальта в крови находится в пределах нормы. Однако чаще количественное определение кобальта в крови в клинической медицине применяется для выявления интоксикации, а не дефицита, поскольку дефицит кобальта, по мнению многих ученых, соответствует недостаточности витамина В12.

В меньшей степени известно, что кобальт является коферментом и входит в активный центр ряда жизненно важных ферментов организма человека: рибонуклеозидтрифосфатредуктазы (КФ 1.4.3.8), метилтрансферазы (КФ 2.1.1.13), метилмалонил-СоА-мутаза (КФ 5.4.99.2), метилмалонил-СоА-карбоксилтрансферазы (КФ 2.1.3.1), пропионил-СоА-карбоксилазы (КФ 6.4.1.3) [8]. Кобальт может выступать в качестве кофермента также в составе некоторых пирофосфатаз, пептидаз, аргиназы [9]. Есть сведения о возможном влиянии кобальта на активность ферментов, в частности, аденилатциклазы и ряда других [10, 11]. Особое влияние он оказывает на ферменты метаболизма гема [12].

Физиологические и патофизиологические эффекты кобальта разнообразны. Существуют данные о влиянии его на метаболизм углеводов и липидов, на функцию щитовидной железы, состояние миокарда. Кобальт внесен в перечень канцерогенных агентов IARC (Агентства по исследованию рака Международной Организации Здравоохранения), однако, некоторые его комплексные соединения оказывают противоопухолевое действие [13]. Он токсичен, в то же время сам, за счет образования прочных связей с циан-ионом, может выступать в качестве антидота при интоксикации цианидами [14]. Есть сведения об эпилептогенном действии кобальта. Ряд работ первой половины XX века свидетельствуют о влиянии кобальта на артериальное давление и тонус сосудов [15, 16].

Человек получает неорганический кобальт с пищей. Кобальт в достаточном количестве для суточной потребности организма содержится в рыбе и морепродуктах, печени, почках, орехах, грибах, овощах и фруктах. Согласно исследованиям, проведенным на здоровых людях, в желудочно-кишечном тракте всасывается 5–20% поступающего с пищей неорганического кобальта при пероральном приеме от 1 мкг до 1.2 мг хлорида кобальта. Всасывание растворимого кобальта выше у женщин, чем у мужчин [17]. Период полувыведения не установлен.

Исследования на крысах с изотопом  $^{57}\text{Co}^{2+}$ , добавленным в питьевую воду, показывают, что ион  $\text{Co}^{2+}$  накапливается главным образом в печени,

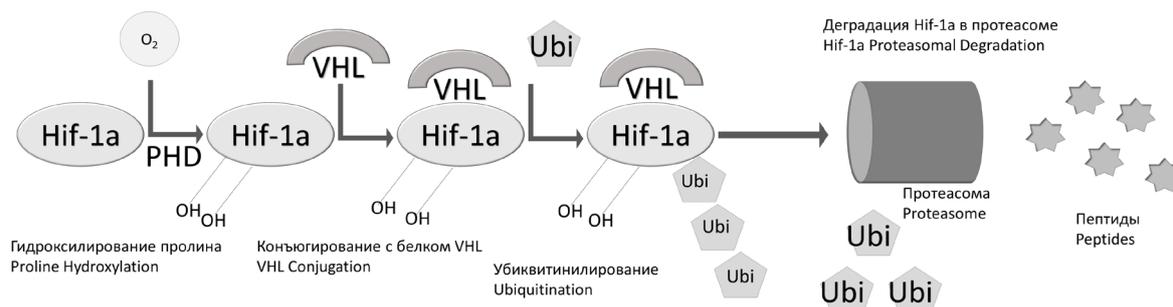
легких и почках [18], а также поджелудочной железе и селезенке [10, 19, 20]. В крови человека содержание кобальта составляет в среднем 0.238 мг/кг, при этом в эритроцитах оно варьирует от 0.059 до 0.13, а в сыворотке от 0.0055 до 0.40 мг/кг. Его излишки на 86% экскретируются почками и на 14% кишечником. Также концентрация кобальта в крови варьирует в зависимости от сезона и времени суток, что связано с особенностями питания человека.

#### *Клеточный уровень воздействия кобальта*

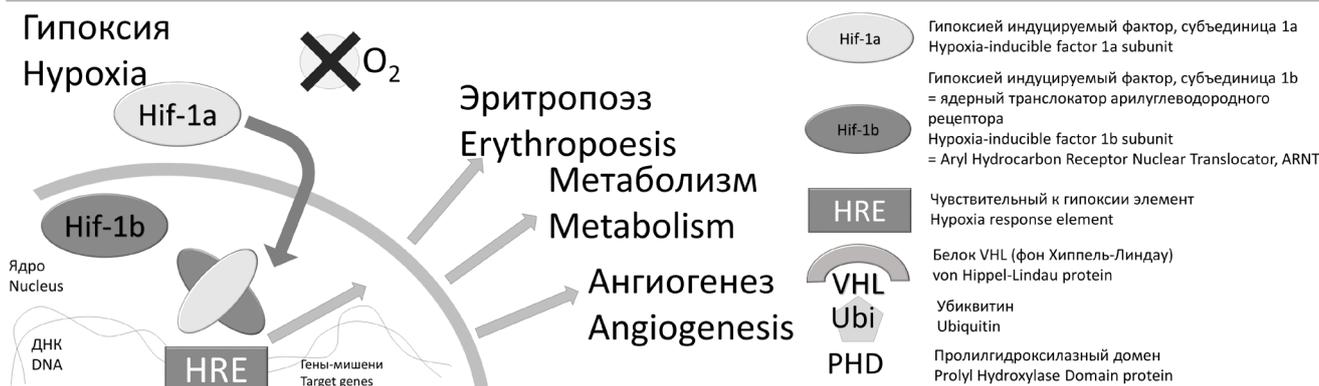
Ген эритропоэтина регулируется наличием/отсутствием кислорода под контролем фактора транскрипции HIF-1. Показано, что после того, как сигнал о понижении концентрации кислорода в окружающей клетки среде принят, в клетке начинается цепь событий, ключевым из которых является связывание так называемого индуцируемого гипоксией фактора 1 (Hypoxia-inducible factor 1, HIF-1) с чувствительным к гипоксии элементом (Hypoxia-response element, HRE), являющимся частью энхансера гена эритропоэтина [21–26]. HIF-1 принадлежит к семейству транскрипционных факторов BHLH (basic-helix-loop-helix) и состоит из двух субъединиц HIF-1a и HIF-1b [14, 26]. HIF-1a является ключевым регулятором клеточного и системного кислородного гомеостаза благодаря повышению активности связывания с последовательностью ДНК гена-мишени эритропоэтина при гипоксии. В нормоксических условиях главный медиатор HIF-1a быстро расщепляется протеасомой [26] (см. рисунок). Известно, что необходимым кофактором для активности пролил-гидролаз в протеасоме является ион железа  $\text{Fe}^{2+}$ , обратимо связанный с активным центром этих металлоферментов [27]. Следовательно, снижение доступности железа путем конкурентного замещения ионами кобальта  $\text{Co}^{2+}$  приводит к ингибированию активности фермента [28, 29]. При гипоксии или введении хлорида кобальта, имитирующего гипоксию, деградация HIF-1a заметно ингибируется. Как следствие, HIF-1a связывается с HIF-1b, проникает сквозь ядерную мембрану и в составе HRE мощно активирует транскрипцию гена эритропоэтина [26].

Удобной моделью для исследования закономерностей индукции гипоксией экспрессии гена эритропоэтина *in vitro* оказались культуры клеток гепатобластомы человека Hep3В и HepG2 [11]. Согласно представлениям авторов гипотезы, роль кислородного сенсора в клетках играет молекула гемопротейна, конформация которой зависит от парциального давления кислорода в среде, в которой находятся эритропоэтин-продуцирующие клетки. Если парциальное давление кислорода низкое, гемопротейн переходит в дезокси-конформацию и тем самым запускает цепь молекулярных событий, в конце концов, приводящих к экспрессии гена эритропоэтина.

## Нормоксия Normoxia



## Гипоксия Hypoxia



Действие HIF при нормальном парциальном давлении кислорода – нормоксия в клетке и при кислородной недостаточности – гипоксия (аналогично действию препаратов кобальта).

The effect of HIF at normal partial pressure of oxygen is normoxia in the cell and at oxygen deficiency is hypoxia (similar to the effect of cobalt preparations).

В условиях достаточно высокого парциального давления кислорода молекула гемопротейна находится в неактивной окси-конформации и не стимулирует продукцию эритропоэтина. Существенным оказалось то, что хлорид кобальта в рамках этой гипотезы действует через сходные механизмы: атом кобальта вытесняет атом железа из гема сенсорной молекулы и занимает его место, что приводит к «запиранию» гемопротейна в активной дезокси-конформации и экспрессии гена эритропоэтина, как и в условиях гипоксии.

С химической точки зрения кобальт является типичным d-элементом и в соединениях проявляет две степени окисления: +2 (в большинстве соединений) и +3 (в основном, в комплексах). Характерными химическими свойствами d-элементов, находящими отражение в биологии, являются переменные состояния окисления, участие в окислительно-восстановительных реакциях, способность к образованию комплексных ионов, каталитическая активность. Благодаря сходству в размере атома и иона с другими микро- и макроэлементами кобальт способен, помимо оказания собственных биологических эффектов, имитировать или модифицировать действие других элементов [9, 30–32].

Методами квантовой химии была исследована атомная и электронная структура комплексов

металлопорфиринов (MeP) с молекулами кислорода (MeP)–O<sub>2</sub> и воды (MeP)–H<sub>2</sub>O в присутствии имидазола в качестве второго лиганда и без него (имидазольная группа гистидина – это ближайшая к гему функциональная группа глобина) [33]. Исследователи оценили и сравнили сродство ионов железа и кобальта к гему в условиях, имитирующих нормоксию (MeP)–O<sub>2</sub> и гипоксию (MeP)–H<sub>2</sub>O. Вкратце, гипотеза состоит в том, что ионы кобальта могут вытеснять ионы железа из молекул гемопротейнов, в том числе гемоглобина, что изменяет конформацию гема таким же образом, каким ее изменяет низкая концентрация кислорода внутри клетки (гипоксия). Данный механизм объяснил универсальный ответ различных клеток организма на избыток кобальта [34–36] и, как следствие, эритропоэтический эффект действия неорганического кобальта на организм в целом.

Исследователи определили энергию и особенности химической связи, а также изменения пространственной конфигурации гема в условиях гипоксии и при замещении атома железа на атом кобальта [36]. В комплексах железо- и кобальтопорфиринов с молекулой кислорода (O<sub>2</sub>) и молекулой воды (H<sub>2</sub>O) обе молекулы занимают 5-ое координационное положение, а имидазольное кольцо аминокислоты гистидина занимает 6-ое координационное положение. Показано,

что ион кобальта в комплексе с порфирином при наличии в 6-м координационном положении имидазола (имитация глобинового окружения) и присоединении в 5-м координационном положении кислорода (имитация нормоксии) смещается примерно так же, как ион железа при присоединении воды в 5-м координационном положении (имитация гипоксии)<sup>2</sup>. Эти данные объясняют, почему избыток кобальта в организме воспринимается клетками как гипоксия и способствует запуску соответствующих компенсаторных процессов, в число которых входит активация экспрессии гена эритропоэтина<sup>3</sup>.

Следует отметить, что влияние неорганического кобальта на организм не ограничивается стимуляцией эритропоэза. К настоящему времени установлено, что в различных клетках HIF-1 вызывает экспрессию различных белков, то есть адаптация клеток и организма в целом к гипоксии осуществляется универсальным путем – через активацию белков HIF, являющихся транскрипционными факторами для генов. Гены кодируют белки, стимулирующие не только продукцию новых эритроцитов, но и ангиогенез (это может быть основой канцерогенного действия кобальта), то есть образование новых кровеносных сосудов [2], а также гликолиз как способ получения энергии при недостатке или отсутствии кислорода [37–42]. В частности, показано, что посредством HIF-1 при гипоксии стимулируется экспрессия генов ряда ферментов гликолиза [43–46], регуляторов ангиогенеза и тонуса сосудов

<sup>2</sup> Моргулис И.И. Ранняя реакция организма млекопитающего на воздействие хлоридом кобальта: дис. канд. биол. наук. Красноярск: ФИЦ «Красноярский научный центр» СО РАН.; 2006. 112 с. URL: <https://www.disscat.com/content/rannaya-reaktsiya-organizma-mlekovitayushchego-na-vozdeistvie-khloridom-kobalta> (дата обращения 12 мая 2021 г.) [Morgulis I.I. Early reaction of the mammalian organism to exposure to cobalt chloride. Cand. Thesis. Krasnoyarsk: Krasnoyarskii nauchnyi tsentr; 2006. 112 p. URL: <https://www.disscat.com/content/rannaya-reaktsiya-organizma-mlekovitayushchego-na-vozdeistvie-khloridom-kobalta> (accessed May 12, 2021) (in Russ.).]

<sup>3</sup> Постников П.В. Разработка высокочувствительной методики качественного определения гибридного белка эритропоэтина, слитого с FC-частью иммуноглобулина g человека (ЭПО-FC), в образцах сыворотки крови с целью антидопингового контроля: дисс. канд. хим. наук. М.: Московский технологический университет; 2017. 152 с. <https://www.disscat.com/content/razrabotka-vysokochuvstvitelnoimetodiki-kachestvennogo-opredeleniya-gibridnogo-belka-eritro> [Postnikov P.V. Development of a highly sensitive method for the qualitative determination of the hybrid protein erythropoietin fused with the FC-part of human immunoglobulin g (EPO-FC) in blood serum samples for the purpose of anti-doping control. Cand. Thesis. Moscow: Moskovskii tekhnologicheskii universitet; 2017. 152 p. <https://www.disscat.com/content/razrabotka-vysokochuvstvitelnoimetodiki-kachestvennogo-opredeleniya-gibridnogo-belka-eritro> (in Russ.).]

[47–49], трансферрина и его рецептора [50–52], белка, связывающегося с инсулиноподобным фактором роста [53] и некоторыми другими. Подсчитано, что около 5% генома человека находится под контролем HIF-1 и что, кроме генов, контролирующих гликолиз и ангиогенез, мишенями HIF-1 являются также гены, регулирующие клеточный рост, деление, выживание и подвижность клеток [37] (см. рисунок).

Некоторые из HIF-активированных генов кодируют белки, которые могут повышать физическую работоспособность независимо от эритропоэза (например, гликолитические ферменты, переносчики глюкозы, ангиогенные пептиды). В настоящее время накоплены достоверные сведения о влиянии ионов кобальта на биологические процессы в организме, не связанные с синтезом эритроцитов, но способные оказать влияние на спортивные достижения. По этическим соображениям исследования в данной области проводятся, в основном, на животных, однако возможность переноса полученных результатов на человека очевидна даже для неспециалиста. Показано, например, что предварительное введение крысам хлорида кобальта в дозе 12.5 мг/кг массы тела защищало их от высотного отека легких, возникающего при гипоксии, вызванной нахождением в условиях высокогорья [54]. По данным другого исследования на крысах, предварительное скармливание добавки хлорида кобальта увеличивало митохондриальный биогенез, поглощение глюкозы и метаболизм посредством улучшения аэробного клеточного дыхания в скелетных мышцах, что увеличивало физическую работоспособность [55, 56]. А в 2018 г. группой ученых из Германии и США было проведено исследование влияния малых доз кобальта на работоспособность добровольцев при аэробных нагрузках [57]. Ученые обнаружили, что прием добровольцами, ни один из которых не занимался спортом на профессиональном уровне, 5 мг кобальта в день в течение 3-х недель приводил к увеличению выносливости и максимальной силы.

#### **Биологически активные добавки и кобальт**

Профессиональные и, в особенности, элитные спортсмены широко используют различные пищевые добавки. Исследования показывают, что в последние годы конкурентоспособные спортсмены все чаще сталкиваются с запрещенными соединениями в составе доступных на фармацевтическом рынке биодобавок для повышения эффективности тренировок, уровня подготовки к выступлениям и улучшению спортивных характеристик организма в целом. Проблема состоит в том, что производители биодобавок далеко не всегда корректно указывают состав продукта на упаковке, что приводит к обнаружению запрещенных веществ у спортсменов, искренне уверенных в отсутствии таковых в допинг-пробах.

Эта тенденция прослеживается повсеместно [58, 59]. Следует вспомнить, например, о нашумевших сообщениях некоторых антидопинговых агентств, в том числе РУСАДА (Российское антидопинговое агентство), НАДА (Национальное антидопинговое агентство) Республики Беларусь и других о необходимости с осторожностью применять витаминный комплекс «Компливит», в состав которого входит неорганический кобальт. Часто, однако, вещества, стимулирующие эритропоэз (например, эритропоэтин, стабилизаторы HIF), не упоминаются в качестве ингредиентов таких продуктов. Одновременно с этим в последнее время в личном окружении элитных спортсменов обнаруживали смеси запатентованного и потому нераскрытого состава (в том числе, и предназначенные только для ветеринарного использования!) [60].

В работах Гейера [61, 62] предметом исследования на допинг были продукты, открыто рекламируемые с, возможно, законными свойствами, способствующими повышению спортивной эффективности. Эти смеси, конфискованные или приобретенные для тестирования

у интернет-поставщиков Центром профилактических допинг-исследований (Германия) и различными антидопинговыми организациями, с якобы заявленными свойствами улучшения кроветворения, были направлены на биохимический анализ с целью обнаружения эритропоэтина (ЭПО) и его производных, а также низкомолекулярных HIF-стабилизаторов или переходных металлов, таких как кобальт; гормона роста, гормонов, стимулирующих выработку релизинг-факторов гормона роста (GHRH), релизинг-пептидов гормона роста (GHRP), низкомолекулярных органических аналитов, таких как анаболические агенты, стимуляторы,  $\beta_2$ -агонисты и прочие, и отдельных микроэлементов, включая кобальт и никель в соответствии с установленными протоколами. В общей сложности 19 продуктов было подвергнуто различным методам аналитического тестирования, включая газовую и жидкостную tandemную хромато-масс-спектрометрию высокого разрешения (GC-MS, LC-HRMS-MS), гель-электрофорез и масс-спектрометрию с индуктивно-связанной плазмой (ICP-MS), как описано в [59]. Результаты тестирования представлены в таблице.

Анализ присутствия неорганического кобальта в конфискованных и приобретенных у интернет-поставщиков продуктах (по данным Центра профилактических допинг-исследований (Германия) [62])  
 Analysis of the presence of inorganic cobalt in products confiscated and purchased from online suppliers (on data of the Center for Preventive Doping Research, Germany) [62]

Продукт № Product No.	Рекламируемый эффект Advertised effect	Состав продукта (предлагаемый способ введения) Product composition (suggested route of administration)	Компоненты, определенные в продукте, имеющие отношение к допинг-контролю ( $\geq 0.1$ мг/мл) Components identified in the product relevant to doping control ( $\geq 0.1$ mg/mL)	Заявлено на этикетке (Да/Нет) Stated on the label (Yes/No)	Примечание Note
1	Стимуляция эритропоэза Erythropoiesis stimulation	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	Кобальт (0.1 мг/мл) Cobalt (0.1 mg/mL) Никель (7.5 мг/мл) Nickel (7.5 mg/mL)	Нет No Нет No	Обнаружен цианокобаламин около 2.0 мг/мл, что соответствует примерно 90 мкг/мл кобальта Cyanocobalamin is detected (about 2.0 mg/mL), which is about 90 $\mu$ g/mL of cobalt
2	Эритропоэз Erythropoiesis	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	Кобальт (4.8 мг/мл) Cobalt (4.8 mg/mL)	Нет No	Обнаружен цианокобаламин (около 1.7 мг/мл), что составляет около 75 мкг/мл кобальта Cyanocobalamin is detected (about 1.7 mg/mL), which is about 75 $\mu$ g/mL of cobalt
3	Увеличивает поставку кислорода в мышечную ткань Increases oxygen supply to muscle tissue	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	–	–	Состав не определен Composition is not determined

Таблица. Продолжение  
Table. Continued

Продукт № Product No.	Рекламуемый эффект Advertised effect	Состав продукта (предлагаемый способ введения) Product composition (suggested route of administration)	Компоненты, определенные в продукте, имеющие отношение к допинг-контролю ( $\geq 0.1$ мг/мл) Components identified in the product relevant to doping control ( $\geq 0.1$ mg/mL)	Заявлено на этикетке (Да/Нет) Stated on the label (Yes/No)	Примечание Note
4	Противодействует усталости Counteracts fatigue	Водный раствор (для инъекций) Water solution (for injection)	–	–	Состав не определен Composition is not determined
5	Противовоспалительные свойства Anti-inflammatory properties	Гель (в/м или в/в) Gel (intravenously or intramuscularly)	–	–	Состав не определен Composition is not determined
6	–	Водный раствор Water solution	Кобальт (3.4 мг/мл) Cobalt (3.4 mg/mL)	Нет No	–
7	–	Водный раствор Water solution	–	–	Состав не определен Composition is not determined
8	Стимуляция эритропоэза Erythropoiesis stimulation	Водная суспензия (в/в) Water Suspension (intravenously)	Кобальт (1.9 мг/мл) Cobalt (1.9 mg/mL)	Нет No	Обнаружен цианокобаламин (около 2.6 мг/мл), что составляет около 110 мкг/мл кобальта Cyanocobalamin is detected (about 2.6 mg/mL), which is about 110 $\mu$ g/mL of cobalt
9	Эритропоэз Erythropoiesis	Водная суспензия (в/в) Water Suspension (intravenously)	Кобальт (2.2 мг/мл) Cobalt (2.2 mg/mL)	Нет No	–
10	Эритропоэз Erythropoiesis	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	Кобальт (3.3 мг/мл) Cobalt (3.3 mg/mL)	Нет No	Обнаружен цианокобаламин (около 3.0 мг/мл), что составляет около 270 мкг/мл кобальта Cyanocobalamin is detected (about 3.0 mg/mL), which is about 270 $\mu$ g/mL of cobalt
11	Повышенная конкурентно-способность Increased competitiveness	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	–	–	Состав не определен Composition is not determined
12	Противодействует усталости Counteracts fatigue	Водная суспензия (в/в) Water Suspension (intravenously)	–	–	Состав не определен Composition is not determined
13	Увеличивает транспорт кислорода Increases oxygen transport	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	–	–	Состав не определен Composition is not determined

Таблица. Окончание  
Table. Continued

Продукт № Product No.	Рекламируемый эффект Advertised effect	Состав продукта (предлагаемый способ введения) Product composition (suggested route of administration)	Компоненты, определенные в продукте, имеющие отношение к допинг-контролю ( $\geq 0.1$ мг/мл) Components identified in the product relevant to doping control ( $\geq 0.1$ mg/mL)	Заявлено на этикетке (Да/Нет) Stated on the label (Yes/No)	Примечание Note
14	Увеличивает транспорт кислорода Increases oxygen transport	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	–	–	Состав не определен Composition is not determined
15	Эритропоэз Erythropoiesis	Водная суспензия (в/м или в/в) Water Suspension (intravenously or intramuscularly)	Кобальт (2.7 мг/мл) Cobalt (3.3 mg/mL)	Да Yes	На этикетке указан глюконат кобальта (2.0 мг/мл), что составляет около 260 мкг/мл кобальта, цианокобаламин (0.25 мг/мл), что составляет около 10 мкг/мл кобальта The label indicates the presence of cobalt gluconate (2.0 mg/mL), which is about 260 $\mu$ g/mL of cobalt, cyanocobalamin (0.25 mg/mL), which is about 10 $\mu$ g/mL of cobalt
16	Стимуляция эритропоэза Erythropoiesis stimulation	Водная суспензия (в/м или в/в) Water Suspension (intravenously or intramuscularly)	Кобальт (0.2 мг/мл) Cobalt (0.2 mg/mL)	Да Yes	На этикетке указан глюконат кобальта (0.7 мг/мл), что составляет около 90 мкг/мл кобальта, цианокобаламин (0.15 мг/мл), что составляет около 7 мкг/мл кобальта The label indicates the presence of cobalt gluconate (0.7 mg/mL), which is about 90 $\mu$ g/mL of cobalt, cyanocobalamin (0.15 mg/mL), which is about 7 $\mu$ g/mL of cobalt
17	Эритропоэз Erythropoiesis	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	Кобальт (0.1 мг/мл) Cobalt (0.1 mg/mL)	Нет No	Обнаружен цианокобаламин (около 4.0 мг/мл), что составляет около 175 мкг/мл кобальта Cyanocobalamin is detected (about 4.0 mg/mL), which is about 175 $\mu$ g/mL of cobalt
18	Эритропоэз Erythropoiesis	Водный раствор (в/в) Water solution (intravenously)	Кобальт (0.1 мг/мл) Cobalt (0.1 mg/mL)	Нет No	Обнаружен цианокобаламин (около 3.3 мг/мл), что составляет около 140 мкг/мл кобальта Cyanocobalamin is detected (about 3.3 mg/mL), which is about 140 $\mu$ g/mL of cobalt
19	–	Водный раствор в конфискованном шприце Water solution in confiscated syringe	Кобальт (5.5 мг/мл) Cobalt (5.5 mg/mL)	Не известно Unknown	Обнаружен цианокобаламин (около 5.3 мг/мл), что составляет около 230 мкг/мл кобальта Cyanocobalamin is detected (about 5.3 mg/mL), which is about 230 $\mu$ g/mL of cobalt

Следует отметить, что три из рассмотренных продуктов имели очень похожие этикетки с одинаковыми названиями одного бренда, однако их содержание существенно отличалось. Предполагается, что среди них были подделки, фальсификаты, и/или на рынке ведется распространение продуктов разного состава, но с очень похожей упаковкой [62].

Что же касается ветеринарных препаратов, достаточно интересные исследования были проведены совместно Жокей-клубом Гонконга и Скаковым обществом Объединенных Арабских Эмиратов на базе лаборатории конного допинга в Гонконге (Racing Laboratory of the Hong Kong Jockey Club) [63], а также независимо от них Британским скаковым обществом на базе Школы ветеринарной медицины и науки Университета города Ноттингема [64]. Были исследованы широко используемые витаминные препараты, некоторые из которых можно приобрести в ветеринарных аптеках в России без рецепта (например, Нето-15 или VAM® Injection). Лабораторный анализ проб крови лошадей, получавших данные препараты строго по инструкции производителя и под контролем ветеринарных специалистов, показал превышение порогового значения кобальта в течение 3–5 дней после применения препарата.

Результаты исследования Гейера [61, 62] заставляют всерьез задуматься о проведении дополнительной разъяснительной и образовательной работы среди спортсменов по применению витаминно-минеральных и иных биологически-активных добавок. Со стороны Национальной антидопинговой лаборатории МГУ начаты исследования по разработке методик определения запрещенных веществ не только в пробах крови спортсменов, но и в предлагаемых на рынке БАД.

#### **Использование препаратов кобальта в клинике и в качестве допингового агента**

Прогресс в понимании физиологической регуляции системы эритропоэза, достигнутый за последние десять лет, выявил новые опорные точки для фармакологических манипуляций. Аэробная емкость крови коррелирует с общей массой гемоглобина в эритроцитах, а, следовательно, с количеством эритроцитов. Поскольку работоспособность мышц напрямую зависит от количества кислорода, которым они снабжаются через кровь, увеличение массы эритроцитов в конечном итоге способствует увеличению аэробной выносливости [65]. Именно этот факт побуждает нечестных спортсменов искусственно стимулировать эритропоэз. Чаще всего для этих целей используют рекомбинантный человеческий эритропоэтин (rhEpo) и его аналоги, но, во-первых, их использование может быть легко обнаружено посредством тестирования на наличие

допинга<sup>4</sup> [66, 67], а во-вторых, они довольно дорогие и их использование связано с определенными трудностями (например, rhEpo существует только в инъекционных формах). Среди недорогих и доступных препаратов, с точки зрения допинг-контроля, особый интерес представляет хлорид кобальта(II). Ионы кобальта активируют индуцируемые гипоксией транскрипционные факторы, которые увеличивают экспрессию эритропоэтина [68].

Эритропоэз-стимулирующая активность неорганического кобальта была впервые замечена еще в 1940-е гг., и с конца 1940-х до конца 1970-х гг. хлорид кобальта применялся для лечения пациентов с анемией. Лекарство обычно давали в виде таблеток в разделенных дозах во время еды. Хлорид кобальта является эталонным веществом для калибровки лекарственной субстанции rhEpo *in vivo*; 5 мкмоль хлорида кобальта имеет ту же эритропоэз-стимулирующую активность, что и одна международная единица (IU) rhEpo [69].

Джефферсон [70] выявил повышенные концентрации кобальта примерно у 50% жителей высокогорья с чрезмерным эритроцитозом. Процент свободных ионов кобальта составляет всего 5–12% от общего количества кобальта в плазме крови, основная его часть связана с альбумином [71]. Кобальт выводится преимущественно с мочой, а небольшое количество выводится с желчью через желудочно-кишечный тракт. Нормальная концентрация кобальта в моче составляет <2 мкг/л у лиц, не употребляющих какие-либо добавки и не подвергающихся воздействию среды с повышенным содержанием кобальта. При приеме хлорида кобальта концентрация кобальта в моче у женщин выше (медиана: 109.7 нмоль/ммоль креатинина), чем у мужчин (медиана: 38.4 нмоль/ммоль креатинина). После однократного внутривенного введения неорганического кобальта у взрослых мужчин 40% кобальта выводилось из организма в течение первых 24 ч, далее до 70% в течение одной недели и до 80% в течение одного месяца, в то время как примерно 10% все еще присутствовали через один год.

<sup>4</sup> Постников П.В. Разработка высокочувствительной методики качественного определения гибридного белка эритропоэтина, слитого с FC-частью иммуноглобулина g человека (ЭПО-FC), в образцах сыворотки крови с целью антидопингового контроля: дисс. канд. хим. наук. М.: Московский технологический университет; 2017. 152 с. <https://www.disscat.com/content/razrabotka-vysokochuvstvitelnoi-metodiki-kachestvennogo-opredeleniya-gibridnogo-belka-eritro> [Postnikov P.V. Development of a highly sensitive method for the qualitative determination of the hybrid protein erythropoietin fused with the FC-part of human immunoglobulin g (EPO-FC) in blood serum samples for the purpose of anti-doping control. Cand. Thesis. Moscow: Moskovskii tekhnologicheskii universitet; 2017. 152 p. <https://www.disscat.com/content/razrabotka-vysokochuvstvitelnoi-metodiki-kachestvennogo-opredeleniya-gibridnogo-belka-eritro> (in Russ.).]

Можно предположить, что соли кобальта могут быть использованы спортсменами в качестве альтернативы другим эритропоэз-стимулирующим агентам (инъекции rhEpo) или кровяному допингу в виде аутологичной гемотрансфузии или переливания эритроцитов [5]. Действительно, хлорид кобальта легко доступен, недорог, прост в дозировке и очень эффективен. Его можно принимать в виде таблеток или добавлять в спортивные напитки (с содержанием электролитов, протеиновые коктейли, энергетические напитки). Было только несколько испытаний внутривенного или внутримышечного введения хлорида кобальта, так как парентеральный путь предотвращает развитие нежелательных желудочно-кишечных эффектов, однако специфическая токсичность внутривенного введения так и не была до конца изучена. Внутримышечное введение хлорида кобальта может быть довольно болезненным и вызвать некроз тканей.

Потенциальное злоупотребление кобальтом заслуживает особого внимания со стороны антидопинговых организаций. Недобросовестные спортсмены и тренеры, применяющие хлорид кобальта для улучшения результатов в спорте, игнорируют его кумулятивное токсическое действие и многочисленные побочные эффекты, которые привели к отказу от данного препарата в медицине. Хотя терапия хлоридом кобальта доказала свою эффективность в стимуляции эритропоэза как при внепочечной, так и при почечной анемии, септической инфекции, миелоидной гипоплазии, серповидноклеточной анемии, ревматоидного артрита и хронической болезни почек, накопление элемента при постоянном приеме и возникающие со временем токсические эффекты слишком велики.

#### *Токсическое действие кобальта*

Кобальт не является высокотоксичным металлом, однако в высоких дозах он может оказывать нежелательное воздействие и наносить значительный урон здоровью человека. Острыми симптомами отравления могут быть отек легких, тошнота, рвота, кровотечение, почечная недостаточность. При хронической интоксикации возникает патология легких, аллергический дерматит, гиперкератоз, нарушения функции щитовидной железы, кардиомиопатия и сердечная недостаточность (особенно, при алкоголизме), нейропатии [72]. Повышенная температура воздуха усиливает токсическое действие кобальта. Вдыхание пыли при обработке легированных кобальтом металлов может привести к развитию интерстициальных заболеваний легких, астмы.

Первые сведения о токсичности кобальта появились еще в XIX веке, однако особое внимание изучению данного вопроса было уделено при открытии синдрома «пивной кардиомиопатии». В 1960-х гг. соли кобальта (хлорид и сульфат в

концентрации 1.2–1.5 мг/л) использовались некоторыми пивоваренными компаниями для стабилизации пены. Люди, регулярно выпивавшие более четырех литров пива в день, получали серьезные побочные эффекты и проблемы, связанные с нарушением сердечной деятельности, в отдельных случаях это приводило к летальному исходу. Признаками синдрома были кардиомегалия, различного вида аритмии, цианоз, низкий сердечный выброс, выпот в перикарде и гипотония. С 1964 по 1966 гг. были описаны случаи кобальтовой кардиомиопатии, связанной с употреблением пива, в Омахе (штат Небраска, США), Квебеке (Канада), Левене (Бельгия) и Миннеаполисе (штат Миннесота, США). Заболевание возникало у людей несмотря на то, что количество кобальта (до 10 мг/день) было меньше, чем дозы, используемые при лечении анемии. С тех пор использование кобальта в пивоварении прекращено и в настоящее время является незаконным. Это также способствовало скорому прекращению его использования для лечения анемий.

Кардиомиопатии также наблюдались у рабочих, работающих с твердыми металлами, которые вдыхали кобальт в концентрациях, превышающих 100 мкг на 1 м<sup>3</sup> воздуха. Сердечная недостаточность может также возникнуть в результате внутривенного или внутримышечного введения хлорида кобальта. Например, 17-летняя женщина с хронической болезнью почек умерла от быстро прогрессирующей дилатационной кардиомиопатии после девяти месяцев терапии хлоридом кобальта (25 мг в день). При патологоанатомическом вскрытии содержание кобальта в миокарде составляло 8.9 мкг/г (сухая ткань) (норма 0.2 мкг/г). Вайсбеккер [73, 74] отмечал повышение систолического артериального давления у всех пациентов, которые проходили терапию хлоридом кобальта. Это согласуется с данными о том, что лечение с помощью рекомбинантных эпоэтинов также может быть связано с повышением артериального давления, хотя механизмы этого повышения до конца не изучены.

Кертис [75] вводил 50 мг хлорида кобальта ежедневно в течение трех месяцев 23 пациентам с хронической болезнью почек на гемодиализе. Это лечение, как и ожидалось, привело к увеличению концентрации гемоглобина на 10 г/л примерно у 50% пациентов. Однако, один пациент умер через три месяца после завершения курса терапии кобальтом, и гистологическое исследование ткани миокарда показало, что у него развилась кардиомиопатия. В посмертном периоде концентрация кобальта в миокарде составляла 1.65 мкг/г, что примерно в 25–80 раз выше, чем в контрольных образцах. Кертис [75] выполнил перспективное исследование концентраций кобальта в крови здоровых людей в качестве контроля и пациентов, находящихся на гемодиализе, после

двухнедельного введения хлорида кобальта. В обеих группах наблюдалось долговременное повышение концентрации кобальта в крови, которое нормализовалось через шесть недель после прекращения приема хлорида кобальта.

Ширрмахер [76] описал случай 35-летней женщины, которая ежедневно получала 100 мг хлорида кобальта для лечения почечной анемии. Из-за развития неврологического заболевания прием хлорида кобальта(II) был прекращен через шесть месяцев. При осмотре у пациента наблюдалась двусторонняя нейросенсорная потеря слуха, потеря вибрационной чувствительности обеих ног и нарушения при проведении пяточно-коленной пробы, а также диффузное увеличение щитовидной железы. Существуют и другие сообщения, свидетельствующие о нарушении слуха при терапии хлоридом кобальта. Из 17 пациентов с хронической болезнью почек, которым Гарднер [15] назначал дозы 50–150 мг хлорида кобальта перорально ежедневно, от четырех пациентов поступали жалобы на возникновение шума в ушах через 4–16 недель. Аудиограмма показала потерю слуха на частотах, превышающих 1000 Гц. Слух вернулся, когда терапия была прекращена. Другие исследователи так же подтвердили потерю слуха при терапии хлоридом кобальта и ее обратимость при прекращении лечения. Лич [77] описал атрофию зрительного нерва у 32-летнего пациента, которого лечили от панцитопении хлоридом кобальта(II) в дозировке до 200 мг в день четырьмя интервалами лечения, каждый продолжительностью от трех до четырех месяцев, в течение трех лет. У пациента развилась перфузия хориоидеи и атрофия зрительного нерва, влияющая на остроту зрения, также наблюдались тошнота и рвота, часто сопровождающие состояние хронической интоксикации организма.

Кобальт ингибирует поглощение йода щитовидной железой. Таким образом, микседема и гиперплазия щитовидной железы были относительно распространенными побочными эффектами лечения солями кобальта. Крисс [78] наблюдал нарушения в работе щитовидной железы во время терапии хлоридом кобальта у пяти пациентов. Среди них было четверо детей с серповидно-клеточной анемией, которые ежедневно получали от 30 до 100 мг  $\text{CoCl}_2$  в течение 14–30 недель. Через несколько недель после прекращения терапии зоб и дисфункция щитовидной железы уменьшились. Поскольку нежелательные эффекты были явно связаны с лечением кобальтом, автор подверг критике его небрежное использование в качестве терапевтического средства.

Пероральное введение 500 мг хлорида кобальта может вызвать заболевания желудочно-кишечного тракта, тошноту, рвоту, потерю веса. Маклоу [37] сообщил о 6-летнем мальчике,

у которого появились боли в животе и рвота после приема напитка, содержащего 2.5 г хлорида кобальта. Концентрация кобальта в его плазме крови составила 7.23  $\mu\text{M}$  (нормальное значение  $<0.02 \mu\text{M}$ ) через 7 ч после приема и 0.09  $\mu\text{M}$  через месяц. Якобцинер и Райбин [79] описали худший случай: 19-месячный мальчик умер примерно через 7 ч после того, как проглотил около 30 мл раствора хлорида кобальта. Вскрытие показало некроз слизистой желудка; печень, почки и селезенка были перегружены кобальтом.

Некоторые аспекты биохимических свойств неорганического кобальта в отношении его биодоступности и потенциальной опасности применения обобщались неоднократно в различных работах [27, 37, 38]. Позднее сотрудниками Бирмингемского центра Национальной службы информации о ядах Великобритании была составлена монография, описывающая токсические эффекты хлорида кобальта [39]. Кобальт и его соединения могут попадать в организм человека различными способами (перорально, дермально, ингаляционно, внутривенно, подкожно). В зависимости от пути попадания токсичность кобальта, ткань организма или орган и степень его повреждения варьируются. Кроме того, решающее значение имеют время воздействия и количество потребляемого кобальта. При высокой дозировке ( $>25$  мг/день) существует опасность непереносимости и повреждения органов [40].

Несмотря на то, что токсическое действие кобальта доказано многократно, молекулярные механизмы его токсичности до конца не идентифицированы. Вредное воздействие кобальта при применении в высоких концентрациях связывают главным образом с вызываемым эффектом гипоксии или «ощущением» клеткой нехватки кислорода. А для нормального функционирования всех клеток любого организма кислород жизненно необходим. Кобальт генотоксичен [53, 80], индуцирует окислительный стресс [53], апоптоз [81]. Ионы кобальта, посредством стабилизации HIF, могут активировать гены, кодирующие белки, которые участвуют в росте опухоли (например, фактор роста эндотелия сосудов [56] и переносчик Р-гликопротеина с множественной лекарственной устойчивостью). Было установлено, что введение солей кобальта способствует развитию карциномы у экспериментальных животных. Кроме того, оказалось, что неорганический кобальт индуцирует разрывы цепей ДНК, перекрестное сшивание ДНК-белок, обмена сестринскими хроматидами и образование микроядер в культурах клеток млекопитающих. Растворимые соли кобальта(II) классифицируются Международной ассоциацией классификационных обществ Всемирной организации здравоохранения как канцерогены группы 2В (возможно, канцерогенные для человека) [22]. Из-за токсических побочных

эффектов их использование в качестве миметиков гипоксии в настоящее время ограничивается лишь лабораторными экспериментами [23].

Риск возникновения нежелательных явлений увеличивается с увеличением дозы и продолжительности лечения. Продолжительность терапевтического введения хлорида кобальта в среднем составляла приблизительно 10 недель. Доза кобальта 0.03 мг на 1 кг массы тела в день при оральном введении – значение, которое считается безопасным с точки зрения токсических воздействий на здоровье в общей популяции в течение всей жизни при ежедневном применении кобальта. Эта доза намного ниже, чем использовавшиеся в клинике для стимуляции эритропоэза терапевтические дозы. К сожалению, многие спортсмены либо не знают, либо не учитывают возможные риски для здоровья, вызванные приемом кобальта в качестве допингового агента.

#### **Определение кобальта в биологических образцах**

Ранее были предприняты первые попытки разработать стратегии выявления допинга солями кобальта у спортсменов. В качестве параметра было предложено использовать содержание кобальта в эритроцитах, поскольку поглощение неорганического кобальта эритроцитами практически необратимо и отражает концентрацию кобальта в плазме [43]. Юнис [44] использовал биокинетическую модель, чтобы оценить уровни кобальта в цельной крови и моче, возникающие в результате орального приема кобальта в количествах, превышающих типичные нормы потребления с пищей. После 10 дней приема кобальта в суточной дозе от 0.4 до 1.0 мг прогнозируемые концентрации кобальта составляли от 1.7 до 10 мкг/л в крови и от 20 до 120 мкг/л в моче. Прогнозировалось, что применение препаратов неорганического кобальта из расчета 1.0 мг кобальта в день ежедневно на протяжении года и более приводят к определению концентраций кобальта от 5.7 до 13 мкг/л в крови и от 65 до 150 мкг/л в моче.

Концентрация кобальта была также установлена с помощью атомно-абсорбционной спектроскопии с графитовой кюветой, в экспериментальных образцах она составляла 0.1–0.5 мкг/л плазмы крови человека по данным рабочей группы IACS WHO [22].

Методы определения кобальта в моче человека, совместимые с рутинными процедурами допинг-контроля, включают метод газовой хромато-масс-спектрометрии [82] и валидированный метод количественной тандемной масс-спектрометрии с электрораспылительной ионизацией с нижним пределом детектирования 50 пг/мл [83]. Другие широко используемые и чувствительные методы количественного определения основаны на применении масс-спектрометрии и атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной плазмой (ICP–MS,

ICP–AES), электротермической атомно-абсорбционной спектроскопии (ETAAS) [84] и др. Поскольку кобальт является естественным и необходимым микроэлементом [50] и может присутствовать в моче здоровых людей в концентрациях от 40 до 810 пг/мл [85], обязательным является определение контрольных и пороговых значений, которые подтвердят неблагоприятное аналитическое заключение. Высокочувствительный метод жидкостной хромато-масс-спектрометрии с ионизацией индуктивно-связанной плазмой (LC–ICP–MS) с пределами обнаружения до 0.8 пг/мл является лучшим аналитическим подходом для решения этой задачи.

В современных антидопинговых методиках для определения неорганического кобальта регламентировано использование только пластиковой лабораторной посуды из полипропилена, так как в стеклянной посуде могут содержаться следовые количества кобальта как результат технологического процесса изготовления, что может отразиться на результате анализа [63, 86].

На анализ можно брать мочу, плазму или сыворотку крови, также в разработке находится метод определения содержания кобальта в эритроцитах в сравнении с содержанием кобальта в плазме, позволяющий отличить источник попадания кобальта в организм (различные формы витамина B12 или неорганический кобальт) [76]. Кровь собирают в пробирки с Li-гепарином (литиевой солью гепарина) или с ЭДТА (калиевой или натриевой солью этилендиаминтетрауксусной кислоты) и сразу центрифугируют для отделения плазмы. Мочу собирают в чистые пластиковые контейнеры. Пробы хранятся до анализа замороженными при  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Скрининговый анализ, как правило, проводится методом ICP–MS [59, 63, 86–88] с использованием стандартных растворов кобальта и германия с сертифицированными значениями, соответствующими стандартным эталонным материалам (Standard Reference Material, SRM) 3113 и 3120a Национального института стандартов и технологий (National Institute of Standards and Technology, NIST), используемым для построения калибровочной кривой (растворы кобальта) и в качестве внутреннего стандарта (растворы германия). Рабочие стандартные растворы кобальта и германия готовят из соответствующих стандартных растворов путем разбавления 3.25% (v/v) азотной кислотой. В лабораториях Европы также часто используют стандартный раствор кобальта CertiPUR® (1 мг/мл) компании Merck, Германия, в качестве внутреннего стандарта – стандарт эмиссии индиевой плазмы (1 мг/мл) от VWR International GmbH (Брухзаль, Германия) и для настройки ICP–MS и построения калибровочных кривых стандартный раствор, содержащий 10 мкг/мл германия, кобальта,

лития, титана и иттрия в 2% азотной кислоте компании *Agilent Technologies* (Вальдбронн, Германия).

Градуировочные смеси, образцы контроля качества (Quality Control, QC) и соответствующие бланковые пробы анализируют вместе с каждой партией тестируемых образцов. Градуировочные смеси и образцы QC изготавливают из стандартных рабочих растворов кобальта. Отношения площади пиков кобальта к внутреннему стандарту (германий) по сравнению с добавленными концентрациями кобальта подбирают с использованием линейной регрессии для получения градуировочной зависимости. Концентрации общего кобальта в исследуемых образцах интерполируют, используя градуировочную зависимость. Для образцов QC фактическая восстановленная концентрация кобальта получается путем вычитания концентрации соответствующей пустой матрицы из общей определенной концентрации. По выбору лаборатории градуировочные смеси можно готовить в сверхчистой воде, плазме или моче в зависимости от того, какие пробы анализируются. Градуировочные зависимости строят, по крайней мере, по шести точкам в диапазоне от 0 до 25 нг/мл или более в плазме и от 0 до 500 нг/мл или более в моче. В каждую серию включают один или два образца QC и/или сертифицированный стандартный образец (Certified Reference Material, CRM). Образцы QC готовят путем добавления в очищенную плазму и мочу стандартного раствора кобальта.

Пробоподготовку мочи для скринингового анализа проводят добавлением внутреннего стандарта (раствора германия) и разведением образца 3.25% азотной кислотой в 5–50 раз. При подготовке проб плазмы (сыворотки) крови после добавления внутреннего стандарта проводят депротенизацию пробы раствором трихлоруксусной кислоты (10 г ТХУ и 120 мг NaCl на 100 мл сверхчистой воды) с последующим добавлением 3.25% азотной кислоты и центрифугированием. Итоговое разведение образца плазмы также должно быть в 5–50 раз. На анализ обычно берут 80–100 мкл исходной пробы. Разбавленный образец вводят через автосэмплер в ICP–MS. В качестве плазмообразующего газа используется аргон, в качестве газа-мишени – гелий. Изотопы, подлежащие детектированию:  $m/z$  59 для кобальта и  $m/z$  72 для германия [55]. Сбор всех данных проводится с проведением трех параллельных определений. После каждого ввода пробы игла автосэмплера промывается деионизированной водой в течение 5 с в порту для ополаскивания и 5 с во флаконе для ополаскивания, после чего следует промывка 0.07% Triton-X в течение максимум 100 с для минимизации переноса. Наконец, зонд автосэмплера снова промывается деионизированной водой в течение 20 с перед следующей инфузией.

Подтверждающий анализ на кобальтовый допинг проводят обычно методом жидкостной хромато-масс-спектрометрии (LC–MS) [63, 86, 87]. Внутренний стандарт при этом, как правило, не используют. До анализа плазмы или сыворотки крови проводят осаждение белков. Неорганический кобальт определяют в комплексе с диэтилтиокарбаматом (DDC), что требует дополнительной пробоподготовки. Обнаружение комплекса Co-DDC проводят в режиме положительной ионизации электрораспылением в одном временном отрезке с использованием выбранного мониторинга реакции. Выбранный ион-предшественник комплекса Co-DDC имеет  $m/z$  355 [63].

При рутинных исследованиях проб на допинг требуются быстрые и простые протоколы подготовки образцов к анализу, и в этой связи интересна работа Кнупа [87], в которой детально описан метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазменной (HPLC–ICP–MS), позволяющий отнести хроматографические пики к запрещенному к использованию неорганическому кобальту или кобальту, входящему в состав цианокобаламина, что является крайне важным для допинг-контроля. Кроме того, метод отличается очень высокой чувствительностью и возможностью детектировать одну частицу кобальта из  $10^{12}$  других частиц, а также проводить анализ изотопного состава интересующего иона, что делает его методом выбора для использования в современном допинг-контроле.

Дополнительные стратегии тестирования, основанные на выявлении косвенных биологических эффектов введения хлорида кобальта, таких как активация транскрипции гена сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) [45], изменение профиля микроРНК-маркеров или усиленный синтез дельта-аминолевулината [46], могут быть надежными альтернативами, но они потребуют длительного и сложного процесса клинической и аналитической проверки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вопрос использования кобальта в качестве допингового агента для улучшения спортивных результатов был и будет актуален. В статье подробно рассмотрены основные биологические эффекты его воздействия на организм, сопоставимые с применением таких эритропоэз-стимулирующих агентов как рекомбинантные эритропоэтины или ингибиторы HIF-пролилгидроксилаз. Отсутствие четкого, утвержденного ВАДА, технического документа по определению кобальта или методу анализа и обязательности его определения всеми антидопинговыми лабораториями мира, несомненно, делает его все более перспективным для приема недобросовестными спортсменами. Особое внимание уделено проблематике

употребления солей кобальта в медицинских целях и в качестве биологически активных добавок, отмечен потенциальный вред его применения ввиду токсического влияния на организм человека, и возможное наложение санкций на спортсменов за использование таких БАД.

Собраны и обобщены литературные данные по основным используемым методам идентификации кобальта. Из всех методов, рассмотренных в обзоре, самым перспективным и высокочувствительным является метод высокоэффективной жидкостной хроматографии в сочетании с масс-спектрометрией с индуктивно-связанной плазменной (HPLC–ICP–MS),

позволяющий отличить эндогенный кобальт, входящий в состав витамина В12 от запрещенного к применению неорганического кобальта.

В настоящее время перед антидопинговыми лабораториями стоит первостепенная задача внедрения вышеуказанного метода в методологическую базу для однозначного определения злоупотреблений солями кобальта со стороны спортсменов. Это позволит снизить как количество дисквалификаций за их использование, так и предотвратить возможные случаи потенциальных отравлений ими.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.  
The authors declare no conflicts of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Nieboer E., Sanford W.E. Essential, toxic and therapeutic functions of metals (including determinant of reactivity). In: *Rev. Biochem. Toxicol.* New York: Elsevier; 1985;7:205–245

2. Salnikow K., Donald S.P., Bruick R.K., Zhitkovich A., Phang J.M., Kasprzak K.S. Depletion of intracellular ascorbate by the carcinogenic metals nickel and cobalt results in the induction of hypoxic stress. *J. Biol. Chem.* 2004;279(39):40337–40344. <https://doi.org/10.1074/jbc.m4030572003>

3. Lippi G., Franchini M., Guidi G.C. Cobalt chloride administration in athletes: a new perspective in blood doping? *Br. J. Sports Med.* 2005;39(11):872–873. <https://doi.org/10.1136/bjism.2005.019232>

4. Jelkmann W. Erythropoiesis stimulating agents and techniques: a challenge for doping analysts. *Curr. Med. Chem.* 2009;16(10):1236–1247. <https://doi.org/10.2174/092986709787846668>

5. Lippi G., Franchini M., Guidi G.C. Blood doping by cobalt. Should we measure cobalt in athletes? *J. Occup. Med. Toxicol.* 2006;1:18. <https://doi.org/10.1186/1745-6673-1-18>

6. Lippi G., Montagnana M., Guidi G.C. Albumin cobalt binding and ischemia modified albumin generation: an endogenous response to ischemia? *Int. J. Cardiol.* 2006;108(3):410–411. <https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2005.03.040>

7. Davis J.E., Fields J.P. Experimental production of polycythemia in humans by administration of cobalt chloride. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1958;99(2):493–495. <https://doi.org/10.3181/00379727-99-24395>

8. Моргулис И.И., Хлебоброс Р.Г. *Биологическая роль кобальта*. Красноярск: Красноярский научный центр СО РАН Сибирский федеральный университет; 2005. 24 с. URL: <http://modernproblems.org.ru/ecology/25-hlebopos10.html> (дата обращения 12 мая 2021 г.)

[Morgulis I.I., Khlebopros R.G. *Biologicheskaya rol' kobal'ta (The biological role of cobalt)*. Krasnoyarsk: Krasnoyarskii nauchnyi tsentr Sib. Otd. Ros. Akad. Nauk; 2005. 24 p. URL: <http://modernproblems.org.ru/ecology/25-hlebopos10.html> (accessed May 12, 2021) (in Russ.).]

9. Кудрин А.В. Металлы и протеолитические ферменты. *Вопр. биол. мед. фарм. химии*. 1999;(3):19–24.

[Kudrin A.V. Metals and proteolytic enzymes. *Vopr. biol., med. i farm. khimii = Probl. of Biol., Med. and Pharm. Chemistry*. 1999;(3):19–24 (in Russ.)]

10. Taylor A., Marks V. Cobalt: a review. *J. Hum. Nutr.* 1978;32(3):165–177. <https://doi.org/10.3109/09637487809144525>

11. Ueno M., Seferyska J., Beckman B., Brookins J., Nakashima J., Fisher J. W. Enhanced erythropoietin secretion in hepatoblastoma cells in response to hypoxia. *Am. J. Physiol.* 1989;257:(4Pt. 1):C743–C749. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1989.257.4.c743>

12. Калиман П.А., Беловецкая И.В. Влияние хлорида кобальта на активность ключевых ферментов метаболизма гема в печени крысы. *Биохимия*. 1986;51(8):1307–1308.

[Kaliman P.A., Belovetskaya I.V. Effect of cobalt chloride on the activity of key enzymes of heme metabolism in rat liver. *Biokhimiya = Biochemistry*. 1986;51(8):1307–1308 (in Russ.).]

13. Осинский С., Левитин И., Бубновская Л. Селективность действия редокс-активных комплексов кобальта(III) на опухолевую ткань. *Экспериментальная онкология*. 2004;26(2):18–24.

[Osinskii S., Levitin I., Bubnovskaya L. Selectivity of the action of redox-active complexes of cobalt(III) on tumor tissue. *Eksperimental'naya onkologiya = Experimental Oncology*. 2004;26(2):18–24 (in Russ.).]

14. Izom G.E., Way J.L. Cyanide intoxication: protection with cobaltous chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1973;24(3):449–456. [https://doi.org/10.1016/0041-008x\(73\)90051-3](https://doi.org/10.1016/0041-008x(73)90051-3)

15. Gardner F.H. The use of cobaltous chloride in the anemia associated with chronic renal disease. *J. Lab. Clin. Med.* 1953;41(1):56–64.

16. Wintrobe M.M., Grinstein M., Dubash J.J., Humphreys S.R., Ashenbrucker H., Worth W. The anemia of infection, VI. The influence of cobalt on the anemia associated with inflammation. *Blood*. 1947;2(4):323–331. <https://doi.org/10.1182/blood.v2.4.323.323>

17. Christensen J.M., Poulsen O.M., Thomsen M. A short-term cross-over study on oral administration of soluble and insoluble cobalt compounds: sex differences in biological levels. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*. 1993;65(4):233. <https://doi.org/10.1007/bf00381196>

18. Edel J., Pozzi G., Sabbioni E., Pietra R., Devos S. Metabolic and toxicological studies on cobalt. *Sci. Total Environ.* 1994;150(1–3):233–244. [https://doi.org/10.1016/0048-9697\(94\)90159-7](https://doi.org/10.1016/0048-9697(94)90159-7)
19. Young R.S. Cobalt. In: Frieden E. (Ed.). *Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements*. UK: Springer; 1985;3:133–147. URL: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-4775-0\\_6](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4684-4775-0_6)
20. Taylor A. Detection and monitoring of disorders of essential trace elements. *Ann. Clin. Biochem.* 1996;33(Pt 6):486–510. <https://doi.org/10.1177/000456329603300603>
21. Barceloux D.G. Cobalt. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 1999;37(2):201–206. <https://doi.org/10.1081/clt-100102420>
22. Cobalt in Hard Metals and Cobalt Sulfate, Gallium Arsenide, Indium Phosphide and Vanadium Pentoxide. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, France: 2006. V. 86. 353 p. URL: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol86/mono86.pdf> (accessed May 12, 2021).
23. Beuck S., Schänzer W., Thevis M. Hypoxia-inducible factor stabilizers and other small-molecule erythropoiesis-stimulating agents in current and preventive doping analysis. *Drug Test. Analysis.* 2012;4(11):830–845. <https://doi.org/10.1002/dta.390>
24. Ebert B, Jelkmann W. Intolerability of cobalt salt as erythropoietic agent. *Drug Test Anal.* 2014;6(3):185–189. <https://doi.org/10.1002/dta.1528>
25. Jelkmann W. The disparate roles of cobalt in erythropoiesis, and doping relevance. *Open J. Hematol.* 2012;3(1):1–9.
26. Zang Q., Yan Q., Yang H., Wei W. Oxygen sensing and adaptability won the 2019 Nobel Prize in Physiology or medicine. *Genes & Diseases.* 2019;6(4):328–332. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2019.10.006>
27. Stolze I.P., Mole D.R., Ratcliffe P.J. Regulation of HIF: prolyl hydroxylases. *Novartis Found. Symp.* 2006;272:15–25. <https://doi.org/10.1002/9780470035009.ch3>
28. Epstein A.C., Gleadle J.M., McNeill L.A., Hewitson K.S., O'Rourke J., Mole D.R., Mukherji M., Metzen E., Wilson M.I., Dhanda A., Tian Y.M., Masson N., Hamilton D.L., Jaakkola P., Barstead R., Hodgkin J., Maxwell P.H., Pugh C.W., Schofield C.J., Ratcliffe P.J. C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell.* 2001;107(1):43–54. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00507-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00507-4)
29. Коломейцев А.В., Тарарина Л.И., Моргулис И.И. Влияние хлорида кобальта на кроветворение у мышей в ранние сроки после воздействия. *Вестник КрАСГАУ.* 2003;2:101–103.  
[Kolomeitsev A.V., Tararina L.I., Morgulis I.I. The effect of cobalt chloride on hematopoiesis in mice early after exposure. *Vestnik KrasGAU = The Bulletin of KrasGAU.* 2003;2:101–103 (in Russ.).]
30. Гончаревская О.А., Монин Ю.Г., Наточин Ю.В. Регуляция скорости проксимальной и дистальной реабсорбции при интратрубекулярном введении кобальта. *Физиол. журн. СССР.* 1985;71(10):1287–1292.  
[Goncharevskaya O.A., Monin Yu.G., Natochin Yu.V. Regulation of the rate of proximal and distal reabsorption with intratubular administration of cobalt. *Fiziologicheskii zhurnal SSSR = J. Physiology USSR.* 1985;71(10):1287–1292 (in Russ.).]
31. Yamagami K., Nishimura S., Sorimachi M. Cd<sup>2+</sup> and Co<sup>2+</sup> at micromolar concentrations mobilize intracellular Ca<sup>2+</sup> via the generation of inositol 1,4,5-triphosphate in bovine chromaffin cells. *Brain Res.* 1998;798(1–2):316–319. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(98\)00445-4](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(98)00445-4)
32. Comhaire S., Blust R., Van Ginneken L., Vanderborgh, O.L.J. Branchial cobalt uptake in the carp, *Cyprinus carpio*: effect of calcium channel blockers and calcium injection. *Fish Physiol. Biochem.* 1998;18(1):1–13. <https://doi.org/10.1023/A:1007746117932>
33. Goldberg M.A., Imagawa S., Dunning S.P., Bunn H.F. Oxygen sensing and erythropoietin gene regulation. In: Baldamus C.A., Koch K.M., Scigalla P., Wiecek L. (Eds.). *Erythropoietin: From Molecular Structure to Clinical Application; Contrib. Nephrol.* Basel: Karger; 1989;76:39–56. <https://doi.org/10.1159/000417880>
34. Bruick R.K. Oxygen sensing in the hypoxic response pathway: regulation of the hypoxia-inducible transcription factor. *Genes Dev.* 2003;17(21):2614–2623. <https://doi.org/10.1101/gad.1145503>
35. Malard V., Berenguer F., Pratt O., Ruat S., Steinmerz G., Quemeneur E. Global gene expression profiling in human lung cells exposed to cobalt. *BMS Genomics.* 2007;8:147–164. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-147>
36. Романова Т.А., Кравченко О.В., Моргулис И.И., Кузубов А.А., Краснов П.О., Аврамов П.В. Подтверждение гипотезы гемопротеинового сенсора *ab initio* методом квантовой химии. *Коорд. химия.* 2004;30(6):432–435.  
[Romanova T.A., Kravchenko O.V., Morgulis I.I., Kuzubov A.A., Krasnov P.O., Avramov P.V. Hypothesis of hemoprotein sensor confirmed by *ab initio* quantum-chemical method. *Russ. J. Coord. Chem.* 2004;30(6):403–406. <https://doi.org/10.1023/B:RUO0.0000030160.11788.20>]
37. Mucklow E.S., Griffin S.J., Delves H.T., Suchak B. Cobalt poisoning in a 6-year-old. *Lancet.* 1990;335(8695):981. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(90\)91053-d](https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)91053-d)
38. Simonsen L.O., Harbak H., Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology—a brief update. *Sci. Total Environ.* 2012;432:210–215. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.06.009>
39. Bradberry S., Sabatta M., Vale J. Cobalt Chloride. UKPID Monograph. URL: [www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid50.htm](http://www.inchem.org/documents/ukpids/ukpids/ukpid50.htm) (accessed May 12, 2021).
40. Finley B.L., Monnot A.D., Paustenbach D.J., Gaffney S.H. Derivation of a chronic oral reference dose for cobalt. *Regul. Toxicol. Pharm.* 2012;64(3):491–503. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2012.08.022>
41. Linna A., Oksa P., Groundstroem K., Halkosaari M., Palmroos P., Huikko S., Uitti J. Exposure to cobalt in the production of cobalt and cobalt compounds and its effect on the heart. *Occup. Environ. Med.* 2004;61(11):877–885. <https://doi.org/10.1136/oem.2003.009605>
42. Yuan Y., Hilliard G., Ferguson T., Millhorn D.E. Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor- $\alpha$  and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor- $\alpha$ . *J. Biol. Chem.* 2003;278(18):15911–15916. <https://doi.org/10.1074/jbc.m300463200>
43. Simonsen L.O., Brown A.M., Harbak H., Kristensen B.I., Bennekou P. Cobalt uptake and binding in human red blood cells. *Blood Cell Mol. Dis.* 2011;46(4):266–276. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2011.02.009>
44. Unice K.M., Monnot A.D., Gaffney S.H., Tvermoes B.E., Thuett K.A., Paustenbach D.J., Finley B.L. Inorganic cobalt supplementation: Prediction of cobalt levels in whole blood and urine using a biokinetic model. *Food Chem. Toxicol.* 2012;50(7):2456–2461. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.04.009>

45. Gray M.J., Zhang J., Ellis L.M., Semenza G.L., Evans D.B., Watowich S.S., Gallick G.E. HIF-1 $\alpha$ , STAT3, CBP/p300 and Ref-1/APE are components of a transcriptional complex that regulates Src-dependent hypoxia-induced expression of VEGF in pancreatic and prostate carcinomas. *Oncogene*. 2005;24(19):3110–3120. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208513>
46. Singh N.K., Chhabra R., Datta K. Nonenzymatic synthesis of delta-aminolevulinate (ALA) by cobalt (Co<sup>++</sup>). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987;143(2):439–446. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(87\)91373-8](https://doi.org/10.1016/0006-291x(87)91373-8)
47. Chai Y.C., Mendes L.F., van Gestel N., Carmeliet G., Luyten F.P. Fine-tuning pro-angiogenic effects of cobalt for simultaneous enhancement of vascular endothelial growth factor secretion and implant neovascularization. *Acta Biomater.* 2018;72:447–460. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.03.048>
48. Peters K., Schmidt H., Unger R.E., Kamp G., Pröls F., Berger B.G., Kirkpatrick C.J. Paradoxical effects of hypoxia-mimicking divalent cobalt ions in human endothelial cells *in vitro*. *Mol. Cell. Biochem.* 2005;270(1–2):157–166. <https://doi.org/10.1007/s11010-005-4504-z>
49. De Laia A.G.S., Valverde T.M., Barrioni B.R., da Silva Cunha P., de Goes A.M., de Miranda M.C., Gomes D.A., Gueiros-Junior C.M., de Sa M.A., de Magalhães Pereira M. Cobalt-containing bioactive glass mimics vascular endothelial growth factor A and hypoxia inducible factor 1 function. *J. Biomed. Mater. Res. A*. 2021;109(7):1051–1064. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37095>
50. Okamoto S., Eltis L.D. The biological occurrence and trafficking of cobalt. *Metallomics*. 2011;3(10):963–970. <https://doi.org/10.1039/c1mt00056j>
51. Gluhcheva Y., Pavlova E., Petrova E., Tinkov A.A., Ajsuvakova O.P., Skalnaya M.G., Vladov I., Skalny A.V. The Impact of Perinatal Cobalt Chloride Exposure on Extramedullary Erythropoiesis, Tissue Iron Levels, and Transferrin Receptor Expression in Mice. *Biol. Trace Elem. Res.* 2020;194(2):423–431. <https://doi.org/10.1007/s12011-019-01790-8>
52. Xu X., Liu T., Wu J., Wang Y., Hong Y., Zhou H. Transferrin receptor-involved HIF-1 signaling pathway in cervical cancer. *Cancer Gene Ther.* 2019;26(11–12):356–365. <https://doi.org/10.1038/s41417-019-0078-x>
53. De Boeck M., Kirsch-Volders M., Lison D. Cobalt and antimony: genotoxicity and carcinogenicity. *Mutat. Res.* 2003;533(1–2):135–152. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.012>
54. Shukla D., Saxena S., Purushothaman J., Shrivastava K., Singh M., Shukla S., Malhotra V.K., Mustoori S., Bansal A. Hypoxic preconditioning with cobalt ameliorates hypobaric hypoxia induced pulmonary edema in rat. *Eur. J. Pharmacol.* 2011;656(1–3):101–109. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.01.038>
55. Saxena S., Shukla D., Bansal A. Augmentation of aerobic respiration and mitochondrial biogenesis in skeletal muscle by hypoxia preconditioning with cobalt chloride. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012;264(3):324–334. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.08.033>
56. Suzuki J. Time-course changes in VEGF expression and capillarity in the early stage of exercise training with Co treatment in rat skeletal muscles. *Acta Physiol. Scand.* 2004;181(2):225–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-201x.2004.01279.x>
57. Hoffmeister T., Schwenke D., Krug O., Wachsmuth N., Geyer H., Thevis M., Byrnes W.C., Schmidt W.F.J. Effects of 3 Weeks of Oral Low-Dose Cobalt on Hemoglobin Mass and Aerobic Performance. *Front. Physiol.* 2018;9:1289. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01289>
58. da Justa Neves D.B., Caldas E.D. Dietary supplements: International legal framework and adulteration profiles, and characteristics of products on the Brazilian clandestine market. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2015;73(1):93–104. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.06.013>
59. Krug O., Thomas A., Walpurgis K., Piper T., Sigmund G., Schänzer W., Laussmann T., Thevis M. Identification of black market products and potential doping agents in Germany 2010–2013. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 2014;70(11):1303–1311. <https://doi.org/10.1007/s00228-014-1743-5>
60. Thevis M., Krug O., Piper T., Geyer H., Schänzer W. Solutions Advertised as Erythropoiesis-stimulating Products were Found to Contain Undeclared Cobalt and Nickel Species. *Int. J. Sports Med.* 2015;37(1):82–84. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1569350>
61. Geyer H., Braun H., Burke L.M., Stear S.J., Castell L.M. A-Z of nutritional supplements: dietary supplements, sports nutrition foods and ergogenic aids for health and performance-Part 22. *Br. J. Sports Med.* 2011;45(9):752–754. <https://doi.org/10.1136/bjsports-2011-090180>
62. Geyer H., Parr M.K., Koehler K., Mareck U., Schänzer W., Thevis M. Nutritional supplements cross-contaminated and faked with doping substances. *J. Mass Spectrom.* 2008;43(7):892–902. <https://doi.org/10.1002/jms.1452>
63. Ho E.N.M., Chan G.H.M., Wan T.S.M., Curl P., Riggs C.M., Hurley M.J., Sykes D. Controlling the misuse of cobalt in horses. *Drug Test. Anal.* 2015;7(1):21–30. <https://doi.org/10.1002/dta.1719>
64. Hillyer L.L., Ridd Z., Fenwick S., Hincks P., Paine S.W. Pharmacokinetics of inorganic cobalt and a vitamin B12 supplement in the Thoroughbred horse: Differentiating cobalt abuse from supplementation. *Equine Vet. J.* 2018;50(3):343–349. <https://doi.org/10.1111/evj.12774>
65. Calbet J.A., Lundby C., Koskolou M., Boushel R. Importance of hemoglobin concentration to exercise: acute manipulations. *Respir. Physiol. Neurobiol.* 2006;151(2–3):132–140. <https://doi.org/10.1016/j.resp.2006.01.014>
66. Reichel C., Gmeiner G. Erythropoietin and analogs. In: Thieme D., Hemmersbach P. (Eds.). *Doping in Sports: Biochemical Principles, Effects and Analysis. Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2010;195:251–294. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4\\_12](https://doi.org/10.1007/978-3-540-79088-4_12)
67. Okano M., Sato M., Kaneko E., Kageyama S. Doping control of biosimilar epoetin kappa and other recombinant erythropoietins after intravenous application. *Drug Test. Anal.* 2011;3(11–12):798–805. <https://doi.org/10.1002/dta.369>
68. Rodriguez-Jimenez F.J., Moreno-Manzano V. Modulation of hypoxia-inducible factors (HIF) from an integrative pharmacological perspective. *Cell. Mol. Life Sci.* 2012;69(4):519–534. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0813-4>
69. Jelkmann W. Efficacy of recombinant erythropoietins: is there unity of international units? *Nephrol. Dial. Transpl.* 2009;24(5):1366–1368. <https://doi.org/10.1093/ndt/gfp058>
70. Jefferson J.A., Escudero E., Hurtado M.E., Pando J., Tapia R., Swenson E. R., Prchal J., Schreiner G.F., Schoene R.B., Hurtado A., Johnson R.J. Excessive erythrocytosis, chronic mountain sickness, and serum cobalt levels. *Lancet.* 2002;359(9304):407–408. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)07594-3](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(02)07594-3)
71. Jansen H.M., Knollema S., van der Duin L.V., Willemsen A.T., Wiersma A., Franssen E.J., Russel F.G., Korf J., Paans A.M. Pharmacokinetics and dosimetry of cobalt-55 and cobalt-57. *J. Nucl. Med.* 1996;37(12):2082–2086.

72. Ebert B., Jelkmann W. Intolerability of cobalt salt as erythropoietic agent. *Drug Test Anal.* 2014;6(3):185–189. <https://doi.org/10.1002/dta.1528>
73. Weißbecker L. Die Kobalttherapie. *Deutsch. Med. Wochenschr.* 1950;75:116–118.
74. Weissbecker L. Neue Möglichkeiten der Kobalttherapie. *Klin. Wochenschr.* 1951;29:80–82. <https://doi.org/10.1007/BF01480495>
75. Curtis J.R., Goode G.C., Herrington J., Urdaneta L.E. Possible cobalt toxicity in maintenance hemodialysis patients after treatment with cobaltous chloride: a study of blood and tissue cobalt concentrations in normal subjects and patients with terminal and renal failure. *Clin. Nephrol.* 1976;5(2):61–65.
76. Schirmacher U.O. Case of cobalt poisoning. *Brit. Med. J.* 1967;1(5539):544–545. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.5539.544>
77. Licht A., Oliver M., Rachmilewitz E.A. Optic atrophy following treatment with cobalt chloride in a patient with pancytopenia and hypercellular marrow. *Isr. J. Med. Sci.* 1972;8(1):61–66.
78. Kriss J.P., Carnes W.H., Gross R.T. Hypothyroidism and thyroid hyperplasia in patients treated with cobalt. *J. Am. Med. Assoc.* 1955;157(2):117–121. <https://doi.org/10.1001/jama.1955.02950190017004>
79. Jacobziner H., Raybin H.W. Poison control... accidental cobalt poisoning. *Arch. Pediatr.* 1961;78:200–205.
80. Lison D., De Boeck M., Verougstraete V., Kirsch-Volders M. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. *Occup Environ Med.* 2001;58(10):619–625. <https://doi.org/10.1136/oem.58.10.619>
81. Pulido M.D., Parrish A.R. Metal-induced apoptosis: mechanisms. *Mutat Res.* 2003;533(1–2):227–241. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2003.07.015>
82. Aggarwal S.K., Kinter M., Herold D.A. Determination of cobalt in urine by gas chromatography-mass spectrometry employing nickel as an internal standard. *J. Chromatogr. B.* 1992;576(2):297–304. [https://doi.org/10.1016/0378-4347\(92\)80203-3](https://doi.org/10.1016/0378-4347(92)80203-3)
83. Minakata K., Suzuki M., Suzuki O. Application of electrospray ionization tandem mass spectrometry for the rapid and sensitive determination of cobalt in urine. *Anal. Chim. Acta* 2008;614(2):161–164. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2008.03.043>
84. Todorovska N., Karadjova I., Arpadjan S., Stafilov T. Electrothermal atomic absorption spectrometric-determination of cobalt in human serum and urine. *Acta Pharm.* 2003;53(2):83–90.
85. Sarmiento-Gonzalez A., Marchante-Gayon J.M., Tejerina-Lobo J.M., Paz-Jimenez J., Sanz-Medel A. High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008;391(1):2583–2589. <https://doi.org/10.1007/s00216-008-2188-4>
86. Popot M.-A., Ho E.N.M., Stojiljkovic N., Bagilet F., Remy P., Maciejewski P., Loup B., Chan G.H.M., Hargrave S., Arthur R.M., Russo C., White J., Hincks P., Pearce C., Ganio G., Zahra P., Batty D., Jarrett M., Brooks L., Prescott L.-A., Bailly-Chouriberry L., Bonnaire Y. and Wan T.S.M. Interlaboratory trial for the measurement of total cobalt in equine urine and plasma by ICP-MS. *Drug Test Anal.* 2017;9(9):1400–1406. <https://doi.org/10.1002/dta.2191>
87. Knoop A., Planitz P., Wüst B., Thevis M. Analysis of cobalt for human sports drug testing purposes using ICP- and LC-ICP-MS. *Drug Test Anal.* 2020;12(11–12):1666–1672. <https://doi.org/10.1002/dta.2962>
88. Galay E.Ph., Dorogin R.V., Temerdashev A.Z. Quantification of cobalt and nickel in urine using inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy. *Heliyon.* 2021;7(1):e06046. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06046>

### Об авторах:

**Пронина Ирина Валерьевна**, к.б.н., главный специалист отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Россия, 105005, Москва, Елизаветинский переулок, дом 10, стр. 1); старший научный сотрудник лаборатории патогеномики и транскриптомики Федерального государственного бюджетного учреждения «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии» (Россия, 125315, Москва, ул. Балтийская, д. 8). E-mail: [pronina@dopingtest.ru](mailto:pronina@dopingtest.ru). Scopus Author ID 8161867200, ResearcherID G-3951-2014, <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

**Мочалова Елена Сергеевна**, исполняющий обязанности директора Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Россия, 105005, Москва, Елизаветинский переулок, д. 10, стр. 1). E-mail: [mochalova@dopingtest.ru](mailto:mochalova@dopingtest.ru).

**Ефимова Юлия Александровна**, к.х.н., доцент, кафедра аналитической химии им. Алимарина И.П. Института тонких химических технологий им. М.В. Ломоносова, ФГБОУ ВО «МИРЭА – Российский технологический университет» (119571, Россия, Москва, пр. Вернадского, д. 86). E-mail: [efimova\\_yulia@bk.ru](mailto:efimova_yulia@bk.ru). <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

**Постников Павел Викторович**, к.х.н., начальник отдела допингового контроля Национальной антидопинговой лаборатории (Института) Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова (Россия, 105005, Москва, Елизаветинский переулок, д. 10, стр. 1). E-mail: [postnikov@dopingtest.ru](mailto:postnikov@dopingtest.ru). <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>

**About the authors:**

**Irina V. Pronina**, Cand. Sci. (Chem.), Main Specialist, Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia); Senior Researcher, Pathogenomics and Transcriptomics Laboratory, Institute of General Pathology and Pathophysiology (8, ul. Baltiiskaya, Moscow, 125315, Russia). E-mail: pronina@dopingtest.ru. Scopus Author ID 8161867200, ResearcherID G-3951-2014, <https://orcid.org/0000-0002-0423-7801>

**Elena S. Mochalova**, Acting Director, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia). E-mail: mochalova@dopingtest.ru.

**Yuliya A. Efimova**, Cand. Sci. (Chem.), Assistant Professor, I.P. Alimarin Department of Analytical Chemistry, M.V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technologies, MIREA – Russian Technological University (86, Vernadskogo pr., Moscow, 119571, Russia). E-mail: efimova\_yulia@bk.ru. <https://orcid.org/0000-0002-3582-0012>

**Pavel V. Postnikov**, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Doping Control Department, National Anti-Doping Laboratory (Institute), Lomonosov Moscow State University (10-1, Elizavetinskii per., Moscow, 105005, Russia). E-mail: postnikov@dopingtest.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3424-0582>

*Поступила: 17.05.2021; получена после доработки: 08.06.2021; принята к опубликованию: 23.07.2021.  
The article was submitted: May 17, 2021; approved after reviewing: June 08, 2021; accepted for publication: July 23, 2021.*