

Ewelina Król, Zbigniew Krejpcio

Katedra Higieny Żywności Człowieka, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu

# Poglądy na temat roli chromu (III) w zapobieganiu i leczeniu cukrzycy

Opinions on the role of chromium (III) in the prevention and control of diabetes

## STRESZCZENIE

W niniejszej pracy dokonano przeglądu dostępnej literatury dotyczącej poglądów na temat roli chromu (III) w zapobieganiu i leczeniu cukrzycy typu 2. W badaniach wykazano, że chrom (III) jest niezbędny w regulacji gospodarki węglowodanowej i lipidowej, a jego działanie polega między innymi na zwiększeniu liczby receptorów dla insuliny oraz aktywacji receptora insulinowego przez jego fosforylację. Niektórzy badacze uważają, że niedobór chromu (III) w organizmie może prowadzić do nietolerancji glukozy i wystąpienia objawów cukrzycy typu 2. Ponadto u chorych na cukrzycę typu 2 stężenie chromu w tkankach może być obniżone, w związku z tym niektórzy autorzy zalecają suplementację tym pierwiastkiem. W pracy przytoczono wyniki badań na zwierzętach, rezultaty prób klinicznych oraz omówiono czynniki, które mogą wpływać na efekt suplementacji chromem. Jednak ze względu na ograniczenia metodologiczne wielu badań klinicznych stanowisko głównych towarzystw diabetologicznych w sprawie wskazań do suplementacji chromem u chorych na cukrzycę oraz u osób z otyłością pozostaje nadal negatywne. (*Diabet. Prakt.* 2008; 9: 168–175)

Słowa kluczowe: cukrzyca, chrom, suplementacja

Adres do korespondencji: prof. dr hab. Zbigniew Krejpcio  
Katedra Higieny Żywności Człowieka  
Uniwersytet Przyrodniczy  
ul. Wojska Polskiego 31, 60-624 Poznań  
tel.: (061) 848 73 36 (061) 848 73 34, faks: (061) 848 73 32  
e-mail: zkre@up.poznan.pl  
Nadesłano: 05.09.2008

Przyjęto do druku: 23.09.2008

## ABSTRACT

In this work the review of the literature about the role of chromium (III) in prevention and control of diabetes was presented. Studies indicate that Cr (III) is necessary for regulation of carbohydrate and lipid metabolism mainly due to increasing the number of insulin receptors and its activation by phosphorylation. Some authors believe that chromium (III) deficiency can lead to glucose intolerance and symptoms of type 2 diabetes. Moreover, in type 2 diabetic patients tissular chromium levels may be decreased, therefore some authors recommend chromium supplementation. The animal and human studies in that subject as well as factors affecting chromium supplementation were discussed. However, due to methodological limitations of many clinical studies, the statements of major diabetes associations concerning recommendation from chromium supplementation in individuals with diabetes and obesity still remains negative. (*Diabet. Prakt.* 2008; 9: 168–175)

Key words: diabetes, chromium, supplementation

## Wstęp

Każdego roku liczba chorych na cukrzycę typu 2 wzrasta o 11%. Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, *World Health Organization*) szacuje, że w 2030 roku na cukrzycę będzie chorowało 366 milionów mieszkańców Ziemi [1]. W związku z tym poszukuje się środków zaradczych, w tym substancji, które wykazywałyby działanie prewencyjne lub terapeutyczne w stosunku do tej choroby. Takie nadzieje wiąże się między innymi z chromem. Chrom występuje najczęściej w dwóch formach chemicznych: heksawalentnej ( $\text{Cr}^{+6}$ ) oraz trivalentnej ( $\text{Cr}^{+3}$ ). Chrom (VI) jest wykorzystywany przede wszystkim w prze-

myśle i uznawany za kancerogen. Chrom (III) jest natomiast pierwiastkiem śladowym, który pozostaje w kręgu zainteresowań naukowych od końca lat 50. XX wieku, kiedy to Schwartz i Mertz [2] odkryli, że jest on niezbędny do przywracania normalnego stężenia glukozy we krwi u szczurów i wchodzi w skład tak zwanego czynnika tolerancji glukozy (GTF, *glucose tolerance factor*). Czynnikiem ten jest kompleksem, który poza chromem (III) tworzą także kwas nikotynowy oraz aminokwasy: kwas glutaminowy, glicyna i cysteina. Jednak początki badań nad klinicznym wykorzystaniem chromu (III) w łagodzeniu objawów nietolerancji glukozy sięgają lat 70. XX wieku, gdy Jeejeebhoy i wsp. [3] zaobserwowali objawy nietolerancji glukozy u pacjentki żywionej przez 3 lata pozajelitowo. Podawanie związków chromu (III) w ilości 250  $\mu\text{g}$  dziennie spowodowało cofnięcie się występujących objawów w ciągu 2 tygodni. Uzyskane wyniki pozwoliły wysunąć hipotezę, że niedobór chromu (III) w organizmie może prowadzić do nietolerancji glukozy i wystąpienia objawów cukrzycy typu 2. Jak dotychczas, stwierdzono, że rola chromu (III) polega na zwiększeniu liczby receptorów dla insuliny oraz aktywacji receptora insulinowego przez jego fosforylację [4, 5]. W badaniach przeprowadzonych ostatnio przez Wu i wsp. [6] wykazano ponadto, że chrom (III) wpływa na ekspresję układu transportowego dla glukozy zlokalizowanego w mięśniach szkieletowych i adipocytach (GLUT4, *glucose transporter*). Wydaje się, że może to być jeden z mechanizmów, poprzez który chrom poprawia wskaźniki gospodarki węglowodanowej i lipidowej u szczurów. Obecnie suplementy zawierające chrom (III) cieszą się dużą popularnością wśród chorych na cukrzycę oraz otyłych osób pragnących uregulować glikemię i zmniejszyć masę ciała, dlatego w niniejszej pracy postanowiono przybliżyć znaczenie chromu (III) w prewencji i leczeniu cukrzycy.

### Spożycie i wchłanianie chromu

Najlepszym źródłem chromu (III) w żywności są przede wszystkim produkty zbożowe, drożdże browarnicze, niektóre gatunki sera oraz jaja [7]. Bezpieczne i zalecane dzienne spożycie chromu (RDA, *recommended dietary allowances*) ustalono w 1989 roku dla osób dorosłych na poziomie 50–200  $\mu\text{g}$  dziennie [8]. Jednak uwzględniając fakt, że spożycie chromu w diecie jest zwykle dużo niższe, objawy niedoborów tego pierwiastka powinny być powszechne. Ponieważ taki stan trudno jest rozpoznać, obecnie obowiązują inne zalecenia, a mianowicie — za wystarczające spożycie chromu (AI, *adequate*

*intake*), ustalone na podstawie średniego poziomu spożycia w diecie, uznaje się wartość 25  $\mu\text{g}$  dziennie dla kobiet i 35  $\mu\text{g}$  dziennie dla mężczyzn [8]. W Polsce w badaniach przeprowadzonych metodą obliczeniową przez Czerwińską i Zadrużną [9] wśród chorych na cukrzycę typu 2 wykazano spożycie chromu w diecie na poziomie 36,2–58,7  $\mu\text{g}$  na osobę dziennie. Jednocześnie Marzec [10] podaje, że średnia oznaczona analitycznie podaż chromu (III) z dietą była wyższa i u kobiet wynosiła 81  $\mu\text{g}$  dziennie, a u mężczyzn — 111  $\mu\text{g}$  dziennie. Podobne wyniki (przeciętnie 110,8  $\mu\text{g}$  dziennie) uzyskali Skibniewska i wsp. [11], badając zawartość chromu (III) w dietach studentów. W ostatnich badaniach przeprowadzonych w 2007 roku Roussel i wsp. [12] stwierdzili, że osoby w starszym wieku spożywały średnio 40,23  $\mu\text{g}$  chromu dziennie, co nie pokrywało zapotrzebowania dla dorosłych — ustalonego we Francji na 125  $\mu\text{g}$  chromu dziennie. Rezultaty porównywalne do wspomnianych wyników stwierdzono także w innych krajach europejskich, między innymi w Finlandii, Szwecji i Szwajcarii [13], chociaż w Hiszpanii podaż chromu w diecie była wyższa i wynosiła około 100  $\mu\text{g}$  chromu dziennie [14].

Chrom (III) występuje w żywności w formach organicznych i nieorganicznych. Jak większość składników mineralnych, jest wchłaniany w jelitach. Następnie przechodzi do krwi i jest transportowany do tkanek. *In vivo*, za wiązanie chromu odpowiadają dwa kompleksy białkowe: transferyna i chromodulina (LMWCr, *low-molecular-weight chromium-binding substance, chromoduline*). Dokładnie nie poznano mechanizmu transportu chromu (III) do komórek ustroju. Zdaniem Clodfelder i wsp. [15] chrom (III) związany z transferyną dzięki receptorowi transferynowemu przechodzi przez błonę komórkową do wnętrza komórek, tworząc endosom, gdzie wskutek zmiany pH kompleks transferyna–chrom (III) się rozpada. Następnie w cytoplazmie chrom (III) wiąże się z apochromoduliną (apo LMWCr), tworząc czynny kompleks LMWCr, który uaktywnia kinazę tyrozynową odpowiedzialną za fosforyzację receptora insulinowego.

Warto wspomnieć, że absorpcja jelitowa chromu jest niewielka i zależy od formy chemicznej, przy czym formy organiczne są lepiej przyswajalne niż nieorganiczne (tab. 1).

W badaniach eksperymentalnych stwierdzono, że przyswajalność chromu (III) zwiększają niektóre aminokwasy, czyli glicyna, kwas asparaginowy [17] i kwas askorbinowy [18], zaś ograniczają cukry proste [19] oraz składniki mineralne, takie jak cynk i żelazo. Ze względu na zaburzenia w gospodarce

**Tabela 1. Przewidywalność różnych form chromu (III) [16]**

Forma chromu (III)	Absorpcja jelitowa (%)	Podmiot badań
Chlorek	0,9 ± 0,2	Szczury
	0,69	Ludzie
	0,5	Szczury
Nikotynian	1,3 ± 0,3	Szczury
Pikolinian	1,1 ± 0,3	Szczury
	2,8 ± 1,14	
Drożdże browarnicze	5–10	Ludzie

mineralnej towarzyszącej cukrzycy warto zwrócić szczególną uwagę na te ostatnie. W badaniach na szczurach suplementacja cynkiem powodowała zmniejszenie absorpcji chromu, a dieta uboga w cynk — wzrost jego stężenia [20]. Jednak jak dotąd nie udało się potwierdzić, czy zależności te występują u osób chorych na cukrzycę. Anderson i wsp. [21], badając efekt skojarzonej suplementacji cynkiem i chromem, zaobserwowali zwiększone wydalanie chromu z moczem w grupie, w której podawano cynk i placebo przez 6 miesięcy. Autorzy wyjaśniają jednak, że jest to raczej wpływ czasu niż interakcji zachodzących między tymi pierwiastkami.

Ze względu na wspólny przenośnik białkowy dla żelaza i chromu — transferynę, przewidywalność chromu może także zmniejszać nadmierna podaż żelaza. Surgent i wsp. [22] postawili hipotezę, że nadmiar żelaza w organizmie, występujący u osób chorych na dziedziczną hemochromatozę, może kompetycyjnie hamować wiązanie chromu, prowadząc do wystąpienia objawów cukrzycy. Potwierdzeniem tej hipotezy może być fakt, że pacjenci z tą chorobą mają obniżone stężenie chromu w osoczu.

### Ocena stanu odżywienia chromem

Stan odżywienia organizmu danym składnikiem zależy od poziomu jego spożycia, absorpcji oraz wydalania z organizmu. Ocena stanu odżywienia mineralnego można określić na podstawie liczby składników oraz ich metabolitów w płynach ustrojowych, wydzielinach i wydalinach, takich jak: krew, mocz, ślina, pot, czasem także w wytworach naskórki (włosy i paznokcie). Jednak określenie stanu odżywienia chromem (III) jest niezwykle trudne ze względu na jego bardzo niskie stężenie w tkankach i płynach ustrojowych. Dotychczas badacze najczęściej określali stężenie tego pierwiastka w moczu i surowicy. W cukrzycy typu 2 zaobserwowano zwiększone wydalanie chromu z moczem [23], co świadczy o niewielkiej reabsorpcji tego pierwiastka przez nerki w warunkach hiperglikemii. Sugeruje to także

możliwość wystąpienia niedoborów chromu, które dodatkowo wpływają negatywnie na gospodarkę glukozą. Ponadto stwierdzono istotne korelacje między niskim stężeniem chromu w surowicy [23], we włosach [24] oraz w paznokciach [25] z występowaniem cukrzycy typu 2. Zauważono także, że w czasie pierwszych 2 lat trwania choroby stężenie chromu w osoczu jest odwrotnie skorelowane ze stężeniem glukozy w osoczu, ale ta tendencja zanika przy dłuższym przebiegu choroby [26]. W tej sytuacji niektórzy autorzy [26] zalecają zwiększenie podaży tego pierwiastka w postaci suplementów.

### Badania na zwierzętach

Rozważając rolę chromu (III) w cukrzycy, przeprowadzono wiele badań z wykorzystaniem modeli zwierzęcych — zarówno cukrzycy typu 1, jak i typu 2. Na przykład Machaliński i wsp. [27] porównali działanie pikolinianu chromu (CrPic) i innego związku chromu, tak zwanego CRC454, u szczurów z wywołaną farmakologicznie cukrzycą typu 1 (dootrzewnowa iniekcja streptozotocyny). W przypadku obu form chromu stwierdzono zdolność do obniżania hiperglikemii (odpowiednio o 11% i 38%), a w przypadku CRC454 — także zwiększone spożycie paszy, co prowadziło do wzrostu masy ciała szczurów. Ponadto CrPic i CRC454 powodowały także obniżenie stężenia enzymów ALT (odpowiednio o 64% i 59%), ASP (odpowiednio WSP 67% i 62%) i CK (odpowiednio o 26% i 16%) we krwi, co może świadczyć o poprawie funkcjonowania wątroby i mięśni szkieletowych. Jednak nie wyjaśniono mechanizmu, który mógł doprowadzić do takiego stanu. Jain i wsp. [28] w podobnym modelu badali wpływ dwóch form chromu (III): pikolinianu i niacynianu — nie tylko na gospodarkę węglowodanową i lipidową, ale także na stężenie cytokin prozapalnych. Trwająca 7 miesięcy suplementacja wymienionymi związkami w dawce 400 µg Cr/kg mc./dzień spowodowała obniżenie stężenia czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF-α, *tumor necrosis factor-α*), interleukiny 6 (IL-6) i peroksydacji lipidów. Ponadto niacynian chromu (III) korzystnie wpłynął na stężenie hemoglobiny glikowanej, triacylogliceroli, białka C-reaktywnego (CRP, *C-reactive protein*) i wydaje się związkiem bardziej skutecznym od pikolinianu. Wyniki badań zespołu autorów niniejszej pracy [29], przeprowadzonych na szczurach z wywołaną cukrzycą typu 1, karmionych dietą wzbogaconą w chrom oraz fruktany, także potwierdzają skuteczność związków chromu. Stwierdzono między innymi, że 5-tygodniowa suplementacja kompleksem trójwartościowego chromu (III) z kwasem propio-

nowym ( $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$ ) w ilości 5 mg Cr/kg diety skutecznie obniżała glikemię (o 26%) i insulinooporność (o 35%); zaobserwowano też wzrost wydajności beta-oksydacji kwasów tłuszczowych w limfocytach (o ok. 10%).

Wywołanie cukrzycy typu 2 u zwierząt jest trudnym zadaniem, gdyż jak dotąd nie stworzono optymalnego modelu zwierzęcego tej choroby. Istnieje jednak kilka pośrednich sposobów wywołania zaburzeń metabolicznych charakterystycznych dla cukrzycy typu 2, między innymi manipulacja genetyczna [30]. Kim i wsp. [31] zaobserwowali, że 4-tygodniowa suplementacja pikolinianem chromu w ilości 100 mg Cr/kg mc./dzień u szczurów Goto-Kakizaki z genetycznie wywołaną cukrzycą powodowała wzrost masy ciała oraz poprawiała wrażliwość insuliny. Wpływ suplementacji kationu biomimetycznego — propionianu chromu (III) na organizm zdrowych szczurów w początkowym stadium cukrzycy typu 2 (szczury ZKO) oraz z cukrzycą typu 2 (szczury *Zucker obese*) badali Clodfelder i wsp. [32]. Podawanie tego związku przez 24 tygodnie w dawkach 1000  $\mu\text{g}$  Cr/kg mc./dzień powodowało obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji LDL, triacylogliceroli, insuliny (stężenia podstawowego i 2 h po obciążeniu glukozą) zarówno u zdrowych osobników, jak i u chorych. Ponadto u zdrowych szczurów wykazywano obniżenie stężenia glukozy w teście obciążenia glukozą, zaś u chorych szczurów stwierdzano obniżenie stężenia cholesterolu frakcji HDL oraz hemoglobiny glikowanej. Wcześniej ten sam zespół [33] wykazał skuteczność suplementacji propionianem chromu (III) już przy niższej dawce. Dawka 20  $\mu\text{g}$  Cr/kg mc./dzień podawana szczurom ZKO przez 24 tygodnie obniżyła stężenie cholesterolu całkowitego, frakcji LDL, HDL, triacylogliceroli oraz insuliny. Kompleks biomimetyczny może mieć duże biologiczne znaczenie, gdyż wykazano jego zdolność do aktywacji kinezy tyrozynowej receptora insulinowego, w czym naśladuje chromodulinę [34].

Inny model cukrzycy typu 2, stosowany przy testowaniu leków i związków o działaniu przeciw cukrzycowym, uzyskuje się, karmiąc szczury dietą wysokotłuszczową, a następnie dokonując iniekcji streptozotocyny. Takie warunki wykorzystali między innymi Sahin i wsp. [35], którzy podawali CrPic w dawce 80  $\mu\text{g}$  Cr/kg mc./dzień przez 10 tygodni szczurom Sprague-Dawley. Autorzy stwierdzili wyraźne obniżenie stężenia glukozy (o 63%), cholesterolu całkowitego (o 9,7%), triacylogliceroli (o 6,6%), wolnych kwasów tłuszczowych (o 24%), mocznika (o 33%) i kreatyniny (o 25%) w surowicy krwi,

w porównaniu z grupą kontrolną. Eksperyment dokonany na szczurach Wistar przez autorów niniejszej pracy [36] także świadczy o korzystnym wpływie chromu w formie kompleksu z kwasem propionowym na wskaźniki biochemiczne krwi w podobnym modelu. Po okresie 6-tygodniowej suplementacji diety wymienionym związkiem w dawkach 10 mg Cr/kg oraz 50 mg Cr/kg odnotowano istotne obniżenie stężenia cholesterolu całkowitego (odpowiednio o 26% i 31%), cholesterolu frakcji LDL (odpowiednio 45% i 36%) oraz triacylogliceroli (w obu grupach po 50%).

### Badania kliniczne z udziałem chorych na cukrzycę typu 2

Choć badania na zwierzętach mogą dostarczać dowodów świadczących o korzystnym wpływie chromu (III) na metabolizm węglowodanów i lipidów, za najbardziej wiarygodne uznaje się próby kliniczne z udziałem ludzi. Jak dotąd brakuje jednoznacznych danych wskazujących na przeciw cukrzycowe działanie tego pierwiastka. W piśmiennictwie można odnaleźć informacje świadczące zarówno o korzystnym wpływie suplementacji chromem (III) na przebieg cukrzycy, jak i o braku takiego oddziaływania.

Należy jednocześnie zwrócić uwagę, że badania z udziałem pacjentów prowadzono, stosując różne dawki, odmienne formy chemiczne chromu o różnicowanej biodostępności oraz różny czas trwania interwencji. Na niejednoznaczność wyników mogły także wpływać: rodzaj stosowanej terapii (dieta, pochodne sulfonilomocznika, metformina czy insulina) oraz różny stopień wyrównania metabolicznego cukrzycy. Ponadto badania prowadzono w różnych rejonach geograficznych świata, wśród ludzi o zróżnicowanym pochodzeniu etnicznym i odmiennych zwyczajach żywieniowych.

Pozytywne wyniki działania chromu (III) uzyskali między innymi Anderson i wsp. [37], analizując wpływ suplementacji pikolinianem chromu u 180 chorych na cukrzycę w Chinach, w badaniu przeprowadzonym metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowanym placebo. Suplementacja 1000  $\mu\text{g}$  chromu dziennie przez 4 miesiące powodowała istotne obniżenie stężenia hemoglobiny glikowanej (ok. 34%), wartości glikemii poposiłkowej (ok. 14%) oraz stężenia insuliny (ok. 18%), a także cholesterolu całkowitego. Podobne badania, choć bez grupy kontrolowanej placebo, przeprowadził w Chinach ten sam zespół [38] u 833 chorych na cukrzycę typu 2, którym przez 10 miesięcy podawano pikolinian chromu w dawce 500  $\mu\text{g}$  dziennie. Odnotowano istotną redukcję stężenia glukozy (o ok. 20%) we krwi już po 1. miesiącu suplementacji.

W badaniach Ghosha i wsp. [39], które przeprowadzono metodą podwójnie ślepej próby, w układzie naprzemiennym, z użyciem placebo, w 50-osobowej populacji Indian przyjmujących 400  $\mu\text{g}$  chromu dziennie przez 28 tygodni, wykazano istotne obniżenie stężenia glukozy (ok. 7%), insuliny (ok. 20%) i hemoglobiny glikowanej we krwi, w porównaniu z grupą stosującą placebo, chociaż nie odnotowano wpływu na gospodarkę lipidową. Pozytywny wpływ suplementacji diety chromem (III) na stężenie insuliny we krwi stwierdzili także Cefalu i wsp. [40] w randomizowanych badaniach z podwójnie ślepą próbą, do których zakwalifikowano 29 chorych na cukrzycę typu 2. Badanym podawano przez 8 miesięcy pikolinian chromu w dawce 1000  $\mu\text{g}$  dziennie. Po 4 miesiącach suplementacji stwierdzono wzrost wrażliwości na insulinę. Należy także wspomnieć, że w niektórych przypadkach dochodziło do zmniejszenia zapotrzebowania na leki oraz insulinę [41].

W badaniach Evans [42] uczestniczyło 14 osób z hipercholesterolemią. Badanym podawano 200  $\mu\text{g}$  chromu dziennie w formie pikolinianu przez 6 tygodni. Stwierdzono istotne obniżenie stężenia wskaźników biochemicznych krwi, takich jak cholesterol całkowity, cholesterol frakcji LDL (o 8%), glukoza (o 24%), natomiast wzrosło stężenie cholesterolu frakcji HDL.

W ostatnio przeprowadzonych przez Martina i wsp. [43] randomizowanych badaniach z podwójnie ślepą próbą potwierdzono zdolność chromu (III) do zahamowania przyrostu masy ciała u chorych na cukrzycę, leczonych pochodną sulfonylomocznika. Ponadto dawka 1000  $\mu\text{g}$  chromu w formie pikolinianu stosowana przez okres 6 miesięcy zmniejszyła insulinoporność, stężenie hemoglobiny glikowanej i wolnych kwasów tłuszczowych w porównaniu z grupą leczoną pochodną sulfonylomocznika, w której podawano placebo.

W piśmiennictwie znaleźć można prace, w których nie potwierdzono korzystnych efektów suplementacji chromem (III) w przebiegu cukrzycy, także przeprowadzone według kryteriów ogólnie przyjętych za najbardziej właściwe (metodą podwójnie ślepej próby, kontrolowane placebo). Na przykład Gunton i wsp. [44] prowadzili badania w grupie 40 pacjentów z upośledzoną tolerancją glukozy, którym podawano pikolinian chromu w dawce 800  $\mu\text{g}$  chromu dziennie przez 3 miesiące. Autorzy nie wykazali żadnych istotnych zmian w tolerancji glukozy, wrażliwości insuliny czy w profilu lipidowym po podaniu chromu (III). Z kolei w badaniach, które przeprowadzili Uusitup i wsp. [45] z udziałem 26 chorych na cukrzycę, nie wykazano wpływu

6-miesięcznej suplementacji chromem (III) w dawce 160  $\mu\text{g}$  dziennie na stężenie cholesterolu całkowitego, cholesterolu frakcji HDL, triglicerydów, insuliny, hemoglobiny glikowanej i glukozy we krwi. W badaniach Kleefstry i wsp. [46] przeprowadzonych w holenderskiej populacji także nie uzyskano zadowalających rezultatów. Po 6-miesięcznym podawaniu pikolinianu chromu (III) w dawkach 500 i 1000  $\mu\text{g}$  dziennie odnotowano tylko nieznaczną (nieistotną statystycznie) korelację między zawartością chromu (III) w surowicy a polepszeniem wskaźników lipidowych we krwi.

Wspomniany brak korzystnych rezultatów jest trudny do interpretacji. Prawdopodobnie pozytywny efekt suplementacji występuje tylko w przypadku znacznych niedoborów chromu (III) w organizmie, a obecnie brakuje odpowiednich narzędzi diagnostycznych, by rutynowo stwierdzać taki stan. Zdaniem Kleefstry i wsp. [46] w społeczeństwie krajów uprzemysłowionych, ze względu na duże spożycie żywności wysoko przetworzonej, niedobory chromu mogą być znacznie większe i w celu ich uzupełnienia powinno się stosować wyższe dawki suplementów tego pierwiastka przez dłuższy czas. Ponadto w ostatnio przeprowadzonych badaniach Wanga i wsp. [47] sugeruje się, że korzystna odpowiedź na suplementację chromem (III) chorych na cukrzycę typu 2 zależy od stwierdzonej wcześniej insulinoporności. Ci sami autorzy we wcześniejszych badaniach na zwierzętach [48] dowiedli, że suplementacja pikolinianem chromu (III) u otyłych insulinopornych szczurów rasy JCR:LA-cp poprawia insulinowrażliwość w porównaniu z nieotyłymi osobnikami.

Przedmiotem badań w ciągu ostatnich kilkunastu lat były także inne typy cukrzycy, takie jak cukrzyca ciążowa czy wywołana kortykosteroidami. Przypuszczalnie w czasie ciąży chrom jest transportowany z krwią przez łożysko z organizmu matki do płodu, co powoduje zmniejszenie zasobów tego pierwiastka w organizmie matki. Potwierdzają to wyniki badań Sanera [49], który stwierdził obniżenie stężenia chromu we włosach wieloródek. Ponadto Aharoni i wsp. [50] zaobserwowali niższe stężenie chromu pod koniec ciąży we włosach kobiet z cukrzycą ciążową w porównaniu ze zdrowymi kobietami w ciąży. Jednocześnie Gunton i wsp. [51] nie stwierdzili zależności między stężeniem chromu w surowicy a nietolerancją glukozy, insulinopornością oraz wskaźnikami lipidowymi u kobiet w 3. trymestrze ciąży. W celu uzupełnienia prawdopodobnych niedoborów chromu (III), dodatkowo pogłębionych wskutek choroby, w cukrzycy ciążowej zaleca się suplementację, co może przynieść korzystne efekty w postaci regulacji glikemii [52].

Innym typem cukrzycy, spowodowanym farmakoterapią, jest choroba wywołana kortykosteroidami. Cukrzyca ta charakteryzuje się insulinoopornością, ketozą i acydozą [53]. W badaniach Raviny i wsp. [53], w których pacjentom podawano CrPic w dawce 200  $\mu\text{g}$  dziennie, odnotowano obniżenie stężenia glukozy; zaistniała też możliwość zmniejszenia stosowanych dawek leków hipoglikemizujących o połowę.

Warto wspomnieć, że stwierdzono również ujemną korelację między statusem chromu (III) a chorobami naczyniowymi serca [23]. W związku z tym niektórzy autorzy zalecają suplementację tym pierwiastkiem również w przypadku schorzeń układu sercowo-naczyniowego.

### Chrom a stres oksydacyjny

Stres oksydacyjny jest następstwem zachwiania równowagi między generowaniem wolnych rodników a ich eliminowaniem przez przeciwutleniacze. Nadmierna generacja wolnych rodników prowadzi do wzmożonej peroksydacji lipidów i jest czynnikiem odgrywającym decydującą rolę w rozwoju blaszki miażdżycowej [54]. Taka sytuacja występuje między innymi w warunkach hiperglikemii. W przebiegu cukrzycy wolne rodniki są generowane przede wszystkim w czasie nieenzymatycznej glikacji białek. Badania nad wpływem związków chromu (III) na wskaźniki stresu oksydacyjnego prowadzili Jain i wsp. [55], którzy na liniach komórkowych, między innymi monocytów i erytrocytów, imitowali warunki panujące w cukrzycy. Badając wpływ trzech form chemicznych chromu: chlorku, pikolinianu i niacynianu na stres oksydacyjny spowodowany ketozą i wysokim stężeniem glukozy na linii komórkowej U937 monocytów, autorzy stwierdzili, że glicynian chromu najefektywniej zmniejszał sekrecję IL-6, IL-8, białka chemotaktycznego monocytów (MCP-1, *monocyte chemotactic protein-1*) oraz obniżał stężenie nadtlenu wodoru. Z kolei ci sami autorzy [56], badając wpływ chlorku chromu (III) na linie komórkowe erytrocytów inkubowanych z glukozą, zaobserwowali zdolność tego związku do inhibicji glikozylacji białek. Przyniesione wyniki badań wskazują na prawdopodobny mechanizm, poprzez który chrom (III) może zmniejszać ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego w cukrzycy.

W badaniach klinicznych Kerkeni i wsp. [57] wykazali, że suplementacja cynkiem i chromem (III) poprawia status antyoksydacyjny (TAS, *total antioxidant status*) u chorych na cukrzycę typu 2. Cheng i wsp. [58] sugerują, że mechanizm antyoksydacyjnego działania chromu (III) prawdopodobnie pole-

ga na obniżeniu bariery oksydacyjnej i minimalizowaniu stresu oksydacyjnego. W badaniach z udziałem chorych na cukrzycę typu 2, którym podawano przez 6 miesięcy chrom (III) w dawce 1000  $\mu\text{g}$  dziennie (w postaci drożdży), wykazano istotne zmniejszenie wskaźników stresu oksydacyjnego we krwi, takich jak obniżenie stężenia substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS, *thiobarbituric acid-reactive substance*) oraz podwyższenie TAS u pacjentów z niewyrównaną glikemią. Jednocześnie autorzy zauważyli, że chrom (III) u osób z prawidłowym stężeniem glukozy we krwi może działać prooksydacyjnie.

### Toksyczność chromu

Uwzględniając fakt, że suplementy chromu znajdują się obecnie na 2. miejscu pod względem sprzedaży na rynku suplementów witaminowo-mineralnych w Stanach Zjednoczonych, należy wspomnieć o możliwości wystąpienia działań niepożądanych wskutek stosowania suplementacji tym pierwiastkiem. Zasadniczo suplementację chromem (III) uznaje się za bezpieczną. Jednak duże dawki pokarmowe chromu (III) przypuszczalnie mogą ograniczać przyswajanie żelaza i cynku, a także wpływać na metabolizm wapnia w kościach. Lukaski i wsp. [59] w badaniach u zdrowych kobiet, którym podawano pikolinian chromu, nie potwierdzili tych zależności w stosunku do żelaza, choć stosowana dawka należała do niskich (200  $\mu\text{g}$ /dzień). W odniesieniu do chorych na cukrzycę, której często towarzyszy nefropatia, należy zbadać możliwość pogłębienia się niekorzystnych zmian wskutek gromadzenia się chromu w nerkach [60]. Jednak wyniki przytoczonych wcześniej badań na zwierzętach, przeprowadzonych przez Sahina i wsp. [31], świadczą raczej o potencjalnie korzystnym działaniu chromu (III) w zapobieganiu występującym w cukrzycy powikłaniom mikronaczyniowym w nerkach. Kilka lat temu pojawiły się informacje na temat kancerogennego działania chromu (III). W badaniach *in vitro* wykazano, że najpowszechniej stosowana forma związków chromu, pikolinian chromu (III), może prowadzić do aberracji chromosomowych w komórkach jajowych chomika chińskiego [61]. Zdolność pikolinianu chromu (III) do formowania wolnych rodników nadtlennokowych wynika, jak się wydaje, z obecności w strukturze aromatycznego ligandu dwudonorowego [16]. W badaniach przeprowadzonych przez innych autorów, w których skupiono się na takich związkach, jak: kompleks chromu z aminokwasami (argininą, kwasem asparaginowym, glicyną, hydroksyproliną i lizyną), glicynianu [16] i propionianu [62], nie

potwierdzono zdolności mutagennych badanych kompleksów.

## Podsumowanie

W związku ze zwiększającą się zachorowalnością na cukrzycę, którą wykrywa się coraz częściej wśród młodszych osób, oraz poszukiwaniem substancji o działaniu przeciwcukrzycowym, obecnie bada się wiele nowych związków chromu (III). Cechy, na które zwraca się szczególną uwagę, to przede wszystkim nietoksyczność oraz wysoka przyswajalność. Podejmuje się próby syntetyzowania nowych związków kompleksowych chromu (III) z pochodnymi krótkołańcuchowych kwasów alifatycznych i aromatycznych. Ponadto ostatnio zaobserwowany wzrost zainteresowania nanotechnologią spowodował stworzenie tak zwanego nanocząsteczkowego chromu (CrNano) [63], który prawdopodobnie może być efektywniej wykorzystywany przez organizm.

Mimo wielu badań eksperymentalnych i klinicznych, nadal nie odnaleziono odpowiedzi na wiele pytań dotyczących mechanizmu działania chromu w organizmie, jego toksyczności czy czynników wpływających na efektywność suplementacji wśród chorych na cukrzycę. Ponadto należy podkreślić, że wiele przytoczonych w niniejszym opracowaniu badań klinicznych dotyczących suplementacji chromem nie spełniało wymaganych rygorów metodologicznych, a wyników pozytywnego działania tego pierwiastka nie udało się zweryfikować w dobrze kontrolowanych próbach. Z tego względu stanowisko Grupy Roboczej ds. Żywienia w Cukrzycy Europejskiego Stowarzyszenia do Badań nad Cukrzycą [64] oraz Amerykańskiego Towarzystwa Diabetologicznego [65], dotyczące ewentualnych zaleceń suplementacji chromem u chorych na cukrzycę i osób z otyłością, nadal pozostaje negatywne. Niezbędne jest przeprowadzenie dalszych badań w celu wyjaśnienia nieznanych kwestii związanych z mechanizmami działania chromu w ustroju człowieka.

## PIŚMIENNICTWO

1. Wild S., Roglic G., Green A. i wsp. Global prevalence of diabetes. Estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* 2004; 27: 1047–1053.
2. Schwarz K., Mertz W. Chromium (III) and glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 1959; 85: 292–295.
3. Jeejeebhoy K.N., Chu R.C., Marliss E.B. i wsp. Chromium deficiency, glucose intolerance, and neuropathy reversed by chromium supplementation in a patient receiving long-term total parenteral nutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* 1977; 30: 531–538.
4. Vincent J.B. Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium binding substance. *J. Am. Coll. Nutr.* 1999; 18: 6–12.
5. Wang H., Kruszewski A., Brautigan D.L. Cellular chromium enhances of insulin receptor kinase. *Biochemistry* 2005; 44: 8167–8175.
6. Wu Y.T., Sun Z., Che S.P. i wsp. Regulation of chromium on gene expression of skeletal muscles in diabetic rats. *Wei. Sheng. Yan. Jiu.* 2005; 34: 184–187.
7. Krejpcio Z., Szymusiak H. Biologicznie aktywne związki chromu (III) — aspekty żywieniowe, towaroznawcze i toksykologiczne. *Towaroznawcze Problemy Jakości* 2006; 6: 29–47.
8. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Jodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium: Chromium. National Academy Press, D.C., Washington 2001.
9. Czerwińska D., Zadrużna M. Ocena spożycia chromu i jego głównych źródeł w diecie osób starszych chorych na cukrzycę typu 2. *Żyw. Człow. Metab.* 2003; 30: 816–821.
10. Marzec Z. Analityczna i obliczeniowa ocena pobrania chromu, niklu i seleniu z całodziennymi racjami pokarmowymi osób dorosłych. *Brom. Chem. Toks.* 1999; 32: 185–189.
11. Skibniewska K., Wyszowska M., Kot W. i wsp. Zawartość chromu w racjach pokarmowych studentów UWM w Olsztynie. *Żyw. Człow. Metab.* 2007; 34: 788–191.
12. Roussel A.-M., Andriollo-Sanchez M., Ferry M. i wsp. Food chromium content, dietary chromium intake and related biological variables in French free-living elderly. *Br. J. Nutr.* 2007; 98: 326–331.
13. Kumpulainen J.T. Chromium content of foods and diets. *Biol. Trace Elem. Res.* 1992; 32: 9–18.
14. Garcia E., Cabrera C., Lorenzo M.L. i wsp. Daily dietary intake of chromium in Southern Spain measured with duplicate diet sampling. *Br. J. Nutr.* 2001; 86: 391–396.
15. Clodfelder B.J., Upchurch R.G., Vincent J.B. A comparison of the insulin-sensitive transport of chromium in healthy and model diabetic rats. *J. Inorg. Biochem.* 2004; 98: 522–533.
16. Lamson D.S., Plaza S.M. The safety and efficacy of high-dose chromium. *Altern. Med. Rev.* 2002; 7: 218–235.
17. Dowling H.J., Offenbacher E.G., Pi-Sunyer F.X. Effects of amino acids on the absorption of trivalent chromium and its retention by regions of the small intestine. *Nutr. Res.* 1990; 10: 1261–1271.
18. Offenbacher E.G. Promotion of chromium absorption by ascorbic acid. *Trace Elem. Electr.* 1994; 11: 178–181.
19. Koslovsky A.S., Moser P.B., Reiser S. i wsp. Effects of diets high in simple sugars on urinary chromium losses. *Metabolism* 1986; 35: 515–518.
20. Hahn C.J., Evans G.W. Absorption of trace metals in the zinc-deficient rat. *Am. J. Physiol.* 1975; 228: 1020–1023.
21. Anderson R.A., Roussel A.-M., Zouari N. i wsp. Potential antioxidant effects of zinc and chromium supplementation in people with type 2 diabetes mellitus. *J. Am. Coll. Nutr.* 2001; 20: 212–218.
22. Surgent T. 3rd, Lim T.H., Jenson R.L. Reduced chromium retention in patients with hemochromatosis, a possible basis of hemochromatotic diabetes. *Metabolism* 1979; 28: 70–79.
23. Davies S., Howard J.M., Hinnisett A. i wsp. Age-related decreases in chromium levels in 51,665 hair, sweat, and serum samples from 40,872 patients: implications for the prevention of cardiovascular disease and type II diabetes mellitus. *Metabolism* 1997; 46: 469–473.
24. Stupar J., Vrtovec M., Dolinek F. Longitudinal hair chromium profiles of elderly subjects with normal glucose tolerance and type 2 diabetes mellitus. *Metabolism* 2007; 56: 94–104.
25. Rajpathak S., Rimm E.B., Li T. i wsp. Lower toenail chromium in men with diabetes and cardiovascular disease compared with healthy men. *Diabetes Care* 2004; 27: 2211–2216.

26. Anderson R.A. Chromium in the prevention and control of diabetes. *Diabetes Metab.* 2000; 26: 22–27.
27. Machaliński B., Walczak M., Syrenicz A. i wsp. Hypoglycemic potency of novel trivalent chromium in hyperglycemic insu89.
28. Jain S.K., Rains J.L., Croad J.L. Effect of chromium niacin and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides, and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radic. Biol. Med.* 2007; 43: 1124–1131.
29. Krejpcio Z., Kurył T., Dębski B. i wsp. Wpływ suplementacji diety fruktanami i chromem (III) na stężenie glikozy i insuliny w krwi oraz  $\beta$ -oksydację w limfocytach szczurów z cukrzycą typu 1. *Med. Wet.* 2007; 63: 1494–1496.
30. Chen D., Wang M.W. Development and application of rodent models for type 2 diabetes. *Diabet. Obes. Metab.* 2004; 1–11.
31. Kim D.S., Kim T.W., Kang J.S. Chromium picolinate supplementation improves insulin sensitivity in Goto-Kakizaki diabetic rats. *J. Trace Elem. Med. Biol.* 2004; 17: 243–247.
32. Clodfelder B.J., Gullick B.M., Lukaski H.C. i wsp. Oral administration of the biomimetic  $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  increases insulin sensitivity and improves blood plasma variables in healthy and type 2 diabetic rats. *J. Biol. Inorg. Chem.* 2004; 98: 522–533.
33. Sun Y., Clodfelder B.J., Shute A.A. i wsp. 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.* 2002; 7: 852–862.
34. Shute A.A., Chakov N.E., Vincent J.B. The stability of the biomimetic cation triqua- $\mu$ -oxohexapropionatotrichromium (III) *in vivo* in rats. *Polyhydron* 2001; 20: 2241–2252.
35. Sahin K., Onderci M., Tuzcu M. i wsp. Effect of chromium on carbohydrate and lipid metabolism in a rat model of type 2 diabetes mellitus: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism* 2007; 56: 1233–1240.
36. Król E., Krejpcio Z. Effect of dietary Cr (III) supplementation on blood indices in high-fat diet-fed STZ-treated rats. *Quimica Clinica* 2007; 26: P115.
37. Anderson R.A., Cheng N., Bryden N.A. i wsp. Elevated intakes of supplemental chromium improve glucose and insulin variables in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 1997; 46: 1786–1791.
38. Cheng N., Zhu X., Shi H. i wsp. Follow-up survey of people in China with type 2 diabetes mellitus consuming supplemental chromium. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 1999; 12: 55–60.
39. Gosh D., Bhattacharyaa B., Mukherjee B. i wsp. Role of chromium supplementation in Indians with type 2 diabetes mellitus. *J. Nutr. Biochem.* 2002; 13: 690–697.
40. Cefalu W.T., Bell-Farrow A.D., Stegner J. i wsp. Effect of chromium picolinate in insulin sensitivity *in vivo*. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 1999; 12: 17–83.
41. Bahijiri S.M., Mira S.A., Mufti A.M. i wsp. The effect of inorganic chromium and brewer's yeast supplementation on glucose tolerance, serum lipids and drug dosage in individuals with type 2 diabetes. *Saudi. Med. J.* 2000; 21: 831–837.
42. Evans G.W. The effect of chromium picolinate on insulin controlled parameters in humans. *Int. J. Biosoc. Med. Res.* 1989; 2: 163–180.
43. Martin J., Zhang X.H., Zhong Q. i wsp. Chromium picolinate supplementation attenuates body weight gain and increases insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2006; 29: 1826–1832.
44. Gunton J.E., Cheung N.W., Hitchman R. i wsp. Chromium supplementation does not improve glucose tolerance, insulin sensitivity, or lipid profile. *Diabetes Care* 2005; 28: 712–714.
45. Uusitupa M.I.J., Mykkanen L., Siitonen O. i wsp. Chromium supplementation in impaired glucose tolerance of elderly: effects on blood glucose, plasma insulin, C-peptide and lipid levels. *Br. J. Nutr.* 1992; 68: 209–216.
46. Kleefstra N., Houweling S., Jansman F.G.A. i wsp. Chromium treatment has no effect in patients with poorly controlled, insulin-treated type 2 diabetes in an obese Western population. *Diabetes Care* 2006; 29: 321–325.
47. Wang Z.Q., Qin J., Martin J. i wsp. Phenotype of subjects with type 2 diabetes mellitus may determine clinical response to chromium supplementation. *Metabolism* 2007; 56: 1652–1655.
48. Cefalu W.T., Wang Z.Q., Zhang X.H. i wsp. Oral chromium picolinate improves carbohydrate and lipid metabolism and enhances skeletal muscle glut-4 translocation in obese, hyperinsulinemic (UCR-LA corpulent) rats. *J. Nutr.* 2002; 132: 1107–1114.
49. Saner G. The effect of parity on maternal hair chromium concentration and the changes during pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 1981; 34: 853–855.
50. Aharoni A., Tesler B., Paltieli Y. i wsp. Hair chromium content of women with gestational diabetes compared with nondiabetic pregnant women. *Am. J. Clin. Nutr.* 1992; 55: 104–107.
51. Gunton J.E., Hams G., Hitchman R. i wsp. Serum chromium does not predict glucose tolerance in late pregnancy. *Am. J. Clin. Nutr.* 2001; 73: 99–104.
52. Jovanovic-Peterson L., Gutierrez M., Peterson C.M. Chromium supplementation for women with gestational diabetes mellitus. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 1999; 12: 17–83.
53. Ravina A., Slezak L., Mirsky N. i wsp. Reversal of corticosteroid-induced diabetes mellitus with supplemental chromium. *Diabet. Med.* 1999; 16: 164–167.
54. Otto-Buczowska E. Kompendium wiedzy o cukrzycy — wybrane zagadnienia patologii, diagnostyki i leczenia.  $\alpha$ -medica Press, Bielsko-Biala 2003.
55. Jain S.K., Rains J.L., Croad J.L. High glucose and ketosis (acetoacetate) increases, and chromium niacin decreases, IL-6, IL-8, and MCP-1 secretion and oxidative stress in U937 monocytes. *Antioxid. Redox Signal* 2007; 9: 1581–1590.
56. Jain S.K., Patel P., Rogier K. i wsp. Trivalent chromium inhibits protein glycosylation and lipid peroxidation in high glucose-treated erythrocytes. *Antioxid. Redox Signal* 2006; 8: 238–241.
57. Kerkeni A., Roussel A.M., Zouri N. i wsp. Antioxidant effect of zinc and chromium supplementation in Tunisian people with type 2 diabetes mellitus. 4<sup>th</sup> International Meeting Dietary antioxidants, trace elements, vitamins and polyphenols. Monastir, Tunisia 2005; 155.
58. Cheng H.H., Lai M.H., Hou W.C. i wsp. Antioxidant effects of chromium supplementation with type 2 diabetes mellitus and euglycemic subjects. *J. Agric Food Chem.* 2004; 5: 1385–1389.
59. Lukaski H.C., Siders W.A., Penland J.G. Chromium picolinate supplementation in women: effect on body weight, composition and iron status. *Nutrition* 2007; 23: 187–195.
60. Stoecker B. Chromium absorption, safety and toxicity. *J. Trace Elem. Exp. Med.* 1999; 12: 163–169.
61. Stearns D.M., Wise J.P., Patierno S.R. i wsp. Chromium (III) picolinate produces chromosome damage in Chinese hamster ovary cells. *FASEB J.* 1995; 1643–1648.
62. Speetjens J.K., Parand A., Crowder M.W. i wsp. Low-molecular-weight chromium-binding substance and biomimetic  $[\text{Cr}_3\text{O}(\text{O}_2\text{CCH}_2\text{CH}_3)_6(\text{H}_2\text{O})_3]^+$  do not cleave DNA under physiologically-relevant conditions. *Polyhydron* 1999; 18: 2617–2624.
63. Zha L.Y., Xu Z.R., Wang M.Q. i wsp. Effects of chromium nanoparticle dosage on growth, body composition, serum hormones and tissue chromium in Sprague-Dawley rats. *J. Zhejiang Univ. Sci. B.* 2007; 8: 323–230.
64. Mann J.J., De Leeuw I., Harmansen K. i wsp. Evidence-based nutritional approaches to the treatment and prevention of diabetes mellitus. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* 2004; 14: 373–394.
65. Nutrition Recommendations and Interventions for Diabetes. *Diabetes Care* 2008; 31; suppl. 1: S61–S78.