

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Institut für Molekulare Zellbiologie des Zentrums für Experimentelle Medizin

Direktorin Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Untersuchungen zur Bioverfügbarkeit von Chrom aus Nahrungsergänzungsmitteln. Aufnahme, Metabolismus und Ausscheidung von ^{51}Cr in der Ratte

Dissertation

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

vorgelegt von

Niels Peter Laschinsky
aus Hamburg

Hamburg 2010

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 01.11.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. P. Nielsen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. R. Böger

Meinen lieben Eltern

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1 | Einleitung | 6 |
| 1.1 | Allgemeines | 6 |
| 1.2 | Essentielles Spurenelement Chrom | 7 |
| 1.3 | Biochemische und physiologische Funktionen von Chrom | 13 |
| 1.3.1 | Molekularbiologische Erkenntnisse über den Chromstoffwechsel | 13 |
| 1.3.2 | Chromtoxizität | 17 |
| 1.3.3 | Chromkinetik | 19 |
| 1.4 | Chrom in der Medizin | 24 |
| 2 | Fragestellung und Versuchsaufbau | 27 |
| 3 | Material und Methoden | 29 |
| 3.1 | Chemikalien | 29 |
| 3.2 | Versuchstiere und Tierhaltung | 29 |
| 3.3 | Radioaktivität und Sicherheit | 30 |
| 3.4 | Synthese der Chromverbindungen | 31 |
| 3.4.1 | Mikrosyntheseverfahren | 33 |
| 3.4.2 | Mikrosynthese von radioaktiven Verbindungen | 34 |
| 3.5 | Applikationslösungen mit ansteigenden Chrommengen | 35 |
| 3.6 | Eisensulfatlösung | 35 |
| 3.7 | Gewinnung und Aufarbeitung der Organproben | 36 |
| 3.8 | Analysemethoden | 37 |
| 4 | Ergebnisse | 48 |
| 4.1 | Ergebnisse der Synthese der Chromverbindungen | 48 |
| 4.2 | Absorption und Ganzkörperretention verschiedener Chromverbindungen nach oraler Zufuhr | 53 |
| 4.3 | Ganzkörperretention von ansteigenden Mengen Chrom nach oraler Gabe | 54 |
| 4.4 | Ausscheidung von ⁵¹ Chrom-L-Phenylalanin, ⁵¹ Chrompropionsäure und ⁵¹ Chromchlorid nach oraler bzw. intraperitonealer Gabe | 55 |
| 4.5 | Ganzkörperretentionsverlauf verschiedener Chromverbindungen nach intraperitonealer Gabe | 60 |
| 4.6 | Organverteilung von ⁵¹ Chromchlorid über 7 Tage | 65 |
| 4.7 | Chromatographische Suche nach chrombindenden Serumproteinen | 71 |
| 4.8 | Chromatographische Suche nach chrombindenden Leberproteinen | 76 |

| | | |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5 | Diskussion | 79 |
| 5.1 | Synthetisierte Chromverbindungen..... | 79 |
| 5.2 | Intestinale Absorption | 80 |
| 5.3 | Absorptionsmechanismus..... | 81 |
| 5.4 | Chromtransport | 82 |
| 5.5 | Biologische Halbwertszeiten | 84 |
| 5.6 | Ganzkörperretention nach oraler und intraperitonealer Chromzufuhr | 86 |
| 5.7 | Gewebsverteilung | 87 |
| 5.8 | Chrombindende Leberproteine | 90 |
| 5.9 | Ausscheidung..... | 91 |
| 5.10 | Chromstoffwechselschema | 92 |
| 5.11 | Essentialität | 93 |
| 6 | Zusammenfassung..... | 94 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 96 |
| 8 | Danksagung | 111 |
| 9 | Lebenslauf | 112 |
| 10 | Eidesstattliche Erklärung | 113 |

1 Einleitung

1.1 Allgemeines

Entdeckung von Chrom

Die Geschichte des Chroms reicht bis in die Mitte des 18. Jahrhunderts zurück. Im Jahre 1761 entdeckte Johann Gottlob Lehmann ein orange-rotes Bleichromat-Mineral (PbCrO_4) im Ural, das er Rotbleierz nannte. Bei den folgenden Untersuchungen identifizierte er die Verbindung fälschlicherweise als Blei-Eisen-Selen Verbindung. Im Jahr 1770 fand Peter Simon Pallas an gleicher Stelle ein rotes Bleimineral, welches aufgrund seiner Rotfärbung Krokoiit [griech. **ὁ κρόκος** = Safran] genannt wurde. Erst im Jahre 1797 entdeckte der französische Chemiker Louis-Nicolas Vauquelin das Element Chrom bei Untersuchungen des Minerals Krokoiit und konnte es in unreiner Form darstellen. Im gleichen Jahr erkannte der deutsche Chemiker Martin-Heinrich Klaproth, ebenfalls im Krokoiit, das Element. Aufgrund der Vielfarbigkeit seiner Salze erhielt das Element den Namen Chrom [griech. **τό χρώμα** = Farbe]. J.J. Berzelius führte 1844 das Symbol Cr ein. Im Jahre 1854 stellte R.W. Bunsen erstmals reines Chrom durch Elektrolyse von wässrigen Chromchloridlösungen her.

Chemie von Chrom

Chrom gehört zur Gruppe VI des Periodensystems der Elemente. Es hat ein Molekulargewicht von 51,99 g/mol, der Atomradius beträgt 140 pm, der Schmelzpunkt liegt bei 1857 °C und der Siedepunkt bei 2672 °C. Es existiert in den Oxidationszuständen von -2 bis +6, wobei Chrom^{6+} und Chrom^{3+} die prädominanten Formen sind. In einem Organismus wird Chrom^{6+} umgehend zu Chrom^{3+} reduziert. Die Umkehr dieser Reaktion findet im Organismus jedoch nicht statt (Mertz, 1998). Dies trägt zur Sicherheit von Chrom^{3+} als Nahrungsergänzungsmittel bei, da schädliche Eigenschaften wie Kanzerogenität und Toxizität vorwiegend dem Chrom^{6+} zugeschrieben werden. Dabei spielt auch die zugeführte Dosis eine entscheidende Rolle. Chrom^{6+} ist bereits in niedrigen Dosen toxisch,

Chrom³⁺ hingegen zeigt erst in supraphysiologischen Dosen toxische Effekte und wurde deshalb bislang immer als sehr sicheres Nahrungsergänzungsmittel betrachtet.

Beim dreiwertigen Chromkation handelt es sich um den stabilsten und am häufigsten vorkommenden Oxidationszustand von Chrom in biologischem Material. Chrom³⁺ geht eine Reihe von Komplexverbindungen ein, wobei es als Zentralion fungiert und hauptsächlich sechsfach koordiniert ist. In vivo zeigt Chrom³⁺ antioxidative Eigenschaften (Tezuka, 1991).

Vorkommen von Chrom

Chrom ist ubiquitär in der Natur. Es existiert in unterschiedlichen Konzentrationen in der Luft, im Wasser, in der Erde sowie in biologischem Material. Fast alle Chromquellen der Erdkruste enthalten dreiwertiges Chrom. Natürlich vorkommendes sechswertiges Chrom ist selten, es entsteht verstärkt durch menschliche Einflüsse.

Verwendung von Chrom

Verwendung findet Chrom vor allem in der galvanischen Industrie, als Metallüberzug beim Verchromen, zur Ledergerbung, Holzimprägnierung sowie zum Beizen und Reinigen von Metallen.

1.2 Essentielles Spurenelement Chrom

Essentialität

Die ersten Aufzeichnungen über die essentielle Bedeutung von Chrom für Säugetiere stammen aus dem Jahr 1957 (Schwarz, 1957). Schwarz und Mertz erzeugten mit einer Mangeldiät Lebernekrosen bei Ratten. Darüber hinaus litten diese Tiere an Glukoseintoleranz. Die Zufuhr von sogenanntem Faktor 3 verhinderte sowohl das Auftreten von Lebernekrosen als auch die Glukoseintoleranz. In der Folge konnte Selenium als die wirksame Komponente gegen die Entstehung von Lebernekrosen identifiziert werden. Die Glukoseintoleranz blieb davon aber unbeeinflusst. Der Anteil von Faktor 3, der für die Glukosetoleranz verantwortlich war, wurde Glukose Toleranz

Faktor (GTF) genannt. In einer Folgestudie (Schwarz, 1959) erkannte man dann Chrom (III) als den entscheidenden Bestandteil des GTF für dessen Wirkung auf die Glukosetoleranz. Anhand dieser Ergebnisse erklärten die Autoren Chrom (III) zu einem essentiellen Element für den Säugetierstoffwechsel. In den 1970er Jahren wurde vermutet, dass Chrom auch für den Menschen essentiell sein könnte. Ursprung dieser These waren die Beobachtungen an einer Patientin, die parenteral ernährt wurde. Diese Patientin zeigte hierunter schwere diabetische Symptome, die durch exogene Insulinzufuhr nicht gelindert werden konnten. Sie verlor an Gewicht, litt unter Glukoseintoleranz und Neuropathie. Durch Zusatz von Chromchlorid zu der parenteralen Nährstofflösung zeigte sich die Symptomatik rückläufig und auf die zusätzliche Zufuhr von Insulin konnte komplett verzichtet werden (Jeejeebhoy, 1977). Mittlerweile wird Chrom routinemäßig Lösungen zur parenteralen Ernährung zugefügt (Anderson, 1995). Weitere Studien konnten den positiven Effekt der Chromsupplementierung auf parenteral ernährte Patienten bestätigen (Freund, 1979; Brown, 1986).

Das analytische Problem bei Untersuchungen zu Chrom in biologischen Systemen ist durch dessen niedrige Gewebekonzentration in allen Geweben (sie liegt im nM-Bereich) bedingt. Dabei besteht die Schwierigkeit, artifizielle Kontaminationen durch das omniprésente Chrom von echten Konzentrationen zu differenzieren. Daher ist bis heute unklar, ob Chrom wirklich ein essentielles Spurenelement ist. Bisher ist es nicht gelungen, die biologisch aktive Form von Chrom zu isolieren (Vincent, 1999). Wie für die anderen essentiellen Elemente würde man ein Metallobiomolekül erwarten, welches ein Ion des Elementes enthält und die biologisch aktive Form des Chroms darstellt.

Die Bedingungen, die ein Spurenelement erfüllen muss, damit es als essentiell für Mensch und Tier angesehen wird, wurden von Cotzias (Cotzias, 1967) wie folgt definiert:

- Das Element ist in allen gesunden Geweben aller Lebewesen vorhanden
- Seine Konzentration ist in unterschiedlichen Spezies gleich groß
- Abhängig von der beobachteten Spezies, muss die Menge des jeweiligen Elementes konstant oberhalb einer gewissen Untergrenze gehalten werden, damit die Funktion, die strukturelle Integrität des Gewebes, das Wachstum, die Gesundheit und die Fertilität nicht beeinträchtigt werden
- Ein Mangel erzeugt reproduzierbar dieselben physiologischen und/oder strukturellen Abnormalitäten
- Die Zufuhr verhindert bzw. hebt Mangelsymptome auf

Dosis-Wirkungsbeziehung

Im Hinblick auf einen möglichen therapeutischen Einsatz eines Spurenelementes interessiert der Zusammenhang zwischen zugeführter Menge und Wirkung. Eine bestimmte Dosis führt in Abhängigkeit von kinetischen Aspekten wie Absorption, Verteilung und Ausscheidung zu bestimmten Konzentrationen im Blut und in der Umgebung des Wirkortes. Die biologische Wirkung eines Elements kann in einer einfachen Dosis-Wirkungsbeziehung dargestellt werden (Mertz, 1987).

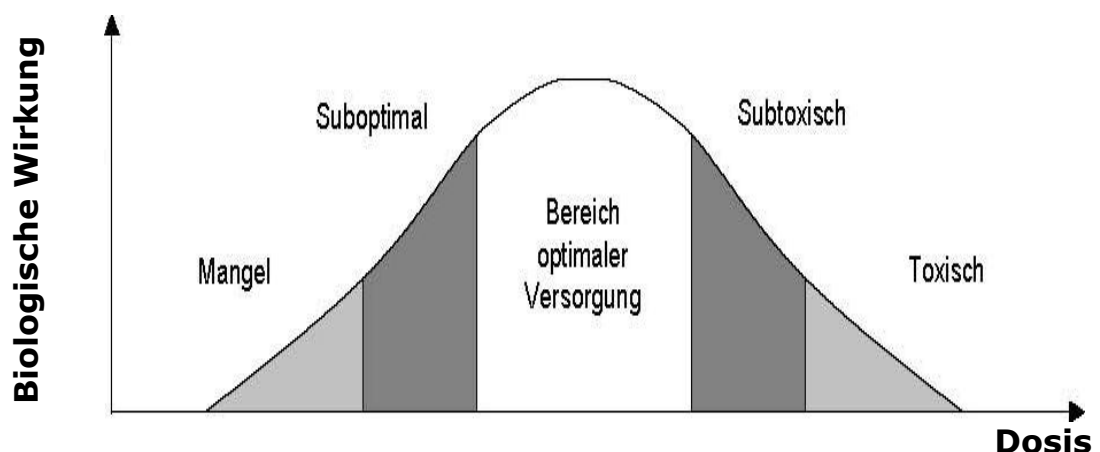


Abbildung 1 Dosis-Wirkungsbeziehung eines Elements im Organismus nach Mertz (Mertz, 1987)

Abbildung 1 verdeutlicht die enge Beziehung von Dosis und Wirkung. Zu niedrige Dosen erzeugen einen Mangel. Mit steigender Zufuhr erreicht man den Bereich der optimalen Wirkung. Bei Überdosierung kommt es zu strukturellen Schäden, die dann zu klinischen Symptomen führen (Mertz, 1987).

Chrombedarf

Im Jahr 1980 etablierte das Food and Nutrition Board of the Institut of Medicine of the National Academics of Science (USA) den "estimated safe and adequate daily dietary intake" (ESADDI) als die Menge Chrom, die täglich zugeführt werden sollte, damit es einerseits zu keinen Mangelerscheinungen, andererseits nicht zu toxischen Effekten kommt. Die empfohlene Dosis lag bei 50-200 µg täglich. Im Jahr 2001 revidierte das Food and Nutrition Board of the Institut of Medicine diese Angaben und ersetzte sie durch die Empfehlung adäquater Einnahmemengen (AI). Der AI ist die empfohlene Chromeinnahmemenge für gesunde Personen. Sie errechnet sich aus der durchschnittlichen Nahrungsaufnahme des Menschen pro Tag (Vincent, 2004). Der AI für männliche Personen beträgt 0,2 µg/d im Alter von 0-6 Monaten, 5,5 µg/d von 7-12 Monaten, 11 µg/d für 1-3 jährige, 15 µg/d für 4-8 jährige, 25 µg/d für 9-13 jährige, 35 µg/d für 14-50 jährige, 30 µg/d ab 50 Jahre, für weibliche Personen 21 µg/d für 9-13 jährige, 24 µg/d für 14-18 jährige, 25 µg/d für 19-50 jährige, 20 µg/d ab 50 Jahre sowie 30 µg/d in der Schwangerschaft und 45 µg/d für Stillende.

Chromzufuhr

Die überwiegende Form, in der Chrom mit der Nahrung zugeführt wird, ist die dreiwertige. Nahrungsmittelanalysen zeigten, dass Fleisch, gefolgt von Ölen, Fetten, Brot, Nüssen, Zerealien und Fisch den höchsten Chromgehalt hat. Grüne Bohnen und Brokkoli besitzen ebenfalls einen hohen Chromgehalt. Den größten Anteil der alimentären Chromzufuhr machen Getränke, Brot, Zerealien und Fleisch aus. Bedingt durch die unterschiedliche Zusammensetzung der Ernährung, kann die individuelle Chromaufnahme erheblich schwanken.

Chrommangel

Anderson und Kozlovsky untersuchten die Chromaufnahme von Amerikanern, die ihre Ernährung selbst gestalteten (Anderson, 1985). Der durchschnittliche Chromgehalt der Nahrung betrug bei Männern 33 µg/d mit einer Schwankungsbreite von 22-48 µg/d, bei Frauen 25 µg/d mit einer Schwankungsbreite von 13-36 µg/d und liegt damit in der Größenordnung des Al. Die Ergebnisse einer Studie an kanadischen prämenopausalen Frauen zeigten sogar Durchschnittswerte von 47 µg/d bei der selbst gewählten Ernährung (Gibson, 1984). In Studien von Offenbacher (Offenbacher, 1986) und Bunker (Bunker, 1984) konnte eine positive Chrombalance durch Zufuhr der Menge des Al erzeugt werden. Folglich sollte es unter durchschnittlichen Ernährungsbedingungen nicht zu einem Chrommangel kommen. Allerdings gibt es eine Reihe physiologischer Stressoren, die über einen erhöhten Chromverlust zu einem Chromdefizit führen können, wenn die gleichzeitige Chromzufuhr den Verlust nicht deckt. Solche Stressoren sind Traumata, schweres körperliches Training (Lukaski, 1996), Stillzeit sowie der Konsum einer zuckerreichen Ernährung (Anderson, 1994). Bestehen Symptome eines Chrommangels, können diese durch eine proteinarme Ernährung, Anstrengung, Blutverlust und Infektionen verstärkt werden (Mertz, 1969; Roginski, 1969). Eine Studie an mangelernährten Kindern aus Nigeria und Jordanien zeigte neben anderen Beeinträchtigungen des Stoffwechsels auch eine herabgesetzte Glukosetoleranz. Durch Zufuhr von Chrom in Form von Chromchlorid konnte die Glukosetoleranz signifikant verbessert werden (Hopkins, 1968).

Auch in einer Reihe von Tierstudien konnte der förderliche Einfluss einer Chromzufuhr bei bestehenden Mangelsymptomen beobachtet werden. Auf Chromzufuhr sprachen außer Ratten auch Mäuse, Affen, Schweine, Pferde und Fische an. Symptome, die bei Chrommangel berichtet wurden, sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

| Mangelsymptome | Spezies |
|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Gestörte Glukosetoleranz | Mensch, Ratte, Maus, Eichhörnchen, Meerschweinchen, Rind |
| Erhöhter Insulinspiegel | Mensch, Ratte, Schwein, Rind |
| Glukosurie | Mensch, Ratte |
| Nüchternhyperglykämie | Mensch, Ratte, Maus |
| Wachstumsretardierung | Mensch, Ratte, Maus, Truthahn |
| Hypoglykämie | Mensch |
| Erhöhtes Serumcholesterin und -triglyzeride | Mensch, Ratte, Maus, Rind, Schwein |
| Vermehrtes Auftreten von Aortenplaques | Kaninchen, Ratte, Maus |
| Hirn- und Nervenfunktionsstörungen | Mensch |
| Kornealäsionen | Ratte, Eichhörnchen |
| Erhöhter Augeninnendruck | Mensch |
| Verminderte Fertilität und Spermienzahl | Ratte |
| Verkürzte Lebenszeit | Ratte, Maus |
| Verminderte Insulinbindung | Mensch |
| Verminderte Insulinrezeptorzahl | Mensch |
| Verminderte fettfreie Körpermasse | Mensch, Schwein, Ratte |
| Erhöhter Körperfettanteil | Mensch, Schwein |
| Herabgesetzte Immunantwort | Rind |
| Erhöhte Morbidität | Rind |

Tabelle 1 Chrommangelsymptome (Anderson, 1998)

In den letzten drei Jahrzehnten variierten die postulierten Werte für Serum- und Plasmachromgehalt mehr als 5000-fach, die für den Urinchromgehalt etwa 500-fach. Die Ursachen für diese Unterschiede liegen im verbesserten Instrumentarium, den verbesserten Nachweismethoden und dem Bewusstsein um mögliche Probenkontamination (Anderson, 1985). Als grobe Referenzwerte für den Menschen gelten heute: Serum < 0,5 µg/l, Urin < 1 µg/l.

Chromstatus

Es ist schwierig den Chromstatus eines Individuums zu erheben, d.h. festzustellen, ob eine ausreichende Chromversorgung vorliegt. Unterschiedliche Methoden zur Stuserhebung wurden in der Literatur vorgeschlagen wie die Chromanalyse aus Blut, Urin und Haar. Keine dieser Bestimmungen lieferte verlässliche Aussagen. Diese Beobachtungen sind vermutlich dadurch bedingt, dass sich der Chromspiegel im Blut nicht im direkten Ausgleich mit den Chromspeichern in den Geweben befindet. Lediglich die Chromsupplementierung wird durch den Chromserumspiegel sowie die Chromurinkonzentration- bzw. ausscheidung reflektiert (Lukaski, 1996). Gegenwärtig ist keine verlässliche Methode bekannt, den Chromstatus eines Individuums festzustellen. Es fehlt an adäquaten

biochemischen Markern, die den Gewebsspiegel von Chrom bzw. dessen metabolische Funktion widerspiegeln (Lukaski, 1999). Die bislang beste Methode den Chromstatus näherungsweise zu erheben, ist eine Chromsupplementierung vorzunehmen mit anschließender Analyse von Glukosetoleranz, Seruminsulin, Lipidstatus und HbA1c. Verbessern sich diese Werte, kann davon ausgegangen werden, dass ein Chrommangelzustand vorgelegen hat (Anderson, 1982; Anderson, 1985).

1.3 Biochemische und physiologische Funktionen von Chrom

1.3.1 Molekularbiologische Erkenntnisse über den Chromstoffwechsel

Die ersten Erkenntnisse über den molekularen Mechanismus stammen aus den Arbeiten von Schwarz und Mertz (Schwarz, 1957; Schwarz, 1959). Sie beschrieben ein organometallisches Molekül, welches sie den Glukose Toleranz Faktor (GTF) nannten, als die Wirkform von Chrom in vivo. Der GTF konnte die durch Mangelernährung induzierte Glucoseintoleranz aufheben. In vitro Studien an Rattenfettgewebe zeigten einen erhöhten Effekt von Insulin in Anwesenheit des GTF (Mertz, 1961). Bestandteile des GTF sollen neben Chrom (III) auch Nicotinsäure, Glutaminsäure, Glycin und Cystein sein (Toepfer, 1977). Folgestudien versagten bei dem Versuch, den GTF zu isolieren und darzustellen.

Für einen Fortschritt sorgte eine Entdeckung in den 80er Jahren (Yamamoto, 1987). Ein Oligopeptid mit einem Molekulargewicht von 1500 Dalton konnte aus insulinabhängigen Zellen isoliert werden. Es wurde Low molecular weight chromium binding substance (LMWCr) oder Chromodulin genannt. Untersuchungen zum Aufbau dieses Peptides zeigten, dass es fast die gleichen Bestandteile wie der hypothetische GTF aufweist, nämlich Glycin, Cystein, Glutamat und Aspartat. In einer Studie von Sumrall und Vincent (Sumrall, 1997) aus dem Jahr 1997 wurde dann ein möglicher Zusammenhang der Peptide diskutiert. So ist der von Schwarz und Mertz isolierte GTF vermutlich ein Artefakt von LMWCr, der durch das Behandeln von LMWCr mit Säure entsteht.

Bis heute ist es allerdings nicht gelungen das LMWCr vollständig zu charakterisieren (Jacquamet, 2003), sodass einige Autoren vermuten, dass es sich beim Chromodulin ebenfalls um ein durch den Isolationsprozess bedingtes Artefakt handeln könnte (Levina, 2007).

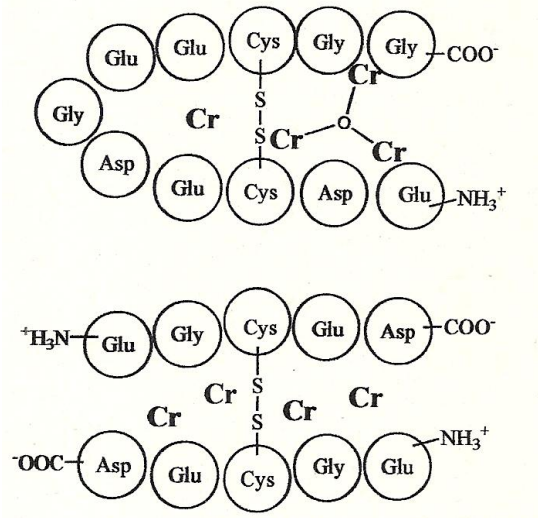


Abbildung 2 Hypothetischer Aufbau von Low molecular weight chromium binding substance (Dinakarpanadian, 2004)

LMWCr besitzt eine hohe Bindungskonstante für Chromionen ($K = 10^{21}$). Bis heute ist der genaue Wirkungsmechanismus von Chrom auf molekularbiologischer Ebene nicht aufgeklärt. Zurzeit wird LMWCr als die Wirkform von Chrom auf zellulärer Ebene betrachtet. Damit das LMWCr seine Wirkung entfalten kann, muss es zuerst aktiviert werden. Die Wirkung von LMWCr ist eng mit dem Insulinstoffwechsel verknüpft. Durch einen Anstieg der Blutglukose steigen der Insulinspiegel und der Chromspiegel im Blut an. Der Anstieg der Blutglukose über 4 mmol/l führt zur Insulinausschüttung aus den Langerhansschen Inselzellen der Bauchspeicheldrüse. Der Anstieg des Insulinspiegels im Blut bewirkt einen verstärkten Einbau von Transferrinrezeptoren in die Membran insulinabhängiger Zellen (Kandror, 1999). Chrom wird im Blut überwiegend an Transferrin gebunden transportiert. Der Transferrinrezeptor vermittelt dann die endozytotische Chromaufnahme in die Zelle und der Chromblutspiegel sinkt wieder (Morris, 1992, 1993a, 1993b). In den so entstandenen Vesikeln wird durch ATP-abhängige Protonenpumpen ein

niedriger pH-Wert erzeugt, wodurch Chrom vom Transferrin getrennt wird. Die freien Chromionen sind jetzt in der Lage inaktives sogenanntes Apochromodulin in der Zelle zu binden (Vincent, 2000; Clodfelder, 2001) und es entsteht aktives Holochromodulin. Dabei zeigte sich, dass die Aktivität von Chromodulin mit der Anzahl der gebundenen Chromionen steigt und mit vier Ionen maximal ist (Davis, 1997). Die folgende Abbildung illustriert diesen Ablauf.

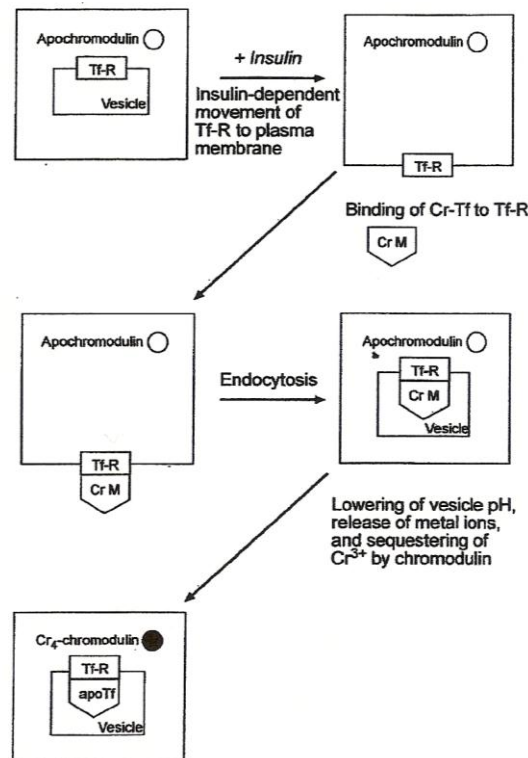


Abbildung 3 Möglicher Mechanismus für den Transport von Chrom aus dem Blut zu LMWCr. Cr = Chromion, M = Metallion, Tf = Transferrin, Tf-R = Transferrinrezeptor (Vincent, 2000)

Parallel zu den oben geschilderten Vorgängen bindet das Insulin die α -Untereinheit des Insulinrezeptors, der dadurch aktiviert wird. Das Insulinsignal besteht aus einer Phosphorylierungskaskade unterschiedlicher intrazellulärer Proteine, die durch die Tyrosinkinase initiiert wird. Als physiologischer Gegenspieler der Tyrosinkinase hemmt das Enzym Protein Tyrosin Phosphatase (PTP) durch Dephosphorylierungen das Insulinsignal (Tonks, 2003). Davis und Mitarbeiter (Davis, 1996) fanden in einer Studie auf einen Insulinreiz hin eine erhöhte PTP-Aktivität, die zu einer

Eigenhemmung des Insulinsignals führen würde. Dies konnte in späteren Studien nicht bestätigt werden. Wang und Mitarbeiter fanden keinerlei Veränderungen der PTP-Aktivität in Chinesischen Hamsterovarzellen nach *in vitro* Inkubation mit verschiedenen Chromverbindungen (Wang, 2005). In einer anderen Studie erzeugte die Zufuhr von Chrompicolinsäure signifikant niedrigere PTP-Spiegel bei fettleibigen Ratten im Vergleich zur Kontrollgruppe (Wang, 2006). Sowohl die gleichbleibende Aktivität der PTP als auch der abgesunkene PTP-Spiegel unter Chromeinfluss führen zu einem Nettozuwachs der vom Insulinrezeptor ausgehenden Phosphorylierungsprozesse und damit zu einer Signalverstärkung. Das aktivierte Chromodulin stabilisiert nun die aktive Konformation des Insulinrezeptors und führt via Tyrosinkinase zu einer 4-8 fachen Verstärkung des Insulinsignals (Vincent, 1999, 2000).

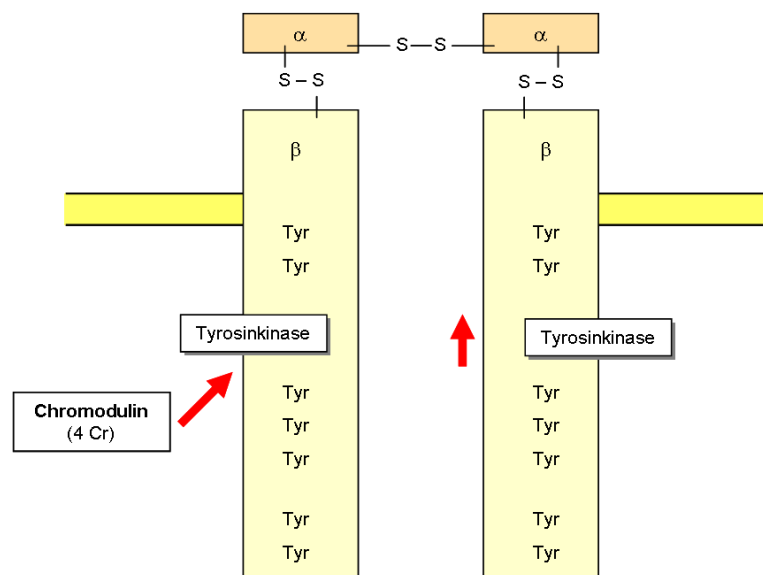


Abbildung 4 Schematische Darstellung der Interaktion zwischen LMWCr und Insulinrezeptor

Durch die gesteigerte Tyrosinkinasefunktion kommt es zu einem Anstieg von Insulinrezeptorsubstrat-1 (IRS-1), was dann zu einer Erhöhung der Aktivität der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3 Kinase) führt. Die PI-3 Kinase wandelt verstärkt Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in Phosphatidylinositoltrisphosphat (PIP₃) um. PIP₃ wiederum stimuliert den vermehrten Einbau von Glucosetransportern (GLUT-4) in die Zellmembran und führt zu einem erhöhten Glukoseeinstrom in die Zelle. Auf diese Weise

sinkt der Blutglukosespiegel. Neben den Effekten von Chromodulin auf den Kohlenhydratstoffwechsel, soll es auch über andere Signaltransduktionswege den Lipid- und Proteinstoffwechsel sowie die Genregulation beeinflussen.

Beendet wird die Chromwirkung vermutlich erst nachdem die Insulinkonzentration im Blut wieder gesunken ist. Durch die hohe Bindungskonstante kann das Chrom aber nicht einfach vom Chromodulin freigesetzt werden, um so die Wirkung zu beenden. Der überwiegende Teil des Chroms wird vermutlich in Form von Chromodulin aus der Zelle transportiert und hauptsächlich über den Urin und in geringerem Ausmaß über die Galle eliminiert, was Analysen der jeweiligen Sekrete belegen (Manzo, 1983). Bislang ist nicht klar, wie das verloren gegangene Chromodulin ersetzt wird. Man vermutet, dass es als Proprotein synthetisiert wird und dann einer posttranslationalen Modifikation unterliegt. Chrom selbst könnte hierbei ebenfalls eine Rolle spielen, da es über die Signaltransduktion des Insulinrezeptors auch einen Einfluss auf die Genregulation nimmt.

Es existieren noch andere Hypothesen über die Wirkung von Chrom auf zellulärer Ebene. So wurde berichtet, dass Chrom möglicherweise direkt mit Insulin interagiert (Mertz, 1969), zu einer Zunahme der Insulinrezeptoren führt (Anderson, 1987), die Aktivität von Serinkinasen hemmt (Chen, 2006) oder signaltransduktionsunabhängig zu einem vermehrten Einbau von Glut-4-Glukosetransporter in die Zellmembran führt (Chen, 2006).

Weitere Studien werden nötig sein, um den tatsächlichen Mechanismus zu identifizieren und gegebenenfalls die unterschiedlichen Hypothesen in Einklang zu bringen. Erschwerend kommt hinzu, dass auch die Insulinrezeptormechanismen selbst noch nicht vollständig verstanden werden.

1.3.2 Chromtoxizität

Der Oxidationszustand von Chrom ist entscheidend bezüglich der unterschiedlichen Einflüsse auf den Stoffwechsel. Chrom (VI) ist instabil, hat stark oxidierende Eigenschaften und gilt als Karzinogen für Mensch und Tier

(Connett, 1983; De Flora, 1989; Cohen, 1993). Im Gegensatz dazu ist Chrom (III) stabil, nicht-oxidierend und nicht-toxisch. Erst in hohen, supraphysiologischen Dosen hat das Chrom³⁺-Ion eine toxische Wirkung (Lukaski, 1999). Dennoch wurde in einigen humanen Fallstudien von unerwünschten Wirkungen im Rahmen einer Supplementierung mit Chrom (III)-haltigen Verbindungen berichtet. Beschrieben wurden Gewichtsverlust, Anämie, Thrombozytopenie, Leberdysfunktion, Nierenversagen (Cerulli, 1998), Rhabdomyolyse (Martin, 1998), Dermatitis (Fowler, 2000) sowie kognitive und motorische Störungen (Huszonek, 1993). Dabei fällt auf, dass in allen Fällen Chrompicolinsäure verwendet wurde. Eine in vitro Studie von Stearns und Mitarbeitern (Stearns, 1995) aus dem Jahr 1995 lässt weitere Zweifel an der Sicherheit von Chrom bzw. von Chrom in Form von Chrompicolinsäure als Nahrungsergänzungsmittel aufkommen. Es wurden die Auswirkungen von Chrom (III)-Chelatverbindungen auf chinesische Hamsterovarzellen in Bezug auf chromosomale Aberrationen untersucht. Es zeigte sich, dass Chrompicolinsäure in Dosen von 50 µM bis 1 mM im Vergleich zur Kontrolluntersuchung das 3- bis 18-fache an chromosomalen Schäden erzeugte. Im Gegensatz dazu wurden für Chromnicotinsäure und Chromchlorid bei gleichem Versuchsaufbau keinerlei erbgutschädigende Effekte beobachtet. Die Picolinsäure selbst war ebenfalls in der Lage klastogene Schäden zu erzeugen, wenn auch in geringerem Ausmaß als Chrompicolinsäure. Auch Manygoats untersuchte die Auswirkungen von Chrompicolinsäure, Picolinsäure und Chromchlorid auf Hamsterovarialzellkulturen (Manygoats, 2002). Dabei war Chromchlorid nur schwach toxisch im Gegensatz zu Chrompicolinsäure und Picolinsäure. Zellen, die mit steigenden Dosen Chrompicolinsäure und Picolinsäure behandelt wurden, zeigten neben einer zunehmenden Anzahl apoptotischer Zellen auch morphologische Veränderungen der Mitochondrien. Das galt nicht für chromchloridbehandelte Zellen. Mitochondriale Schäden gelten als Auslöser für den programmierten Zelltod. Des Weiteren erzeugte Chrompicolinsäure mutagene Zellschäden in Hamsterovarialzellkulturen (Stearns, 2002). Im Vergleich zu unbehandelten Zellen erhöhte Chrompicolinsäure die Mutationsfrequenz vierzigfach und im Vergleich zu mit Chromchlorid behandelten Zellen vierfach. Der Mechanismus dieser Schädigungen ist

bislang nicht verstanden. So könnte die freigesetzte Picolinsäure für die Schäden verantwortlich sein und/oder reaktive Sauerstoffspezies, die von dem gesamten Komplex generiert werden. Die Ergebnisse der obengenannten in vitro Untersuchungen wurden wiederholt kritisiert, da die verwendeten Chromdosen um ein Vielfaches höher liegen als sie im lebenden Organismus auftreten. Außerdem werden sämtliche in vivo wirksamen biochemischen Mechanismen wie Resorption, Verteilung, Aufschlüsselung und mögliche Reparaturmechanismen außer Acht gelassen. Es ist daher fraglich, ob diese Ergebnisse auch in vivo Gültigkeit besitzen. In einem Literaturreview aus dem Jahr 1999 von 19 randomisierten kontrollierten Studien, in denen die Studienteilnehmer zwischen 175 und 1000 µg Chrom/Tag über einen Zeitraum von 6 bis 64 Wochen zu sich nahmen, wurden keine toxischen Effekte beschrieben. Die Studien verwendeten überwiegend Chrompicolinsäure, einige aber auch Chromchlorid und Chromnicotinsäure (Jeejeebhoy, 1999). Anderson führte Ratten Chromchlorid und Chrompicolinsäure in Dosen, die im Verhältnis zum Körpergewicht mehrere tausendmal über dem menschlichen ESADDI (50-200 µg) lagen, über 24 Wochen zu. Auch hier blieben toxische Effekte aus (Anderson, 1997). Eine neuere Studie von Hepburn und Mitarbeitern (Hepburn, 2003) an der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* konnte nachweisen, dass Chrompicolinsäure in Dosen von 260 µg Chrom/kg Nahrung weibliche Sterilität förderte und die Rate tödlicher Mutationen deutlich erhöhte, nicht aber Chromchlorid.

Eine abschließende Beurteilung der Risiken, die eine Nahrungsergänzung mit Chrompicolinsäure mit sich bringt, ist anhand des oben Gesagten nicht möglich. Studien über die Langzeitwirkung (> 1 Jahr) von Chrompicolinsäure sind erforderlich. Gleiches gilt für alle anderen verfügbaren chromhaltigen Nahrungsergänzungsprodukte.

1.3.3 Chromkinetik

Der Begriff Chromkinetik fasst den Metabolismus von Chrom zusammen. Dazu gehören Prozesse wie die Chromaufnahme, die Chromverteilung und die Chromausscheidung. Die zentralen Begriffe der Chromkinetik sind

Absorption und Retention. Da beide Begriffe in der Literatur widersprüchlich verwendet werden, soll zunächst festgelegt werden, wie diese Begriffe in dieser Arbeit definiert sind.

Die **Absorption** [lat. *absorbere* = aufsaugen] beschreibt sowohl den Prozess der Aufnahme von Substanzen über die Darmschleimhaut in Richtung Blut- und Lymphkapillaren, als auch die insgesamt aufgenommene Menge einer zugeführten Dosis. Sie errechnet sich aus der Addition von Retention und dem Anteil, der bis zu diesem Zeitpunkt aufgenommen und bereits wieder ausgeschieden wurde.

Die **Retention** [lat. *retinere* = zurückhalten] beschreibt die Nettoabsorption, d.h. die Menge einer zugeführten Dosis, die nach einem definierten Zeitraum noch im Organismus vorhanden ist.

Aufnahme

Chrom kann dem Organismus auf unterschiedlichen Wegen zugeführt werden. Man unterscheidet die orale, die subkutane, die intraperitoneale und die intravenöse Zufuhr. Die orale Gabe führt zu dem niedrigsten Chromspiegel im Blut, da die Darmwand ein bedeutendes Passagehindernis darstellt. Der Vergleich von intraperitonealer und subkutaner Chromzufuhr zeigte, dass beide Applikationsmethoden zu identischen Blutspiegeln führen. Nach intraperitonealer Injektion der Chromverbindung weisen in der Folge besonders die intraperitoneal gelegenen Organe hohe Dosen auf (Marek, 1997). Der effektivste und schnellste Weg hohe Chromspiegel im Blut zu erzeugen, ist der intravenöse, da er unabhängig von Absorptionsprozessen ist. Nach oraler Gabe erfolgt die Chromaufnahme hauptsächlich über das Jejunum, gefolgt von Ileum und Duodenum (Chen, 1973). Da aber bereits nach 15 Minuten die Retention von Chrom signifikant ansteigt, ist es wahrscheinlich, dass auch der Magen an der Absorption beteiligt ist. Versuche mit ligiertem Pylorus ergaben aber nur sehr geringe Absorptionsmengen für den Magen (Oberleas, 1990). Clodfelder und Mitarbeiter bestätigten anhand ihrer Daten, dass die Absorption von Chrom in Magen und Dünndarm erfolgt und bei Erreichen des Dickdarms sistiert (Clodfelder, 2003). Studien an Ratten zeigten, dass nach oraler Zufuhr von Chromchlorid, Chromnicotinat und Chrompicolinat lediglich 0,5-1,3 % der

zugeführten Dosis absorbiert werden (Olin 1994; Anderson 1996). Auch der Mensch absorbiert mit 0,4-2 % des Nahrungschroms nur geringe Mengen (Anderson, 1985). Dabei spielen unterschiedliche Faktoren eine Rolle:

Beim Menschen hat sich gezeigt, dass die Aufnahme von Chrom (III) von der gegebenen Menge abhängt. So scheint die Chromabsorption umgekehrt proportional zur aufgenommenen Menge zu sein. Nach der oralen Einnahme von 10 µg Chrom täglich werden etwa 2 % absorbiert (Anderson, 1985). Erhöht man die Zufuhr an Chrom auf 40 µg pro Tag, so verringert sich die Absorption auf etwa 0,5 % (Anderson, 1985; Bunker, 1984). Bei weiterer Steigerung der Chromzufuhr bleibt die absorbierte Menge recht konstant bei 0,4 %. Bei Tieren, speziell bei Ratten, konnte dieser Effekt nicht gefunden werden. Es ist möglich, dass die zugeführte Chrommenge bei Ratten niedriger sein muss, um einen ähnlichen Effekt bezüglich der Absorption zu beobachten (Anderson, 1996).

Auch die chemische Form scheint eine Rolle bei der Chromaufnahme zu spielen. Bei den Chromverbindungen handelt es sich um Komplexe, in denen das Chrom als Zentralatom fungiert und Liganden bindet. Diese Liganden bestimmen die Eigenschaften des Komplexes hinsichtlich Stabilität und Löslichkeit. Die am häufigsten zur Nahrungsergänzung eingesetzten Chromkomplexe sind das Chrompicolinat und das Chromnicotinat. Auch das anorganische Chromchlorid findet oft Verwendung. Absorptionsversuche ergaben für Chromnicotinat höhere Werte als für Chrompicolinat und Chromchlorid (Olin, 1994; Anderson 1996). Die Bioverfügbarkeit von organischen Chromkomplexen soll mit durchschnittlich 2-5 % größer sein als die von anorganischen Chromsalzen mit 0,5-2 % (Yang, 2005). Weiterhin spielen die Interaktion mit einigen Nahrungsmitteln sowie die Wirkung von Pharmaka eine Rolle bei der Aufnahme von Chrom. Aminosäuren binden Chrom und erhöhen auf diese Weise die Chromaufnahme beim Menschen (Hambridge, 1971). Phytate sind sowohl in vivo als auch in vitro in der Lage Chrom zu komplexieren. Allerdings wird durch die Chrombindung an Phytate dessen Absorption verhindert. Bei Zinkmangel ist die Chromaufnahme bei Ratten ebenfalls erhöht, wird nach Zinkzufuhr aber gesenkt (Hahn, 1975). Des Weiteren erhöhen Ascorbinsäure (Offenbacher, 1994; Seaborn, 1992) und Picolinsäure die Chromaufnahme beim Menschen. Im Gegensatz dazu

senken Oxalate (Chen, 1973) und Antazida (Davis, 1995) die Chromaufnahme, wie Versuche an Ratten zeigten. Keine Veränderungen erbrachten die gleichzeitigen subkutanen Gaben von Insulin, Glucagon, Adrenalin, Thyroxin und ACTH (Anderson, 1995). Das galt auch für die orale Zufuhr von Ethanol, Gluthathion, Saccharose, Dextrose, Histidin und Milch (Anderson, 1995). Bisläng ungeklärt ist, ob die gesamte Menge des absorbierten Chroms in die biologische Wirkform transferiert werden kann. Der genaue Mechanismus der Aufnahme von Chrom aus dem Magen-Darm-Trakt ist noch immer unklar. Die Tatsache, dass bestimmte chemische Formen von Chrom bevorzugt aufgenommen werden, lässt vermuten, dass der Prozess der Aufnahme ein komplexerer Prozess ist als beispielsweise einfache Diffusion (Lukaski, 1999).

Transport

Nach der Aufnahme von Chrom ins Blut erfolgt der Transport hauptsächlich gebunden an Transferrin. Jedes Transferrinmolekül hat zwei Bindungsstellen für Eisen, es können aber auch andere Metalle wie Mangan, Kupfer oder Chrom gebunden werden. Chrom konkurriert mit dem Eisen um die Bindungsstellen am Transferrin, was aber beim normalen Eisenstatus kein Problem darstellt, da lediglich etwa 30 % des Transferrins mit Eisen abgesättigt sind und somit eine ausreichende Transportkapazität besteht (Brock, 1985). In vitro Inkubationsversuche von chromhaltigen Verbindungen mit Vollblut bzw. Blutplasma haben gezeigt, dass unter diesen Bedingungen auch Albumin und andere Serumproteine Chrom binden können (Hopkins, 1964; Borguet, 1990, 1995). Ein Teil des Chroms scheint auch ungebunden im Blut transportiert zu werden. Dabei überwiegt im Plasma das proteingebundene Chrom bei Weitem das ungebundene Chrom mit etwa 95 % zu 5 % (Lim, 1983).

Verteilung

Mit dem Blutstrom gelangt das Chrom dann zu den entsprechenden Zielorganen. Ein 3-Kompartimenten-Modell wurde vorgeschlagen, um die Kinetik von Chromaustausch und Chromverteilung im Organismus zu beschreiben. Das plasmagebundene Chrom befindet sich im Ausgleich mit

drei Speichern. Einem Speicher mit schneller Austauschgeschwindigkeit und einer Halbwertszeit von etwa einem Tag, einem Speicher mit mittlerer Austauschgeschwindigkeit und einer Halbwertszeit im Bereich von einigen Tagen sowie einem Speicher mit langsamer Austauschgeschwindigkeit und einer Halbwertszeit von einigen Monaten (Mertz, 1965; Onkelix, 1977; Lim, 1983). Diese drei verschiedenen Speichertypen finden sich auf die unterschiedlichen Gewebe in unterschiedlichem Ausmaß verteilt. Bei Untersuchungen über die Gewebsverteilung von Chrom aus neun unterschiedlichen organischen Chromverbindungen ergaben sich vollkommen verschiedene Verteilungsmuster (Anderson, 1996). Die mengenmäßig größte Retention zeigen in solchen Versuchen die Nieren, die Leber und die Muskulatur. Die Gesamtkörper-Chromretention ist relativ konstant, unabhängig von der zugeführten Menge des Chroms, des Verabreichungsweges sowie der An- bzw. Abwesenheit von anderen Nahrungsmitteln und Hormonen. Die Chromretention wird scheinbar nicht auf der Ebene der Absorption reguliert, sondern vielmehr über die Ausscheidung (Anderson, 1995).

Ausscheidung

Etwa 98 % des oral zugeführten Chroms wird nicht absorbiert und erscheint im Stuhl. Das aufgenommene Chrom (III) wird hauptsächlich innerhalb weniger Tage über den Urin und in geringeren Mengen über Galle, Schweiß und Haare ausgeschieden. Für die Ausscheidung scheint die chemische Form, in der das Chrom in den Blutkreislauf gelangt, eine entscheidende Rolle zu spielen. Diese ist wiederum von Aufnahme- und Stoffwechselmechanismen abhängig. Stabile Chromkomplexe wie z.B. Chrom-EDTA werden in der Niere glomerulär filtriert aber nahezu nicht reabsorbiert. Im Gegensatz dazu werden vom Plasma-Chrom (III) etwa 5-40 % filtriert, wovon anschließend 60-95 % reabsorbiert werden (Donaldson, 1981). Die durchschnittliche menschliche Chromausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin liegt bei 0,22 µg/d (Borel, 1984).

1.4 Chrom in der Medizin

Stoffwechselwirkungen

Chrom wird allgemein als essentielles Spurenelement betrachtet, das für den reibungslosen Ablauf von Kohlenhydrat- und Lipidstoffwechsel benötigt wird. Chrom entfaltet seine Wirkung durch die Potenzierung der Rezeptoreffekte des Insulins im Sinne eines "Insulin-Sensitizers". Ein Blick auf die Stoffwechselfunktion von Insulin verdeutlicht die potentiellen Effekte von Chrom. Das Peptidhormon Insulin wirkt anabol. Sämtliche Stoffwechselwirkungen werden über den Insulinrezeptor vermittelt. Kurzfristig kommt es zur Steigerung der Glukoseaufnahme in Fett- und Muskelzellen und damit zu einer raschen Senkung des Blutzuckerspiegels. Gleichzeitig werden die Glykolyse und die Glykogensynthese der Skelettmuskulatur sowie die Triazylglyzeridsynthese in den Adipozyten gesteigert. Die Aktivierung der cAMP-spezifischen Phosphodiesterase führt zur Absenkung des cAMP-Spiegels und dadurch zur Hemmung der Lipolyse im Fettgewebe, zur Hemmung der Glykogenolyse, zur Stimulierung der Glykogensynthese in Leber und Skelettmuskulatur und zur Hemmung der Glukoneogenese in der Leber. Außerdem steigert Insulin den Aminosäuretransport in die Skelettmuskulatur. Langfristig werden durch Induktion bzw. Repression der Schlüsselenzyme die Glykolyse gefördert und die Glukoneogenese gehemmt. Die Induktion der Lipoproteinlipase steigert die Spaltung der VLDL-Triazylglyzeride und stimuliert die Triazylglyzeridbiosynthese.

Die ungenügende Zufuhr von Chrom soll Mit- oder Hauptursache von Symptomen wie Glukoseintoleranz, erhöhten Insulinspiegeln und Hyperlipidämie sein, welche wiederum mit Diabetes mellitus und kardiovaskulären Erkrankungen assoziiert sind.

Das Interesse an Chrom stammt aus frühen Tierstudien, die dem Spurenelement eine essentielle Rolle im Kohlenhydratstoffwechsel zuschreiben (Schwartz, 1957, 1959; Schroeder, 1966). In Folgestudien an Ratten zeigten sich unter Chrommangel erhöhte Cholesterin- und Triglyzeridspiegel. Außerdem bestand eine erhöhte Wahrscheinlichkeit von arteriosklerotischen Ablagerungen in der Aorta (Schroeder, 1965, 1968;

Anderson, 1998). Durch Zufuhr von Chrom konnte der Spiegel an glukosiliertem Hämoglobin (HbA_{1c}) gesenkt werden (Evans, 1993).

Kohlenhydratstoffwechsel

Der in Studien am häufigsten beobachtete Effekt einer Chromtherapie besteht in der Verbesserung von Blutzucker und Insulinspiegel. Humane Fallstudien berichteten über die Verbesserung von diabetes-assoziierten Symptomen durch Chromzufuhr (Jeejeebhoy, 1977; Freund, 1979; Brown, 1986; Anderson, 1989; Fox, 1998; Ravina, 1999). Allerdings konnten randomisierte, plazebo-kontrollierte Studien diese Tendenz nicht eindeutig bestätigen (Glinsmann, 1966; Sherman, 1968; Nath, 1979; Rabinowitz, 1983; Mossop, 1983). Die bislang größte Studie zu dieser Fragestellung (Anderson, 1997) zeigte eine signifikante Verbesserung des Plasmaglukosespiegels, des HbA_{1c} und der Insulinkonzentration in der Gruppe der Patienten mit Diabetes Typ 2, die Chrom erhielten. Zwei systematische Literaturreviews (Althuis, 2002; Yeh, 2003) bewerten die aktuelle Datenlage bezüglich der Regulation der Glukosehomeostase durch Chrom als unschlüssig, da zu wenig reliable Studien existieren, in denen die westliche Bevölkerung untersucht wird. In den aktuellsten Empfehlungen der American Diabetes Association wird aufgrund der unklaren Studienlage von einer Nahrungsergänzung mit Chrom für Diabetiker und Fettleibige abgeraten (American Diabetes Association, 2007).

Fettstoffwechsel

Neben den Effekten einer Chromtherapie auf den Glukosestoffwechsel berichten viele Studien über eine Senkung der Blutfette (Riales, 1981; Bourn, 1986; Urberg, 1988; Wang, 1989; Press, 1990; Lefavi, 1993; Roebach 1991; Abraham, 1992). Diese Einflüsse scheinen unabhängig von den Effekten auf den Kohlenhydratstoffwechsel zu sein (Lefavi, 1993). Der größte Effekt findet sich bei Patienten mit den höchsten Ausgangswerten, es braucht aber unter Umständen mehrere Monate bis zur Manifestation (Anderson, 1995). Gleichzeitig senkt die Chromzufuhr das Risiko für das Auftreten von arteriosklerotischen Ablagerungen. Es wurde berichtet, dass der Serumchromspiegel in einem inversen Verhältnis zum Auftreten der

Koronaren Herzkrankheit (KHK) steht. Außerdem hatten Patienten, die an einer KHK litten, niedrigere Chromkonzentrationen in der Aorta, nicht aber in anderen Geweben (Newman, 1978). Das Ansprechen der Blutfette auf Chrom ist allerdings ähnlich inkonstant wie das des Kohlenhydratstoffwechsels.

Proteinstoffwechsel

Chrom soll als Nahrungsergänzungsmittel, mit oder ohne ergänzendes Training, auch den Körperaufbau verändern. Das Zwei-Komponenten-Körpermodell unterscheidet die fettfreie Körpermasse (inklusive Körperproteinen und Mineralien) von der Fettmasse. Chrom soll nun den fettfreien Anteil erhöhen und gleichzeitig für Gewichtsverlust und Kraftzuwachs sorgen. Der überwiegende Anteil der Studien konnte, mit oder ohne körperliches Training, keinerlei signifikante Effekte in Bezug auf obengenannte Zielgrößen nachweisen (Clancy, 1994; Trent, 1995; Hallmark, 1996; Lukaski, 1996; Campbell, 1999; Volpe, 2001). Dabei ist es unerheblich, in welcher chemischen Form das Chrom zugeführt wird (Lukaski, 1996). Lediglich die Studien von Evans (Evans, 1989) und Kaats (Kaats, 1996) zeigten positive Effekte auf die Körperkomposition, wobei deren Studiendesigns bereits kritisiert wurden. Eine Metaanalyse, die sich mit unterschiedlichen Nahrungsergänzungsmitteln zur Gewichtsreduktion beschäftigt, befand Chrompicolinsäure für diesen Zweck als unwirksam (Pittler, 2004).

Die Entwicklungen der Blutwerte unter einer Chromtherapie sind bislang schlicht zu inkonstant, um eindeutige Schlüsse über therapeutische Indikationen ziehen zu können. Die Störungen von Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel sind grundsätzlich als multifaktoriell bedingte Erkrankungen anzusehen. Chrom ist ein Nahrungsmittel und kein Medikament, folglich hilft es denjenigen, die an einem Chrommangel leiden.

2 Fragestellung und Versuchsaufbau

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Chromstoffwechsel der Ratte. Obwohl eine Reihe von Chromverbindungen derzeit weltweit zur Nahrungsergänzung verwendet werden, ist die Bioverfügbarkeit des Chroms aus den einzelnen Verbindungen bislang nicht systematisch untersucht worden. Schwerpunkt der Arbeit sind das Chromphenylalanin und das Chrompropionat. Vergleichend werden Untersuchungen mit Chromchlorid vorgenommen.

Um den Verlauf der Chromkinetik im Organismus der Ratte verfolgen zu können, werden die entsprechenden Verbindungen in Mikrosynthesen mit radioaktivem $^{51}\text{Chrom}$ hergestellt. Die intestinale Absorption, der Verlauf der Ganzkörperretention, die Organverteilung von $^{51}\text{Chrom}$ sowie die Ausscheidung werden mit Hilfe des empfindlichen Hamburger Ganzkörper-Radioaktivitätszählers und für kleinere Proben mit einem γ -Counter untersucht.

Ferner sollen nach Markierung von Ratten durch orale bzw. intraperitoneale Applikation von $^{51}\text{Chrom}$, Serum- und Organproben mit geeigneten analytischen Verfahren wie Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC), Zentrifugation und Ultrafiltration untersucht werden, mit dem Ziel, neue Erkenntnisse bezüglich der physiologisch vorhandenen chrombindenden Proteine bzw. Peptide zu erhalten.

In der Arbeit wird damit auch nach Hinweisen gesucht, ob Chrom tatsächlich ein essentielles Element ist.

Konkret sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Mikrosynthese von $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Verbindungen ($^{51}\text{Chrom}$ -phenylalanin, $^{51}\text{Chrom}$ propionat und $^{51}\text{Chrom}$ chlorid) mit hoher spezifischer Aktivität und anschließender Analyse auf radiochemische Reinheit mittels HPLC.

2. Messung der Absorption, Ganzkörperretention und Ausscheidung von $^{51}\text{Chrom}$ in Ratten, aus verschiedenen entsprechend markierten Verbindungen ($^{51}\text{Chromphenylalanin}$, $^{51}\text{Chrompropionat}$ und $^{51}\text{Chromchlorid}$) nach oraler und intraperitonealer Applikation durch Verwendung von Stoffwechselläufigen und dem Hamburger Ganzkörper-Radioaktivitätszähler.
3. Hat die orale Applikation von ansteigenden Chrommengen einen Einfluss auf die Retention im Rattenorganismus? Welchen Einfluss hat die vorherige orale Gabe von Eisensulfat auf die Retention von ansteigenden Mengen Chrom aus intraperitonealer Verabreichung?
4. Untersuchung der Organverteilung von $^{51}\text{Chrom}$ im zeitlichen Verlauf nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chrom}_2\text{-Transferrin}$.
5. Suche nach chrombindenden Proteinen in Rattenserum und Rattenleber mittels Zentrifugation, HPLC und Ultrafiltration nach in vivo bzw. in vitro Markierung mit $^{51}\text{Chromchlorid}$ bzw. $^{51}\text{Chromphenylalanin}$.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Folgende Chemikalien wurden von nebenstehenden Firmen bezogen:

| Substanz | Strukturformel | Molekulargewicht | Hersteller |
|--------------------------------|-------------------------------------------|------------------|------------|
| Ammoniumhydroxid 25 % | NH_4OH | 35,10 g/mol | Fluka |
| Chrom (III) chlorid Hexahydrat | $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 266,45 g/mol | Fluka |
| Eisen (II) Sulfat Heptahydrat | $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 278,02 g/mol | Merck |
| L-Phenylalanin | $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ | 165,19 g/mol | Merck |
| D-Phenylalanin | $\text{C}_9\text{H}_{11}\text{NO}_2$ | 165,19 g/mol | Sigma |
| Nicotinsäure | $\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$ | 123,11 g/mol | Fluka |
| Propionsäure | $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2$ | 74,08 g/mol | Fluka |
| Salpetersäure 65 % | HNO_3 | 63,02 g/mol | Merck |

Tabelle 2 Verwendete Chemikalien. Firma Fluka (St. Gallen, Schweiz), Firma Merck (Darmstadt, Deutschland), Firma Sigma (St. Louis, USA)

⁵¹Chrom

Eine Lösung ⁵¹CrCl₃ in 0,5 M HCl mit einer spezifischen Aktivität von 25,98 GBq/mg wurde von der Firma Perkin Elmer Life and Analytical Science (Boston, USA) bezogen. Die Gesamtaktivität der Lieferung betrug 398,85 MBq (10,78 mCi) und hatte ein Gesamtvolumen von 14,15 µl. Die radionuklidische Reinheit war größer als 99 %.

3.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Fünfundzwanzig weibliche Wistar Ratten mit einem durchschnittlichen Gewicht von 150 g wurden von den Charles River Laboratories (Wilmington, Massachusetts) bezogen. Die Tiere waren zu fünft in Käfigen aus Polyethylen mit Stahlgitterdeckel untergebracht. Die Verteilung erfolgte zufällig und blieb bis zum Beginn der Versuche unverändert. Vier Wochen lang wuchsen die Nagetiere in der Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf auf. Zu Beginn der Untersuchungen wurden die Ratten in ihren Käfigen in einem dafür vorgesehenen Stall des Instituts untergebracht. Die Ratten lebten unter einem 12-Stunden Licht-Dunkel-

Zyklus in Ställen mit kontrollierter Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Es bestand freier Zugang zu Wasser und einer Standarddiät für Ratten (ssniff R/M-H extrudiert). Im Verlauf wuchsen die Tiere auf ein Durchschnittsgewicht von 300 g. Sämtliche tierexperimentellen Untersuchungen standen in Übereinstimmung mit den in Hamburg geltenden Gesetzen und Richtlinien für Tierversuche (Tierversuchgenehmigung 37/04).

3.3 Radioaktivität und Sicherheit

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 Begrenzungen 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.

Gemäß der Strahlenschutzverordnung (Strl Sch V) sind Mitarbeiter von Institutionen in denen mit ionisierender Strahlung umgegangen wird, über die Inhalte und Auslegung der Strahlenschutzverordnung zu unterweisen. Ziel ist der sichere Umgang mit Strahlungsquellen. Vor Beginn der Arbeit mit Radioaktivität erfolgte daher eine ausführliche Unterweisung im Strahlenschutz durch die Strahlenschutzbeauftragten der Arbeitsgruppe Eisenstoffwechsel PD Dr. Dr. P. Nielsen und Dr. R. Engelhardt. Beim Umgang mit Radioaktivität gilt grundsätzlich das ALARA-Prinzip (As Low As Reasonably Achievable), d.h., alle Strahlenbelastungen müssen so niedrig wie vernünftigerweise möglich gehalten werden. Dabei unterscheidet man allgemeine Schutzmaßnahmen wie die Verwendung möglichst niedriger Dosen, das Einhalten eines möglichst großen Abstandes, die Minimierung der Expositionszeit und die Abschirmung durch Schutzwände aus Blei von den individuellen Schutzmaßnahmen wie das Tragen von Schutzkleidung. Zur Umsetzung dieser Forderungen wurde die Aktivität in einem Strahlenschutzbunker gelagert. Lediglich PD Dr. Dr. Nielsen als

professioneller Chemiker hatte Kontakt mit der maximalen Aktivität von 398,85 MBq. Der Umgang mit der Radioaktivität erfolgte ausschließlich in dafür zugelassenen Räumen. Die Herstellung der radioaktiv markierten Verbindungen fand hinter einer Bleischutzwand an einem dafür vorgesehenen und entsprechend gekennzeichneten Arbeitsbereich unter Abzug statt. Die synthetisierten ⁵¹chrom-markierten Verbindungen wurden anschließend ebenfalls im Schutzbunker gelagert und nur zur Rattenapplikation aus dem Bunker geholt. Beim Umgang mit sämtlichen potentiell kontaminierten Materialien wurden Kittel, Mundschutz, Handschuhe und Schutzbrille getragen. Die radioaktiv belasteten Tiere waren in dafür vorgesehenen Ställen mit entsprechender Genehmigung untergebracht. Der anfallende Müll wie Exkrememente, Streu und Einmalinstrumente wurde getrennt gesammelt und in einem Lagerraum aufbewahrt. Während der Zwischenlagerung kam es zum weitgehenden Zerfall der Radioaktivität. Nach einer Freimessung des Sondermülls konnte die ordnungsgemäße Entsorgung erfolgen. Die belasteten Kadaver und Organe wurden eingefroren. Nach Abklingen der Aktivität erfolgte die Entsorgung über die Zentrale Tierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Durch das Tragen einer Dosimeterplakette während sämtlicher Arbeiten konnte die individuelle Strahlenbelastung dokumentiert werden. Die Auswertung der Plakette erfolgte nach Ablauf von sechs Monaten. Die Personendosis lag weit unterhalb des zulässigen Grenzwertes von 20 mSv/a.

3.4 Synthese der Chromverbindungen

Zunächst erfolgte die Synthese der Chromverbindungen im Grammbereich, um deren Verhalten während der Herstellung abschätzen zu können. Aus den Ergebnissen sollte ein Verfahren zur Synthese im Milligrammbereich entwickelt werden, um dann in dieser Größenordnung die radioaktive Markierung mit ⁵¹Chrom vorzunehmen.

Synthese von 5 mMol Chrom (L-Phenylalanin)₃

Als Herstellungsvorschrift diente die Arbeit von Yang und Mitarbeitern (Yang, 2005). Es wurden zunächst sowohl Chrom-L-Phenylalanin als auch Chrom-D-Phenylalanin hergestellt.

1,3 g (= 4,87 mMol) Chrom (III)-Chlorid Hexahydrat (= 266,45 g/mol) wurden in 25 ml H₂O gelöst, 2,4 g (= 14,6 mMol, Merck) L-Phenylalanin (= 165,19 g/mol) wurden in 60 ml Wasser bei 95 °C gelöst. Anschließend wurden beide Lösungen zusammengegeben und in einem 250 ml Erlenmeyerkolben 4 h im Wasserbad auf 95 °C erhitzt. Die grüne Farbe schlug nach 5 min in violett um. Die Lösung wurde eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die schwarz-blaue Masse wurde in ca. 100 ml Aceton gewaschen und filtriert. Die schwarz-blaue zähe Masse wurde an der Luft getrocknet. Ausbeute: 2,55 g (78 %).

Synthese von 5 mMol Chrom (D-Phenylalanin)₃

1,3 g (= 4,87 mMol) Chrom (III)-Chlorid Hexahydrat (= 266,45 g/mol) wurden in 25 ml H₂O gelöst, 2,4 g (= 14,6 mMol, Sigma) D-Phenylalanin (= 165,19 g/mol) wurden in 60 ml Wasser bei 95 °C gelöst. Anschließend wurden beide Lösungen zusammengegeben und in einem 250-ml-Erlenmeyerkolben 4 h im Wasserbad auf 95 °C erhitzt. Die grüne Farbe schlug nach 5 min in violett um. Die Lösung wurde eingefroren und anschließend lyophilisiert. Die schwarz-blaue Masse wurde in ca. 100 ml Aceton gewaschen und filtriert. Das schwarz-blaue Pulver wurde an der Luft getrocknet. Ausbeute: 3,0 g (92 %).

Synthese von 5 mMol Bishydrohexapropionattrischromium (III) Nitrate Trihydrate

Zur Synthese diente die Vorschrift von A. Earnshaw und Mitarbeitern (Earnshaw, 1966).

Zunächst erfolgte die Synthese von Chromhydroxid. Dazu wurden 1,3 g (= 5 mMol) Chrom (III)-Chlorid Hexahydrat (= 266,45 g/mol) und 1 g (= 10 mMol) Natriumcarbonat (Na₂CO₃) je in 40 ml destilliertem Wasser gelöst und vermischt. Dabei entstand eine grau-grüne Lösung, die 60 Minuten bei 60 °Celsius im Wasserbad erhitzt wurde. Das ausgefällte Chromhydroxid

wurde filtriert und gewaschen. Das noch feuchte Chromhydroxid war von geléeartiger Konsistenz und blauer Farbe. Das Chromhydroxid wurde nun in 1 ml destilliertem Wasser aufgelöst. Zu dieser Lösung wurden 10 mMol Propionsäure (0,75 g) und 1 ml 10%ige Salpetersäure gegeben und anschließend im Wasserbad auf 60 °C erhitzt. Die bei Abkühlung entstandenen Kristalle wurden gefiltert und waren von dunkler blau-grüner Farbe.

3.4.1 Mikrosyntheseverfahren

Nach erfolgreicher Synthese der Verbindungen im Grammbereich wurde der Herstellungsmaßstab verkleinert. Wir entschieden uns, für die folgenden Untersuchungen mit Chrom-L-Phenylalanin weiterzuarbeiten. Die eingesetzte Chrommenge lag nun im Milligrammbereich. In dieser Größenordnung wurde dann die radioaktive Markierung vorgenommen, um eine möglichst große spezifische Aktivität zu erhalten. Ausgehend von dieser Synthesemenge konnten dann Aliquots für die Belastung der Tiere entnommen werden, die eine Chrommenge analog zu humanen chromhaltigen Nahrungsergänzungsprodukten enthalten.

Mikrosynthese von 24 µMol ChromTris-L-Phenylalanin

6,5 mg (= 24 µMol) Chrom (III)-Chlorid Hexahydrat (= 266,45 g/mol) wurden in ein Eppendorfgefäß eingewogen und anschließend mit 100 µl destilliertem Wasser aufgefüllt. Es ergab sich eine homogene grüne Lösung. 12 mg (73 µMol) L-Phenylalanin (= 165,19 g/mol) wurden in ein weiteres Eppendorfgefäß eingewogen und ebenfalls mit 100 µl destilliertem Wasser aufgefüllt. Das Eppendorfgefäß mit dem Phenylalanin wurde in einen Thermoblock verbracht und auf 95 °C erhitzt, um das Phenylalanin zu lösen. Nachdem dies geschehen war, wurde die Lösung mit dem CrCl₃ dazu pipettiert. Nach 5 Minuten ergab sich eine violette Färbung. Der Ansatz verblieb weitere 4 Stunden im Thermoblock.

Mikrosynthese von 40 μMol Chrompropionat

In einem Eppendorfgefäß wurden 10 mg (= 40 μMol) Chrom (III)-Chlorid Hexahydrat (= 266,45 g/mol) eingewogen, mit 100 μl destilliertem Wasser aufgefüllt und gelöst. Anschließend wurden 8,4 mg (= 80 μMol) Na_2CO_3 ebenfalls in 100 μl destilliertem Wasser gelöst. Beide Ansätze wurden in einem Mikrofilter zusammengegeben. 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 nun in 40 μl destilliertem Wasser gelöst. Es erfolgte die Zugabe von 10 μl 10%iger Salpetersäure sowie von 6 mg Propionsäure. Der Ansatz wurde dann im Thermostat auf 57 °C erhitzt. Das entstandene Chrompropionat wurde anschließend mit 13000 U/Min für 15 Minuten zentrifugiert und einmal gewaschen.

3.4.2 Mikrosynthese von radioaktiven Verbindungen

Mikrosynthese von 38 μMol $^{51}\text{ChromTris-L-Phenylalanin}$

Es wurden 18,5 mg (= 112 μMol) L-Phenylalanin (= 165,19 g/mol) in ein Eppendorfgefäß eingewogen und mit 200 μl destilliertem Wasser aufgefüllt. In ein zweites Eppendorfgefäß wurden 10 mg (38 μMol) Chrom (III)-Chlorid Hexahydrat (= 266,45 g/mol) eingewogen und 200 μl destilliertes Wasser dazugegeben. 200 μl der $^{51}\text{Chromchloridstammlösung}$ mit einer Aktivität von 74 MBq wurden in das Gefäß mit dem CrCl_3 pipettiert. Um das Phenylalanin zu lösen, wurde das Eppendorfgefäß mit dem Phenylalanin im Thermoblock auf 95 °C erhitzt. Nachdem das Phenylalanin sich gelöst hatte, wurde der Ansatz mit dem $^{51}\text{Chromchlorid}$ dazugegeben. Der Ansatz verblieb vier Stunden im Thermoblock.

Mikrosynthese von 31 μMol $^{51}\text{Chrompropionat}$

8,3 mg (31 μMol) Chrom (III)-Chlorid Hexahydrat (= 266,45 g/mol) wurden in ein Eppendorfgefäß eingewogen und 200 μl destilliertes Wasser dazugegeben. Anschließend wurden noch 200 μl der $^{51}\text{Chromchloridstammlösung}$ mit einer Aktivität von 44 MBq in den Ansatz gegeben. 8,4 mg (80 μMol) Na_2CO_3 wurden in 100 μl destilliertem Wasser

aufgelöst. Beide Ansätze wurden jetzt in einem Mikrofilter vermischt. Der Ansatz wurde im Thermostat bei 57° Celsius eine Stunde erhitzt. Das Chromhydroxid wurde dann mittels Zentrifugation bei 13000 U/min 20 Minuten zentrifugiert. Das Chromhydroxid wurde in 40 µl destilliertem Wasser gelöst. Jetzt erfolgte die Zugabe von 6 mg Propionsäure und 10 µl 10%iger Salpetersäure. Die Lösung wurde im Thermostat auf 57 °Celsius erhitzt. Das auf diese Weise entstandene ⁵¹Chrompropionat wurde bei 13000 U/Min für 15 Minuten zentrifugiert und einmal gewaschen.

⁵¹Chromchlorid

Nach Erhalt der ⁵¹Chromchloridlieferung wurde die Stammlösung durch Zugabe von destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl aufgestockt. Die Gesamtaktivität von 398,85 MBq befand sich jetzt also in einem Gesamtvolumen von 1000 µl. Zur Applikation von ⁵¹Chromchlorid wurde ein entsprechendes Aliquot aus der verdünnten ⁵¹Chromchloridstammlösung entnommen.

3.5 Applikationslösungen mit ansteigenden Chrommengen

Es wurden 113,3 mg (= 0,43 mMol) Chrom (III)-Chlorid Hexahydrat (= 266,45 g/mol) eingewogen und anschließend in 4 ml destilliertem Wasser gelöst. Es folgte eine Verdünnung im Verhältnis 1:50. Die Chromkonzentration der Lösung betrug 0,1106 µg/µl. Jeder Ansatz erhielt ein entsprechendes Aliquot dieser Lösung, um die definierten Chrommengen zu realisieren. 30 µl der ⁵¹Chromchloridstammlösung wurden mit 970 µl destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1000 µl aufgestockt. Ein Aliquot von 60 µl aus dieser Lösung, mit einer Aktivität von 330 MBq, wurde zur Markierung in jeden Ansatz der ansteigenden Chrommengen gegeben.

3.6 Eisensulfatlösung

Eine übliche Eisendosis für den Menschen beträgt 200 mg auf 70 kg Körpergewicht/Tag. Um toxische Effekte zu vermeiden, wird mit einer Dosis

entsprechender Größenordnung für die Ratte gearbeitet. Da das durchschnittliche Gewicht der Ratten zum Zeitpunkt dieses Versuches 280 g betrug, sollte jede Ratte 0,8 mg Eisen erhalten. 65,3 mg (= 0,23 mMol) Eisensulfat (= 278,02 g/mol) wurden in 3 ml destilliertem Wasser gelöst. Die Eisenkonzentration dieser Lösung betrug also 4,35 mg/ml. Damit jedes Tier bei Applikation etwa 0,8 mg Eisen erhielt, wurden 190 µl dieses Ansatzes verabreicht.

3.7 Gewinnung und Aufarbeitung der Organproben

Organprobengewinnung

Die Narkotisierung der Tiere erfolgte mit einem CO₂/O₂-Gemisch. Nach eingetretener Bewusstlosigkeit wurde die Narkose mit intraperitonealer Gabe von Ketamin fortgeführt. Mit einem Skalpell erfolgte ein Längsschnitt zur Eröffnung der Bauchhöhle. Das Bauchpaket wurde zur Seite geschlagen und die abdominale Aorta dargestellt. Jetzt konnte die Aorta mit einer Butterflykanüle punktiert werden. Das Blut wurde in einem Serumröhrchen aufgefangen (durchschnittlich 8-10 ml). Das Ausbluten tötete das Tier. Es folgte die Entnahme von Bauchpaket, Milz, Nieren, Leber, Lunge, Herz und Gehirn. Außerdem wurden noch je etwa 1 g Fett- und Muskelgewebe sowie der Femur entnommen. Die Aktivität der entnommenen Proben und die des Kadavers wurden im Ganzkörperzähler gemessen. Das Blut wurde nach der Messung sofort zentrifugiert, Erythrozyten und Serum anschließend erneut gemessen.

Herstellung von Leberhomogenat

Es wurde 1 g noch gefrorenes Lebergewebe eingewogen und in den Kolben des Potter-Elvehelm glass-glass Homogenators verbracht. Anschließend wurden 5 ml eiskalter 100 mM Tris-HCl-Puffer dazugegeben. Ein Stößel wurde in seiner Halterung befestigt, die Rotationsgeschwindigkeit auf 1000 U/min eingestellt. Der Stößel wurde nun 5-Mal über einen Hebel auf und ab bewegt. Auf diese Weise erfolgte die mechanische und chemische Aufschlüsselung des Lebergewebes. Das Resultat war eine homogene orange-rote Flüssigkeit. Es folgte die vollständige Überführung des Ansatzes in ein Reagenzglas durch Dekantieren. Nach Zentrifugation

(5000 U/min, 30 min, bei 5 °C) wurden die weiteren Untersuchungen mit dem Überstand durchgeführt.

Inkubation von Rattenserum mit ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin bzw. ⁵¹Chromchlorid

Durch Zentrifugation einer geronnenen Vollblutprobe der Ratte wurde Serum gewonnen. Um die Inkubation der Serumproteine vorzunehmen, wurden nun unterschiedliche Volumina von zuvor gewonnenem Rattenserum mit definierten Mengen ⁵¹Chromchlorid bzw. ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin in ein Eppendorfgefäß gegeben. Der Ansatz wurde 1 Stunde im Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die Trennung der Ansätze über Gel- bzw. Anionenaustauschchromatographie vorgenommen werden. Auf die gleiche Art und Weise erfolgte auch die Markierung der Serumproteine für den Verteilungsversuch. Ein Aliquot des mit ⁵¹Chromchlorid inkubierten Rattenserums wurde dann den Ratten intraperitoneal appliziert.

3.8 Analysemethoden

Spektralanalyse

Mit der UV-VIS-Spektralanalyse untersucht man Lösungen auf ihre Absorption von Licht. Dabei wird die Messstrahlung einer definierten Wellenlänge durch die zu untersuchende Lösung geschickt. Der nicht absorbierte Anteil der Strahlung fällt auf einen Photomultiplier, der auch kleinste Lichtmengen in elektrische Impulse umsetzt. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann bei bekanntem Extinktionskoeffizienten die Konzentration der Lösung bestimmt werden:

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

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

Verwendet wurden 1 ml QS-Küvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm. Die Messung erfolgte im Spektralbereich von 200 nm bis 800 nm.

Chromatographie

Die Chromatographie ist ein Verfahren zur Trennung und Reinigung biologischer Verbindungen aus einem komplexen Gemisch von Molekülen. Chromatographische Verfahren beruhen auf der unterschiedlichen Affinität der zu trennenden Stoffe eines Gemisches zu zwei verschiedenen Phasen. Die eine Phase ist an einen festen Träger gebunden und wird daher als stationäre Phase bezeichnet, die andere, die mobile Phase, ist in Bewegung und durchströmt die stationäre Phase. Dadurch muss sich immer wieder ein neues Gleichgewicht zwischen beiden Phasen einstellen, was zu einer Trennung des Stoffgemisches führt. Nach der Art der Kräfte, die bei der Entstehung der Gleichgewichte wirken, lassen sich Verteilungs-, Adsorptions-, Ionenaustausch- und Hohlraumdiffusionschromatographie (= Gelchromatographie) unterscheiden. Nach der Anordnung des Trägermaterials unterscheidet man Dünnschicht- und Säulenchromatographie. Ein High Pressure Liquid Chromatographie Gerät (HPLC) besteht aus einer Pumpe, einem Probeninjektor, einer Trennsäule, dem mobilen Phasensystem und einem UV-Photometer (siehe Abbildung 5).

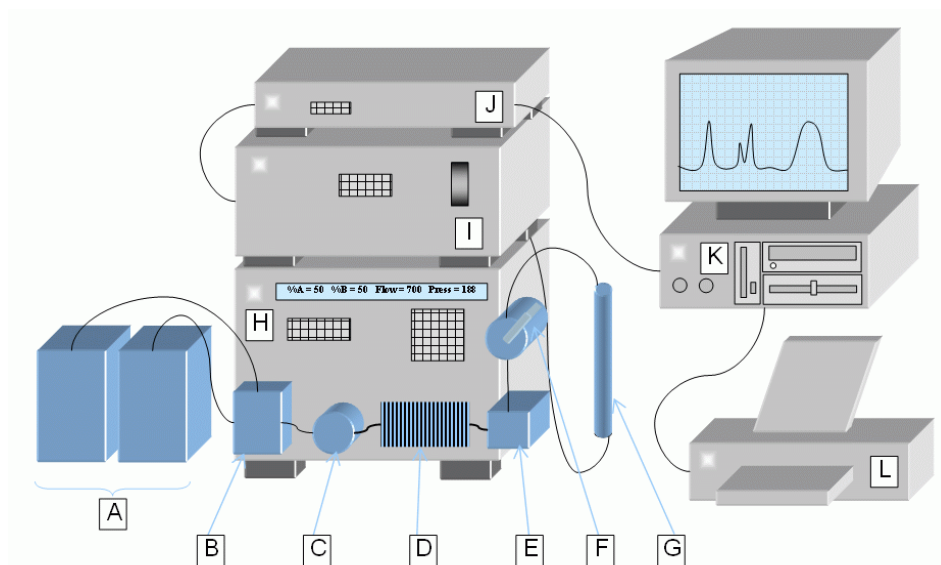


Abbildung 5 Typischer Aufbau einer HPLC-Apparatur. A: Eluentenreservoir, B: Elektromagnetische Mischventile mit Doppelhubkolbenpumpe, C: Überdruckventil, D: Druckkompensationsschleife, E: Mischkammer, F: RHEODYNE-Einspritzventil, G: Trennsäule, H: HPLC-Einheit, I: Detektor-Einheit (z. B. UV-Spektrometer), J: Computerinterface, K: PC, L: Drucker

High Performance Liquid Chromatographie (HPLC, Umkehrphasen-flüssigkeitschromatographie, Lichrocart HPLC Cartridge RP-18,5 µm)

Es handelt sich hierbei um eine Variante der Verteilungschromatographie. Das Prinzip dieser Methode ist die Verteilung von Stoffen zwischen zwei flüssigen Phasen, wobei die eine an einem festen Träger verankert ist. Bei der Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie ist die mobile Phase hydrophil, die stationäre Phase hydrophob. Die stationäre Phase besteht aus unter hohem Druck in eine Säule gepackten Kieselgelteilchen, an die hydrophobe Substanzen kovalent gebunden sind. Als mobile Phase wurde ein Methanol/Wasser Gemisch (50/50) verwendet. Zur Detektion wurde das Photometer auf 262 nm eingestellt. Die Trennung kommt dadurch zustande, dass sich die Stoffe nach ihren hydrophoben Eigenschaften unterschiedlich in den beiden Phasen verteilen und damit mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten durch die Säule wandern.

Zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit wurde das Eluat der Lösungen der radioaktiven Chromverbindung nach dem Durchlaufen der Trennsäule in fünf verschiedenen Fraktionen gesammelt. Anschließend wurde die Aktivität der einzelnen Fraktionen für 100 Minuten im Autogammazähler gemessen. Bei gegebener radiochemischer Reinheit müsste sich die Hauptaktivität in der Fraktion wiederfinden, die den photometrisch bestimmten Peak der jeweiligen Verbindung enthält. Als Referenz diente die Messung einer unfraktionierten Probe gleicher Menge der Lösung der jeweiligen ⁵¹Chromverbindung.

Ionenaustauschchromatographie (Mono-Q)

Die Ionenaustauschchromatographie ist ein flüssigchromatographisches Trennverfahren. Grundlegend basiert ihr Prinzip auf der Interaktion von gelösten positiv oder negativ geladenen Teilchen mit einer entgegengesetzt geladenen festen Trägermatrix. Bei der verwendeten Mono-Q Säule der Firma Pharmacia handelt es sich um eine Anionenaustauschersäule. Hierbei besteht die Trägermatrix aus positiv geladenen Gruppen. Diese Gruppen liegen über einen weiten pH-Bereich protoniert und damit positiv geladen vor. Unter Austausch des negativ geladenen Gegenions (hier Chlorid) kann ein negativ geladenes Molekül an die Matrix gebunden werden. Da

Biomoleküle, insbesondere Proteine (in Abhängigkeit vom pH-Wert) eine Ladung aufweisen, eignet sich die Ionenaustauschchromatographie sehr gut als Aufreinigungsverfahren biologischer Makromoleküle.

Die Ionenaustauschchromatographie erfolgt in drei Schritten:

Zunächst wird die Säule mit den Probenmolekülen beladen. Hierbei werden die Gegenionen der Säulenmatrix durch Probenmoleküle ersetzt. Während des Beladungsvorganges kommt es bereits zur ersten Fraktionierung des zu trennenden Substanzgemisches. Während ein Teil der verschiedenen Probenmoleküle aufgrund ihrer Ladung an die Matrix binden kann, passieren entgegengesetzt oder schwach geladene Moleküle die Säule und werden dadurch von den übrigen Komponenten getrennt.

Der nächste Schritt ist ein Waschvorgang, mit dem nur sehr schwach mit der Matrix interagierende Moleküle von der Säule gespült werden.

Um die gebundenen Moleküle abzulösen, muss die elektrostatische Bindung an der Säulenmatrix durch Zugabe von Inertsalzen (mit dem ursprünglichen Gegenion) geschwächt werden. Hierzu wurde ein Ionenstärkegradient verwendet, d.h. die Konzentration des zugegebenen NaCl wurde kontinuierlich erhöht. Dies ist der Hauptfraktionierungsschritt dieses Chromatographieverfahrens. Nacheinander werden zuerst Moleküle die schwächer an die Matrix binden von der Säule eluiert, gefolgt von den Molekülen, die stärker an die Säule gebunden sind. Ein Gradientenprogramm stellt aus zwei Laufmitteln zu jedem Zeitpunkt ein definiertes Gemisch her, welches durch die Säule gepumpt wird. Als Laufmittel A wurde Tris-HCl-Puffer (25 mM), als Laufmittel B Tris-HCl-Puffer (25 mM) mit NaCl (0,5 M) gelöst verwendet. Der Durchfluss betrug 0,8 ml/min, das Photometer war auf 280 nm eingestellt. Auf diese Weise wurde der NaCl-Ionengradient realisiert. Das Gradientenprogramm lief über 45 Minuten. Die Auffangröhrchen für das Eluat wurden alle 2 Minuten mit Hilfe eines Fraktionsteilers gewechselt. Anschließend wurden die Fraktionen im Autogammazähler gemessen. Als Referenz erfolgte die Messung einer unfraktionierten Probe. Getrennt wurde mit ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin bzw. ⁵¹Chromchlorid markiertes Rattenserum und mit ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin markiertes Leberhomogenat.

Molekularsiebchromatographie (Gelchromatographie, Superose 12)

Die Stoffgemischtrennung erfolgt hier nach Molekülgröße und somit auch nach Molekulargewicht. Salze und kleine Moleküle eluieren langsam, große Moleküle eluieren schnell von der Säule. Quervernetzte Polymere (hier 12%ige Agarose quervernetzt) bilden eine Netz- oder Porenstruktur, in deren Räume kleine Moleküle eindringen oder sie durchwandern können. Übersteigt der Eigendurchmesser der Moleküle jedoch den Porenquerschnitt, so können diese Moleküle nur das Außenvolumen der Partikel passieren. Alle Moleküle, die größer sind als die Porengröße (Ausschlussgröße, beträgt bei der Superose $12,2 \times 10^6$ Da) verhalten sich gleich und bewegen sich nur in dem äußeren Flüssigkeitsraum. Sie treten nach Durchlaufen des Volumens außerhalb der Gelpartikel (Ausschlussvolumen) zuerst aus der Säule. Der optimale Trennungsbereich für diese Säule liegt bei einem Molekulargewicht zwischen 1000 und 300000 Dalton. Als Laufmittel diente Tris-HCl-Puffer (100 mM), der Durchfluss betrug 0,8 ml/min und das Photometer war auf 280 nm eingestellt. Die Chromatographie lief 45 Minuten. Die Auffangröhrchen für das Eluat wurden alle 2 Minuten mit Hilfe eines Fraktionsteilers gewechselt. Anschließend wurden die Fraktionen im Autogammazähler gemessen. Als Referenz erfolgte die Messung einer unfraktionierten Probe. Getrennt wurde mit $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$ bzw. $^{51}\text{Chromchlorid}$ markiertes Rattenserum und mit $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$ markiertes Leberhomogenat.

Aktivitätsmessung der radioaktiven Chromlösungen

Von den synthetisierten $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Verbindungen wird ein Aliquot entnommen und im Ganzkörperzähler gemessen. Durch die bekannte spezifische Aktivität der Stammlösung kann die Chromkonzentration der jeweiligen Tracerdosis errechnet werden. Dazu kommt dann gegebenenfalls die bei der Synthese der Verbindung zugegebene nicht radioaktive Chrommenge.

Ultrafiltration (Milipore-MC Centrifugal Filter Units)

Es handelt sich um eine Technik zur Abtrennung und Aufkonzentrierung von makromolekularen Substanzen. Einer Proteinlösung werden Salze und

niedermolekulare Substanzen dadurch entzogen, dass sie mittels Überdruck, der hier durch die Zentrifuge erzeugt wurde, gegen eine Ultrafiltrationsmembran gepresst werden. Es erfolgte eine Proteinkonzentrierung. Verwendet wurden Filter der Firma Milipore, die in Eppendorfgefäße eingesetzt wurden. Der Filter besteht aus Poren an Unter- und Oberseite, welche eine definierte Ausschlussgrenze haben. Der Cut-Off-Level des verwendeten Systems beträgt 10000 NMWL (nominal molecular weight limit). 100 µl von mit ⁵¹chrom-markiertem Serum bzw. Leberhomogenat wurden in den Filtereinsatz pipettiert und, wie für Filter dieser Art empfohlen, bei 13000 U/min 30 min zentrifugiert. Die ⁵¹Chromaktivität im Ultrafiltrat wurde im Autogammazähler 100 Minuten gemessen. Als Referenz diente eine nicht filtrierte Probe gleichen Volumens.

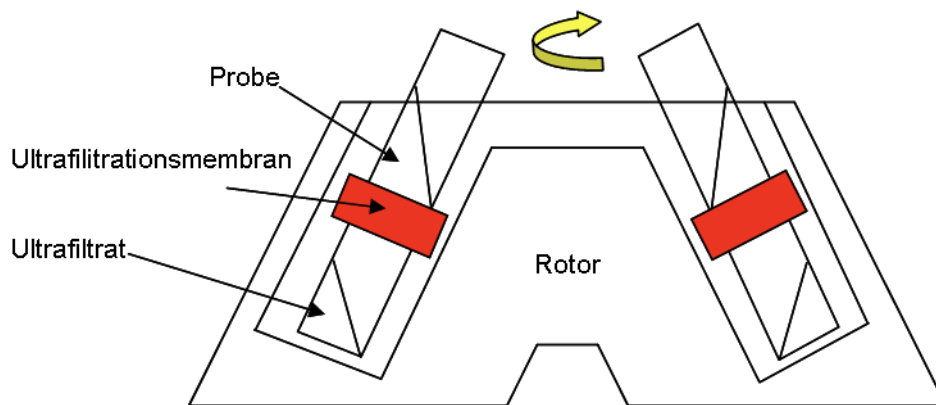


Abbildung 6 Schematische Darstellung der Ultrafiltration

Stoffwechsellkäfig

Um die Ausscheidung der unterschiedlichen Chromverbindungen zu verfolgen, wurden die Tiere unmittelbar nach Applikation in Stoffwechsellkäfige gesetzt. Stoffwechsellkäfige erlauben die separate Sammlung von Kot und Urin. Der Boden des Stoffwechsellkäfigs besteht aus einem Gitter. Die Exkrememente fallen durch dieses Gitter. Durch eine Glaskugel erfolgt die Trennung. Während der Urin an der Kugel hinabläuft, prallt der Kot ab. Auf diese Weise werden Kot und Urin in separaten Vorrichtungen aufgefangen. Die Stoffwechsellkäfige sind aus transparentem Kunststoff, auf diese Weise hatten die Tiere Sichtkontakt zueinander. Es

bestand jederzeit freier Zugang zu Wasser und Futter. Die Sammelbehälter wurden nach Ablauf von 24 Stunden gewechselt und anschließend im Ganzkörperzähler gemessen. Anhand der Aktivität konnte auf die Ausscheidung von ^{51}Cr rückgeschlossen werden.

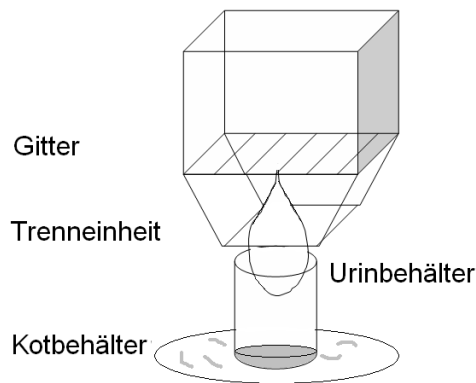


Abbildung 7 Schema eines Stoffwechselläfigs

Ganzkörperzähler-Radioaktivitätszähler

Das analytische Problem bei Untersuchungen zu Chrom in biologischen Systemen ist die geringe Gewebekonzentration. Sie liegt im nM-Bereich. Folglich wird ein äußerst sensibles Messinstrument benötigt, um die Stoffwechselwege von geringen Mengen ^{51}Cr verfolgen zu können. Realisiert wurde dies mit dem Hamburger Ganzkörper-Radioaktivitätszähler.

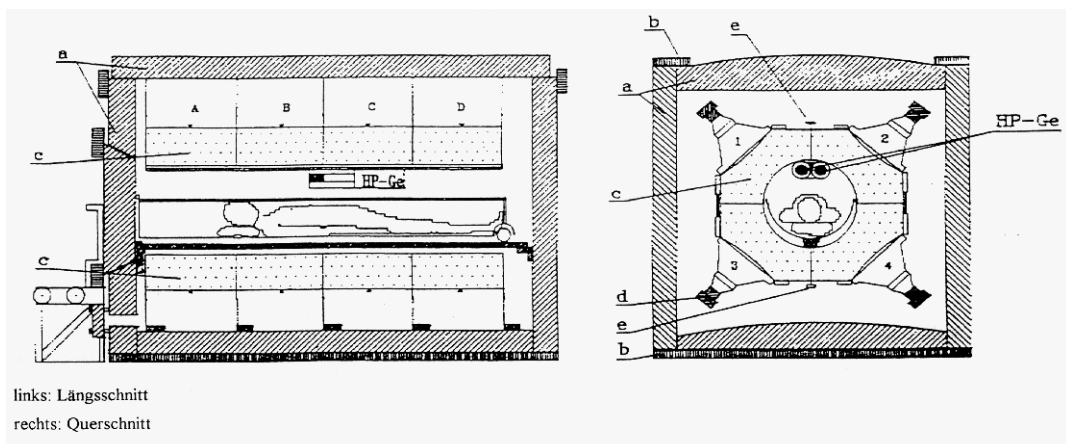


Abbildung 8 Schematischer Aufbau des Hamburger Ganzkörper-Radioaktivitätszählers (HAMCO) a: 15 cm Stahlplatten (Voratomzeitalterstahl), b: 5 cm Halterahmen (Voratomzeitalterstahl), c: Szintillatorflüssigkeit in Modultanks (je 170 l), d: Vorverstärker auf Photomultiplier-Basis, e: Lichtquellen, A, B, C, D: 50-cm-Modultanks, 1, 2, 3, 4: Du Mont-K 1328-Photomultiplier, HP-Ge: zwei GP-Ge-Detektoren (n-Typ)

Der zu messende Gegenstand befindet sich in der Mitte des Ganzkörperzählers. Die Aktivität strahlt in alle Richtungen radiär ab. Bei ^{51}Cr handelt es sich um einen weichen Gammastrahler. Die Strahlung durchdringt die Szintillationsflüssigkeit, die sich in Tanks rund um die Röhre befindet. Hier kommt es nun zum Compton-Effekt. Elektronen werden durch die Gammastrahlung angeregt und aus ihren Atomschalen gelöst. Dabei werden energiereiche Lichtquanten emittiert. Das Signal, das durch die Lichtblitze entsteht, wird von den umgebenden Potentiometern verstärkt und dem Rechner zur Auswertung zugeführt. Der Ganzkörperzähler wird durch einen Stahlmantel (Voratomzeitalter) gegenüber Umgebungsstrahlung abgeschirmt.

Für Verlaufsmessungen mit dem Ganzkörperzähler sind die nachfolgenden Einstellungen und Berechnungen notwendig.

Eichung und Wirkungsgradbestimmung des Ganzkörper- Radioaktivitätszählers

Zur Eichung des Ganzkörperzählers wurde aus einer ^{51}Cr Chromchloridstammlösung mit einer spezifischen Aktivität von 6,56 kBq/ μl ein Aliquot von 260 μl mit einer Aktivität von $A(0) = 1,7 \text{ MBq}$ (45 μCi) genommen und ein punktförmiger Standard erzeugt. Mit diesem punktförmigen Standard mit bekannter Aktivität $A(0)$ erfolgte eine tägliche Eichung des Ganzkörperzählers auf ^{51}Cr .

$$A(t) = A(0) * e^{-\lambda t}$$

($A(t)$ = Aktivität zum Zeitpunkt t [μCi], $A(0)$ = Aktivität zum Zeitpunkt 0 [μCi], t = Zeit [d], λ = Zerfallskonstante)

Für die Bestimmung des Wirkungsgrades eines punktförmigen Standards mit bekannter Aktivität $A(t)$ benötigt man die Nettostrahlung (N_{Netto}) des Standards. Diese kann mit der Formel $N_{\text{Netto}} = N_{\text{Brutto}} - N_{\text{Untergrund}}$ berechnet werden. Die Untergrundstrahlung ($N_{\text{Untergrund}}$) erhält man durch eine Leermessung, die Bruttostrahlung (N_{Brutto}) durch Messung des punktförmigen Standards. Jetzt kann man den Wirkungsgrad durch Einsetzen in folgende Formel errechnen.

$$E = N_{\text{Netto}} / A(t)$$

(E = Wirkungsgrad [%], N_{Netto} = Nettozählrate [cps], A(t) = Aktivität zum Zeitpunkt t [μCi])

Der Wirkungsgrad der punktförmigen Quelle betrug 5,53 %. Die Herstellung eines Phantomstandards sollte eine möglichst realitätsnahe Eichung des Ganzkörperzählers für die Tiermessungen ermöglichen. Dazu wurden in eine Polypropylenflasche 200 ml destilliertes Wasser gegeben sowie ein Aliquot von 200 μl obiger ^{51}Cr chloridstammlösung mit einer Aktivität von 1,3 MBq (35 μCi). Der Wirkungsgrad des Phantomstandards betrug 5,3 %.

Absorption

Die Absorption bezeichnet eine zeitkorrigierte Zählrate N zum Zeitpunkt t, die ins Verhältnis zur Zählrate N(0) beim Applikationszeitpunkt t(0) gesetzt wird. Die Angabe erfolgt in Prozent.

$$\text{Abs.} = N(t) / N(0)$$

(Abs. = Absorption [%], N(t) = Zählrate zum Zeitpunkt t [cps], N(0) = Zählrate zum Zeitpunkt 0 [cps])

Die Zeitabfallskorrektur errechnet sich über die Zerfallsgleichung:

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

(N(t) = Zählrate zum Zeitpunkt t [cps], $N(x)_{\text{Netto}}$ = Nettozählrate zum Zeitpunkt x [cps], $\Delta t = t_1 - t_2$ [d], $T_{1/2}$ = Halbwertszeit [d])

Für $N(x)_{\text{Netto}}$ wird die aktuelle Zählrate, für Δt die vergangene Zeit und für $T_{1/2}$ die Halbwertszeit von ^{51}Cr eingesetzt.

Aktivitätsmessung der Tiere

Zu Beginn erfolgte die Bestimmung der Untergrundstrahlung des Ganzkörper-Radioaktivitätszählers. Dieser Wert ist dann von jeder Tiermessung zu subtrahieren. Bevor die Belastung der Tiere beginnen konnte, musste die Untergrundstrahlung jedes Tieres gemessen werden (N_{Ratte}). Anschließend wurden die radioaktiven Chromverbindungen appliziert. Nach Ablauf einiger Minuten erfolgte dann die 100%-Messung, der Zeitpunkt wurde als t(0) definiert. Es ergab sich $N_{\text{Netto}} = N_{\text{Brutto}} - N_{\text{Ratte}}$.

Mit den obengenannten Formeln konnte der Verlauf der Retention verfolgt werden. Zur Messung wurden die Ratten in eine kleine mit Zellstoff ausgelegte, transparente Box mit den Abmessungen 30 cm x 20 cm x 20 cm gesetzt. Der große Vorteil bei der Verwendung dieser Box liegt darin, dass auf eine Narkotisierung der Ratten verzichtet werden kann. Die Messgenauigkeit des Ganzkörperzählers wird durch Bewegung gestört. Der Bewegungsradius der Tiere in dieser Box ist aber so gering, dass er die Messung nicht stört. Die Box befindet sich zur Messung auf einer Styroporbrücke im Zentrum des Ganzkörperzählers (siehe Abbildung 9).



Abbildung 9 Ganzkörperzähler offen mit Ratte in Käfig auf Styroporbrücke

Ganzkörper-Retentionsmodell

Zur Bestimmung der biologischen Halbwertszeiten der verschiedenen Chromverbindungen im Rattenorganismus wurde folgendes Rechenmodell verwendet:

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

($100 - a_1 - a_3$: Transportpool; a_1 : Transitpool; a_3 : Speicherpool)

Als Startwerte für die curve-fitting-Software (Slide Write Plus 6.1, Advanced Graphics Software Inc., Encinita, USA) wurden die Daten der CrCl_3 -Retention bei Ratten von Mertz und Mitarbeitern (Mertz, 1965) verwendet. Zur Bestimmung der dritten Halbwertszeit, welche der minimalen Ausscheidung des gespeicherten Chroms entspricht, wurden die zweite und die dritte Komponente der Formel zusammengefasst. Auf diese Weise erhält man eine Unter- und eine Obergrenze, die die Halbwertszeit sicher einschließen. Das Prinzip dieses Rechenmodells zur Bestimmung der biologischen Halbwertszeit von $^{51}\text{Chrom}$ ist aus der Literatur bekannt (Hopkins, 1965; Mertz, 1965; Onkelinx, 1977).

Datenanalyse

Die Daten werden als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. Der Studentsche t-Test für unverbundene Stichproben wurde eingesetzt, um signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen zu ermitteln. Signifikanz wird bei einem $P < 0,05$ angenommen.

Als Curve-fitting Software wurde Slide Write Plus 6.1 (Advanced Graphics Software Inc., Encinita, USA) verwendet.

4 Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurden ^{51}Cr -markierte Verbindungen synthetisiert, charakterisiert und dann im Tierversuch eingesetzt.

4.1 Ergebnisse der Synthese der Chromverbindungen

Die Leitverbindungen dieser Arbeit sind das Chrom-L-Phenylalanin und die Chrompropionsäure, die wie folgt synthetisiert wurden:

Chrom-L-Phenylalanin

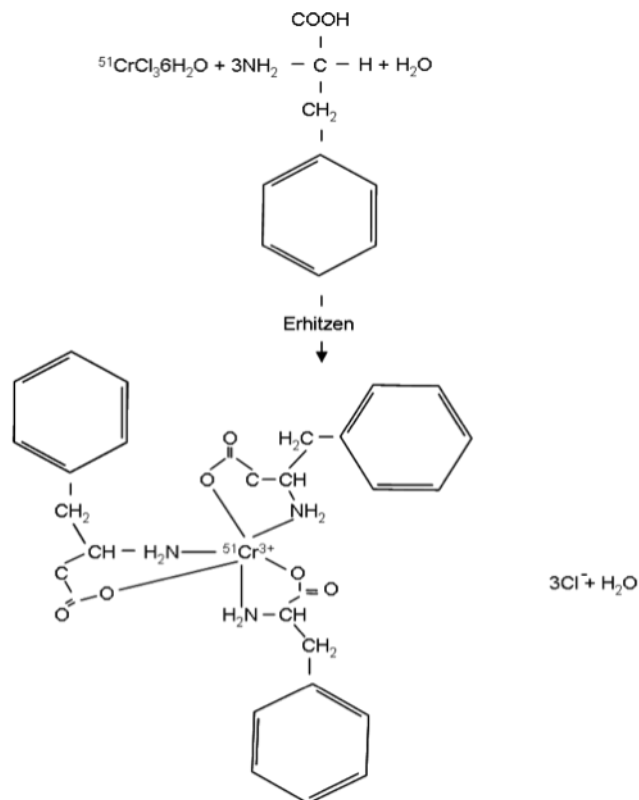


Abbildung 10 Synthese von ^{51}Cr -L-Phenylalanin

Wie alle Nebengruppenelemente ist auch Chrom durch eine mögliche Elektronenbesetzung seiner nur einfach besetzten 3d-Orbitale geprägt. Es weist eine sogenannte Elektronenlücke auf (Elektronenakzeptor) und stellt so eine Lewis-Säure dar. Phenylalanin ist eine Aminosäure, die außer der

typischen Amino- und Carboxylgruppe der Aminosäure auch einen Benzolring enthält. Sowohl die Amino- als auch die Carboxylgruppe besitzen ein freies Elektronenpaar (Elektronendonator) und können so als Lewis-Basen fungieren. Es handelt sich bei der hier synthetisierten Verbindung um eine Metallkomplexverbindung, in der Chrom mit der Koordinationszahl 6 als Zentralion fungiert und mit drei Phenylalaninmolekülen als zweizählige Liganden koordiniert ist. Die dreifach positive Ladung des Chromatoms bleibt bestehen und wird durch drei Chloridionen ausgeglichen.

Chrompropionsäure

Synthese von ^{51}Cr Chromhydroxid:

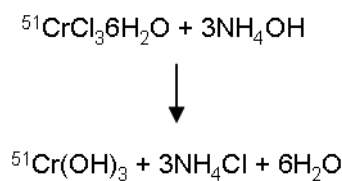


Abbildung 11 Synthese von ^{51}Cr Chromhydroxid

Synthese von ^{51}Cr Triaqua- μ_3 -oxo- μ -hexapropionatotrichromium (III):

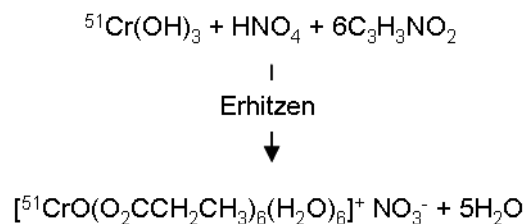


Abbildung 12 Synthese von ^{51}Cr Triaqua- μ_3 -oxo- μ -hexapropionatotrichromium (III)

In Analogie zum Chromphenylalanin handelt es sich bei der Chrompropionsäure auch um eine Metallkomplexverbindung. Abbildung 13 gibt den strukturellen Aufbau der Verbindung wieder. Das Kation gilt als synthetisches Biomimetikum von LMWCr, ist wasserlöslich und säurestabil. Es besteht aus drei Chromatomen, die in einem planaren Dreieck

angeordnet und mit einem zentralen μ_3 -Oxid vernetzt sind. Jeweils zwei Chromatome werden außerdem von zwei carboxylgruppenhaltigen Liganden, der Propionsäure, gebunden. Durch einen weiteren Aquo-Liganden ist jedes Chromatom dann sechsfach koordiniert (Davis, 1997).

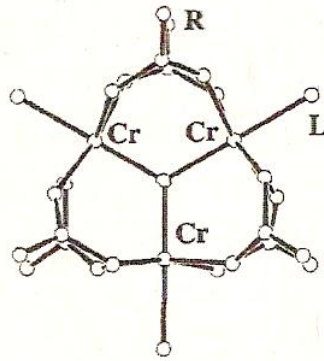


Abbildung 13 Struktur des oxo-centered trinuclear chromium carboxylate cation.
L = H₂O, R = CH₂CH₃ (Davis, 1997)

Ergebnisse der Spektralanalyse

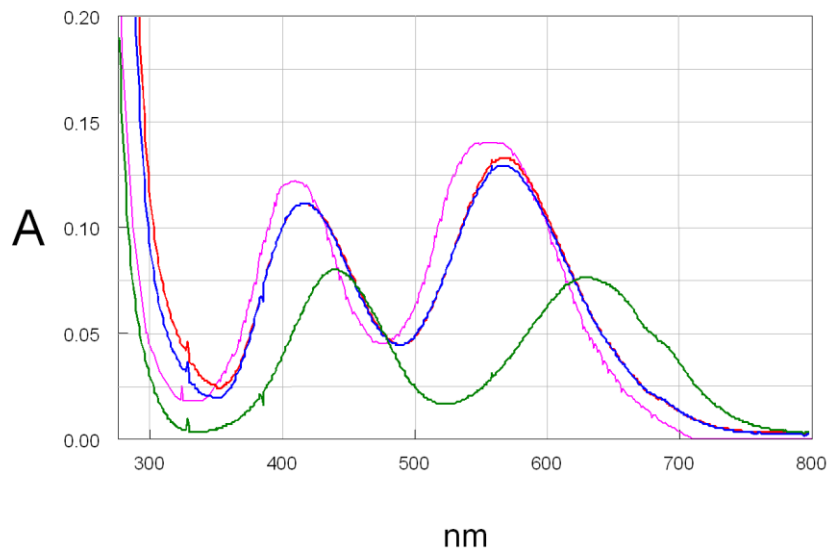
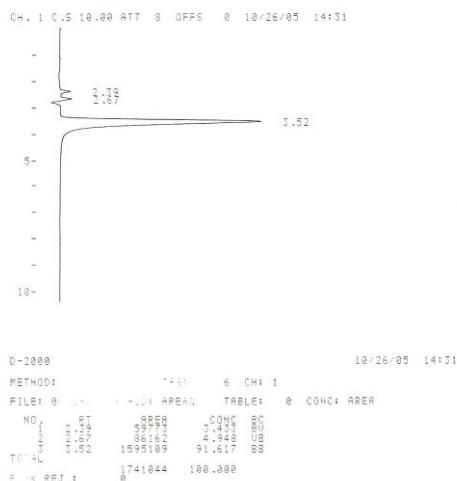


Abbildung 14 UV/VIS-Spektrogramm von Chrom-L-Phenylalanin (–) (Absorptionsmaximum 419 nm), Chrom-D-Phenylalanin (–) (Absorptionsmaximum 419 nm), Chromchlorid (–) (Absorptionsmaximum 454 nm) und Chrompropionat (–) (Absorptionsmaxima 560 nm) in H₂O (pH 4,5)

Chrom-L- und Chrom-D-Phenylalanin haben in der UV/VIS Spektralanalyse identische Eigenschaften. Sowohl Chrom-D-Phenylalanin bzw. Chrom-L-Phenylalanin als auch Chrompropionat zeigen bei einem pH-Wert von 4,5 Absorptionsmaxima im sichtbaren Bereich von etwa 420 und 560 nm. Die Maxima in diesem Bereich sind ein Charakteristikum von Chrom (III) in sogenannter pseudooktahedralear Umgebung (Davis, 1997). Sie entsprechen dem Wellenlängenbereich von gelbem bzw. blauem Licht passend zur grün-blauen Färbung der Chromkomplexe. Das ermittelte Spektrum von Chromphenylalanin stimmt mit den Literaturangaben überein (Yang, 2005).

HPLC-Analysen der Verbindungen

Chrom- L-Phenylalanin



Chrompropionat

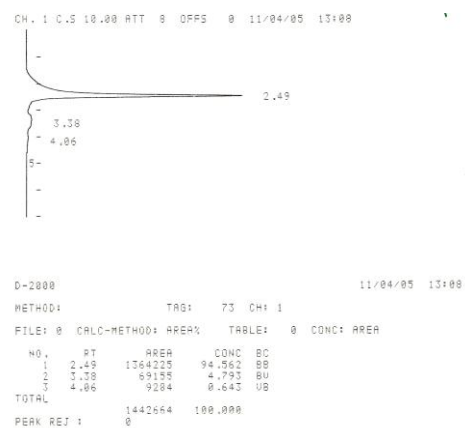


Abbildung 15 Analyse von 30 µl Chrom-L-Phenylalaninlösung bzw. 30 µl Chrompropionatlösung über Lichrocart HPLC Cartridge RP-18.5 µm, Laufmittel Aqua dest./Methanol (50/50), pH 5,5, Durchlaufgeschwindigkeit 0,8 ml/min, Detektion bei 262 nm mit UV-Detektor K-2500 Knauer

Die HPLC-Analyse zeigt ein relativ scharfes Auftrennungsergebnis für beide synthetisierten Verbindungen. Bei Chrom-L-Phenylalanin ist ein deutlicher Hauptpeak bei dreieinhalb Minuten, bei Chrompropionat bei zweieinhalb Minuten zu erkennen. Beide Chromatogramme zeigen nebenbefundlich je zwei kleinere Peaks, die vermutlich Verunreinigungen entsprechen. Die Ergebnisse ließen sich gut reproduzieren.

HPLC-Analyse zur Bestimmung der radiochemischen Reinheit

Um die Ergebnisse der HPLC-Analysen mit den "kalten Verbindungen" zu überprüfen, erfolgte die Analyse der radiochemischen Reinheit von $^{51}\text{Chrom}$ -L-Phenylalanin mittels Umkehrphasenflüssigkeitschromatographie. Dazu wurden 10 μl der gelösten Verbindung in fünf Fraktionen aufgeteilt, deren Aktivität anschließend im Auto- γ -Zähler gemessen wurde. Eine unfraktionierte Probe wurde zum Vergleich gemessen.

$^{51}\text{Chrom}$ -L-Phenylalanin

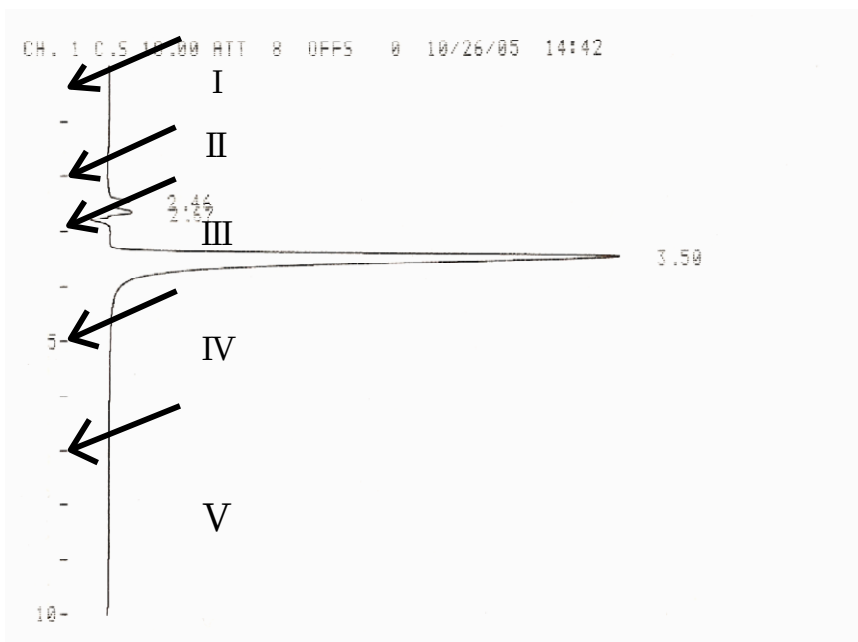


Abbildung 16 Analyse auf radiochemische Reinheit von 10 μl $^{51}\text{Chrom}$ -L-Phenylalaninlösung über LichroCart HPLC Cartridge RP-18.5 μm , Laufmittel Aqua dest./Methanol (50/50), pH 5,5, Durchlaufgeschwindigkeit 0,8 ml/min, Detektion bei 262 nm mit UV-Detektor K-2500 Knauer

Lediglich 25 % der eingesetzten Aktivität finden sich im Eluat, relativ unabhängig vom Hauptpeak, verteilt über die 5 Fraktionen wieder. Eine Messung im Ganzkörperzähler wies die Restaktivität auf der Säule nach. Offenbar ist die Chromverbindung während der Chromatographie zerfallen und das $^{51}\text{Chrom}$ zum größten Teil vom Säulenmaterial adsorbiert worden. Bei dem Hauptpeak in der photometrischen Analyse handelt es sich daher am ehesten um ein Zerfallsprodukt.

4.2 Absorption und Ganzkörperretention verschiedener Chromverbindungen nach oraler Zufuhr

In diesem Versuch wurde die Sieben-Tages-Ganzkörperretention von Chrom aus unterschiedlichen ^{51}Cr -markierten Verbindungen nach oraler Zufuhr untersucht. Nach erfolgreicher Synthese wurde eine Lösung der jeweiligen Chromverbindung mit definierter Chrommenge hergestellt und den Ratten via Schlundsonde verabreicht. Zehn Ratten erhielten ^{51}Cr -L-Phenylalanin ($10\ \mu\text{g Cr}$), fünf ^{51}Cr -Chrompropionsäure ($18\ \mu\text{g Cr}$) und vierzehn ^{51}Cr -Chromchlorid ($0,02\text{-}50\ \mu\text{g Cr}$). Zum Zeitpunkt der Applikation waren die Tiere seit zwölf Stunden nüchtern. Unmittelbar nach der Belastung erfolgte die 100-%-Messung definitionsgemäß zum Zeitpunkt $t = 0$. Nach Ablauf von sieben Tagen wurde die Ganzkörperretention der Ratten gemessen und ins Verhältnis zur 100-%- Messung gesetzt.

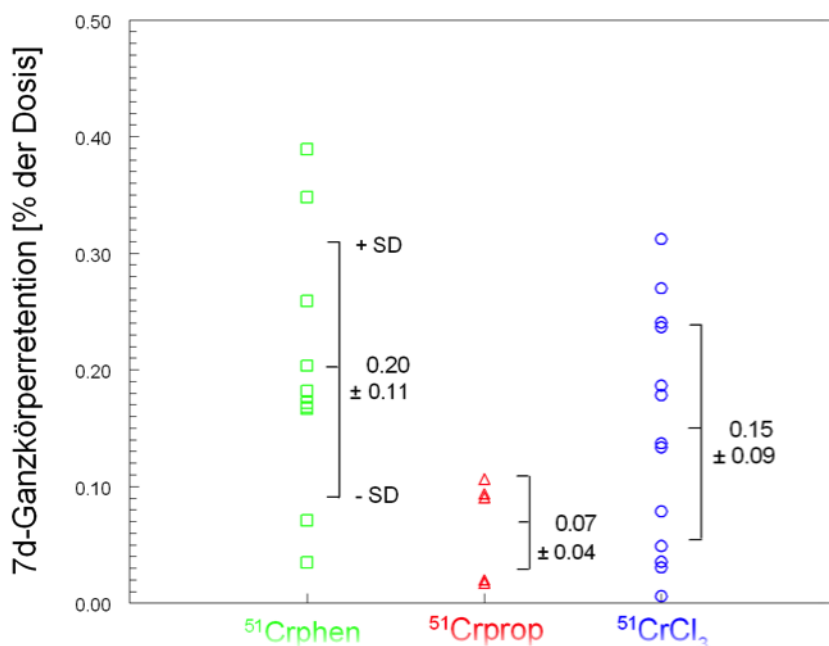


Abbildung 17 Sieben-Tages-Ganzkörperretention von verschiedenen ^{51}Cr -markierten Verbindungen nach einmaliger oraler Applikation von $10\ \mu\text{g Cr}$ in Form von Chromphenylalanin, $18\ \mu\text{g}$ in Form von Chrompropionat und $0,02\text{-}50\ \mu\text{g}$ in Form von Chromchlorid. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen

Nach einem Zeitintervall von 7 Tagen sind bereits mehr als 99 % der applizierten Chromdosis unabhängig von der Verbindung ausgeschieden worden. Chrom-L-Phenylalanin zeigte mit durchschnittlich 0,20 % die größte

7-Tages-Ganzkörperretention, gefolgt von Chromchlorid mit 0,15 %. Die niedrigste Retention hatte die Chrompropionsäure mit durchschnittlich 0,07 %. Die Ergebnisse der 7-Tages-Ganzkörperretentionswerte von Chrom-L-Phenylalanin, Chrompropionsäure und Chromchlorid unterscheiden sich jedoch nicht signifikant.

4.3 Ganzkörperretention von ansteigenden Mengen Chrom nach oraler Gabe

Ziel dieser Untersuchungen war es der Frage nachzugehen, ob ansteigende Mengen Chrom einen Einfluss auf die Ganzkörperretention haben. Eine Tracerdosis ^{51}Cr Chromchlorid wurde mit entsprechenden Mengen von unmarkiertem ("kaltem Chrom") verdünnt. Jeweils zwei Ratten erhielten Lösungen mit definierten Mengen Chromchlorid über eine Schlundsonde.

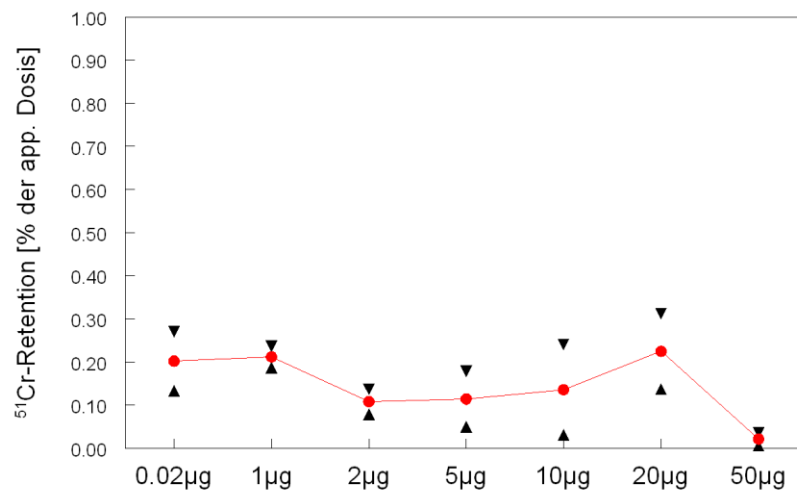


Abbildung 18 Sieben-Tages-Ganzkörperretention aus ansteigenden Mengen Chromchlorid (0,02-50 µg) nach oraler Gabe. Abgebildet sind die Einzelwerte mit entsprechenden Mittelwerten

Die Ergebnisse zeigen im Dosisbereich von 0,02-20 µg eine niedrige und relativ konstante Chromabsorption. Bereits in früheren Untersuchungen an Ratten zeigte sich die Chromabsorption dosisunabhängig.

4.4 Ausscheidung von $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$, $^{51}\text{Chrompropionsäure}$ und $^{51}\text{Chromchlorid}$ nach oraler bzw. intraperitonealer Gabe

In diesem Experiment wurden Daten bezüglich der Ausscheidungswege von Chrom nach Verabreichung von unterschiedlichen $^{51}\text{Chrom}$ -markierten Verbindungen nach oraler bzw. intraperitonealer Zufuhr erhoben. Nach Zufuhr der Verbindungen wurde zunächst die Ganzkörperretention der Tiere bestimmt und als 100%-Messung zum Zeitpunkt $t=0$ festgelegt. Anschließend wurden die Tiere 48 Stunden in Stoffwechselkäfigen gehalten. Durch die Stoffwechselkäfige war es möglich Kot und Urin separat über 48 Stunden zu sammeln. Die Auffangbehälter wurden nach Ablauf von 24 Stunden ausgewechselt. So erhielt man jeweils einen Wert für Kot und Urin über den Zeitraum 0-24 Stunden sowie 24-48 Stunden. Die Aktivität in den Proben wurde im Ganzkörperzähler gemessen, auf den Applikationszeitpunkt ($t=0$) korrigiert und ins Verhältnis zur applizierten Dosis (100 %) gesetzt.

$^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$

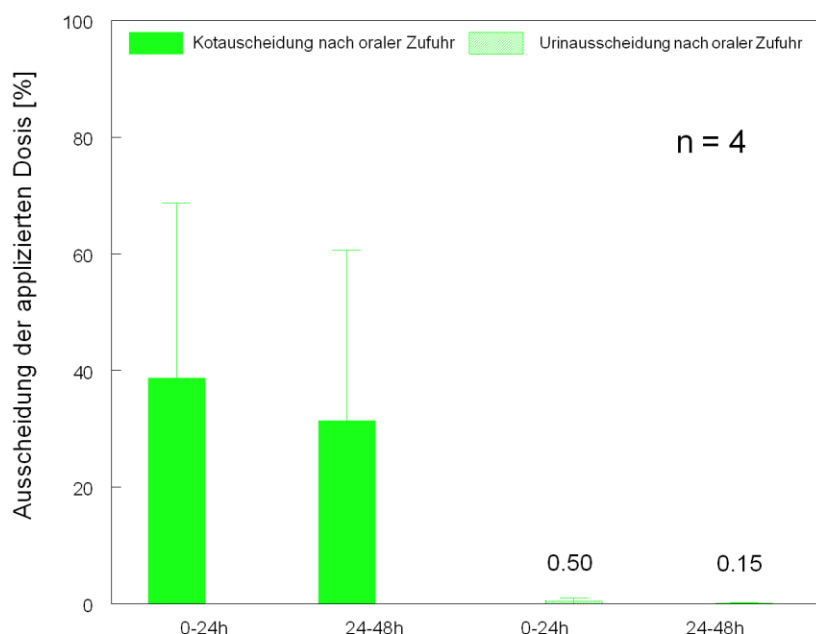


Abbildung 19 Urin- und Kotausscheidung von $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$ (10 μg Chrom) über 48h nach oraler Zufuhr. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 4)

Abbildung 19 zeigt deutlich die überwiegende Ausscheidung der Verbindung über den Stuhl nach oraler Zufuhr. Innerhalb der ersten 48 Stunden finden sich im Mittel etwa 70 % der verabreichten Aktivität im Stuhl wieder. Die Urinausscheidung liegt nach Ablauf von 24 Stunden bei 0,50 % und fällt dann innerhalb der nächsten 24 Stunden auf 0,15 % ab. Damit ergibt sich eine Gesamtausscheidung mit dem Urin von 0,65 % der applizierten Aktivität innerhalb von 48 Stunden. Durch Addition der 48-Stunden-Urinausscheidung und der 48-Stunden-Ganzkörperretention ergibt sich eine Absorption von 0,85 % für $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$.

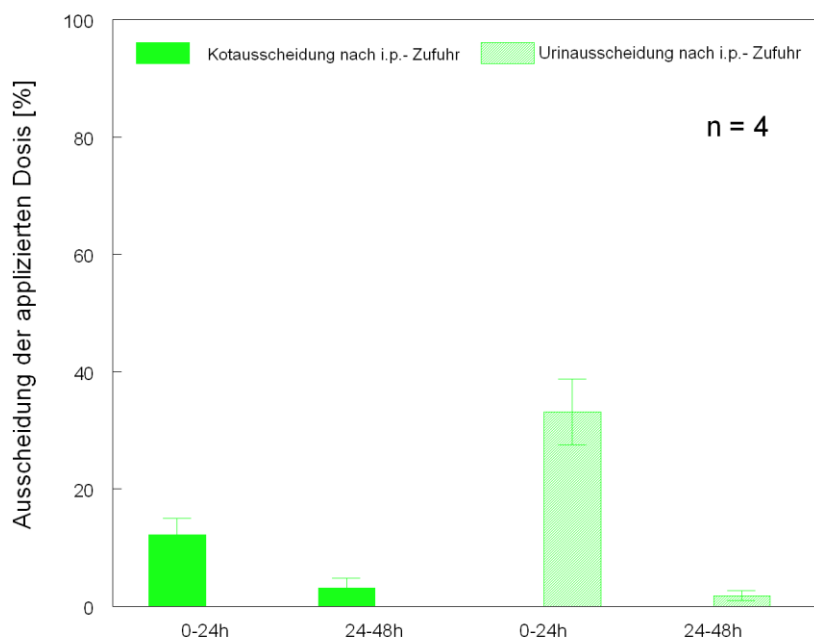


Abbildung 20 Urin- und Kotausscheidung von $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$ (5 μg Chrom) über 48 h nach intraperitonealer Zufuhr. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 4)

Nach intraperitonealer Gabe von $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$ kommt es zu einer überwiegend renalen Ausscheidung von Chrom. Es werden binnen 48 Stunden etwa 35 % der Gesamtaktivität über den Urin abgegeben, davon 33 % bereits innerhalb der ersten 24 Stunden. Weiterhin werden etwa 15 % der Gesamtaktivität biliär eliminiert. Innerhalb der ersten 24 Stunden erscheinen 12 %, nach 48 Stunden 15 % der Aktivität im Kot. Die Ergebnisse der Ganzkörperretentionsmessung nach 48 Stunden von

Chrom-L-Phenylalanin stimmen, unter Berücksichtigung von Messungenauigkeiten, mit denen der Stoffwechselkäfigversuche überein.

⁵¹Chrompropionat

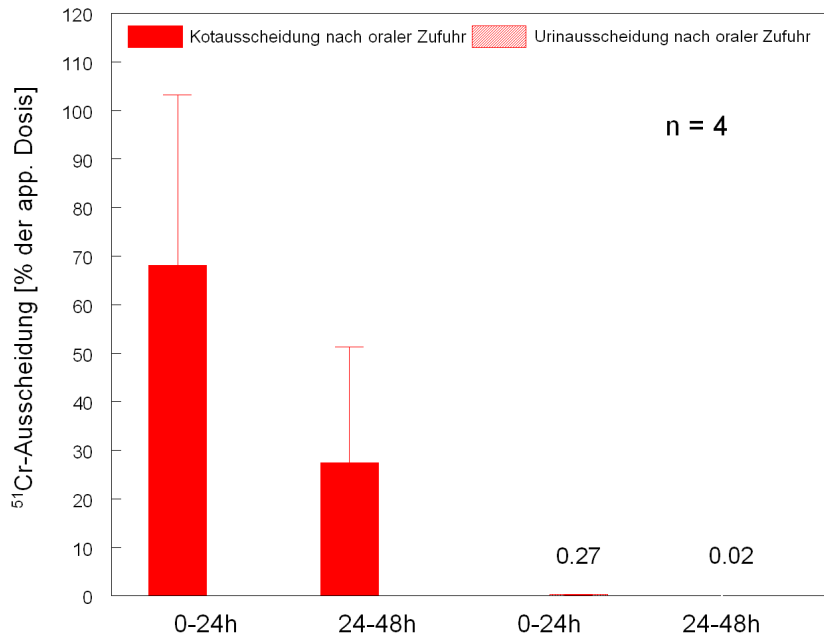


Abbildung 21 Kot- und Urinausscheidung von ⁵¹Chrompropionat (18 µg) über 48 h nach oraler Zufuhr. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (n = 4)

Auch die orale Zufuhr von ⁵¹Chrompropionsäure führt zu der überwiegenden Eliminierung der Aktivität über den Stuhl. Sie beträgt nach Ablauf von 48 Stunden etwa 95 %. Die Ausscheidung über den Urin ist, wie typischerweise nach oraler Applikation, mit 0,29 % gering und liegt damit noch deutlich unter der mit dem Urin ausgeschiedenen Menge von ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin. Diese Beobachtung stimmt gut mit der beobachteten niedrigeren Ganzkörperretention von ⁵¹Chrompropionat im Vergleich zu ⁵¹Chromphenylalanin überein. Für Chrompropionat errechnet sich eine Absorption von 0,36 %.

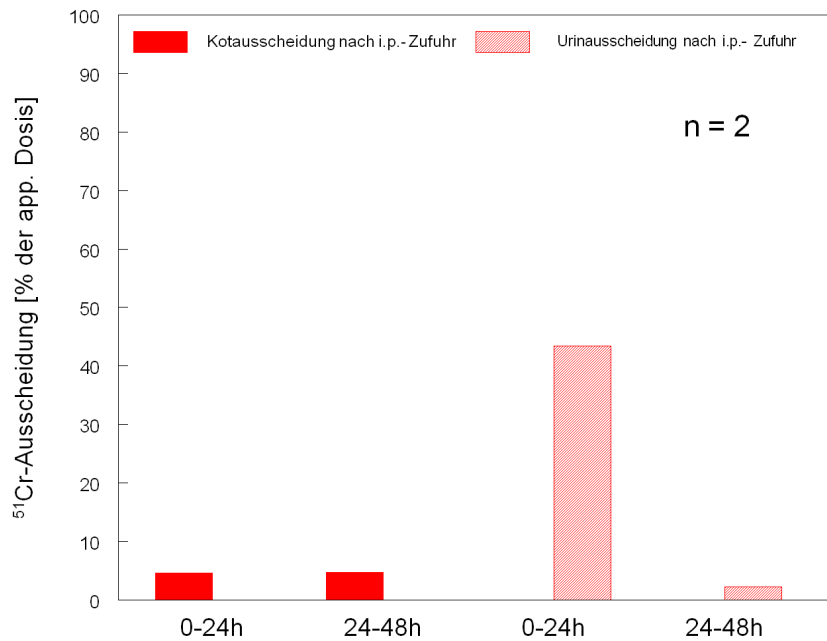


Abbildung 22 Kot- und Urinausscheidung von ^{51}Cr Chrompropionat (20 µg) über 48 h nach intraperitonealer Zufuhr. Dargestellt sind Mittelwerte (n = 2)

Nach intraperitonealer Gabe von ^{51}Cr Chrompropionat zeigte sich erneut, dass der überwiegende Anteil von 46 % des ^{51}Cr Chroms innerhalb von 48 Stunden renal eliminiert wurde. Bereits nach 24 Stunden erschienen 43 % der ^{51}Cr Chromdosis im Urin. Aber auch im Kot konnten 10 % der zugeführten Aktivität gleichmäßig verteilt über 48 Stunden wieder gefunden werden. Diese Ergebnisse korrelieren gut mit der nach 48 Stunden gemessenen Ganzkörperretention (siehe Abbildung 25). So sind zu diesem Zeitpunkt noch fast 40 % der Aktivität in der Ratte vorhanden.

^{51}Cr Chromchlorid

Nach oraler Applikation von Chromchlorid erreicht die fäkale Ausscheidung innerhalb der ersten 24 Stunden bereits 90 %. Nach Ablauf von 48 Stunden sind mehr als 98 % des ^{51}Cr Chroms aus dem zugeführten ^{51}Cr Chromchlorid ausgeschieden worden. Renal werden insgesamt etwa 0,36 % der Aktivität eliminiert. Es errechnet sich eine Absorption von 0,51 %.

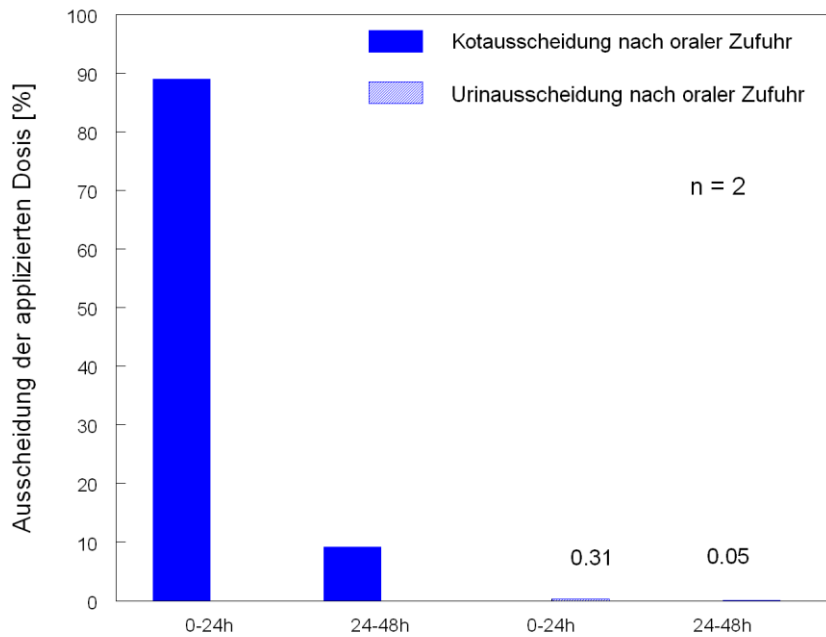


Abbildung 23 Kot- und Urinausscheidung von ⁵¹Chromchlorid (10 µg Chrom) über 48 h nach oraler Gabe. Dargestellt sind Mittelwerte (n = 2)

Tabelle 3 fasst die Ergebnisse der Untersuchungen mit den Stoffwechselfähigen und der 7-Tagesganzkörperretention abschließend zusammen.

| | n | Cr(PA) ₃ [%] | n | CrProp [%] | n | CrCl ₃ [%] |
|--------------------------|----|-------------------------|---|-------------|----|-----------------------|
| Orale Applikation | | | | | | |
| 7d-Ganzkörperretention | 10 | 0,20± 0,11 | 5 | 0,07± 0,04 | 14 | 0,15± 0,09 |
| 2d-Urinausscheidung | 4 | 0,65± 0,50 | 4 | 0,29± 0,12 | 2 | 0,36* |
| 2d-Kotausscheidung | 4 | 70,11±17,11 | 4 | 94,60±15,02 | 2 | 98,21* |
| i.p. Applikation | | | | | | |
| 7d-Ganzkörperretention | 4 | 30,24± 4,51 | 2 | 30,53* | | |
| 2d-Urinausscheidung | 4 | 34,89± 6,02 | 2 | 45,58* | | |
| 2d-Kotausscheidung | 4 | 14,21± 2,88 | 2 | 9,31* | | |

Tabelle 3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Ganzkörperretention und der Ausscheidung von ⁵¹Chromphenylalanin, ⁵¹Chrompropionat und ⁵¹Chromchlorid. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen. * Mittelwert aus 2 Tieren

4.5 Ganzkörperretentionsverlauf verschiedener Chromverbindungen nach intraperitonealer Gabe

Chrom-L-Phenylalanin

Eine Gruppe von vier Ratten erhielt eine intraperitoneale Injektion einer ^{51}Cr -L-Phenylalanin-Lösung. Unmittelbar nach Applikation erfolgte die 100%-Ganzkörpermessung der Tiere. Über einen Zeitraum von 60 Tagen wurde die Ganzkörperretention verfolgt und im Verhältnis zur 100%-Messung bestimmt.

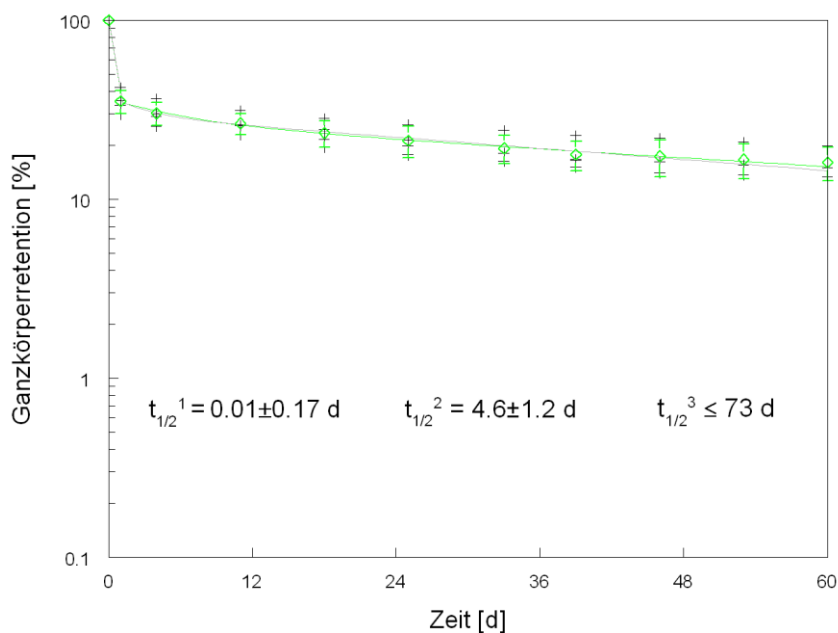


Abbildung 24 Verlauf der ^{51}Cr -Ganzkörperretention von Ratten ($n = 4$) nach intraperitonealer Zufuhr von ^{51}Cr Chromphenylalanin ($5 \mu\text{g}$ Chrom). Dargestellt sind die Einzelwerte (+), Mittelwerte (\diamond) mit Standardabweichungen (\perp) und Ganzkörperretentionskurven (oberer Grenzwert = grün, unterer Grenzwert = grau)

Wie aus der Abbildung 24 ersichtlich, beträgt die Ganzkörperretention nach Ablauf von 48 Stunden nur noch durchschnittlich 35 %. Auch die Versuche mit den Stoffwechselkäfigen zeigten eine Elimination von nahezu 50 % der applizierten Aktivität binnen 48 Stunden über Urin und Fäzes. Der Verlust des absorbierten Chroms ist in den folgenden Tagen deutlich geringer. Nach 60 Tagen hat die Ratte durchschnittlich 15 % des zugeführten Chroms retiniert. Mit Hilfe der graphischen Analyse lassen sich die Halbwertszeiten, mit denen Chrom aus dem Rattenorganismus eliminiert wird, bestimmen. Es

ergibt sich eine kurze Halbwertszeit von 0,01 Tagen, eine mittlere Halbwertszeit von 4,6 Tagen und eine lange Halbwertszeit, die auf 58 bis 73 Tage eingegrenzt werden kann.

Chrompropionat

Analog zu dem Versuch mit ^{51}Cr -L-Phenylalanin wurde mit ^{51}Cr Chrompropionat verfahren. Die Messung der Ganzkörperretention von 2 Ratten erfolgte über 50 Tage.

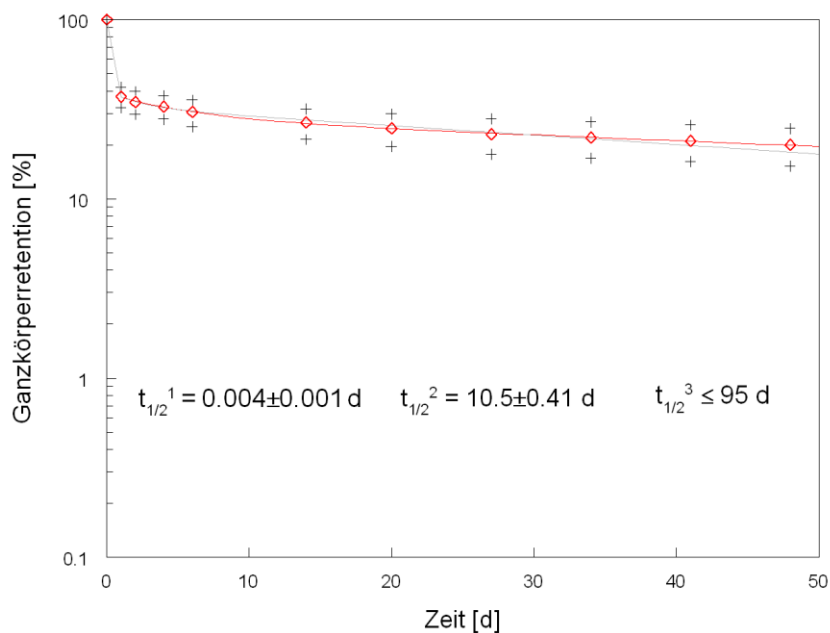


Abbildung 25 Verlauf der ^{51}Cr -Ganzkörperretention von Ratten ($n = 2$) nach intraperitonealer Zufuhr von ^{51}Cr Chrompropionat ($20 \mu\text{g}$ Chrom). Dargestellt sind die Einzelwerte (+), Mittelwerte (\diamond) und Ganzkörperretentionskurven (oberer Grenzwert = rot, unterer Grenzwert = grau)

Auch die Ganzkörperretentionskurve von ^{51}Cr Chrompropionat zeigte zu Beginn einen starken Abfall auf 35 % innerhalb von 48 Stunden. Gleichzeitig konnten etwa 55 % der applizierten Aktivität in Stuhl und Urin wiedergefunden werden. In der Folge unterliegt die Chromausscheidung einer deutlich langsameren Kinetik. Nach 50 Tagen enthalten die Tiere noch durchschnittlich 20 % der applizierten Aktivität. Die errechneten Halbwertszeiten betragen 0,004 d, 10,5 d und ≤ 95 d.

Chromchlorid

In diesem Versuch wurde neben dem Verlauf der Ganzkörperretention nach intraperitonealer Gabe von Chromchlorid der Effekt von ansteigenden Mengen Chrom, mit und ohne vorherige orale Zufuhr von Eisensulfat, auf die Ganzkörperretention untersucht. Jeweils vier Ratten erhielten dafür Lösungen mit definierten Mengen Chromchlorid (0,02 µg Cr, 1 µg Cr, 2 µg Cr und 5 µg Cr) intraperitoneal appliziert, wovon jeweils zwei Ratten pro Dosis bereits zwei Stunden vor der Applikation der Chromchloridlösungen eine Eisensulfatlösung oral per Schlundsonde erhielten. Die Ganzkörperretention wurde anschließend über einen Zeitraum von 40 Tagen verfolgt.

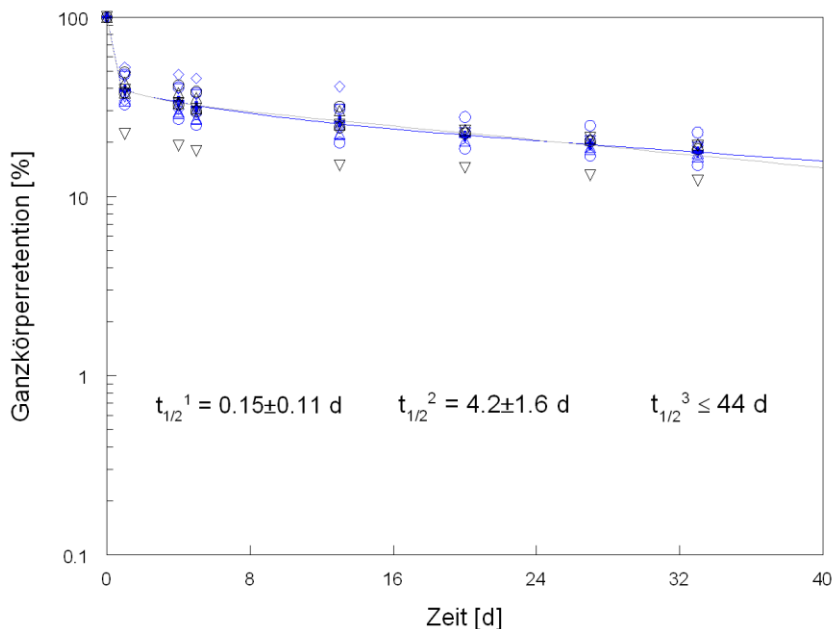


Abbildung 26 Verlauf der ^{51}Cr -Ganzkörperretention von Ratten ($n = 14$) nach intraperitonealer Zufuhr von $^{51}\text{Chromchlorid}$ (0,02-5 µg Cr). Dargestellt sind die Einzelwerte (0,02 µg Cr ohne Fe (○), 1 µg Cr ohne Fe (◇), 2 µg Cr ohne Fe (Δ), 5 µg Cr ohne Fe (□), 0,02 µg Cr mit Fe (◊), 1 µg Cr mit Fe (◊), 2 µg Cr mit Fe (Δ), Mittelwerte (+) mit Standardabweichung (⊥) und die Ganzkörperretentionskurven (oberer Grenzwert = blau, unterer Grenzwert = grau)

Die Eliminationskinetik ähnelt denen von Chromphenylalanin und Chrompropionat. Nach zwei Tagen sind durchschnittlich 60 % der Aktivität ausgeschieden worden. Damit erfolgt die Chromausscheidung nach der Chromchloridzufuhr initial etwas langsamer als bei den beiden zuvor

beschriebenen Verbindungen, was die größere erste Halbwertszeit (0,15 d) widerspiegelt. In der Folge beschleunigt sich die Ausscheidung dann aber, sodass sich nach 34 d mit 20 % ein identischer Retentionswert im Vergleich zu den anderen Verbindungen einstellt. Die drei Halbwertszeiten für Chromchlorid betragen 0,15 d, 4,2 d und ≤ 44 d.

Es ergeben sich keine signifikanten Unterschiede der Ganzkörperretention nach 34 Tagen mit oder ohne vorherige Verabreichung von Eisensulfat. Verfolgt man die Ganzkörperretention von Chromchlorid nach intraperitonealer Zufuhr über 34 Tage, so fällt auf, dass die verabreichten Mengen zu ähnlichen Aktivitäten in allen Tieren geführt haben. Die Unterschiede bezüglich der Ganzkörperretention gleichen sich im Verlauf der Zeit immer mehr an und pendeln sich im Bereich von 19 % ein. Lediglich die 0,02 μg Dosis ohne vorherige Eisensulfatgabe und die 1 μg Dosis mit vorheriger Eisensulfatgabe weichen stärker ab.

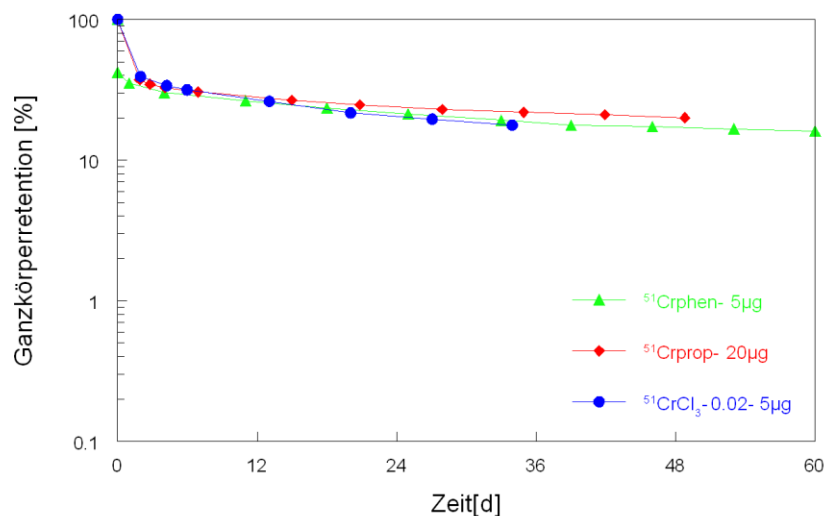


Abbildung 27 Verlauf der ^{51}Cr -Ganzkörperretention nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$, $^{51}\text{Chrompropionat}$ und $^{51}\text{Chromchlorid}$ in Ratten. Dargestellt sind die Mittelwerte aus Gruppen von 2 bis 14 Tieren

In Abbildung 27 sind die Mittelwerte der Ganzkörperretentionskinetiken von $^{51}\text{Chrom-L-Phenylalanin}$, $^{51}\text{Chrompropionat}$ und $^{51}\text{Chromchlorid}$ gegeneinander aufgetragen. Im Verlauf nähern sich die

Ganzkörperretentionswerte der einzelnen Verbindungen immer mehr an. Die Metabolisierung der einzelnen Verbindungen scheint identischen Gesetzmäßigkeiten zu unterliegen. Diese Tendenz bestätigen auch die errechneten Halbwertszeiten der verschiedenen Verbindungen und die dazugehörigen Poolgrößen, die in Tabelle 4 abschließend zusammengefasst werden.

| [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) |
| Cr Phenylalanin i.p. | 64 | 0,01 ± 0,17 | 9,56 ± 1,15 | 4,6 ± 1,2 | 26,85 ± 0,43 | 58 < T _{1/2} ≤ 73 |
| Cr Propionat i.p. | 61 | 0,004 ± 0,001 | 10,5 ± 0,41 | 3,9 ± 0,4 | 28,23 ± 0,19 | 57 < T _{1/2} ≤ 95 |
| CrCl ₃ i.p. | 59 | 0,15 ± 0,11 | 11,0 ± 2,64 | 4,2 ± 1,6 | 29,63 ± 0,48 | 31 < T _{1/2} ≤ 44 |

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

4.6 Organverteilung von $^{51}\text{Chromchlorid}$ über 7 Tage

Dieses Experiment untersucht die Organverteilung von $^{51}\text{Chrom}$ über einen Zeitraum von 7 Tagen nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chrom}_2\text{-Transferrin}$. Nach in vitro Inkubation von heterologem Rattenserum mit $^{51}\text{Chromchlorid}$ erfolgte die intraperitoneale Injektion eines Aliquots mit einem Chromgehalt von $0,006\ \mu\text{g}$. Nach Ablauf von festgelegten Zeitintervallen (2 h, 4 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 168 h) wurden die Tiere getötet und die Organverteilung gemessen. Die Gesamtaktivität (100 %) ergab sich durch Aufaddieren der Einzelaktivitäten der Gewebe zum Todeszeitpunkt.

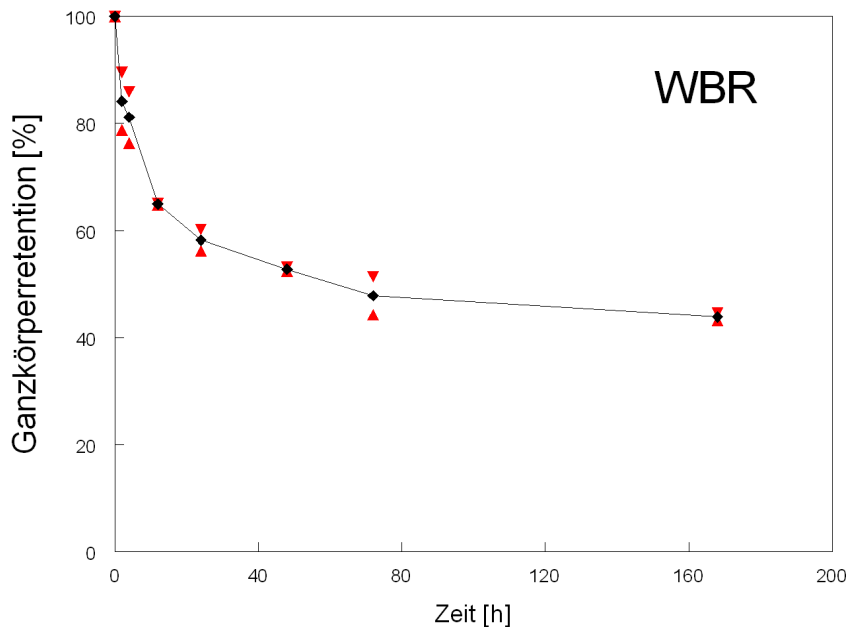


Abbildung 28 Ganzkörperretentionsverlauf nach i.p Applikation von $^{51}\text{Chromchlorid}$ ($0,006\ \mu\text{g}$ $^{51}\text{Chrom}$) inkubiertem heterologem Rattenserum. Dargestellt sind Einzel- und Mittelwerte von 2 Tieren

Nach Ablauf von 7 Tagen sind noch immer durchschnittlich 42 % der Gesamtaktivität im Rattenkörper vorhanden. Der größte Anteil der Chromausscheidung vollzieht sich innerhalb der ersten 12 Stunden, in denen knapp 40 % verloren gehen. Im Vergleich zur Ganzkörperretentionskurve von intraperitoneal gegebener $^{51}\text{Chromchlorid}$ mit etwa 30 % Ganzkörperretention nach 7 Tagen (vergleiche Abb. 26) ergibt sich also, dass bei direkter Gabe von mutmaßlich

proteingebundenem Chrom etwa 12 % mehr $^{51}\text{Chrom}$ retiniert wurden. Die Retentionskurve zeigt den typischen Verlauf intraperitoneal applizierter Verbindungen (siehe Kapitel 4.5).

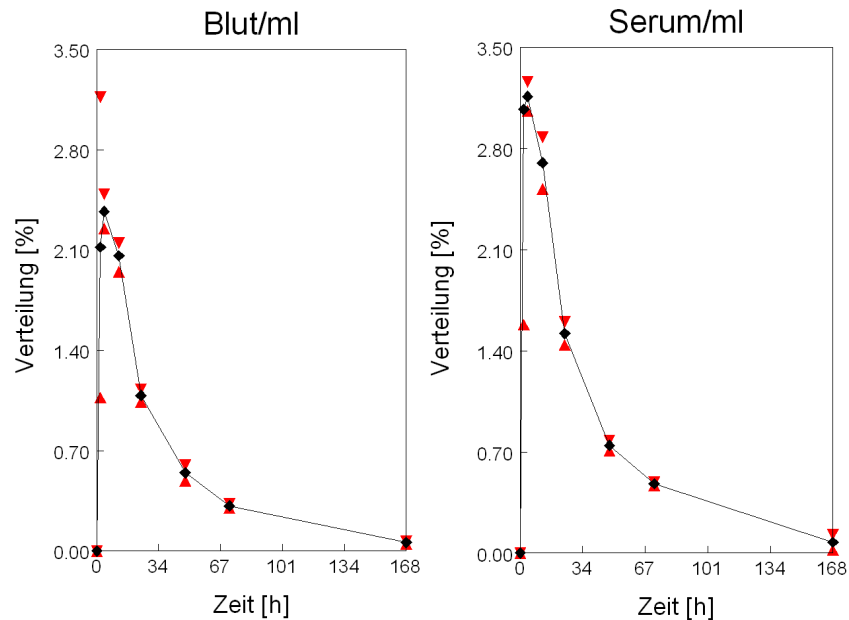


Abbildung 29 Verlauf $^{51}\text{Chrom}$ -Verteilung nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chromchlorid}$ ($0,006 \mu\text{g } ^{51}\text{Chrom}$) inkubiertem heterologem Rattenserum in Vollblut und Serum. Dargestellt sind Einzel- und Mittelwerte von 2 Tieren

Im Blut erkennt man das schnelle Anfluten der Aktivität, die nach 4 Stunden ihr Maximum erreicht hat. Im Vollblut findet sich zu diesem Zeitpunkt 2,5 %, im Serum 3 % der Gesamtaktivität pro Milliliter. Das Blutvolumen der Ratte entspricht etwa 6 % des Gesamtkörpergewichtes. Die hier untersuchten Ratten wogen zum Untersuchungszeitpunkt durchschnittlich 300 g und hatten daher nach 4 Stunden etwa 45 % der gemessenen Gesamtaktivität im Blut. In der Folgezeit sank die Aktivität im Blut und im Serum kontinuierlich ab und war nach 168 Stunden fast bis auf null abgefallen.

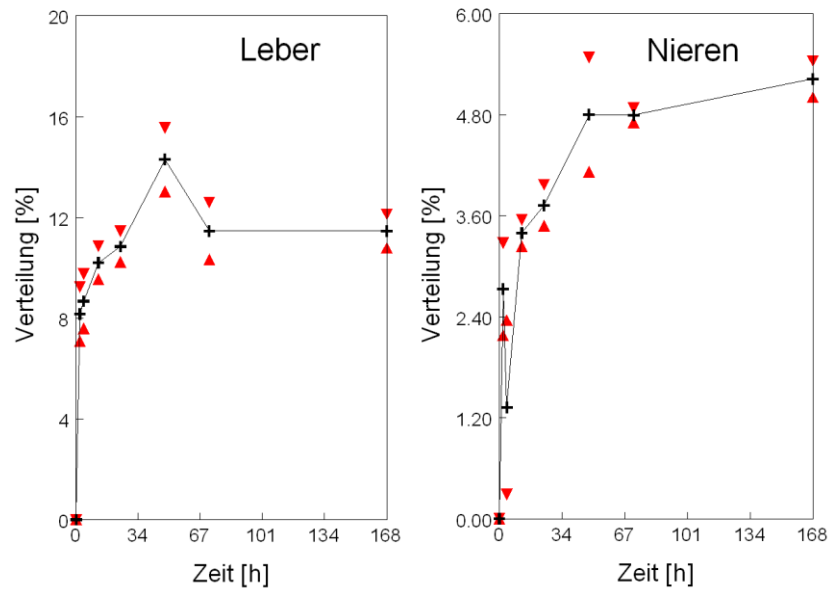


Abbildung 30 Verlauf $^{51}\text{Chrom}$ -Verteilung nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chromchlorid}$ ($0,006 \mu\text{g } ^{51}\text{Chrom}$) inkubiertem heterologem Rattenserum in Leber und Nieren. Dargestellt sind Einzel- und Mittelwerte von 2 Tieren

In der Leber kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg der Aktivität bis auf einen Gipfel nach 48 Stunden. Anschließend erfolgt ein Abfall der Gesamtmenge der Aktivität, die sich nach 72 Stunden auf einem hohen Niveau von 11 % einstellt. Dieser Wert bleibt bis zum Ablauf von 168 Stunden konstant. Die Verteilungskurve der Niere zeigt einen zweigipfeligen Verlauf. Bereits nach 2 Stunden ist der erste Gipfel erreicht. Innerhalb der nächsten 2 Stunden kommt es zu einem deutlichen Abfall, vermutlich durch die beginnende Chromausscheidung mit dem Urin bedingt. Anschließend steigt die Aktivität der Nieren wieder an. Die Nieren enthalten nach 168 Stunden 5 % der Gesamtaktivität des Rattenkörpers und damit auch etwa 5 % des verabreichten Chrms.

Fettgewebe, Muskulatur und Gehirn zeigen eine ähnliche Kinetik. Es kommt zunächst zu einem steilen Anstieg der Aktivität, die ihren Höchstwert nach 2 Stunden in der Muskulatur bzw. nach 4 Stunden in Fett und Gehirn erreicht. Alle Kurven zeigen in der Folge einen steilen Aktivitätsabfall in den Geweben, der sich nach einem mehr oder weniger großen zwischenzeitlichen Ausschlag nach oben dann auf einem niedrigen Wert

stabilisiert (Muskulatur 0,1 %, Fettgewebe 0,2 % und Gehirn 0,1 %). Bei einer 300 g schweren Ratte besteht das Körpergewicht zu 30 % aus Muskulatur, folglich errechnet sich ein Gesamtwert von 9 % der Gesamtaktivität bzw. der Chromdosis, den die Muskulatur nach Ablauf von 7 Tagen enthält.

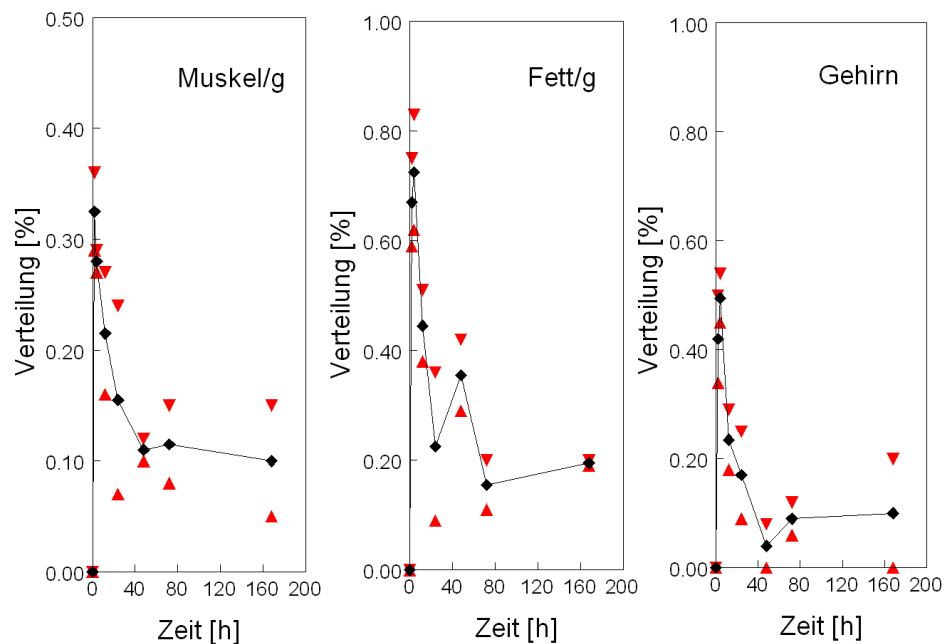


Abbildung 31 Verlauf $^{51}\text{Chrom}$ -Verteilung nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chromchlorid}$ ($0,006 \mu\text{g } ^{51}\text{Chrom}$) inkubiertem heterologem Rattenserum in Muskulatur, Fett und Gehirn. Dargestellt sind Einzel- und Mittelwerte von 2 Tieren

Die Abbildung zum Gastrointestinaltrakt (GIT) (Abb. 32) fasst Bauchspeicheldrüse, Magen, Dünndarm und Dickdarm zusammen. Der überwiegende Anteil des GIT liegt intraperitoneal. Bereits nach 2 Stunden zeigt der GIT den höchsten Chromgehalt im Verlauf, nach 168 Stunden hat dieser seinen Tiefpunkt erreicht. Auch die Milz gehört zu den intraperitoneal gelegenen Organen. Bis zur 48ten Stunde steigt ihr Chromgehalt und stabilisiert sich von dort an im Bereich um 2,2 %.

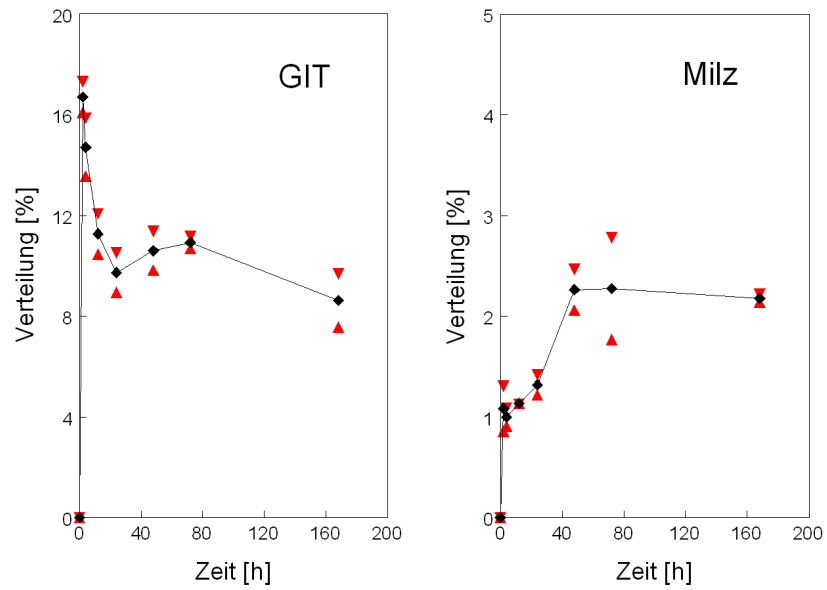


Abbildung 32 Verlauf $^{51}\text{Chrom}$ -Organverteilung nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chromchlorid}$ ($0,006 \mu\text{g } ^{51}\text{Chrom}$) inkubiertem heterologem Rattenserum in Gastrointestinaltrakt (GIT) und Milz. Dargestellt sind Einzel- und Mittelwerte von 2 Tieren

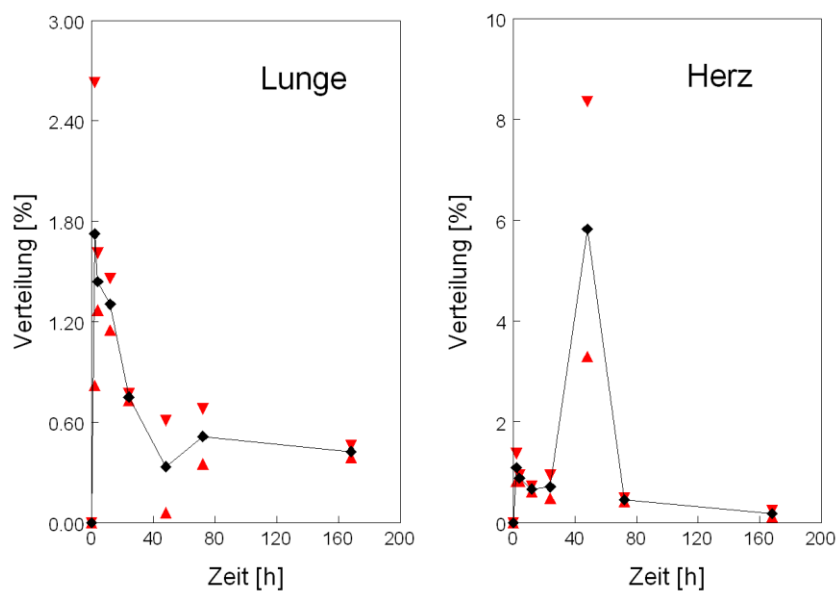


Abbildung 33 Verlauf $^{51}\text{Chrom}$ -Organverteilung nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chromchlorid}$ ($0,006 \mu\text{g } ^{51}\text{Chrom}$) inkubiertem heterologem Rattenserum in Lunge und Herz. Dargestellt sind Einzel- und Mittelwerte von 2 Tieren.

Die zentralen Kreislauforgane Lunge und Herz zeigen zunächst einen Anstieg des radioaktiven Chromgehaltes auf 1,7 % bzw. 1 % der Gesamtmenge, der nach 168 Stunden auf 0,4 % bzw. 0,2 % abfällt.

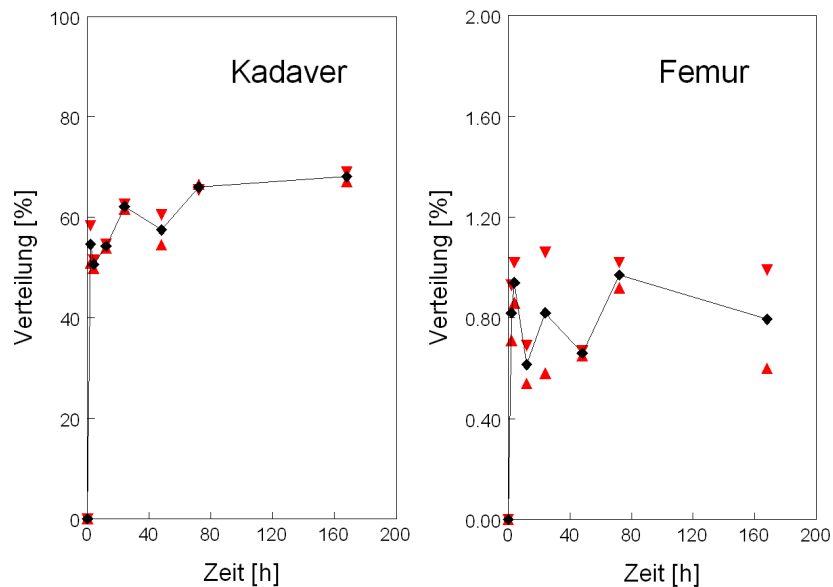


Abbildung 34 Verlauf ⁵¹Chrom-Organverteilung nach intraperitonealer Applikation von ⁵¹Chromchlorid (0,006 µg ⁵¹Chrom) inkubiertem heterologen Rattenserum in Kadaver und Femur. Dargestellt sind Einzel- und Mittelwerte von 2 Tieren

Der Kadaver besteht überwiegend aus Muskulatur, Knochen, Fett, Fell und Blut. Dazu gehört auch der kontralaterale Femur. Es besteht folglich eine strukturelle Verbindung der beiden Kinetiken. Sowohl Kadaver als auch Femur zeigen im Verlauf drei vorübergehende Spitzenwerte des Chromgehaltes. Der Kadaver hat über den gesamten Messzeitraum den höchsten Chromgehalt aller untersuchten Strukturen. Nach 168 Stunden ist der Chromgehalt des Kadavers maximal. Der Chromgehalt des Femurs sinkt zum Ende nochmals auf 0,8 % ab.

4.7 Chromatographische Suche nach chrombindenden Serumproteinen

In vitro Inkubation von Rattenserum mit ^{51}Cr -L-Phenylalanin

Bei diesem Versuch wurden 200 μl Rattenserum mit 3 μl ^{51}Cr -L-Phenylalanin-Lösung (10 μg Cr) bzw. 29 μl ^{51}Cr -Chromchlorid-Lösung (0,03 μg ^{51}Cr) eine Stunde im Thermoblock bei 37 °C inkubiert. Auf diese Weise können Serumproteine unter annähernd physiologischen Bedingungen Chrom binden. Anschließend wurden 25 μl der unterschiedlichen Ansätze mit Ionenaustausch- bzw. Molekularsiebchromatographie getrennt. Das Eluat wurde in Fraktionen über zwei Minuten gesammelt. Bei einer Gesamtlaufzeit von 45 Minuten ergaben sich 23 Fraktionen. Die Angabe der Aktivität der einzelnen Fraktionen erfolgt im Verhältnis zur Aktivität eines nicht fraktionierten Serumaliquots gleichen Volumens.

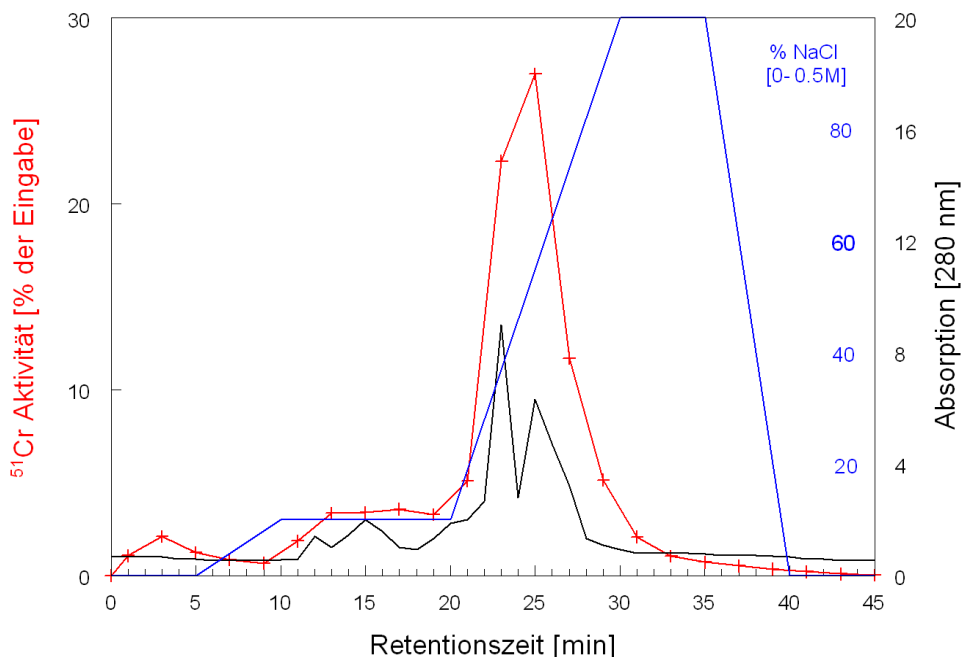


Abbildung 35 Chromatographische Trennung von 25 μl Rattenserum (1,25 μg Chrom) nach in vitro Inkubation von 200 μl Rattenserum mit ^{51}Cr -L-Phenylalanin (10 μg Chrom) über Mono-Q-Säule, bei 280 nm

Die Proteintrennung der mit ^{51}Cr -L-Phenylalanin inkubierten Serumprobe mit Ionenaustauschchromatographie zeigte eine unscharfe Verteilung der Aktivität. Ein erster kleiner Peak erscheint bereits nach 3 Minuten im Eluat.

Es folgen ein weiterer breiter Peak zwischen 12 und 17 Minuten sowie ein großer Peak mit Höchstwert nach 25 Minuten. Der erste Peak taucht bereits ohne Salzgradient auf, beim zweiten Peak liegt eine Salzkonzentration von 10 % vor. Der größte Peak beginnt bei einem Salzgradienten von 20 % (= 0,1 Mol NaCl) und erreicht sein Maximum bei ca. 50 % (= 0,25 Mol NaCl).

In vitro Inkubation von Rattenserum mit ^{51}Cr Chromchlorid

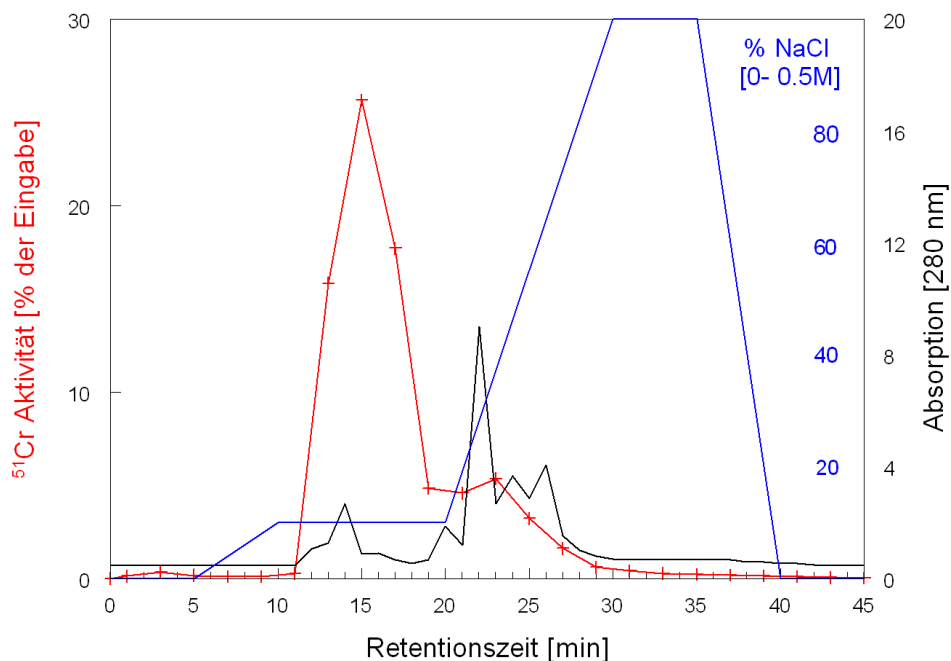


Abbildung 36 Chromatographische Trennung von 25 µl Rattenserum (0,0038 µg ^{51}Cr) nach in vitro Inkubation von 200 µl Rattenserum mit einer Tracerdosis ^{51}Cr Chromchlorid (0,03 µg ^{51}Cr) über Mono-Q-Säule, bei 280 nm

Nimmt man die in vitro Inkubation des Serums mit einer Tracerdosis ^{51}Cr Chromchlorid vor, zeigt die Ionenaustauschchromatographie ein verändertes Bild. Die Verhältnisse scheinen sich genau umzudrehen. Der überwiegende Anteil der Aktivität konzentriert sich dabei auf den Peak nach 15 Minuten. Ein zweiter deutlich kleinerer Gipfel erscheint in der Chromatographie nach 23 Minuten. Der zweite Peak entspricht in etwa dem Konzentrationsmaximum der Chromatographie des Chrom-L-Phenylalaninansatzes. Ein winziger Ausschlag findet sich nach Ablauf von 3 Minuten analog zu dem Chrom-L-Phenylalaninchromatogramm. Insgesamt

konzentriert sich die Verteilung der Aktivität auf den Bereich zwischen 10 und 30 Minuten.

In vivo Inkubation mit ^{51}Cr -L-Phenylalanin

Zum Vergleich wurden 20 μl ^{51}Cr -L-Phenylalaninlösung (68 μg Chrom) mit 100 μl destilliertem Wasser verdünnt und einer Ratte intraperitoneal appliziert. Nach Ablauf von 24 Stunden erfolgte die Auftrennung von 25 μl des Rattenserums unter gleichen Bedingungen wie nach in vitro Inkubation.

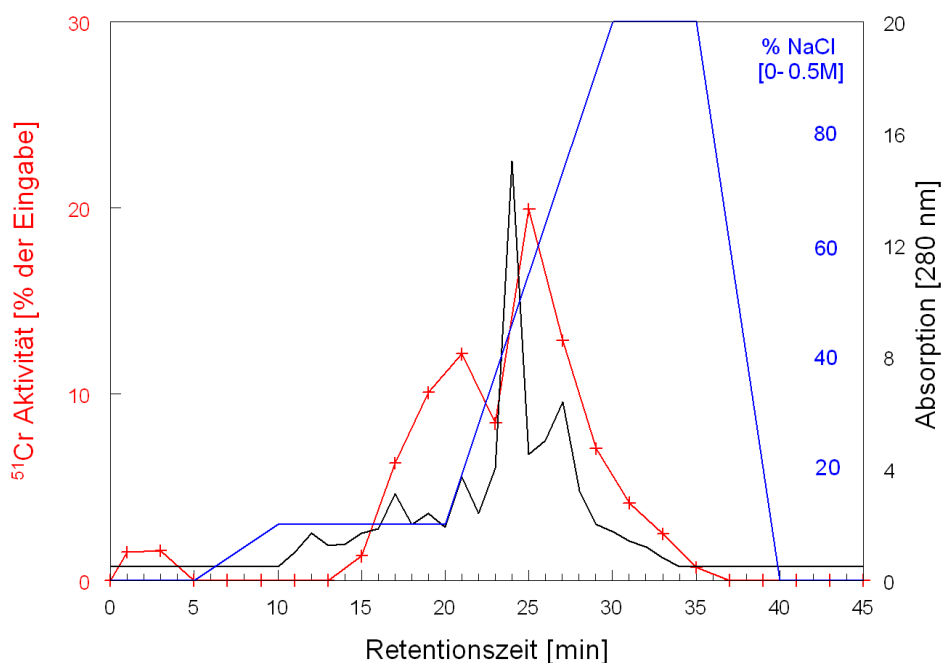


Abbildung 37 Chromatographische Trennung von 25 μl Rattenserum (0,095 μg), 24 h nach i.p. Applikation von ^{51}Cr -L-Phenylalanin (68 μg Chrom), über Mono-Q-Säule, bei 280 nm

Die Anionenaustauschchromatographie des Rattenserums zeigt nach in vivo Markierung ebenfalls deutlich drei Ausschläge, die zu identischen Zeitpunkten erscheinen wie nach in vitro Markierung. Der entscheidende Unterschied liegt allerdings in der Größe der Peaks. Der erste Ausschlag ist auch in diesem Fall niedrig. Das Größenverhältnis von Peak zwei und drei hat sich im Verhältnis zur in vitro Inkubation zugunsten von Peak zwei verschoben. Auffällig ist, dass das Verteilungsverhältnis der Aktivität zwischen zweitem und drittem Ausschlag intermediär zu den Ergebnissen

der in vitro Inkubation mit Chromphenylalanin bzw. Chromchlorid zu liegen scheint. Das gilt auch für die applizierte Chromdosis pro Volumeneinheit. Analysiert man 25 µl des gleichen Ansatzes mit einer Säule, die nach Molekulargewicht trennt, erhält man wieder ein Chromatogramm mit drei Peaks.

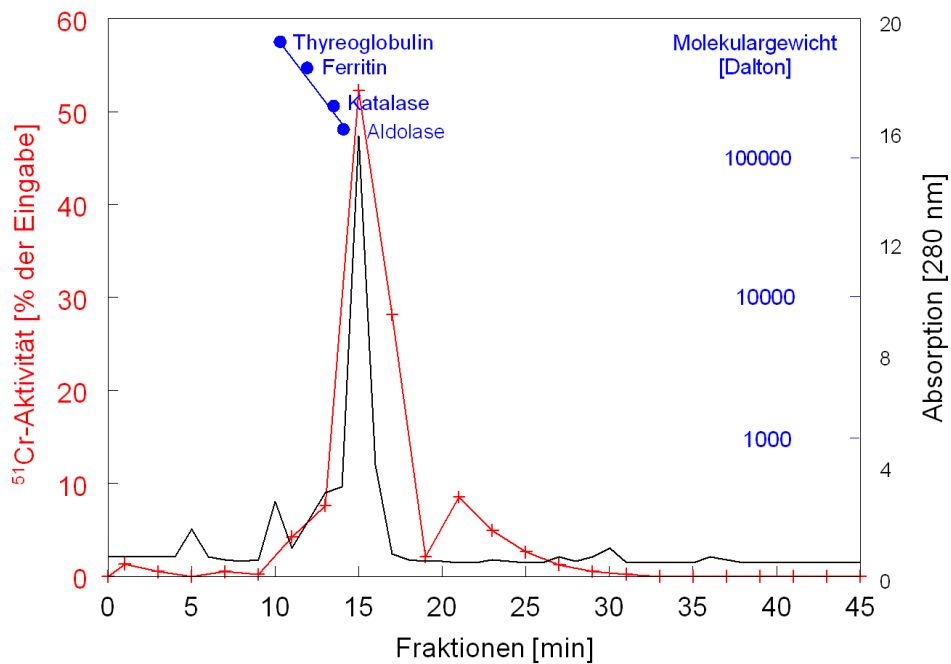


Abbildung 38 Chromatographische Trennung von 25 µl Rattenserum (0,095 µg), 24 h nach i.p. Applikation von ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin (68 µg Chrom), über Superose 12 Säule, bei 280 nm

Der erste kleine Ausschlag erscheint bereits nach 2 Minuten im Eluat, folglich läuft das Chrom dieser Fraktion mit hochmolekularen Proteinen, die aufgrund ihrer Größe nicht mit dem Gel der Säule interagieren und sie daher über das Außenvolumen schnell passieren. Der maximale Ausschlag findet sich nach 15 Minuten. Anhand der Eichkurve erkennt man, dass das Molekulargewicht des Proteins, das diesem Peak entspricht, unterhalb von 158000 Dalton liegt. Der Ausschlag enthält den überwiegenden Anteil der Gesamtaktivität. Der zweithöchste Wert (3. Peak) folgt nach 21 Minuten. Die entsprechende Proteinfraction hat ein kleineres Molekulargewicht als die des zweiten Gipfels.

Das Auftrennungsergebnis zeigte sich in allen Ansätzen stabil und konnte in Wiederholungsläufen gut reproduziert werden. Mehr als 95 % der in die HPLC injizierten Aktivität wurden wieder gefunden, was die Reliabilität der Ergebnisse unterstreicht.

Ultrafiltration

Zur Ultrafiltration wurden, 24 Stunden nach intraperitonealer Markierung mit 20 µl ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin, 100 µl Rattenserum (0,38 µg Chrom) in eine Filtereinheit mit einem Cut-Off-Level von 10000 NMWL pipettiert und bei 13000 U/min 30 Minuten zentrifugiert.

Die Ultrafiltration ergab eine Konzentrierung der Aktivität in der Filtermembran, sie enthielt durchschnittlich 98,5 % der Aktivität des eingesetzten Serums. Das Ultrafiltrat enthielt lediglich 1,5 % der Aktivität. Betrachtet man die Ergebnisse der Molekularsiebchromatographie des Serums, erscheint dies plausibel. So erhält man nach Aufaddieren aller Aktivitäten der Fraktionen 14 bis 23 (27 bis 45 Minuten) eine Gesamtaktivität von unter 2 %. Dieser Bereich enthält den niedermolekularen Anteil der Proteintrennung, da die Superose-Säule einen optimalen Trennungsbereich von 1000 Da bis 300000 Da hat. Den Filter passieren alle Moleküle, die kleiner als 10000 Da sind.

| Probe | Aktivität [%] |
|--------------|----------------------|
| 1 | 0,85 |
| 2 | 2,14 |
| Mittelwert | 1,50 |

Tabelle 5 Ultrafiltration von 100 µl Rattenserum (0,38 µg Cr) in Millipore Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units (Cut Off Level 10000 NMWL), 24 h nach intraperitonealer Markierung mit 20 µl ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin (68 µg Cr)

4.8 Chromatographische Suche nach chrombindenden Leberproteinen

Der Leber wird als zentralem Stoffwechselorgan auch eine entscheidende Rolle im Chromstoffwechsel zugeschrieben. So wird die Leber unter anderem als bedeutender Chromspeicher angesehen. Ziel dieses Experiments war es das Chrombindungsverhalten von Leberproteinen zu analysieren. Die zu untersuchenden Tiere erhielten ein Aliquot einer ^{51}Cr -L-Phenylalanin-Lösung ($68\ \mu\text{g}$ Chrom) intraperitoneal injiziert. Nach Ablauf von 24 Stunden erfolgten die Leberpräparation und die Weiterverarbeitung zu Leberhomogenat. Eine Probe von $25\ \mu\text{l}$ der Zytosolfraction wurde mit Ionenaustausch- bzw. Molekularsiebchromatographie über eine Laufzeit von 45 Minuten in 23 Fraktionen getrennt und deren Aktivität dann im γ -Counter bestimmt. Als Referenz diente die Aktivität einer unfraktionierten Probe.

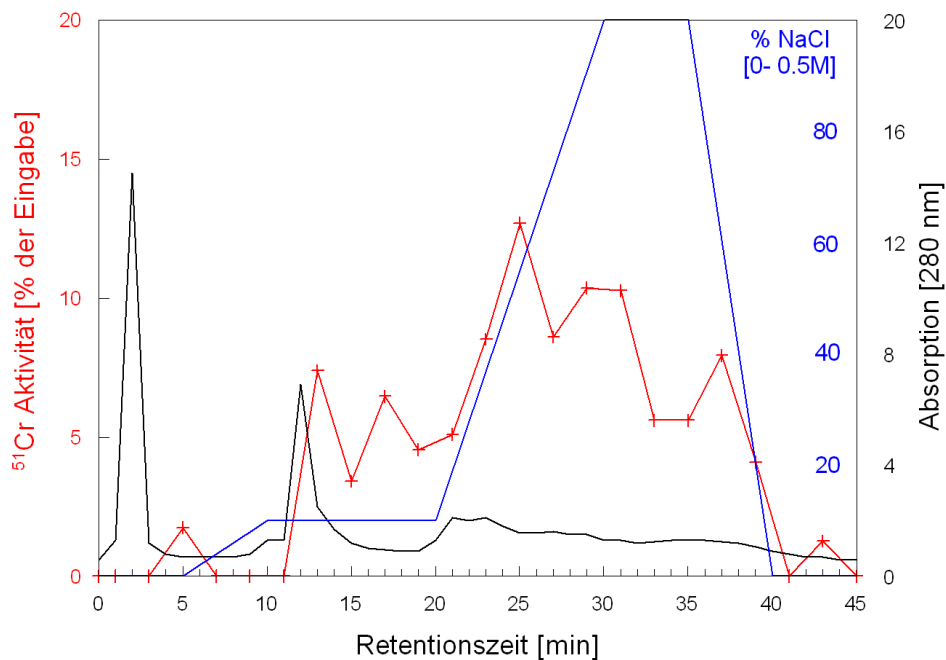


Abbildung 39 Chromatographische Trennung von $25\ \mu\text{l}$ Leberhomogenat, 24 Stunden nach ^{51}Cr -L-Phenylalanin ($68\ \mu\text{g}$ Chrom) i.p. über Mono-Q-Säule bei 280 nm. Exemplarische Darstellung

Die chromatographische Trennung (Ionenaustauschchromatographie) ergibt ein buntes Bandenmuster. Eine Vielzahl von Leberproteinen scheint Chrom

zu binden. Das ^{51}Cr verteilt sich auf sieben Ausschläge. Dabei werden fast 80 % der Gesamtaktivität mit steigender NaCl-Konzentration des Laufmittels mit einer Laufzeit zwischen 20 und 40 Minuten von der Säule gelöst. Der hohe Salzgradient spricht für die Ladung der Proteine in diesem Bereich. Wiederholungen des Versuches ergaben Chromatogramme mit identischen Bandenmustern, allerdings variierte die Ausprägung der Banden der einzelnen Durchläufe erheblich.

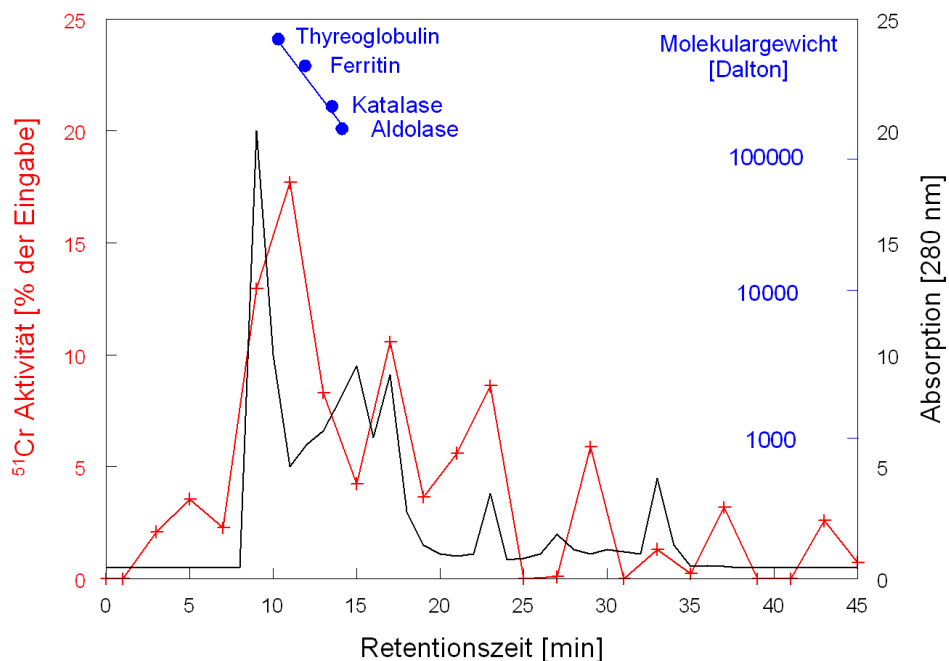


Abbildung 40 Chromatographische Trennung von 100 μl Leberhomogenat, 24 h nach ^{51}Cr -L-Phenylalanin (68 μg Chrom) i.p. über Superose 12 Säule. Exemplarische Darstellung

Abbildung 40 zeigt exemplarisch das Ergebnis der chromatographischen Trennung der Leberproteine nach Molekulargewicht. Im dargestellten Durchlauf ergaben sich acht Ausschläge. Bereits nach 5 Minuten erhält man den ersten Chrompeak im Eluat. Das Molekulargewicht der entsprechenden Proteinfraction liegt im hochmolekularen Bereich. Es folgen drei weitere Ausschläge im hoch- bis niedrigmolekularen Bereich, auf die sich 70 % der gesamten ^{51}Cr aktivität konzentrieren. Die restliche Aktivität verteilt sich auf Fraktionen, die keinen Proteinen mehr entsprechen. In

Wiederholungsläufen erscheinen die Ausschläge zu analogen Zeitpunkten, variieren aber auch in diesem Trennungsverfahren in ihrer Ausprägung.

Die Chrom-Leberproteininteraktionen scheinen sehr störanfällig, unspezifisch und abhängig von den Trennungsbedingungen zu sein.

Ultrafiltration

Zur näheren Eingrenzung der Molekulargröße der chrombindenden Proteine wurden 100 µl Leberhomogenat in einen Filter mit einem Cut-Off-Level von 10000 NMWL pipettiert und anschließend bei 13000 U/min 30 min zentrifugiert. Die Aktivität des Ultrafiltrats wurde im γ -Counter gemessen und mit einer nicht filtrierten Probe verglichen.

| Probe | Aktivität [%] |
|--------------|----------------------|
| 1 | 11,98 |
| 2 | 7,77 |
| Mittelwert | 9,88 |

Tabelle 6 Ultrafiltration von 100 µl Rattenleberhomogenat in Millipore Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units (Cut Off Level 10000 NMWL), 24 h nach intraperitonealer Markierung mit 20 µl ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin (68 µg Chrom)

Nach Ultrafiltration fanden sich durchschnittlich 10 % der Gesamtaktivität des Leberhomogenats im Ultrafiltrat wieder. Der Filter hielt fast 90 % der Gesamtaktivität zurück, die folglich mit Proteinen assoziiert war, deren Molekulargewicht ein Passieren der Filtermembran nicht erlaubte. Die Ergebnisse der Molekularsiebchromatographie korrelieren gut mit denen der Ultrafiltration. Man findet in den Fraktionen 13-23 mit der Retentionszeit von 25-45 min 14 % der Gesamtaktivität wieder, entsprechend der Größenordnung des Ultrafiltrats.

5 Diskussion

5.1 Synthetisierte Chromverbindungen

Für diese Arbeit wurden die Verbindungen Chrom-L-Phenylalanin und Chrompropionsäure gewählt, da sie in neueren Veröffentlichungen deutliche Vorteile bezüglich Stoffwechselwirkungen und Absorptionseigenschaften im Vergleich zu anderen gängigen chromhaltigen Nahrungsergänzungsprodukten zeigten (Yang, 2005; Sun, 2002; Sreejayan, 2008). Chromchlorid wurde zum Vergleich untersucht. Chromhaltige Nahrungsergänzungsprodukte für den Menschen enthalten gewöhnlich Dosen von 200-600 µg Chrom/Tag. Bei einem durchschnittlichen menschlichen Körpergewicht von 75 kg entspricht dies 0,8-2,4 µg Chrom auf 0,3 kg Ratte. Da die käuflich erhältlichen $^{51}\text{CrCl}_3$ -Chargen eine limitierte spezifische Aktivität haben, mussten alle hergestellten Chromdosen zwangsläufig im supraphysiologischen, jedoch weit außerhalb des toxischen Bereiches liegen, der bei i.v.-Gaben bei etwa 1 mg/100 g Körpergewicht beginnt (Mertz, 1965).

Die UV/VIS-Spektralanalyse von Chromphenylalanin entspricht den Literaturangaben (Yang, 2005). Das Spektrum von Chrompropionat stimmt mit dem im Rahmen einer früheren Studie unseres Instituts ermittelten Spektrum dieser Verbindung überein (Kottwitz, 2007).

Die HPLC-Analysen von Chrom-L-Phenylalanin und Chrompropionsäure zeigten reproduzierbar einen einzelnen Peak, den man als Molekülpeak deuten konnte. Die Verwendung von ^{51}Cr markiertem Material zeigt aber, dass es sich dabei um ein Abbauprodukt handeln muss. Offenbar zerfällt der Chromkomplex unter den Bedingungen der HPLC-Chromatographie auf einer HPLC-Säule. Da die erhobenen UV-Spektren vergleichbar mit der Literatur waren, dürfte an der Identität der jeweiligen Verbindungen kein Zweifel bestehen.

5.2 Intestinale Absorption

Die Absorption von Chrom nach oraler Zufuhr ist generell sehr gering. Nach Literaturangaben liegt sie bei durchschnittlich 0,5-2 % (Anderson, 1985). Chrom-L-Phenylalanin zeigte nach oraler Zufuhr mit 0,85 % die größte Absorption der hier untersuchten Verbindungen. Die Absorption von Chrompropionat und Chromchlorid lag bei 0,36 % bzw. 0,51 %.

Das Metall Chrom als Elektronenakzeptor geht mit sogenannten Liganden (Elektronendonatoren) koordinative Bindungen ein. Dabei entstehen Metallkomplexe. Durch die Komplexbildung erhält das Zentralion Chrom eine Hülle. Die Liganden bestimmen die chemischen Eigenschaften des Komplexes und die Eigenschaften des Komplexes beeinflussen die Absorption. Es wurde berichtet, dass organische Chromkomplexe besser absorbiert werden sollen als anorganische Chromkomplexe (Mertz, 1971). Auch in unseren Untersuchungen zeigte sich diese Tendenz für das Chrom-L-Phenylalanin. Reaktionen, die zu Metallkomplexen führen, sind Gleichgewichtsreaktionen mit einer Bildungs- und einer Zerfallskonstante. Dabei gilt, je größer die Bildungskonstante, desto stabiler der Komplex. Vermutlich ist die Komplexstabilität ein entscheidender Faktor für die Verwertung. Das Chrompicolinat gilt als eine besonders stabile Verbindung (Speetjens, 1999; Chakov, 1999). Es wird angenommen, dass Chrompicolinat als intaktes Molekül aufgenommen wird. Die von unserer Arbeitsgruppe erhobene Absorption von Chrompicolinat lag bei 0,99 % (Kottwitz, 2007). Das Chrom-L-Phenylalanin zeigte bei gleicher Methodik mit 0,85 % eine Absorption von vergleichbarer Größe. Folglich könnte auch das Chrom-L-Phenylalanin in vivo ein recht stabiler Komplex sein. Bei Chromchlorid und Chrompropionat handelt es sich um mehr ionische Verbindungen. Die ähnlichen Absorptionswerte von Chrompropionat und Chromchlorid legen die Vermutung nahe, dass beide Komplexe dem gleichen Aufnahmemechanismus unterliegen. Für das Chrompropionat wurde erst kürzlich über eine besonders große Absorption bei sehr guter Wasserlöslichkeit und Säureresistenz berichtet (Clodfelder, 2004). Anhand der hier erhobenen Ergebnisse ist es fraglich, ob es sich beim Chrompropionat tatsächlich um eine derart stabile Verbindung handelt. Vielmehr scheint in vivo sowohl beim Chromchlorid als auch beim

Chrompropionat die Zerfallskonstante die Bildungskonstante deutlich zu überwiegen. Die Absorption von ^{51}Cr Chromchlorid wird in der Literatur mit $< 1\%$ angegeben (Anderson, 1985) und stimmt damit mit den hier erhobenen Befunden überein. Auch eine humane Studie (Di Silvestro, 2007) erbrachte Ergebnisse, die die hier erhobenen in ihrer Größenordnung bestätigen, auch wenn in dieser Studie lediglich der über 24 Stunden ausgeschiedene Anteil des zugeführten Chroms ohne Retention berücksichtigt wurde.

| Cr-Verbdg, Zeitpunkt | Spezies | Wert [%] | Literatur |
|-----------------------------------------|---------|-------------|--------------------|
| CrPic, 48 h | Mensch | 2,80 ± 1,14 | Gargas, 1994 |
| CrPic, 24 h | Mensch | 0,417± 0,08 | Di Silvestro, 2007 |
| CrCl ₃ , 24 h | Mensch | 0,077± 0,01 | Di Silvestro, 2007 |
| CrNic-Glyc, 24 h | Mensch | 0,138± 0,04 | Di Silvestro, 2007 |
| CrPolyNic, 24 h | Mensch | 0,169± 0,03 | Di Silvestro, 2007 |
| ^{51}Cr Pic, 48 h | Ratte | 0,99 | Kottwitz, 2008 |
| ^{51}Cr Nic, 48 h | Ratte | 0,12 | Kottwitz, 2008 |
| ^{51}Cr Pa, 48 h | Ratte | 0,85 | Laschinsky, 2010 |
| ^{51}Cr Prop, 48 h | Ratte | 0,36 | Laschinsky, 2010 |
| ^{51}Cr Cl ₃ , 48 h | Ratte | 0,51 | Laschinsky, 2010 |

Tabelle 7 Absorption verschiedener Chromverbindungen nach oraler Zufuhr. Zusammenfassung von Literaturwerten und Ergebnissen dieser Arbeit

5.3 Absorptionsmechanismus

Untersuchungen am Menschen ergaben eine dosisabhängige Absorption von Chrom. Bis zu einer Schwellendosis von 40 µg zeigt die Chromabsorption des Menschen ein inverses Verhältnis zur zugeführten Menge. Übersteigt die zugeführte Dosis diesen Schwellenwert, liegt die Absorption relativ konstant bei 0,4 % (Anderson, 1985). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass es sich bei der Chromaufnahme um einen sättigbaren carriervermittelten Transport handeln könnte. Vergleichbare Untersuchungen der Ratte brachten widersprüchliche Ergebnisse. Die Autoren vermuteten, dass der Schwellenwert der Ratte für diesen Effekt deutlich niedriger liegen muss (Anderson, 1996). Andere Untersuchungen über den Aufnahmemechanismus von anorganischem

Chrom favorisieren einen nicht sättigbaren Aufnahmeprozess von Chrom (Donaldson, 1966; Dowling, 1989).

Die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten ebenfalls keinen Sättigungseffekt nach oraler Zufuhr von Chromchlorid im Dosisbereich zwischen 0,02 und 20 µg/Ratte. Folglich könnte anorganisches Chrom im Intestinaltrakt der Ratte durch passive Diffusion entlang eines Konzentrationsgradienten aufgenommen werden. Stabile organische Chromkomplexe werden möglicherweise anders behandelt und gelangen, begünstigt durch ihre Lipophilie, auf transzellulärem Weg intakt zur Aufnahme ins Blut. So ließe sich die hohe Absorption von beispielsweise Chrompicolinat erklären. Bislang ungeklärt ist allerdings, ob dies transportervermittelt und unter Energieverbrauch erfolgt.

5.4 Chromtransport

Die chromatographische Trennung des *in vitro* mit ⁵¹Chromphenylalanin inkubierten Rattenserums unterscheidet sich von dem mit ⁵¹Chromchlorid inkubiertem lediglich quantitativ. Qualitativ verfügen beide Ansätze in der Ionenaustauschchromatographie über ein vergleichbares Bandenmuster mit drei Ausschlägen zu identischen Zeitpunkten. Diese Dreiteilung der applizierten Aktivität findet sich auch in der chromatographischen Trennung nach *in vivo* Markierung mit ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin wieder. Der entscheidende Unterschied der Chromatogramme liegt in der Aktivitätsverteilung auf die unterschiedlichen Banden.

Die Anionenaustauschersäule wurde so geeicht, dass Transferrin nach 15 Minuten im Eluat erscheint. Folglich scheint nach *in vitro* Inkubation mit ⁵¹Chromchlorid der überwiegende Anteil des zugeführten Chrms an Transferrin zu binden. Die *in vitro* Inkubation von Serum mit ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin zeigte eine deutliche Umverteilung zugunsten eines anderen nicht näher definierten Proteins. Diese Tendenz bestätigte sich bei der *in vivo* Markierung, obwohl hier auch ein großer Anteil der Aktivität im Bereich des Transferrins zu finden war. Anhand der Eichgraden der Gelchromatographie erkennt man, dass es nach der intraperitonealen Zufuhr des Chrom-L-Phenylalanin zu einer Konzentrierung der

⁵¹Chromaktivität auf ein Protein kommt, welches von der Größe zum Transferrin passt.

Untersuchungen zum Chromtransport nach oraler Zufuhr von ⁵¹Chromchlorid ergaben, dass mehr als 99 % des ⁵¹Chroms mit nichtzellulären Blutbestandteilen assoziiert war. Nähere Analysen zeigten, dass 90 % des ⁵¹Chroms in der β -Globulin-Fraktion zu finden war, wovon wiederum 80 % an Transferrin gebunden waren (Hopkins, 1964). Transferrin besitzt zwei Eisenbindungsstellen, die A-Seite und die B-Seite. Beide Seiten können theoretisch ebenso von Chromionen besetzt werden. Lediglich das an die A-Seite gebundene Chrom wird bei neutralem pH-Wert von Eisen verdrängt (Harris, 1977). In in vitro Studien kam es nach Inkubation von Blut bzw. Serum mit verschiedenen Chromspezies zu einer Beladung von Transferrin mit Chrom. Gleichzeitig binden unter diesen Bedingungen auch Albumin sowie einige Degradationsprodukte Chrom (Borguet, 1990, 1995). Es ist also bekannt, dass neben dem Transferrin auch andere Proteinspezies in der Lage sind Chrom zu binden. Bei Inkubation von Rattenserum mit ansteigenden Mengen Chrom (III) in Form von $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ und anschließender Zugabe von carrierfreiem ⁵¹Chrom zeigte sich eine zunehmende Umverteilung von ⁵¹Chrom zugunsten von Albumin, der α_1 - und der α_2 - Globulin Fraktion (Hopkins, 1964). Einen möglichen Erklärungsansatz für die hier beobachtete Verteilung der Aktivität auf die unterschiedlichen Proteinspezies liefert also die applizierte Chromdosis. Bei der in vitro Markierung des Serums mit ⁵¹Chromchlorid handelte es sich um eine reine Tracerdosis. Sowohl die in vitro Inkubation mit Chrom-L-Phenylalanin als auch die in vivo Markierung mit Chrom-L-Phenylalanin enthielt einen erheblichen Anteil "kalten" Chroms. Transferrin besitzt eine Eisenbindungskapazität von 1,43 μg Eisen/mg Transferrin. Für Chrom errechnet sich eine Chrombindungskapazität von 1,33 μg Chrom/mg Transferrin. Die Blutkonzentration von Transferrin wird mit 2,0-3,6 g/l angegeben. Das Blutvolumen der Ratte beträgt 6 % des Körpergewichtes, welches zum Zeitpunkt dieses Versuches durchschnittlich bei 280 g lag. Es ergibt sich also für ein Blutvolumen von 16,8 ml eine Gesamtchrombindungskapazität für Transferrin von 44,69-80,47 μg . Etwa

30 % des Transferrins sind unter physiologischen Bedingungen mit Eisen gesättigt und folglich von der Bindungskapazität zu subtrahieren. Die Gesamtbindungskapazität von Transferrin für Chrom beträgt also 31,28-54,32 µg. In 200 µl Blut können demnach 0,37-0,65 µg Chrom gebunden werden. Lediglich die in vitro Dosis des ⁵¹Chromchlorids lag mit 0,03 µg im physiologischen Bereich. Die anderen Versuche wurden mit supraphysiologischen Dosen durchgeführt. Demzufolge kam es in den übrigen Ansätzen zu einer mehr oder weniger starken Übersättigung des Transferrins, was die Umverteilung zugunsten der anderen Serumproteinspezies erklärt. Vermutlich bindet Transferrin bei noch vorhandener Kapazität Chrom aufgrund der Ähnlichkeit von Ladung und Ionenradius von Eisen- und Chromionen recht selektiv. Erst bei Überschreitung dieser Kapazität gewinnt die Bindung an andere Proteine zunehmend an Bedeutung. Es ist weiterhin nicht auszuschließen, dass auch die verabreichte Chromform einen Einfluss auf die Interaktion mit den Serumproteinspezies haben könnte.

5.5 Biologische Halbwertszeiten

Anhand der Ganzkörperretentionskurve nach intraperitonealer Zufuhr konnten für jede untersuchte Chromverbindung mit graphischer Analyse drei exponentielle Komponenten errechnet werden, die die Chromelimination determinieren. Die intraperitoneale Applikationsform war notwendig, um die Ganzkörperretention über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können.

| [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) |
| Cr Phenylalanin i.p. | 64 | 0,01 ± 0,17 | 9,56 ± 1,15 | 4,6 ± 1,2 | 26,85 ± 0,43 | 58 < T _{1/2} ≤ 73 |
| Cr Propionat i.p. | 61 | 0,004 ± 0,001 | 10,5 ± 0,41 | 3,9 ± 0,4 | 28,23 ± 0,19 | 57 < T _{1/2} ≤ 95 |
| CrCl ₃ i.p. | 59 | 0,15 ± 0,11 | 11,0 ± 2,64 | 4,2 ± 1,6 | 29,63 ± 0,48 | 31 < T _{1/2} ≤ 44 |

Tabelle 8 Parameter des Ganzkörperretentionsmodell in Ratten. Dargestellt sind biologische Halbwertszeiten und Poolgrößen mit Standardabweichungen

Alle drei untersuchten Chromverbindungen zeigten eine ähnliche Eliminationskinetik mit einer kurzen, einer mittleren und einer langen Halbwertszeit. Auch die Größe der den Halbwertszeiten entsprechenden Pools war für die verschiedenen Verbindungen identisch. Die einzelnen Kompartimente sind vermutlich in unterschiedlichem Ausmaß auf die einzelnen Organe verteilt (Onkelix, 1977; Lim, 1983). Die Halbwertszeiten ergeben sich aus dem Zusammenspiel komplexer physiologischer Prozesse wie transkapillärem Flux, Aufnahme/Abgabe von Geweben und Ausscheidung über Urin, Kot, Schweiß und Zellabschilferungen. Die Ganzkörperretentionskurven zeigen passend zu der kurzen ersten Halbwertszeit einen frühen Knick. Anhand der Ergebnisse der Stoffwechselläufigversuche zeigt sich ein Zusammenhang mit der Ausscheidung im Urin, die innerhalb der ersten 24 h maximal ist. Aber auch die fäkale Elimination spielt bereits während der ersten 48 h eine Rolle. Die zweite Komponente könnte die ⁵¹Chromabgabe aus Weichgeweben wie Muskulatur und Leber repräsentieren (Hopkins, 1964). Ein nicht unerheblicher Teil von 25-30 % des ⁵¹Chrom aus den unterschiedlichen Verbindungen unterliegt einer langen Halbwertszeit. Möglicherweise kommt sie durch das Binden von Chrom an Proteine mit langsamen Turnover zustande, die das Chrom entsprechend lang retinieren. Bislang wurde in der Literatur lediglich die Halbwertszeit von intravenös appliziertem Chromchlorid untersucht (siehe Tabelle 9).

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

5.6 Ganzkörperretention nach oraler und intraperitonealer Chromzufuhr

Die orale Ganzkörperretention konnte über einen Zeitraum von 7 Tagen verfolgt werden. Anschließend fiel sie unterhalb des Detektionslimits und war von der Untergrundstrahlung nicht mehr abzugrenzen. Für Chrom-L-Phenylalanin lag die 7-Tages-Ganzkörperretention mit 0,2 % höher als die von Chrompropionsäure mit 0,07 % und Chromchlorid mit 0,15 %. Die 7-Tages-Ganzkörperretention für Chrompropionat und Chromchlorid zeigten keine signifikanten Unterschiede. Im Vergleich zur, nach gleicher Messmethode erhobenen, 7-Tages-Ganzkörperretention von Chrompicolinat (0,08 %) weist das Chrom-L-Phenylalanin eine mehr als doppelt so große Retention nach 7 Tagen auf. Mittelfristig scheint die zugeführte Chromverbindung einen Einfluss auf die Retention nach oraler Zufuhr zu nehmen, das zeigen auch Arbeiten anderer Arbeitsgruppen (Tabelle 10).

| Cr-Verbdg, Probe, Zeitpunkt | Spezies | Wert [%] | Literatur |
|------------------------------------------------------------|---------|--------------|------------------|
| ⁵¹ CrPic, Ganzkörper, 12h | Ratte | 0,4 ± 0,08 | Olin, 1994 |
| ⁵¹ CrNic, Ganzkörper, 12h | Ratte | 0,6 ± 0,05 | Olin, 1994 |
| ⁵¹ CrCl ₃ , Ganzkörper, 12h | Ratte | 0,7 ± 0,12 | Olin, 1994 |
| ⁵¹ CrCl ₃ , Ganzkörper ohne GIT, 24h | Ratte | 0,31 ± 0,06 | Anderson, 1995 |
| ⁵¹ CrCl ₃ , Ganzkörper ohne GIT, 24h | Ratte | 0,6 ± 0,2 | Anderson, 1996 |
| ⁵¹ CrPic, Ganzkörper ohne GIT, 24h | Ratte | 0,5 ± 0,3 | Anderson, 1996 |
| ⁵¹ CrNic, Ganzkörper ohne GIT, 24h | Ratte | 1,0 ± 0,5 | Anderson, 1996 |
| ⁵¹ CrPic, Ganzkörper, 7d | Ratte | 0,078± 0,016 | Kottwitz, 2007 |
| ⁵¹ CrNic, Ganzkörper, 7d | Ratte | 0,043± 0,016 | Kottwitz, 2007 |
| ⁵¹ CrProp, Ganzkörper, 7d | Ratte | 0,007 | Kottwitz, 2007 |
| ⁵¹ CrCl ₃ , Ganzkörper, 7d | Ratte | 0,006 | Kottwitz, 2007 |
| ⁵¹ CrPa, Ganzkörper, 7d | Ratte | 0,2 ± 0,11 | Laschinsky, 2010 |
| ⁵¹ CrProp, Ganzkörper, 7d | Ratte | 0,07 ± 0,04 | Laschinsky, 2010 |
| ⁵¹ CrCl ₃ , Ganzkörper, 7d | Ratte | 0,15 ± 0,09 | Laschinsky, 2010 |

Tabelle 10 Ganzkörperretention verschiedener Chromverbindungen nach oraler Zufuhr. Zusammenfassung von Literaturwerten und Ergebnissen dieser Arbeit

Durch intraperitoneale Gabe gelangen nahezu 100 % der zugeführten Dosis in den Blutkreislauf. Auf diese Weise konnte die langfristige Chromretention verfolgt werden. Es ist auffällig, wie sehr sich die Retentionskurven von Chromchlorid, Chrom-L-Phenylalanin und Chrompropionat mit der Zeit

angleichen (vergleiche Abb. 27). Nach 14 Tagen wurden von allen Verbindungen durchschnittlich 26 % der ursprünglich zugeführten ⁵¹Chrom-Dosis retiniert. Die Ergebnisse liegen in derselben Größenordnung wie andere Literaturwerte (Mertz, 1964; Jain, 1981).

Ansteigende Chromdosen hatten weder nach oraler noch nach intraperitonealer Applikation einen Einfluss auf die Ganzkörperretention. Auch die vorherige orale Gabe von Eisensulfat beeinträchtigte die intraperitoneale Chromretention nicht. Wie die Versuche zur Serumproteinanalyse zeigen, sind bei Transferrinübersättigung andere Proteinspezies im Serum in der Lage den Chromtransport zu übernehmen, sodass es zu keiner Wechselwirkung zwischen Eisen- und Chromstoffwechsel kommt.

Die langfristige Chromretention scheint also einer genauen Regulation zu unterliegen und einen spezifischen Transport- und Verteilungsmechanismus zu besitzen, wie dies für ein essentielles Spurenelement auch zu erwarten wäre. Das gilt vermutlich auch für das oral zugeführte Chrom, allerdings war es durch den zeitlich limitierten Beobachtungszeitraum von 7 Tagen nicht möglich diesen Effekt zu überprüfen. Der Chromhaushalt könnte vor allem auf der Ebene der Ausscheidung reguliert werden, so zeigten bereits ältere Untersuchungen, dass die Chromretention unabhängig von der zugeführten Form, der Menge, dem Verabreichungsmodus und der Gegenwart von Hormonen ist (Anderson, 1996).

5.7 Gewebsverteilung

Um die Organverteilung von Chrom über einen längeren Zeitraum verfolgen zu können, werden relativ hohe Blutchromspiegel benötigt. Da die Absorption nach oraler Zufuhr großen Schwankungen unterliegt und insgesamt zu gering ist, wurde die intraperitoneale Gabe gewählt. Die intraperitoneale Applikation führt zu vergleichbar hohen Blutspiegeln wie die Intravenöse. Das Chrom wurde in Form von ⁵¹Chrom₂-Transferrin verabreicht.

| Organ | ⁵¹Cr- Verteilung [%] 7d nach ⁵¹Cr₂-Tf i.p. | ⁵¹Cr- Verteilung [%] 7d nach ⁵¹CrPic i.p. |
|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------|
| Vollblut/ ml | 0,08 | 0,001 |
| Serum/ ml | 0,06 | 0,001 |
| Leber | 11,46 | 11,50 |
| Nieren | 5,23 | 6,42 |
| Fett | 0,20 | 0,001 |
| Muskel | 0,10 | 0,085 |
| Gehirn | 0,10 | 0,04 |
| Milz | 2,18 | 2,35 |
| GIT | 8,63 | 3,50 |
| Lunge | 0,43 | 0,68 |
| Herz | 0,18 | 0,17 |
| Femur | 0,80 | 0,59 |
| Kadaver | 68,10 | 62,00 |

Tabelle 11 Vergleich der prozentualen ⁵¹Chrom-Organverteilung 7 Tage nach intraperitonealer Applikation von ⁵¹Chrom-markiertem Transferrin und ⁵¹Chrompicolinat

Über den gesamten Untersuchungszeitraum waren fast 80 % des Chroms im Blut proteingebunden. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Serumproteine für den Chromtransport, liegt damit aber etwas unterhalb der Literaturwerte (Hopkins, 1964). Folglich scheinen auch die Erythrozyten zu einem geringen Anteil am Chromtransport beteiligt zu sein. Initial zeigen mehr oder weniger alle Organe einen durchblutungsbedingten Anstieg in der ⁵¹Chromkonzentration. Im Verlauf reflektieren die Organaktivitäten dann echte Speichereffekte, da die Aktivität im Blut deutlich abfällt. In Herz, Gehirn und Lunge werden nach Ablauf von 7 Tagen lediglich geringe Mengen Chrom gespeichert. Die abdominalen Organe Leber, Milz, GIT und Nieren retinieren dagegen einen deutlich größeren Anteil Chrom. Dabei zeigen besonders die intraperitoneal gelegenen Organe eine hohe Chromkonzentration. Untersuchungen an Mäusen zeigten nach intraperitonealer Chromzufuhr ähnliche Ergebnisse (Sipowicz, 1997). Bedingt durch die Applikationsart kommt es zu hohen intraperitonealen Chromkonzentrationen. Es wird angenommen, dass das Chrom teilweise direkt von den intraperitonealen Organen absorbiert wird. Auch das Stütz- und Bindegewebe (Knochen, Fettgewebe) sowie die Muskulatur spielen eine wichtige Rolle als Chromspeicher. Das erkennt man beim Hochrechnen der

Aktivität der Gewebeproben auf das Organgesamtgewicht. Außerdem hat der überwiegend aus Fell, Muskulatur, Knochen und Fett bestehende Kadaver die größte Aktivität aller gemessenen Strukturen. Die höchsten Organwerte hatten Leber, Nieren und Milz. In diesen Organen kam es zu einer echten Chromanreicherung, so stellten sich erst im Verlauf die Spitzenwerte ein. Die hier beschriebenen Ergebnisse stimmen mit anderen Studienergebnissen relativ gut überein (Hopkins 1964; Olin 1994; Anderson, 1995; Sipowicz, 1997).

Abbildung 41 vergleicht die hier erhobenen Daten mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe über die Organverteilung von intraperitoneal verabreichtem Chrompicolat. Die Ergebnisse wurden unter gleichen Bedingungen erhoben. Trotz sehr unterschiedlich verlaufender Chromverteilung innerhalb der ersten 24 Stunden gleichen sich die Unterschiede in den folgenden 3 bis 7 Tagen immer mehr an. Dies ist ein weiteres Indiz für eine mittel- bis langfristige Feinregulation des Chromhaushaltes.

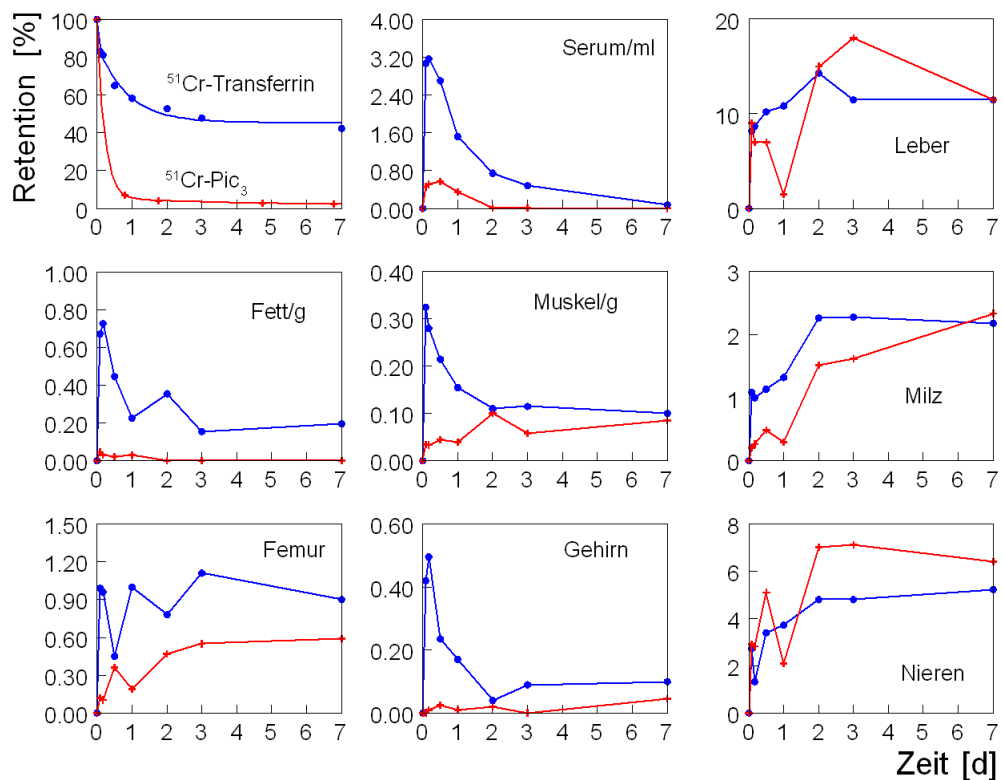


Abbildung 41 Vergleichende Darstellung der ^{51}Cr -Verteilung verschiedener Organe nach intraperitonealer Gabe von ^{51}Cr -Transferrin und ^{51}Cr -Picolat

5.8 Chrombindende Leberproteine

Die Leber gilt als zentrales Organ für den Chromstoffwechsel und spielt ferner eine wichtige Rolle als Chromspeicher. In Leberzelluntersuchungen der Ratte zur Chromverteilung aus radioaktiv markierten Chromverbindungen enthielt das Zytosol mit 64,5 % den größten Anteil chrombindender Proteine, gefolgt vom Nukleus mit durchschnittlich 12,2 % (Feng, 2003). Eine ähnliche Verteilung fand sich auch in Studien mit ⁵¹Chrompropionat (Clodfelder, 2001, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde das Zytosol der Leber nach in vivo Injektion von ⁵¹Chrom-L-Phenylalanin auf ⁵¹chrombindende Proteine untersucht. In der Anionenaustauschchromatographie fanden sich 7, in der Molekularsiebchromatographie 8 Protein- bzw. Peptidspezies die ⁵¹Chrom gebunden hatten. Anhand der Eichgrade der Molekularsiebchromatographie sowie der Ultrafiltration des Leberhomogenats erkannte man, dass sich das Chrom überwiegend auf hochmolekulare Proteinspezies verteilt (~ 90 %). Diese Tendenz zeigten auch Arbeiten mit ⁵⁰Chrom von Feng (Feng, 2000, 2003). In einer neuen Studie waren mehr als 68 % des Chroms im Zytoplasma an Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 57,9 kDa gebunden. Insgesamt fanden sich dabei 5 chrombindende Proteinspezies im Zytosol mit einem relativen Molekulargewicht von $96,9 \pm 6,2$, $68,2 \pm 1,4$, $57,9 \pm 4,7$, $24,2 \pm 1,8$, $8,8 \pm 0,6$ kDa (Feng, 2003). Die in unseren Versuchen verwendete Säule zur Trennung nach Molekulargewicht (Superose 12) hat eine optimale Trennschärfe im Bereich von 1-300 kDa, die von Feng verwendete (Sephadex G-100) lediglich zwischen 4-150 kDa. So lässt sich die größere Anzahl der gefundenen chrombindenden Proteinspezies erklären. Im Gegensatz dazu zeigte eine Studie von Yamamoto an Mäusen, dass 80 % des i.p. zugeführten Chroms auf niedermolekulare und nur 20 % auf hochmolekulare Proteine des Zytosols verteilt waren (Yamamoto, 1984). Chrom gilt als sehr reaktionsfreudiges Kation und verbindet sich mit vielen Makromolekülen in biologischen Systemen. Folglich sind die Chrom-Protein-Interaktionen möglicherweise relativ unspezifisch, was die Variabilität in der Anzahl und Ausbildungsstärke der Chrompeaks in den unterschiedlichen Chromatographien erklären könnte. Eine weitere Möglichkeit wäre eine Verunreinigung der Zytosolfraction während des Herstellungsprozesses.

5.9 Ausscheidung

Absorbiertes Chrom wird hauptsächlich über den Urin ausgeschieden und nur in geringen Mengen über Galle, Haare und Schweiß (Lukaski, 1999). Die Stoffwechselläufigversuche konnten das für Chrom-L-Phenylalanin und Chrompropionat bestätigen. Nach intraperitonealer Zufuhr wurden innerhalb der ersten 48 Stunden 35 bzw. 45 % der Gesamtaktivität über den Urin ausgeschieden.

Überraschenderweise spielte bei beiden Verbindungen die biliäre Exkretion eine große Rolle. Vom Chrompropionat wurden 10 % über den Stuhl ausgeschieden, vom Chrom-L-Phenylalanin sogar 15 %. Hopkins fand nach intravenöser Zufuhr von ⁵¹Chromchlorid 4 % der Dosis nach 48 Stunden im Stuhl wieder, Visek nach 96 Stunden sogar 20 % (Visek, 1953; Hopkins, 1965). Aufgrund der niedrigen Absorption von Chrom wird oral zugeführtes Chrom hauptsächlich mit dem Kot ausgeschieden. Nach Ablauf von 48 Stunden fanden sich vom ⁵¹Chromchlorid 99 %, vom ⁵¹Chrompropionat 95 % und vom ⁵¹Chromphenylalanin 70 % der applizierten Dosis im Kot wieder. Über den Urin wurden nur geringe Mengen Chrom eliminiert, passend zu der niedrigen Chromabsorption nach oraler Zufuhr. Inwieweit die biliäre Exkretion nach intestinaler Absorption eine Rolle spielt, ist aus den vorliegenden Ergebnissen nicht abzuschätzen, da das nicht absorbierte Chrom diesen Anteil im Stuhl überlagert.

Die Form, in der Chrom ausgeschieden wird, ist bislang noch unklar. Chrom liegt im Blut hauptsächlich proteingebunden vor (siehe Abschnitt 5.4 Chromtransport). Lediglich niedermolekulare Proteine können den glomerulären Filter der Niere passieren, werden allerdings bei normaler Nierenfunktion fast vollständig rückresorbiert. Freies Chrom könnte den Filter ebenfalls passieren. Der Anteil, der anschließend nicht reabsorbiert wird, würde dann im Urin erscheinen. Proteinanalysen des Urins zeigten, dass Chrom in einer Proteinbande ausgeschieden wurde, die der Größe nach Chromodulin entspricht (Clodfelder, 2001). Auch die biliäre Exkretion von Chrom scheint in Form eines niedermolekularen Proteins zu erfolgen, über dessen genaue Eigenschaften bislang wenig bekannt ist (Manzo, 1983).

5.10 Chromstoffwechselschema

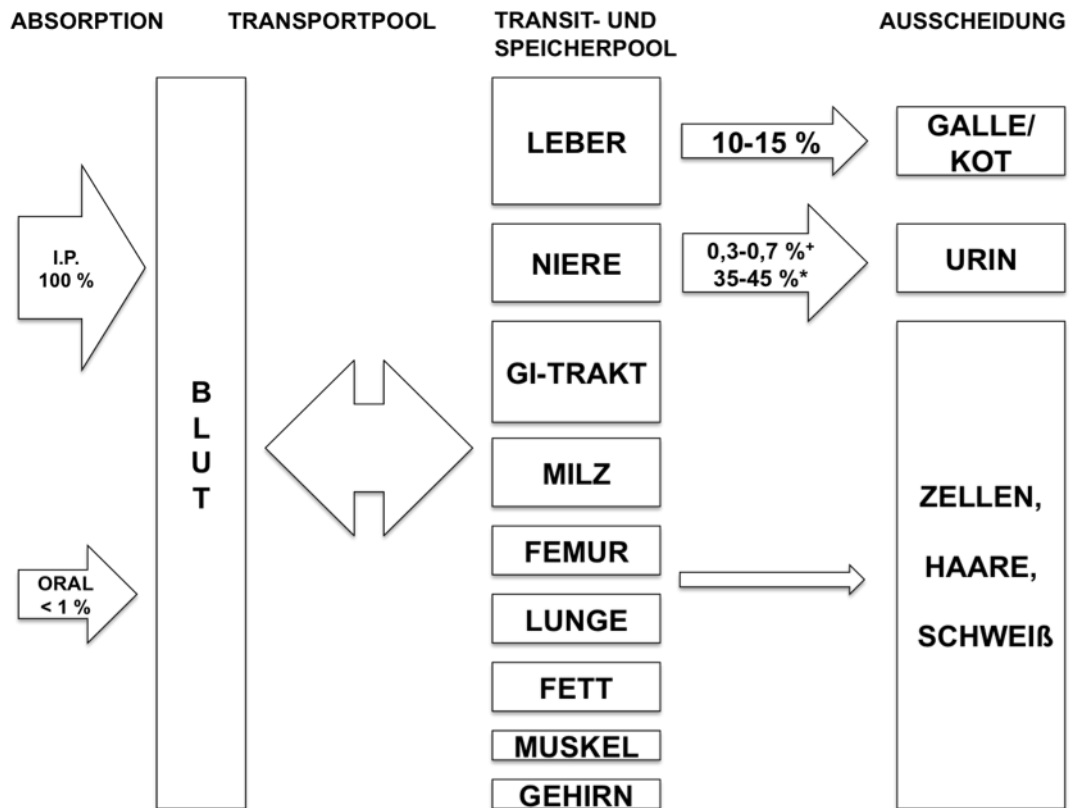


Abbildung 42 Zusammenfassung der Untersuchungen zum Chrommetabolismus in Form eines möglichen Chromstoffwechselschemas. Jedes untersuchte Organ verfügt über einen Transit- und Speicherpool unterschiedlicher Größe. Die Größen der Kästen um die Organe repräsentieren ihre relative Bedeutung als Chromspeicher. Die Angaben über die Ausscheidung beziehen sich auf die ersten 48h nach Applikation. i.p. = intraperitoneale Gabe, oral = orale Gabe, * = nach intraperitonealer Gabe, + = nach oraler Gabe

5.11 Essentialität

Von einem essentiellen Spurenelement wird gefordert, dass es in allen Geweben des Organismus präsent ist und eine Funktion im Stoffwechsel besitzt. Dabei erzeugt ein Mangel des Elementes stabil reproduzierbare klinische Symptome (Stearns, 2000). Vieles deutet darauf hin, dass es sich beim Chrom um ein essentielles Spurenelement handelt.

Die hier durchgeführten Untersuchungen konnten nach intraperitonealer Applikation von $^{51}\text{Chrom}_2$ -Transferrin in allen untersuchten Geweben $^{51}\text{Chrom}$ nachweisen. Ferner ergaben die Untersuchungen zum Chromstoffwechsel, dass der Chromhaushalt einer genauen Regulation unterliegt. Unabhängig von der zugeführten Verbindung ergaben sich ähnliche Gewebsspiegel, das $^{51}\text{Chrom}$ wurde mit identischen Halbwertszeiten eliminiert. Eine Beeinflussung dieser Prozesse durch gleichzeitige Eisenzufuhr war nicht nachzuweisen. Das Spektrum der postulierten klinischen Chrommangelsymptome ist groß (Tabelle 1), ihr Auftreten allerdings sehr variabel. In vielen Studien konnte durch Chromzufuhr eine Linderung dieser Symptome erzeugt werden. Ein kausaler Zusammenhang ist bei der aktuellen inkonstanten Studienlage allerdings fraglich.

Trotz intensiver Forschung ist es bislang nicht gelungen, den Wirkmechanismus von Chrom auf molekularer Ebene zu entschlüsseln. Es bleibt bis zur endgültigen Aufklärung von Aufnahme-, Wirk- und Ausscheidungsmechanismus spekulativ, ob es sich beim Chrom tatsächlich um ein essentielles Spurenelement handelt.

6 Zusammenfassung

Seit etwa 50 Jahren wird Chrom in der Literatur als essentielles Spurenelement beschrieben. Chrom soll über eine Interaktion mit dem Insulinrezeptor den Kohlenhydrat-, den Fett- und den Proteinstoffwechsel beeinflussen. Der genaue Mechanismus der Chromwirkung auf molekularer Ebene wird in der Literatur ebenso kontrovers diskutiert wie die Chromwirkungen am Stoffwechsel per se. Tatsächlich ist bis heute nicht endgültig geklärt, ob es sich beim Chrom wirklich um ein essentielles Spurenelement handelt.

Diese Arbeit verfolgte den Stoffwechsel verschiedener Chromverbindungen von der Aufnahme bis zur Ausscheidung. Außerdem wurde die Interaktion von Chrom mit Plasma- und Leberproteinen untersucht.

Es wurden mit ^{51}Cr -L-Phenylalanin und ^{51}Cr -Propionat zwei radioaktive Chromverbindungen synthetisiert, die in der Literatur als Nahrungssubstitution auch beim Menschen diskutiert werden. Im Vergleich zu $^{51}\text{CrCl}_3$ als Referenz wurde die intestinale Absorption, die Ganzkörperretention und die Ausscheidung von ^{51}Cr in Gruppen von Ratten untersucht.

Chrom-L-Phenylalanin hatte nach oraler Zufuhr mit 0,85 % eine mehr als doppelt so große Absorption wie Chrompropionat (0,36 %). Am Beispiel von $^{51}\text{CrCl}_3$ wurde die Dosisabhängigkeit (0,02-50 $\mu\text{g}/\text{Ratte}$) der intestinalen Absorption untersucht. Es zeigte sich eine konstante Absorptionsrate, die gegen einen sättigbaren Mechanismus und mehr für eine Diffusion als Aufnahmemechanismus spricht. Dies stimmt mit früheren mehr indirekt gewonnenen Befunden in der Literatur überein.

Für die Absorption könnte die Komplexstabilität der jeweiligen Chromkomplexe in wässriger Lösung eine Rolle spielen. Nach erfolgreicher Absorption sind hauptsächlich die Serumproteine für den Chromtransport verantwortlich. Dabei kommt vor allem dem Transferrin eine entscheidende Rolle zu. Mit steigenden Chrommengen übernehmen dann aber auch andere Serumproteine den Chromtransport. Auf diese Weise scheint eine Interaktion mit dem Eisenstoffwechsel verhindert zu werden.

Die hier untersuchten Chromverbindungen zeigten ähnliche biologische Halbwertszeiten, die sich auf Verteilungspools identischer Größe bezogen. Kurzfristig variiert die Ganzkörperretention verbindungsabhängig. Verfolgt man die Ganzkörperretention aber über einen Zeitraum von mehreren Wochen, fällt auf, dass sie sich unabhängig von verabreichter Verbindung und Chromdosis mit der Zeit immer mehr angleicht. Folglich scheint der Chromhaushalt einer mittel- bis langfristigen Regulation zu unterliegen. Diese Tendenz zeigten dann auch die Gewebsanalysen nach intraperitonealer Zufuhr von $^{51}\text{Chrom}_2$ -Transferrin im Vergleich zu Versuchen mit $^{51}\text{Chrom}$ picolinat. $^{51}\text{Chrom}$ konnte in allen untersuchten Geweben wiedergefunden werden. Die höchsten Gewebsspiegel hatten die Leber, die Nieren und die Milz. Die Analyse des Leberzellzytosols zeigte, dass 90 % des Chroms mit hochmolekularen Leberproteinen assoziiert war. Hier besteht möglicherweise ein Zusammenhang mit der 3. biologischen Halbwertszeit. Einschränkend muss gesagt werden, dass die hier verwendeten Substanzmengen methodisch bedingt unphysiologisch hoch waren, was ein generelles Problem der gesamten bisherigen Chromforschung darstellt.

Die Versuche mit Stoffwechsellkäfigen bestätigten die große Bedeutung der Niere als Hauptausscheidungsorgan von absorbiertem Chrom. Doch auch die fäkale Ausscheidung war mit 10 % für Chrom-L-Phenylalanin und sogar 15 % für Chrompropionat von Bedeutung.

Die Erkenntnisse dieser Arbeit wurden zusammenfassend in einem Chromstoffwechselschema unter 5.10 dargestellt.

7 Literaturverzeichnis

Abraham AS, Brooks BA, Eylath U (1992) The effects of chromium supplementation on serum glucose and lipids in patients with and without non-insulin-dependent diabetes. *Metabolism* 41: 768-771

Althuis MD, Jordan NE, Ludington EA, Wittes JT (2002) Glucose and insulin responses to dietary chromium supplements: a meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 76: 148-155

American Diabetes Association (2007) Nutrition recommendations and interventions for diabetes. A position statement of the American Diabetes Association. *Diabetes Care* 30: 48-65.

Anderson RA (1989) Essentiality of chromium in humans. *Sci Total Environ* 86: 75-81

Anderson RA (1994) Stress effects on chromium nutrition of humans and animals. In *Biotechnology in the Feed Industry. Proc Alltech Annu Symp 10th Nottingham* pp 267-274. England: Nottingham Univ Press

Anderson RA (1995) Chromium and parenteral nutrition, *Nutrition* 11: 83-86

Anderson RA (1995) Chromium, glucose tolerance, diabetes and lipid metabolism. *J Adv Med* 8: 37-49

Anderson RA (1998) Chromium, glucose Intolerance and diabetes. *J Am Coll Nutr* 17: 548-55

Anderson RA (1998) Chromium: physiology, dietary sources and requirements. In: *Encyclopedia of Human Nutrition*, Sadler MJ, Strain JJ, Caballero B (eds), Academic Press Ltd. London, UK, pp. 388-394

Anderson RA, Kozlovsky AS (1985) Chromium intake, absorption and excretion of subjects consuming self-selected diets. *Am J Clin Nutr* 41: 1177-1183

Anderson RA, Polansky MM (1995) Dietary and metabolite effects on trivalent chromium retention and distribution in rats. *Biol Trace Elem Res* 50: 97-108

Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, Roginski EE, Patterson KY, Veillon C, Glinsmann W (1982) Urinary chromium excretion of human subjects: effects of chromium supplementation and glucose loading *Am J Clin Nutr* 36: 1184-93.

Anderson RA, Bryden NA, Polansky MM (1985) Serum chromium of human subjects: effects of chromium supplementation and glucose. *Am J Clin Nutr* 41: 571-577

Anderson RA, Polansky MM, Bryden NA, Bhathena SJ, Canary JJ (1987) Effects of supplemental chromium on patients with symptoms of reactive hypoglycemia, *Metabolism* 36: 351-355

Anderson RA, Bryden NA, Polansky MM, Gautschi K (1996) Dietary chromium effects on tissue chromium concentrations and chromium absorption in rats. *J. Trace Elem Exp Med* 9: 11-25

Anderson RA, Bryden NA, and Polansky MM (1997) Lack of toxicity of chromium chloride and chromium picolinate in rats. *J Am Coll Nutr* 16: 273-279

Anderson RA, Cheng N, Bryden N, et al (1997) Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 46: 1786-1791

Borel JS, Anderson RA. (1984) Chromium Pp. 175-199 in Biochemistry of the Essential Ultratrace Elements, E. Frieden (ed), New York: Plenum Press

Borguet F, Cornelis R, Lameire N (1990) Speciation of chromium in plasma and liver tissue of endstage renal failure patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Biol Trace Elem Res* 26-27: 449-460

Borguet F, Cornelis R, Delanghe J, Lambert M-C, Lameire N (1995) Study of the chromium binding in plasma of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clin Chim Acta* 238: 71-84

Bourn DM, Gibson RS, Martinez OB, MacDonald AC (1986) The effect of chromium supplementation on serum lipids in a selected sample of canadian postmenopausal women. *Biol Trace Elem Res* 9: 197-205

Brock JH. (1985) Transferrins. In: Metalloproteins Harrison PM (ed) Vol. 2, pp. 183-262. Mac Millan, London, UK

Brown RO, Forloines-Lynn S, Cross RE, Heizer WD (1986) Chromium deficiency after long-term total parenteral nutrition. *Dig Dis Sci* 31: 661-664

Bunker VW, Lawson MS, Delves HT, Clayton BE (1984) The uptake and excretion of chromium by the elderly. *Am J Clin Nutr* 39: 797-802

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

Cerulli J, Grabe DW, Gauthier I, Malone M, McGoldrick MD (1998) Chromium picolinate toxicity. *Ann Pharmacother* 32: 428-431

Chakov NE, Collins RA, Vincent JB (1999) A reinvestigation of the electronic spectra of chromium (III) picolinate complexes and high yield synthesis and characterization of $\text{Cr}_2(\mu\text{-OH})_2(\text{pic})_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Hpic = picolinic acid). *Polyhedron* 18: 2891-2897

Chen G, Liu P, Pattar GR, Tackett L, Bhonagiri P, Strawbridge AB, Elmendorf JS (2006) Chromium activates glucose transporter 4 trafficking and enhances insulin-stimulated glucose transport in 3T3-L1 adipocytes via a cholesterol-dependent mechanism. *Molecular Endocrinology* 20 (4): 857-870

Chen NSC, Tsai A, Dyer IA (1973) Effect of chelating agents on chromium absorption in rats. *Nutrition* 103: 1182-1186

Clancy SP, Clarkson PM, Dechecke ME, Nosaka K, Freedson PS, Cunningham JJ, Valentine B (1994) Effects of chromium picolinate supplementation on body composition, strength, and urinary chromium loss in football players. *Int J Sport Nutr* 4: 142-153

Clodfelder BJ, Vincent JB (2005) The time-dependent transport of chromium in adult rats from the bloodstream to the urine. *J Biol Inorg Chem* 10: 383-393.

Clodfelder BJ, Emamaullee J, Hepburn DD, Chakov NE, Nettles HS, Vincent JB (2001) The trail of chromium (III) in vivo from the blood to the urine: the roles of transferrin and chromodulin. *J Biol Inorg Chem* 6: 608-617

Clodfelder BJ, Chang C, Vincent JB (2004) Absorption of the biomimetic chromium cation triaqua- μ_3 -oxo- μ -hexapropionatotrichromium(III) in rats. *Biol Trace Element Res* 98: 159-169

Cohen MD, Kargacin B, Klein CB and Costa M (1993) Mechanisms of chromium carcinogenicity and toxicity. *Crit Rec Toxicol* 23: 255-281

Connett PH, Wetterhahn KE (1983) Metabolism of the carcinogen chromate by cellular constituents. *Struct Bonding* 54: 93-124

Cotzias GC (1967) Trace Substances. *Environ Health-Proc, Univ. Mo Annu. Conf*: p.5

Davis CM, Vincent JB (1997) Chromium oligopeptide activates insulin receptor tyrosine kinase activity. *Biochem* 36: 4382-4385

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

Davis ML, Seaborn CD, Stoecker BJ (1995) Effects of over-the-counter drugs on chromium retention and urinary excretion in rats. *Nutr Res* 15: 201-205

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

Davis CM, Royer AC, Vincent JB (1997) Synthetic multinuclear chromium assembly activates insulin receptor kinase activity: functional model for low-molecular-weight-chromium binding substance. *Inorg Chem* 36: 5316-5320

De Flora S, Wetterhahn KE (1989) Mechanisms of chromium metabolism and genotoxicity. *Life Chem Rep* 7: 169-244

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

Donaldson RM, Barreras RF (1966) Intestinal absorption of trace quantities of chromium. *J Lab Clin Med* 68: 484-493

Donaldson DL, Rennert OM (1981) Chromium(III) metabolism by the kidney. *Ann Clin Lab Science* 11: 377-385

Dowling HJ, Offenbacher EG, Pi-Sunyer FX (1989) Absorption of inorganic, trivalent chromium from the vascularly perfused rat small intestine. *J Nutr* 119: 1138-1145.

Earnshaw A, Figgis BN, Lewis J (1966) Chemistry of polynuclear compounds. Part IV. Magnetic properties of trimeric chromium and iron carboxylates. *J Chem Soc (A)*: 1656-1663

Evans GW (1989) The effects of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. *Int J Biosoc Med Res* 11: 163-180

Evans GW, Pouchnik DJ (1993) Composition and biological activity of chromium-pyridine carboxylate complexes. *J Inorg Biochem* 49: 177-187

Fowler JF Jr (2000) Systemic contact dermatitis caused by oral chromium picolinate. *Cutis* 65: 116

Fox G, Sabovic Z (1998) Chromium picolinate supplementation for diabetes mellitus. *J Fam Pract* 46: 83-86

Freund H, Atamian S, Fischer J (1979) Chromium deficiency during total parental nutrition. *JAMA* 241: 496-498

Gibson RS, Scythes CA (1984) Chromium, selenium, and other trace elements intakes of a selected sample of canadian premenopausal women. *Biol Trace Element Res* 6: 105-116

Glinsmann W, Mertz W (1966) Effect of trivalent chromium on glucose tolerance. *Metabolism* 15: 510-520

Hahn CJ, Evans GW (1975) Absorption of trace metals in the zinc-deficient rat. *Am J Physiol* 228: 1020-1023

Hallmark MA, Reynolds TH, Desouza CA, Dotson CO, Anderson AA, Rogers MA (1996) Effect of chromium and resistive training on muscle strength and body composition. *Med Sci Sports Exerc* 28: 139-144

Hambridge KM. (1971) Chromium nutrition in the mother and the growing child. In: Mertz W, Cornatzer WE (eds) *Newer trace elements in nutrition*. Marcel Dekker Inc, New York pp. 169-174

Hepburn DDD, Xiao J, Bindom S, et al (2003) Nutritional supplement chromium picolinate causes sterility and lethal mutations in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3766-3771

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

Hopkins LL, Ransome-Kuti O, Majaj AS (1968) Improvement of Impaired Carbohydrate Metabolism by Chromium(III) in malnourished infants. *Am J Clin Nutr* 21: 203-211

Huszonek J (1993) Over-the-counter chromium picolinate. *Am J Psychiatry* 150: 1560-1561

Jain R, Verch RL, Wallach S, Peabody RA (1981) Tissue chromium exchange in the rat. *Am J Clin Nutr* 34: 2199-2204

Jacquamet L, Sun YJ, Hatfield J, Gu WW, Cramer SP, Crowder MW, Lorigan GA, Vincent JB, Latour JM (2003) Characterization of chromodulin by x-ray absorption and electron paramagnetic resonance spectroscopies and magnetic susceptibility measurements. *J Am Chem Soc* 125: 774-780

Jeejeebhoy KN (1999) The role of chromium in nutrition and therapeutics and as a potential toxin. *Nutrition Reviews* 57, No.11: 329-335

Jeejeebhoy KN, Chu RC, Marliss EB, Greenberg GR, Robertson AB (1977) Chromium deficiency, glucose intolerance and neuropathy reversed by chromium supplementation, in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *Am J Clin Nutr* 30: 531-538

Kaats GR, Blum K, Fisher JA, Adelman JA (1996) Effect of chromium picolinate supplementation on body composition: A randomized double-masked placebo-control study. *Curr Ther Res* 57: 747-755

Kandror KV (1999) Insulin regulation of protein traffic in rat adipocyte cells. *J Biol Chem* 274: 25210-25217

Kottwitz K (2007) Untersuchungen zum Chromstoffwechsel in der Ratte: Synthese, Absorption und Retention von ⁵¹Chromverbindungen. Med. Dissertation, Universität Hamburg

Lefavi RG, Wilson GD, Keith RE, Anderson RA, Blessing DL, Hames CG, McMillan JL (1993) Lipid-lowering effect of dietary chromium(III)-nicotinate acid complex in male athletes. *Nutr Res* 13: 239-249

Levina A, Hugh HH, Lay PA (2007) X-ray absorption and EPR spectroscopic studies of the biotransformation of chromium(VI) in mammalian cells. Is chromodulin an artefact of isolation methods? *J Am Chem Soc* 129: 1065-1075

Lim TH, Sargent III T, Kusubov N (1983) Kinetics of trace element chromium(III) in the human body. *Am J Physiol* 244: R445-R454

Lukaski, HC (1999) Chromium as a supplement. *Annu Rev Nutr* 19: 279-302

Lukaski HC, Bolonchuk WW, Siders WA, Milne DB (1996) Chromium supplementation and resistance training: effects on body composition, strength and trace elements status of men. *Am J Clin Nutr* 63: 954-965

Manygoats KR, Yazzie M, Stearns DM (2002) Ultrastructural damage in chromium picolinate-treated cells: a TEM study. *J Biol Inorg Chem* 7: 791-798

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

Martin WR and Fuller RE (1998) Suspected chromium picolinate-induced rhabdomyolysis. *Pharmacotherapy* 18: 428-431

Mertz W (1969) Chromium occurrence and function in biological systems. *Physiol Rev* 49: 163-239

Mertz W, Underwood EJ (1987) Introduction. Trace elements in human and animal nutrition 1: 1-19, 5th ed, San Diego, Acad Press

Mertz W (1998) Chromium research from a distance: From 1959 to 1980. *J Am Coll Nutr* 17: 544-547

Mertz W, Roginski EE (1969) Effect of chromium(III) supplementation on growth and survival under stress in rats fed low protein diets. *J Nutr* 97: 531-536

Mertz W, Roginski EE (1971) Chromium metabolism: The glucose tolerance factor. In Mertz W, Cornatzer WE (eds): "Newer trace elements in nutrition." New York Marcel Dekker: pp. 123-153

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

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

Mossop R (1983) Effects of chromium(III) on fasting blood glucose, cholesterol and cholesterol HDL levels in diabetics. *Cent Afr J Med* 29: 80-82

Morris BW, Blumsohn W, Mac Neil S, Gray TA (1992) The trace element chromium- a role in glucose homeostasis. *Am J Clin Nutr* 55: 989-991

Morris BW, Gray TA, Mac Neil S (1993a) Glucose-dependent uptake of chromium in human and rat insulin-sensitive tissues. *Clin Sci* 84: 477-482

Morris BW, Mac Neil S, Stanley K, Gray TA, Fraser R (1993b) The inter-relationship between insulin and chromium in hyperinsulinaemic euglycemic clamps in healthy volunteers. *J Endocrinol* 139: 339-345

Nath R, Minocha J, Lyall V, et al (1979) Assessment of chromium metabolism in maturity onset and juvenile diabetes using chromium 51 and therapeutic response of chromium administration on plasma lipids, glucose tolerance and insulin levels. In: Shapcott D, Hubert J, eds. *Chromium in nutrition and metabolism*. Amsterdam: Elsevier/ North- Holland: 213-221

Newman HAI, Leighton RF, Lanese RR, Freedland NA (1978) Serum chromium and angiographically determined coronary artery disease. *Clin Chem* 24: 541-544

Oberleas D, Li Y-C, Stoecker BJ, Henley SA, Keim KS, Smith Jr. JC (1990) The rate of chromium transit through the gastrointestinal tract. *Nutr Res* 10: 1189-1194

Offenbacher EG (1994) Promotion of chromium absorption by ascorbic acid. Trace Elem Electrolytes 11: 178

Offenbacher EG, Spencer H, Dowling HJ, et al (1986) Metabolic chromium balances in men. Am J Clin Nutr 44: 77-82

Olin KL, Stearns DM, Armstrong WH, Keen CL (1994) Comparative retention of ⁵¹chromium (⁵¹Cr) from ⁵¹Cr chloride, ⁵¹Cr nicotinate and ⁵¹Cr picolinate in a rat model. Trace Elem Electrolytes 11: 182-186

Onkelinx C (1977) Compartment analysis of metabolism of chromium(III) in rats of various ages. Am J Physiol 232: 478-484

Pittler MH, Edzard E (2004) Dietary supplements for body-weight reduction: a systematic review. Am J Clin Nutr 79: 529-536

Press RI, Geller J, Evans GW (1990) The effect of chromium picolinate on cholesterol and apolipoprotein fractions in human subjects. West J Med 152: 41-45

Rabinowitz M, Gonick H, Levin S, Davidson M (1983) Clinical trial of chromium and yeast supplements on carbohydrate and lipid metabolism in diabetic men. Biol Trace Elem Res 5: 449-466

Ravina A, Slezak L, Mirsky N, Bryden N, Anderson RA (1999) Reversal of corticosteroid-induced diabetes mellitus with supplemental chromium. Diabet Med 16: 164-167

Riales R, Albrink MJ (1981) Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high density lipoprotein of adult men. Am J Clin Nutr 34: 2670-2678

Roeback JR Jr, Mae K, Chambless LE, Fletcher RH (1991) Effects of chromium supplementation on serum high-density lipoprotein cholesterol levels in men taking beta-blockers. *Ann Intern Med* 115: 917-924

Roginski EE, Mertz W (1969) Effects of chromium(III) supplementation on glucose and amino acid metabolism in rats fed a low protein diet. *J Nutr* 97: 525-530

Schroeder HA (1966) Chromium deficiency in rats: a syndrom simulating diabetes mellitus with retarded growth. *J Nutr* 88 (4): 439-445

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

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

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

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

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

Seaborn CD, Stoecker BJ (1992) Effects of ascorbic acid depletion and Cr status on retention and urinary excretion of chromium. *Nutr Res* 12: 1229

Sherman L, Glennon J, Brechw, Klomberg G, Gordon E (1968) Failure of trivalent chromium to improve hyperglycemia in diabetes mellitus. *Metabolism* 17: 439-442

Sipowicz, MA, Anderson LM, Utermahlen Jr. WE, Issaq HJ, Kasprzak KS (1997) Uptake and tissue distribution of chromium(III) in mice after a single intraperitoneal or subcutaneous administration. *Toxicology Letters* 93: 9-14

Speetjens JK, Collins RA, Vincent JB, Woski SA (1999) The nutritional supplement chromium(III) tris (picolinate) cleaves DNA. *Chem Res Toxicol* 12: 483-487

Sreejayan N, Dong F, Kandadi MR, Yang X, Ren J (2008) Chromium alleviates glucose intolerance, insulin resistance, and hepatic ER stress in obese mice. *Obesity* 16: 1331-1337

Stearns DM (2000) Is chromium a trace essential metal? *Bio factors* 11: 149-162

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

Stearns DM, Silveira SM, Wolf KK et al (2002) Chromium(III) tris (picolinate) is mutagenic at the hypoxanthine (guanine) phosphoribosyl transferase locus in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res* 513: 135-142

Sumrall KH, Vincent JB (1997) Is glucose tolerance factor an artifact produced by acid hydrolysis of low-molecular-weight-chromium-binding-substance? *Polyhedron* 16: 4171-4177

Sun Y, Clodfelder BJ, Shute AA, Irvin T, Vincent JB (2002) The biomimetic $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ decreases plasma insulin, cholesterol, and triglycerides in healthy and type II diabetic rats but not type I diabetic rats. *J Biol Inorg Chem* 7: 852-862

Tezuka M, Momiyama K, Edano T, Okada S (1991) Protective effect of chromium(III) on acute lethal toxicity of carbon tetrachloride in rats and mice. *J Inorg Biochem* 42: 1-8

Toepfer EW, Mertz W, Polansky MM, Roginski EE, Wolfe WR (1977) Preparation of chromium-containing material of glucose tolerance factor activity from brewer's yeast extracts and by synthesis. *J Agricul Food Chem* 25: 162-166

Tonks NK (2003) PTP1B: From the sidelines to the front lines! *FEBS Lett* 546: 140-148

Trent LK, Thieding-Cancel D (1995) Effects of chromium picolinate on body composition. *J Sports Med Phys Fitness* 35: 273-280

Urberg M, Benyi J, John R (1988) Hypocholesterolemic effects of nicotinic acid and chromium supplementation. *J Fam Pract* 27: 603-606

Vincent JB (1999) Mechanisms of chromium action: Low-molecular-weight chromium-binding-substance. *J Am Coll Nutr* 18: 6-12

Vincent, JB (2000) Elucidating a biological role for chromium at a molecular level. *Acc Chem Res* 33: 503-510

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

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

Visek WJ, Whitney IB, Kuhn III USG, Comar CL (1953) Metabolism of ⁵¹Cr by animals as influenced by chemical state. *Proc Soc Exptl Biol Med* 84: 610-615

Volpe SL, Huang H-W, Larpadisorn K, Lesser II (2001) Effect of chromium supplementation and exercise on body composition, resting metabolic rate and selected biochemical parameters in moderately obese women following an exercise program. *J Am Coll Nutr* 20 No4: 293-306

Wang H, Kruszewski A, Brautigam DL (2005) Cellular chromium enhances activation of insulin receptor kinase. *Biochemistry* 44: 8167-8175

Wang MM, Fox EA, Stoecker BJ, Menendez CE, Chan SB (1989) Serum cholesterol of adults supplemented with brewer's yeast or chromium chloride. *Nutr Res* 9: 989-998

Wang ZQ, Zhang XH, Russell JC, Hulver M, Cefalu WT (2006) Chromium picolinate enhances skeletal muscle cellular insulin signaling in vivo in obese, insulin-resistant JCR: LA-cp rats. *Am J Nutr* 136: 415-420

Yamamoto A, Wada O, Ono T (1984) Distribution and chromium-binding capacity of a low-molecular-weight-chromium-binding-substance in mice. *J Inorg Biochem* 22: 91-102.

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

Yang X, Palanichamy K, Ontko AC, Rao MNA, Fang CX, Ren J, Sreejayan N (2005) A newly synthetic chromium complex- chromium(phenylalanine)₃ improves insulin responsiveness and reduces whole body glucose tolerance. *FEBS Lett* 579: 1458-1464

Yeh GY, Eisenberg DM, Kaptchuk TJ, Phillips RS (2003) Systematic review of herbs and dietary supplements for glycaemic control in diabetes. *Diabetes Care* 26: 1277-1294

8 Danksagung

Ich bedanke mich bei Frau Prof. Dr. Dr. Ulrike Beisiegel dafür, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben hat an ihrem Institut zu promovieren.

Mein ganz besonderer Dank geht an Herrn PD Dr. Dr. Peter Nielsen für die kontinuierliche wissenschaftliche Beratung, Betreuung und Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe

Eisenstoffwechsel, im Besonderen bei Herrn Dr. Rainer Engelhardt, Herrn Dr. Roland Fischer sowie Frau Rosemarie Kongi für die freundliche Unterstützung bedanken.

9 Lebenslauf

10 Eidesstattliche Erklärung

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 anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift

