

Aus dem Institut für Molekulare Zellbiologie
des Zentrums für Experimentelle Medizin
des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktorin Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

**Untersuchungen zum
Chromstoffwechsel in der Ratte:
Synthese, Absorption und Retention
von ⁵¹Chromverbindungen**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

Karin Kottwitz

Hamburg 2007

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 14.10.2008

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/ die Vorsitzende: Herr PD Dr. Dr. P. Nielsen

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Frau Prof. Dr. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Herr Prof. Dr. U. Beil

Danksagungen

Diese Arbeit ist mit der Unterstützung und Beteiligung von Personen und dem Institut für Molekulare Zellbiologie entstanden, denen ich meinen Dank aussprechen möchte.

Prof Dr. Dr. Ulrike Beisiegel danke ich für die Möglichkeit einer Disseration an ihrem Institut.

Meinem Doktorvater PD Dr. Dr. Peter Nielsen bin ich für seine Förderung und seine wertvolle und stetige wissenschaftliche Betreuung während meiner Doktorarbeit sehr verbunden.

Rosemarie Kongi, Dr. Rainer Engelhardt und Dr. Roland Fischer, dem Team der Eisenstoffwechselambulanz, danke ich für ihre Hilfe.

Ein persönlicher Dank geht an meine lieben und großzügigen Eltern.

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Chrom als essentielles Spurenelement	6
1.2	Biochemische und physiologische Funktionen von Chrom	11
	Molekularbiologische Modelle.....	11
	Chromokinetik bei Mensch und Tier	14
	DNS-Schädigung durch Chrom?	17
	Bedeutung von Chrom in der Medizin	18
1.3	Chrom als Nahrungsergänzungsmittel.....	21
2	FRAGESTELLUNGEN UND VERSUCHSAUFBAU	22
3	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1	Chemikalien	23
3.2	Versuchstiere	24
3.3	Tierfutter und Spezialdiäten	24
3.4	Umgang mit Radioaktivität	25
3.5	Synthese der Chromverbindungen	27
	Synthese von ChromTrisPicolinat und ChromDiNicotinat	27
	Synthese von Bishydrohexapropionatrischromium III Nitrate Trihydrate	32
	⁵¹ CrCl ₃	33
3.6	Analyse der Chromverbindungen	34
	UV-VIS Absorptionsspektroskopie.....	34
	HPLC-Analyse	34
	Aktivitätsmessung der radioaktiven Chromlösungen.....	35
3.7	Ganzkörper-Radioaktivitätszähler	36
3.8	Stoffwechselkäfig	39
3.9	Gewinnung und Aufarbeitung der Organproben	40
3.10	Organveraschung und Messung des Eisengehalts in Organen	40
3.11	Ganzkörper-Retentionsmodell	41
4	ERGEBNISSE	42

4.1	Ergebnisse zur Analytik der synthetisierten Chromverbindungen	42
	Ergebnisse der Spektrumanalyse.....	44
	Ergebnisse der HPLC-Analyse zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit.....	47
	Ergebnisse zur Aktivitätsmessung der Chromlösungen	51
4.2	Interstinale Absorption von verschiedenen Chromverbindungen	52
4.3	Ausscheidung von Chrompicolinat.....	53
4.4	Ausscheidung von Chromnicotinat	54
4.5	Akkumulation von Chromverbindungen	56
4.6	Ganzkörperretentionsverlauf verschiedener Chrom-verbindingen.....	57
	Ganzkörperretention nach intraperitonealer Gabe von Chrompicolinat	57
	Ganzkörperretention nach intravenöser Gabe von Chrompicolinat	58
	Ganzkörperretention nach intraperitonealer Gabe von Chromchlorid.....	59
4.7	Organverteilung von Chrompicolinat über 7 Tage	61
4.8	Wechselwirkungen mit dem Eisenstoffwechsel	67
	Ergebnisse zur Messung des Eisengehalts in Lebern	67
	Auswirkung des Eisenhaushaltes auf die Retention von Chrom.....	68
	Auswirkung des Eisenhaushaltes auf die Organverteilung von Chrom.....	70
5	DISKUSSION	73
5.1	Synthetisierte Chromverbindungen.....	73
5.2	Intestinale Absorption.....	73
5.3	Ganzkörperretention und biologische Halbwertszeiten	75
5.4	Organverteilung.....	77
5.5	Chromausscheidung	80
5.6	Chrommetabolismus	81
5.7	Wechselwirkung mit dem Eisenstoffwechsel	82
5.8	Essentialität.....	84
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	85
7	LITERATURNACHWEIS.....	87

1 Einleitung

Chrom hat in den modernen Naturwissenschaften eine über 200 Jahre alte Geschichte. Bekannt wurde es wegen der Vielfarbigkeit seiner Salze und bekam daher seinen Namen von dem griechischen Wort für Farbe „chroma“. Als 1761 Rotbleierz (PbCrO_4) von Johann Gottlob Lehmann im Ural entdeckt wurde, wusste man noch nicht, dass Chrom ein Bestandteil dieses Erzes war. Wenig später, 1770, fand Peter Simon Pallas im Ural ein Erz, welches er wegen seiner roten Färbung Krokoiit nannte. 1797 konnte Louis-Nicolas Vauquelin Chrom(III)Oxid aus Krokoiit und Salzsäure gewinnen und ein Jahr später erhielt er zwar verunreinigtes aber elementares Chrom durch Reduktion des Chrom(III)Oxid mit Holzkohle. Bis Ende des 19. Jahrhunderts wurde Chrom hauptsächlich als Farbpigment genutzt. Seit Ende des 20. Jahrhunderts wird Chrom zur Herstellung von korrosions- und hitzebeständigen Legierungen verwendet. Chrom ist ein Übergangsmetall und kommt hauptsächlich in der dreiwertigen Form Cr(III) vor, welches die stabilste Form ist. Die zwei- und vierwertigen Formen sind instabil und kommen nur sehr selten vor. Die sechswertige Form Cr(VI) ist ein starkes Oxidationsmittel und wird von der International Agency for Research on Cancer und vom US Toxicology Program als karzinogen und Auslöser für Lungenkrebs anerkannt (Barceloux, 1999). Die Toxizität von sechswertigem Chrom liegt vermutlich in dessen Reduktion durch Cytochrom b5 und der Entstehung von freien Radikalen (Borthiry, 2007). Trivalentes Chrom wird dagegen als nicht karzinogen angesehen.

1.1 Chrom als essentielles Spurenelement

1959 wurde Chrom als Bestandteil des Glukose-Toleranz-Faktors entdeckt (Schwartz, 1959) und fand somit Eingang in die Forschung der Spurenelemente und Ernährungsphysiologie. Chrom wird seit 20 Jahren in einschlägigen Lehrbüchern und Veröffentlichungen als essentiell bezeichnet. Es gibt verschiedene Hinweise für eine Funktion von Chrom im Glukose- und Lipidstoffwechsel (aktuelle Übersicht: (Mertz, 1998; Vincent, 2004)). Von dem “Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine of the National Academies of Science” (USA) liegt seit 1980 ein „estimated safe and

adequate daily dietary intake“(ESADDI) von 50-200 µg täglich vor. Diese Angabe wurde 2002 revidiert und mit einem „adequate intake“ von 35 µg / d für Männer und 25 µg / d für Frauen angegeben. Diese Werte berechnen sich aus der durchschnittlichen Nahrungsaufnahme eines erwachsenen Menschen pro Tag (Vincent, 2004). Man nimmt an, dass diese täglich aufgenommene Menge Chrom zu keinem gesundheitlichen Schaden oder Risiko führt. Da der tägliche Bedarf an Chrom sehr gering ist, und Chrom in den meisten Lebensmitteln wie Vollkornprodukten, Fleisch, Hefe und Wasser vorkommt, ist ein Chrommangel unter normalen Ernährungsbedingungen sehr unwahrscheinlich.

Die geringen physiologischen Mengen bilden die Hauptprobleme der Chromforschung, welche direkt abhängig von den aktuellen Analysemöglichkeiten ist. Je größer in einem Organismus die Konzentration eines Elements ist, desto einfacher ist dessen Nachweis. Wasserstoff, Kohlenstoff, Stickstoff, Sauerstoff und Schwefel als Hauptbestandteile eines Organismus können relativ einfach in der Größenordnung g/kg Körpergewicht gemessen werden. Ebenso können Natrium, Magnesium, Kalium, Kalzium, Chlorid und Phosphor noch in g/kg Körpergewicht gemessen werden, allerdings bereits in geringeren Mengen als die zuvor genannten Elemente. Im Gegensatz dazu sind Spurenelemente wie Chrom mit einer Konzentration von weniger als 50 mg/kg Körpergewicht vergleichsweise schwierig zu messen. Ein Fortschritt in der Messung kleinster Mengen von Elementen war die Entwicklung der Atom-Absorptions-Spektroskopie (AAS) durch Alan Walsh. Dabei handelt es sich um eine Konzentrationsbestimmung durch Messung des absorbierten Lichts von Substanzen bzw. Atomen in Gasform. Mit dieser Methode wurden bereits zahlreiche Messungen zur Bestimmung der Konzentration von Elementen bzw. Spurenelementen in Geweben durchgeführt (Kirchgeßner, 1990).

Eine neue Methode zur Bestimmung von Chromkonzentrationen in Blutproben ist der „advanced oxidation process“ (AOP). Hierbei handelt es sich um eine Vorbehandlung der Blutprobe mit H₂O₂ und UV-Licht, um organisches Material zu zerstören und Chrom aus seinen Verbindungen zu lösen. Des Weiteren wird die Blutprobe mit Säure (HNO₃) behandelt, um das

Enzym Katalase zu deaktivieren. Die so vorbehandelte Blutprobe wird mit der „catalytic adsorptive stripping voltametry“ (CAAdSV) analysiert und erlaubt eine Genauigkeit der Chromkonzentration von $6 \pm 0,3$ ppb. Die Messergebnisse dieser Methode wurden mittels AAS bestätigt (Yong, 2006). Zur Bestimmung von Chrom(III)Komplexen in biologischen Matrices eignen sich HPLC-Analysenmethoden. Eine bewährte Methode besonders zur Bestimmung von Chrompicolinat ist die „reversed phase high performance liquid chromatography“ (RP-HPLC) (Koll, 2005). Diese Methode wurde auch in der vorliegenden Arbeit als Analysemethode genutzt und wird im Kapitel 3.6.2 genauer erläutert.

Zur Fraktionierung von Chromkomplexen wird auch die „reversed-phase ion-pair chromatography“ (RPIP-HPLC) genutzt. Die RPIP-HPLC ermöglicht eine schonende Fraktionierung von organischen Chromverbindungen durch Verwendung anderer Eluenten.

Der alleinige Nachweis eines Elements in einem Organismus ist jedoch noch kein hinreichender Beweis für eine physiologische Funktion. Es muss daher zwischen lebensnotwendigen „essentiellen“ Spurenelementen und zufällig vorhandenen „akzidentellen“ Spurenelementen unterschieden werden. Je geringer die Konzentration eines Elementes ist, umso schwieriger ist die Beweisführung seiner Essentialität. Dies erklärt sich dadurch, dass der Ansatz solcher Versuche meist im Entzug des entsprechenden Elements liegt, um die dann auftretenden Veränderungen des Organismus zu beobachten. Von Cotzias wurde folgende Definition eines essentiellen Elements formuliert (Cotzias, 1967):

- Das Element ist in allen gesunden Geweben aller Lebewesen vorhanden.
- Seine Konzentration ist von einem Tier zum nächsten ziemlich konstant.
- Sein Entzug aus dem Körper erzeugt reproduzierbar und unabhängig von der betrachteten Spezies die gleichen physiologischen und strukturellen Abnormalitäten.

- Diese durch einen Mangelzustand erzeugten Abnormalitäten werden stets von bestimmten biochemischen Veränderungen begleitet.
- Diese biochemischen Veränderungen können verhindert oder geheilt werden, wenn der Mangelzustand verhindert oder behoben wird.

Die biologische Wirkung eines Elements kann in einer einfachen Dosis-Wirkungsbeziehung dargestellt werden (Mertz, 1987).

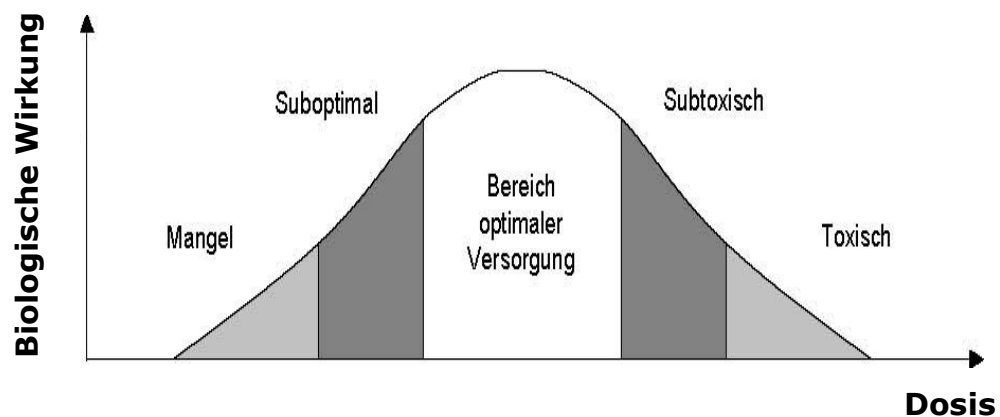


Abbildung 1 Dosis- Wirkungsbeziehung eines Elements im Organismus nach Mertz (Mertz, 1987)

Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der optimalen biologischen Wirkung, welche nur in einem bestimmten Dosisbereich erreicht wird. Außerhalb dieses Bereichs kommt es entweder zu einer Vergiftung (toxisch) oder zu einem Mangel. Mit steigender Dosis lassen sich fünf Bereiche einteilen (Mertz, 1987):

1. **Mangel:** Verbunden mit der Entwicklung klinischer Symptome.
2. **Suboptimal oder Marginal:** Metabolische Defekte sind offensichtlich.
3. **Optimal**
4. **Subtoxisch:** Biochemische Defekte beginnender Toxizität entwickeln sich.
5. **Toxisch:** Klinische Symptome sind manifest.

Als Beispiel für eine solche Dosis-Wirkungsbeziehung soll der Eisenstoffwechsel kurz beschrieben werden, weil Eisen ein dem Chrom ähnliches Übergangsmetall und ein sicher essentielles Spurenelement ist (Kirchgeßner, 1990). Seine wichtigste Funktion besteht in dem Transport von Sauerstoff als Bestandteil des Hämoglobins. Ein Eisenmangel kann bedingt sein durch Mangelernährung, einem genetischen Defekt wie der Thalassämie, einer Autoimmunerkrankung oder einer schweren chronischen Erkrankung. Zu einer Eisenüberladung kommt es beispielsweise bei der Typ1-Hämochromatose. Hierbei handelt es sich um eine autosomal-rezessive Eisenspeicherkrankheit mit einer Punktmutation im HFE-Gen auf Chromosom 6 (Feder, 1996). Der Pathomechanismus liegt in einer aufgehobenen Regulierung der Eisenresorption im Darm. Es kommt zu einer toxischen Eisenüberladung der Organe. Folgen dieser Erkrankung können sein: grau-braune Hautpigmentierung, Splenomegalie, Myokardschädigung, Hodenatrophie durch Hypophysenschädigung, Leberzirrhose und Diabetes mellitus (Bronzediabetes).

Die Wichtigkeit einer feinen Regulierung eines Spurenelementes und die Folgen einer Abweichung aus diesem Gleichgewicht werden aus den beschriebenen Beispielen deutlich. Da bei Elementen, welche in physiologisch niedrigen Konzentrationen vorkommen, ein eventueller Mangel schon durch geringste zugeführte Mengen wieder ausgeglichen wird, kann man bei ubiquitär vorhandenen Elementen kaum einen Mangelzustand erreichen. Ein Beweis für Essentialität kann daher letztlich nur auf molekularer Ebene erbracht werden, indem die molekulare Funktion des Elements eindeutig bestimmt wird. Die unten aufgeführte Tabelle einiger essentieller Spurenelemente mit deren Bestandteil von molekularen Strukturen soll dies verdeutlichen. Die unten gezeigte Tabelle zählt einige essentielle Spurenelemente und deren nachgewiesene physiologische Funktion auf.

Spurenelement	Täglicher Bedarf (mg)	Essentieller Bestandteil von:
Eisen	0,5 – 5	Hämoglobin, Myoglobin und Ferritin
Fluor	5 - 25	Zahnschmelz, Knochen
Jod	0,1 – 0,2	Schilddrüsenhormonen (T3 und T4)
Kobalt	0,005	Vitamin B12
Kupfer	1 – 2,5	Caeruloplasmin, Superoxiddismutase und Zytochromoxidase
Mangan	2 - 5	Thiamin, Superoxiddismutase, Arginase, saure Phosphatase, Glukosyltransferasen
Molybdän	1 – 2,5	Xanthinoxidase
Selen	0,02 – 0,1	Glutathionperoxidase
Vanadium	0,015 – 0,03	Haloperoxidasen, Nitrogenasen
Zink	0,4 - 6	Insulin und Carboanhydrase

Tabelle 1 Essentielle Spurenelemente und deren täglicher Bedarf und Funktion (Auswahl).

1.2 Biochemische und physiologische Funktionen von Chrom

Molekularbiologische Modelle

Aufgrund der vielen Vermutungen einer physiologischen Funktion von Chrom ist es wichtig zu erfahren, wie Chrom auf molekularbiologischer Ebene genau wirkt. Besonders die Funktion im Glukosestoffwechsel ist im Zusammenhang mit der Erkrankung Diabetes mellitus von großem Interesse. Als erster Anhaltspunkt gilt der von Schwarz und Mertz zufällig entdeckte Glukose-Toleranz-Faktor. Der ursprüngliche Versuch sollte die Umstände, welche zu einer Lebernekrose bei Ratten führten, genauer untersuchen. Durch Fütterung einer Spezialdiät stellte sich heraus, dass ein diätischer Seleniummangel zur Lebernekrose führte. Als Nebeneffekt zeigte sich unter dieser Spezialdiät auch eine gestörte Glukosetoleranz, dessen Ursache eine zweite Komponente unabhängig vom Seleniummangel sein musste. Dieser fehlende Faktor wurde Glukose-Toleranz-Faktor genannt (Schwartz, 1957). Seit 1959 ist bekannt, dass der Glukose-Toleranz-Faktor aus Cr³⁺,

Nikotinsäure, Glutaminsäure, Glycin und Cystein besteht und aus Bierhefe und Schweineiere extrahiert werden kann (Schwartz, 1959). Die genaue Wirkung von diesem neuen Glukose-Toleranz-Faktor wurde daraufhin untersucht. Eine Steigerung der Glukoseaufnahme in Muskel- und Fettgewebe wurde beobachtet (Mertz, 1961), welche sich zunächst auf eine Interaktion des Glukose-Toleranz-Faktors mit Insulin zurückführen ließ (Evans, 1973). Weitere Untersuchungen zeigten nur wenig konstante Ergebnisse in Hinblick auf Isolierung und Charakterisierung des Glukose-Toleranz-Faktors (Haylock, 1983; Shepherd, 1992). Die Vermutung kam auf, dass der Glukose-Toleranz-Faktor nur ein Lieferant für absorbierbares Chrom ist, und nicht der biologisch aktive Faktor.

Ein neu entdecktes Metallobio-Molekül für Chrom ist das „low-molecular-weight chromium-binding protein“ (LMWCr) auch **Chromodulin** genannt (Yamamoto, 1987; Sun, 2000). Bei dem LMWCr handelt es sich um ein Polypeptid mit einer Größe von 1500 Da, welches vier Chromionen binden kann (Davis, 1997), und welches gegenwärtig als das Molekül für die biologisch aktive Form von Chrom betrachtet wird (Vincent, 1999), ohne dass jedoch eine definierte Struktur wirklich bewiesen werden konnte.

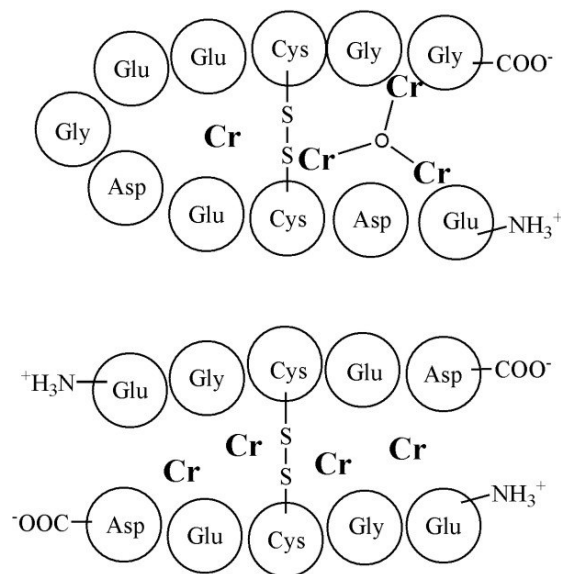


Abbildung 2 Theoretische Modelle eines LMWCr-Molekül (Dinakarandian, 2004)

In-vitro Untersuchungen in Fettzellen haben ergeben, dass LMWCr in einer Postrezeptor-Rolle die Wirkung von Insulin, beispielsweise durch externe Bindung an den Insulinrezeptor, auf Aktivierung und Umwandlung von Glukose in Kohlendioxid und Fett steigerte (Vincent, 1994, Yamamoto, 1989). Das Vorkommen und die Funktion von LMWCr in vivo wurde ausführlich untersucht. Urin- und Galleanalysen haben ergeben, dass Chrom überwiegend in der Form von LMWCr ausgeschieden wird (Manzo, 1983). LMWCr wurde neben Chrompicolinat auch in Urin, Blut, Leber und Niere von Ratten, welche mit Chrompicolinat behandelt wurden, wiedergefunden (Hepburn, 2003). Um zu erklären, wie LMWCr tatsächlich eine steigernde biologische Wirkung von Insulin bewirkt, hat man sich auf die Signalkaskade des Insulin-Rezeptor-Komplexes konzentriert. Da die Wirkung von Insulin auf eine Kaskade von Phosphorylierungen und Dephosphorylierungen beruht, wird angenommen, dass LMWCr an einer Regulierung dieser Phosphorylierungsschritte beteiligt ist. Erste Ergebnisse in isolierten Lipozyten deuteten auf eine mögliche Aktivierung einer membranständigen Phosphotyrosine Phosphatase (PTP1B) durch LMWCr hin (Davis, 1996). Dieses Ergebnis widerspricht jedoch den Erkenntnissen, dass PTP1B den Insulinrezeptor dephosphoryliert und inaktiviert und somit die Insulinwirkung herunterreguliert (Bandyopadhyay, 1997; Kenner, 1996; Walchi, 2000; Elchebly, 1999; Klamann, 2000; Zinker, 2002). Weitere Untersuchungen widerlegten, dass LMWCr PTP1B aktiviert, vielmehr ist seine Funktion in der Verstärkung der Insulinrezeptor-Kinase zu suchen (Hong, 2005). Eine weitere Arbeit erklärt bei mit Chrompicolinat behandelten Tieren die deutliche Verbesserung von Glukosebereitstellung und Insulinwirkung durch eine Verstärkung der intrazellulären Signalkaskade. Hierbei wurde in der Skelettmuskulatur von übergewichtigen insulinresistenten JCR:LA-cp Ratten sowohl eine vermehrte Phosphorylierung bzw. Aktivität von Insulinrezeptor-Substrate (IRS)-1 und Phosphatidylinositol (PI)-3-Kinase als auch eine verminderte „protein tyrosin phosphatase 1B“ (PTP1B) Aktivität gefunden (Wang, 2006). Als Grundlage dieser biochemischen Prozesse zeigt ein hypothetisches Modell eine vermehrte intrazelluläre Aufnahme von Chrom nach Bindung von Insulin. Danach kommt es zur Bildung von Chromodulin,

welches durch Bindung an den Insulinrezeptor die verschiedenen Signalkaskaden verstärkt (Vincent, 2000).

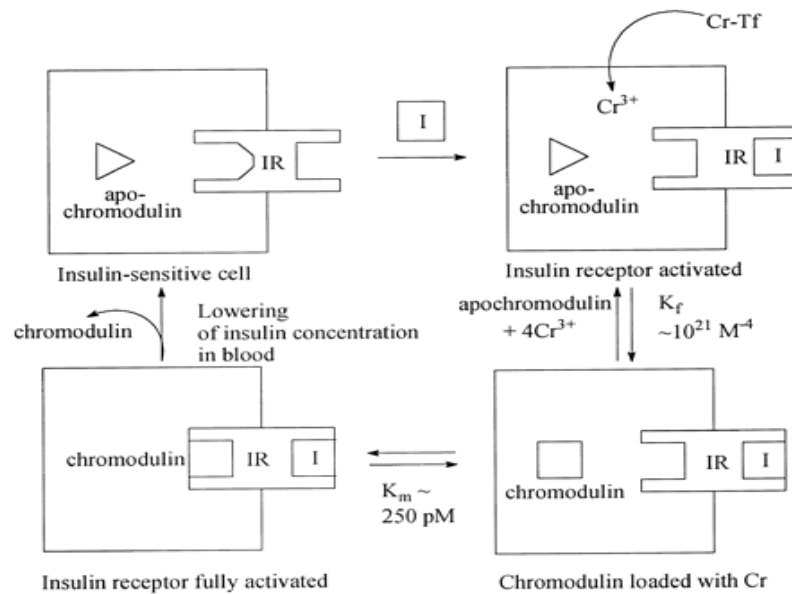


Abbildung 3 Schema einer möglichen physiologischen Wirkung von Chrom. Der Insulinrezeptor (IR) wird durch Insulin (I) aktiviert. Chrom wird in die Zelle transportiert und Apo-Chromodulin zu Chromodulin transformiert. Chromodulin bindet an den Insulinrezeptor und aktiviert die Insulinrezeptor-Kinase. Sobald die Insulinkonzentration sinkt, wird Chrom aus der Zelle hinaus transportiert, um seine Wirkung zu beenden (Vincent, 2000)

Chromokinetik bei Mensch und Tier

Die Chromokinetik befasst sich grundsätzlich mit dem Metabolismus von Chrom wie zum Beispiel Aufnahme, Ausscheidung und Verteilung im Organismus. Bei Versuchen mit Tieren ist die orale Absorption mit durchschnittlich $< 0,5\%$ sehr gering. Ein Einfluss auf die intestinale Absorption nach oraler Gabe von Chromchlorid durch Zusätze wie Insulin, Prostaglandine und anderen Hormonen, diätischen Zusätzen oder verschiedenen Chrommengen, kann nicht beobachtet werden (Anderson, 1995). Die Absorption liegt konstant zwischen $0,3\% - 0,8\%$ der gegebenen Menge, gemessen durch Messungen der Ganzkörperretention 24 Stunden nach Applikation. Die Verteilung im Organismus ist ebenfalls unabhängig von diesen Faktoren. Die Hauptspeicherorgane sind Leber und Nieren. Um also die positiven Eigenschaften von Chrom, wie verbesserte Blutzuckerwerte, geringere Blutfettwerte und die Steigerung der fettfreien Körpermasse,

nutzen zu können, sucht man nach Chromverbindungen, welche eine gute orale Absorption und dadurch eine entsprechend vermehrte Wirkung im Stoffwechsel aufweisen sollen. Eine dem Chrompicolinat ähnliche Verbindung ist das Chromnicotinat. Im Vergleich von Chrompicolinat, Chromnicotinat und Chromchlorid zeigten sich sowohl für die Absorption als auch für die Organverteilung nach oraler Gabe höhere Werte für Chromnicotinat als für Chrompicolinat und Chromchlorid (Olin, 1994). Nach oraler Gabe von radioaktiv markiertem Chrom fand man nach 12 Stunden im Urin nach Chromnicotinat-Gabe 6,25 %, nach Chrompicolinat 3 % und nach Chromchlorid 4,35 % der Aktivität wieder. Die Hauptmenge von allen Chromverbindungen 12 Stunden nach der Applikation befand sich in Leber, Nieren, Muskulatur und im Blut.

Eine Arbeit von Mertz (Mertz, 1965) zeigte den Retentionsverlauf nach intravenöser Gabe von ^{51}Cr -Chlorid. Anhand der Daten während einer Messzeit von 80 Tagen konnten die Kinetik des Chromstoffwechsels aufgezeichnet und drei biologische Halbwertszeiten ermittelt werden $t_{1/2} = 0,5$ d, $t_{1/2} = 5,9$ d und $t_{1/2} = 83,4$ d. Es zeigte sich auch, dass die Retention bzw. der Retentionsverlauf unabhängig von der gegebenen Menge und der gefütterten Diät ist. Nach intravenöser Gabe finden sich größere Mengen von Chrom in den Organen Leber und Niere und Muskulatur wieder. Sowohl das Drei-Kompartimentmodell als auch die Organverteilung werden durch andere Arbeiten bestätigt (Onkelinx, 1977; Hopkins, 1965). Die Hauptausscheidung findet innerhalb weniger Tage über den Urin statt. Eine weitere Ausscheidung findet über die Leber bzw. die Galle statt, welche sich in der messbaren Aktivität im Kot zeigt. Nach einer langfristigen Speicherung von Chrom in Organen findet nur noch eine sehr geringe und langsame Ausscheidung statt. Es zeigte sich immer wieder, dass die Retention und die Organverteilung unabhängig von der gegebenen Menge, der Diät und auch dem Geschlecht sind. Ein Unterschied in der Retention und Verteilung von ^{51}Cr findet sich hingegen bei unterschiedlichen Chromverbindungen (Anderson, 1996). Hier zeigt sich auch, dass zwar die Chromverbindung, jedoch nicht die absorbierte Menge einen Einfluss auf die Organverteilung hat, und dass das im Blut gemessene ^{51}Cr nicht proportional zu der Chromkonzentration in den Organen ist.

Die Untersuchungen zur Chromokinetik beim Menschen liefern ähnliche Ergebnisse. Die orale Verfügbarkeit von Chrom ist ebenfalls sehr niedrig, weswegen Chrom auch als nicht absorbierbarer Marker für Studien im Magendarmtrakt gilt (Anals of the ICRP, 1987). Je nach Art der Chromverbindung variiert die orale Absorption von Chrom. Chromchlorid hat eine Absorption von 0,4 % (Anderson, 1983), wohingegen für Chrompicolinat eine Absorption von 1,2 % (Campbell, 1999) bis 2,8 % (Gargas, 1994) gemessen wird.

Erste Ergebnisse über den Verlauf der Retention von ^{51}Cr im menschlichen Körper liefert eine Arbeit von Sargent 1979, welche die Retention zwischen Hämochromatosepatienten und Patienten mit normalem Eisenspeicher vergleicht. Ein möglicher Zusammenhang zwischen dem Chromstoffwechsel und dem Eisenstoffwechsel sollte eine denkbare Erklärung für diabetische Symptome bei Hämochromatosepatienten sein. Durch die Eisenüberladung kommt es zu einer möglichen Verdrängung von Chrom, welches ein dem Eisen ähnliches Element ist, und von dem gleichen Protein Transferrin gebunden und transportiert wird (Moshtaghie, 1992; Hopkins, 1964). Der dadurch entstehende Chrommangel verursacht danach die oben genannten Glukosestoffwechselstörungen. Dies war ein neuer Ansatz zu der bisherigen Erklärung, dass eine Schädigung der endokrinen Pankreas aufgrund der Eisenüberladung bei Hämochromatose zu einem Funktionsverlust und zur Entstehung von Diabetes mellitus führt. Nach intravenöser Injektion von ^{51}Cr -Chlorid fiel auf, dass Patienten mit Hämochromatose im Vergleich zu gesunden Probanden eine geringere Chromretention aufweisen (Sargent, 1979). Man erkennt ein Drei-Kompartimentmodell bei der Retention von Chrom ähnlich wie in den oben genannten Tierversuchen. Da in diesem Versuch auch im Stuhl der Probanden 0,5 % der Aktivität wieder gefunden wird, spricht dies für einen zusätzlichen biliären Transport. In einer weiteren Studie (Lim, 1983) wurde der Chromstoffwechsel zwischen gesunden Probanden mit dem von zwei Hämochromatosepatienten verglichen. Die Ergebnisse der Arbeit dienen zur Aufstellung eines schematischen Modells für die Aufnahme, Organverteilung und Ausscheidung von Chrom in einem Drei-Kompartimentmodell. Die Arbeit gibt wichtige Aufschlüsse über den Transport im Blut, welcher sowohl proteingebunden als auch ungebunden

stattfindet, über den Austausch zwischen Blut und Organen und über die langfristige Speicherung vorwiegend in den Organen Leber und Milz. Weiterhin zeigt der Versuch, dass die Hämochromatosepatienten eine erhöhte Ausscheidung und eine verminderte Speicherung von ^{51}Cr haben.

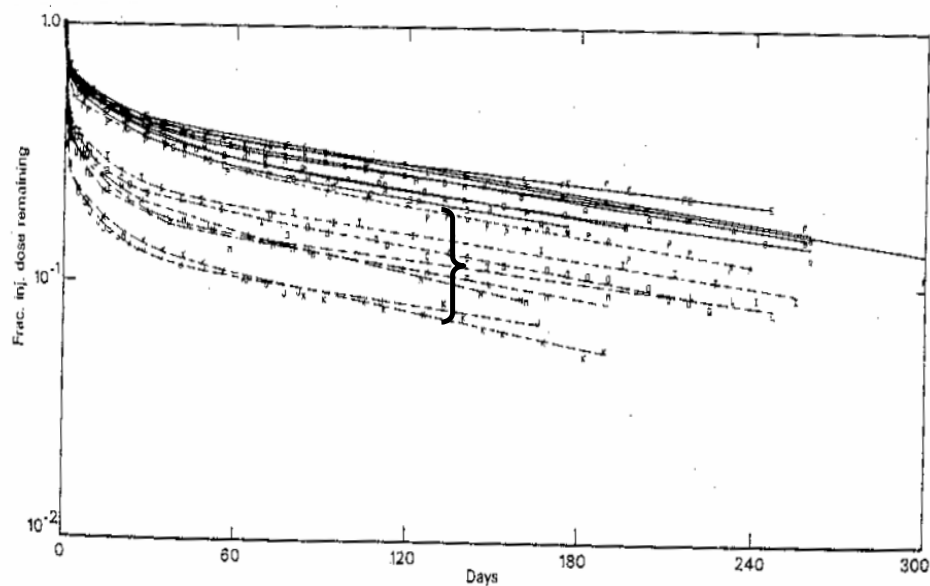


Abbildung 4 Darstellung der Ganzkörperretention über 8 Monate von ^{51}Cr -Chlorid nach intravenöser Injektion. Die verminderte Retention bei Hämochromatosepatienten (gestrichelte Linien) ist durch die Klammer hervorgehoben (Sargent, 1979).

Basierend auf den ermittelten Daten bezüglich Absorption und Retention von Chrom aus Tierversuchen wurde ein Rechenmodell entwickelt, welches auf eine Akkumulation von Chrom im Gewebe in Mengen hindeutet, welche in Tierversuchen und in-vitro Tests DNS schädigend sind (Stearns, 1995). Diese Vermutung mag in Hinblick auf bekannte Speichererkrankungen von anderen ähnlichen Übergangsmetallen wie Eisen (Hämochromatose) und Kupfer (Morbus Wilson) plausibel erscheinen. Aufgrund der geringen Resorption von Chrom sollte jedoch genau beobachtet werden, ob dies der Realität entspricht.

DNS-Schädigung durch Chrom?

Ein weiteres Gebiet der Chromforschung ist dessen Wirkung auf der DNS-Ebene. 1995 zeigten Stearns und Mitarbeiter eine DNS schädigende Wirkung von Chrompicolinat in einem Ovar-Zellmodell von chinesischen Hamstern (CHO) (Stearns, 1995), diese Ergebnisse sind jedoch wegen der

hohen Mengen an Chrom (0,05 – 1 mM) als physiologisch irrelevant angesehen worden. Eine andere Arbeit hatte nach oraler Gabe von 200 mg / kg KG an Ratten keine Chromosomenschäden im Knochenmark gefunden (Komorowski, 1999). In-vitro Tests zeigen eine konzentrationsabhängige Schädigung in Makrophagen, welche mit Chrompicolinat und Chromnicotinat behandelt wurden (Bagchi, 1997). In vivo Tests weisen vor allem auf eine Langzeitschädigung durch ständige Aufnahme von Chrom bzw. Chrompicolinat hin. In einer anderen Arbeit wurde für 2 Monate der Einfluss von täglicher intravenöser Gabe von Chrompicolinat auf die DNS mit einem im Urin messbaren Marker, 8-Hydroxy-deoxyguanosine (8-OHdG), untersucht. Nach einem Monat steigen die 8-OHdG Werte in den Proben der mit Chrompicolinat behandelten Tiere an und weisen auf eine oxidative DNS Schädigung hin (Hepburn, 2003). Da Chrompicolinat auf dem Markt der Nahrungsmittelergänzung als Hauptchromquelle dient, sind weitere Studien zu einer möglichen DNS Schädigung von großem Interesse. Auch der genaue Aufnahmemechanismus von Chrompicolinat, dessen Verstoffwechslung und Abbauprodukte könnten zu einer Klärung der Wirkung von Chrom sowohl im Stoffwechsel als auch auf Ebene der DNS führen.

Bedeutung von Chrom in der Medizin

Welche Rolle spielt Chrom in verschiedenen Stoffwechselwegen und besonders im Glukosestoffwechsel? Bei Tieren wurde beobachtet, dass bei einem Chrommangel der Blutzuckerspiegel erhöht ist und sogar ein Diabetes mellitus mit entsprechenden Symptomen wie erhöhter Insulinspiegel, Glykurämie und Hyperglykämie im Nüchternzustand manifest werden kann. Diese Symptome ließen sich durch Gabe von Chrom bzw. dem Glukose-Toleranz-Faktor wieder beheben (Mertz, 1959; Schroeder, 1965; Schroeder, 1966). Es konnten anschließend auch verminderte Glykohämoglobine (HbA_{1c}) festgestellt werden (Evans, 1993). In-vitro Tests zeigten für Chrompicolinat eine erhöhte Glukoseaufnahme in Muskelzellen und für Chromnicotinat eine erhöhte Insulinaktivität in isoliertem Fettgewebe (Evans, 1993). Bei Ratten mit Chrommangel waren erhöhte Cholesterin- und Triglyzeridspiegel zu messen und eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von

atherosklerotischen Ablagerungen in der Aorta zu beobachten (Schroeder, 1965; Schroeder, 1968; Anderson, 1998). Weitere Untersuchungen zeigten, dass Chrommangel ein vermindertes Wachstum (Schroeder, 1966; Anderson, 1998), eine verminderte Lebensdauer und eine verminderte Fruchtbarkeit und Spermienzahl verursachte (Anderson, 1981). Erste deutliche Hinweise der Auswirkungen eines Chrommangels beim Menschen ergaben sich nach langzeitiger totaler parenteraler chromfreier Ernährung. Die Patienten entwickelten schwere diabetische Stoffwechselstörungen, welche durch die Zufuhr von Chrom und Insulin behoben werden konnten (Jeejeebhoy, 1979; Anderson, 1995). Auch neurologische Symptome wie eine periphere Neuropathie wurden auf Chrommangel, bedingt durch totale parenterale Ernährung, zurückgeführt, als sich eine Besserung der Symptome durch eine Chromsubstitution zeigte (Jeejeebhoy, 1979; Verhage, 1996). Da als möglicher Auslöser dieser Stoffwechselstörungen ein Chrommangel in Betracht gezogen wurde (Freund, 1979), wird heute Chrom der parenteralen Nahrung standardmäßig beigefügt (Anderson, 1995). Es ist nicht auszuschließen, dass eine totale parenterale Ernährung insgesamt zu einer Form von Mangelernährung führen kann, so dass bei diesen Ereignissen eventuell mehrere Faktoren zusammenspielten. Einzelne Beobachtungen zeigten, dass eine Glukosestoffwechselstörung bei mangelernährten Kindern in Jordanien und Nigeria durch Chrom positiv beeinflusst werden konnte (Hopkins, 1968).

Genauere Untersuchungen und Versuche zu dem Einfluss von Chrom auf den Glukosestoffwechsel zeigten, dass viele Patienten mit erhöhtem Blutzucker, einer beginnenden Glukoseintoleranz bis hin zu einem manifesten Diabetes mellitus von einer Chromtherapie profitierten (Anderson, 1998). Eine Kontrollstudie zeigte, dass eine zusätzliche Therapie mit Chrompicolinat und Biotin bei Typ 2 Diabetikern sowohl die Werte des OGTT als auch der Blutfette verbesserte (Singer, 2006). Zusammen mit einer Sulfonylharnstofftherapie zeigte sich sowohl eine verbesserte Insulinsensitivität als auch ein positiver Einfluss auf die Körpermasse (Martin, 2006). Bei insulinresistenten Ratten war auch ein positiver Einfluss auf die Gefäßfunktion und das Nierengewebe bei einer Chromtherapie zu erkennen (Proctor, 2007). Bei Ratten wurde festgestellt, dass ein erhöhter

Blutdruck, ausgelöst durch eine zuckerreiche Diät, mit Chrom wieder gesenkt werden kann (Koplias, 2007).

Im Zusammenhang mit Chrom ist der Glukosestoffwechsel sicherlich der wichtigste und am meisten untersuchte Stoffwechselweg. Es gibt jedoch weitere Stoffwechselbereiche, in denen eine Funktion von Chrom beim Menschen beobachtet wurde, siehe Tabelle 2. Im Zusammenhang mit dem Fettstoffwechsel wurde bei hyperlipämischen Ratten festgestellt, dass auf Ebene der biochemischen Parameter ein positiver Effekt durch eine Chromtherapie bestand (Inceli, 2007). In-vitro Tests mit Leberzellen zeigten eine Verringerung der apoA-I Promoter Aktivität durch Chrom ähnlich wie bei Magnesium und Zink (Haas, 2003).

Eine weitere Methode zur Beurteilung des Chromstoffwechsels ist die Messung von ausgeschiedenem Chrom im Urin. Dabei wurde festgestellt, dass es zu einer vermehrten Ausscheidung von Chrom unter Stressbedingungen, Schwangerschaft und erhöhter Glukosezufuhr kam. Dies wurde als eine Mobilisation von Chromreserven und somit als erhöhter Bedarf an Chrom unter Stressbedingungen interpretiert (Anderson, 1982; Martinez, 1985).

Metabolismus	Funktionsstörung bei Chrommangel
Glukosestoffwechsel	Verminderte Glukosetoleranz, erhöhte Insulinspiegel, Glykosurie, Hyperglykämie, Verminderte Insulinbindung und Insulinrezeptorzahl (Anderson, 1998)
Fettstoffwechsel	Erhöhtes Serumcholesterin und Triglyzeride, verminderte fettfreie Körpermasse (Lean Body Mass) (Anderson, 1998; Evans, 1993)
Nervensystem	Hirn- und Nervenfunktionsstörung (Anderson, 1998), Enzephalopathie und Verwirrtheit, Periphere Neuropathie (Anderson, 1981)
Reproduktionsorgane	Verminderte Fruchtbarkeit und Spermienzahl (Anderson, 1981)
Augen	Erhöhter Augeninnendruck (Anderson, 1998)

Tabelle 2 Einfluss von Chrommangel auf verschiedene Stoffwechselfunktionen.

Gemeinhin kann festgestellt werden, dass bei Chrommangel eine Substitution durch Chrom einen positiven Effekt auf die genannten

Mangelercheinungen ausüben kann. Allerdings gab es bei manchen Supplementationsversuchen durchaus auch widersprüchliche bzw. inkonstante Ergebnisse (Glinsmann, 1966; Sherman, 1968; Schroeder, 1968; Levine, 1968; Hopkins, 1968; Gunton, 2005). Mertz erklärt dies damit, dass Chrommangel nur einer von vielen Faktoren für einen gestörten Glukosestoffwechsel ist (Mertz, 1967).

1.3 Chrom als Nahrungsergänzungsmittel

Obwohl man voraussetzen kann, dass die durchschnittliche tägliche Nahrungsaufnahme eine ausreichende Versorgung mit Chrom gewährleistet ist der Markt für nahrungsergänzende Chrompräparate groß. Chrom als Zusatzpräparat ist besonders unter Sportlern, wegen seiner Eigenschaft den Körperfettanteil zu senken und die Muskelmasse zu steigern, beliebt. Am populärsten ist Chrompicolinat, welches wegen seiner höheren Resorbtiionsrate von 1,2 % dem Chromchlorid mit einer Resorbtiionsrate von 0,4 % vorgezogen wird.

Nahrungsmittelergänzungen werden auch bei älteren Menschen immer populärer. Dabei sollte man vor allem in dieser Altersgruppe auf die Problematik der Wechselwirkung mit Medikamenten achten. Im Falle von Chrom besteht eine mögliche Wechselwirkung mit Diabetes-Medikamenten bei Diabetes Mellitus Typ 2 Patienten (Wold, 2005).

Zur Gewichtsreduktion nehmen über 15 % der amerikanischen Bevölkerung verschiedene Nahrungsergänzungsmittel. Zu den häufigsten gehört Chrompicolinat (Blanck, 2007). In den USA wird jährlich eine halbe Milliarde Dollar für Chrompicolinat ausgegeben (The Chromium File, 1999).

Allerdings zeigte eine neue Studie bei Frauen zur Bewertung der Eigenschaften von Chrompicolinat auf den Stoffwechsel keine Verringerung des Körpergewichts oder des Körperfettanteiles feststellen (Lukaski, 2007). Eine vorgeschlagene Einnahme von bis zu 1 g Chrom täglich kann bedenklich sein, wenn die vermutete DNS schädigende Wirkung von Chrompicolinat zutrifft.

2 Fragestellungen und Versuchsaufbau

Um den Chromstoffwechsel nach oraler und parenteraler Gabe von verschiedenen Chromverbindungen detailliert untersuchen zu können wird in der vorliegenden Arbeit radioaktivmarkiertes ^{51}Cr eingesetzt. Unter Verwendung eines empfindlichen Ganzkörperradioaktivitätszählers sollen Untersuchungen zur Aufnahme, Verteilung und Ausscheidung von Chrom aus verschiedenen Verbindungen gemacht werden. Des Weiteren soll die mögliche Wechselwirkung von Chrom- und Eisenstoffwechsel untersucht werden. In der Arbeit wird damit auch nach Hinweisen gesucht, ob Chrom tatsächlich ein essentielles Element ist.

Konkret geht es in dieser Arbeit um die folgenden Aufgaben und Fragestellungen:

1. Miniaturisierte Synthesen (10 mg Maßstab) von ^{51}Cr -Verbindungen ($^{51}\text{CrCl}_3$, ^{51}Cr -Picolinat, ^{51}Cr -Nicotinat und ^{51}Cr -Propionat) mit möglichst hoher spezifischer Aktivität. Messung der radiochemischen Reinheiten durch HPLC-Chromatographie.
2. Orale und parenterale (i.p., i.v.) Applikation von verschiedenen Chromverbindungen in Gruppen von Ratten. Messung der Absorption, des Verlaufs der Ganzkörperretention und der Organverteilung unter Verwendung des empfindlichen Hamburger-Ganzkörper-Radioaktivitätszählers.
3. Mit Hilfe von Stoffwechselkäfigen soll die Ausscheidung von Chrompicolinat und Chromnicotinat nach oraler und intraperitonealer Gabe über 48 Stunden verfolgt werden. Kommt es zu einer Akkumulierung von Chrom bei täglicher Gabe von Chrompicolinat bzw. Chromnicotinat?
4. Detaillierte Chromkinetik nach Applikation von Cr-Picolinat an der Ratte. Bestimmung von biologischen Halbwertszeiten und ggf. Transferfaktoren
5. Kommt es zu einer Beeinflussung der Chromretention durch den Eisenstatus bei normaler Eisenspeicherung bzw. Eisenüberladung während des Versuchs? Wird die Retention zum Beispiel herunterreguliert?

3 Material und Methoden

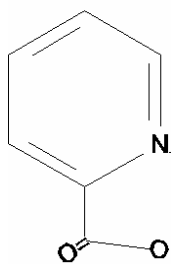
3.1 Chemikalien

Chrom: Für diesen Versuch wurde Chrom (III) – Chlorid Hexahydrat $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($M_r = 266,45$) von der Firma Fluka (St. Gallen, Schweiz) bezogen.

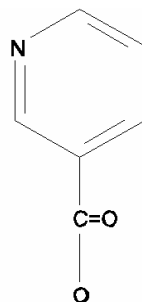
^{51}Cr : Eine $^{51}\text{CrCl}_3$ Lösung in 0,5 M HCL und einer spezifischen Aktivität von 31 GBq/ mg wurde von der Firma PerkinElmer Life and Analytical Sciences (Boston, USA) bezogen. Die Gesamtaktivität von 370 MBq (10 mCi) wurde in zwei Plastikbehältern mit je 185 MBq (5 mCi) und einem Volumen von 10 μl geliefert.

Natriumbikarbonat Na_2CO_3 ($M_r = 105,99$) wurde von der Firma Baker (Phillipsburg, USA) bezogen.

Nicotinsäure und Picolinsäure $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ ($M_r = 123,11$) wurden von der Firma Fluka (St. Gallen, Schweiz) bezogen.



Picolinsäure



Nicotinsäure

Propionsäure $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ ($M_r = 74,08$) wurde von der Firma Sigma (St. Louis, USA) bezogen.

Salpetersäure 65 % HNO_3 ($M_r = 63,02$) wurde von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Wasserstoffperoxid H_2O_2 ($M_r = 34,02$) wurde von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

3.2 Versuchstiere

Die tierexperimentellen Untersuchungen standen in Übereinstimmung mit den Hamburg geltenden Gesetzen und Richtlinien für Tierversuche (Tierversuchgenehmigung 37/04). Für diese Arbeit wurden 30 weibliche Wistar Ratten (150 g) der Charles River Laboratories bezogen. Die Tiere wurden in der Tierhaltung des UKE untergebracht. Nach der Ankunft wurden zwei Wochen bis zum Versuchsanfang gehalten. Im Verlauf wuchsen die Tiere auf ein Durchschnittsgewicht von 300 g.

3.3 Tierfutter und Spezialdiäten

Zur Aufzucht und Haltung bekamen die Tiere eine Standarddiät für Ratten (ssniff R/M-H extrudiert). Die Tiere erhielten zu jeder Zeit Wasser ad libitum. Zur Beeinflussung des Eisenstatus wurden Spezialdiäten gefüttert. Hierzu dienten ein eisenarmes (Altromin C1038) und ein eisenreiches (0,5 % TMH-Ferrocen auf Basis Altromin C1038) Spezialfutter. Bei dem Material TMH-Ferrocen (3,5,5-Trimethylhexanoyl-Ferrocen) handelt es sich um eine lipophile organometallische Verbindung, die eine sehr hohe orale Absorptionsrate besitzt. Dies lässt sich auf seine lipophilen Eigenschaften zurückführen, wodurch TMH-Ferrocen nicht mehr der physiologischen Aufnahmeregulation von ionischem Eisen unterliegt, sondern direkt über die Lipidaufnahme in den Körper gelangt (Nielsen, 1993). Durch diese Eigenschaften ist TMH-Ferrocen geeignet, am Tiermodell die schwere Eisenüberladung wie bei hereditärer Hämochromatose nachzustellen.



Abbildung 5 Darstellung der eisenarmen Spezialdiät links (Altromin C1038) und der eisenreichen Spezialdiät rechts (0,5 % TMH-Ferrocen auf Basis Altromin C1038).

3.4 Umgang mit Radioaktivität

Wegen des notwendigen sorgfältigen Umgangs mit radioaktivem Material wurden entsprechende Strahlenschutzvorschriften genau befolgt. Zunächst erfolgte eine Einweisung und Unterweisung im Strahlenschutz durch die Strahlenschutzbeauftragten der Arbeitsgruppe Eisenstoffwechsel, PD Dr. Dr. P. Nielsen und Dr. R. Engelhardt durchgeführt. Als wichtigste Regel bei dem Kontakt mit Radioaktivität gilt das „ALARA“ Prinzip (As Low As Reasonably Achievable). Das heißt, mit so wenig Aktivität wie möglich, so kurz wie möglich und mit so viel räumlichen Abstand wie möglich, zu arbeiten. Dies bedeutet im Einzelnen, dass die Aktivität in einem Strahlenschutz bunker gelagert wurde und nur zu dem Zeitpunkt der Synthese der radioaktiven Chromverbindungen herausgebracht wurde. Der Umgang mit der hohen Aktivität von maximal 370 MBq wurde durch professionelle Chemiker (Dr. Peter Nielsen) in dafür zugelassenen Räumen durchgeführt. Die Synthese der radioaktiven Substanzen fand hinter einer Bleischutzwand statt. Aus diesem Grund handelt es sich bei den verwendeten Chrommengen um suprphysiologische Mengen. Diese Größenordnung ist aufgrund der notwendigen chemischen Herstellungsmethode der organischen Chromverbindungen und der möglichst geringen Menge der zu handhabenden Radioaktivität nur so möglich gewesen. Ebenfalls im Schutz bunker gelagert wurden die synthetisierten Chromverbindungen, welche eine wesentlich geringere Aktivität aufwiesen. Sie wurden nur zu den einzelnen Arbeitsschritten bei der Rattenapplikation außerhalb des Schutz bunkers angewandt. Mit dem radioaktiven Material wurde ausschließlich in Räumen mit entsprechender Umgangsgenehmigung gearbeitet. Während des Kontakts mit der Radioaktivität und den radioaktiv markierten Tieren wurden Schutzkittel, Schutzbrille, Mundschutz und Handschuhe getragen. Die mit Aktivität belasteten Tiere wurden in einem Stall untergebracht, welcher ebenfalls eine Genehmigung für die Arbeit mit Radioaktivität hatte. Der anfallende Müll wie Streu und kontaminierte Einmalinstrumente wurden in einem Lagerraum gesammelt. Nach einer Zwischenlagerung und dabei erfolgtem weitgehendem Zerfall der Radioaktivität konnte später eine Freimessung des Sondermülls erfolgen und

anschließend ordnungsgemäß entsorgt werden. Die Kadaver und Organe wurden eingefroren und ebenfalls nach Abklingen der Aktivität über die Tierklinik entsorgt. Bei Einhaltung dieser Vorsichtsmaßnahmen war die Strahlenbelastung als vergleichsweise gering einzuschätzen. Um die individuelle Strahlenbelastung objektiv zu dokumentieren, wurde eine Dosimeterplakette getragen, die alle 6 Monate auszuwerten war.



Abbildung 6 Arbeitsplatz für die Synthese von radioaktive Substanzen hinter einer abschirmenden Bleiburg in einem Abzug.

Die physikalische Halbwertszeit von ^{51}Cr beträgt 27,7 Tage. ^{51}Cr hat eine Strahlungsenergie von 320 keV mit einer Emissionswahrscheinlichkeit von 9,8 % und von 5 keV mit einer Emissionswahrscheinlichkeit von 22 %. Die Dosisleistung beträgt $5 \cdot 10^{-6}$ mSv/h. Für eine 40 Stundenwoche gelten folgende Limits der Jahresaktivitätszufuhr: „annual limit on intake“ (ALI) und „derived air concentration“ (DAC); ALI (1%) = 10^9 Bq, ALI (Y) = $7 \cdot 10^8$ Bq, DAC (Y) = $3 \cdot 10^5$ Bq/m³.

3.5 Synthese der Chromverbindungen

Synthese von ChromTrisPicolinat und ChromDiNicotinat

Als Anleitung wurde die Arbeit von Evans und Pouchnik verwendet und modifiziert (Evans, 1993). Vor der tatsächlichen Herstellung von radioaktiven Chromverbindungen, wurde zunächst in der Größenordnung von 1 – 2 Gramm gearbeitet, um die Ausbeute und das Verhalten der Lösungen während der Herstellung abschätzen zu können. Danach wurde das Herstellungsverfahren in verschiedenen Schritten auf kleinere Mengen von 50 mg bis hin zu 10 mg umgestellt.

Synthese von 0,01 Mol ChromTrisPicolinat

Zur Herstellung wurden 0,01 Mol (= 2,6 g) Cr(III)-Chlorid Hexahydrat ($M = 266,45$) in 25 ml destilliertem Wasser gelöst. Zu dieser dunkelgrünen Lösung wurde 0,03 Mol (= 3,7 g) Picolinsäure ($M = 123,11$) gegeben. Die Lösung wurde im Wasserbad auf ca. 40° Celsius erwärmt, wobei sich eine dunkelblaue Lösung entwickelte aus der nach einer Stunde erste rötliche Kristalle ausfielen. Der Ansatz wurde über Nacht bei 40° C weiter gerührt und am nächsten Tag filtriert. Die festen Bestandteile wurden mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Bei diesem Verfahren gewann man rote Kristalle mit einer Ausbeute von 1,7 g (26,9 %).

Chrompicolinat bildet rot glänzende Kristalle. Seine Löslichkeit in Wasser bei einem pH von 7,0 beträgt 0,6 mM und in Chloroform 2,0 mM. Seine molekulare Masse beträgt 418,31 Gramm. Chrompicolinat hat gelöst in Wasser einen Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 15546 \text{ L /Mol} \cdot \text{cm}$ und sein Absorptionsmaximum liegt bei $\lambda = 262 \text{ nm}$ (Evans, 1993).

Synthese von 0,01 Mol ChromDiNicotinat

Zur Herstellung wurden 0,01 Mol (= 2.6 g) Cr(III)-Chlorid Hexahydrat ($M = 266,45$) in 25 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden 0,03 Mol (= 3,7 g) Nicotinsäure ($M = 123,11$) gegeben. Bei Erwärmung im Wasserbad auf 60° Celsius schlug die Farbe von dunkelgrün auf dunkelblau um. Anschließend wurde die Lösung mit NaOH auf pH 7,5 titriert, wobei eine

schaumige Masse entstand, die erst nach Verdünnen mit destilliertem Wasser gefiltert werden konnten. Die gefilterten festen Bestandteile wurden gewaschen und luftgetrocknet. Es ergab sich eine Ausbeute von 2,87 g (45,5 %). Wenn beim Titrieren ein pH-Wert über 7,5 erreicht wird, lösen sich die ausgefallenen Bestandteile wieder komplett auf.

Chromnicotinat ist von grau-blauer Farbe. Seine molekulare Masse beträgt 369 Gramm. Chromnicotinat hat in Wasser gelöst einen Extinktionskoeffizient von $\epsilon = 6000 \text{ L / Mol} \cdot \text{cm}$ und sein Absorptionsmaximum liegt bei $\lambda = 262 \text{ nm}$ (Evans, 1993).

Synthese von 0,2 mMol ChromTrisPicolinat

Es wurde 0,2 mMol (= 52 mg) Cr(III)-Chlorid Hexahydrat in 0,5 ml destilliertem Wasser in einem Eppendorfgesäß aufgelöst und 0,6 mMol (= 74 mg) Picolinsäure dazu gegeben. Die festen Bestandteile lösten sich komplett in destilliertem Wasser auf. Bei Erwärmung auf 57° C zeigte sich zunächst eine Dunkelblaufärbung und nach einer Stunde eine beginnende Rotfärbung der Lösung. Die festen Bestandteile wurden gefiltert, mit destilliertem Wasser gewaschen und luftgetrocknet. Insgesamt wurden 4 Ansätze gefertigt und für 24 Stunden bei 57°C erwärmt. Dabei ergaben sich folgende Ausbeuten:

1. 26,6 mg (21,1 %).
2. 47 mg (37,3 %).
3. 35,8 mg (28,4 %).
4. 44 mg (34,9 %).

Durchschnittliche Ausbeute = 30,4 %

Synthese von 0,2 mMol ChromDiNicotinat

Es wurde 0,2 mMol Cr(III)-Chlorid Hexahydrat (= 52 mg) in 0,5 ml destilliertem Wasser in einem Eppendorfgesäß aufgelöst und 0,6 mMol (= 74 mg) Nicotinsäure dazu gegeben. Hierbei ergab sich als Schwierigkeit, dass sich die Nicotinsäure nicht komplett auflöste. Durch Erwärmen auf 57° C färbte sich der flüssige Anteil dunkelblau und zeigte somit eine Komplexreaktion an. Allerdings war noch nach drei Stunden ein Rest der Nicotinsäure ungelöst. Da als mögliche Ursache hierfür der saure pH-Wert

oder die geringere Reaktionsoberfläche in Betracht kam, wurden folgende Verfahren getestet:

1. Die bereits hergestellte Lösung mit dem Rest an ungelöster Nicotinsäure wurde mit NaOH titriert, um festzustellen, ob durch Erhöhen des pH-Wertes eine bessere Lösung zu erzielen war. Da es zu keinem Erfolg kam, wurde die Lösung zentrifugiert und die flüssige Phase abpipettiert. Die abpipettierte Lösung wurde dann mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt. Hierzu wurde die Lösung aufgrund der Volumenzunahme während des Titrieren auf zwei Eppendorfgefäße verteilt. Die festen Bestandteile wurden dann gefiltert, mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend luftgetrocknet. Es ergab sich eine Ausbeute 22,5 mg (17,8 %).
2. Da als Möglichkeit die geringe Oberfläche zu einer trägen Reaktion führt, wurde die Lösung in der Originalmischung für 24 Stunden bei 57° Celsius belassen, um eine ausreichend lange Reaktionszeit zu gewährleisten. Es war hiernach immer noch ein Rest der Nicotinsäure ungelöst. Bei diesem Verfahren ergab sich eine Ausbeute von 38,2 mg (30,3 %).
3. Um festzustellen, unter welchen Bedingungen sich die Nicotinsäure unter diesen Mengenverhältnissen auflöst, wurde Nicotinsäure mit H₂O vermischt und anschließend mit NaOH auf den pH-Wert 7,5 titriert. Bei einem pH-Wert zwischen 6 – 7,5 liegt die Nicotinsäure komplett gelöst vor. Unter diesen Bedingungen ergab sich bei sonst gleichem Herstellungsverfahren wie bisher geschildert und 24h Erwärmung im Thermostat eine Ausbeute von 59,3 mg (47 %) und 50 mg (39,7 %). Diese Methode wurde schließlich als Herstellungsverfahren angewendet.

Nach mehrfachen Wiederholungen stellte sich das dritte Verfahren aus drei Gründen als die Methode der Wahl heraus. Die Nicotinsäure war komplett gelöst, eine nachträgliche Neutralisierung der Lösung zur Ausfällung von Chromnicotinat durch NaOH war nicht mehr notwendig, und dieses Verfahren ergab die größte Ausbeute.

Mikrosyntheseherstellungsverfahren

Nach den erfolgreichen Versuchen, Chromverbindungen im Mengenbereich von 50 mg zu synthetisieren, sollten beim weiteren Herstellungsverfahren die Radioaktivität und die fünffach geringere benötigte Menge für die Versuche berücksichtigt werden. Weil möglichst wenig Kontakt sowohl zeitlich, als auch räumlich stattfinden sollte, bereitete die bisherige Filtermethode der Ansätze die meisten Schwierigkeiten und musste optimiert werden. Unter diesen Gesichtspunkten stellte sich die Nutzung von Mikrofiltern der Firma Millipor, welche direkt in die Eppendorfgefäße eingesetzt werden, als erfolgreiche Methode heraus. Hierdurch bleibt das Umfüllen in ein weiteres Gefäß nach dem Filtern aus. Zum Verifizieren dieses Verfahrens wurden als Testmengen jeweils 60 μMol Picolinat und Nicotinat in die Becher der Filtereinheit (Ultrafree MC Centrifugal Filter Units with microporous membrane) der Firma Millipor gegeben und mit 200 μl destilliertem Wasser bzw. 200 μl Natronlauge durch mischen mit der Pipette gelöst. Dazu wurden jeweils 20 μMol CrCl_3 gelöst in 100 μl destilliertem Wasser gegeben. Die Lösungen wurden dann für 24 Stunden bei 57° Celsius belassen. Filtrieren und Waschen erfolgte durch Zentrifugation. Die Filtereinheiten wurden dafür jeweils bei 13000 U / Min für 30 Minuten zentrifugiert.

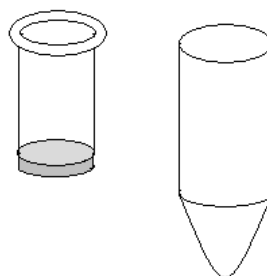


Abbildung 7 Schema einer Filtereinheit mit einer Mikroporenmembran und einem Eppendorfgefäß.

Um die Chrommenge, welche den Tieren verabreicht werden sollte, möglichst gering zu halten, wurde eine Herstellungsmenge der Chromverbindungen von 40 μMol gewählt. Zur Herstellung wurde das oben geschilderte Verfahren angewandt.

Mikrosynthese von 40 µMol ChromTrispicolinat

Es wurden 40 µMol CrCl_3 (= 10 mg) in einem Eppendorfgefäß mit 100 µl H_2O gelöst und 120 µMol Picolinat (= 14 mg) mit 100 µl H_2O in dem Mikrofilter gelöst. Das gelöste Chromchlorid wurde zu der Picolinatlösung in den Mikrofilter pipettiert und vermischt. Das Eppendorfgefäß wurde in dem Thermostat auf 57° Celsius über Nacht erwärmt. Durch Zentrifugation bei 13000 U / Min für 20 Minuten wurde das Chrompicolinat gefiltert und ebenso mit 50 µl H_2O gewaschen.

Mikrosynthese von 40 µMol ChromDiNicotinat

Es wurden 40 µMol (CrCl_3 = 10mg) in einem Eppendorfgefäß mit 100 µl H_2O gelöst und 120 µMol Nicotinat (= 14mg) mit 100 µl NaOH in dem Mikrofilter gelöst. Das gelöste Chromchlorid wurde zu der Nicotinatlösung in den Mikrofilter pipettiert und vermischt. Das Eppendorfgefäß wurde in dem Thermostat auf 57° Celsius über Nacht erwärmt. Durch Zentrifugation bei 13000 U / Min für 20 Minuten wurde das Chromnicotinat gefiltert und ebenso mit 50 µl H_2O gewaschen.

Mikrosynthese von radioaktivem ^{51}Cr Trispicolinat

Es wurden 40 µMol CrCl_3 (= 10 mg) in einem Eppendorfgefäß mit 50 µl H_2O gelöst und 120 µMol Picolinat (= 14 mg) mit 50 µl H_2O in dem Milliporfilter gelöst. $^{51}\text{CrCl}_3$ mit einer Aktivität von 185 MBq wurden mit 500 µl H_2O verdünnt. Hiervon wurden 240 µl in die Picolinatlösung pipettiert und vermischt. Anschließend wurden die 50 µl CrCl_3 in die Lösung pipettiert und ebenfalls vermischt. Das Eppendorfgefäß wurde in dem Thermostat auf 57° Celsius über Nacht erwärmt und vor dem Filtrieren abgekühlt. Durch Zentrifugation bei 13000 U / Min für 20 Minuten wurde das Chrompicolinat gefiltert. Zum Waschen wurden 50 µl eisgekühltes destilliertes Wasser genommen und ebenfalls bei 13000 U / Min für 20 Minuten zentrifugiert.

Mikrosynthese von radioaktivem ^{51}Cr DiNicotinat

Es wurden 40 µMol CrCl_3 (= 10 mg) in einem Eppendorfgefäß mit 50 µl H_2O gelöst und 40 µMol Nicotinat (= 14mg) mit 50 µl NaOH in dem Mikrofilter gelöst. Von der oben genannten $^{51}\text{CrCl}_3$ -Lösung wurden 240 µl in die

Nicotinatlösung pipettiert und vermischt. Anschließend wurden die 50 μl CrCl_3 in die Lösung pipettiert und ebenfalls vermischt. Das Eppendorfgefäß wurde in dem Thermostat auf 57° Celsius über Nacht erwärmt und vor dem Filtrieren abgekühlt. Durch Zentrifugation bei 13000 U / Min für 20 Minuten wurde das Chromnicotinat gefiltert. Zum Waschen wurden 50 μl eisgekühltes destilliertes Wasser genommen und ebenfalls bei 13000 U / Min für 20 Minuten zentrifugiert.

Synthese von Bishydrohexapropionattrischromium III Nitrate Trihydrate

Bei der Synthese wurde nach der Anleitung von Earnshaw (Earnshaw, 1966) gearbeitet. Auch hier wurde schrittweise die Herstellungsmenge der Chromverbindung reduziert.

Synthese von 5 mMol Chrompropionat

Es wurde 5 mMol Chrom Chlorid (III) (= 1,3 g) und 10 mMol Natriumcarbonat $\text{Na}_2\text{CO}_3 = 1 \text{ g}$ ($M_r = 105,9$) jeweils in 40 ml destilliertem Wasser gelöst und vermischt. Dabei entstand eine grau-grüne Lösung, die im Wasserbad auf 60° Celsius für 60 Minuten erhitzt wurde. Das ausgefällte Chromhydroxid wurde filtriert und gewaschen, wobei sich durch die gute Wasserlöslichkeit ein gewisser Verlust in der Blaufärbung der gefilterten Flüssigkeit zeigte. Das noch feuchte Chromhydroxid war von geléeartiger Konsistenz und blauer Farbe. Das Chromhydroxid wurde in 1ml destilliertem Wasser aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden 10 mMol Propionsäure (0,75 g) und 1 ml 10 % Salpetersäure gegeben und anschließend im Wasserbad auf 60° Celsius erhitzt. Die bei Abkühlung entstandenen Kristalle wurden gefiltert und waren von dunkler blau-grüner Farbe.

Mikrosynthese von 40 μMol Chrompropionat

Nach den ersten erfolgreichen Ergebnissen wurde versucht, die Chrompropionat-Verbindung in Mengen von 40 μMol entsprechend den Versuchsgrößen herzustellen. Es wurden 40 μMol CrCl_3 (= 10 mg) in 100 μl destilliertem Wasser gelöst und 80 μMol Na_2CO_3 (= 8,4 mg) ebenfalls in 100

μl destilliertem Wasser gelöst in einem Mikrofilter zusammengemischt. Die Lösung wurde im Thermostat für 60 Minuten auf 57° Celsius erhitzt. Durch Zentrifugation bei 13000 U / Min für 20 Minuten wurde das Chromhydroxid gefiltert. Das Chromhydroxid wurde mit $40 \mu\text{l}$ destilliertem Wasser gelöst und dazu wurden 6 mg Propionsäure und $10 \mu\text{l}$ 10 % Salpetersäure gegeben. Die Lösung wurde im Thermostat auf 57° Celsius erhitzt. Das entstandene Chrompropionat wurde mit 13000 U / Min für 15 Minuten zentrifugiert und einmal gewaschen.

Mikrosynthese von $40 \mu\text{Mol}$ radioaktivem ^{51}Cr -Propionat

Es wurden $80 \mu\text{Mol}$ (= 8,4 mg) Na_2CO_3 in $100 \mu\text{l}$ destilliertem Wasser im Mikrofilter aufgelöst. $^{51}\text{CrCl}_3$ mit einer Aktivität von 185 MBq wurden mit $500 \mu\text{l}$ destilliertem Wasser aufgefüllt und davon $240 \mu\text{l}$ zu den $40 \mu\text{Mol}$ CrCl_3 (= 10 mg) gegeben. Das gelöste CrCl_3 wurde mit der Na_2CO_3 Lösung vermischt. Die Lösung wurde im Thermostat für 60 Minuten auf 57° Celsius erhitzt. Durch Zentrifugation bei 13000 U / Min für 20 Minuten wurde das Chromhydroxid gefiltert. Das Chromhydroxid wurde mit $40 \mu\text{l}$ destilliertem Wasser gelöst und dazu wurden 6 mg Propionsäure und $10 \mu\text{l}$ 10 % Salpetersäure gegeben. Die Lösung wurde im Thermostat auf 57° Celsius erhitzt. Das entstandene ^{51}Cr -Propionat wurde mit 13000 U / Min für 15 Minuten zentrifugiert und ebenso einmal gewaschen, wobei die abfiltrierte Flüssigkeit eine blaue Färbung zeigte.

$^{51}\text{CrCl}_3$

Bei der Vorbereitung der $^{51}\text{CrCl}_3$ -Lösung wurden $40 \mu\text{Mol}$ CrCl_3 (= 10 mg) in 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Hiervon wurden $100 \mu\text{l}$ abpipettiert und mit $23 \mu\text{l}$ der $^{51}\text{CrCl}_3$ -Stammlösung vermischt, so dass das Verhältnis von Chrommenge zu Aktivität bei allen Chromlösungen gleich ist ($230 \mu\text{l}$ $^{51}\text{CrCl}_3$ -Stammlösung auf $40 \mu\text{Mol}$ CrCl_3).

3.6 Analyse der Chromverbindungen

Um die synthetisierten Chromverbindungen zu analysieren und die erfolgreiche Synthese festzustellen, wurden diese in Mikrofiltern mit 400 µl H₂O auf 57° Celsius für eine Stunde erwärmt und sofort mit 13000 U/Min für 20 Minuten zentrifugiert. Hierdurch erhielt man jeweils eine gesättigte Lösung von Chrompicolinat, Chromnicotinat und Chrompropionat. Die verschiedenen Lösungen wurden mit den folgenden drei Methoden analysiert:

UV-VIS Absorptionsspektroskopie

Bei der UV-VIS-Spektralanalyse handelt es sich um eine Meßmethode zur Bestimmung der Konzentration einer Lösung anhand des absorbierten Lichts bei einer bestimmten Wellenlänge. Mit folgender Formel (Lambert-Beer-Gesetz) lässt sich anhand von Konstanten und der Absorption die Konzentration errechnen:

$$A = \epsilon \times d \times c$$

(A = Absorptionsmaximum, d = Durchmesser der Küvette [cm], ϵ = Extinktionskoeffizient [L / Mol] und c = Konzentration [Mol])

Zur Spektralanalyse wurden 1ml QS-Küvetten mit 1 cm Schichtdicke genutzt. Die Messung wurde im Spektrumbereich von 200 nm bis 800 nm durchgeführt. Bei bekanntem Extinktionskoeffizienten von Chrompicolinat und Chromnicotinat konnte so die Konzentration der gesättigten Chromlösung ermittelt werden (Evans, 1993).

HPLC-Analyse

HPLC steht für High Performance Liquid Chromatography und dient sowohl zur Trennung und Qualifizierung von Substanzen, als auch zur Quantifizierung mittels Standards. Zur Auftrennung der zu untersuchenden Substanz wird diese zusammen mit einer mobile Phase (Eluent) durch eine stationäre Phase (Trennsäule) gepumpt. Bei der Normal Phase HPLC wird je nach Polarität der Substanz diese an der Wand der Trennsäule (Silikagel, Kieselgel) festgehalten. So ergibt sich die Retentionszeit. Bei der häufigeren angewendeten Reversed Phase HPLC ist die stationäre Phase unpolar. Die Detektion erfolgt mittels UV- oder Fluoreszenzdetektor. Die HPLC-Analyse wurde mit einer C18 5U Säule durchgeführt. Die Durchflussrate wurde auf

0,8 ml / Min eingestellt. Es wurde ein Eluent aus destilliertem Wasser und Methanol (50/50) hergestellt. Das Photometer wurde auf 262 nm eingestellt.

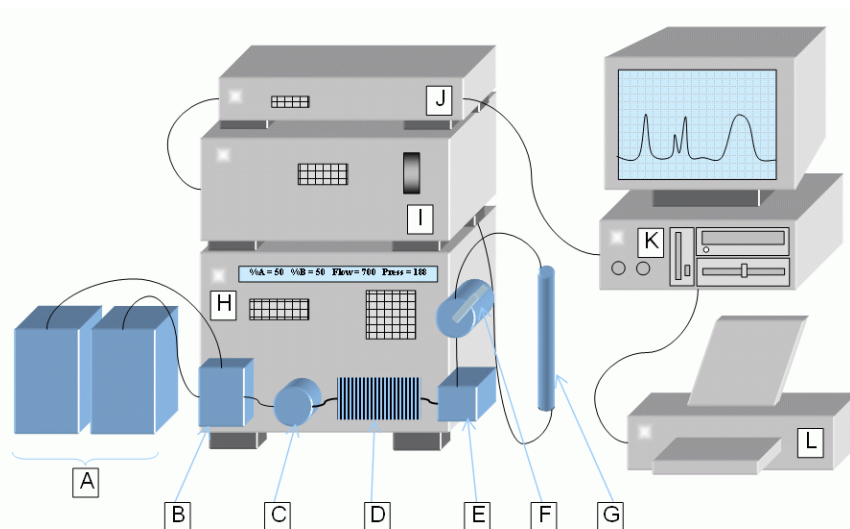


Abbildung 8 Typischer Aufbau einer HPLC Apparatur. A: Eluentenreservoir, B: Elektromagnetische Mischventile mit Doppelhubkolbenpumpe, C: Überdruckventil, D: Druckkompensationsschleife, E: Mischkammer, F: RHEODYNE-Einspritzventil, G: Trennsäule, H: HPLC-Einheit, I: Detektor-Einheit (z. B. UV-Spektrometer), J: Computerinterface, K: PC, L: Drucker.

Zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit wurden die gesättigten radioaktiven Lösungen der Chromverbindungen nach dem Durchlaufen der Trennsäule in vier verschiedenen Behältern aufgefangen. Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils für 100 Minuten im Autogammazähler gemessen. Bei gegebener radiochemischer Reinheit wurde die Hauptaktivität in der Fraktion mit dem Peak des jeweiligen Komplexes wieder gefunden. Als Referenz wurde die Aktivität einer unfractionierten Probe gleicher Menge der jeweiligen Chromlösung gemessen.

Aktivitätsmessung der radioaktiven Chromlösungen

Die gefilterten radioaktiven Lösungen wurden im Ganzkörper-Radioaktivitätszähler gemessen, um anhand der Aktivität die Konzentration zu ermitteln. Bei bekannter spezifischer Radioaktivität, welche zur Herstellung genutzt wurde ($A_x / 40 \mu\text{Mol CrCl}_3$), kann man die Chromkonzentration in der gesättigten Lösung berechnen.

3.7 Ganzkörper-Radioaktivitätszähler

Die physiologischen Mengen des im Körper vorkommenden Chroms befinden sich im nMol Bereich. Aus diesem Grund ist eine exakte Messung der Chrommenge mit herkömmlichen Messinstrumenten wegen deren eventueller Verunreinigungen mit Chrom nicht möglich. Aus diesem Grund wird der Ganzkörper-Radioaktivitätszähler genutzt, um bereits geringste Mengen bzw. Aktivitäten von radioaktiv markiertem Chrom zu registrieren.

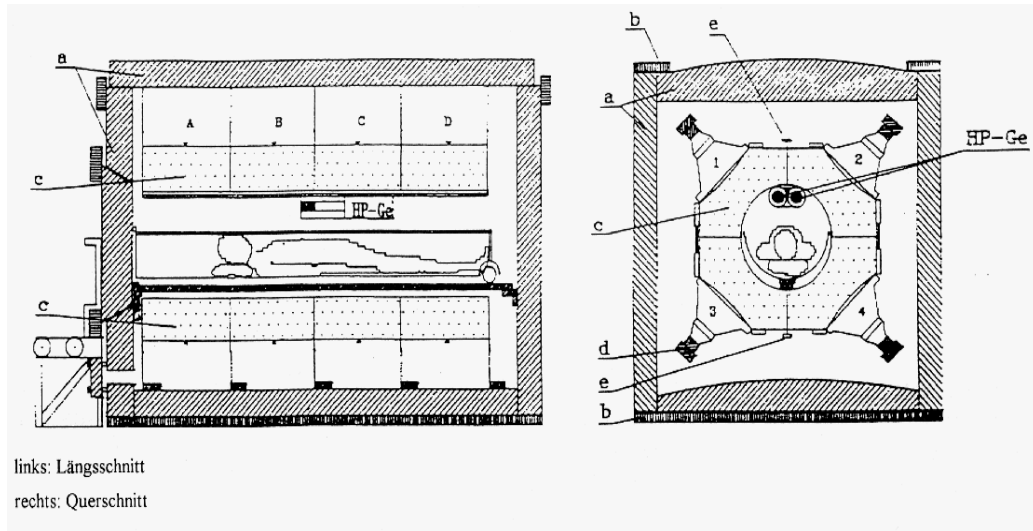


Abbildung 9 Schematischer Aufbau des Hamburger Ganzkörper-Radioaktivitätszählers (HAMCO) a: 15 cm Stahlplatten (Voratomzeitalterstahl), b: 5 cm Halterahmen (Voratomzeitalterstahl), c: Szintillatorflüssigkeit in Modultanks (je 170 l), d: Vorverstärker auf Photomultiplier-Basis, e: Lichtquellen, A,B,C,D: 50 cm Modultanks, 1,2,3,4: Du Mont-K 1328-Photomultiplier, HP-Ge: zwei GP-Ge-Detektoren (n-Typ)



Abbildung 10 Darstellung des HAMCO mit ausgefahrener Liegefläche und einer darauf aufgebauten Brücke mit Mess-Box und darin befindlicher Ratte.

Der zu messende Körper befindet sich in der Mitte des Ganzkörper-Radioaktivitätszählers. Die Aktivität in Form von Gammastrahlen strahlt radial vom Körper ab. Dabei durchdringt die Strahlung eine Szintillationsflüssigkeit, welche in Tanks um die Röhre herum angeordnet ist. In dieser Szintillationsflüssigkeit werden aufgrund des Comptoneffekts Elektronen durch die Gammastrahlen von ihren Atomschalen gelöst. Die kinetische Energie der gestreuten Elektronen wird in Szintillationslicht umgewandelt, welches von den umgebenden Photomultipliern gemessen wird, siehe Abbildung 9. Die in den Photomultiplier erzeugten elektrischen Ladungen werden in Form von Spannungsimpulsen an einen Rechner weiter gegeben. Um ausschließlich die Aktivität des zu messenden Körpers zu bestimmen, ist der Ganzkörper-Radioaktivitätszähler von äußeren Strahlungen durch einen Stahlmantel abgeschirmt. Dieser Stahlmantel darf nicht mit Radioaktivität belastet sein, welches eine Besonderheit im Vergleich zu dem heutigen hergestellten Stahl ist. In der Industrie werden Hochöfen zur Stahlherstellung mit Kobalt-60 versetzt, um so entsprechend der Aktivität die Abnutzung der Ofenwände bestimmen zu können. Stahl, welches auf diese Art hergestellt wird, würde die Messungen von Radioaktivität verfälschen und ist deswegen absolut ungeeignet. Um Verlaufsmessungen mit dem Ganzkörper-Radioaktivitätszähler durchzuführen, sind folgende Einstellungen und Berechnungen nötig:

1. Eichung des Ganzkörper-Radioaktivitätszählers und Bestimmung des Wirkungsgrades

Zur Eichung des Ganzkörper-Radioaktivitätszählers wurde von einer $^{51}\text{CrCl}_3$ -Stammlösung mit einer Aktivität von 37 MBq (1 mCi / ml) eine Menge von 50 μl mit einer Aktivität von $A_0 = 1,85 \text{ MBq}$ (50 μCi) abgenommen. Mit diesem Standard wurde bei bekannter und vorgegebener Aktivität A_0 der Ganzkörper-Radioaktivitätszähler täglich bzw. vor jeder Messreihe auf ^{51}Cr geeicht.

$$A(t) = A_0 * e^{-\lambda t}$$

Um den Wirkungsgrad eines punktförmigen Standards mit einer bekannten Aktivität $A(t)$ zu bestimmen, wurde zunächst der Untergrund des Ganzkörper-

Radioaktivitätszählers gemessen $N_{\text{Untergund}}$. Anschließend wurde die Aktivität des punktförmigen Standards gemessen N_{Brutto} . Daraus ergibt sich $N_{\text{Netto}} = N_{\text{Brutto}} - N_{\text{Untergund}}$. Der Wirkungsgrad wird mit folgender Formel bestimmt:

$$E = N_{\text{Netto}} / A(t) \quad [\%]$$

Für eine punktförmige Quelle betrug der Wirkungsgrad 7,5 %. Um eine in seinen Dimensionen möglichst realitätsnahe Eichung für die Messungen der Tiere zu haben, wurde eine Phantomquelle als Standard hergestellt. Hierbei handelte es sich um eine mit 200 ml Wasser gefüllte Polypropylenflasche, in der $^{51}\text{CrCl}_3$ mit einer Aktivität von $A_0 = 1,48 \text{ MBq}$ ($40\mu\text{Ci}$) gelöst ist. Der Phantomstandard hatte einen Wirkungsgrad von 6,8 %.

2. Absorption

Bei der Absorption handelt es sich um die zeitkorrigierte Zählrate $N(t)$ zum Zeitpunkt t , welche im Verhältnis zur Zählrate N_0 zum Zeitpunkt t_0 gesetzt wird und berechnet sich mit folgender Formel:

$$\text{Abs} = N(t) / N_0 \quad [\%]$$

Um bei Verlaufsmessungen dem radioaktiven Zerfall Rechnung zu tragen, wird entsprechend des Elements und dessen Halbwertszeit eine Zeitabfallkorrektur berechnet. Hierzu entspricht die Aktivität zum Zeitpunkt $t_0 = 100 \%$. Zu jedem späteren Zeitpunkt t_x wird eine aktuelle Zählrate $N_{x\text{Netto}}$ gemessen. Mit der folgenden Formel wird für diese Zählrate die korrigierte Zählrate berechnet:

$$N(t) = N_{x\text{Netto}} * e^{+\Delta t (\ln 2 / T^{1/2})}$$

Bei ^{51}Cr beträgt die physikalische Halbwertszeit 27,7 d.

3. Aktivitätsmessung der Tiere

Bei der Messung der Tiere wird zunächst der Untergrund des Ganzkörper-Radioaktivitätszählers gemessen. Anschließend wird der Untergrund der Ratte ohne applizierte Aktivität gemessen. (Tieruntergrund $N_{\text{Ratte}} \sim 4 \text{ counts}$). Die radioaktive Chromverbindung wurde verabreicht und die Ratte nach 5 bis 10 Minuten nochmals gemessen: $t_0 = N_{\text{Brutto}}$. Daraus ergibt sich $N_{\text{Brutto}} -$

$N_{Ratte} = N_{0Netto}$. Die Aktivität zum Zeitpunkt der Belastung t_0 wird mit 100 % festgelegt. Der Verlauf der Retention wird durch die oben genannten Formeln bestimmt. Für diese Messungen ist es wichtig, dass der Messkörper sich im Ganzkörper-Radioaktivitätszähler annähernd nicht bewegt, um keine Artefakte bei den Messungen zu verursachen. Um dies zu gewährleisten, wurden die Tiere in einer kleinen transparenten Box (30 cm x 20 cm x 20 cm) gemessen. Diese Box wurde auf eine Brücke gestellt, um in der Mitte des Ganzkörper-Radioaktivitätszählers zu stehen. Eine Besonderheit dieser Methode ist, dass die Tiere zur Messung nicht betäubt werden mussten, weil die geringen Bewegungen in der Box von dem Ganzkörper-Radioaktivitätszähler toleriert werden.

3.8 Stoffwechselkäfig

Um die Ausscheidungswege der verschiedenen Chromverbindungen bestimmen zu können, wurden die Ausscheidungen in Stoffwechselkäfigen getrennt und der jeweilige Chromgehalt anhand der Aktivität gemessen. Die Tiere saßen auf einem Gitter, durch welches Kot und Urin fielen, welche durch ein tropfenförmiges Glas getrennt gesammelt werden konnten. Die Tiere bekamen Nahrung und Wasser ad libitum. Die Aufenthaltszeit in dem Stoffwechselkäfig betrug nicht länger als 48 Stunden. Die Tiere hatten zu jeder Zeit Sichtkontakt zu einander.

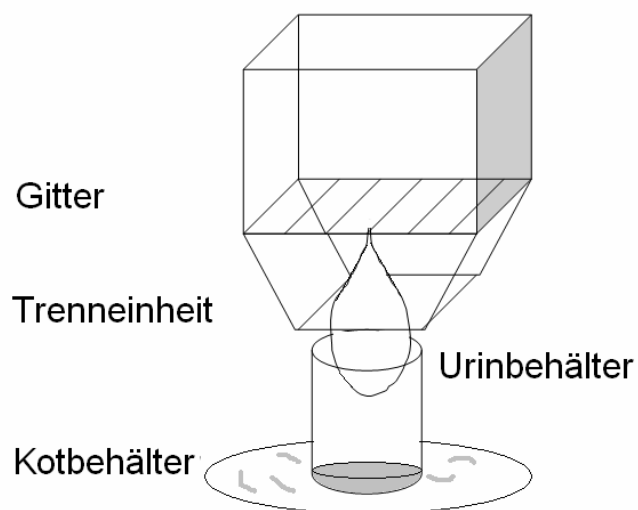


Abbildung 11 Schema eines Stoffwechselkäfigs.

3.9 Gewinnung und Aufarbeitung der Organproben

Die Tiere wurden zuerst mit CO₂ / O₂ narkotisiert und anschließend mit Ketanest intraperitoneal anästhesiert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle und Freipräparation bzw. Darstellung der Aorta abdominalis wurde mit einem 10 ml EDTA Serum-Röhrchen und einer Butterflykanüle aus der Aorta durchschnittlich 8 - 10 ml Blut abgenommen, was die Tiere tötete. Anschließend wurden die Organe entnommen und gewogen. Aus dem Serum-Röhrchen wurde zunächst 1 ml Vollblut entnommen. Der Rest wurde unter Kühlung zentrifugiert, davon wurde 1 ml Serum entnommen. Die Organe wurden sofort zur Messung der Chromaktivität in den Autogammazähler gestellt und anschließend eingefroren. Die ⁵¹Cr-Aktivität in Leber und im Restkörper wurden jeweils im Ganzkörperzähler gemessen.

3.10 Organveraschung und Messung des Eisengehalts in Organen

Der Eisengehalt der Leber wurde von sechs Tieren bestimmt. Hierzu wurden zuvor über zwei Wochen zwei Tiere mit einer eisenreichen Spezialdiät gefüttert, zwei weitere Tiere wurden mit 75 mg TMH-Ferrocen intraperitoneal eisenüberladen und noch mal zwei weitere Tiere erhielten keine Form von Eisenüberladung. Zur Bestimmung des Eisengehalts wurde von den jeweiligen Organen circa ein halbes Gramm zur Messung genutzt. Die Veraschung fand in einem MLS Digestion/ Dryingmodule 1200 statt. Hierzu wurden die Organteile in hitzestabilen Bechern mit 5 ml Salpetersäure und 1 ml Sauerstoffperoxid versetzt und in den Veraschungsofen gestellt, um durch die Hitze von Mikrowellen den Oxidationsprozess zu beschleunigen. Die entstehenden Gase wurden durch ein „Exhaustmodule EM-30“ abgesaugt. Die zurückbleibende Flüssigkeit hatte eine gelbliche Färbung, diese wurde dann auf 50 ml mit H₂O verdünnt. Hiervon wurde ein Aliquot von 1 ml abgenommen. Der Eisengehalt wurde dann mit dem Atomabsorptionsspektogramm (AAS) gemessen.

3.11 Ganzkörper-Retentionsmodell

Um die biologischen Halbwertszeiten der verschiedenen Chromverbindungen nach Aufnahme in den Organismus zu ermitteln, wurde folgendes Retentionsmodell angewandt:

$$R(t) = (100 - a_1 - a_3) \cdot \exp(-\ln 2 \cdot t / T_{1/2}^1) + a_1 \cdot \exp(-\ln 2 \cdot t / T_{1/2}^2) + a_3 \cdot \exp(-\ln 2 \cdot t / T_{1/2}^3)$$

(100 - a₁ - a₃ : Transportpool; a₁ : Transitpool; a₃ : Speicherpool)

Um die dritte Halbwertszeit, welche der minimalen Ausscheidung des gespeicherten Chroms entspricht, besser einzugrenzen, wurden die zweite und die dritte Komponente der Formel zusammengefasst. Hierdurch erhält man eine Untergrenze und eine Obergrenze, in welcher die Halbwertszeit sicher liegt. Das Prinzip dieses Rechenmodells wurde bereits mehrfach angewendet, um biologische Halbwertszeiten von ⁵¹Cr zu ermitteln (Hopkins, 1965; Mertz, 1965; Onkelinx, 1977).

4 Ergebnisse

Zunächst soll die Grundlage der Versuche, nämlich die Analyse der mit ^{51}Cr markierten synthetisierten Verbindungen vorgestellt werden. Anschließend werden die Ergebnisse zur Absorption, zur Retentionskinetik und zum Metabolismus der verschiedenen pharmazeutischen Chromverbindungen in Ratten dargestellt.

4.1 Ergebnisse zur Analytik der synthetisierten Chromverbindungen

Die zwei wichtigsten Chromverbindungen in dieser Arbeit sind Chrompicolinat und Chromnicotinat, deren Synthese im vorigen Kapitel beschrieben wurde. Hierbei handelt es sich um organische Chromverbindungen, welche Pyridinringe besitzen.

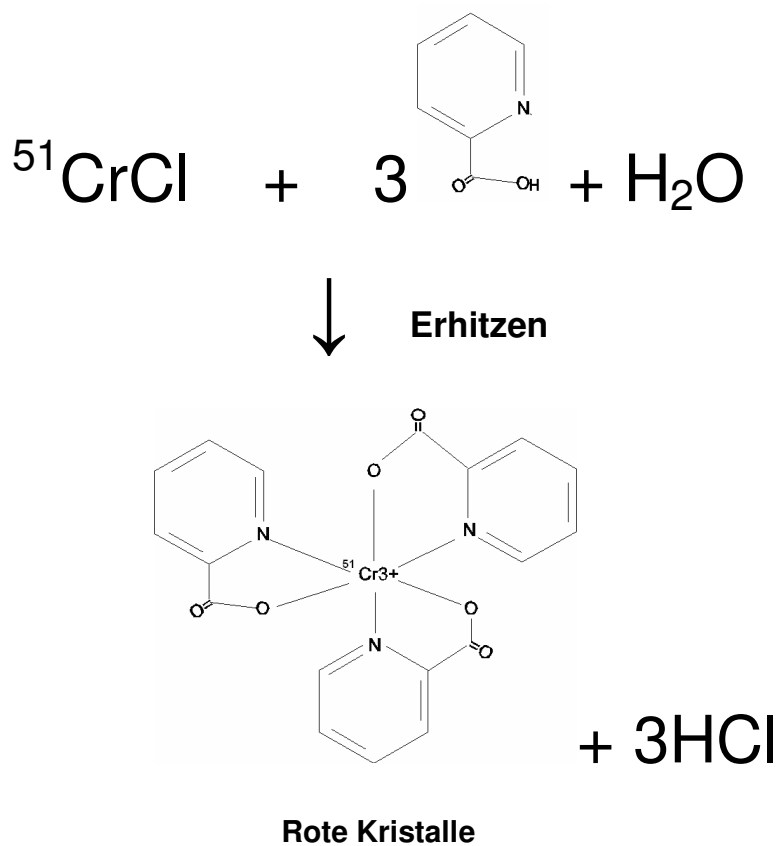
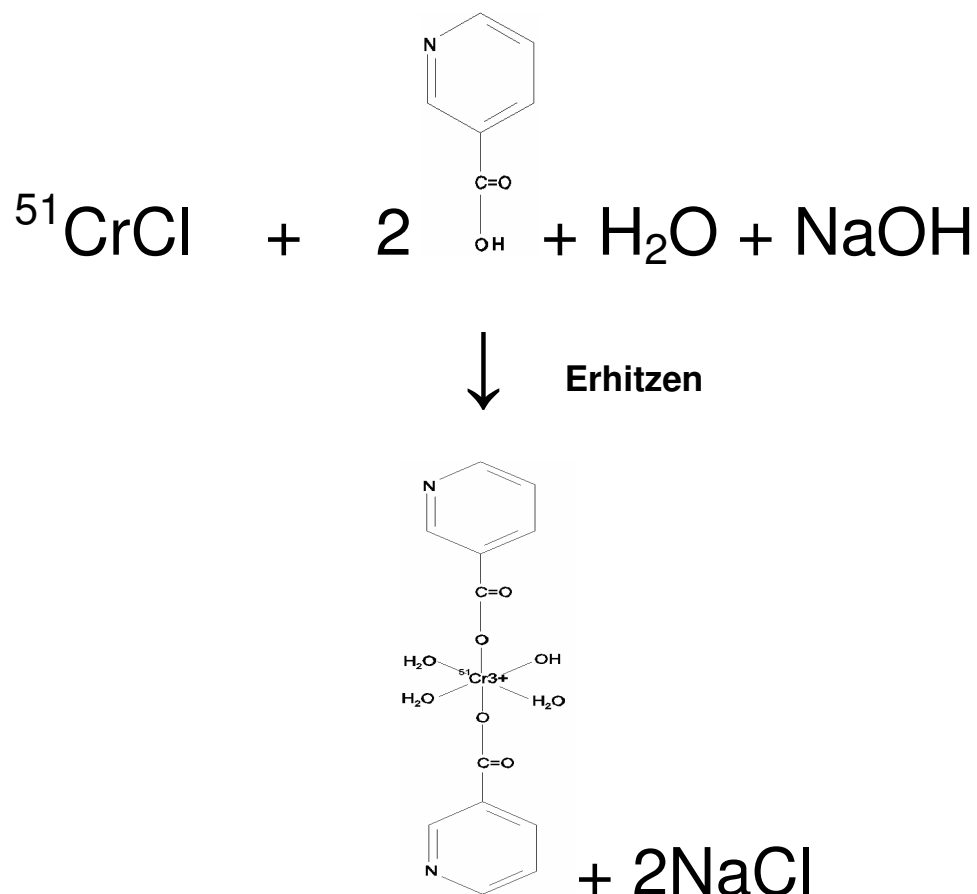


Abbildung 12 Syntheseweg von ^{51}Cr TrisPicolinat



Blau-graue Kristalle

Abbildung 13 Syntheseweg von ${}^{51}\text{CrDiNicotinat}$

Die Oxidationsstufe 3 mit der Elektronenkonfiguration d^3 ist die wichtigste Oxidationsstufe von Chrom. Vom grün gefärbten Ion $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_3]^{3+}$ leiten sich unzählige, relativ stabile Chrom(III)-Komplexe ab, die alle die Koordinationszahl sechs am Zentralatom Chrom aufweisen. Alle diese Chrom(III)-Komplexe haben gemäß der oktaedrischen Ligandenfeldaufspaltung, ungeachtet der Stärke des Ligandenfeldes, drei ungepaarte Elektronen in den t_{2g} -Zuständen und sind damit magnetisch normal. Dies trifft wohl auch auf das relativ stabile Chrompicolinat zu, das rot gefärbt ist.

Ergebnisse der Spektrumanalyse

Durch UV-VIS-Spektroskopie konnte anhand der gemessenen Absorption und des bekannten Extinktionskoeffizienten die Konzentration der gesättigten Lösung der verschiedenen Chromverbindungen errechnet werden. Da die gesättigten Lösungen für eine genaue Messung zu stark konzentriert waren, wurden diese solange mit Wasser verdünnt bis eine Messung möglich war. Anschließend wurde die Konzentration auf die originale Lösung umgerechnet.

Chrompicolinat

Das Spektrogramm zeigt ein Absorptionsmaximum in Wasser (pH 7,0) bei 262 nm von 1,6. Entsprechend dem Lambert-Beer-Gesetz $A = \epsilon \times d \times c$ ergibt sich eine Konzentration von $c = 0,1$ mMol. $A = 1,6$, $d = 1$ cm und $\epsilon = 15546$ L / Mol x cm.

Da es sich bei dieser Lösung um die sechsfache Verdünnung der Originallösung handelte, hatte die Stammlösung eine Konzentration von 0,6 mMol und entspricht somit den Literaturangaben (Evans, 1993).

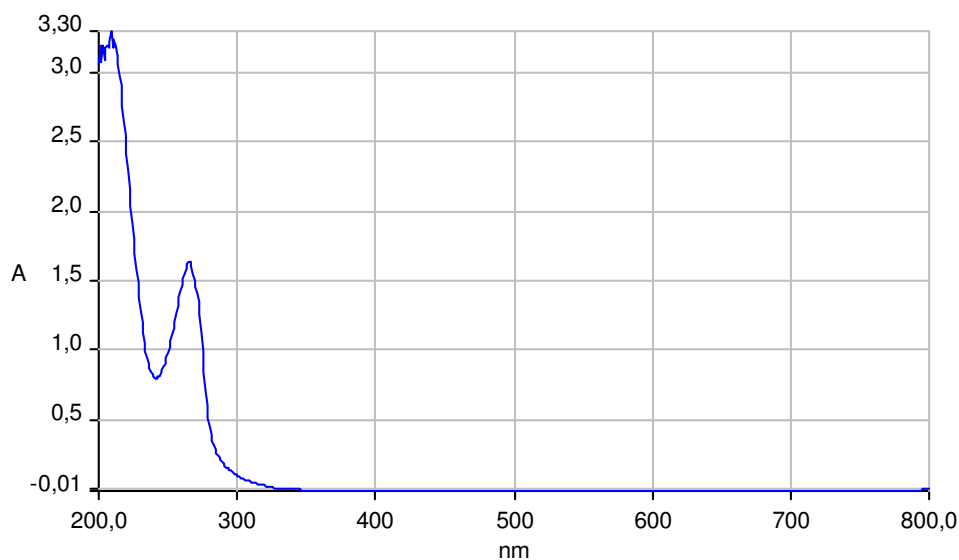


Abbildung 14 Spektrogramm im UV und sichtbarem Bereich von 200 bis 800 nm von 0,1 mMol Chrompicolinatlösung mit einem Absorptionsmaximum in Wasser (pH 7,0) von 1,6 bei 262 nm.

Chromnicotinat

Das Spektrogramm von zwei verschiedenen verdünnten Lösungen zeigt ein Absorptionsmaximum in Wasser (pH 7,0) bei 262 nm von $A_1 = 1,2$ und ein zweites von $A_2 = 0,6$, siehe Abbildung 15. Entsprechend dem Lambert-Beer-Gesetz $A = \epsilon \times d \times c$ ergeben sich die Konzentrationen $c_1 = 0,2$ mMol und $c_2 = 0,1$ mMol. $A = 1,6$, $d = 1$ cm und $\epsilon = 6000$ L / Mol x cm.

Die erste Lösung wurde fünffach und die zweite Lösung zehnfach verdünnt. Somit errechnet sich für die Stammlösung eine Konzentration von 1 mMol, welches der angegebenen Löslichkeit von 12 μ Mol widerspricht (Evans, 1993).

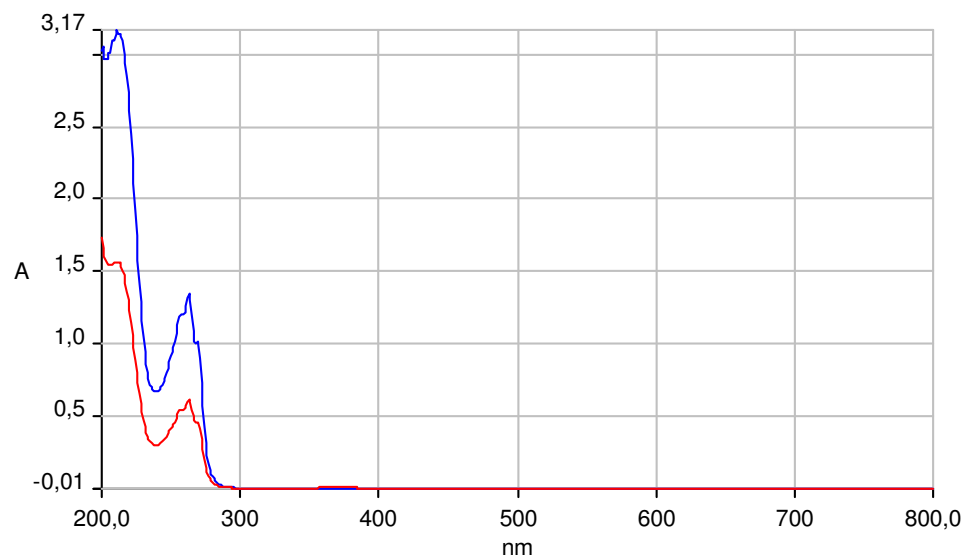


Abbildung 15 Spektrogramm im UV und sichtbarem Bereich von 200 bis 800 nm von 0,2 mmol (blau) und 0,1 mMol (rot) Chromnicotinatlösung mit einem Absorptionsmaximum in Wasser (pH 7,0) von 1,2 und 0,6 bei 262 nm.

Chrompropionat

Das Spektrogramm zeigt einen deutlichen Unterschied zu den beiden oberen. Es zeigt sich keine Absorption bei 262 nm, jedoch in dem langwelligen Bereich von 430 nm und 580 nm entsprechend der grün-blauen Färbung der Chrompropionatlösung.

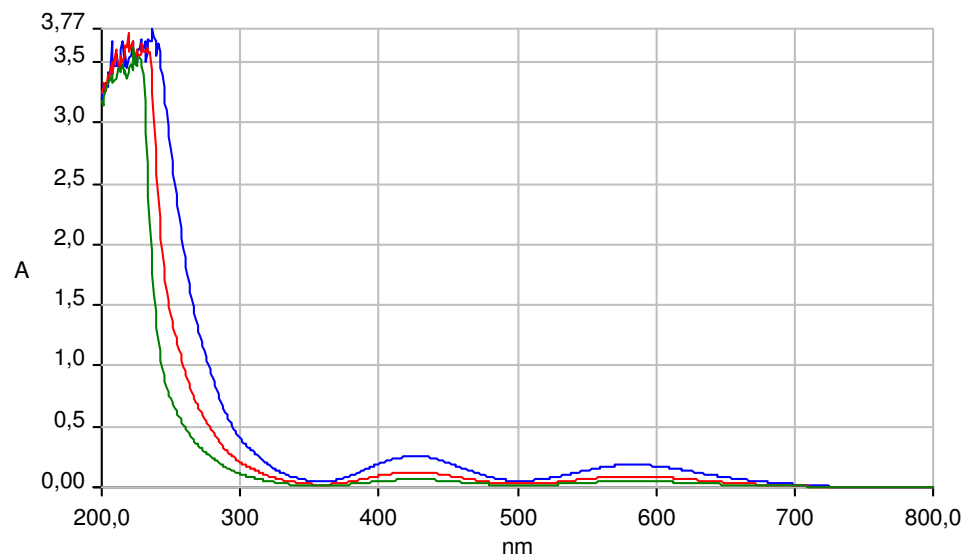


Abbildung 16 Spektrogramm im UV und sichtbarem Bereich von 200 bis 800 nm von Chrompropionat bei zehnfacher, zwanzigfacher und vierzigfacher Verdünnung der gesättigten Stammlösung.

Ergebnisse der HPLC-Analyse zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit

Chrompicolinat

Zum Vergleich wurde das selbst hergestellte Chrompicolinat mit kommerziellem Chrompicolinat in Tablettenform von Nahrungsmittelergänzungsherstellern analysiert. Hierzu wurde eine Chrompicolinatablette in destilliertem Wasser aufgelöst und zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 400 µl abpipettiert, welche nochmals mit einem Mikrofilter bei 13000 U / Min für 20 Min zentrifugiert wurden. Diese Lösungen wurden sowohl einzeln analysiert, als auch gemischt mit dem selbst hergestellten Chrompicolinat.

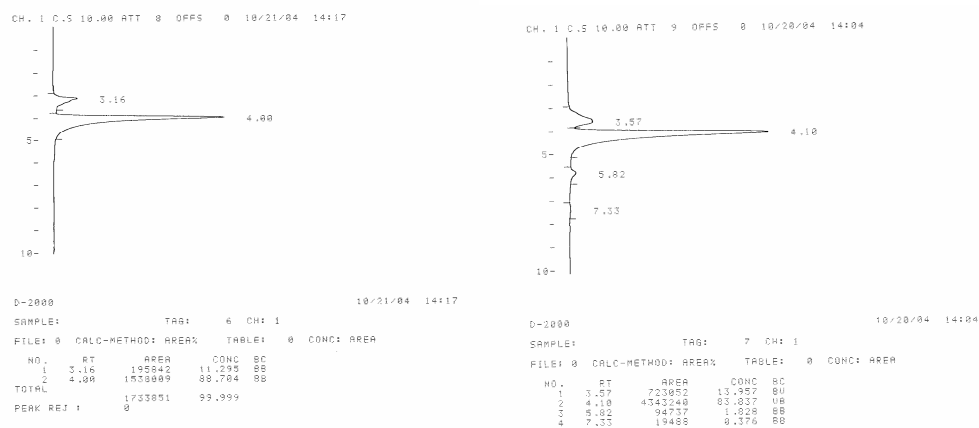


Abbildung 17 HPLC-Chromatogramm von selbst synthetisiertem Chrompicolinat links und Chrompicolinat der Firma "Nature's Valley" rechts.

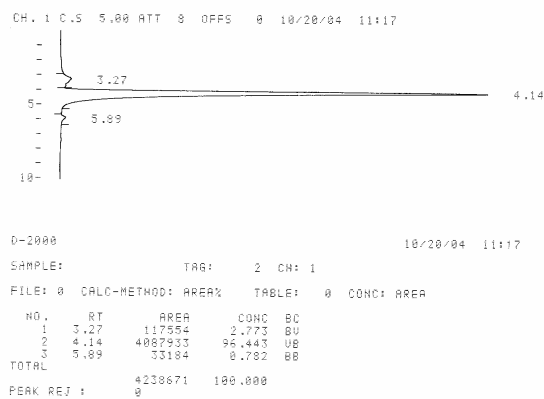


Abbildung 18 HPLC-Chromatogramm von selbst synthetisiertem Chrompicolinat gemischt mit kommerziellem Chrompicolinat.

Man erkennt, dass die kommerzielle Chrompicolinatlösung zum Teil mehrere Peaks aufweist, was für eine Verunreinigung der Lösung bzw. für weitere Zusatzstoffe spricht, siehe Abbildung 17. In der Analyse der Mischung von dem selbst synthetisierten Chrompicolinat mit kommerziellem Chrompicolinat erkennt man, dass es nur einen Hauptpeak gibt, welcher sehr viel größer als die Peaks der übrigen Analysen erscheint, siehe Abbildung 18. Somit ist die gelungene Synthese von Chrompicolinat erwiesen. Zudem wird dies auch durch die Retentionszeit von vier Minuten bestätigt (Evans, 1993).

Um die radiochemische Reinheit der erfolgreich synthetisierten Chrompicolinatlösung zu zeigen, wurden 50 µl der Chrompicolinatlösung fraktioniert und im Auto- γ -Zähler gemessen. Als Referenz wurde die Aktivität von 50 µl unfraktionierter Chrompicolinatlösung gemessen.

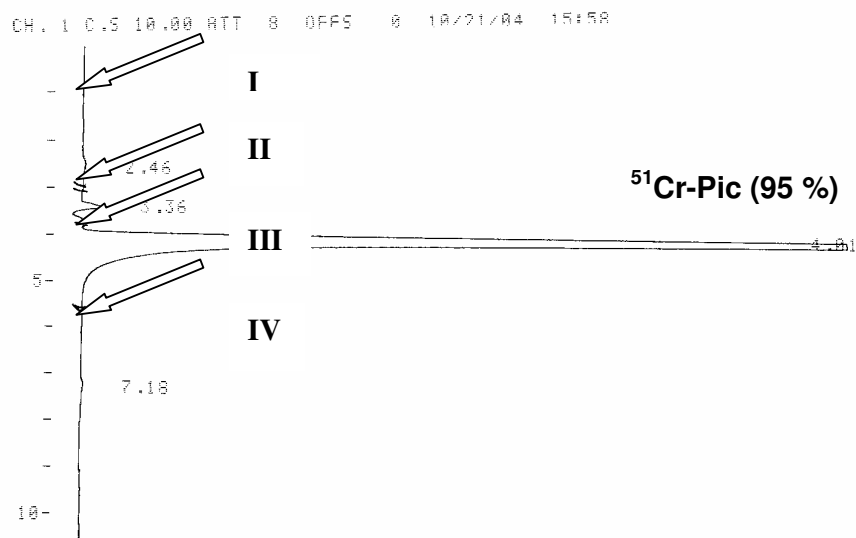


Abbildung 19 HPLC-Chromatogramm zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit von 50 µl gesättigter ^{51}Cr -Picolinatlösung durch Aufteilung in vier Fraktionen.

Zu den angezeigten Zeitpunkten (Pfeile) wurden vier Fraktionen (I – IV) aufgefangen und anschließend im Auto- γ -Zähler dessen Aktivität gemessen. Bei der Messung der Aktivität im Auto- γ -Zähler wurden 95 % der Referenzaktivität in der Fraktion III wieder gefundenen, womit die radiochemische Reinheit für Chrompicolinat und auch die Stabilität des Komplexes erwiesen ist.

Chromnicotinat

Das synthetisierte Chromnicotinat wurde in verschiedenen Mengen als gesättigte Lösung analysiert und ebenfalls die radiochemische Reinheit ermittelt.

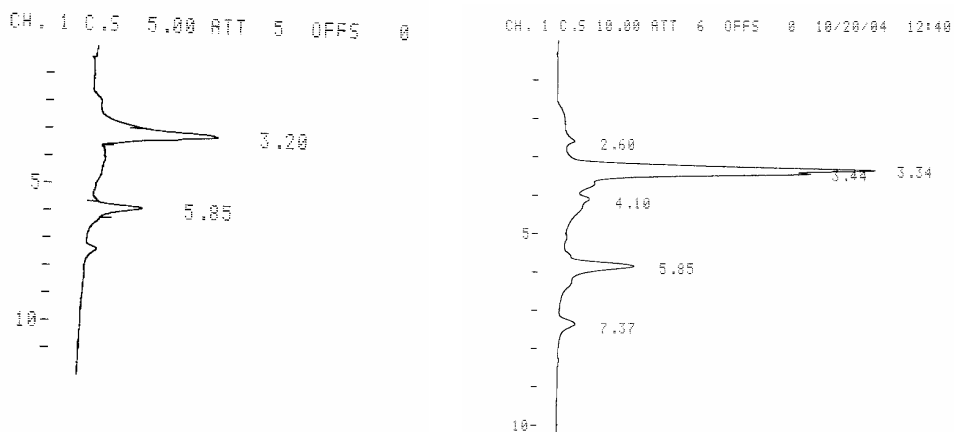


Abbildung 20 HPLC-Chromatogramm von 10 µl links und 25 µl rechts gesättigter Chromnicotinatlösung.

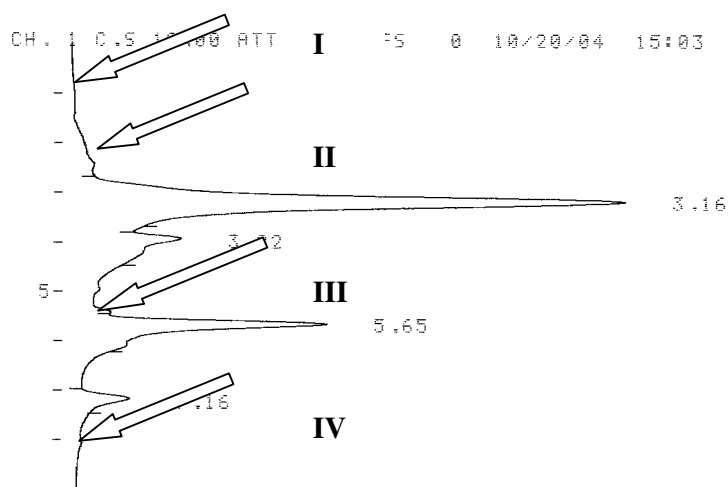


Abbildung 21 HPLC-Chromatogramm zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit von 25 µl gesättigter ^{51}Cr -Nicotinatlösung durch Aufteilung in vier Fraktionen.

In Abbildung 20 erkennt man in dem HPLC-Chromatogramm mehrere Peaks, welche entweder auf Unreinheiten oder einen Zerfall der Chromnicotinatverbindung deuten. Die Aktivitätsanalyse der vier Fraktionen, siehe Abbildung 21, im Auto- γ -Zähler zeigt, dass die Hauptmenge der Aktivität bereits mit der ersten Fraktion durchgelaufen ist und sich nicht wie

erwartet in der zweiten Fraktion wieder findet. Dies deutet auf einen instabilen Chromnicotinatkomplex hin, der die Bedingungen der HPLC-Chromatographie nicht intakt übersteht.

Chrompropionat

Es wurden von der gesättigten Chrompropionatlösung 20 µl in der HPLC-Apparatur analysiert.

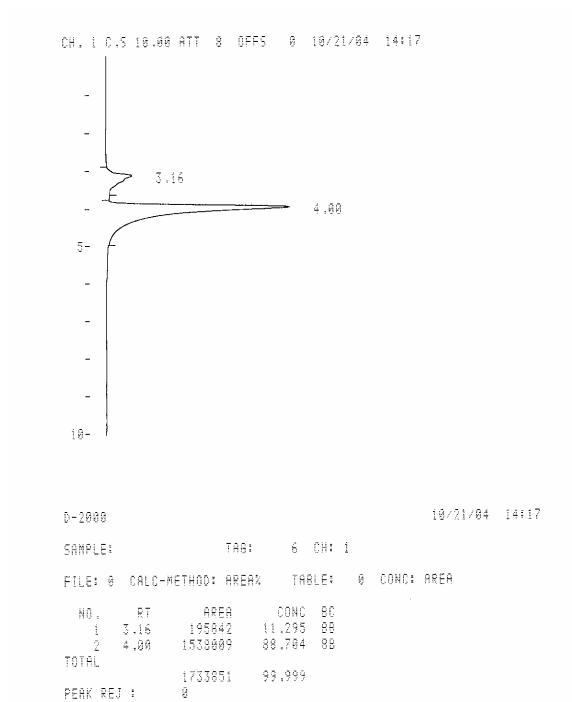


Abbildung 22 HPLC-Chromatogramm von 20 µl gesättigter Chrompropionatlösung.

In der HPLC-Chromatogramm von Chrompropionat erkennt man einen Hauptpeak nach einer Retentionszeit von 4 Minuten, dem ein kleiner Peak voran geht. Daraus kann man schließen, dass keine Verunreinigungen vorliegen und dass es sich um einen stabilen Komplex handelt.

Ergebnisse zur Aktivitätsmessung der Chromlösungen

Bei den synthetisierten Chromverbindungen ist das Verhältnis von Radioaktivität und Chrommenge bekannt. Man kann daher mit der gemessenen Aktivität in einer gesättigten Lösung die Konzentration bzw. die Löslichkeit des Chromkomplexes errechnen.

Chrompicolinat

Bei der Synthese von Chrompicolinat wurden 240 μl (= 88,8 MBq) von einer $^{51}\text{CrCl}_3$ - Stammlösung mit einer Aktivität von 185 MBq / 500 μl (5 mCi / 500 μl) mit 40 μMol CrCl_3 = (2,08 mg Chrom) gemischt. Das entspricht einer Aktivität von 42,7 GBq pro 1 Gramm Chrom. In einem Mol Chrompicolinat ist ein Mol Chrom enthalten. Bei einer Löslichkeit von 0,6 mMol sind in 50 μl gesättigter Chrompicolinatlösung 30 nMol Chrom (= 1,56 μg) enthalten. In diesem Fall müsste dies einer Aktivität von 66,6 kBq (42,7 Gbq / 1g x 1,56 μg) entsprechen. 50 μl der gesättigten Lösung wurden im Ganzkörper-Radioaktivitätszähler gemessen und hatten eine Aktivität von 66 kBq entsprechend einer Löslichkeit von 0,6 mMol.

Chromnicotinat

Bei der Synthese von Chromnicotinat wurde von einer $^{51}\text{CrCl}_3$ - Stammlösung mit einer Aktivität von 185 MBq/ 500 μl (5 mCi/ 500 μl) 240 μl (= 88,8MBq) mit 40 μMol CrCl_3 = (2,08 mg Chrom) gemischt. Das entspricht einer Aktivität von 42,7 GBq/ 1 g Chrom. In einem Mol Chrompicolinat ist ein Mol Chrom enthalten. Bei einer Löslichkeit von 12 μMol sind in 50 μl gesättigter Chromnicotinatlösung 0,6 nMol Chrom (= 31,2 ng Chrom) enthalten. In diesem Fall müsste dies einer Aktivität von 1332 Bq (42,7 Gbq/ 1g x 31,2 ng) entsprechen. 50 μl der gesättigten Lösung wurden im Ganzkörper-Radioaktivitätszähler gemessen und hatten eine Aktivität von 1 kBq entsprechend einer Löslichkeit von 12 μMol .

Die gravierenden Unterschiede zwischen der Spektralanalyse und der Aktivitätsmessung lassen sich wahrscheinlich durch die Instabilität des Komplexes erklären, weswegen auch die HPLC-Analyse keine eindeutigen Resultate zeigt.

4.2 Interstinale Absorption von verschiedenen Chromverbindungen

Der erste Versuch befasste sich mit der Retention 7 Tage nach oraler Gabe der verschiedenen Chromverbindungen. Hierzu wurde von den vier ^{51}Cr -Verbindungen Chrompropionat, Chromchlorid, Chrompicolinat und Chromnicotinat eine Lösung hergestellt, die jeweils vier Gruppen á 5 Tieren per Schlundsonde verabreicht wurde. Zum Zeitpunkt der Gabe waren die Tiere seit 8 Stunden nüchtern. Die reine Chrommenge der jeweiligen Lösungen entspricht $16\ \mu\text{g}$ Chrom. 10 Minuten nach der Gabe wurden die Tiere im HAMCO gemessen und die Aktivität zu diesem Zeitpunkt ($t = 0\ \text{h}$) gleich 100 % gesetzt. 7 Tage nach der Applikation wurden die Tiere wieder gemessen und die Ganzkörperretention (GKR) anhand der Restaktivität ermittelt.

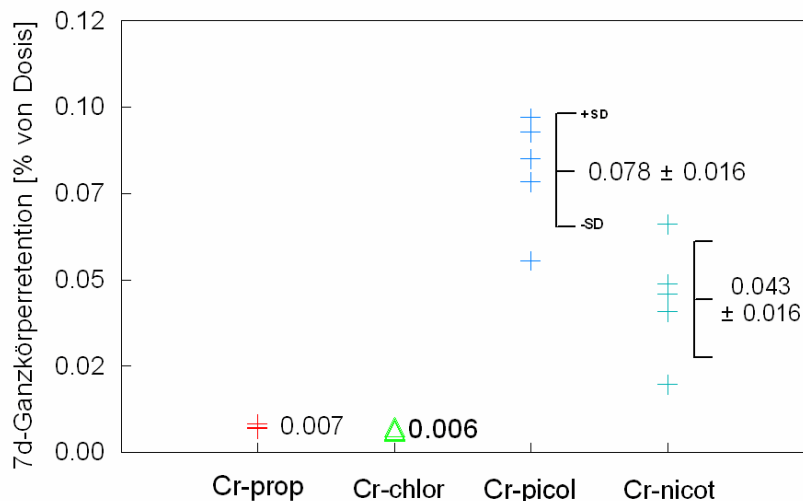


Abbildung 23 ^{51}Cr -Ganzkörperretention von Ratten ($n = 5$) aus verschiedenen pharmazeutischen Chromverbindungen 7 Tage nach einmaliger oraler Gabe von jeweils $16\ \mu\text{g}$ Chrom. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung.

Abbildung 23 zeigt, dass bei allen vier Chromverbindungen bereits nach 7 Tagen mehr als 99 % der gegebenen Aktivität ausgeschieden wurde, wobei man Differenzen in der Retention erkennen kann. Eindeutig zeigt Chrompicolinat von allen Verbindungen mit durchschnittlich 0,08 % die höchste Retention, gefolgt von Chromnicotinat mit durchschnittlich 0,006 %, die ebenso niedrig ist wie die Retention von Chrompropionat.

4.3 Ausscheidung von Chrompicolinat

Zur Messung der Ausscheidung von ^{51}Cr -Picolinat wurden nach oraler bzw. intraperitonealer Applikation jeweils drei Ratten für 48 Stunden in Stoffwechselläufigen gehalten. Sofort nach der Applikation $t = 0$ h wurden Urin und Kot für die ersten 24 Stunden gesammelt (0 – 24 h) und dessen Aktivität gemessen. Anschließend wurden Urin und Kot für die zweiten 24 Stunden (24 – 48 h) gesammelt und ebenfalls dessen Aktivität gemessen. Die Aktivität der gesammelten Proben wurde im Ganzkörper-Radioaktivitätszähler gemessen und auf die applizierte Aktivität bezogen.

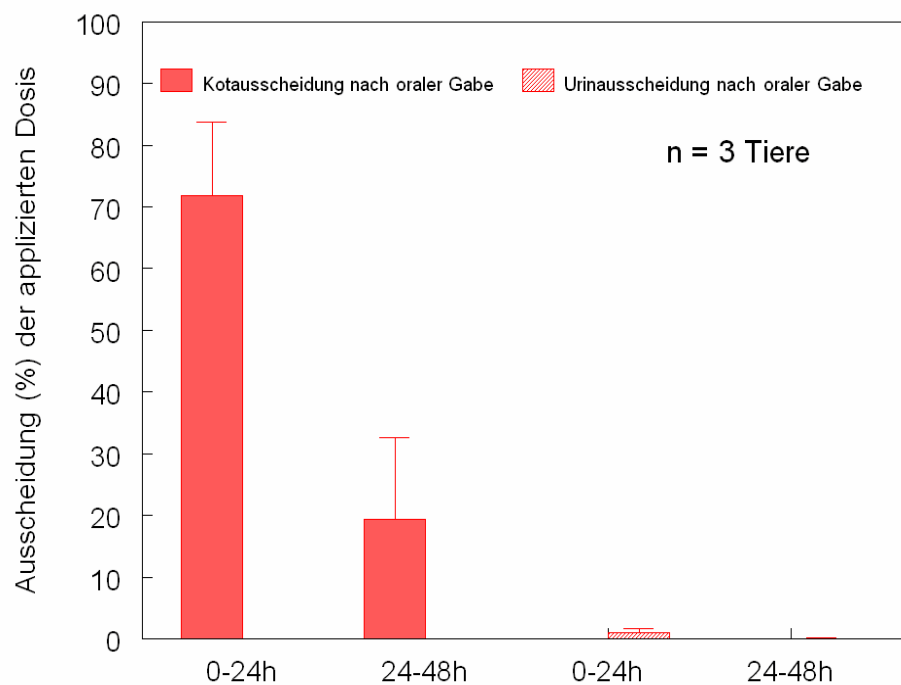


Abbildung 24 Ausscheidung von ^{51}Cr -Picolinat nach oraler Applikation (16 μg Cr). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n = 3).

Abbildung 24 zeigt, dass nach oraler Gabe der überwiegende Anteil des ^{51}Cr -Picolinat nicht resorbiert wurde und bereits über 70 % nach den ersten 24 Stunden über den Kot ausgeschieden wurden. Insgesamt wurden 90 % innerhalb von 48 Stunden über den Kot ausgeschieden. In den ersten 24 Stunden wurde knapp 1 % der Aktivität im Urin wiedergefunden.

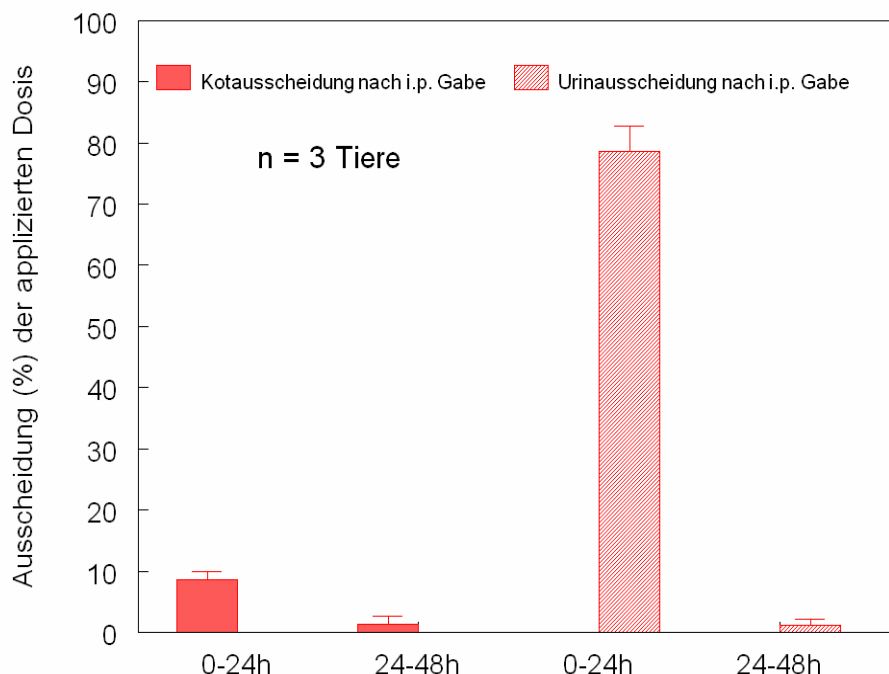


Abbildung 25 Ausscheidung von ^{51}Cr -Picolinat nach intraperitonealer Injektion ($43\ \mu\text{g Cr}$). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung ($n = 3$).

Innerhalb der ersten 24 Stunden wurden über 80 % des intraperitoneal applizierten ^{51}Cr -Picolinats über die Nieren ausgeschieden. Zusammen mit der Ausscheidung über den Kot von circa 9 % sind bereits innerhalb von 24 Stunden circa 90 % der applizierten Menge wieder ausgeschieden. Dieser Wert entspricht den Ergebnissen der Ganzkörperretentionskurve, siehe Kap. 4.6, nach intraperitonealer Gabe von ^{51}Cr -Picolinat, in welcher ebenfalls nach 24 Stunden nur noch 10 % der Aktivität vorhanden war.

4.4 Ausscheidung von Chromnicotinat

Zur Messung der Ausscheidung von ^{51}Cr -Nicotinat wurden auf gleiche Weise wie beim Chrompicolinat nach oraler Applikation drei Ratten für 48 Stunden in Stoffwechselkäfigen gehalten. Die Gewinnung der Ausscheidungen wurde ebenfalls auf gleiche Weise durchgeführt. Dieser Versuch wurde nicht intraperitoneal durchgeführt, da die geringe Löslichkeit von Chromnicotinat eine zu große Applikationsmenge erfordert hätte.

Die Aktivität der gesammelten Proben wurde im Ganzkörper-Radioaktivitätszähler gemessen und auf die applizierte Aktivität bezogen.

Auch beim ^{51}Cr -Nicotinat wurde nach oraler Gabe der Hauptanteil der Aktivität circa 84 % über den Kot innerhalb von 48 Stunden ausgeschieden. Im Vergleich zu ^{51}Cr -Picolinat wurde nach oraler Gabe deutlich weniger Aktivität im Urin wieder gefunden, nur 0,07 %.

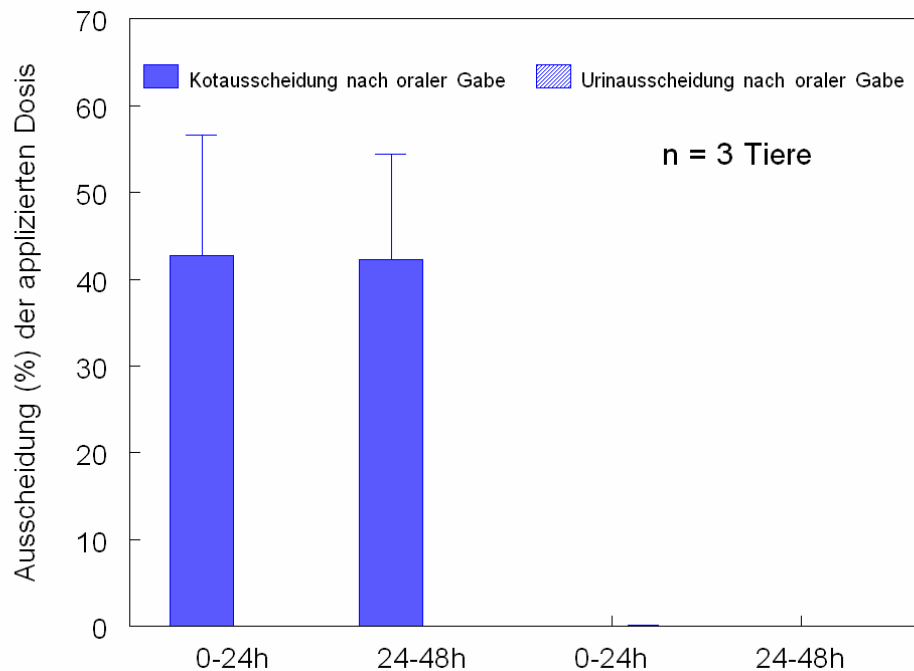


Abbildung 26 Ausscheidung von ^{51}Cr -Nicotinat nach oraler Applikation (16 μg Cr). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichung (n = 3).

	n	Cr-Picolinat	Cr-Nicotinat
Orale Gabe			
7d-GKR (%)	5	0.0785 \pm 0.016	0.043 \pm 0.016
48h-Urinausscheidung (%)	3	0.91 \pm 0.97	0.08 \pm 0.07
48h-Kotausscheidung (%)	3	91 \pm 12.5	85 \pm 15
i.p. Injektion			
48h-Urinausscheidung (%)	3	79.8 \pm 4.1	-
48h-Kotausscheidung (%)	3	10.0 \pm 2.13	-

Tabelle 3 Zusammenfassung der Resultate der Ganzkörperretention und der Ausscheidung von Chrompicolinat und Chromnicotinat. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

4.5 Akkumulation von Chromverbindungen

Mit diesem Versuch sollte gezeigt werden, ob es bei täglicher Einnahme von 16 µg Chrom als ^{51}Cr -Picolinat und ^{51}Cr -Nicotinat zu einer Akkumulation im Körper kommt.

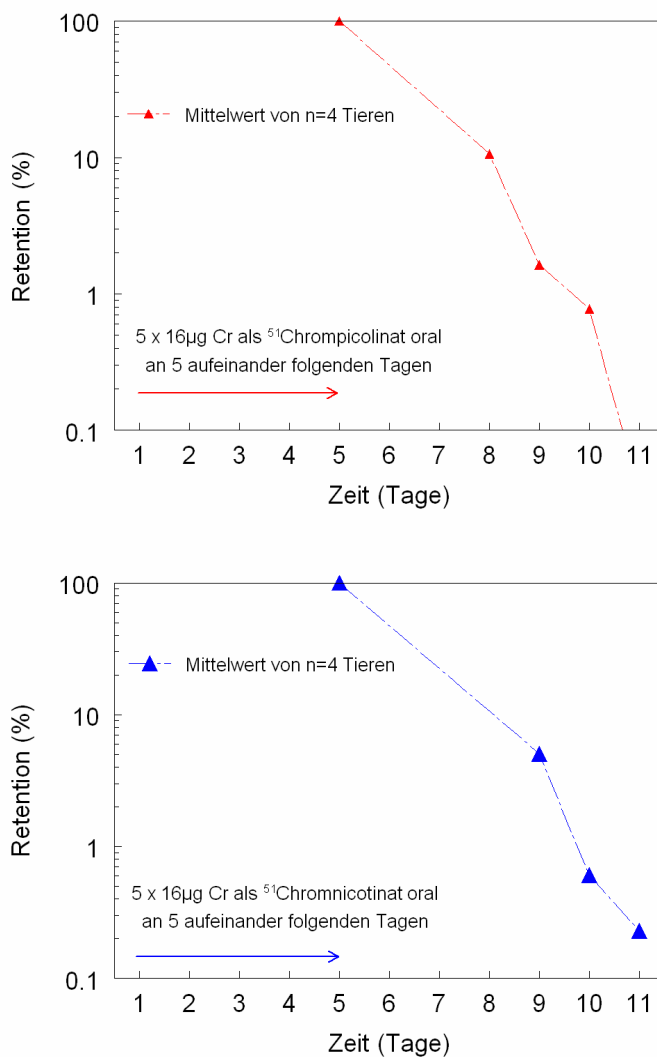


Abbildung 27 Ganzkörperretention nach fünfmaliger oraler Gabe von ^{51}Cr -Picolinat oben und ^{51}Cr -Nicotinat unten jeweils entsprechend 16 µg Chrom. Dargestellt sind Mittelwerte (n = 4).

Die Grafiken lassen erkennen, dass es trotz wiederholter oraler Gabe sowohl von Chrompicolinat als auch Chromnicotinat zu keiner erkennbaren Akkumulation der Verbindungen kam. Bereits sechs Tage nach der letzten Gabe sank die Retention unter 1 %. Es zeigt sich eine ähnlich schnelle Ausscheidung wie bei den Versuchen nach einmaliger oraler Gabe.

4.6 Ganzkörperretentionsverlauf verschiedener Chromverbindungen

Diese Versuchreihe befasste sich mit der Retention und den biologischen Halbwertszeiten der Chromverbindungen nach der Applikation. Es war nicht möglich, einen Verlauf der Retention nach oraler Gabe der Chromverbindungen zu dokumentieren, weil aufgrund der geringen Ganzkörperretention nicht ausreichend viel messbare Aktivität vorhanden war.

Ganzkörperretention nach intraperitonealer Gabe von Chrompicolinat

In diesem Versuch wurde 2 Gruppen à 5 Tieren ^{51}Cr -Picolinat als Lösung mit einer Chrommenge von 8 μg intraperitoneal injiziert. Die gemessene Aktivität direkt nach der Injektion entsprach 100 %. Die Retention wurde über einen Zeitraum von 9 Wochen gemessen.

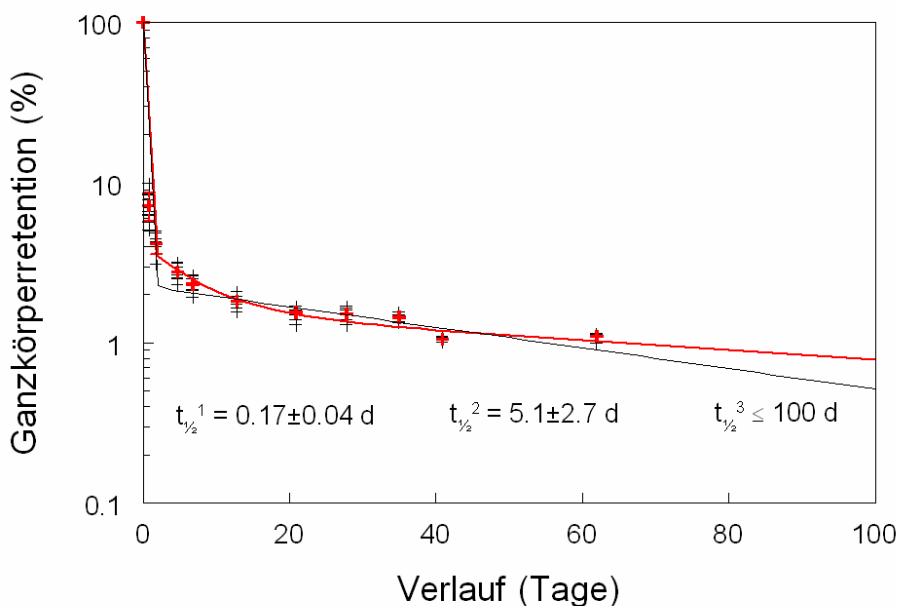


Abbildung 28 Verlauf der ^{51}Cr -Ganzkörperretention von Ratten ($n = 10$) nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Picolinat (8 μg Cr). Dargestellt sind Einzelwerte, Standardabweichung (Errorbars) der Mittelwerte, Ganzkörperretentionskurve (oberer Grenzwert = rot, unterer Grenzwert = schwarz) und biologische Halbwertszeiten mit Standardabweichung.

Ein deutlicher Verlust der Aktivität auf 10 % war bereits nach 24 Stunden zu sehen. Dieses Ergebnis stimmt mit den Werten des Versuchs auf dem Stoffwechselkäfig überein (siehe Kap. 4.3). Innerhalb von einer Woche sank die GKR auf 2 % und innerhalb von zwei Wochen ist die Retention auf 1 % gesunken. Im restlichen Verlauf dieses Versuchs blieb die GKR auf dem Niveau von 1 %. Die errechneten biologischen Halbwertszeiten zeigen eine schnelle Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^1 = 0.17$ d, eine mittlere Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^2 = 5.1$ d und eine langsame Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^3$, welche anhand der Berechnung zwischen 47 d und 100 d liegen muss.

Ganzkörperretention nach intravenöser Gabe von Chrompicolinat

Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Retention nach intraperitonealer und intravenöser Gabe von ^{51}Cr -Picolinat gleichermaßen verläuft, und ob die Gabe unterschiedlicher Mengen Chroms eine Auswirkung auf die Retention hat. Hierzu wurden ^{51}Cr -Picolinatlösungen mit Chrommengen von 1,7 μg bis 5 μg in die Schwanzvene injiziert. Der Retentionsverlauf wurde über 3 Wochen gemessen.

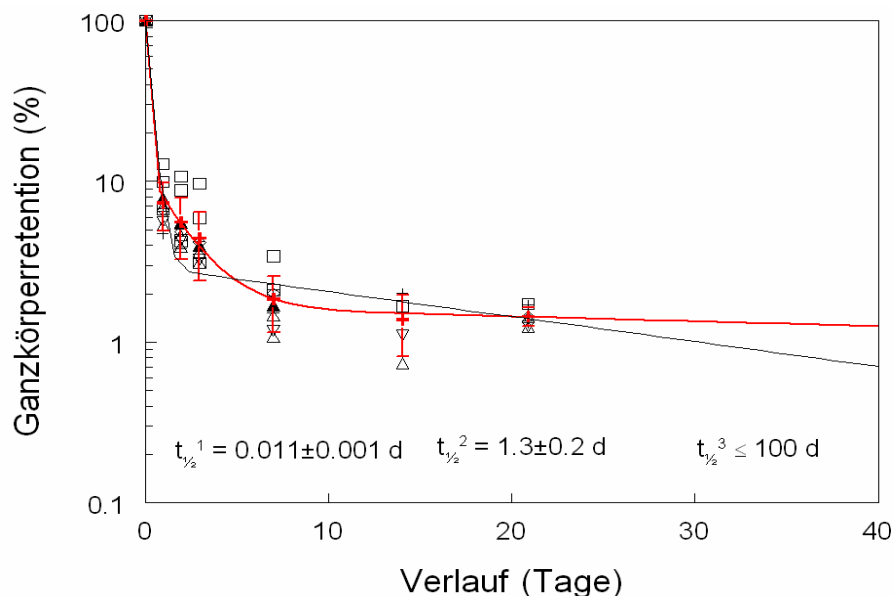


Abbildung 29 Verlauf der ^{51}Cr Pic-Ganzkörperretention von Ratten ($n = 10$) nach intravenöser Injektion von verschiedenen Mengen (1,7 – 5 μg Cr). Dargestellt sind Einzelwerte, Standardabweichung (Errorbars) der Mittelwerte, Ganzkörperretentionskurve (oberer Grenzwert = rot, unterer Grenzwert = schwarz) und biologische Halbwertszeiten mit Standardabweichung.

Wie nach intraperitonealer Gabe war ein schneller Verlust auf 10 % in den ersten 24 Stunden zu sehen. Die weitere Retention ging innerhalb der ersten Woche auf 2 % und innerhalb der zweiten Woche auf 1 % zurück.

Es zeigte sich keine Abhängigkeit der Retention von der injizierten Chrommenge.

Die errechneten biologischen Halbwertszeiten zeigen eine schnelle Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^1 = 0.01$ d, eine mittlere Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^2 = 1.3$ d und eine langsame Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^3$, welche anhand der Berechnung zwischen 19 d und 100 d liegen muss.

Ganzkörperretention nach intraperitonealer Gabe von Chromchlorid

In diesem Versuch wurde 2 Gruppen à 5 Tieren ^{51}Cr -Chlorid als Lösung mit einer Chrommenge von 10 μg intraperitoneal injiziert. Die nach der Injektion gemessene Aktivität wurde gleich 100 % gesetzt. Die Retention wurde über einen Zeitraum von 8 Wochen dokumentiert.

Ähnlich wie beim ^{51}Cr -Picolinat fand auch beim ^{51}Cr -Chlorid der schnellste Verlust der Aktivität bereits innerhalb der ersten 24 Stunden auf 80 % statt. Danach sank die GKR innerhalb einer Woche auf 65 % und nach zwei Wochen auf 58 %. Die weitere Ausscheidung von ^{51}Cr -Chlorid verlief bedeutend langsamer und die langfristige Retention war mit 50 % deutlich höher als die von ^{51}Cr -Picolinat nach intraperitonealer und intravenöser Gabe ~ 1 %.

Die errechneten biologischen Halbwertszeiten zeigen eine schnelle Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^1 = 0.28$ d, eine mittlere Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^2 = 4.2$ d und eine langsame Ausscheidungskomponente $T_{1/2}^3$, welche anhand der Berechnung zwischen 104 d und 150 d liegen muss.

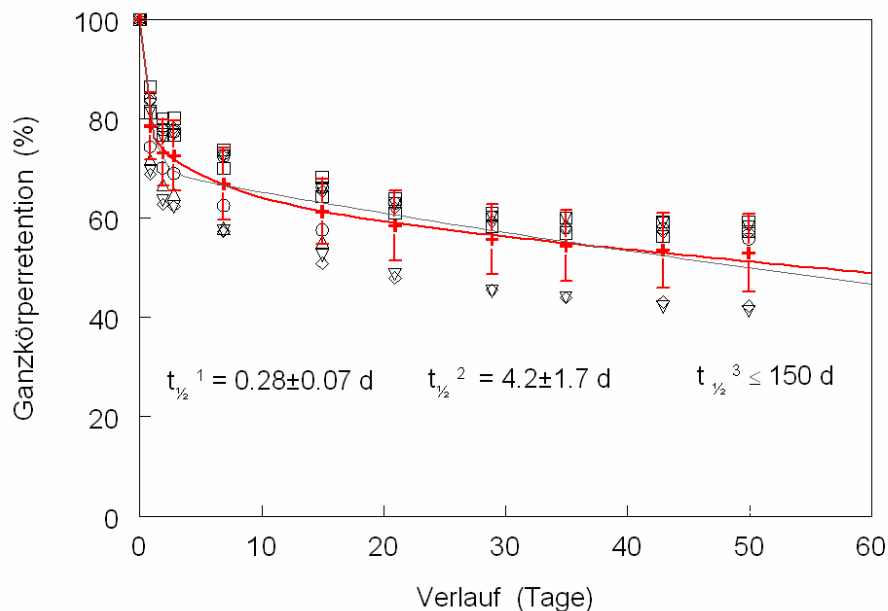


Abbildung 30 Verlauf der ^{51}Cr -Ganzkörperretention von Ratten ($n = 10$) nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Chlorid ($10 \mu\text{g Cr}$). Dargestellt sind Einzelwerte, Standardabweichung (Errorbars) der Mittelwerte, Ganzkörperretentionskurve (oberer Grenzwert = rot, unterer Grenzwert = schwarz) und biologische Halbwertszeiten mit Standardabweichung.

Die folgende Tabelle zeigt die Werte aller Ganzkörperretentionsversuche im Überblick.

[^{51}Cr] Verbindung	Transportpool		Transitpool		Speicherpool	
	A_1 (%)	$T_{1/2}^1$ (d)	A_2 (%)	$T_{1/2}^2$ (d)	A_3 (%)	$T_{1/2}^3$ (d)
CrCl_3 i. p.	22	0.28 ± 0.07	13.0 ± 1.7	4.2 ± 1.2	64.6 ± 0.5	$104 < T_{1/2} \leq 150$
Cr Picolinat i. p.	96	0.17 ± 0.04	2.5 ± 1.2	5.1 ± 2.7	1.58 ± 0.09	$47 < T_{1/2} \leq 100$
Cr Picolinat i. v.	88	0.01 ± 0.01	10.5 ± 1.6	1.3 ± 0.2	1.66 ± 0.06	$19 < T_{1/2} \leq 100$

Tabelle 4 Parameter des Ganzkörperretentionsmodell in Ratten. Dargestellt sind biologische Halbwertszeiten und Poolgrößen mit Standardabweichungen.

4.7 Organverteilung von Chrompicolinat über 7 Tage

Dieser Versuch untersuchte das Verteilungsmuster von ^{51}Cr aus Chrompicolinat im Organismus zu verschiedenen Zeitpunkten. Es wurde ^{51}Cr -Picolinat als Lösung mit einer Chrommenge von $43\ \mu\text{g}$ intraperitoneal injiziert. Nach der Applikation wurden die Tiere nach unterschiedlichen Zeitpunkten (2 h – 7 Tage) getötet und die Organverteilung gemessen. Dabei bezog sich die gemessene Aktivität der Organe auf die zum Zeitpunkt des Todes vorhandene Ganzkörperaktivität, welche gleich 100 % gesetzt wurde.

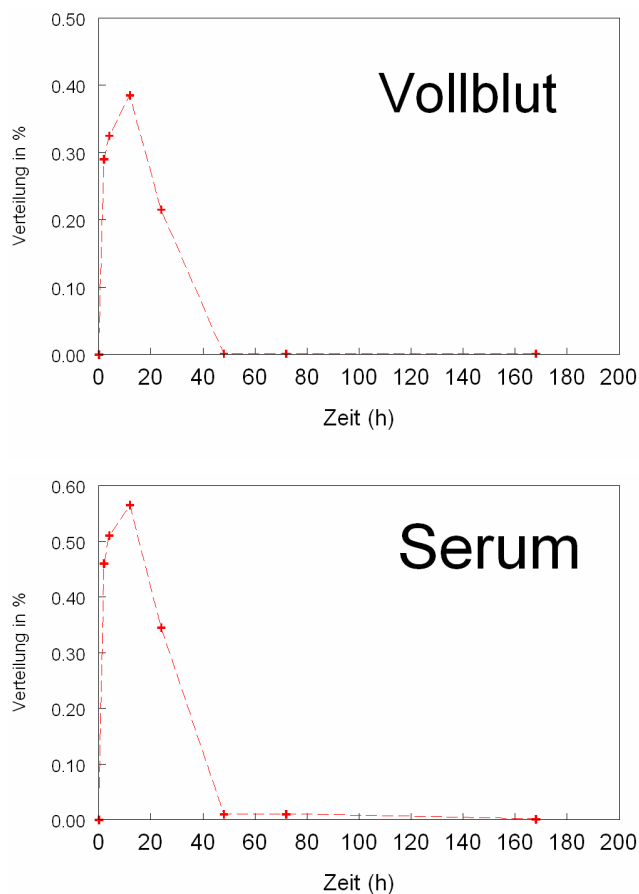


Abbildung 31 Verlauf der ^{51}Cr -Verteilung nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Picolinat ($43\ \mu\text{g}$ Cr) in 1 ml Vollblut und 1 ml Serum. Dargestellt sind Mittelwerte ($n = 2$).

Man sah zunächst eine Anflutung im Blut innerhalb von 12 Stunden auf fast 0,4 % im Vollblut und über 0,5 % im Serum. Bei einer Blutmenge von 6 %

des Körpergewichts, von durchschnittlich 300 g, errechnet sich eine Gesamtaktivität im Blut von 7,2 %.

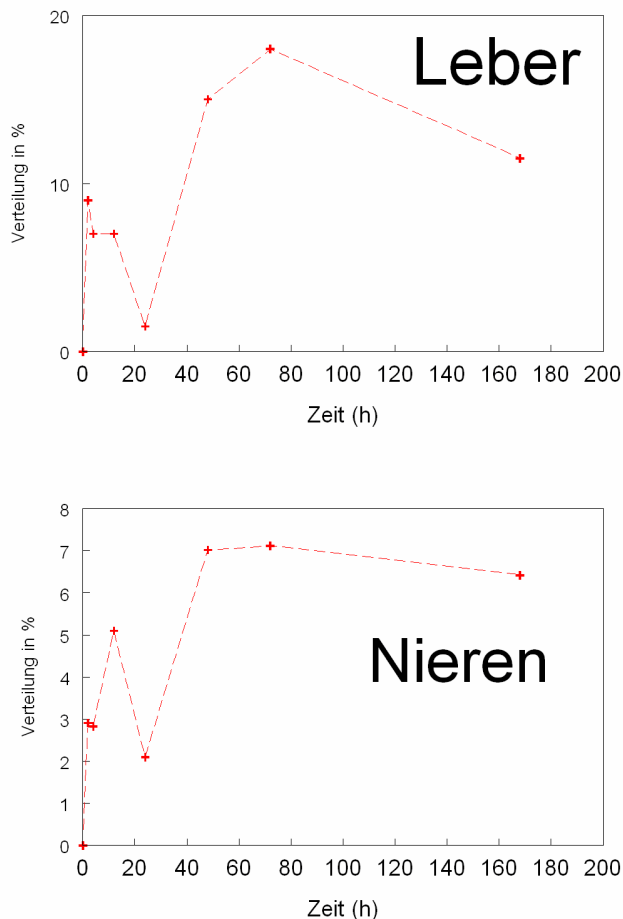


Abbildung 32 Verlauf der ^{51}Cr -Verteilung nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Picolinat ($43\mu\text{g Cr}$) in Leber und Nieren. Dargestellt sind Mittelwerte ($n = 2$).

Die Abbildung 32 zeigt zunächst einen Anstieg des Chromanteils in der Leber auf fast 10 % und dann einen Abfall nach 24 Stunden. Eventuell ist dies zusätzlich auf einen Firstpass-Effekt und eine hepatobiliäre Ausscheidung zurückzuführen, welche mit der wieder gefundenen Aktivität im Kot übereinstimmt. Anschließend kam es zu einem erneuten Anstieg des Chromanteils in der Leber, welcher die Leber als eines der langfristigen Speicherorgane erscheinen lässt. Die Aktivität in den Nieren zeigte einen Peak innerhalb der ersten 24 Stunden, entsprechend dem Zeitraum in dem die Hauptausscheidung der Aktivität über den Urin stattfand. Der

anschließende Anstieg der Aktivität auf 7 % deutet auf eine langfristige Chromspeicherung in den Nieren hin.

Die Chromkonzentration in der Milz und im Femur stieg innerhalb einer Woche kontinuierlich auf über 2 % bzw. 0,6 % an, siehe Abbildung 33. Somit findet sowohl in der Milz als auch in Knochen eine Speicherung von Chrom statt.

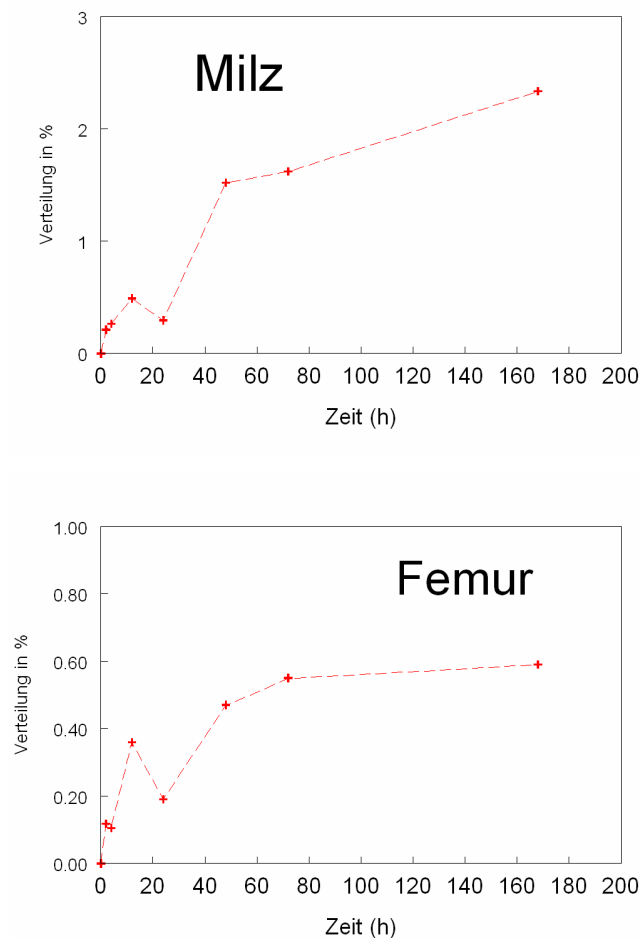


Abbildung 33 Verlauf der ^{51}Cr -Verteilung nach intraperitonealer Applikation von ^{51}Cr -Picolinat entsprechend 43 μg Chrom in Milz und Femur. Dargestellt sind Mittelwerte ($n = 2$).

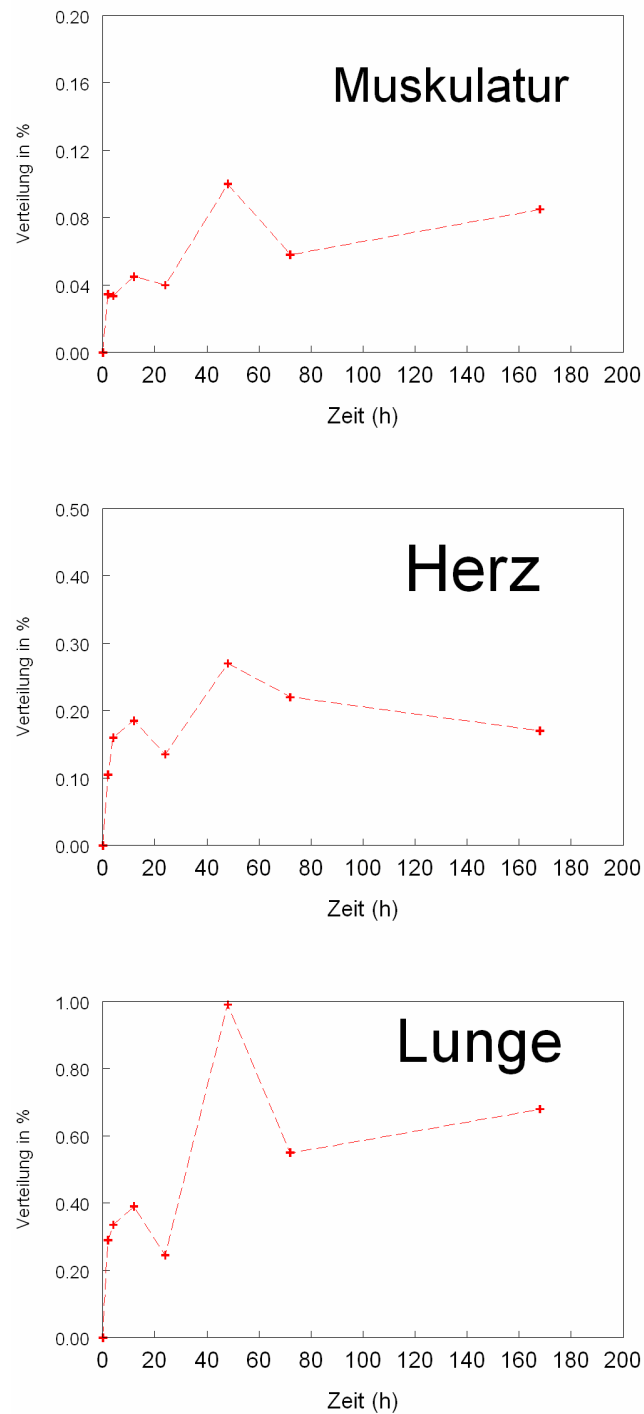


Abbildung 34 Verlauf der ^{51}Cr -Verteilung nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Picolinat (43 μg Cr) in 1 g Muskel (M. Quadriceps), im Herz (~1 g) und in der Lunge. Dargestellt sind Mittelwerte (n = 2).

Sowohl die Muskulatur des M. Quadriceps als auch die Muskulatur des Herzens, welches durchschnittlich 1 Gramm wiegt, sind Speicherorgane für

Chrom. Allerdings war der Chromanteil im Herzen mit 0,2 %/g bedeutend höher als in der quergestreiften Muskulatur 0,08 %/g. Die Muskulatur macht bei der Ratte 30 % des Körpergewichts aus. Bei einem Durchschnittsgewicht von 300 g entspricht dies einer Muskulaturmenge von 90 g. Wenn man die Aktivität in der quergestreiften Muskulatur auf die Gesamtmenge der Muskulatur hochrechnet, findet man ungefähr 7 % der Aktivität in der gesamten Muskulatur wieder. Dies macht das Muskelgewebe ebenfalls zu einem wichtigen Chromspeicher. Auch in der Lunge erkennt man einen Peak innerhalb der ersten 24 Stunden. In dem Verlauf von einer Woche stieg der Anteil auf 0,8 %. Dies bedeutet, dass auch im Lungengewebe eine langfristige Speicherung stattfindet.

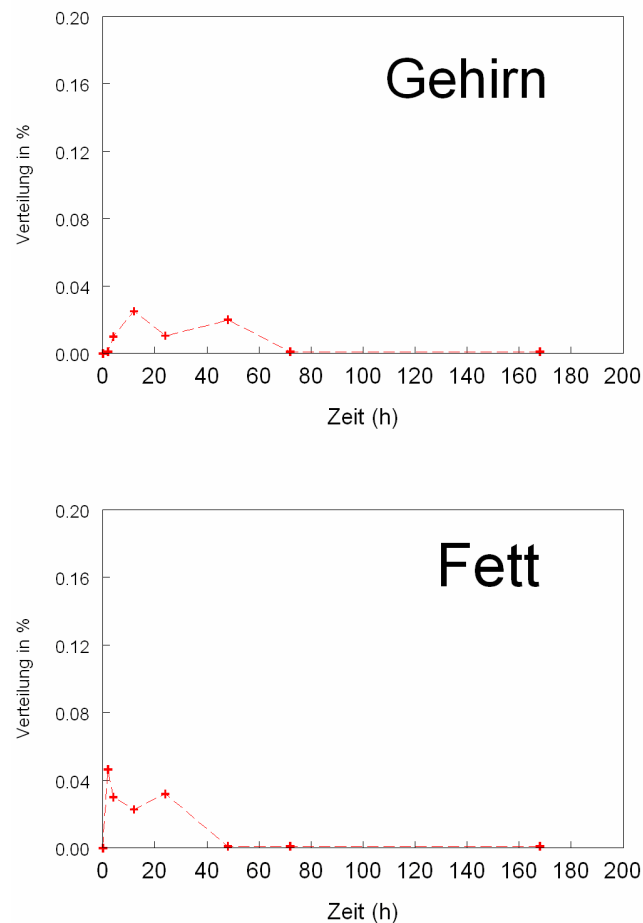


Abbildung 35 Verlauf der ^{51}Cr -Verteilung nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Picolinat (43 μg Cr) in Lunge, Hirn und 1 g Fettgewebe. Dargestellt sind Mittelwerte ($n = 2$).

Die beiden lipidreichen Gewebe zeigen nur eine geringe kurzfristige Chromspeicherung von circa 48 Stunden, danach geht der Chromanteil auf kaum messbare Werte zurück. Aufgrund der lipophilen Eigenschaften von Chrompicolinat ist dies eine unerwartete Besonderheit. Eventuell ist dies ein Hinweis dafür, dass nicht das lipophile Chrompicolinat sondern nur Chrom in Zellen aufgenommen bzw. gespeichert wird.

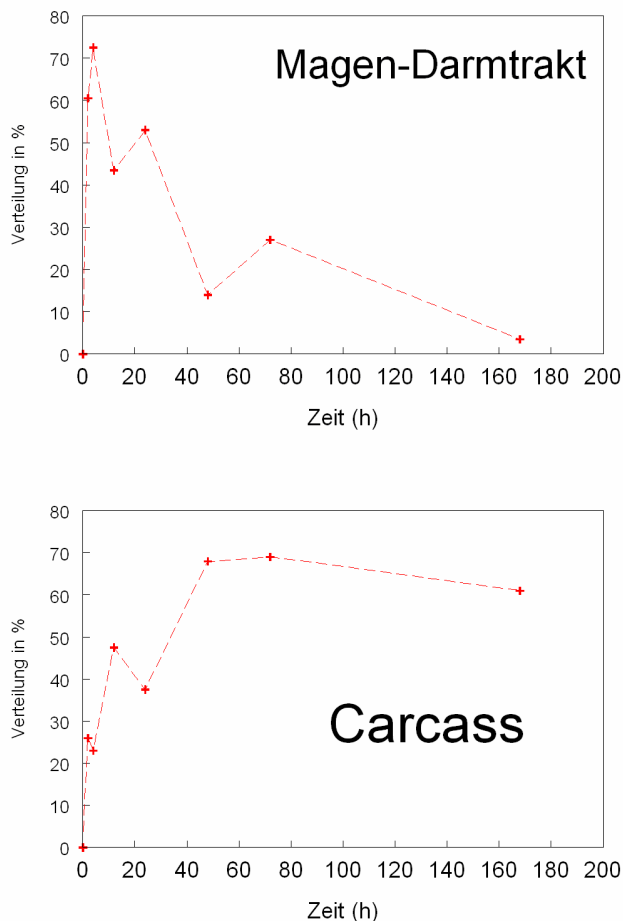


Abbildung 36 Verlauf der ^{51}Cr -Verteilung nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Picolinat ($43 \mu\text{g Cr}$) im Magen-Darmtrakt und Carcass. Dargestellt sind Mittelwerte ($n = 2$).

Der Magen-Darmtrakt nahm bereits innerhalb von 4 Stunden über 70 % der Aktivität auf. Danach sank der Chromanteil kontinuierlich ab, woran man erkennt, dass im Magen-Darmtrakt bzw. in der glatten Muskulatur keine langfristige Chromspeicherung stattfand. Im Carcass, welcher hauptsächlich aus quergestreifter Muskulatur, Knochen und Fell besteht, stieg der

Chromanteil innerhalb einer Woche auf über 60 %. Dies bestätigt die vorherigen Ergebnisse, dass Muskulatur und Knochen, als hauptsächliche Bestandteile des Carcass, zwei wesentliche Speicherorgane für Chrom sind.

4.8 Wechselwirkungen mit dem Eisenstoffwechsel

In dieser Arbeit sollte auch untersucht werden, ob sich eine Wechselwirkung zwischen dem Chromstoffwechsel und dem Eisenstoffwechsel zeigt. Als Basis dieser Versuche diente der Vergleich zwischen einer Kontrollgruppe und einer eisenüberladenen Gruppe. Eine Eisenüberladung wurde mit organometallischen Verbindung TMH-Ferrocen erlangt. Hierzu wurde TMH-Ferrocen sowohl diätisch mit Spezialfutter zugeführt, als auch als Lösung intraperitoneal appliziert. Die mögliche Auswirkung des veränderten Eisenhaushaltes auf den Chromstoffwechsel wurde untersucht, indem die Retention und die Organverteilung der Chromverbindungen kontrolliert wurden.

Ergebnisse zur Messung des Eisengehalts in Lebern

Da die Leber für Eisen ein wichtiges Speicherorgan ist, wurde dessen Eisengehalt als Referenz für die Eisenüberladung der Tiere genommen. Es wurde der Lebereisengehalt von je zwei Tieren aus jeder der drei Gruppen mittel AAS gemessen. Dabei handelt es sich um eine Gruppe ohne Eisenüberladung, eine Gruppe mit diätischer Eisenüberladung und eine Gruppe mit Eisenüberladung durch intraperitoneale Injektion von TMH-Ferrocen.

Eisenstatus	Lebereisen (mg / gww)	sd	VK (%)
Keine Fe-Überladung	0,18	0,003	1,6
Keine Fe-Überladung	0,13	0,000	0,2
Diätische Fe-Überladung	3,18	0,026	0,8
Diätische Fe-Überladung	4,01	0,018	0,4
TMH i.p. Fe-Überladung	1,00	0,010	1,0
TMH i.p. Fe-Überladung	1,55	0,002	0,2

Tabelle 5 Eisengehalt der Leber in mg pro Gramm „wet weight“. Dargestellt sind die Einzelwerte mit Standardabweichung und dem Variationskoeffizient.

Die Tabelle zeigt, dass eine deutliche Eisenüberladung während der Versuche vorlag. Es zeigt auch, dass die intraperitoneale Applikation von TMH-Ferrocen eine geringere Eisenüberladung bewirkt, als eine eisenreiche Spezialdiät. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe zeigt die intraperitoneale Applikation 5 - 10fach höhere Lebereisenwerte und die Spezialdiät ungefähr 20 - 25fach höhere Werte.

Auswirkung des Eisenhaushaltes auf die Retention von Chrom

Um festzustellen, ob der Eisenhaushalt einen Einfluss auf die Retention von Chrom hat, wurden folgende zwei Versuche durchgeführt:

1. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurde zwei Gruppen á fünf Tiere $8 \mu\text{g}$ Chrom als ^{51}Cr -Picolinat intraperitoneal gegeben. Nach 14 Tagen wurde die erste Gruppe auf eine eisenarme Spezialdiät und die zweite Gruppe auf eine eisenreiche Spezialdiät umgesetzt, um eine eventuelle Veränderung der Retention zu untersuchen.

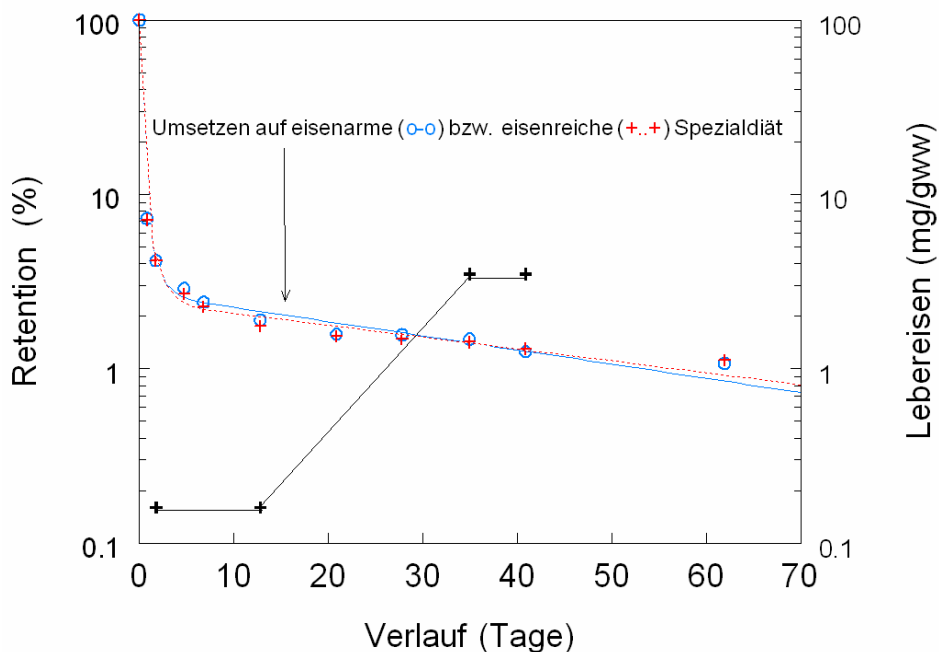


Abbildung 37 Vergleich der ^{51}Cr -Ganzkörperretention nach intraperitonealer Gabe von ^{51}Cr -Picolinat ($8 \mu\text{g}$ Cr) bei unterschiedlicher Eisenstoffwechsellage. Verlauf der GKR unter einer eisenarmer Diät (o—o) und eisenreicher Diät (+...+). Zu Versuchsbeginn haben beide Gruppen gleiche Lebereisenwert. Darstellung des Lebereisens (in mg pro Gramm „wet weight“ +—+) der Gruppe mit Eisenüberladung. Dargestellt sind Mittelwerte ($n = 5$).

Der Verlauf zeigt, dass eine Eisenüberladung während des Zeitraums der Langzeitretention keinen signifikanten Einfluss auf die Retention hat (t-test $p < 0,05$). Zu diesem Zeitpunkt kann das gespeicherte ^{51}Cr nicht mehr an einem aktiven Stoffwechsel in Zusammenhang mit Eisen beteiligt sein, da es sonst zu einer Verschiebung der Chromretention kommen würde

- Zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurde zwei Gruppen $10 \mu\text{g}$ Chrom als ^{51}Cr -Chlorid intraperitoneal gegeben. In der vierten, fünften und sechsten Woche wurde nur einer Gruppe jeweils 25 mg TMH-Ferrocen intraperitoneal injiziert um festzustellen, ob diese Form der Eisenüberladung eine Auswirkung auf die Retention hat.

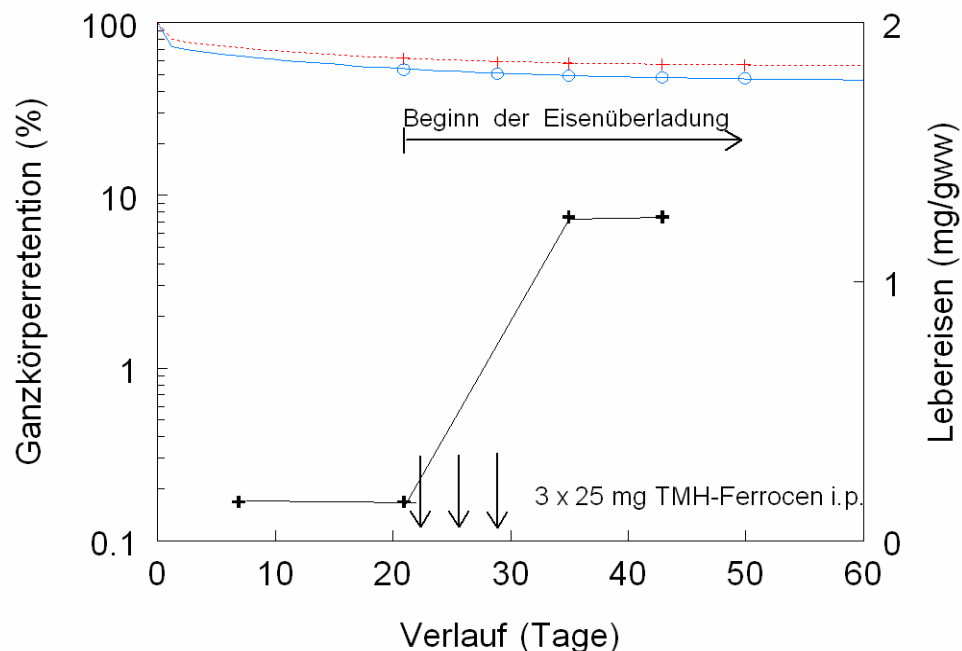


Abbildung 38 Darstellung der Beeinflussung von TMH-Ferrocen i.p. auf die ^{51}Cr -Ganzkörperretention nach intraperitonealer Gabe von Chromchlorid ($10 \mu\text{g}$ Cr). Mittelwert von $n = 3$ Tieren ohne Eisenüberladung (o—o) und von $n = 4$ Tieren mit Eisenüberladung (+...+). Darstellung der Lebereisenkonzentration (in mg pro Gramm „wet weight“ +—+) von der Gruppe mit Eisenüberladung.

Auch bei dieser Form der Eisenüberladung kam es nicht zu einer Veränderung der Retention bzw. der Ausscheidung von Chrom. Während der beobachteten Phase der langfristigen Speicherung von Chrom wurde das bereits gespeicherte Chrom nicht oder nicht messbar von dem Eisenstoffwechsel beeinflusst.

Auswirkung des Eisenhaushaltes auf die Organverteilung von Chrom

Um festzustellen, ob der Eisenhaushalt einen Einfluss auf die Organverteilung hat, wurden folgende zwei Versuche durchgeführt:

1. Zum Zeitpunkt $t = 0$ h wurde zwei Gruppen $10 \mu\text{g}$ Chrom als ^{51}Cr -Chlorid intraperitoneal gegeben. Als Referenzwert wurde eine erste Organverteilung nach 16 gemessen. Innerhalb des Zeitraums vom 16. bis zum 49. Tag wurde nur einer Gruppe mit $n = 4$ Tiere dreimal 25 mg TMH-Ferrocen intraperitoneal gegeben. Anschließend wurde am 49. Tag von beiden Gruppen die Organverteilung gemessen. Hierbei sollte untersucht werden, ob eine Eisenüberladung eine Auswirkung auf die Organverteilung hat.
2. In diesem Versuch sollte untersucht werden, ob eine bestehende Eisenüberladung vor der Gabe von ^{51}Cr -Chlorid intraperitoneal eine Auswirkung auf die Organverteilung hat. Hierzu wurde eine Gruppe zuvor zwei Wochen lang mit einer eisenreichen Spezialdiät gefüttert, während die andere Gruppe eine eisenarme Spezialdiät erhielt. Danach wurde beiden Gruppen $10 \mu\text{g}$ Chrom als ^{51}Cr -Chlorid intraperitoneal gegeben und dessen Organverteilung 7 Tage später gemessen.

Organverteilung (%) nach i.p. Gabe von 10 µg ⁵¹CrCl₃

Organ	t = 16 d n = 3 Tiere ohne Eisenüberladung	t = 49 d n = 3 Tiere ohne Eisenüberladung	t = 49 d n = 4 Tiere mit Eisenüberladung
Vollblut/ ml	0.01 ± 0	0.25 ± 0.44	0.001 ± 0
Serum/ ml	0.006 ± 0.005	0.001 ± 0	0.001 ± 0
Gehirn	0.08 ± 0.01	0.007 ± 0.005	0.001 ± 0
Herz	0.01 ± 0	0.12 ± 0.02	0.08 ± 0.009
Fett/ g	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.03	0.04 ± 0.009
Muskel/ g	0.27 ± 0.11	0.02 ± 0.007	0.017 ± 0.009
Lunge	0.2 ± 0.04	1.67 ± 2.49	0.245 ± 0.11
Femur	0.59 ± 0.08	0.77 ± 0.24	0.61 ± 0.04
Nieren	1.12 ± 0.2	1.06 ± 0.18	0.77 ± 0.06
Milz	1.33 ± 0.27	1.84 ± 0.5	2.16 ± 0.28
Magendarmtrakt	16 ± 1	14.6 ± 1.52	17.25 ± 3.09
Leber	24 ± 6.08	24.6 ± 4.5	31.25 ± 5.31
Carcass	55.33 ± 4.16	55.3 ± 0.57	50.25 ± 4.27

Tabelle 6 Aufstellung der Organverteilung zu verschiedenen Zeitpunkten von ⁵¹Cr-Chlorid (10 µg Cr) nach intraperitonealer Injektion. Eine Gruppe wurde nach 16 Tagen, eine zweite nach 49 Tagen und eine dritte Gruppe, welche dreimal 25 mg TMH-Ferrocen intraperitoneal bekommen hat, wurde ebenfalls nach 49 Tagen gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen.

Der Vergleich der Organverteilung nach 49 Tagen zwischen der eisenüberladenen Gruppe und der Kontrollgruppe zeigt keine signifikante Differenz (t-Test $p < 0,05$). In beiden Gruppen zeigt sich, dass die Organe Nieren, Milz und Leber und Muskulatur und Knochen Speicher für Chrom sind. Der größere Anteil in der Leber bei der eisenüberladenen Gruppe lässt sich durch die 50% größere Masse des Organs im Vergleich zur Kontrollgruppe erklären.

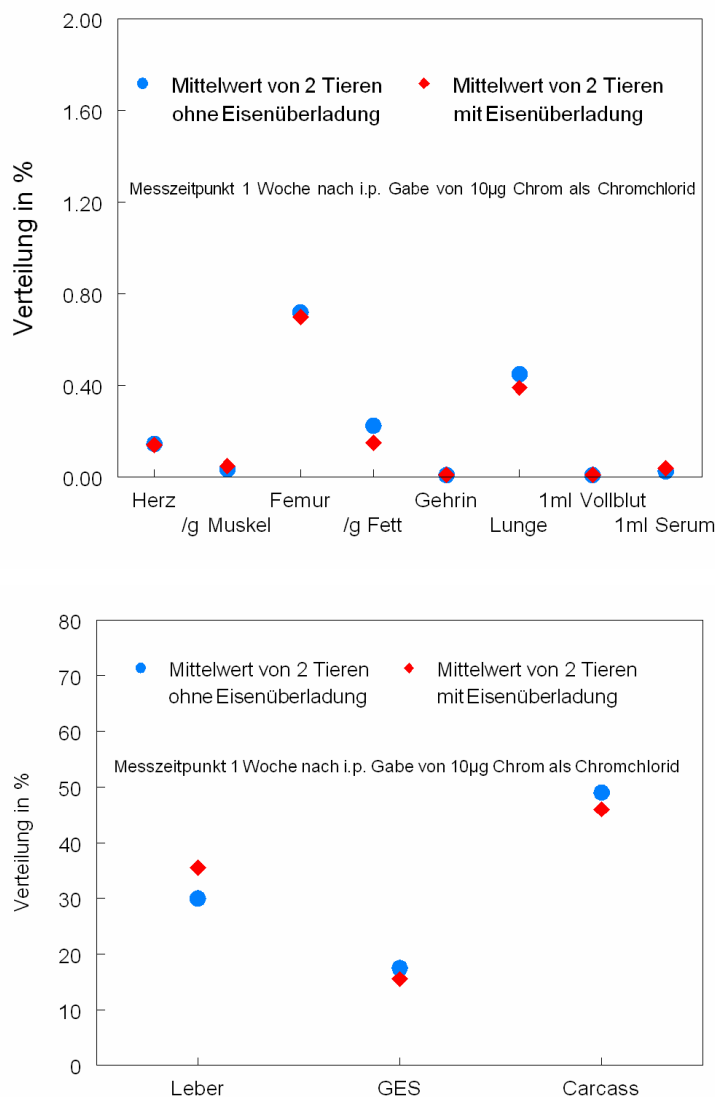


Abbildung 39 Vergleich der Organverteilung 7 Tage nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Chlorid ($10\mu\text{g}$ Cr) zwischen einer Kontrollgruppe (\circ) und einer Gruppe mit diätischer Eisenüberladung (\diamond). Dargestellt sind Mittelwerte ($n = 2$).

Abbildung 39 zeigt, dass es keinen signifikanten Unterschied in der Organverteilung zwischen der eisenüberladenen Gruppe und der Kontrollgruppe gibt (t-test $p < 0,05$). Der Chromanteil in der Leber ist bei der eisenüberladenen Gruppe etwas höher, allerdings ist hierbei zu beachten, dass durch die Eisenüberladung die Leber vergrößert ist und das Durchschnittsgewicht einer Leber in der normalen Gruppe 9 g und in der eisenüberladenen Gruppe 13 g beträgt.

5 Diskussion

5.1 Synthetisierte Chromverbindungen

Eine wichtige Rolle für diese Arbeit spielte die Synthese der ^{51}Cr -markierten Chromverbindungen, weil diese die Grundlage der Untersuchungen waren. Dabei war die Miniaturisierung der Synthese mit Hilfe von Mikrofiltern von großer Bedeutung. Chrompicolinat zeigte sich anhand der Analyseergebnisse als eine relativ stabile Verbindung. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse und der Spektralanalyse stimmen mit denen von Evans überein (Evans, 1993). Besonders die HPLC-Analyse gilt als verlässlich zur Bestimmung von Chrompicolinat (Koll, 2004). Chromnicotinat scheint jedoch instabiler zu sein und ist z. B. über eine reverse Phase HPLC als intaktes Molekül nicht zu chromatographieren, was durch Verfolgen der ^{51}Cr -Aktivität gut zu erkennen war. Hier liegt ein Widerspruch zu den Ergebnissen von Evans vor (Evans, 1993), die keine markierten Verbindungen zur Verfügung hatten.

5.2 Intestinale Absorption

In der Literatur wird Chrom als nicht absorbierbarer Marker beschrieben (Anals of the ICRP, 1987). Im Detail zeigten Experimente aber, dass durchaus geringe Mengen absorbiert werden, siehe Tabelle 7. Die Absorption lässt sich sowohl durch die im gesamten Körper retinierte, als auch durch die im Urin ausgeschiedene Chrommenge bestimmen.

Cr-Verbdg, Messprobe, Zeitpunkt	Spezies	Wert (%)	Literatur
$^{51}\text{CrCl}_3$, Ganzkörper, 24 h	Ratte	$0,5 \pm 0,1$	Anderson, 1995
$^{51}\text{CrCl}_3$, Gastrointestinaltrakt, 24 h	Ratte	$0,6 \pm 0,2$	Anderson, 1996
$^{51}\text{CrPic}$, Gastrointestinaltrakt, 24 h	Ratte	$0,5 \pm 0,3$	Anderson, 1996
$^{51}\text{CrNic}$, Gastrointestinaltrakt, 24 h	Ratte	$1,0 \pm 0,5$	Anderson, 1996
$^{51}\text{CrCl}_3$, Ganzkörper, Organe, 12 h	Ratte	$0,7 \pm 0,12$	Olin, 1994
$^{51}\text{CrPic}$, Ganzkörper, Organe, 12 h	Ratte	$0,4 \pm 0,08$	Olin, 1994
$^{51}\text{CrNic}$, Ganzkörper, Organe, 12 h	Ratte	$0,6 \pm 0,05$	Olin, 1994
CrPic, 24 h -Urin	Mensch	$2,8 \pm 1,14$	Gargas, 1994

CrPic, 24 h -Urin	Mensch	0,417 ± 0,08	DiSilvestro, 2007
CrCl ₃ , 24 h -Urin	Mensch	0,077 ± 0,01	DiSilvestro, 2007
CrNic-Glyc, 24 h -Urin	Mensch	0,138 ± 0,04	DiSilvestro, 2007
CrPolyNic, 24 h -Urin	Mensch	0,169 ± 0,03	DiSilvestro, 2007
⁵¹ CrPic, Ganzkörper, 7 Tage	Ratte	0,078 ± 0,016	Kottwitz, 2007
⁵¹ CrNic, Ganzkörper, 7 Tage	Ratte	0,043 ± 0,016	Kottwitz, 2007
⁵¹ CrProp, Ganzkörper, 7 Tage	Ratte	0,007	Kottwitz, 2007
⁵¹ CrCl ₃ , Ganzkörper, 7 Tage	Ratte	0,006	Kottwitz, 2007
⁵¹ CrPic, 48 h -Urin	Ratte	0.91 ± 0.97	Kottwitz, 2007
⁵¹ CrNic, 48 h -Urin	Ratte	0.08 ± 0.07	Kottwitz, 2007

Tabelle 7 Absorption verschiedener Chromverbindungen nach oraler Applikation bei Ratten und Menschen und die Ergebnisse dieser Arbeit.

In der vorliegenden Arbeit zeigen die mehr salzartigen Verbindungen Chromchlorid und Chrompropionat die geringste Absorption in der Ratte. Die organischen Chromverbindungen Chrompicolinat und Chromnicotinat haben im Vergleich eine 13 bzw. 6-fach höhere Retention. Dies ist vermutlich mit der erhöhten Lipophilie der Chromverbindungen im Vergleich zu Chromchlorid zu begründen. Der Unterschied zwischen Chrompicolinat (GKR = 0,08 %) und Chromnicotinat (GKR = 0,04 %) lässt sich durch die unterschiedliche Komplexstruktur der Chromverbindungen erklären (Evans, 1993; Anderson, 1996). Eine bessere orale Absorption von Chrompropionat (Clodfelder, 2004) bedingt durch seine Wasserlöslichkeit und Stabilität (Shute, 2001) im Vergleich zu den anderen Chromverbindungen konnte in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht bestätigt werden, wobei betont werden muss, dass die hier verwendete Technik mit dem Ganzkörperzähler in jedem Fall die empfindlichere und reproduzierbarere Methode darstellt.

Zur Beurteilung des Chromstoffwechsels bzw. der Absorption wurde häufig die Chromausscheidung im Urin untersucht (Gargas, 1994; Onkelinx, 1977; Olin, 1994; Lim, 1983; DiSilvestro, 2007), was eine indirekte, störanfällige und eher ungenaue Methode darstellt. In der aktuellen Studie von DiSilvestro an jungen Frauen wurde gezeigt, dass die Verbindung Chrompicolinat die höchste Absorption mit knapp 0,5 % (Ausscheidung nach 24 Stunden) der gegebenen Menge besitzt, wohingegen Chromchlorid oder

Chromnicotinatverbindungen mit nur 0,1 % absorbiert werden (DiSilvestro, 2007). Die im Urin wiedergefundene Chrommenge muss zuvor aus dem Magen-Darmtrakt absorbiert worden sein. Die Ergebnisse von DiSilvestro über die Chromabsorption aus den beiden Chromverbindungen stimmen mit denen aus der vorliegenden Arbeit an Ratten gut überein. Hier wurde nach oraler Applikation von ^{51}Cr -Picolinat circa 1 % der Aktivität nach 48 Stunden im Urin wiedergefunden. Somit ist die intestinale Absorption (Retention + Urinausscheidung) von ^{51}Cr -Picolinat mit: GKR (48 h) 0,08 % + Urinausscheidung (48 h) 1,08 % = 1,16 %.

Nach oraler Applikation von ^{51}Cr -Nicotinat wurde im Urin 0,077 % der Aktivität wiedergefunden. Dies zeigt eine deutlich geringere Absorption im Vergleich zu ^{51}Cr -Picolinat. Eine theoretisch errechnete Absorption von ^{51}Cr -Nicotinat unter Berücksichtigung der Retention ergibt:

GKR (48 h) 0,04 % + Urinausscheidung (48 h) 0,077 % = 0,117 %.

Wie eingangs erwähnt, war die spezifische ^{51}Cr -Aktivität der hergestellten Chromverbindungen aus technischen Gründen limitiert, sodass den Ratten jeweils höhere Chrommengen appliziert werden mussten (ca. 5 $\mu\text{g}/100$ g Körpergewicht) als den aktuellen Angaben des „Food and Nutrition Board of the Institute of Medicine of the National Academies of Science (USA)“ für den Menschen entsprechen würden (0,5 $\mu\text{g}/100$ g Körpergewicht). Das hat aber möglicherweise keinen negativen Einfluss auf die Relevanz der Ergebnisse, denn es wurde früher mehrfach gezeigt, dass die applizierte Cr-Dosis keinen Einfluss auf die Absorption oder die Organverteilung hat (Hopkins, 1965; Mertz, 1965). Zudem liegen die applizierten Mengen weit unterhalb der beginnenden toxischen Dosis von ~ 1 mg / 100 g Körpergewicht bei intravenöser Gabe (Mertz, 1965), so dass auch diesbezüglich keine Gefahr bestand.

5.3 Ganzkörperretention und biologische Halbwertszeiten

Der Langzeitverlauf der Ganzkörperretention aus den absorbierten Chromverbindungen wurde nach intraperitonealer bzw. intravenöser Applikation verfolgt, da die Retention nach oraler Gabe zu gering war. Anhand der Retentionsdaten wurden für CrCl_3 und Chrompicolinat die biologischen Halbwertszeiten errechnet, siehe Tabelle 8.

[⁵¹ Cr] Verbindung	Transportpool		Transitpool		Speicherpool	
	A ₁ (%)	T _{1/2} ¹ (d)	A ₂ (%)	T _{1/2} ² (d)	A ₃ (%)	T _{1/2} ³ (d)
CrCl ₃ i. p.	22	0.28 ± 0.07	13.0 ± 1.7	4.2 ± 1.2	64.6 ± 0.5	104 < T _{1/2} ≤ 150
Cr Picolinat i. p.	96	0.17 ± 0.04	2.5 ± 1.2	5.1 ± 2.7	1.58 ± 0.09	47 < T _{1/2} ≤ 100
Cr Picolinat i. v.	88	0.01 ± 0.01	10.5 ± 1.6	1.3 ± 0.2	1.66 ± 0.06	19 < T _{1/2} ≤ 100

Tabelle 8 Parameter des Ganzkörperretentionsmodell für Ratten. Dargestellt sind biologischen Halbwertszeiten und Poolgrößen mit Standardabweichungen.

Der Verlauf der Retention von Chrompicolinat nach intraperitonealer und intravenöser Applikation zeigt eine insgesamt schnellere Ausscheidung nach intravenöser Injektion. Dies lässt sich mit einer verzögerten Aufnahme in den Blutkreislauf erklären. Da die Retentionskurven insgesamt einen sehr ähnlichen Verlauf beschreiben, kann man von einem gleichen Metabolismus, welcher nur zeitlich verzögert ist, ausgehen.

In Tabelle 9 sind zum Vergleich die biologischen Halbwertszeiten einiger Arbeiten für CrCl₃ aufgezeichnet. Für Chrompicolinat sind in der Literatur keine biologischen Halbwertszeiten beschrieben.

Methode	T _{1/2} ¹	T _{1/2} ²	T _{1/2} ³	Literatur
⁵¹ CrCl ₃ i.v., GKR über 84 Tage (Ratte)	0,5 d	5,9 d	83,4 d	Mertz, 1965
⁵¹ CrCl ₃ i.v., GKR über 8 Monate (Mensch)	0,56 d	12,7 d	192 d	Sargent, 1979
⁵¹ CrCl ₃ i.v., GKR über 84 Tage (Mensch)	0,5-12 h	1-14 d	3-12 Mo	Lim, 1983

Tabelle 9 Literaturwerte von biologischen Halbwertszeiten von CrCl₃ in Mensch und Ratte

In einigen Arbeiten zur Kompartimentanalyse des Chromstoffwechsels werden die biologischen Halbwertszeiten mit der Ausscheidung in Zusammenhang gebracht (Onkelinx, 1977; Lim, 1983). Wenn man die Ergebnisse der Ganzkörperretention zusammen mit denen der Stoffwechselkäfige betrachtet findet man zeitliche Übereinstimmungen. Nach intravenöser bzw. intraperitonealer Gabe der Chromverbindungen findet der Hauptverlust der Aktivität innerhalb von 24 Stunden statt, welche man im Urin wiederfindet. Somit besteht ein Zusammenhang mit der ersten biologischen Halbwertszeit und der Urinausscheidung. Der weitere Verlust

lässt sich auf die Exkretion über den Kot zurückführen und ist somit eine Erklärung für die zweite biologische Halbwertszeit. Die dritte biologische Halbwertszeit entspricht der Langzeitretention von Chrom und zeigt eine nur geringfügige Ausscheidung von gespeichertem Chrom.

Der Vergleich des Retentionsverlaufs zwischen Chrompicolinat und Chromchlorid zeigt, dass Chromchlorid eine deutlich höhere Retention. Dies spiegelt sich auch in der dritten Ausscheidungskomponente von Chromchlorid wieder. Diese Ergebnisse zeigen, dass, obwohl Chromchlorid eine sehr geringe orale Absorption aufweist, man von einer hohen Chromspeicherung im Organismus ausgehen kann, wenn dieser erst einmal Chrom aufgenommen hat. Daraus lässt auch den Umkehrschluss zu, dass für die geringe Retention von Chrompicolinat nach intraperitonealer bzw. intravenöser Injektion entweder nur eine geringe intrazelluläre Aufnahme von Chrompicolinat als ganze Verbindung, oder eine nur minimale Abgabe von Chrom aus der stabilen Verbindung verantwortlich ist. Um nähere Aussagen zu gewinnen, müsste man den molekularen Metabolismus von Chrompicolinat genauer untersuchen. Ergebnisse hierzu liefert eine Arbeit von Hepburn (Hepburn, 2003). Es wurde festgestellt, dass im Urin und in anderen Organen sowohl Chrompicolinat als ganzer Komplex als auch LMWCr wiedergefunden wurde. In welchem Verhältnis Chrompicolinat und LMWCr zueinander stehen, und wodurch es zu einem Transfer kommt, ist noch unklar.

5.4 Organverteilung

Die Verteilung von Chrom im Organismus bzw. in den Organen wurde von ^{51}Cr -Picolinat i.p. und ^{51}Cr -Chlorid i.p. gemessen.

Um einen zeitlichen Verlauf der Verteilung von Chrompicolinat im Organismus zu bekommen, fanden hierzu mehrere Messungen über einen Zeitraum von 7 Tagen statt. Die folgende Tabelle beschreibt einige Versuche, welche ebenfalls die Organverteilung von Chrom im Verlauf von verschiedenen Zeiträumen gemessen haben.

Methoden	Ergebnisse	Literatur
$^{51}\text{CrCl}_3$ i.v., Messzeitraum 15 Min - 4 d nach Injektion	Chromzunahme in: Milz, Niere, Hoden Chromabnahme in: Herz, Pankreas, Lunge, Gehirn	Hopkins, 1965
$^{51}\text{CrCl}_3$ oral, Messzeitraum 1 h - 24 h nach Applikation	Absolut größte Menge im Carcass; relativ größte Menge in Niere, Milz und Pankreas	Anderson, 1995
CrCl_3 , CrPic und CrNic oral für 3 Wochen mit anschließender einmaliger Messung	Höchste Konzentration in Niere > Leber > Milz > Lunge > Muskulatur > Herz mit $\text{CrPic} > \text{CrNic} > \text{CrCl}_3$	Anderson, 1996
$^{51}\text{CrCl}_3$, $^{51}\text{CrPic}$ und $^{51}\text{CrNic}$ oral, Messzeitraum 1 h - 12 h nach Applikation	Ein Maximum zwischen 1 h – 3 h mit Höchstwerten in Blut, Muskulatur und Urin	Olin, 1994

Tabelle 10 Organverteilung verschiedener Chromverbindungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden durch Verlaufsmessungen von ^{51}Cr -Picolinat nach intraperitonealer Injektion in den ersten Stunden eine Anreicherung in allen Organen bzw. Geweben gefunden. Ein ähnlicher Verlauf zeigte auch die Arbeit von Olin nach oraler Applikation (Olin, 1994). Diese Ähnlichkeit der anfänglichen Anreicherung deutet auf einen gleichen Metabolismus nach stattgefundener Absorption hin.

Das Maximum der ^{51}Cr -Aktivität innerhalb der ersten 24 Stunden fand sich in fast allen Organen wieder und spricht für eine Chromanreicherung, welche auf die Organdurchblutung zurückzuführen ist. Nach 24 Stunden begann der Chromanteil im Blut zu sinken und war nach 48 Stunden kaum noch messbar. Dies bedeutet, dass die gemessenen Werte in den Organen nach 24 Stunden unabhängig von einer blutgebundenen Anreicherung sind, und eine tatsächliche Anreicherung in den Organen stattgefunden hat.

Ein bemerkenswertes Ergebnis zeigte sich im Vergleich Vollblut und Serum. Es wurde nicht im Serum die etwa doppelte Chrommenge gefunden. Dies würde auch auf einen erythrozytengebundenen Transport von Chrompicolinat hindeuten. Allerdings widerspricht dies den Ergebnissen aus früheren Arbeiten (Onkelinx, 1977).

Im Laufe der 7 Tage zeigten sich einige Organe und Gewebe als Speicher für Chrom. Hierzu zählen Femur (Knochen), Leber, Lunge, Milz, quergestreifte Muskulatur und Nieren. In Blut, Fettgewebe, Hirn und im Magen-Darmtrakt sinkt der Chromanteil deutlich. Diese Werte lassen sich mit Ergebnissen bezüglich des Verteilungsverlaufs anderer Arbeiten vereinbaren (Hopkins, 1965; Anderson, 1995). Die Organe Leber, Niere und Milz zeigen die größte Aufnahme. Auch Knochen und Muskulatur haben insgesamt eine hohe Aufnahme, wenn man die Aktivität pro Gramm auf das Gesamtgewicht der Gewebe hochrechnet. Es zeigt sich, dass die Speicherorgane unabhängig vom Applikationsmodus sind.

Offenbar ist jedoch die Chromverbindung von Bedeutung für die Organverteilung. Die Organverteilung von Chromchlorid wurde einmalig 7 Tage nach der Applikation gemessen. Tabelle 11 vergleicht die Organverteilung von ^{51}Cr -Picolinat mit ^{51}Cr -Chlorid 7 Tage nach intraperitonealer Injektion. Ein deutlicher Unterschied in der Verteilung ist in der Leber und dem Magen-Darmtrakt zu sehen. Nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Chlorid findet sich in diesen Organen erheblich mehr Aktivität wieder als nach intraperitonealer Gabe von ^{51}Cr -Picolinat. Der vergleichsweise geringere Anteil im Carcass nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Chlorid stimmt mit der ebenfalls geringeren Aktivität in der quergestreiften Muskulatur überein. Unterschiede in der Organverteilung waren auch bei Hopkins zu sehen, allerdings handelt es sich dabei nicht um Langzeitwerte (Hopkins, 1965). Diese Differenzen lassen sich vermutlich sowohl mit den unterschiedlichen Retentionswerten von Chromchlorid und Chrompicolinat begründen, als auch mit dem noch nicht genau geklärten intrazellulären Metabolismus von Chrompicolinat.

Organ	Verteilung (%)	
	7 d nach $^{51}\text{CrCl}_3$ i.p.	7 d nach $^{51}\text{CrPic}$ i.p.
Serum/ ml	0.02	0.001
Vollblut/ ml	0.01	0.001
Fett/ g	0.22	0.001
Gehirn	0.01	0.04
Muskel/ g	0.035	0.085
Herz	0.14	0.17
Femur	0.72	0.59
Lunge	0.45	0.68
Milz	-	2.35
Magen-Darmtrakt	17.5	3.5
Nieren	-	6.42
Leber	30	11.5
Carcass	49	62

Tabelle 11 Aufstellung der Organverteilung 7 Tage nach intraperitonealer Injektion von ^{51}Cr -Chlorid und ^{51}Cr -Picolinat. Dargestellt sind Mittelwerte von $n = 2$ Tieren.

5.5 Chromausscheidung

Nach intraperitonealer Applikation von ^{51}Cr -Picolinat finden sich innerhalb 48 Stunden ungefähr 10 % der Aktivität im Kot wieder. Dies bedeutet, dass ein zusätzlicher hepato-billiärer Transport stattfinden muss. Hopkins hat mit $^{51}\text{CrCl}_3$ ähnliche Ergebnisse gefunden, wobei er nach intravenöser Injektion nach 24 Stunden 2 % der Aktivität und nach 48 Stunden 4 % der Aktivität im Kot wiedergefunden hat (Hopkins, 1965). Dieser mögliche Transport ist bei oraler Gabe nicht zu erkennen, da er von der Aktivität des nicht resorbierten ^{51}Cr -Picolinats im Kot überdeckt wird. Einen weiteren Hinweis auf einen hepato-billiären Transport bringt die Organverteilung. Man erkennt einen Peak der Aktivität in der Leber wenige Stunden nach der Applikation, welcher eher auf einen First-Pass-Effekt hindeutet, als auf eine Speicherung in Hepatozyten. Die tatsächliche Speicherung erkennt man später anhand der wieder steigenden Aktivität, welche dann nicht mehr sinkt. Die Ausscheidung nach oraler Applikation wird im Kapitel 5.2 Intestinale Absorption diskutiert.

5.6 Chrommetabolismus

Wenn man die Ergebnisse der Absorption, der Ganzkörperretention, der Stoffwechselläufige und der Organverteilung zusammenträgt, kann man ein Schema des Chromstoffwechsels für Chrompicolinat erstellen:

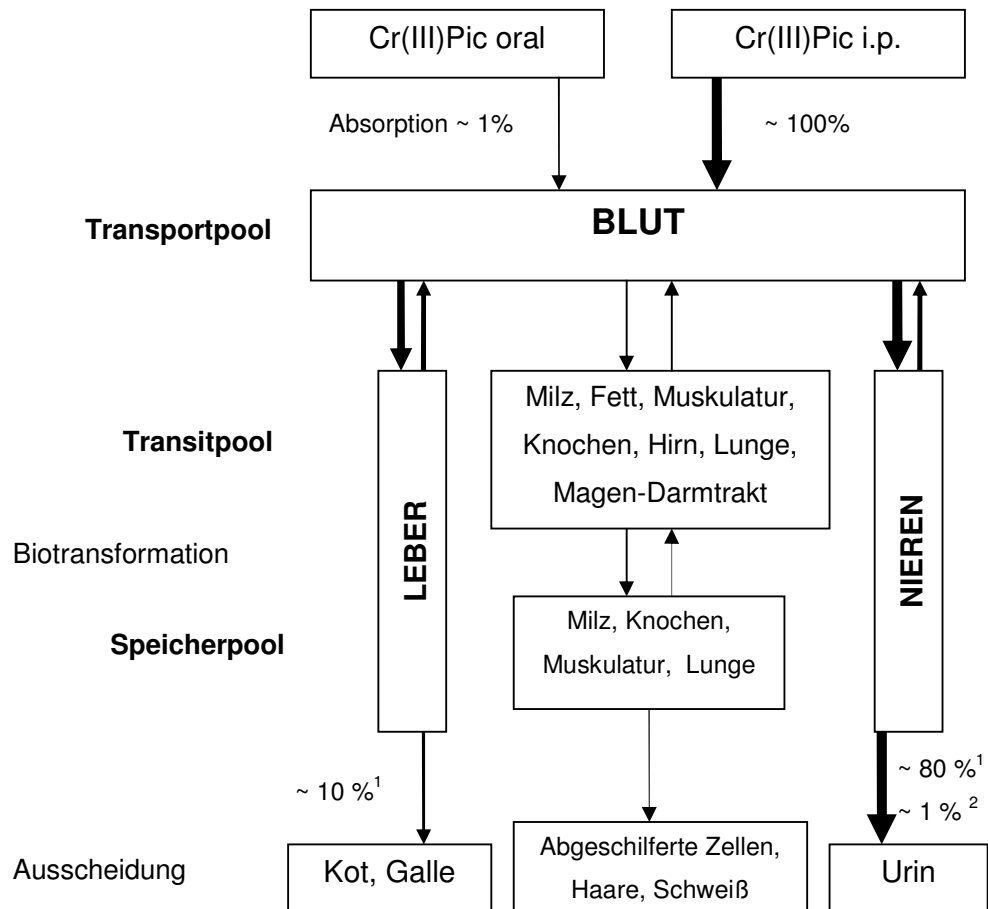


Abbildung 40 Darstellung eines möglichen Schemas des Chrompicolinatstoffwechsels mit Transportmedium, Transitpool und Speicherpool von Chrom in verschiedenen Organen und Ausscheidungswege nach Biotransformation in Leber und Niere. Die Pfeildicke repräsentiert die Geschwindigkeit und Gewichtung der Abläufe. ¹Ausscheidung nach i.p. Injektion. ²Ausscheidung nach oraler Applikation.

Es wird davon ausgegangen, dass Chrompicolinat nach oraler und parenteraler Applikation den gleichen Stoffwechselverlauf nimmt. Nachdem Chrom aufgenommen wird, durchläuft es den Prozess der ersten Biotransformation und Ausscheidung über Leber und Niere. Dies beweisen die Ergebnisse der Versuche mit den Stoffwechselläufigen. Anhand der

Ergebnisse der Organverteilung zeigt sich, dass Leber, Niere, Milz, Lunge, Knochen und Muskulatur Speichergewebe für Chrom sind, wohingegen in den Geweben Fett, Hirn und dem Magendarmtrakt nur ein Transit stattfindet.

5.7 Wechselwirkung mit dem Eisenstoffwechsel

Eine Wechselwirkung zwischen Chrom und Eisenstoffwechsel war anhand der ähnlichen chemischen Eigenschaften bereits früher vermutet worden und aus Arbeiten mit Hämochromatosepatienten geschlussfolgert worden. Zunächst wurde gezeigt, dass Chrom und Eisen beide vom Protein Transferrin im Blut transportiert werden (Hopkins, 1964; Moshtaghie, 1992). Dies lässt besonders bei Hämochromatosepatienten eine Wechselwirkung mit dem Chromtransport aufgrund gesättigter Transferrinspiegel vermuten. Bei einer Arbeit zur Bestimmung der Chromretention zeigte sich, dass Hämochromatosepatienten eine geringere Chromretention als die gesunden Probanden aufwiesen. Aus der Arbeit von Lim ergab sich, dass bei Hämochromatosepatienten das im Blut ungebundene Chrom wesentlich schneller ausgeschieden wurde als bei Probanden mit normalen Eisenreserven. In Bereich der langfristigen Speicherung war bei Hämochromatosepatienten nur eine geringe Minderung festzustellen (Lim, 1983).

In der vorliegenden Arbeit an Ratten mit und ohne Eisenüberladung wurden jedoch keine deutlichen Unterschiede gesehen. Die Ergebnisse zeigten, dass die verschiedenen Formen der Eisenüberladung, diätisch und intraperitoneal, weder zu einer signifikanten Veränderung der Ganzkörperretention noch zu einer Veränderung der Organverteilung führten, siehe Abbildung 41. In unseren Versuchen wurde allerdings hauptsächlich eine Auswirkung von Eisenüberladung auf die langfristige intrazelluläre Speicherung von Chrom untersucht und hier nicht gefunden. Möglicherweise ist aber besonders oder ausschließlich die Anfangsphase betroffen, bei der der Transferrintransport eine große Rolle spielt.

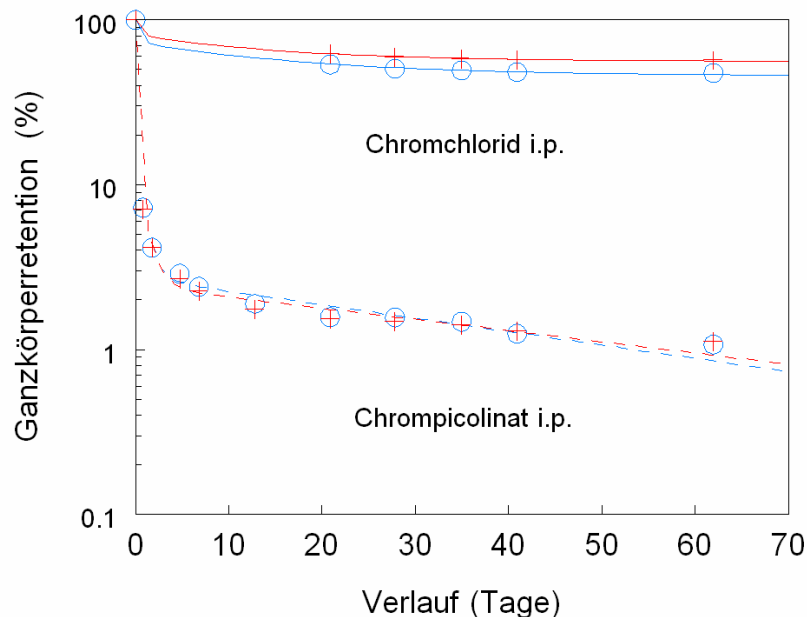


Abbildung 41 Darstellung der Auswirkung des Eisenstatus auf die Ganzkörperretention von Chromchlorid (—) und Chrompicolinat (----) nach intraperitonealer Injektion. Dargestellt sind Mittelwerte von der jeweils eisenüberladenen Gruppe (+) und der Kontrollgruppe (o).

Dies könnte darauf schließen lassen, dass Chrom, nachdem es in die Zelle aufgenommen wurde, eine eigene Regulation hat, welche nicht an den Metabolismus von Eisen gekoppelt ist und somit während dieser Phase nicht von dem Eisenstatus beeinflusst werden kann. Wenn also der die Aufnahme in die Zellen unabhängig von eisenspezifischen Proteinen stattfindet, erklärt dies die Gleichartigkeit der Organverteilung nach zuvor bestehender Eisenüberladung. Beim Chrompicolinat bleibt zu klären zu welchem Zeitpunkt es Chrom freigibt, oder ob Chrompicolinat als ganzes in die Zellen aufgenommen wird und eventuell erst dann Chrom freigibt. Eine Arbeit von Hepburn deutet darauf, dass Chromverbindungen kurzfristig als ganzes in der Zelle vorkommen und anschließend das abgegebene Chrom im Zytosol und im Kern gespeichert wird, während das Abbauprodukt wieder ausgeschieden wird (Hepburn, 2003). Wenn Chrom erst intrazellulär abgegeben wird, wäre es nicht von der extrazellulären Transferrinsättigung betroffen.

5.8 Essentialität

Einige Ergebnisse dieser Arbeit sprechen für einen eigenständigen Chrommetabolismus. Hierzu zählt das geregelte Ausscheidungsmuster von Chrom, welches sich über die biologischen Halbwertszeiten darstellt, eine langfristige Speicherung in bestimmten Organen und eine relative Unabhängigkeit von dem Eisenstoffwechsel. Dies sind jedoch letztlich keine ausreichenden Beweise für die Essentialität von Chrom. Letztlich fehlt immer noch der Nachweis einer Funktion von Chrom auf molekularer Ebene. Um diese Versuchsbedingungen zu gewährleisten, werden höchste Ansprüche an technischen Möglichkeiten und Methoden gestellt. Aufgrund der geringen physiologischen Chromkonzentrationen müssen alle Instrumente und Materialien absolut chromfrei sein, um eine Verunreinigung und falsche Ergebnisse zu vermeiden. Bei der Herstellung chromfreier Materialien besonders beim Futter besteht die Möglichkeit, dass auch andere Metalle wie z.B. Eisen fehlen und somit der übrige Metabolismus gestört ist. Da die Isolierung und exakte Aufschlüsselung der Struktur und Zusammensetzung von biologisch aktiven Chromverbindungen trotz umfangreicher Versuche bislang erfolglos geblieben ist (Haylock, 1983; Shepherd, 1992; Knöchel, 1999; Weseloh, 2001), bestehen bis zum Beweis des Gegenteils Zweifel, ob Chrom tatsächlich ein essentielles Spurenelement ist (Stearns, 2000).

6 Zusammenfassung

Seit mehreren Jahrzehnten wird dem Übergangsmetall Chrom in vielen Publikationen und Lehrbüchern eine Funktion im Glukosestoffwechsel zugeschrieben. Chrom soll den Insulinrezeptor aktivieren, ein Chrommangel soll zu Diabetes mellitus führen. Allerdings gibt es bis heute in der Literatur nur wenige experimentelle Daten über den Chromstoffwechsel und vor allem ist genaue Funktion auf molekularer Ebene unklar, sodass durchaus auch Zweifel an der Rolle von Chrom als essentielles Spurenelement bestehen.

In der vorliegenden Arbeit wird detailliert die gastrointestinale Absorption, Ganzkörperretention, die Organverteilung, die Urin- und Stuhlausscheidung von Chrom aus verschiedenen Chromverbindungen in der Ratte untersucht, Außerdem wird der Frage nachgegangen, ob ein Zusammenhang zwischen Eisen- und Chromstoffwechsel besteht.

Grundlage der Versuche waren die Synthesen von verschiedenen ⁵¹Cr-markierten Chromverbindungen (Cr-Picolinat, Cr-Nicotinat, „Cr-propionat“), welche bereits als Nahrungsergänzungsmittel verwendet werden bzw. in Studien an Patienten mit Diabetes mellitus getestet wurden. Um möglichst hohe spezifische Aktivitäten zu erhalten, wurden jeweils Synthesen im 10 mg Maßstab entwickelt. Die radiochemischen Reinheiten wurden mit HPLC-Chromatographie überprüft, wobei sich nur Chrompicolinat als relativ stabiler Chromkomplex herausstellte, der den Chromatographiebedingungen standhielt.

Diese unterschiedlichen Stabilitäten haben evtl. direkten Einfluss auf die Absorption und Organverteilung von Chrom in den Rattenversuchen. Grundsätzlich wurden polare Chromverbindungen wie CrCl₃ relativ schlecht absorbiert, zeigten aber in-vivo eine deutlich höhere Ganzkörperretention durch Speicherung in verschiedenen Geweben. Nach oraler Gabe von verschiedenen Chromverbindungen zeigte Chrompicolinat die höchste Ganzkörperretention (~ 0,08 % der applizierten Dosis), doppelt so groß ist wie die Retention von Chromnicotinat. Chromchlorid und Chrompropionat werden nur in sehr geringem Maße absorbiert (Ganzkörper- Retention 0,006 %). Die Ganzkörperretention von Chrompicolinat nach intraperitonealer und intravenöser Injektion zeigt einen gleichen Verlauf, was für eine gleichartige

Verstoffwechslung spricht. Eine Akkumulation von Chrom durch tägliche orale Aufnahme von Chrompicolinat oder Chromnicotinat kann nicht bestätigt werden. Innerhalb von 6 Tagen sinkt die Retention auf vergleichsweise niedrige Werte wie nach einmaliger oraler Gabe. Die Untersuchungen mit Stoffwechselkäfigen zeigen Unterschiede in dem Metabolismus von Chrompicolinat und Chromnicotinat. Nach oraler Gabe von Chrompicolinat ~ wird 1 % der Aktivität und bei Chromnicotinat ~ 0.07 % der Aktivität innerhalb der ersten 24 Stunden im Urin wiedergefunden. Bei intraperitonealer Gabe von Chrompicolinat findet man ^{51}Cr -Aktivität auch im Kot wieder. In den ersten 24 Stunden sind ~ 9 % der Aktivität im Kot. Die Ergebnisse der Organverteilung zeigen, dass es hauptsächlich in den Organen bzw. Geweben, Nieren, Leber, Lunge, Milz, Muskulatur und Knochen zu einer Speicherung von Chrom bzw. Chrompicolinat kommt. Für CrCl_3 und CrPic wurden in Ratten jeweils drei biologische Halbwertszeiten bestimmt, für CrPic wurde ein Stoffwechselschema mit Transportmedium, Transitpool und Speicherpool erstellt.

In keinem der vorliegenden Vergleiche von ^{51}Cr -Ganzkörperretention und Organverteilung fanden sich Unterschiede in Tieren mit oder ohne Eisenüberladung. Möglicherweise findet dieser in der Literatur beschriebene Zusammenhang ausschließlich in der hier nicht untersuchten Frühphase statt mit dem Transport von Chrom im Blut gebunden an Transferrin.

7 Literaturnachweis

Anal. of the ICRP, Radiation Dose to Patients from Radiopharmaceuticals, ICRP Publication 53, Vol. 18 No. 1-4 1987; 103 – 118.

Anderson RA, Bryden NA, Polansky MM, Gautschi K. Dietary Chromium Effects on Tissue Chromium Concentrations and Chromium Absorption in Rats. *J. Tr. Elem. Exp. Med.* 1996; 9:11-25.

Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, Patterson KY, Veillon C, Glinsmann W. Effects of chromium supplementation on urinary Cr excretion of human subjects and correlation of Cr excretion with selected clinical parameters. *J. Nutr.* 1983; 113: 308-311.

Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, Roginski EE, Patterson KY, Reamer DC. Effect of exercise (running) on serum glucose, insulin, glucagon, and chromium excretion. *Diabetes* 1982; 31:213—216.

Anderson RA, Polansky MM. Dietary and Metabolite Effects on Trivalent Chromium Retention and Distribution in Rats. *Biol. Tr. Elem. R.* 1995; 50 (2): 97 – 108.

Anderson RA. Chromium and parenteral nutrition. *Nutrition* 1995; 11(1 Suppl): 83-86.

Anderson RA. Chromium, Glucose Intolerance and Diabetes. *J. Am. Coll. Nutr.* 1998; 17: 548-55.

Anderson RA. Chromium: physiology, dietary sources and requirements. *Encyclopedia of Human Nutrition* 1998; 388-394.

Anderson RA. Nutritional Role of Chromium. *Sci. Tot. Env.* 1981; 17:13-29.

Bagchi D, Bagchi M, Balmoori J, Ye X, Soths SJ. Comparative induction of oxidative stress in cultured J774A.1 macrophage cells by chromium picolinate and chromium nicotinate. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* 1997; 97: 335-346.

Bandyopadhyay D, Kusari A, Kenner K, Liu F, Chernoff J, Gustafon T, Kusari J. Protein-Tyrosine phosphatase 1B complexes with the insulin receptor in vivo and is tyrosin phosphorylated in the presence of insulin. *J. Biol. Chem* 1997; 272: 1639-1645.

Barceloux DG. Chromium. *J. Toxic. Clin. Toxicol.* 1999; 37: 173-194.

Blanck H, Serdula M, Gillespie C, Galuska D, Sharpe P, Conway J, Khan L, Ainsworth B. Use of non-prescription dietary supplements for weight loss is common among Americans. *J Am Diet Assoc.* 2007; 107: 441 – 447.

Borthiry G, Antholine W, Kalyanaraman B, Myers J, Myers C. Reduction of hexavalent chromium by human cytochrome b₅: Generation of hydroxyl radical and superoxide. *Free Rad. Biol. & Med.* 2007; 42: 738 – 755.

Campbell WW, Joseph JO, Davey SL, Cambell D, Anderson RA, Evans WJ. Effects of resistance training and chromium picolinate on body composition and skeletal muscle in older men. *J. Appl Physiol.* 1999; 86: 29-39

Clodfelder B, Chang C, Vincent J. Absorption of the biomimetic chromium cation triaqua- μ 3-oxo- μ hexapropinatotrichromium(III) in rats. *Biol Trace Elem Res.* 2004; 98: 159 – 69.

Cotzias CG. Importance of trace substance in environmental health as exemplified by manganese. *Proc. First Annual Conf. Trace Subst. in Environmetal Health* 1967; 5-19.

Davis CM, Vincent JB. Isolation and characterization of a biologically active chromium oligopeptide from bovine liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 1997; 339: 335-343.

Davis MC, Sumrall K, Vincent JB. A biologically active form of chromium may activate a membrane phosphotyrosine phosphatase. *Biochemistry* 1996; 35: 12963-12969.

Dinakarpandian D, Morrissette V, Chaudhary S, Amini K, Bennett B, Van Horn J. An informatics search for the low-molecular weight chromium-binding peptide. *BMC Chemical Biology.* 2004; 4: 2.

DiSilvestro R, Dy E. Comparison of acute absorption of commercially available chromium supplements. *Tr. Elem.* 2007; 21: 120 – 124.

Earnshaw A, Figgis BN, Lewis J. Chemistry of Polynuclear Compounds. Part VI. Magnetic Properties of Trimeric Chromium and Iron Carboxylates. *J. Chem. Soc.* 1966; 1656 - 19663.

Elchebly M, Payette P, Michaliszyn E, Cromlish W, Collins C, Ramachandran C, Gresser MJ, Tremblay M, Kennedy B. Increased insulin sensitivity and obesity resistance in mice lacking the PTP1B gene. *Science* 1999; 283: 1544-1548.

Evans GW, Pouchnik DJ. Composition and Biological Activity of Chromium-Pyridine Carboxylate Complexes. *J. Inorg. Biochem.* 1993; 49: 177-187.

Evans GW, Roginski EE, Mertz W. Interaction of the glucose tolerance factor (GTF) with insulin. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 1973; 50: 718-722.

Feder J, Gnirke A, Thomas W. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.* 1996; 13: 399 - 408.

Freund HS, Atamain, Fischer JE. Chromium deficiency during total parental nutrition. *J. Am. Med. Assoc.* 1979; 241: 496-498.

Gargas ML, Norton RL, Paustenbach TJ, Finley BL. Urinary Excretion of Chromium by Humans Following Ingestion of Chromium Picolinate. *D. Met. and Disp.* 1994; 22: 522 – 529.

Glinsmann WH, Mertz W. Effect of trivalent chromium on glucose tolerance. *Metabolism* 1966; 15: 510-20.

Gunton J, Cheung N, Hitchman R, Hams G, O`Sullivan C, Foster-Powell K, McElduff A. Chromium supplementation does not improve glucose tolerance, insulin sensitivity, or lipid profile. *Diabetes Care.* 2005; 28: 712 – 713.

Haas M, Sawaf R, Horani M, Gobal F, Wong N, Mooradian A. Effect of chromium on apolipoprotein A-I expression in HepG2 cells. *Nutrition.* 2003; 19: 353 -357.

Haylock SJ, Buckley PD, Blackwell LF. The Relationship of Chromium to the Glucose Tolerance Factor. *J. Inorg. Biochem.* 1983; 19: 105-117.

Hepburn D. The Nutritional Supplement Chromium Picolinate Causes Cell Damage, Sterility and Lethal Mutations. Ph.D Research Seminar, The University of Alabama, Department of Chemistry, 2003; http://bama.ua.edu/~chem/seminars/student_seminars/spring03/papers-s03/hepburn-s03.pdf.

Hong W, Kruszewski A, Brautigam DL. Cellular Chromium Enhances Activation of Insulin Receptor Kinase. *Biochemistry* 2005; 44: 8167- 8175.

Hopkins LL Jr. Distribution in the Rat of Physiological Amounts of Injected Cr(III) with Time. *Am. J. Physiol.* 1965; 209: 731 - 735.

Hopkins LL Jr., Ransome-Kuti O, Majaj AS. Improvement of impaired carbohydrate metabolism by chromium (III) in malnourished infants. *Am. J. Clin. Nutr.* 1968; 21:203-211.

Hopkins LL, Price MG. Effectiveness of chromium (III) in improving the impaired glucose tolerance of middle-aged Americans. *Western Hemisphere Nutrition Congr Abstracts Vol. II* 1968; 40 - 41.

Hopkins LL, Schwarz K. Chromium (III) binding to serum proteins, specifically to siderophilin. *Biochem. Biophys. Acta* 1964; 90: 484 - 491.

Inceli M, Bolkent S, Doger M, Yanardag R. The effects of combined treatment with niacin and chromium on the renal tissues of hyperlipidemic rats. *Mol. Cell. Biochem.* 2007; 294: 37 – 44.

Jeejeebhoy KN, Chu RC, Marliss EB, Greenberg GR, Bruce-Robertson A. Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation in a patient receiving long-term total parental nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 1979; 30: 531-538.

Kenner KA, Anyanwu E, Olefsky F, Kusari J. PTP1B is a negative regulator of insulin- and insulin-like growth factor-I-stimulated signalling. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 19810-19816.

Kirchgeßner M, Reichlmayr-Lais AM. Estimates of Trace Element Requirements from Suboptimal Status by Biochemical and Metabolic Criteria. *Tr. Elem. M. Ani.* 1985; 5: 884-91.

Kirchgeßner M, Wolfram, G. Ernährungsphysiologische Grundlagen der Spurenelementversorgung. *Spurenelemente und Ernährung* 1990; 135-49.

Klaman D, Boss O, Peroni O, Kim J, Martino J, Zaboltony J, Moghal N, Lubkin M, Kim Y, Sharpe A, Stricker-Krongrad A, Shulman G, Neel B, Kahn B. Increased energy expenditure, decreased adiposity, and tissue-specific

insulin sensitivity in PTP1B deficient mice. *Mol. Cel. Biol.* 2000; 20: 5479-5489.

Knöchel A, Weseloh G. Fractination of chromium(III) compounds in biological matrices. *Fresenius, J. Anal. Chem* 1999; 363: 533-535.

Koll M, Hoenen H, Aboul-Enein H. A validated method for analysis of chromium picolinate in nutraceuticals by reversed phase high performance liquid chromatography. *Biomed. Chromatogr.* 2005; 19: 119 - 122.

Komorowski, J.R., and Loveday, K. Rat chromosomes are unharmed by orally administered chromium picolinate. *J. Am. Coll. Nutr.* 1999; 18: 527.

Koplias M, Dang L, Anderson H. Effect of dietary chromium on resistance artery function and nitric oxide signalling in the sucrose-fed spontaneously hypertensive rat. *Journ. Vasc. Res.* 2007; 44: 110 – 118.

Levine RA, Streeten DHP, Doisy RJ. Effects of oral chromium supplementation on the glucose tolerance of elderly human subjects. *Metabolism* 1968; 17: 114-25.

Lim TH, Sargent T, Kusubov N. Kinetics of trace element chromium(III) in the human body. *Am. J. Pysiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 1983; 244: 445 - 454.

Lukaski H, Siders W, Penland J. Chromium picolinate supplementation in women: effects on body weight composition, and iron status. *Nutrition.* 2007; 23: 187 – 195.

Manzo L, Di Nucci A, Edel J, Gregotti C, Sabbioni E. Biliary and gastrointestinal excretion of chromium after administration of Cr-III and Cr-IV in rats. *Res. Commun. Chem. Pathos. PharMol.* 1983; 42: 113 - 125.

Martin J, Wang Z, Zhang X, Wachtel D, Volaufova J, Matthews D, Cefalu W. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2006; 29: 1826 – 1832.

Martinez OB, MacDonald AC, Gibson RS, Bourn O. Dietary chromium and effect of chromium supplementation on glucose tolerance of elderly canadian women. *Nutr. Res*. 1985; 5: 609-620.

Mertz W, Roginski E, Reba RC. Biological activity and fate of trace quantities of intravenous chromium (III) in the rat. *Am. J. Physiol.* 1965; 209: 489 – 494.

Mertz W, Roginski EE, Schwartz K. Effects of trivalent chromium complexes on glucose uptake by epididymal fat tissue of rats. *J. Biol. Chem.* 1961; 236: 318 - 322.

Mertz W, Schwarz K. Relation of glucose tolerance factor to impaired intravenous glucose tolerance of rats on stock diets. *Am. J. Physiol.* 1959; 196: 614-618.

Mertz W, Underwood EJ. Introduction. *Trace Elements in Human and Animal Nutrition* 1987; 1:1-19.

Mertz W. Biological role of chromium. *Fed. Proc.* 1967; 26: 186 - 93.

Mertz W. Review Chromium research from a distance: From 1959 to 1980. *J. A. Coll. Nut.* 1998; 17(6): 544-547.

Moshtaghie A, Ani M, Bazrafshan M. Comparative Binding Study of Aluminium and Chromium to Human Transferrin, Effect of iron. *Biol. Tr. Elem. Res.* 1992; 32: 39-46.

Nielsen P, Heinrich H. Metabolism of Iron from (3,5,5-Trimethylhexanoyl) Ferrocene in Rats. *Biochem. Pharm.* 1993; 45: 385-391.

Olin KL, Stearns DM, Armstrong WH, Keen CL. Comparative retention/absorption of ^{51}Cr Chromium (^{51}Cr) from ^{51}Cr chloride, ^{51}Cr nicotinate and ^{51}Cr picolinate in a rat model. *Tr. Elem. Electrol.* 1994; 11: 182 – 186.

Onkelinx C. Compartment Analysis of Metabolism of Chromium (III) in Rats of Various Ages. *Am. J. Physiol.* 1977; 232: 478 – 484.

Proctor S, Kelly S, Stanhope K, Havel P, Russel J. Synergistic effects of conjugated linoleic acid and chromium picolinate improve vascular function and renal pathophysiology in the insulin-resistant JCR:LA-cp rat. *Diab. Ob. Metab.* 2007; 9: 87 – 95.

Sargent T, Lim T, Jenson R. Reduced Chromium Retention in Patients With Hemochromatosis, A Possible Basis of Hemochromatotic Diabetes, *Metabolism* 1979; 28: 70 - 79.

Schroeder HA, Balassa JJ. Influence of chromium, cadmium, and lead on rat aortic lipids and circulating cholesterol. *Am. J. Physiol.* 1965; 209: 433 - 437.

Schroeder HA. Chromium deficiency in rats: a syndrome simulating diabetes mellitus with retarded growth. *J. Nutr.* 1966; 88: 439 - 445.

Schroeder HA. Diabetic-like serum glucose levels in chromium-deficient rats. *Life Sci.* 1965; 4: 2057 - 2062.

Schroeder HA. Serum cholesterol levels in rats fed thirteen trace elements. *J. Nutr.* 1968; 94: 475 - 480.

Schroeder HA. The role of chromium in mammalian nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 1968; 21: 230 - 244.

Schwartz K, Mertz W. A glucose tolerance factor and its differentiation from factor 3. *Arch. Biochem. Biophys.* 1957; 72: 515 - 518.

Schwartz K, Mertz W. Chromium (III) and the glucose tolerance factor. Arch Biochem Biophys 1959; 85: 292 - 295.

Shepherd PR, Elwood C, Buckley PD Blackwell LF. Glucose tolerance factor potentiation of insulin action in adipocytes from rats raised on a torula yeast diet cannot be attributed to a deficiency of chromium or glucose tolerance factor activity in the diet. Biol. Trace Element Res. 1992; 32: 109-113.

Sherman I, Glennon JA, Brech WJ, Klomberg GH, Gordon ES. Failure of trivalent chromium to improve hyperglycemia in diabetes mellitus. Metabolism 1968; 17: 439-42.

Shute AA, Chakov NE, Vincent JB. The stability of the biomimetic cation triqua-oxohexapropionatotrichromium(III) in vivo in rats. Polyhyderon. 2001; 20: 2241-2252

Singer G, Geohas J. The effect of chromium picolinate and biotin supplementation on glycemic control in poorly controlled patients with type 2 diabetes mellitus: A placebo-controlled, double-blinded, randomized trial. Diab. Techn. Therap. 2006; 8: 636 – 643.

Stearns DM, Belbruno J, Wetterhahn KE. A Prediction of Chromium (III) Accumulation in Humans from Chromium Dietary Supplements. FASEB J. 1995; 9: 1650 – 1657.

Stearns DM, Wise JP, Patierno SR, Wetterhahn KE. Chromium(III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. FASEB 1995; 9:1643-1648.

Stearns DM. Is chromium a trace essential metal? BioFactors 2000; 11: 149 – 162.

Sun Y, Ramirez J, Vincent JB. The binding of trivalent chromium to low-Molecular-weight chromium binding substance (LMWCr) and the transfer of chromium from transferrin and chromium picolinate to LMWCr. *J. Biol. Inorg. Chem* 2000; 5: 129-136.

The Chromium File from the International Development Association, Issue No. 6, September 1999.

Verhage AH, Cheong WK, Jeejeebhoy KN. Neurologic symptoms due to possible chromium deficiency in long-term parenteral nutrition that closely mimic metronidazole-induced syndrome. *J. Parent. Enteral. Nutr.* 20 1996; 123-127.

Vincent JB. Elucidating a biological role for chromium at a Molecular level. *Acc. Chem. Res.* 2000; 33: 503 – 510.

Vincent JB. Mechanisms of chromium action: Low-Molecular-Weight chromium-binding substance. *J. Am. Coll. Nutr.* 1999; 18: 6-12.

Vincent JB. Recent Developments in the Biochemistry of Chromium(III). *Biol. Tr. Elem. Res.* 2004; 99: 1 - 15.

Vincent JB. Relationship between glucose tolerance factor and low-Molecular-weight-chromium binding substance. *J. Nutr.* 1994; 124: 117-118.

Vincent JB. The biochemistry of chromium. *J. Nutr.* 2000; 130: 715 - 718

Walchi S, Churchod M, Gobert R, Arkinstall S, Hooft van Huijsduijnen R. Identification of tyrosine phosphatases that dephosphorylate the insulin receptor. A brute force approach based on “substrate-trapping” mutants. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 9792-9796.

Wang Z, Zhang X, Russel J, Hulver M, Cefalu W. Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling in vivo in obese, insulin-resistant JCR:LA-cp rats. *Am. J. Nutr.* 2006; 136: 415 – 420.

Weseloh G. Untersuchungen zur Chromaufnahme von Hefezellen und Charakterisierung chromhaltiger Komplexe aus Bierhefe. Hamburg, 2001; www.sub.uni-hamburg.de/opus/volltexte/2001/628/pdf/dissertation.pdf.

Wold R, Lopez S, Yau L, Butler L, Pareo-Tubbeh S, Waters D, Garry P, Baumgartner R. Increasing trends in elderly persons use of nonvitamin, nonmineral, dietary supplements and concurrent use of medications. *J Am Diet Assoc.* 2005; 105: 54 – 63.

Yamamoto A, Wada O, Manabe S. Evidence that chromium is an essential factor for biological activity of low-Molecular-weight, chromium-binding substance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 163: 189-193.

Yamamoto A, Wada O, Ono T. Isolation of a biologically active low-Molecular-mass chromium compound from rabbit liver. *Eur. J. Biochem.* 1987; 165: 627-631.

Yong L, Armstrong K, Dansby-Sparks R, Carrington N, Chambers J, Xue Z. Quantitative analysis of trace chromium in blood samples. Combination of the advanced oxidation process with catalytic adsorptive stripping voltammetry. *Anal. Chem.* 2006; 78: 7582 – 7587.

Zinker B, Rondinone C, Trevillyan J, Gum R, Clampit J, Waring J, Xie N, Wilcox D, Jacobson P, Frost L, Kroeger P, Reilly R, Koterski S, Opgenorth T, Ulrich R, Crosby S, Butler M, Murray S, McKay R, Bhanot S, Monia B, Jirousek M. PTP1B antisense oligonucleotide lowers PTP1B protein, normalizes blood glucose and improves insulin sensitivity in diabetic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002; 99: 11357-11362.

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlichen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderwertig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: