

Aus dem
Deutschen Diabetes-Zentrum
Leibniz-Zentrum an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Deutsche Diabetes-Klinik -

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Werner Scherbaum

Oxidativer Stress bei diabetischer Neuropathie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Christoph Sohr

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Bernd Nürnberg
Dekan

Referent: Prof. Dr. med. Dan Ziegler

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Helmut Sies

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungen	III-VI
2. Einleitung	1
2.1. Diabetes mellitus und seine Folgeschäden	1
2.2. Diabetische Neuropathie	2
2.2.1. Diabetische Polyneuropathie	2
2.2.1.1. Klinik der distalen symmetrischen Polyneuropathie (DSP)	3
2.2.1.2. Klinische Bedeutung der DSP	4
2.2.1.3. Diagnostik	4
2.2.1.4. Morphologie	5
2.2.2. Autonome Neuropathie	5
2.2.2.1. Kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie (KADN)	6
2.2.3. Kausale Therapie	7
2.2.3.1. Blutzuckereinstellung und Folgeschäden des Diabetes mellitus	7
2.2.4. Pathogenese der diabetischen Neuropathie	8
2.2.4.1. Diabetes mellitus und oxidativer Stress	8
2.2.4.2. Oxidativer Stress bei experimenteller diabetischer Neuropathie	10
2.2.4.3. Grundlagen des oxidativen Stresses	11
2.2.4.4. Mechanismen des oxidativen Stresses beim Diabetes	12
2.2.4.4.1. Erhöhte Aktivität des Polyolstoffwechselweges	14
2.2.4.4.2. Advanced glycation end products (AGEs)	15
2.2.4.4.3. Rolle der Glykosylierung bei der diabetischen Neuropathie	18
2.2.4.4.4. Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren durch AGE und Hyperglykämie	19
2.2.4.4.5. Verstärkte Aktivierung der Protein-Kinase C- β	20
2.2.4.4.6. Erhöhter Fluss durch den Hexosamin-Stoffwechselweg	21
2.2.4.4.7. Verminderte antioxidative Abwehr	22
2.2.4.4.8. Stickstoffmonoxid	24
2.2.4.5. Marker für oxidativen Stress im Plasma	25
2.2.4.5.1. Isoprostane	25
2.2.4.6. Marker für endotheliale Dysfunktion im Plasma	27
2.2.4.6.1. Halogenierte Oxidantien (hypochlorige Säure, unterbromige Säure)	27
2.2.4.6.2. Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) und ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1)	27
3. Fragestellung	31
4. Probanden	32
5. Material und Methoden	34
5.1. Erfassung der peripheren Nervenfunktion	34
5.1.1. Nervenleitgeschwindigkeit (NLG)	34

5.1.2. Quantitative sensorische Tests	34
5.2. Kardiovaskuläre autonome Funktionstests	41
5.3. Augenfundus	46
5.4. Probensammlung und Plasmaaufbereitung	47
5.5. Laboruntersuchungen	47
5.5.1. Marker für oxidativen Stress	49
5.5.1.1. 8-epi-Prostaglandin F _{2α}	49
5.5.1.2. Vitamin E	49
5.5.1.3. Vitamin C	49
5.5.1.4. Reaktive Sauerstoffverbindungen	49
5.5.1.4.1. Superoxidanion und Peroxynitrit	51
5.5.2. Marker für Inflammation und endotheliale Dysfunktion	51
5.5.2.1. Halogenierte Oxidantien (hypochlorige Säure)	51
5.5.2.2. Zelluläre Adhäsionsmoleküle	51
5.6. Reagentien	52
5.7. Statistische Analysen	53
6. Ergebnisse	54
6.1. Biomarker für oxidativen Stress	55
6.2. Adhäsionsmoleküle	63
6.3. Korrelationen zwischen Parametern des oxidativen Stresses und der Nervenfunktion	66
6.4. Korrelationen zwischen Parametern der KADN und Adhäsionsmolekülen	74
7. Diskussion	78
7.1. F ₂ -Isoprostan 8-epi-PGF _{2α}	79
7.2. Totale antioxidative Kapazität gegenüber Superoxidanion und Peroxynitrit	80
7.3. Vitamin E	82
7.4. Vitamin C	83
7.5. Marker der Inflammation und der endothelialen Dysfunktion	84
7.5.1. Hypochlorige Säure	84
7.5.2. Adhäsionsmoleküle	84
7.6. Schlussfolgerungen	86
8. Zusammenfassung	88
9. Literaturverzeichnis	90
10. Danksagung	108
11. Lebenslauf	109

1. Abkürzungen

AGE	advanced glycation end product
ASR	Achillessehnenreflex
ATP	Adenosintriphosphorsäure
BMI	Body Mass Index
Chol	Cholesterin
CML	Carboxymethyllysin
cpm	counts per minute
DAG	Diacylglycerol
DCCT	Diabetes Control and Complications Trial
DSP	distale symmetrische Polyneuropathie (= periphere Neuropathie)
EDTA	Ethylene Diamine Tetra-Acetate (= Äthylendiamintetra- essigsäure)
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay (= Enzym-Immunoassay)
ET-1	Endothelin-1
GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie
GSH	Glutathion
HDL	high density lipoprotein
HNO ₂	salpetrige Säure
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HO ₂ [•]	Hydroxyperoxyl-Radikal
HOBr	hypobromige Säure (= unterbromige Säure)
HOCl	hypochlorige Säure (= unterchlorige Säure)

HPLC	high performance liquid chromatography (= Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRV	heart rate variation (= Variabilität der Herzfrequenz)
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
KADN	kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
m	männlich
MCP-1	monocyte chemoattracting protein 1
MCR	mean circular resultant
MNCV	motor nerve conduction velocity (= motorische NLG)
NAD ⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NDS	Neuropathy Disability Score
NF-κB	nuclear factor-κB
NICI	negative ion-chemical ionization
NIS	Neuropathy Impairment Score
NIS[LL]	Neuropathy Impairment Score of the Lower Limbs
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit (= nerve conduction velocity [NCV])
NO [•]	Stickstoffmonoxid-Radikal
NO ⁺	Nitrosyl-Kation
NO ⁻	Nitrosyl-Anion
NO ₂ [•]	Stickstoffdioxid-Radikal
N ₂ O ₄	Distickstofftetroxid

NSS	Neuropathy Symptom Score
O ₂	molekularer Sauerstoff
O ₂ ^{•-}	Superoxidanion / -radikal
O ₃	Ozon
OH [•]	Hydroxyl-Radikal
ONOO ⁻	Peroxynitrit-Anion
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PFB	Pentafluorobenzyl
PGF	Prostaglandin F
PKC	Protein-Kinase C
PNP	periphere Neuropathie
PSR	Patellarsehnenreflex
RAGE	AGE-Rezeptoren
RMSSD	root mean squared successive difference
RNS	reactive nitrogen species
RO [•]	Alkoxy-Radikal
RO ₂ [•]	Peroxy-Radikal
ROOH	Lipid-Hydroperoxide
ROS	reactive oxygen species
RR	Blutdruckmesswert nach Riva Rocci (in mmHg)
SEM	standard error of the mean (= mittlere Standardabweichung)
sICAM-1	soluble ICAM-1 (= lösliches ICAM-1)
SIN-1	3-Morpholino-Sydnonimin Hydrochlorid (= C ₆ H ₁₀ N ₄ O ₂ .HCl)
SOD	Superoxiddismutase
STZ	Streptozotocin

sVCAM-1	soluble VCAM-1 (= lösliches VCAM-1)
TAC	total antioxidant capacity (= totale antioxidative Kapazität)
TG	Triglyzeride
TGF	transforming growth factor
TMS	Trimethylsilyl
TWS	Temperaturwahrnehmungsschwelle (= thermal perception threshold [TPT])
UKPDS	United Kingdom Prospective Diabetes Study
VC	Vitamin C
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VE	Vitamin E
VEGF	vascular endothelial growth factor (= vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor)
VE/L	Vitamin E/Lipid-Verhältnis / -Quotient
VWS	Vibrationswahrnehmungsschwelle (= vibration perception threshold [VPT])
w	weiblich

2. Einleitung

2.1. *Diabetes mellitus und seine Folgeschäden*

Der Begriff Diabetes mellitus ist ein Sammelbegriff für eine Gruppe metabolischer Erkrankungen, denen eine Hyperglykämie durch einen absoluten oder relativen Insulinmangel gemeinsam ist. Bei der Entstehung der Hyperglykämie spielen eine gesteigerte Glukoseproduktion, eine gestörte Glukoseverwertung bzw. eine gestörte Insulinsekretion eine Rolle. Es werden mehrere Diabetestypen unterschieden, unter denen dem Typ 1 und dem Typ 2 die größte Bedeutung zukommt. Der Typ 1 Diabetes entsteht durch eine β -Zelldestruktion, die einen absoluten Insulinmangel nach sich zieht, während dem Typ 2 Diabetes pathophysiologisch eine große Bandbreite zugrunde liegt, die von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis hin zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt reicht [1, 2].

Weltweit nimmt vor allem die Inzidenz des Typ 2 Diabetes zu. Als einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 ist die Adipositas zu nennen. Mit dem Ausmaß der Überernährung steigt weltweit die Zahl der Typ 2 Diabetiker an, wobei zunehmend jüngere Altersgruppen betroffen sind [2]. Aufgrund neuerer epidemiologischer Daten ist davon auszugehen, dass der Anteil des Diabetes mellitus an Morbidität und Mortalität der Bevölkerung relativ groß ist [2]. Durch Diabetes mellitus können in zahlreichen Organsystemen Folgeschäden entstehen:

- Zu den chronischen diabetischen Komplikationen zählen die Neuropathie sowie die Retinopathie und Nephropathie, die als Mikroangiopathie bezeichnet werden.

Terminale Niereninsuffizienz, Amputationen der unteren Extremitäten und Erblindungen sind die gefürchteten Endstadien dieser Folgeschäden.

- Darüber hinaus geht der Diabetes gehäuft mit makrovaskulären Komplikationen einher (Makroangiopathie wie koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrovaskuläre Durchblutungsstörungen). Die Prognose der Patienten mit Diabetes wird heute entscheidend durch die kardiovaskulären Begleiterkrankungen bestimmt.

2.2. Diabetische Neuropathie

Die diabetische Neuropathie ist eine Nervenerkrankung infolge des Diabetes mellitus unter Ausschluss anderer Ursachen für eine Neuropathie. Die wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung einer diabetischen Neuropathie sind eine unzureichende Diabeteseinstellung, lange Diabetesdauer, viszerale Adipositas und zunehmende Körpergröße; möglicherweise spielen Hypertonie, Alter, Rauchen, Hypoinsulinämie und Dyslipidämie ebenfalls eine Rolle [3].

Die diabetische Neuropathie wird unterteilt in die symmetrischen und asymmetrischen Neuropathien. Die distale symmetrische Polyneuropathie (DSP) ist die mit Abstand häufigste klinische Manifestation [4]. In den westlichen Industrieländern gilt die diabetische Neuropathie als häufigste erworbene Neuropathieform [5].

2.2.1. Diabetische Polyneuropathie

Die DSP tritt bei ca. einem Viertel aller Typ 1 bzw. Typ 2 Diabetiker auf [3]. Epidemiologische Studien zeigen eine Prävalenz von ca. 30% der in

Krankenhäusern [6-9], beziehungsweise von ca. 20% der in der Bevölkerung untersuchten Diabetiker [10-14]. Die DSP findet sich bei annähernd der Hälfte der Patienten nach einer Diabetesdauer von 25 Jahren [15] und in mehr als 40% der Patienten mit Diabetes im Alter von 70-79 Jahren [16].

2.2.1.1. *Klinik der distalen symmetrischen Polyneuropathie (DSP)*

Die Leitsymptome der DSP sind symmetrische, distal beginnende und nach proximal fortschreitende strumpf- bzw. seltener handschuhförmige Parästhesien, sowie Schmerzen, die als brennend („burning feet“), bohrend, krampfartig oder stechend beschrieben werden. Zusammenfassend treten bei der DSP, v.a. an den unteren, aber auch an den oberen Extremitäten, folgende Symptome und Defizite auf [3, 4]:

- Positive sensorische Symptome:
 1. distal betonte Schmerzen, Parästhesien, Dysästhesien (unangenehme Parästhesien), Taubheitsgefühl und Wadenkrämpfe,
 2. typischerweise Exazerbation der Schmerzen in der Nacht, Besserung der Beschwerden beim Gehen,
 3. evozierte Schmerzen: Hyperalgesie (leicht schmerzhafter Reiz wird als stark schmerzhaft empfunden), Allodynie (nicht schmerzhafter Reiz wird als schmerzhaft empfunden).
- Neuropathische Defizite:
 1. abgeschwächte oder fehlende Muskeleigenreflexe (z.B. Achillessehnen- oder Patellarsehnenreflexe),

2. Sensibilitätsstörungen: veränderte Tiefenwahrnehmung (Vibrationssinn und Lagesinn gestört, eventuell mit sensibler Ataxie), veränderte Thermosensibilität,
3. reduzierte Sensibilität für Gelenkstellung oder funktionelle Einschränkungen wie z.B. eine Reduktion der Gehfähigkeit [17],
4. Muskelschwäche bzw. -lähmung bei motorischer Beteiligung.

2.2.1.2. Klinische Bedeutung der DSP

Es finden sich zunehmend Belege dafür, dass nicht nur Marker für Mikroangiopathie (wie z.B. Albuminurie), sondern auch die bei der Polyneuropathie eingesetzten Funktionstests wie z.B. Nervenleitgeschwindigkeit (NLG; nerve conduction velocity [NCV]) und Vibrationswahrnehmungsschwelle (VWS; vibration perception threshold [VPT]) als Prädiktoren für erhöhte Mortalität von Diabetikern anzusehen sind [18, 19] und auch die Morbidität determinieren. So vergrößert eine erhöhte VWS die Wahrscheinlichkeit des Auftretens neuropathischer Fußulzera, die einen der häufigsten Gründe für die Einweisung in ein Krankenhaus und Amputationen an den unteren Extremitäten bei Diabetikern darstellen [20].

2.2.1.3. Diagnostik

Die Funktion der verschiedenen peripheren Nervenfaserp Populationen kann mit Hilfe objektiver oder subjektiver, d.h. psychophysischer, quantitativer Methoden erfasst werden [20]:

- Die großkalibrigen, schnell leitenden A α - und A β - Fasern können objektiv mit Hilfe der NLG untersucht werden, durch quantitative sensorische Tests (QST) wird die Funktion der großkalibrigen Fasern mit Hilfe der VWS erfasst.
- Die kleinkalibrigen, dünn bemarkten A δ - Fasern werden subjektiv durch Messung der Kaltschwelle und die nicht bemarkten C- Fasern subjektiv durch Erfassung der Warmschwelle untersucht.

2.2.1.4. *Morphologie*

Im Verlauf einer DSP können strukturelle Veränderungen auftreten wie z.B. ein Verlust von myelinisierten Nervenfasern [21], in groß- und kleinkalibrigen Nervenfasern [5, 22-24]. Hier wurden sowohl axoplasmatische [25, 26] als auch Vorgänge der Demyelinisierung [22, 27-29] beobachtet. Außerdem werden im Zusammenhang mit der diabetischen Neuropathie des Menschen eine axonale Atrophie oder eine Verminderung des Axondurchmessers diskutiert. Auch ein Verlust nicht myelinisierter Nervenfasern wurde nachgewiesen [26]. Darüber hinaus wird von einer verstärkten Fibrose und endoneuralen Kollagenbildung berichtet [28, 30].

2.2.2. *Autonome Neuropathie*

Typ 1 und Typ 2 Diabetiker können neben der peripheren Neuropathie auch eine Störung des autonomen Nervensystems entwickeln. Die kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie (KADN) geht mit einer ungünstigen Prognose einher. Veränderungen im urogenitalen Bereich umfassen die erektile Dysfunktion, Blasenentleerungsstörung mit Blasenlähmung oder im gastrointestinalen Bereich (Magenentleerungsstörung / Gastroparese), bei denen häufig postprandiale

Hypoglykämien oder selten eine Stuhlinkontinenz auftreten können. Auch können Funktionsstörungen des respiratorischen Systems, der Thermoregulation / Schweißsekretion oder der Pupillenmotorik vorkommen.

Dabei muß die autonome Neuropathie, die durch die Erkrankung an Diabetes mellitus hervorgerufen wird, sorgfältig abgegrenzt werden gegen Funktionsstörungen des autonomen Nervensystems, die anderer Genese sind. So kann eine Dysfunktion des autonomen Nervensystems außer durch Diabetes mellitus z.B. auch durch Niereninsuffizienz, Alkoholismus, Malignome oder Infektionen bedingt sein.

Analog der bei der DSP morphologisch nachgewiesenen Nervenläsionen konnten bei Patienten mit autonomer Neuropathie eine Reduktion bzw. dystrophische Veränderungen sympathischer Neurone [31, 32] und Störungen parasymphatischer Fasern [33, 34] nachgewiesen werden.

2.2.2.1. Kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie (KADN)

Unter den Manifestationen der autonomen diabetischen Neuropathie kommt der kardiovaskulären autonomen diabetischen Neuropathie (KADN) am meisten Aufmerksamkeit zu, weil sie bereits im asymptomatischen Stadium mit nicht-invasiven kardiovaskulären autonomen Funktionstests, die auf der Herzfrequenzvariabilität und Blutdruckregulation basieren, diagnostiziert werden kann. In diesen frühen Stadien steht eine verminderte Herzfrequenzvariabilität im Vordergrund. In späteren Stadien können eine Erhöhung der Ruheherzfrequenz (Ruhetachykardie durch Schädigung des Parasympathikus) und orthostatische Hypotonie (Sympathikusschädigung) mit Symptomen wie Schwindel und Schwäche bis hin zu Synkopen auftreten.

Der plötzliche Herztod tritt bei an Diabetes mellitus erkrankten Patienten gehäuft auf, was ebenso der KADN zugeschrieben wird (ca. 4fach erhöhte Mortalität durch KADN). So lagen über eine Zeitspanne von 5-10 Jahren bei diesen Patienten die Mortalitätsraten bei 27-53% gegenüber Raten von 5-15% bei Patienten ohne Zeichen einer KADN [35]. Ähnliches gilt für die stumme Myokardischämie bzw. den stummen Myokardinfarkt: Wie Studien belegen konnten, sind eine stumme Myokardischämie unter körperlicher Belastung und ein stummer Myokardinfarkt bei Patienten mit KADN verhältnismäßig häufig [36, 37].

2.2.3. Kausale Therapie

2.2.3.1. Blutzuckereinstellung und Folgeschäden des Diabetes mellitus

Die Prävalenz und Inzidenz diabetischer Folgeschäden sind bei unzureichender Blutzuckereinstellung gesteigert [38]. Im Umkehrschluß konnten klinische Studien belegen, dass eine gute Diabeteseinstellung das Auftreten der Komplikationen verhindern kann:

Der Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) konnte für Diabetes Typ 1-Patienten [38], die United Kingdom Prospective Diabetes Study (UKPDS) für Diabetes Typ 2-Patienten [39, 40] belegen, dass die Entwicklung und das Fortschreiten der chronischen Komplikationen beim Diabetes mellitus durch eine intensive Diabetestherapie verzögert werden können.

In der DCCT-Studie konnte eine normnahe Blutzuckereinstellung das Risiko für eine diabetische Neuropathie um 60% senken. Im Rahmen der UKPDS wurde jedoch bei Typ 2 Diabetikern kein eindeutiger Effekt einer konsequenten Blutzuckereinstellung auf die Neuropathie beobachtet [40]. Auch in der Steno Typ 2 Studie [41] ließ sich die Neuropathie durch eine intensive multifaktorielle Therapie nicht günstig

beeinflussen. Somit wurde beim Typ 2 Diabetes im Gegensatz zum Typ 1 der Nachweis einer effektiven kausalen Intervention bei der Neuropathie bislang noch nicht erbracht.

2.2.4. Pathogenese der diabetischen Neuropathie

2.2.4.1. Diabetes mellitus und oxidativer Stress

Biomoleküle können durch freie Radikale geschädigt werden. Freie Radikale zeichnen sich durch ein ungepaartes einzelnes Elektron aus, welches zu einer ausgeprägten Reaktivität und Instabilität des Moleküls führt. Solche Moleküle streben danach, ein weiteres Elektron in sich aufzunehmen und so verliert ein zweites Molekül in der Reaktion mit einem Radikal-Molekül ein Elektron an dieses. Das ehemalige Radikal ist nun - mit einem vollen Satz an paarigen Elektronen - stabiler. Bei diesem Vorgang wird das zweite Molekül selbst zum reaktiven freien Radikal, eine Kettenreaktion hat begonnen. Diese ist beendet, wenn zwei freie Radikale aufeinanderstoßen und sich so gegenseitig neutralisieren. Sollte das zweite Molekül wichtig für die biochemischen Vorgänge des Organismus sein, kann der gesamte Organismus als Ergebnis des anfänglichen „Angriffs“ durch freie Radikale leiden.

So greifen die Moleküle bevorzugt an ungesättigten Verbindungen (d.h. Doppelbindungen) an. Diese liegen häufig in Biomolekülen wie Proteinen und Phospholipiden (z.B. in Zellmembranen) vor. Durch die oxidierende Reaktion mit freien Radikalen können chemische Veränderungen z.B. durch Strangbrüche entstehen. Hieraus kann ein Funktionsverlust biologischer Moleküle jeder Art, so auch z.B. von Proteinen, (Zellmembran-)Lipiden oder der DNA, resultieren [42]. Durch den Angriff der freien Radikale auf diese Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen kommt es zur Bildung von Lipidperoxyl-Radikalen, aus denen dann

wiederum Lipidperoxide entstehen, die nicht fähig sind die Integrität der Zellwand aufrecht zu erhalten.

Freie Radikale werden kontinuierlich im Körper gebildet und ebenso ständig durch vorhandene antioxidative Mechanismen unschädlich gemacht. Oxidativer Stress ist letztendlich eine Verschiebung des Verhältnisses Prooxidantien / Antioxidantien zugunsten der Prooxidantien (Fließgleichgewicht) [43-45]. Dies macht deutlich, dass mit einem erhöhten oxidativen Stress im Umkehrschluß auch eine Depletion von Antioxidantien einhergeht. Antioxidans ist hierbei zu definieren als Substanz, die in relativ geringer Konzentration die Oxidation eines oxidierbaren Substrates signifikant verzögert oder verhindert [46].

Einem gesteigerten oxidativen Stress wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung verschiedener chronischer Erkrankungen wie z.B. Arteriosklerose, Krebs, M. Alzheimer und Diabetes mellitus [42, 46-51] zugeschrieben. Studien belegen, dass systemischer oxidativer Stress bereits bei Jugendlichen mit Diabetes mellitus Typ 1 vorliegt und dann bis zum frühen Erwachsenenalter weiter ansteigt [52]. Die Radikalbedingte Lipidperoxidation und die zytotoxische Aldehydproduktion sind beteiligt an der Zytokin-induzierten Zerstörung der β -Zellen der menschlichen Langerhans-Inseln und somit beteiligt an der Entstehung des Diabetes mellitus Typ 1 [53].

Mehrere Studien konnten bei Patienten mit Diabetes mellitus, die bereits teilweise Folgeschäden (z.B. bezüglich Makro- / Mikroangiopathie) aufwiesen, einen verstärkten oxidativen Stress nachweisen [48, 50, 54-57]. Die Oxidation zellulärer Strukturen der peripheren Nerven durch oxidativen Stress könnte wichtige funktionelle und strukturelle Veränderungen verursachen und so eine Neuropathie

bewirken. Bei Diabetikern mit Neuropathie liegen allerdings keine systematischen Studien im Hinblick auf oxidativen Stress vor.

Eine Hypothese besagt, dass durch Hypoxie freie Radikale entstehen, die periphere Nerven schädigen können. Ein Zusammenhang zwischen mangelhafter Blut- bzw. Sauerstoffversorgung der peripheren Nerven und dem Auftreten einer diabetischen Neuropathie konnte mehrfach in (tierexperimentellen) Studien belegt werden [58, 59].

2.2.4.2. Oxidativer Stress bei experimenteller diabetischer Neuropathie

Oxidativer Stress gilt als biochemischer Auslöser für eine herabgesetzte NLG des N. ischiadicus und einen reduzierten endoneuralen Blutfluss bei gleichzeitig vorliegender endoneuraler Hypoxie, erkennbar am verminderten endoneuralen Sauerstoffpartialdruck bei diabetischen Ratten [60]. Low und Nickander konnten zeigen, dass die Aktivität der Cu-Zn-Superoxiddismutase, die Teil der antioxidativen Abwehr ist, im N. ischiadicus von Ratten mit STZ-induziertem Diabetes mellitus reduziert ist [60]. Lipidperoxidations-Produkte wie z.B. Malondialdehyd oder konjugierte Diene sind in diabetischen Ischiasnerven erhöht [60]. Entsprechend sind GSH-Gehalt und die Aktivität der Glutathion-Peroxidase ebenfalls in Ischiasnerven diabetischer Ratten herabgesetzt [61, 62]. Nerven diabetischer Ratten weisen im Vergleich mit Kontrolltieren einen geringeren Gehalt an Vitamin E auf [63]. Im Modell der STZ-diabetischen Ratte ist somit ein gesteigerter oxidativer Stress bei gleichzeitiger selektiver Abnahme der antioxidativen Abwehr im Ischiasnerven nachweisbar [60, 61]. Unterstützt werden diese Befunde dadurch, dass die Behandlung diabetischer Ratten mit Insulin oder Antioxidantien mit einer Verbesserung der Nervenfunktion einhergeht [64-68].

2.2.4.3. Grundlagen des oxidativen Stresses

Moleküle, die oxidativen Stress verursachen, werden in mehrere Gruppen eingeteilt. So kann eine Klassifizierung als ROS (reactive oxygen species) bzw. RNS (reactive nitrogen species) vorgenommen werden [44, 69]:

- ROS:

- Radikale: Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)-, Hydroxyl (OH^{\cdot})-, Peroxyl (RO_2^{\cdot})-, Alkoxy (RO^{\cdot})- und Hydroxyperoxyl (HO_2^{\cdot})-Radikale,
- Moleküle, die primär keine Radikale sind, in der Folge jedoch in solche umgewandelt werden: hypochlorige Säure (HOCl), Peroxynitrit ($ONOO^-$), Ozon (O_3), Singulett-Sauerstoff (1O_2) und Wasserstoffperoxid (H_2O_2).

- RNS:

- Radikale: Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot})- und Stickstoffdioxid (NO_2^{\cdot})-Radikale,
- später in Radikale umgewandelte nicht-Radikale: Peroxynitrit ($ONOO^-$); aufgrund seines Gehalts an Stickstoff und Sauerstoff, kann $ONOO^-$ sowohl zu den ROS als auch den RNS gezählt werden), salpetrige Säure (HNO_2), Nitrosyl-Kation (NO^+), Nitrosyl-Anion (NO^-), Distickstofftetroxid (N_2O_4) und einige weitere Substanzen.

Die Reaktivität der einzelnen Substanzen ist sehr unterschiedlich ausgeprägt. Während das Superoxid-Radikal (mit einigen Molekülen) und OH^{\cdot} (mit fast jedem Molekül) schnell reagieren, findet sich bei HOCl und $ONOO^-$ nur eine mittelmäßig ausgeprägte Reaktivität. Die Entstehung dieser Substanzen ist im menschlichen Körper, dessen Zellen auf einen aeroben Stoffwechsel angewiesen sind,

unvermeidbar [70, 71]. Neben dem Stoffwechsel ist auch Strahlung eine mögliche Quelle für freie Radikale [71, 72].

ROS und RNS können DNA (z.B. durch Mutation, Rearrangement, Deletion, Insertion oder Sequenzveränderung) schädigen, Signalübertragungswege aktivieren / inhibieren, Zelltod durch Apoptose oder Nekrose beeinflussen und Proteine schädigen [42, 44]. Der Gehalt an Oxidationsprodukten in Geweben und Plasma oder die Veränderungen im antioxidativen Status sind als Messparameter für gesteigerten oxidativen Stress genutzt worden [48, 73, 74]. Erfasst wird der oxidative Stress durch die Messung der durch ROS / RNS oxidativ veränderten Biomoleküle wie z.B. Lipide, Proteine und DNA-Basen. Unter den Lipidoxidationsprodukten sind Malondialdehyd, konjugierte Diene und Hydroperoxide sowie 9α - 11α -8-epi-PGF_{2 α} (ein F₂-Isoprostan) am ausgiebigsten erforscht worden.

Ein Hinweis auf oxidativen Stress kann sich durch eine Verminderung oder eine (kompensatorische) Erhöhung antioxidativer Enzyme ergeben [75]. Bestimmung der Vitamine, Thiole oder der totalen antioxidativen Kapazität lassen allenfalls Rückschlüsse auf den oxidativen Stress zu.

2.2.4.4. Mechanismen des oxidativen Stresses beim Diabetes

Die meisten metabolischen Störungen, die bei Diabetes mellitus auftreten, tragen direkt oder indirekt zu einem erhöhten oxidativen Stress bei. Dieser entsteht einerseits durch eine erhöhte Produktion von ROS durch Autoxidation von Glukose und ihren Metaboliten. Dies führt zu einer Bildung von Superoxid (O₂^{•-})- und Hydroxyl (OH[•])- Radikalen [76], gesteigerter Glykosylierung, mitochondrialer Dysfunktion, Ischämie und einem erhöhten Durchsatz durch den Polyolstoffwechselweg. So konnte bei Diabetikern z.B. eine gesteigerte Produktion von O₂^{•-} und NO[•] gefunden

werden [50, 77]. Andererseits entsteht oxidativer Stress auch durch eine eingeschränkte Kapazität, ROS abzufangen. Eine Störung antioxidativer Schutzmechanismen bei Diabetikern konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden [60, 62, 78].

Das prooxidative Peroxynitrit (ONOO^-) entsteht aus Stickstoffmonoxid (NO^\bullet) und Superoxid ($\text{O}_2^{\bullet-}$) [50, 79, 80], zwei Bestandteilen, die bei oxidativem Stress bei Diabetes mellitus vermehrt entstehen [50, 77]. Das entstehende ONOO^- ist ein wirkungsvolles Oxidans, das LDL oxidiert [81], vaskuläre Dysfunktion verursacht [82] und Tyrosinreste in Proteinen nitriert [83]. In vitro konnte nachgewiesen werden, dass ONOO^- Proteine [84], Lipide [85] und DNA [86, 87] schädigt. Im Rahmen der Schädigung von DNA kommt es hier zu Strangbrüchen und Modifikation der Basen und somit zu Mutationen.

Die Mechanismen, denen bei der Entstehung diabetischer Komplikationen und speziell des oxidativen Stresses durch Hyperglykämie im Diabetes mellitus eine Rolle beigemessen wird und die somit zu den bereits erwähnten Fehlfunktionen beitragen sollen, sind nach Brownlee [88, 89]:

1. erhöhte Aktivität des Polyolstoffwechsels [89, 90],
2. gesteigerte Bildung von advanced glycation end products (AGEs) [88, 89, 91],
3. erhöhte Aktivität von Protein-Kinase C (PKC)- Isoformen wie z.B. der PKC- β [88, 89],
4. gesteigerte Aktivität des Hexosaminstoffwechsels [89].

Jeder dieser Mechanismen ist pathogenetisch bedeutsam, jedoch tragen möglicherweise alle synergistisch zum Entstehen des oxidativen Stresses und damit der diabetischen mikrovaskulären Komplikationen bei.

Die genauen Mechanismen, die zum Phänomen des oxidativen Stresses führen, sind bis jetzt nicht komplett erforscht und wahrscheinlich multifaktoriell [48, 74, 92].

2.2.4.4.1. *Erhöhte Aktivität des Polyolstoffwechselweges*

Bei bestehender Hyperglykämie wird der Polyolstoffwechsel als zusätzlicher bzw. alternativer Weg des Glukoseabbaus aktiviert. Auf verschiedenen Wegen werden ROS durch eine Überaktivität des Polyolstoffwechselweges generiert [89]. Bei gesteigertem Polyolstoffwechsel wird Glukose vermehrt durch die Aldose-Reduktase (NADPH-abhängig) zu Sorbitol reduziert und Sorbitol im nächsten Schritt durch die Sorbitol-Dehydrogenase (NAD⁺-abhängig) zu Fruktose oxidiert [89].

Die Akkumulation von Sorbitol bzw. die Überaktivität des Polyolstoffwechsels führen zur Abnahme von Myoinositol und Taurin. Taurin ist ein potentes Antioxidans und wirkt so den hier geschilderten pathogenetischen Prozessen entgegen. Eine Verringerung des Taurins fördert also den oxidativen Stress weiter [93]. Der Verlust von Myoinositol führt zu reduzierter Verfügbarkeit von Diacylglycerol, was zu einer Reduktion der neuronalen Na⁺-K⁺-ATPase-Aktivität beiträgt [5, 94]. Dieser Ionenpumpenmechanismus hält bei regelrechter Funktion das Ruhepotential aufrecht und ist daher für die Nervenfunktion bedeutsam. Die Störung der Na⁺-K⁺-ATPase führt zu einer intra-axonalen Na⁺-Anhäufung und einem reduzierten nodalen Na⁺-Gleichgewichtspotential.

Die potentiell schädlichen Effekte des Hyperglykämie-induzierten Anstieges der Aktivität des Polyolstoffwechselweges sind über verschiedene Mechanismen zu erklären:

- Sorbitol-induzierter osmotischer Stress (spielt laut Brownlee keine relevante Rolle),
- Abnahme der Aktivität der Na⁺-K⁺-ATPase,
- Anstieg des cytosolischen NADH/NAD⁺-Verhältnisses (durch Aktivität der Sorbitol-Dehydrogenase; führt letztlich zur vermehrten Aktivierung der Protein-Kinase C; siehe unten),
- Abfall des cytosolischen NADPH (durch Verbrauch von NADPH durch die Aldose-Reduktase).

Zusammenfassend ist ein erhöhter Fluss über den Polyolstoffwechselweg offensichtlich ein bedeutender Mechanismus in der Pathogenese der diabetischen Neuropathie. Die Aktivierung des Polyolstoffwechselweges begünstigt die Bildung von ROS sowie die nicht-enzymatische Glykierung.

2.2.4.4.2. *Advanced glycation end products (AGEs)*

Durch die chronisch erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentration kommt es zur Entstehung intra- sowie extrazellulärer advanced glycation end products (AGE). Bei der Interaktion von Glukose und Aminogruppen der Proteine verbinden sich reduzierte Monosaccharide mit freien Aminogruppen der körpereigenen Proteine oder anderer zellulärer Moleküle. So entstehen früh-

reversible Produkte, sogenannte Schiff'sche Basen, aus denen die stabileren frühen Amadori-Glykosylierungsprodukte entstehen [95].

AGEs können aus dem Abbau dieser Amadori-Produkte, aus der intrazellulären Autoxidation von Glukose zu Glyoxal, oder aus der Fragmentierung von Glyceraldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat zu Methylglyoxal hervorgehen. So entstehen aus den reaktiven intrazellulären Dikarboxylen (Glyoxal, Methylglyoxal und den Produkten aus dem Abbau der Amadori-Produkte) durch Reaktion mit Aminogruppen intra- und extrazellulärer Proteine – u.a. durch chemische Umbildung, Dehydrierung, Fragmentierung, Kreuzverknüpfung und Oxidation der früh-reversiblen Amadori-Produkte – die irreversiblen AGEs.

Da diese Prozesse und somit auch die entstehenden Produkte selbst irreversibel sind, kommt es zu einer kontinuierlichen Akkumulation der AGEs.

Die Produktion intrazellulärer AGE-Vorstufen schädigt Zielzellen durch drei Hauptmechanismen:

- I. durch AGE-modifizierte intrazelluläre Proteine weisen eine veränderte Funktion auf,
- II. durch AGE-Vorstufen modifizierte extrazelluläre Matrixbestandteile interagieren in abnormer Weise mit anderen Matrixbestandteilen und mit Rezeptoren für Matrix-Proteine (Integrine),
- III. Plasmaproteine, die durch AGE-Vorstufen modifiziert wurden, binden an AGE-Rezeptoren auf endothelialen Zellen, Mesangialzellen und Makrophagen und induzieren so die Rezeptor-aktivierte Produktion von

ROS. Die AGE-Rezeptor-Verbindung aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B, was wiederum pathologische Veränderungen der Genexpression nach sich zieht.

Der Prozeß der Protein-Kreuzverknüpfung führt zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur und so zur Veränderung der funktionellen Eigenschaften mehrerer wichtiger Matrixmoleküle und somit auch Gewebefunktionen und -eigenschaften (z.B. Kollagen-Modifikation und die damit einhergehende Veränderung von Struktur und Permeabilität von Gefäßwänden) durch die AGE-Bildung. So ist z.B. glykosyliertes LDL stärker atherogen als nicht-glykosyliertes LDL.

In Zellkulturen rufen einzelne AGE-Rezeptoren Langzeiteffekte der AGEs auf zelluläre Schlüsselzellen diabetischer Komplikationen (wie z.B. Makrophagen, glomerulären Mesangiumzellen und vaskulären Endothelzellen) hervor. Zu diesen Effekten gehört die Expression von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch Makrophagen und Mesangiumzellen (Interleukin-1, insulin-like growth factor-1, tumor necrosis factor- α , macrophage colony-stimulating factor, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor und platelet-derived growth factor) [96], sowie die Expression koagulations- und entzündungsfördernder Moleküle durch Endothelzellen (Thrombomodulin, tissue factor und das Zell-Adhäsionsmolekül VCAM-1). Die AGEs bewirken Kreuzverknüpfungen von Proteinen (z.B. Kollagen, extrazelluläre Matrixproteine, langlebige Moleküle wie DNA und Membranproteine) und somit eine Beschleunigung der Arteriosklerose, sie begünstigen die glomeruläre Dysfunktion, lösen die endotheliale Dysfunktion aus und verändern schließlich Zusammensetzung und Struktur der extrazellulären Matrix. So begünstigen AGEs Koagulation

und Thrombose und initiieren Atherosklerose durch Stimulation der Expression von AGE-Rezeptoren (RAGE) durch Makrophagen [3, 89]. Die AGEs tragen somit zur Entstehung der diabetischen mikrovaskulären Störungen bei.

Weiterhin scheint die Bindung von Liganden an endotheliale AGE-Rezeptoren zumindest zum Teil die von Diabetes verursachte Hyperpermeabilität der Kapillarwand hervorzurufen (wahrscheinlich durch die Induktion von VEGF). Ebenso können Basalmembranproteine gegen ihren Abbau resistent werden und an Dicke und Steifheit zunehmen.

AGEs können durch Abfangen (Quenching) von Stickstoffmonoxid dazu führen, dass die Relaxation der Gefäßwand bzw. -muskulatur reduziert ist. Auch andere Proteineigenschaften (z.B. Diffusionskoeffizient, Viskosität und Elastizität) können sich ändern und auf diese Weise zu Funktionseinbußen der betroffenen Proteine führen.

Übereinstimmend mit dieser These bedingte im Tierversuch die Blockade des RAGE-Rezeptors die Entstehung einer vergleichsweise nur gering ausgeprägten makrovaskulären Erkrankung. Weiterhin waren eine Prävention der diabetischen Nephropathie und eine Verbesserung der Wundheilung zu verzeichnen [89].

2.2.4.4.3. Rolle der Glykosylierung bei der diabetischen Neuropathie

Eine erhöhte nicht-enzymatische Glykosylierung ließ sich sowohl tierexperimentell im peripheren Nerven als auch bei Patienten mit Diabetes mellitus nachweisen [97, 98]. Die so entstehenden AGEs akkumulieren in den peripheren Nerven [97, 99], wo sie zur segmentalen Demyelinisierung

beitragen sollen. Dies geschieht über die Erkennung dieser Myelinproteine durch AGE-spezifische Rezeptoren auf Makrophagen, die dann zur Myelinzerstörung und anschließenden Phagozytose führt [98].

2.2.4.4.4. Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren durch AGE und Hyperglykämie

Die AGE-Bildung wurde bislang hauptsächlich als Prozeß der Protein-Modifikation diskutiert. Aus neueren Studien ergibt sich jedoch, dass Interaktionen von AGE-modifizierten Proteinen mit spezifischen AGE-Rezeptoren (RAGE) nicht nur dazu dienen, AGE-Proteine zu eliminieren, sondern auch Signalübertragungswege zu aktivieren, die zu einer Bildung von ROS, zur Depletion von zellulären antioxidativen Abwehrmechanismen (z.B. Glutathion, Ascorbat) und zur Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B [100, 101] führen. Die Aktivierung von NF- κ B (durch oxidativen Stress und über die AGE-Bildung) und vermutlich auch anderer redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren unterstützt die Expression einer Vielzahl von Kininen (z.B. procoagulant tissue factor, Endothelin-1, Zytokine, Adhäsionsmoleküle VCAM-1 [vascular cell adhesion molecule 1], ICAM-1 [intercellular adhesion molecule 1] und MCP-1 [monocyte chemoattractant protein 1]) [100-104]. Für alle diese Substanzen konnte eine Erhöhung bei Patienten mit Diabetes festgestellt werden. Es wird angenommen, dass oxidativer Stress über die Bildung von AGE zu einer gesteigerten Expression von Endothelin-1 (ET-1), einem starken Vasokonstriktor führt, NF- κ B dient wahrscheinlich als Mediator der ET-1-Transkription [96].

Das Konzept des AGE-induzierten oxidativen Stresses, der Transkriptionsfaktoren aktiviert, könnte das gemeinsame Auftreten von oxidativem Stress und Veränderungen des dynamischen endothelialen Gleichgewichts zwischen einem gerinnungshemmenden und einem gerinnungsfördernden Zustand, sowie zwischen Vasodilatation und Vaso-
konstriktion erklären.

2.2.4.4.5. *Verstärkte Aktivierung der Protein-Kinase C- β*

Intrazelluläre Hyperglykämie führt über eine Steigerung des Gehalts am Lipid-Second messenger Diacylglycerol (DAG) zu einer Erhöhung der de novo-Synthese mehrerer Isoformen der PKC-Familie, insbesondere zu einer Aktivierung der β - und δ -Isoformen von PKC.

Hyperglykämie kann auch PKC-Isoformen indirekt durch die Verbindung von AGE-Rezeptoren und durch eine erhöhte Aktivität des Polyol-Stoffwechselweges – vermutlich durch Erhöhung der ROS – aktivieren.

Beim frühen experimentellen Diabetes konnte gezeigt werden, dass eine Aktivierung der PKC- β -Isoformen Veränderungen des retinalen und renalen Blutflusses bedingt – eventuell durch Suppression der NO-Produktion und / oder Steigerung der Endothelin-1-Aktivität. Weiterhin findet sich über diesen Mechanismus Hyperglykämie-induziert sowohl glomerulär als auch in glatten Muskelzellen eine reduzierte Produktion von NO. Darüber hinaus induziert die Aktivierung von PKC durch erhöhten Glukosespiegel die Expression des Permeabilitäts-steigernden Faktors VEGF in glatten Muskelzellen und unterstützt durch Expression von TGF- β 1, Fibronektin und Typ IV-Kollagen – sowohl in Mesangiumzellen in vitro als auch in den Glomeruli diabetischer

Ratten – die Akkumulierung von mikrovaskulären Matrixproteinen. Dieser Effekt scheint bedingt zu sein durch die Inhibition der Stickstoffmonoxidproduktion durch PKC, die auch an der Aktivierung von NF- κ B in kultivierten Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen beteiligt ist [89].

Eine Behandlung mit einem spezifischen PKC- β -Inhibitor (Ruboxistaurin) reduzierte die PKC-Aktivität in Retina und renalen Glomeruli diabetischer Tiere signifikant. Die Inhibition der PKC- β führte zu einer Reduktion diabetesbedingter Defizite mit Zunahme des endoneuralen Blutflusses und der Nervenleitgeschwindigkeit [105], sowie Abnahme des oxidativen Stresses [106].

2.2.4.4.6. *Erhöhter Fluss durch den Hexosamin-Stoffwechselweg*

Erhöhte intrazelluläre Glukose, die über den Hexosamin-Stoffwechselweg verarbeitet wird, spielt ebenfalls eine Rolle bei der Entstehung diabetischer Komplikationen. Die Aktivierung dieses Stoffwechselweges durch Hyperglykämie kann zu multiplen Veränderungen sowohl der Genexpression als auch der Proteinfunktion führen.

Diese von Brownlee diskutierten Mechanismen sind Hyperglykämie-induziert und führen zu einer Überproduktion von Superoxid durch die mitochondriale Elektronentransportkette, somit also zur gesteigerten Bildung von ROS. In Versuchen konnte durch Inhibition der einzelnen Stoffwechselwege der Zusammenhang zwischen diesen und der Bildung von ROS – und somit der Entstehung diabetischer Komplikationen – deutlich gemacht werden [88].

2.2.4.4.7. Verminderte antioxidative Abwehr

Neben den von Brownlee diskutierten Mechanismen zur Ausbildung diabetischer Folgeschäden spielt ebenfalls eine reduzierte antioxidative Abwehr (in peripheren Nerven) bei der Entstehung oxidativen Stresses eine wichtige Rolle:

Im menschlichen Körper finden sich einige synergistisch arbeitende antioxidative Schutzmechanismen, welche die Oxidation der Biomoleküle, durch die der oxidative Stress in Form freier Radikale entsteht, in Grenzen halten.

Superoxiddismutase (SOD; katalysiert die Bildung von Wasserstoffperoxid aus zellulären Superoxidradikalen [$O_2^{\cdot-}$]), Vitamin E, Glutathion, α -Liponsäure, die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH und die Glutathion-Peroxidase sind wichtige antioxidative Schutzsubstanzen [42, 44, 107] und neutralisieren Lipid-Hydroperoxide und Wasserstoffperoxid. Diese antioxidativen Schutzsubstanzen werden beim Abfangen der freien Radikale selbst oxidiert und durch Regenerationssysteme wieder in ihre aktive reduzierte Form zurückgeführt. So entsteht z.B. bei der Reaktion von Vitamin E (Tocopherol) mit einem Peroxyl-Radikal durch Oxidation ein Tocopheroxyl-Radikal. Dieses wiederum wird u.a. durch Vitamin C (Ascorbat) und Thiole reduziert [42].

Auch Moleküle, die selbst durch freie Radikale geschädigt werden und auf diese Art wertvollere Moleküle vor einem Angriff schützen, sind Teil der antioxidativen Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers. Als Beispiel hierfür kann das Albumin genannt werden. Man kann diese Schutzsubstanzen gemäß ihrer chemischen Eigenschaften einteilen in hydrophobe Verbindungen (z.B. Vitamin E [α -Tocopherol] und Karotinoide inaktivieren hydrophobe ROS) und hydrophile Verbindungen (z.B. Vitamin C inaktiviert hydrophile ROS) [107].

Einige dieser antioxidativen Substanzen werden im menschlichen Körper selbst produziert (z.B. Superoxiddismutase, Katalase), andere Antioxidantien nimmt der Mensch über die Ernährung auf. Antioxidative Wirkungen von Vitamin E, Vitamin C, β -Karotin bzw. anderen Karotinoiden und verwandten Pflanzenpigmenten und Flavonoiden konnten in vielen Versuchen belegt werden. Einige dieser Substanzen (z.B. Vitamin C und einige pflanzliche Phenole) können in vitro durch Interaktion mit Eisen- oder Kupferionen auch pro-oxidativ wirken [108-111]. Dem antioxidativen Effekt dieser Stoffe wird gegenüber dem prooxidativen jedoch deutlich mehr Bedeutung beigemessen [110, 112]. Fest steht, dass einige Stoffe in veränderter Umgebung ggf. sehr unterschiedlich reagieren können.

Experimentelle Studien konnten eine Prävention bzw. Korrektur einer Störung des Nerven-Blutflusses und der NLG bzw. eine Normalisierung der mechanischen und thermischen Hyperalgesie durch Gabe verschiedener Antioxidantien zeigen: u.a. Acetylcystein, α -Tocopherol, Probucol, Glutathion, α -Liponsäure [113-120].

Beispiele für Abwehrmoleküle der freien Radikale im peripheren Nerven sind:

- Im Zytosol: Ascorbat (Vitamin C), Urat, Zystein, Transferrin, Albumin, Coeruloplasmin, Glutathion, Glutathion-Peroxidase, Glutathion-Reduktase, Katalase, Superoxiddismutase.
- In der Membran: α -Tocopherol (Vitamin E) ist ein lipophiles / hydrophobes physiologisches Antioxidans, das in die Zellmembranen inkorporiert wird. Hier kann es daher die Oxidation der Membranlipide, bei denen es sich häufig um ungesättigte und somit durch freie Radikale stark gefährdete Moleküle handelt, verhindern. So führte in Untersuchungen eine experimentelle Depletion des Vitamin E-Gehalts bei nicht-diabetischen Tieren zur sensorischen Polyneuropathie und bei diabetischen Tieren zur Verschlechterung der bestehenden Neuropathie [62].

- Die wichtigsten enzymatischen, antioxidativ wirksamen Substanzen sind die oben genannten Antioxidantien Superoxiddismutase, Katalase, Glutathion-Peroxidase und Glutathion-Reduktase [42].

Beim Diabetes wurden Störungen verschiedener antioxidativer Schutzmechanismen wie z.B. des Glutathion-Redox-Systems und Vitamin C / Vitamin E-Zyklus festgestellt [78]. Bei experimenteller diabetischer Polyneuropathie fand sich eine Abnahme der antioxidativen Schutzsysteme [60]. So wurde eine verminderte Aktivität der Superoxiddismutase [60] und des körpereigenen Antioxidans Glutathion im peripheren Nerven nachgewiesen [61, 62].

2.2.4.4.8. *Stickstoffmonoxid*

Oxidativer Stress kann zu NO-Mangel führen, welcher wiederum, zusätzlich zur Verringerung des mikrovaskulären Flusses, die Expression von Adhäsionsmolekülen beschleunigen, die Blut-Nerven-Schranke in ihrer Permeabilität beeinträchtigen, die Bildung von Superoxid-Radikalen begünstigen, die Adhäsionsfähigkeit der Gefäßwand und die Hemmung des Wachstums der glatten Muskelzellen beeinträchtigen sowie PKC und NF- κ B aktivieren kann.

Der erhöhte Umsatz im Polyolstoffwechsel im Rahmen der chronischen Hyperglykämie führt ebenfalls zu einem NO-Mangel im Endothel des Nerven [121, 122]. Da NO die Expression von ICAM-1, VCAM-1 und anderer Adhäsionsmoleküle inhibiert [123], werden diese Moleküle beim NO-Mangel hochreguliert.

2.2.4.5. Marker für oxidativen Stress im Plasma

2.2.4.5.1. Isoprostane

F₂-Isoprostane (wie z.B. 8-epi-PGF_{2α}) sind in den menschlichen Körperflüssigkeiten in nur geringer Konzentration enthalten. Sie sind Isomere von Prostaglandinen, die infolge der (Per-)Oxidation von Arachidonsäure bzw. Arachidonsäure-haltigen Phospholipiden durch freie Radikale in vivo entstehen und in Urin und peripherem Blut von Mensch und Tier nachweisbar sind [124-131]. Die meisten Isoprostane liegen nicht ungebunden im Plasma vor, sondern sind mit (Phospho-)Lipiden verestert. Die Isoprostane entstehen als spezifische Produkte aus der Peroxidation ungesättigter Fettsäuren in Lipiden [127, 132-140], ihre Konzentration stellt somit ein Maß für den oxidativen Stress in vivo dar.

Erhöhte F₂-Isoprostane bzw. erhöhtes 8-epi-PGF_{2α} fanden sich bei mehreren Erkrankungen bzw. Toxinen, die mit erhöhter Schädigung durch oxidativen Stress bzw. mit einer Prädisposition zur beschleunigten Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen einhergehen: z.B. Rauchen, Diabetes, Leberzirrhose, Alkoholabusus [130, 132, 133, 138, 141-145]. Weiterhin findet sich eine Erhöhung der F₂-Isoprostane im fortgeschrittenen Alter [130] und bei Hypercholesterinämie [146].

Marker der Lipidperoxidation sind bei Diabetikern erhöht [147-151], wobei eine Erhöhung bereits bei Patienten ohne chronische Komplikationen zu finden ist [148-150]. Verschiedene Autoren halten die Messung der endogenen Produktion von Prostaglandinen (wie F₂-Isoprostanen bzw. 8-epi-PGF_{2α}) in Blut und Urin in vivo – als Biomarker für die Lipidperoxidation und damit für erhöhten oxidativen Stress – für einen der aussagekräftigsten Parameter [127, 131, 152-154].

In vivo konnte ein Zusammenhang zwischen chronischer Hyperglykämie und der Konzentration von 8-epi-PGF_{2α} im Urin hergestellt werden [138]. Dieser Befund

stimmt überein mit den Ergebnissen von in vitro-Untersuchungen, die eine gesteigerte Bildung und Freisetzung von 8-epi-PGF_{2α} unter hyperglykämischen Bedingungen nachwiesen [155]. Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse von Gopaul et al., die einen erhöhten Plasmagehalt an verestertem 8-epi-PGF_{2α} bei Typ 2 Diabetikern fanden, der nicht mit Nüchternblutzucker oder HbA_{1c} korrelierte [132]. Andere Studien zeigten erhöhte Werte für 8-epi-PGF_{2α} im Urin [156] bzw. eine Abnahme der 8-epi-PGF_{2α}-Exkretion unter verbesserter Blutzuckereinstellung [138].

Gegenüber anderen Parametern haben die F₂-Isoprostane als Marker der Lipidperoxidation in vivo günstige Eigenschaften: 1.) es handelt sich um stabile, spezifische Produkte der Lipidperoxidation; 2.) sie treten in gut nachweisbaren (wenn auch geringen) Mengen in allen Geweben und Flüssigkeiten auf; 3.) ihre Konzentration ist abhängig von oxidativem und antioxidativem Status [157] und unabhängig vom Gesamtfettgehalt der untersuchten Körperflüssigkeit.

Die Messung der Isoprostane aus Plasmaproben wirft das mögliche Problem der artifiziellen Bildung dieser Substanzen durch Autoxidation der im Plasma vorkommenden Arachidonsäure auf, wenn die Probe nicht ordnungsgemäß gelagert bzw. nicht rechtzeitig bearbeitet wird. So ist z.B. eine Lagerungstemperatur von -70°C bis zu 6 Monaten als unbedenklich bezüglich des Auftretens nachträglicher F₂-Isoprostan-Bildung durch Autoxidation anzusehen. Weil Urin kaum Lipide / Substrat enthält, ist Autoxidation hier kein relevantes Problem [124, 145].

2.2.4.6. Marker für endotheliale Dysfunktion im Plasma

2.2.4.6.1. Halogenierte Oxidantien (*hypochlorige Säure, unterbromige Säure*)

Die Reaktion des Zellenzyms Myeloperoxidase (in Neutrophilen und Monozyten) mit Wasserstoffperoxid und Chlor führt zur Entstehung von hypochloriger Säure (= HOCl = unterchlorige Säure), während die Peroxidase das eosinophile Wasserstoffperoxid mit Brom zu hypobromiger Säure (= HOBr = unterbromige Säure) katalysiert. An Entzündungsherden können sich Leukozyten anhäufen, wodurch die Freisetzung dieser Zellenzyme eine schwere Schädigung verursachen kann.

Halogenierte Oxidantien besitzen die Fähigkeit, insbesondere Moleküle, die „-SH“-Gruppen enthalten, zu oxidieren. HOCl spielt eine entscheidende Rolle bei Gewebeschädigung unter inflammatorischen Bedingungen und kann endotheliale Dysfunktion durch Modifikation von L-Arginin induzieren [158]. Es ist ein Marker für endotheliale Dysfunktion und wird als proinflammatorisches Oxidans bezeichnet. HOCl inaktiviert rasch die α_1 -Antiprotease. Dieses Enzym hindert proteolytische Enzyme wie Elastase daran, Gewebe zu zerstören.

HOCl kann Kollagenase, die natürliches / natives Kollagen abbaut, und Gelatinase, die denaturiertes Kollagen angreift, aktivieren und somit auch über diesen Mechanismus einen Zellschaden begünstigen.

2.2.4.6.2. Adhäsionsmoleküle VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*) und ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*)

Die Adhäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 gehören zu den wichtigsten Adhäsionsmolekülen im menschlichen Körper. Es existieren verschiedene Formen dieser Adhäsionsmoleküle: einerseits die an der jeweiligen Zelloberfläche (membran-)gebundene Form, andererseits die im Plasma lösliche Form (= sICAM-1 bzw.

sVCAM-1 = soluble ICAM-1 bzw. soluble VCAM-1). Die löslichen Formen – sICAM-1 und sVCAM-1 – sind relativ leicht im Plasma nachzuweisen [159, 160].

Die Funktion dieser löslichen Formen im menschlichen Körper ist noch nicht geklärt, aber ihre Konzentration im Plasma spiegelt die Expression dieser Moleküle z.B. auf Leukozyten und Endothelzellen, d.h. in ihrer membrangebundenen Form wider [159, 161, 162].

Die Adhäsionsmoleküle sind normalerweise in geringem Maß auf verschiedenen Zellarten exprimiert. So findet sich z.B. das membrangebundene VCAM-1 hauptsächlich auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Gewebsmakrophagen [163]. Physiologischerweise sind die Aufgaben von VCAM-1 die Zusammenlagerung der Monozyten und Lymphozyten sowie die Mitwirkung an der transendothelialen Wanderung der Leukozyten [164-167].

Vor allem bei Entzündungsreizen, aber auch bei malignen Prozessen, Nierenschäden oder Autoimmunerkrankungen, wird ein Anstieg der Adhäsionsmoleküle beobachtet [159, 168-171]. Da Entzündungsvorgänge mit oxidativem Stress einhergehen [172], wie auch die diabetische Neuropathie, könnten Adhäsionsmoleküle im Kontext der mikrovaskulären Theorie eine Rolle bei der Entstehung der diabetischen Neuropathie spielen.

Die Bildung z.B. von VCAM-1 wird im menschlichen Körper durch AGEs stimuliert: durch Bindung von AGEs an ihre endothelialen Rezeptoren (RAGE) wird die Expression sowohl der Endothelzell-assoziierten als auch der löslichen Form von VCAM-1 unter anderem durch den entstehenden zellulären oxidativen Stress und die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B induziert.

VCAM-1 und auch ICAM-1 steuern die Wechselwirkung zwischen Endothel und Leukozyten und beeinflussen auf diesem Weg die Anlagerung an Endothelzellen und

auch die Migration der Leukozyten durch die Endothelbarriere in den Interzellularraum. Hierdurch induzieren die Adhäsionsmoleküle einen wichtigen initialen Schritt in der Pathogenese arteriosklerotischer Gefäßschädigungen [173, 174]. Erhöhte Werte für Adhäsionsmoleküle gehen daher mit einem erhöhten Risiko für die Entwicklung sowohl mikro- als auch makrovaskulärer Schädigungen einher. So konnte die Hoorn Study [175] belegen, dass ein erhöhter Plasmagehalt an sVCAM-1 mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Mortalität bei Typ 2 Diabetikern einhergeht. Eine weitere Studie konnte eine signifikante Korrelation zwischen erhöhter Konzentration von sVCAM-1 und dem Ausmaß der diabetischen mikrovaskulären Komplikationen aufzeigen [176].

Typ 2 Diabetiker mit erhöhten Adhäsionsmolekülen im Plasma zeigten ein gehäuftes Vorkommen der diabetischen Nephropathie [176, 177] und Retinopathie [176, 178, 179]. In einer weiteren Studie konnten erhöhte Konzentrationen für sICAM-1 und für sVCAM-1 bei Typ 1 Diabetikern mit Mikroalbuminurie nachgewiesen werden [180]. Koga et al. [176] zeigten eine signifikante Erhöhung von sVCAM-1 bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und peripherer Neuropathie gegenüber denen ohne Neuropathie. Inwieweit Plasma-Adhäsionsmoleküle einen prädiktiven Wert hinsichtlich der Progression einer diabetischen Polyneuropathie darstellen könnten, wurde in einer prospektiven Pilotstudie von Jude et al. [181] untersucht. ICAM-1, jedoch nicht VCAM-1, war signifikant mit einer Verlangsamung der NLG über 5 Jahre assoziiert.

In zahlreichen Studien konnte eine Erhöhung der Adhäsionsmoleküle sowohl beim Typ 1 als auch beim Typ 2 Diabetes festgestellt werden [182-184]. Bei Typ 2 Diabetikern zeigte sich meist eine Erhöhung von sVCAM-1 [177, 183-186], während einige wenige andere Studien dies nicht bestätigen konnten [187, 188]. Eine weitere

Studie zeigte bei Typ 2 Diabetikern, dass sICAM-1 bei den Patienten signifikant höher war als bei den Kontrollpersonen, während sVCAM-1 bei Diabetikern mit Makroangiopathie höher als bei denen ohne diese Komplikation war [189]. Eine weitere Untersuchung [184] konnte jedoch keine unterschiedlichen VCAM-1-Werte zwischen Diabetikern mit und ohne Makroangiopathie nachweisen.

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Plasma-/Biomarker für oxidativen Stress untersucht: Plasma 8-epi-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (als Marker für Lipidperoxidation), Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)-Produktion, Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$) Lag time (Latenzzeit bis zur Peroxidation) und HOCl-Produktion (als proinflammatorisches Oxidans und Marker für endotheliale Dysfunktion), sowie Vitamin E und Vitamin C (als Marker für antioxidative Schutzsysteme) und ICAM bzw. VCAM (als weitere Marker für endotheliale Dysfunktion).

3. Fragestellung

Ziel dieser Querschnittstudie war es, festzustellen, inwieweit sich bei Diabetikern mit verschiedenen Schweregraden der peripheren und / oder autonomen diabetischen Neuropathie Hinweise für erhöhte / herabgesetzte Konzentrationen verschiedener Marker für oxidativen Stress bzw. antioxidativen Schutz ergeben. Zu diesem Zweck wurden eine detaillierte quantitative Charakterisierung und Staging der Polyneuropathie und kardiovaskulären autonomen diabetischen Neuropathie vorgenommen und ein breites Spektrum von Markern für oxidativen Stress, antioxidative Abwehr bzw. endotheliale Dysfunktion eingesetzt.

4. Probanden

Patienten mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes wurden aus der klinischen Abteilung der Deutschen Diabetes-Klinik am Deutschen Diabetes-Zentrum (DDZ), Düsseldorf, rekrutiert. Insgesamt wurden 189 ambulante oder stationäre Patienten in die Studie aufgenommen. Weiterhin wurden 85 gesunde Kontrollpersonen für die Studie rekrutiert. Alle Studienteilnehmer erklärten ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie.

Einschluss- und Ausschlusskriterien

1. Typ 1 oder Typ 2 Diabetes gemäß Kriterien der World Health Organization (WHO) / American Diabetes Association (ADA),
2. Alter \geq 18 Jahre,
3. Neuropathie nicht-diabetischer Genese (z.B. alkoholische oder urämische Neuropathie, Vitamin B₁₂-Mangel, Hypothyreose),
4. Raucher oder ehemalige Raucher (Nikotinabusus maximal bis 1 Jahr vor Studienteilnahme),
5. Einnahme von Antioxidantien (z.B. Vitamin C, Vitamin E, α -Liponsäure, β -Carotin, Probucol, Carvedilol) oder Prooxidantien (z.B. Eisenpräparate, Primaquin) während der letzten 3 Monate,
6. pAVK mit Claudicatio intermittens und / oder beidseits nicht-palpable Fußpulse,
7. Koronare Herzkrankheit (KHK) mit / ohne Angina pectoris, Z.n. Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz (Grad nach New York Heart Association NYHA III-IV) oder Z.n. Herzschrittmacher-Implantation, Herzrhythmusstörungen, Reizleitungsstörungen, Kardiomyopathien, Herzklappenfehler,

8. Aktuelle Medikation, die die Funktion des peripheren und / oder autonomen Nervensystems beeinflussen könnte (Betarezeptorenblocker, trizyklische Antidepressiva, Antihypertensiva wie z.B. α -Blocker [z.B. Prazosin] oder Imidazolinrezeptoragonisten [z.B. Clonidin], bestimmte Antiarrhythmika [z.B. Diltiazem, Herzglykoside]),
9. Neurologische Erkrankungen (z.B. M. Parkinson, Multiple Sklerose),
10. Blutzucker >400 mg/dl und / oder Ketonurie (ketotische / ketoazidotische Stoffwechsellentgleisungen unmittelbar vor Untersuchungsbeginn).

Gesunde Kontrollpersonen fanden sich unter den Mitarbeitern des Deutschen Diabetes-Zentrums, Düsseldorf, sowie unter den Patienten einer augenärztlichen Praxis in Langenfeld.

Diese Kontrollpersonen erfüllten folgende Ausschlusskriterien:

- a) Diabetes mellitus,
- b) Raucher (Nikotinabusus maximal bis 1 Jahr vor Studienteilnahme),
- c) Diät vor und während der Untersuchungen,
- d) Einnahme von Anti- oder Prooxidantien innerhalb der vorangegangenen 3 Monate,
- e) Einnahme von Medikamenten zur Behandlung chronischer Erkrankungen.

Wurde eines der genannten Kriterien innerhalb der genannten Zeiträume vor Durchführung der Untersuchungen nicht erfüllt, führte dies zum Ausschluss von der Studienteilnahme.

Die Studie wurde in Übereinstimmung mit den Grundsätzen der Declaration of Helsinki für klinische Studien in ihrer Fassung aus dem Jahr 2000 durchgeführt.

5. Material und Methoden

5.1. Erfassung der peripheren Nervenfunktion

5.1.1. Nervenleitgeschwindigkeit (NLG)

Die periphere Nervenfunktion wurde mittels Messungen der NLG, quantitativer sensorischer Tests (Vibrationstest und Temperatursensitivität) und klinischer neurologischer Untersuchungen durch Erhebung des Neuropathy Symptom Score (NSS) nach Young et al. [16, 190, 191], des Neuropathy Impairment Score für die unteren Extremitäten (NIS[LL]) nach Dyck et al. [192-194] und des Neuropathy Disability Score (NDS) nach Young et al. [16, 190, 191] erfasst.

Elektrophysiologische Verfahren, wie die Bestimmung der motorischen und sensiblen NLG zeichnen sich durch eine hohe Objektivität, Sensitivität, Spezifität, Präzision und weitgehende Standardisierung aus [195]. Kritisch zu bemerken ist jedoch, dass mit Hilfe solcher Verfahren kein Aufschluß über neuropathische Symptome und Defizite erlangt werden kann. Weiterhin erfassen sie die Funktion der großkalibrigen myelinisierten, schnell leitenden Nervenfaserpopsulationen (A α - und A β -Fasern; nur ca. 20% der peripheren Nervenfasern) [4, 196].

Die motorische NLG wurde an N. medianus und N. peroneus, die sensible NLG an N. medianus und N. suralis mit Hilfe von Oberflächenelektroden unter Verwendung eines Sapphire Elektromyographen (Medelec, Woking, Surrey, England) bei einer Hautoberflächentemperatur von 33-34°C gemessen [4].

5.1.2. Quantitative sensorische Tests

Sie ermöglichen die „Bestimmung der absoluten sensorischen Schwelle, definiert als die minimale Energie, die zuverlässig für eine bestimmte Modalität entdeckt wird“

[197]. Die Vorteile dieser Tests bestehen in ihrer Einfachheit und Nichtinvasivität bei hoher Sensitivität sowie genauer Kontrolle der Stimulusintensität und des Testalgorithmus.

Als quantitative sensorische Messungen wurden durchgeführt:

1. Vibrationswahrnehmungsschwelle (VWS) am Os metacarpale des Digitus II rechts und am Malleolus medialis mit Hilfe der sogenannten method of limits (= Eingrenzungsmethode) (Vibrometer, Somedic, Stockholm, Schweden). Es wurde in 3 Durchgängen erfaßt, bei welcher Amplitude der Vibration ein Anstieg der Vibration zuerst wahrgenommen wurde (sog. appearance threshold) und in 3 weiteren Durchgängen, bei welcher Amplitude eine Abnahme der Vibration nicht mehr wahrgenommen wurde (sog. disappearance threshold). Die VWS in μm wurde definiert als der Mittelwert dieser insgesamt 6 Bestimmungen. Die Untersuchung der Vibrations-sensitivität dient der Funktionsprüfung der großkalibrigen Afferenzen nach Stimulation der Mechanorezeptoren [4].
2. Temperaturwahrnehmungsschwelle (TWS) (Wahrnehmungsschwellen für Warm- und Kaltreize [jeweils $n=7$]). Die Patienten sollen die erste Wahrnehmung einer Temperaturänderung durch einen Knopfdruck signalisieren. Als Messorte wurden unter der Verwendung des PATH-Testers 200 ([PAin and THERmal sensitivity tester], Tönnies, Deutschland) Daumenballen (Thenar) und der Fußrücken (laterales Dorsum pedis) mit Hilfe der method of limits (= Eingrenzungsmethode) gewählt. Die Messung der TWS ermöglicht somit eine Aussage über den Zustand der kleinkalibrigen A δ -

und C-Fasern zu treffen. Diese Fasertypen bilden den Großteil der peripheren Nervenfasern (ca. 80%) [4].

In ihrer Eigenschaft als psychophysische Methoden sind die quantitativen sensorischen Tests anfällig gegenüber Störfaktoren wie mangelnde Kooperations- und Konzentrationsfähigkeit seitens des Probanden [4], ermöglichen jedoch in Kombination mit der bereits erwähnten elektrophysiologischen Untersuchung (NLG) eine exakte Quantifizierung der peripheren Nervendysfunktion.

Im Rahmen der klinisch neurologischen Untersuchung wurden typische Symptome und Defizite der peripheren diabetischen Neuropathie durch Erhebung des Neuropathy Impairment Scores of the Lower Limbs (NIS[LL]) [192-194], des Neuropathy Symptom Scores (NSS) [16, 190, 191] und des Neuropathy Disability Scores (NDS) [16, 190, 191] erfaßt.

Diese Scores sind in den Abbildungen 1-3 dargestellt.

Abbildung 1:

NIS (LL)

Muskelschwäche	rechts	links
Beugung im Hüftgelenk		
Streckung im Hüftgelenk		
Beugung im Kniegelenk		
Streckung im Kniegelenk		
Dorsalflexion im oberen Sprunggelenk		
Plantarflexion im oberen Sprunggelenk		
Beuger der Zehen		
Strecker der Zehen		

Graduierung:

normal	=	0
25 % schwach	=	1
50 % schwach	=	2
75 % schwach	=	3
Bewegung gegen Schwerkraft	=	3,25
Bewegung bei aufgehobener Schwerkraft	=	3,5
Muskelzucken; keine Bewegung	=	3,75
Lähmung	=	4

Reflexe	rechts	links
PSR		
ASR		

Graduierung:

normal	=	0
abgeschwächt	=	1
nicht vorhanden	=	2
Pat. 50 – 69 J. →	ASR abgeschwächt	= 0
	ASR fehlt	= 1

Sensibilität	rechts	links
Berührungsdruk		
Nadelstich		
Vibration		
Gelenkposition		

Graduierung:			
normal	=		0
abgeschwächt	=		1
nicht vorhanden	=		2

Berührungsdruk, Nadelstich und Vibrationswahrnehmung wurden an der terminalen Phalanx der Großzehe getestet:

- Berührungsdruk: beurteilt mit langfaseriger Baumwolle
- Nadelstich: beurteilt mit geraden Nadeln
- Vibrationswahrnehmung: gemessen mit 128 Hz Stimmgabel (nach Rydel-Seiffer)

Die Wahrnehmung der Gelenkbewegung wurde durch Bewegung der terminalen Phalanx getestet.

Der NIS[LL] ist die Summe aus den o.g. Punktwerten, die für die rechte und die linke Körperhälfte zu einem Gesamtwert addiert wurden.

Abbildung 2:

NSS		Punkte
<i>Symptomatik Fuß / Unterschenkel</i>		
- Brennen, Taubheitsgefühl, Parästhesien	(= 2)	
- Schwächegefühl (Erschöpfung / Ermüdung), Krämpfe, Schmerzen	(= 1)	
<i>Lokalisation</i>		
- Füße oder	(= 2)	
- Unterschenkel oder	(= 1)	
- andere Lokalisation	(= 0)	
<i>Exazerbation</i>		
- nachts vorhanden oder	(= 2)	
- tagsüber und nachts vorhanden	(= 1)	
- oder nur tagsüber vorhanden	(= 0)	
- Patient wird durch Symptome aus dem Schlaf geweckt	(= 1)	
<i>Besserung der Symptome beim</i>		
- Gehen oder	(= 2)	
- Stehen oder	(= 1)	
- Sitzen bzw. Hinlegen	(= 0)	

Der NSS ist die Summe aus den Punkten, die den jeweils vorliegenden Beschwerden zugeordnet sind. Der NSS-Punktwert wurde einem Scoring unterzogen:

3-4 = leichte Symptome,

5-6 = mäßige Symptome,

7-10 = schwere neuropathische Symptome.

Abbildung 3:

NDS

	rechts	links
<i>Achillessehnenreflex (ASR)</i>		
- normal	0	0
- abgeschwächt	1	1
- fehlend	2	2
<i>Vibrationsempfindung</i>		
Messung am Fußrücken (1. Metatarsale distal mit semiquantitativer 128 Hz Stimmgabel nach Rydel-Seiffer am Fußrücken)		
1. Metatarsale distal (untere Normwerte bis 30 Jahre 6/8, über 30 Jahre 5/8), falls kein Empfinden besteht Messung am Malleolus medialis (untere Normgrenze bis 40 Jahre 6/8, über 40 Jahre 5/8)		
- normal	0	0
- abgeschwächt / fehlend	1	1
<i>Schmerzempfindung</i>		
Messung am Fußrücken		
- normal	0	0
- abgeschwächt / fehlend	1	1
<i>Temperaturempfindung</i>		
Messung am Fußrücken (mit kalter Stimmgabel)		
- normal	0	0
- abgeschwächt / fehlend	1	1

Der NDS-Punktwert wurde ebenfalls einem Scoring unterzogen:

- 3-5 = leichte neuropathische Defizite,
- 6-8 = mäßige neuropathische Defizite,
- 9-10 = schwere neuropathische Defizite.

Kriterien für das Vorliegen einer peripheren diabetischen distalen symmetrischen Polyneuropathie der unteren Extremitäten waren nach Dyck et al. [193]:

1. Reduktion der motorischen NLG des N. peroneus und / oder der sensiblen NLG des N. suralis,
2. erhöhte malleolare VWS,
3. erhöhte TWS für Kälte und / oder Wärme auf dem Fußrücken,
4. NIS[LL] ≥ 2 ,
5. NSS ≥ 3 .

Der Schweregrad der diabetischen Neuropathie wurde nach Dyck et al. [191] (bzw. Ziegler et al. [198]) in folgender Weise eingeteilt (Staging):

Stadium 0	=	< 2 der Kriterien 1-4 treffen zu, NSS < 3
	=	keine periphere Neuropathie
Stadium 1	=	≥ 2 der Kriterien 1-4 treffen zu und NSS < 3
	=	asymptomatische Neuropathie
Stadium 2	=	≥ 2 der Kriterien 1-4 treffen zu und NSS ≥ 3
	=	symptomatische Neuropathie

5.2. Kardiovaskuläre autonome Funktionstests

Zur Diagnostik der KADN wurde das Computersystem NeuroDiag II (Dr. Vetter GmbH, Baden-Baden, Deutschland) verwendet [199]. Das System ermittelt die Zeitabstände zwischen aufeinanderfolgenden R-Zacken in einer EKG-Ableitung (R-R-Intervalle).

Es wurden nach Ziegler [4] die folgenden Tests durchgeführt:

1. Variabilität der Herzfrequenz (heart rate variability = HRV) in Ruhe (5 Minuten)

Nach einer Ruheperiode von 5 Minuten wurde die HRV im Liegen und im Stehen unter normaler Atmung über jeweils 5 Minuten gemessen. Aus 150 artefaktfreien R-R-Intervallen wurden Herzfrequenz, Variationskoeffizient der R-R-Intervalle und die Wurzel der mittleren quadrierten aufeinanderfolgenden Differenzen (RMSSD = root mean squared successive difference) zwischen benachbarten R-R-Intervallen errechnet und eine Spektralanalyse durchgeführt. Diese Spektralanalyse erlaubt dabei die Auftrennung der HRV in ihre verschiedenen Komponenten; sympathischer und parasympathischer Einfluss auf das Herz werden so weitgehend getrennt quantifiziert (siehe VLF- und LF-Band).

2. VLF Band Energiespektrum (0,003-0,04 Hz) in Ruhe (5 Minuten)

Das Leistungsspektrum im Niederfrequenzband steht in Beziehung zu Fluktuationen des mit Thermoregulation assoziierten Vasomotoren-tonus und wird hauptsächlich durch das sympathische Nervensystem beeinflusst.

3. LF Band Energiespektrum (0,04-0,15 Hz) in Ruhe (5 Minuten)

Die mittelfrequente HRV steht in Beziehung zum sog. 10-Sekunden-Rhythmus (Mayer-Wellen), der durch die Barorezeptoren moduliert wird. Sie steht unter dem Einfluss von Sympathikus und Parasympathikus.

Die hochfrequente HRV, die vom Parasympathikus (N. vagus; der respiratorischen Aktivität zuzuordnen) beeinflusst wird, wurde in dieser Studie nicht zur weiteren Diagnostik herangezogen, da ihre Aussagekraft für die Beurteilung einer KADN eingeschränkt ist.

4. HRV unter tiefer Respiration (tiefe In- und Expiration) mit Berechnung der Mean circular resultant (MCR) (mittels Vektoranalyse nach Weinberg und Pfeifer [200])

Während dieses Untersuchungsabschnittes musste der liegende Proband eine Atemfrequenz von 6 Atemzügen pro Minute einhalten (Inspirationszeit 6 Sekunden, Expirationszeit 4 Sekunden). Unter dieser Frequenz wurde bei gesunden Personen die maximale HRV beobachtet. Aus 100 artefaktfreien R-R-Intervallen wurden Herzfrequenz, Variationskoeffizient der R-R-Intervalle und root mean squared successive difference (RMSSD) berechnet.

In dem Atemzyklus mit der maximalen HRV wurden das längste R-R-Intervall während der Expiration ($R-R_{\max}$) und das kürzeste R-R-Intervall während der Inspiration ($R-R_{\min}$) ermittelt, daraufhin die Differenz $R-R_{\max} - R-R_{\min}$ (E-I-Differenz) und der Quotient $R-R_{\max} / R-R_{\min}$ (E/I-Quotient) berechnet. Mittels Vektoranalyse wurde der mean circular resultant (MCR) festgestellt.

5. Maximum / Minimum 30:15-Quotient nach dem Aufstehen

Während der EKG-Aufzeichnung wurde die ruhig liegende Testperson aufgefordert, sich zu erheben und sich neben die Untersuchungs- liege zu stellen. Im Augenblick des aktiven Aufstehens wurde der Test gestartet.

Die Hemmung des Parasympathikus führt zu einem Frequenzanstieg, dessen Maximum um den 15. Schlag liegt, gefolgt von einem Frequenzabfall mit einem Minimum um den 30. Schlag. Bei Vorliegen einer parasympathischen Innervationsstörung ist diese Sofortreaktion der Herzfrequenz geringer ausgeprägt oder gänzlich aufgehoben.

Beim Ewing-Test in seiner ursprünglichen Definition durch D.J.Ewing und B.F.Clarke sind für die Untersuchung das kürzeste R-R-Intervall um den 15. Herzschlag (Bereich 5.-25. Herzschlag) und das längste R-R-Intervall um den 30. Herzschlag (Bereich 20.-40. Herzschlag) nach dem Aufstehen von Bedeutung und werden somit zur Berechnung des Quotienten herangezogen. Der Zeitpunkt des Auftretens dieser kürzesten / längsten Intervalle ist interindividuell unterschiedlich. Aus diesen beiden Intervallen errechnet sich der Max/Min 30:15-Quotient:

$$\text{Max/Min 30:15-Quotient} = \text{RR}_{\text{max 20-40}} / \text{RR}_{\text{min 5-25}}$$

6. Valsalva-Quotient

Der Untersuchte wurde aufgefordert, im Sitzen in ein Mundstück zu blasen, das mit einem modifizierten Manometer verbunden war. Hierbei wurde ein konstanter Druck von 40 mmHg über 15 Sekunden lang aufrechterhalten. Die intrathorakale Drucksteigerung bewirkt reaktiv über den Barorezeptorreflex eine Tachykardie und Vasokonstriktion, wodurch der initiale Blutdruckabfall ausgeglichen wird. Nach Druckentlastung kommt es vorübergehend zu einem Blutdruckanstieg, der über eine Aktivierung des Parasympathikus reflektorisch zum Frequenzabfall führt. Dieser Test dient der allgemeinen Beurteilung des kardiovaskulären Systems, da ein

erniedrigter Valsalva-Quotient Ausdruck einer herabgesetzten Funktion des Parasympathikus, des Sympathikus oder der Barorezeptoren sein kann.

Die Aufzeichnung der R-R-Intervalle erfolgte während des Manövers und anschließend über 15 Sekunden. Der Valsalva-Quotient wurde aus dem längsten R-R-Intervall während der dem Pressversuch folgenden 15 Sekunden, geteilt durch das kürzeste R-R-Intervall während des Manövers, berechnet.

Wegen der Gefahr der Auslösung von Fundus- oder Glaskörperblutungen wurde bei Patienten mit proliferativer Retinopathie auf die Durchführung des Valsalva-Manövers verzichtet.

7. Änderung des systolischen Blutdrucks beim Aufstehen aus vorher liegender Position (Orthostase-Test)

Nach einer Ruhephase von 5 Minuten Dauer, in der minütlich der Blutdruck mit einem automatischen Blutdruckmessgerät nach Riva Rocci erfasst wurde (Dynamap 1846 SX von Critikon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland; Messbereiche systolisch 30-245 mmHg, diastolisch 10-210 mmHg), wurde nach aktivem Aufstehen in den folgenden 5 Minuten erneut der Blutdruck minütlich gemessen. Aus den so gewonnenen jeweils 5 Messungen des systolischen und des diastolischen Blutdrucks jeweils in der Ruhephase im Liegen und in der darauffolgenden Phase des Stehens und somit isometrischer Muskelkontraktion wurden einzelne Werte ausgewählt und ein Delta-RR berechnet: Die systolische Blutdruckänderung wird als die Differenz zwischen dem niedrigsten Wert vor dem Aufstehen und dem ersten Wert nach dem Aufstehen definiert. Der diastolische

Differenzwert wurde zwischen dem letzten gemessenen diastolischen Wert im Liegen und dem ersten gemessenen diastolischen Wert im Stehen ermittelt. Der Orthostasetest wurde als positiv bewertet (d.h. im Sinne einer hypotonen Orthostasereaktion), wenn der systolische Blutdruckabfall ≥ 28 mmHg betrug. Bei Patienten mit KADN kommt es typischerweise zu einem Abfall insbesondere des systolischen aber auch des diastolischen Blutdrucks ohne adäquaten Frequenzanstieg im Sinne einer asympathikotonen orthostatischen Hypotonie.

Die Testparameter 2 und 7 sind überwiegend sympathisch moduliert, die der Tests 1 und 3-6 werden überwiegend vagal beeinflusst.

Anhand der obigen 7 Tests wurde festgelegt:

Eine KADN wurde ausgeschlossen, wenn weniger als zwei von 5-7 verwertbaren oder keiner von 4 verwertbaren Tests pathologisch ausfiel (= Stadium 0).

Dagegen lag eine grenzwertige KADN vor, wenn 2 von 5-7 verwertbaren oder 1 von 4 verwertbaren Tests positiv war.

Eine gesicherte KADN wurde definiert als ≥ 3 von 5-7 verwertbaren Tests pathologisch bzw. ≥ 2 von 4 verwertbaren Tests pathologisch [198].

Als KADN-Score wurde die Anzahl der pathologischen Parameter unter den 7 relevanten Tests definiert (Range: 0-7).

5.3. Augenfundus

Die Untersuchungen des Augenhintergrundes wurden mittels Fundoskopie und Fundusfoto nach Pupillenerweiterung mittels der Kamera CR3-45NN (Canon, Tokyo, Japan) im DDZ durchgeführt und von einem erfahrenen Arzt beurteilt.

5.4. Probensammlung und Plasmaaufbereitung

Blut wurde nach einer 10-14stündigen Nahrungskarenz durch eine periphervenöse Blutentnahme in Probenröhrchen (10 ml) mit NH_4 und 2,7 ml fassenden Probenröhrchen mit EDTA (in einer Konzentration von 0,1%) gesammelt. Plasma wurde durch zehnmünütige Zentrifugation bei 1500xg unter Raumtemperatur erhalten. Plasma aus den EDTA-Probenröhrchen wurde für die spätere Analyse auf Vitamine und antioxidative Kapazität bei einer Temperatur von minus 85°C gelagert. Für die F_2 -Isoprostan-Analyse wurde jeweils 1ml Plasma aus den NH_4 -Probenröhrchen mit jeweils 10 μl des ketten- / bindungsbrechenden Antioxidans BHT (butyliertes Hydroxytoluol) versetzt (in einer Endkonzentration von 25 $\mu\text{mol/l}$) und bis zur späteren Analyse bei minus 85°C gelagert.

5.5. Laboruntersuchungen

Glykosyliertes Hämoglobin (HbA_{1c}) wurde durch Ionenaustauscherchromatographie isoliert und im vollautomatischen Analysensystem Diamat (Biorad, München, Deutschland) analysiert. Der Normbereich lag bei 4,2-6,2%.

Die Blutglukose wurde mit Hilfe eines enzymatischen Testverfahrens quantitativ bestimmt (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland). Anhand des Blutzuckertagesprofils wurde die mittlere Blutglukose errechnet (nüchtern, postprandial, präprandial vor dem Mittagessen und Abendessen sowie vor dem Schlafengehen).

Ein Urikase-basiertes Nachweisverfahren wurde zur Bestimmung der Harnsäure im Serum verwendet (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland).

Zur Messung des Gesamtcholesterins im Serum kam die Cholesterol-C high performance CHOD-PAP Methode (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland) zur Anwendung.

Der HDL-Anteil der Blutfette wurde ebenfalls enzymatisch nach der CHOD-PAP Methode gemessen (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland).

Anhand der gemessenen Werte für Gesamtcholesterin, Triglyzeride und HDL wurde mit Hilfe der Friedewald-Formel der LDL-Anteil an den Blutfetten errechnet.

Die Analyse der Gesamt-Triglyzeride erfolgte mit einem GPO-PAP high-performance, enzymatischen und kolorimetrischen / photometrischen Test (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland).

Mit einem auf Kreatininase basierenden Test wurde der Kreatiningehalt in Urin und Serum gemessen (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland). Fibrinogen wurde durch ein Analyseverfahren unter der Verwendung von Natriumcitrat bestimmt (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland).

Die Albuminausscheidungsrate im 12h-Urin wurde mittels kinetischer Nephelometrie [201] (Array Protein System, Beckman, Fullerton, CA, USA) und als Median aus 3 aufeinanderfolgenden Sammelperioden (3 aufeinander folgende Nächte) bestimmt. Das Bestehen einer diabetischen Nephropathie wurde definiert als mediane Urin-Albumin-Ausscheidungsrate von $\geq 20 \mu\text{g}/\text{min}$.

Ein vollautomatisiertes Hämatologie-Analysegerät Sysmex KX-21 (Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland; basierend auf der Resistenz-Meßmethode in Kombination mit einem Stromatolyser-WH [Sysmex Europe GmbH, Norderstedt, Deutschland]) wurde zur Messung der Leukozyten verwendet.

5.5.1. Marker für oxidativen Stress

5.5.1.1. *8-epi-Prostaglandin F_{2α}*

8-epi-PGF_{2α} wurde wie bereits zuvor beschrieben [129, 202, 203] in folgenden Arbeitsschritten analysiert: alkalische / basische Hydrolyse, Extraktion der Gesamtlipide, NH₂-Chromatographie, Pentafluorobenzyl (PFB)-Derivatisierung, Trimethylsilyl (TMS)-Äther-Derivatisierung und Gaschromatographie-Massenspektrometrie / Negative Ion chemische Ionisierung (GC-MS/NICI).

5.5.1.2. *Vitamin E*

α-Tocopherol wurde durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemäß bereits im Vorfeld veröffentlichtem Prozedere gemessen [203, 204].

Der Quotient aus Vitamin E und Lipiden wurde definiert als Konzentration von Vitamin E dividiert durch die Summe der Konzentrationen von Cholesterin und Triglyzeriden.

5.5.1.3. *Vitamin C*

Ascorbinsäure wurde auf zuvor etablierte Weise analysiert, das Vorgehen bei der Analyse bereits publiziert [203, 205].

5.5.1.4. *Reaktive Sauerstoffverbindungen*

In biologischen Systemen konzentriert sich die Aufmerksamkeit auf zwei freie Radikale, Superoxidanion (O₂^{•-}) und Hydroxyl-Radikal (OH[•]), die u.a. gebildet werden durch die Reduktion von Sauerstoff bzw. von Wasserstoffperoxid, Hydroxyl-Radikale können weiterhin aus Superoxidanionen gebildet werden.

Als antioxidative Kapazität bezeichnet man die Fähigkeit freie Radikale und Oxidantien abzufangen. Die sogenannte Total Antioxidant Capacity (TAC) wurde analysiert durch Chemilumineszenz unter Verwendung des Superoxidanions ($O_2^{\cdot-}$), des Peroxynitrits ($ONOO^-$) und der hypochlorigen Säure ($HOCl$) als prooxidativ wirksame Substanzen. Mit Hilfe der TAC werden sowohl alle bekannten und unbekanntes antioxidativen Aktivitäten, die in einer Probe existieren, als auch ihre Interaktionen erfasst.

Die in dieser Studie zur Messung der antioxidativen Kapazität des Plasmas genutzten ABEL[®] (= Analysis By Emitted Light) antioxidant test kits (Knight Scientific Limited, UK) basieren auf dem lichtemittierenden Protein Pholasin[®].

Die Testkits messen die Fähigkeit einer Probe, freie Radikale und andere Oxidantien in Gegenwart des Photoproteins Pholasin[®] abzufangen. Dabei emittiert Pholasin[®] Licht in Gegenwart verschiedener Systeme, die freie Radikale und bestimmte Oxidantien generieren können wie es in den verschiedenen, für die einzelnen Substanzen bzw. Gruppen von Oxidantien spezifischen, ABEL[®] Test-Kits das Superoxidanion, Peroxynitrit bzw. hypochlorige Säure tun [206].

Wurde die Probe bereits freien Radikalen und / oder Oxidantien ausgesetzt, wird ihr Gehalt an Antioxidantien sehr stark vermindert sein. Dadurch wird die Fähigkeit der Probe mit freien Radikalen und Oxidantien, die im Assay generiert werden, zu reagieren, herabgesetzt.

Die antioxidative Kapazität der Probe im Test wird ausgedrückt als prozentuale Abnahme der Peak Lumineszenz (des Maximums der Lichtemission) von Pholasin[®] und / oder der zeitlichen Verzögerung („Lag time“) in der die Peak Lumineszenz auftritt. Das Ergebnis ist die Lichtemission der Probe in Prozent der Lichtemission einer Kontrolllösung.

5.5.1.4.1. *Superoxidanion und Peroxynitrit*

Die Erhebung von TAC- $O_2^{\cdot-}$ und TAC- $ONOO^-$ wurde bereits in Veröffentlichungen der vorliegenden Arbeit beschrieben [203, 207].

5.5.2. Marker für Inflammation und endotheliale Dysfunktion

5.5.2.1. *Halogenierte Oxidantien (hypochlorige Säure)*

Analog zu den Messungen von TAC- $O_2^{\cdot-}$ und TAC- $ONOO^-$ wurden die Messungen von HOCl durchgeführt. Als spezifisches Reagens fungierte hier Chloramin T [208]. HOCl wird von Chloramin T gebildet, das Chloramin T zerfällt spontan unter Bildung von Chloridionen. Diese wiederum reagieren mit Wasserstoffperoxid, das in der Umwandlung des Superoxidanions oder durch andere Mechanismen zur HOCl-Bildung entsteht. Wird Chloramin T zu Pholasin[®] gegeben, emittiert dieses Licht. Das durch die Reaktion entstehende Lichtsignal wurde aufgezeichnet und die antioxidative Kapazität bei maximaler Lichtemission bestimmt (Messung in counts per minute [cpm]).

5.5.2.2. *Zelluläre Adhäsionsmoleküle*

Als Biomarker für Inflammation und endotheliale Dysfunktion wurden Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) und Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) im Serum (sICAM-1 und sVCAM-1) durch quantitative Sandwich Enzym Immunoassays bestimmt. Diese Immunoassays basieren auf mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gegen sICAM-1 und sVCAM-1 vorbeschichteten Mikro-Platten (R&D, Wiesbaden, Deutschland). sICAM-1 und sVCAM-1 in den jeweiligen Proben wurden durch den immobilisierten Antikörper an die Mikro-Platten gebunden und durch die Enzym-verbundenen, für die untersuchten Adhäsionsmoleküle spezifischen, monoklonalen Antikörper markiert (Sandwich-Methode). Nach dem Auswaschen

wurde die Substrat-Lösung zugegeben. Nach 30 Minuten wurde die Farbentwicklung gestoppt und die Farbintensität durch einen ELISA-Leser bei 620 nm gemessen. Die Standardkurven waren in einem Bereich von 0,5 bis 50 ng/ml für sICAM und 5 bis 80 ng/ml für sVCAM von der Konzentration linear abhängig.

Intra-assay Variation:	sICAM-1:	4,5%
	sVCAM-1:	5,4%
Inter-assay Variation:	sICAM-1:	8,2%
	sVCAM-1:	9,3%

5.6. Reagentien

Butyliertes Hydroxytoluol (BHT), α -Tocopherol, γ -Tocopherol, Ascorbinsäure (Vitamin C), Ascorbinoxidase, *o*-Phenylendiamin, Natriumacetat, *N,O*-bis(trimethylsilyl)trifluoro-Azetamid, Pentafluorobenzyl-Bromid und Diisopropylethylamin wurden bei der Sigma Chemical Company (Poole, Dorset, Großbritannien) erworben. Die Standardmessung von Prostaglandin F₂ (9,11,15*S*-trihydroxy-prosta-13*E*-en-1 Säure) schlossen 9 α ,11 α -PGF₂, 9 α ,11 β -PGF₂, 9 β ,11 α -PGF₂, 9 α ,11 α -8-epi PGF₂, 9 α ,11 α -15*R*-8-epi PGF₂, 3,3',4,4'-tetradeuteriertes 9 α ,11 α -PGF₂ (PGF₂-d₄) und 3,3',4,4'-tetradeuteriertes 9 α ,11 α -15*S*-8-iso PGF₂ (8-epi-PGF₂-d₄) ein und wurden von SPI Bio (Massy, Cedex, Frankreich), Aminopropyl (NH₂) Cartridges von der Waters Corporation (Milford, MA, USA) bezogen. Pholasin[®], Adjuvans K und 3-Morpholino-Sydnomin Hydrochlorid (SIN-1) wurden freundlicherweise von Dr. Jan Knight (Knight Scientific, Plymouth, Großbritannien) zur Verfügung gestellt. Weitere Mehrzweckchemikalien und organische Lösungsmittel, die zur Durchführung der Analysen benötigt wurden, wurden bezogen von BDH beziehungsweise Sigma (jeweils Poole, Großbritannien).

5.7. Statistische Analysen

Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert und Standardschätzfehler (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau wurde bei $\alpha=0,05$ definiert. Kontinuierliche Variablen wurden abhängig von ihrer Verteilung mittels parametrischer und nicht-parametrischer Tests verglichen, wobei für normalverteilte Daten der t-Test für unabhängige Gruppen und für nicht-normalverteilte der Mann-Whitney U-Test zur Anwendung kamen. Qualitative Daten wurden mittels Fisher's exact test analysiert, während Assoziationen zwischen Variablen mit linearer Regressionsanalyse untersucht wurden.

Um herauszufinden, ob oxidativer Stress eine unabhängige Determinante des Schweregrades der Polyneuropathie darstellt, wurde eine multiple logistische Regressionsanalyse mit NIS[LL] als abhängiger Variable durchgeführt. Fünf Marker für oxidativen Stress (8-epi-PGF_{2 α} , TAC-O₂[•], TAC-ONOO⁻, VE/Lipid-Quotient und VC) wurden in 5 getrennten Modellen jeweils dem Originalmodell zugefügt. Unabhängige Variablen in diesem Modell waren Alter, Geschlecht, BMI, Diabetestyp und -dauer, Körpergröße, HbA_{1c}, Albuminurie, Triglyzeride*, HDL*, LDL*, Retinopathie und arterielle Hypertonie (*Variablen im Modell mit VE/Lipid-Quotient ausgeschlossen).

6. Ergebnisse

Die demographischen, klinischen und biochemischen Daten der drei Diabetikergruppen und gesunden Kontrollpersonen sind in Tabelle 1 gezeigt.

Tabelle 1: Demografische und biochemische Daten der Kontrollpersonen und der 3 Diabetikergruppen

	Kontrollen	Diabetes PNP- KADN-	Diabetes PNP+ KADN-	Diabetes PNP+ KADN+
N	85	62	105	22
Alter (Jahre)	47,5 ± 1,9	43,0 ± 2,0	57,9 ± 1,2 ⁽¹⁾⁽²⁾	54,4 ± 2,9 ⁽²⁾
BMI (kg/m²)	25,1 ± 0,4	27,7 ± 0,6 ⁽¹⁾	28,2 ± 0,5 ⁽¹⁾	26,7 ± 1,0
Geschlecht (m/w)	42/58	36/64	57/43 ⁽²⁾	54/46
HbA_{1c} (%)	5,7 ± 0,1	9,1 ± 0,2 ⁽¹⁾	9,6 ± 0,2 ⁽¹⁾	9,8 ± 0,3 ⁽¹⁾
Mittlere Blutglukose (mg/dl)	--	182 ± 6,5	192 ± 4,9	199 ± 11,1
Harnsäure (mg/dl)	--	4,9 ± 0,2	5,3 ± 0,2	5,4 ± 0,3
Typ 1/Typ 2 Diabetes (%)	--	50/50	24/76 ⁽²⁾	36/64
Insulin-Therapie (%)	--	74	73	91
Diabetesdauer (Jahre)	--	7,5 ± 0,9	12,2 ± 1,0 ⁽²⁾	18,5 ± 2,0 ⁽²⁾⁽³⁾
Cholesterin (mg/dl)	224 ± 5,4	204 ± 6,0 ⁽¹⁾	223 ± 4,1 ⁽²⁾	213 ± 8,3
HDL (mg/dl)	62,2 ± 1,8	51,6 ± 1,8 ⁽¹⁾	48,9 ± 1,8 ⁽¹⁾	49,8 ± 4,4 ⁽¹⁾
LDL (mg/dl)	143 ± 4,7	123 ± 5,1 ⁽¹⁾	139 ± 3,7 ⁽²⁾	125 ± 10,0
Triglyzeride (mg/dl)	112 ± 7,7	164 ± 27,9 ⁽¹⁾	174 ± 9,3 ⁽¹⁾	198 ± 27,1 ⁽¹⁾
Kreatinin (mg/dl)	0,78 ± 0,0	0,74 ± 0,0	0,81 ± 0,0 ⁽²⁾	0,85 ± 0,1
Fibrinogen (mg/dl)	--	283 ± 10,0	308 ± 12,0	329 ± 20,3
Leukozyten (Anzahl/μl)	--	5811 ± 185,8	6448 ± 171,7 ⁽²⁾	6027 ± 347,7
Nephropathie (%)	--	18	35 ⁽²⁾	55 ⁽²⁾
Retinopathie (%)	--	19	34	62 ⁽²⁾⁽³⁾
Hypertonus (%)	--	27	59 ⁽²⁾	55 ⁽²⁾

arithmetischer Mittelwert ± SEM

⁽¹⁾ p<0,05 vs Kontrolle; ⁽²⁾ p<0,05 vs PNP-/KADN-; ⁽³⁾ p<0,05 vs PNP+/KADN-

Entsprechend der Definitionen im Methodenteil (siehe Seite 41 bzw. 46) wiesen 62 der Diabetiker keine Polyneuropathie (PNP) oder kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie (KADN) auf (PNP-/KADN-; n = 62). Bei weiteren 105 Diabetikern wurde eine PNP jedoch keine KADN (PNP+/KADN-; n = 105) nachgewiesen, während bei 22 Patienten sowohl eine PNP als auch KADN diagnostiziert wurde (PNP+/KADN+; n = 22) (Tabelle 1).

Die Diabetiker der Gruppe PNP-/KADN- waren signifikant jünger als die Diabetiker der anderen Gruppen, weiterhin waren die Kontrollpersonen jünger als die Patienten der Gruppe PNP+/KADN- ($p < 0,05$). Der BMI war bei den Patienten PNP-/KADN- und PNP+/KADN- der Kontrollgruppe gegenüber signifikant erhöht ($p < 0,05$). Die Gruppe PNP+/KADN- wies einen höheren Prozentsatz von Männern im Vergleich mit der Gruppe PNP-/KADN- auf ($p < 0,05$). Der Anteil von Typ 1 Diabetikern war in der Gruppe PNP+/KADN- geringer als in der Gruppe PNP-/KADN- ($p < 0,05$). Die Diabetesdauer war kürzer in der Gruppe PNP-/KADN- als in den anderen Diabetikergruppen, die längste Dauer fand sich in der Gruppe PNP+/KADN+ ($p < 0,05$). Cholesterin, LDL, Kreatinin und die Anzahl der Leukozyten sowie die Anteile von Nephropathie und arterieller Hypertonie waren in der Gruppe PNP+/KADN- höher als bei PNP-/KADN- ($p < 0,05$). Nephropathie, Retinopathie und arterielle Hypertonie waren häufiger bei PNP+/KADN+ als bei PNP-/KADN- ($p < 0,05$), während die Retinopathie bei PNP+/KADN+ häufiger war als bei PNP+/KADN- ($p < 0,05$). HbA_{1c}, mittlere Blutglukose, Harnsäure, Anteile der Insulin-therapierten Diabetiker, HDL, Triglyzeride und Fibrinogengehalt waren in den drei untersuchten Gruppen mit Diabetikern vergleichbar (Tabelle 1).

6.1. Biomarker für oxidativen Stress

Im Vergleich mit der Kontrollgruppe waren jeweils fünf, vier bzw. vier Marker für oxidativen Stress signifikant verändert in den Gruppen PNP+/KADN-, PNP-/KADN- bzw. PNP+/KADN+ ($p < 0,05$) (Tabelle 2). So waren im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe PNP+/KADN- verändert ($p < 0,05$): Plasma 8-epi-PGF_{2 α} , O₂⁻, ONOO⁻, VE/L und Vitamin C. Vergleicht man die Kontrollen mit der Gruppe PNP-/KADN-, so fallen hier signifikante Veränderungen für Plasma 8-epi-PGF_{2 α} , O₂⁻, ONOO⁻ und

VE/L auf ($p < 0,05$). Im Vergleich der Kontrollgruppe mit der Gruppe PNP+/KADN+ fielen veränderte Werte für $O_2^{\cdot-}$, $ONOO^-$, VE/L und HOCl auf ($p < 0,05$).

Die detaillierte graphische Darstellung der Ergebnisse aus Tabelle 2 findet sich in den Abbildungen 1-6. Abbildung 1 zeigt, dass der Durchschnittsgehalt an Plasma 8-epi-PGF_{2α} in den Gruppen PNP-/KADN- und PNP+/KADN- signifikant höher war als bei den Kontrollpersonen ($p < 0,05$). Es fand sich jedoch kein Unterschied im Gehalt an 8-epi-PGF_{2α} zwischen den Diabetikerkollektiven.

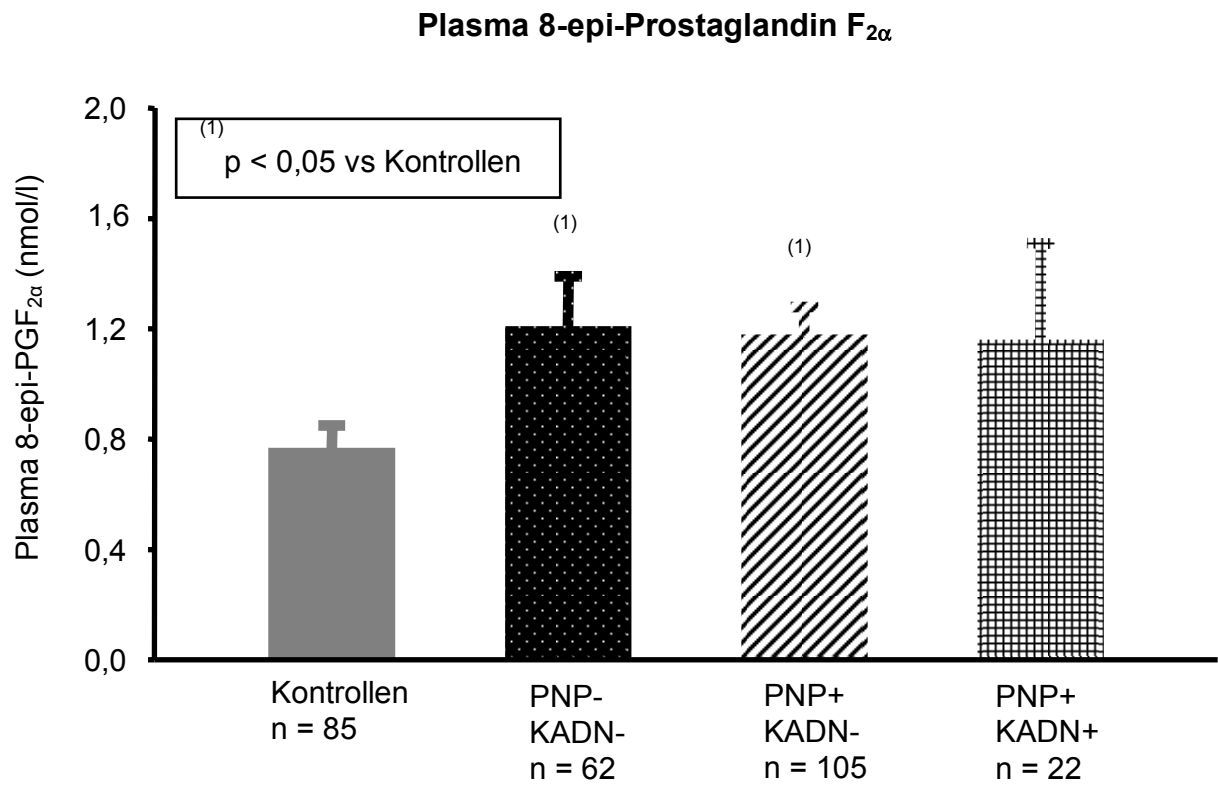
Tabelle 2: Ergebnisse oxidativer Stress

	Kontrollen n = 85	Diabetes PNP- KADN- n = 62	Diabetes PNP+ KADN- n = 105	Diabetes PNP+ KADN+ n = 22
Plasma 8-epi-PGF_{2α} (nmol/l)	0,76 ± 0,09 ⁽²⁾	1,20 ± 0,19 ⁽⁴⁾	1,17 ± 0,11	1,15 ± 0,36
O₂^{·-} (mV; Superoxid-quenching)	2,56 ± 0,22 ⁽²⁾	3,31 ± 0,34 ⁽⁴⁾⁽³⁾	4,20 ± 0,30 ⁽¹⁾	5,17 ± 0,66 ⁽⁵⁾
ONOO⁻ (min; Peroxynitrit-quenching lag time)	49,5 ± 1,4 ⁽²⁾	44,0 ± 1,3 ⁽⁴⁾	42,3 ± 1,1	40,5 ± 2,6 ⁽⁵⁾
VE/L [(μmol/l) / (mmol/l)]	4,42 ± 0,15 ⁽²⁾	3,96 ± 0,20 ⁽⁴⁾	3,16 ± 0,11 ⁽¹⁾	3,52 ± 0,33 ⁽⁵⁾
Vitamin C (μmol/l)	38,3 ± 1,7 ⁽²⁾	40,7 ± 1,9	33,6 ± 1,6 ⁽¹⁾	34,5 ± 3,6
HOCl (cpm; HOCl-quenching)	3,58 ± 0,29	3,68 ± 0,48	3,70 ± 0,25	4,31 ± 0,27 ⁽⁵⁾

arithmetischer Mittelwert ± SEM; cpm = counts per minute

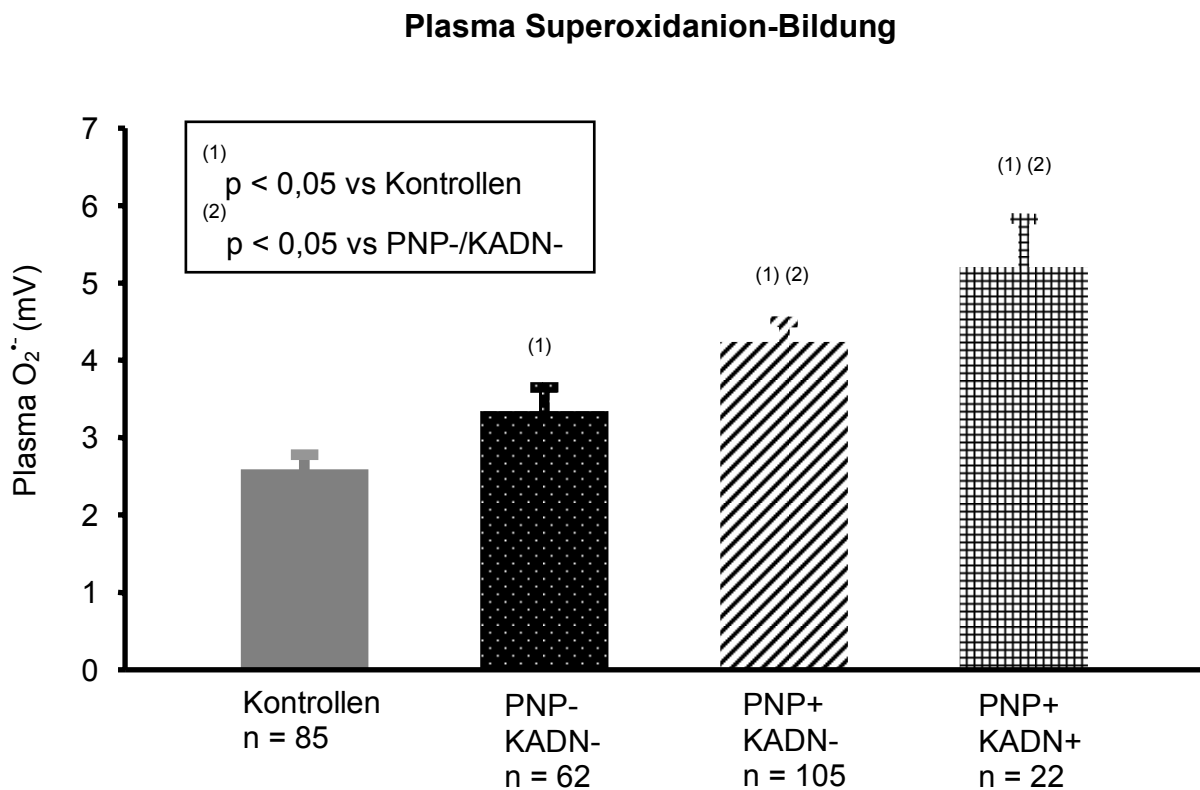
- (1) p < 0,05 PNP+/KADN- vs. PNP-/KADN-
 (2) p < 0,05 Kontrollen vs. PNP+/KADN-
 (3) p < 0,05 PNP-/KADN- vs. PNP+/KADN+
 (4) p < 0,05 PNP-/KADN- vs. Kontrollen
 (5) p < 0,05 PNP+/KADN+ vs. Kontrollen

Abbildung 1:



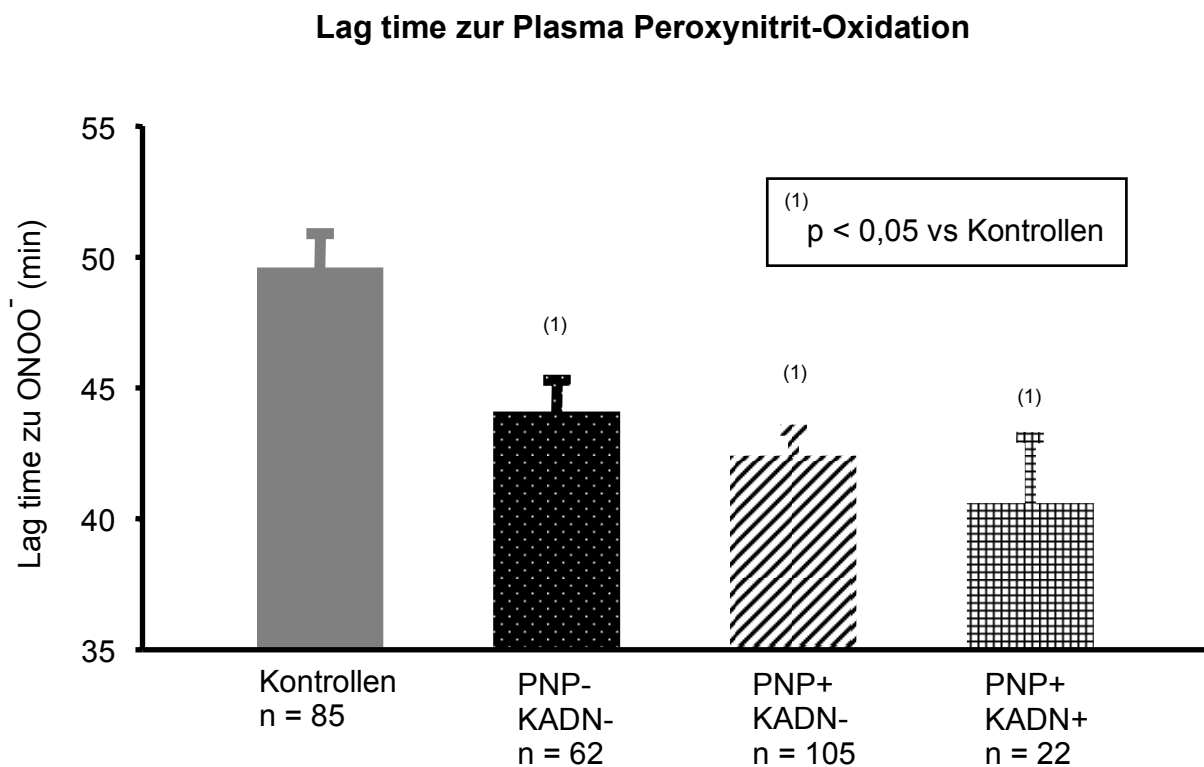
Die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion war in den 3 Diabetikergruppen signifikant höher als bei den Kontrollen ($p < 0,05$). Die $O_2^{\cdot-}$ -Produktion war signifikant höher in der Gruppe PNP+/KADN- als in Gruppe PNP-/KADN- ($p < 0,05$). Die höchste $O_2^{\cdot-}$ -Produktion fand sich in der Gruppe PNP+/KADN+ mit signifikanten Unterschieden gegenüber der Kontrollgruppe und Gruppe PNP-/KADN- ($p < 0,05$). Kein signifikanter Unterschied wurde zwischen den Gruppen PNP+/KADN- und PNP+/KADN+ nachgewiesen (Abbildung 2).

Abbildung 2:



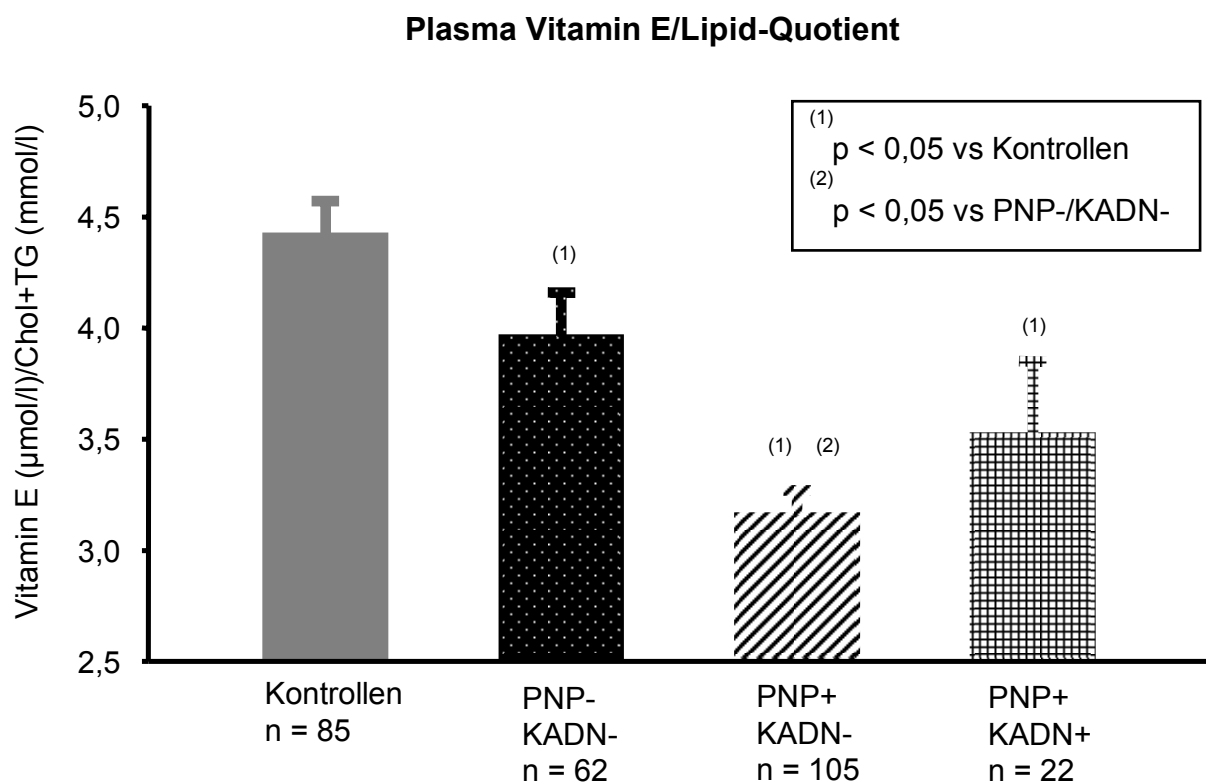
ONOO⁻ Lag time (ausgedrückt als Lag time zur Induktion von Pholasin[®] Chemolumineszenz) war in den Diabetikergruppen PNP-/KADN- signifikant kürzer als bei den Kontrollpersonen ($p < 0,05$). ONOO⁻ Lag time war in Gruppe PNP+/KADN- kürzer als in Gruppe PNP-/KADN-. Es fand sich weiterhin eine kürzere ONOO⁻ Lag time in Gruppe PNP+/KADN+ verglichen mit denen der Gruppe PNP+/KADN-. All diese Unterschiede erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 3).

Abbildung 3:



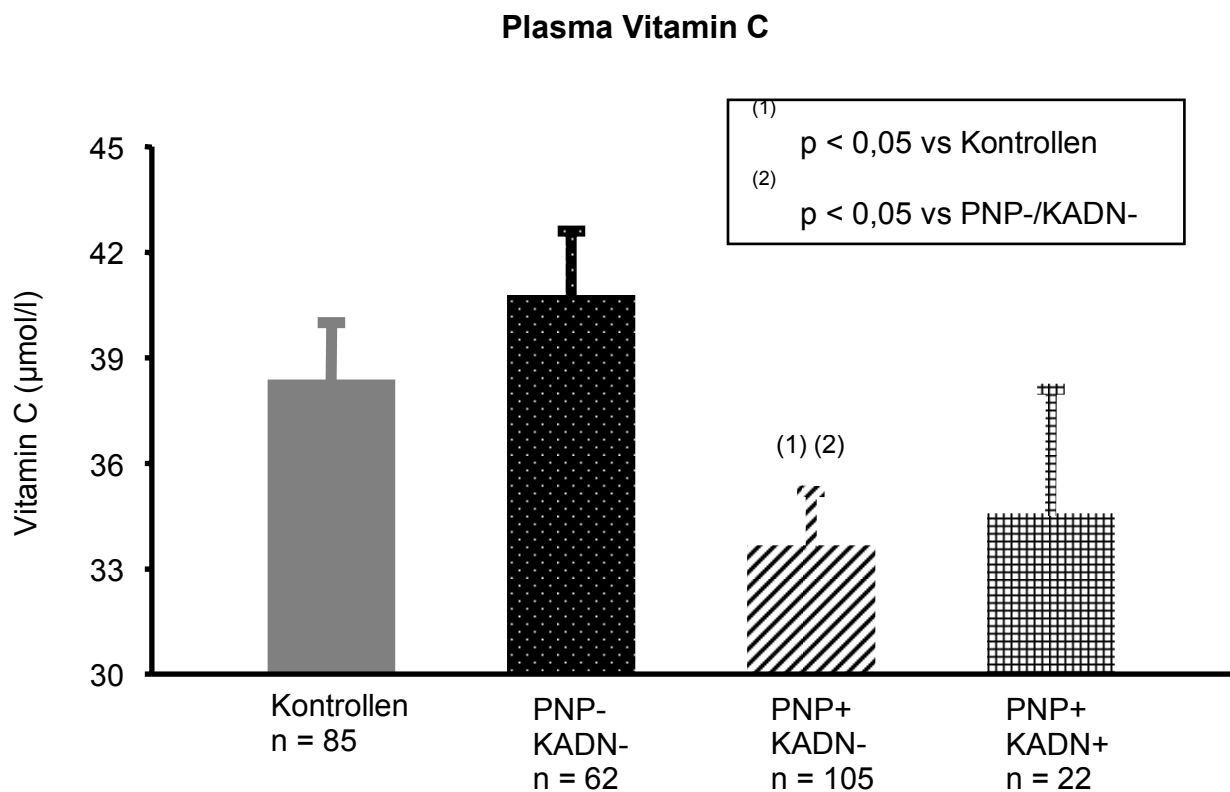
Der zu Gesamtlipiden (Cholesterin + Triglyceride) in Bezug gesetzte Gehalt an Vitamin E im Plasma (Vitamin E/Lipid-Quotient = VE/L) war im Vergleich mit den Kontrollpersonen in allen 3 Diabetikergruppen signifikant niedriger ($p < 0,05$). Der VE/Lipid-Quotient war in der Gruppe PNP+/KADN-, jedoch nicht PNP+/KADN+ im Vergleich mit der Gruppe PNP-/KADN- noch geringer ($p < 0,05$) (Abbildung 4).

Abbildung 4:



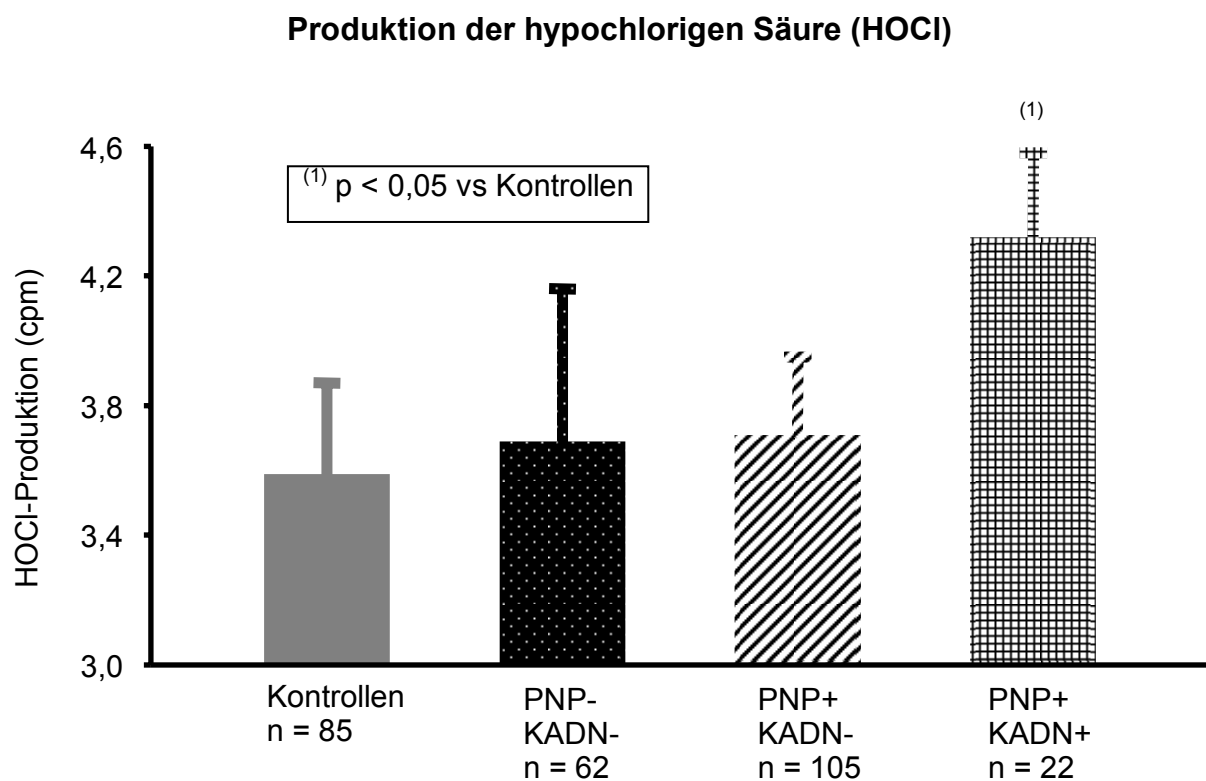
Die Vitamin C-Spiegel waren in der Gruppe PNP+/KADN- signifikant niedriger als in den Kontrollen ($p < 0,05$). Das Bestehen einer KADN zusätzlich zu einer PNP (PNP+/KADN+) führte zu keinem Absinken der Konzentration von Vitamin C. Dies lag möglicherweise an der relativ hohen Streuung der Einzelwerte in Gruppe PNP+/KADN+. Vitamin C war in der Gruppe PNP+/KADN- im Vergleich mit Gruppe PNP-/KADN- signifikant reduziert ($p < 0,05$) (Abbildung 5).

Abbildung 5:



Bezüglich der hypochlorigen Säure (HOCl) fand sich lediglich ein signifikanter Anstieg in der Gruppe PNP+/KADN+ gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Zwischen den Kontrollen, der Gruppe PNP-/KADN- und der Gruppe PNP+/KADN- fanden sich keine signifikanten Unterschiede (Abbildung 6).

Abbildung 6:



6.2. Adhäsionsmoleküle

Die Konzentration des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 war in der Gruppe PNP+/KADN+ gegenüber den Kontrollpersonen signifikant ($p < 0,05$) und gegenüber Gruppe PNP+/KADN- grenzwertig signifikant erhöht ($p = 0,055$). Im Gegensatz dazu fanden sich zwischen den Kontrollpersonen, der Gruppe PNP-/KADN- und der Gruppe PNP+/KADN- keinerlei signifikante Unterschiede (Abbildung 7).

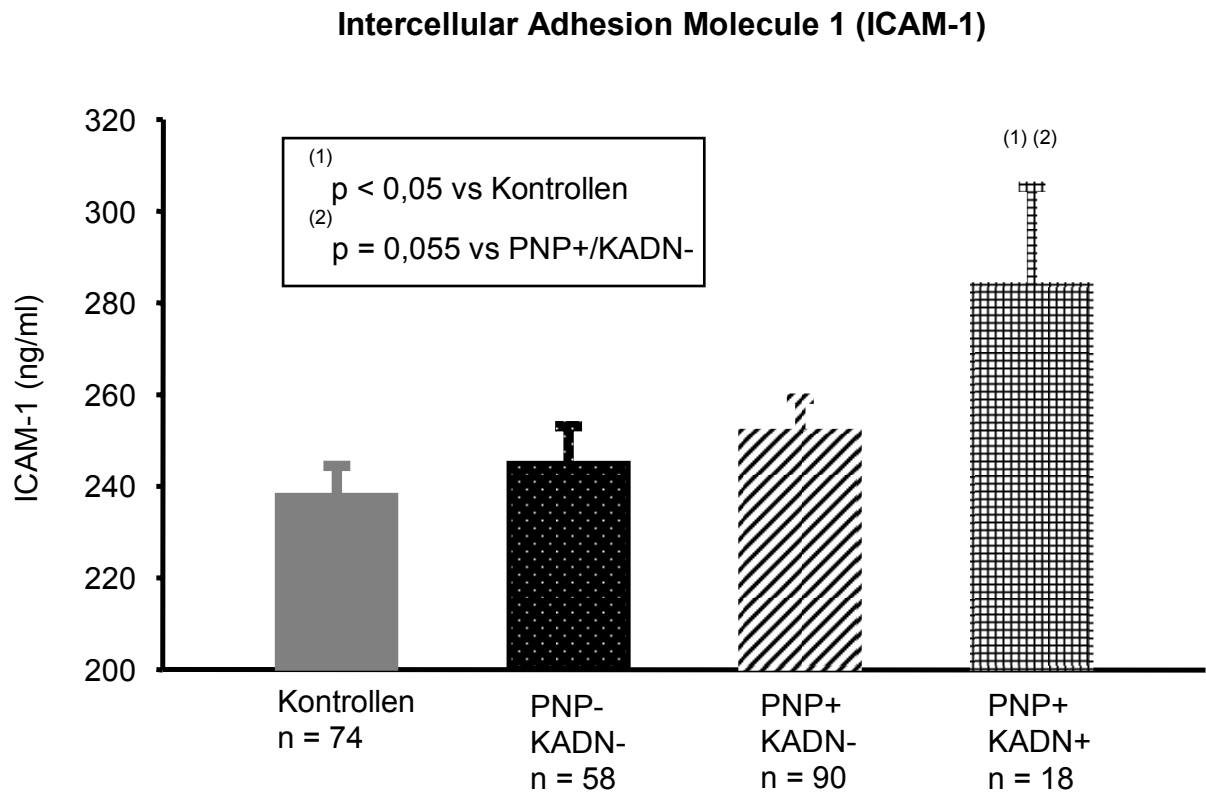
Tabelle 3: Adhäsionsmoleküle

	Kontrollen n = 74	Diabetes PNP – KADN – n = 58	Diabetes PNP + KADN – n = 90	Diabetes PNP + KADN + n = 18
ICAM-1 (Konzentration [ng/ml])	238,42 ± 6,44	245,45 ± 8,23	251,64 ± 7,06	284,18 ± 21,38 (2)(3)(4)
VCAM-1 (Konzentration [ng/ml])	443,66 ± 16,52	550,99 ± 26,07 ⁽¹⁾	549,93 ± 19,23 ⁽⁵⁾	582,87 ± 60,26 ⁽²⁾

arithmetischer Mittelwert ± SEM

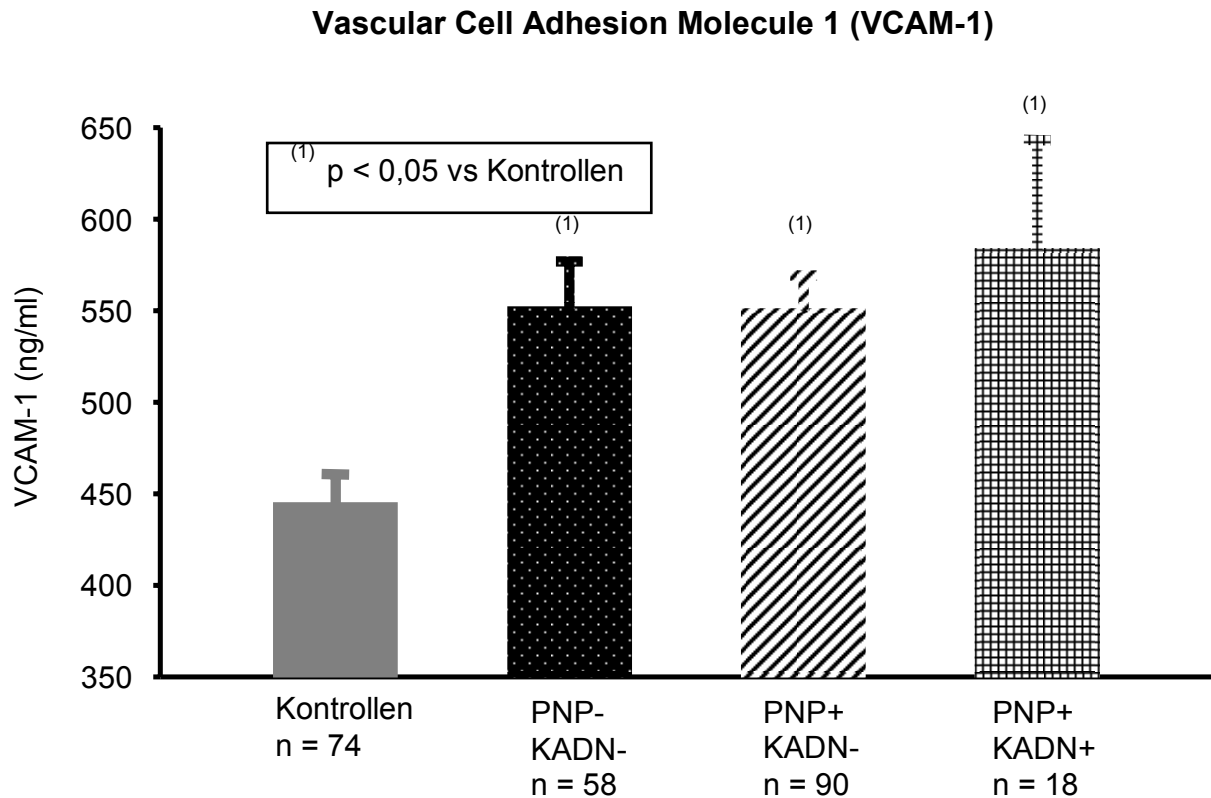
- (1) $p < 0,05$ PNP-/KADN- vs. Kontrollen
 (2) $p < 0,05$ PNP+/KADN+ vs. Kontrollen
 (3) $p < 0,05$ PNP+/KADN+ vs. PNP-/KADN-
 (4) $p < 0,05$ PNP+/KADN+ vs. PNP+/KADN-
 (5) $p < 0,05$ PNP+/KADN- vs. Kontrollen

Abbildung 7:



Die Mittelwerte von VCAM-1 in allen 3 Diabetikergruppen waren jeweils signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht ($p < 0,05$) (Abbildung 8). Weitere signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen lagen nicht vor.

Abbildung 8:



6.3. Korrelationen zwischen Parametern des oxidativen Stresses und der Nervenfunktion

Einfache Korrelationsanalysen ergaben mäßige Korrelationen zwischen den Parametern des oxidativen Stresses und denen der Nervenfunktion. So zeigten sich z.B. eine inverse Korrelation zwischen Temperaturwahrnehmungsschwelle TWS (Kälte) am Thenar und Vitamin E/Lipid-Quotient ($r = -0,225$, $p < 0,05$) (Abbildung 9), eine inverse Korrelation zwischen NIS[LL] und Vitamin E/Lipid-Quotient ($r = -0,199$, $p < 0,05$) (Abbildung 10) und eine Beziehung zwischen NIS[LL] und Superoxidanion-Bildung ($r = 0,21$, $p < 0,05$) (Abbildung 11). Für die Beziehungen der Marker des oxidativen Stresses untereinander ergab sich die höchste Korrelation zwischen Superoxidanion-Bildung und Lag time zur Peroxynitrit-Oxidation ($r = -0,502$, $p < 0,05$) (Abbildung 12).

Abbildung 9:

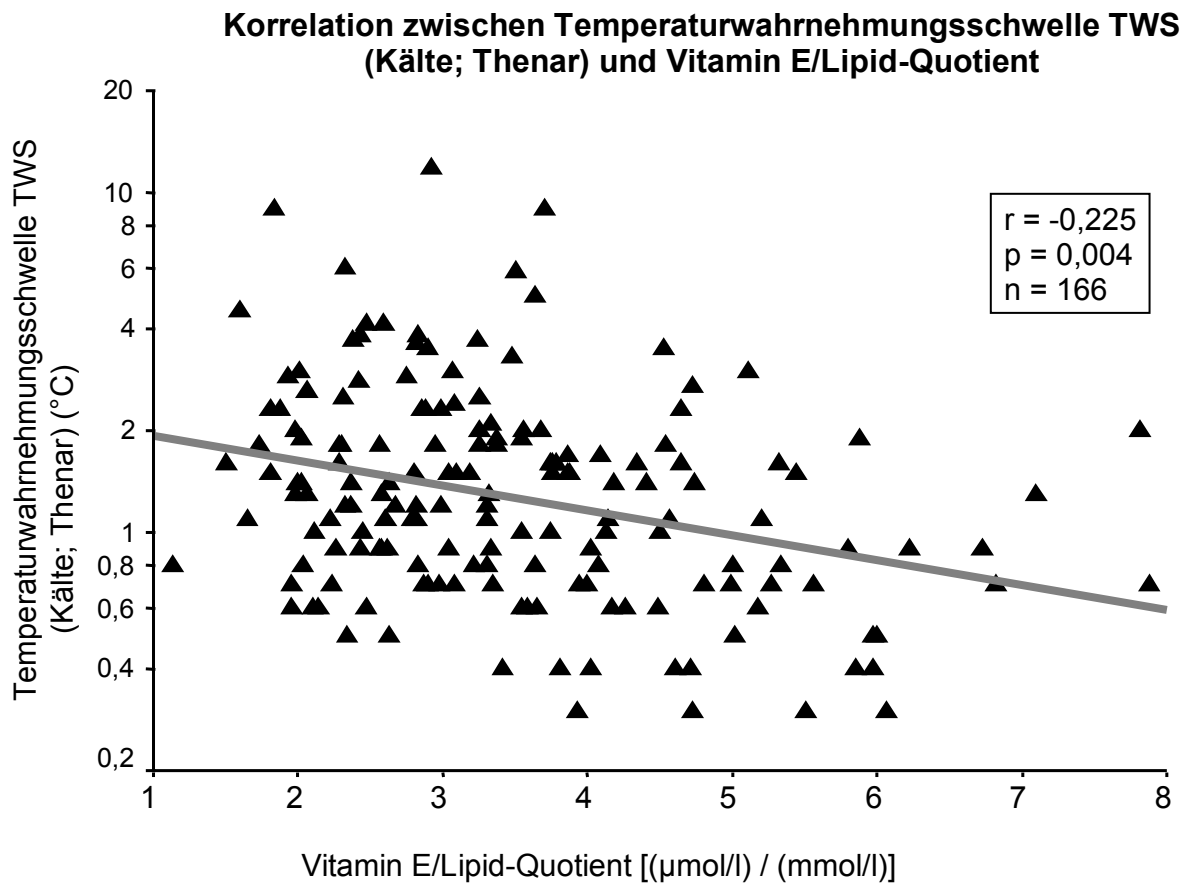


Abbildung 10:

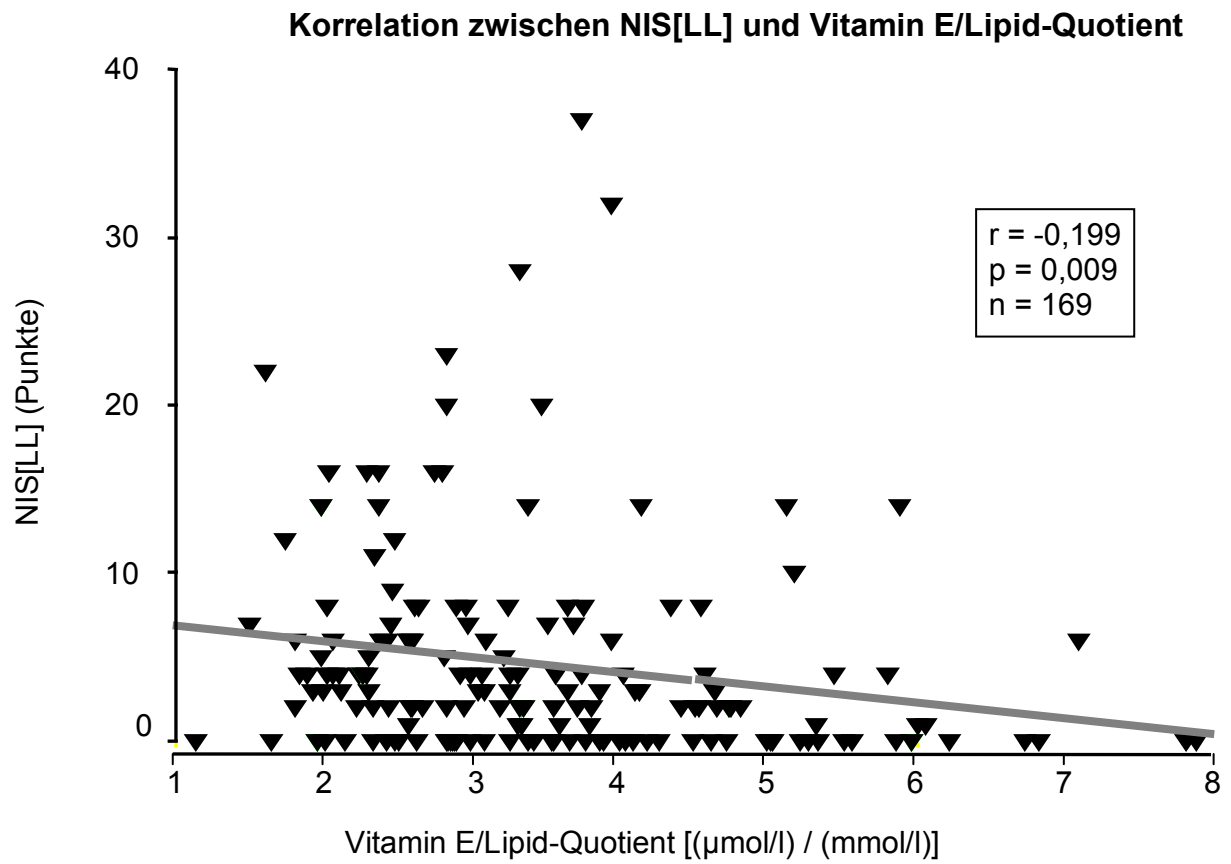


Abbildung 11:

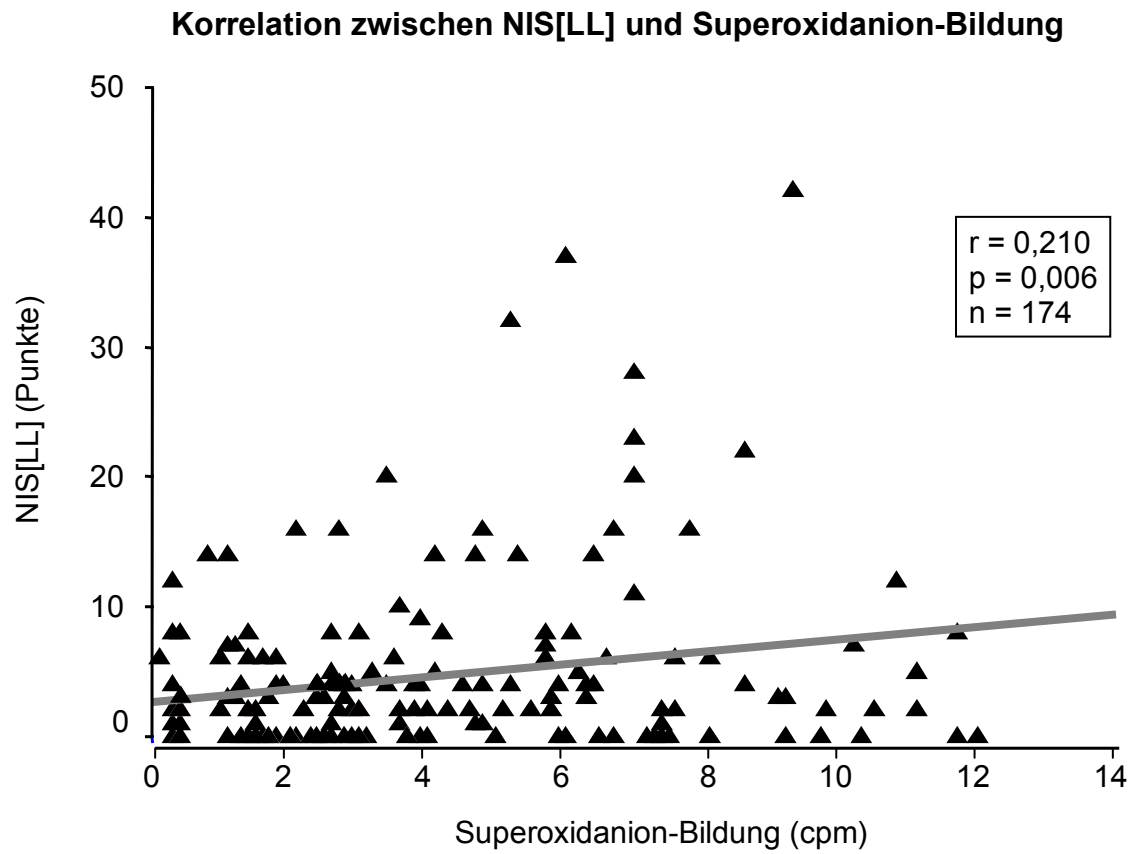
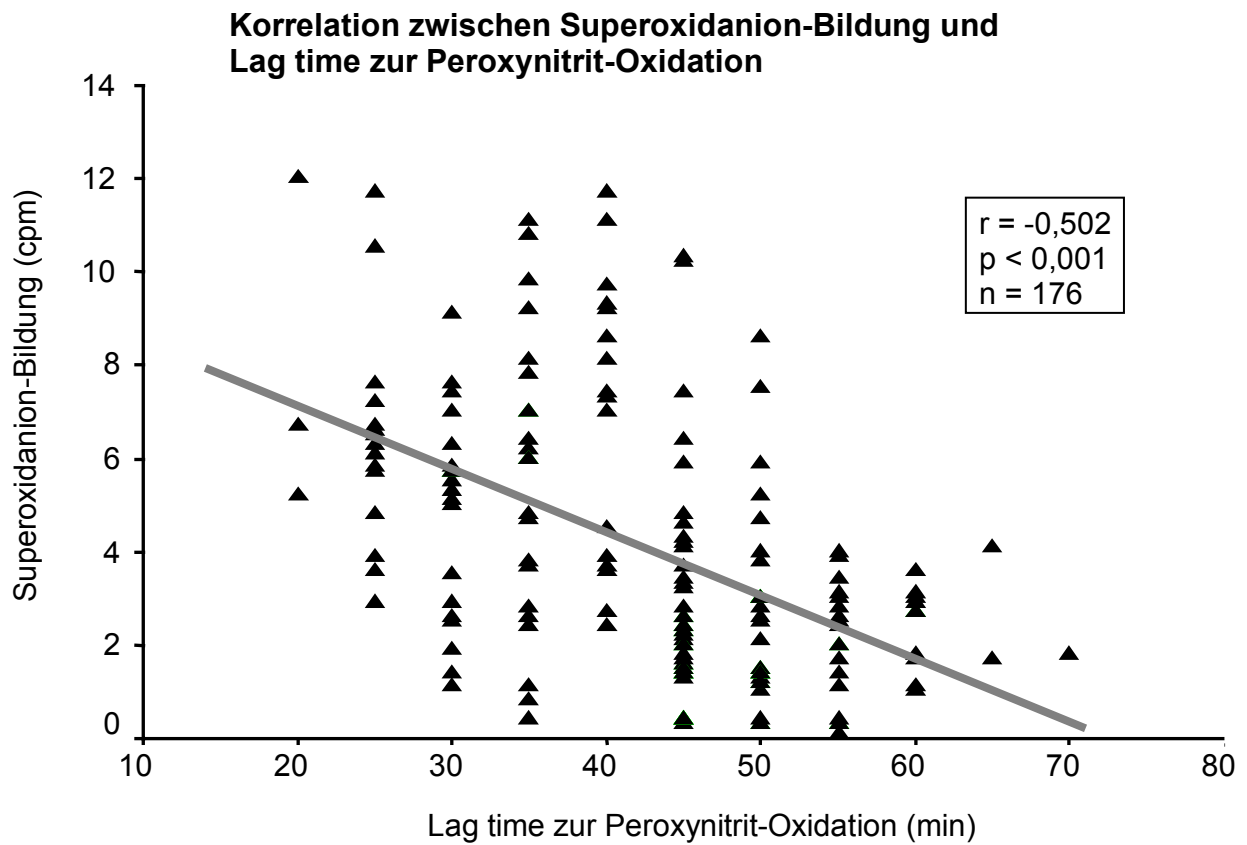


Abbildung 12:



Um einzuschätzen, ob der oxidative Stress eine unabhängige Determinante des Schweregrades der diabetischen Polyneuropathie darstellt, wurde eine multiple logistische Regressionsanalyse (forward stepping) mit NIS[LL] als abhängiger Variable durchgeführt. Als unabhängige Variablen wurden in das Modell eingefügt: Alter, Geschlecht, BMI, Diabetestyp, Diabetesdauer, Größe, HbA_{1c}, Albuminurie, Triglyzeride, HDL, LDL, Retinopathie und arterielle Hypertonie (Tabelle 4).

Tabelle 4: Unabhängige Variablen, die in die Regressionsanalyse mit NIS[LL] als abhängiger Variable aufgenommen wurden (Originalmodell)

<i>Abhängige Variable:</i> NIS[LL]	
<i>In das Modell aufgenommene unabhängige Variablen (forward stepping):</i>	
<ul style="list-style-type: none"> • Alter • Geschlecht • BMI • Körpergröße • Triglyzeride* • HDL* • LDL* 	<ul style="list-style-type: none"> • Diabetestyp • Diabetesdauer • HbA_{1c} • Albuminurie • Retinopathie • Hypertonie

*ausgeschlossen im Modell mit Vitamin E/Lipid-Quotienten

Die einzigen mit NIS[LL] unabhängig assoziierten Faktoren waren Diabetesdauer und Triglyzerid-Gehalt ($p < 0,05$) (Tabelle 5). Die Ergebnisse der einzelnen Modelle, in denen die verschiedenen Marker des oxidativen Stresses (Superoxid, Peroxynitrit, Vitamin C, Vitamin E/Lipid-Quotient, 8-epi-PGF_{2α}) zum Originalmodell hinzugefügt werden, sind in Tabelle 5 wiedergegeben.

Tabelle 5: Multivariate Modelle zur Identifizierung von Faktoren, die unabhängig mit dem NIS[LL] assoziiert sind

<i>Zum Originalmodell hinzugefügte Variablen</i>	<i>Assoziationen mit NIS[LL]</i>
= Originalmodell	Diabetesdauer Triglyzeride
+ Superoxid	Superoxid Diabetesdauer Triglyzeride
+ Peroxynitrit	Peroxynitrit
+ Vitamin C	Retinopathie
+ Vitamin E/Lipid-Quotient	Diabetesdauer Typ 2 Diabetes mellitus
+ 8-epi-PGF _{2α}	Diabetesdauer Triglyzeride

Wurde die Superoxidanion-Produktion zum Originalmodell hinzugefügt, fanden sich Superoxid, Diabetesdauer und Triglyzeride als unabhängige mit NIS[LL] assoziierte Faktoren ($p < 0,05$). Wurde die Lag time zur Peroxynitrit-Oxidation in das Originalmodell eingefügt, zeigte sich einzig diese Variable, die signifikant mit NIS[LL] assoziiert war ($p < 0,05$). Das Hinzufügen von Vitamin C resultierte in der Retinopathie als einziger Faktor, der im Modell übrig blieb ($p < 0,05$). Wurde der Vitamin E/Lipid-Quotient zum Originalmodell hinzugefügt (Triglyzeride, HDL und LDL ausschließend),

zeigten sich Diabetesdauer und Typ 2 Diabetes mellitus als mit NIS[LL] unabhängig assoziierte Faktoren ($p < 0,05$). Schließlich ergaben sich bei Hinzunahme von 8-epi-PGF_{2 α} zum Originalmodell die Diabetesdauer und Triglyzeride als mit NIS[LL] unabhängig assoziierte Faktoren ($p < 0,05$).

6.4. Korrelationen zwischen Parametern der KADN und Adhäsionsmolekülen

In Korrelationsanalysen fielen signifikante Korrelationen zwischen Parametern der KADN und dem Adhäsionsmolekül ICAM-1 auf. Es fällt eine inverse Korrelation zwischen HRV unter tiefer Respiration und ICAM-1 auf ($r = -0,343$, $p < 0,05$) (Abbildung 13). Eine inverse Korrelation zeigte sich auch zwischen Max/Min 30:15-Quotient und ICAM-1 ($r = -0,256$, $p < 0,05$) (Abbildung 14). Eine positive Korrelation bestand zwischen dem KADN-Score und ICAM-1 ($r = 0,428$, $p < 0,05$) (Abbildung 15).

Abbildung 13:

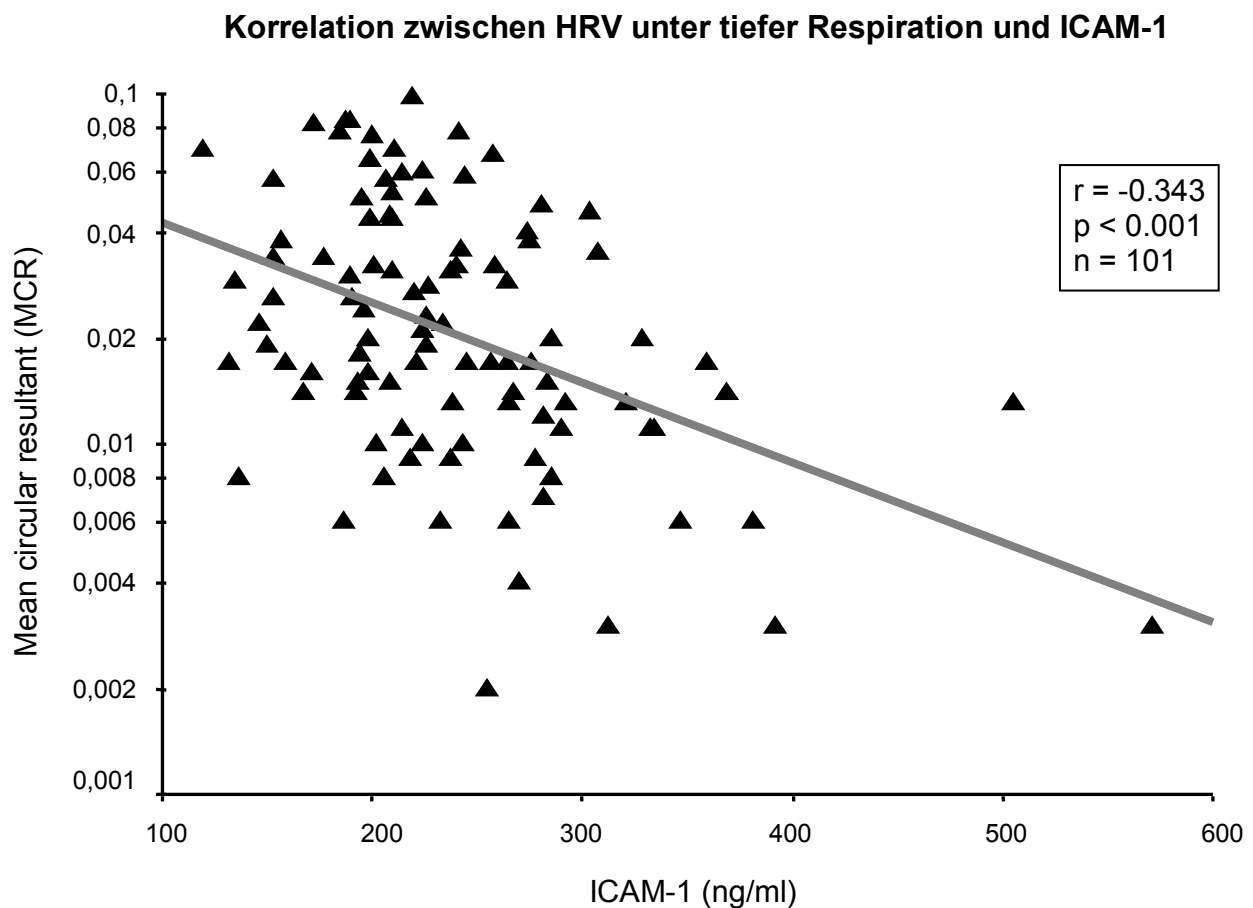


Abbildung 14:

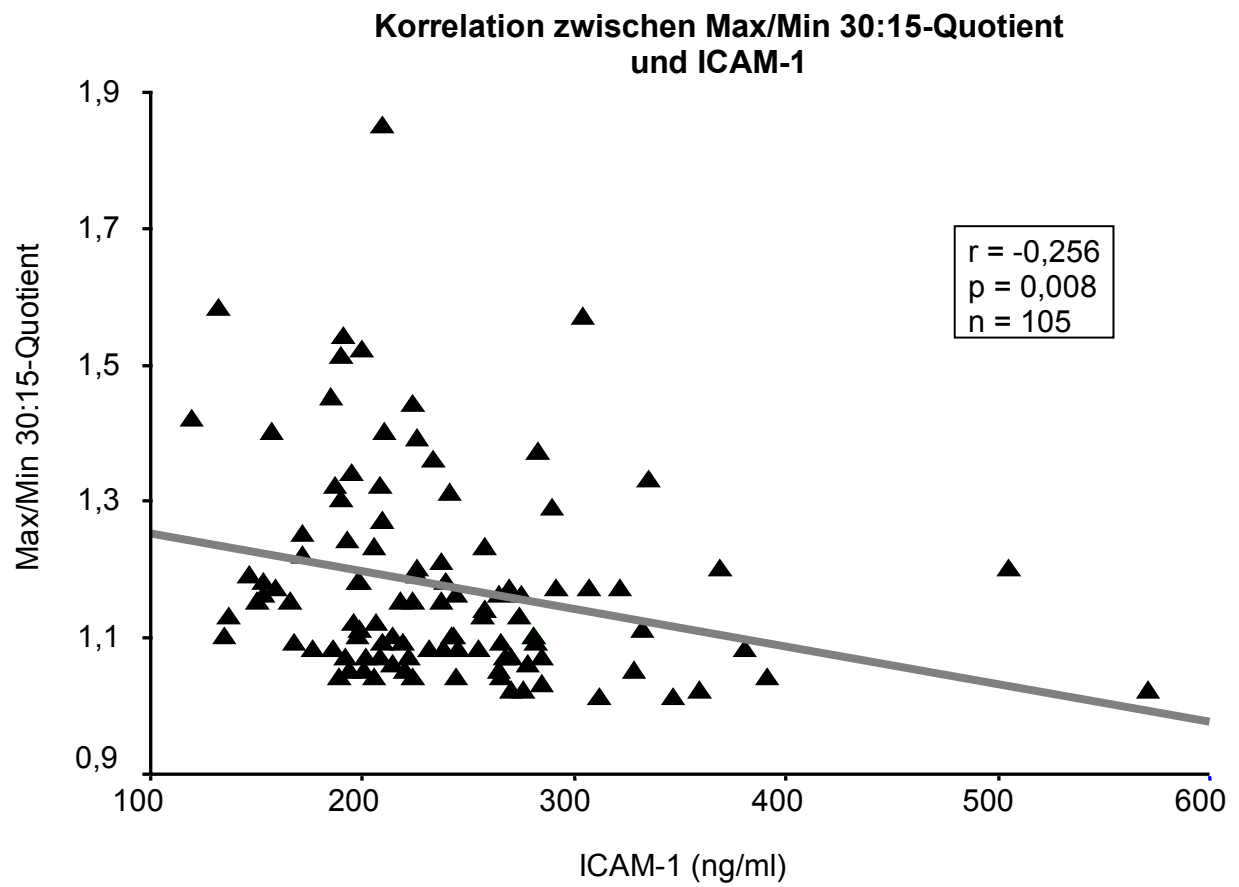
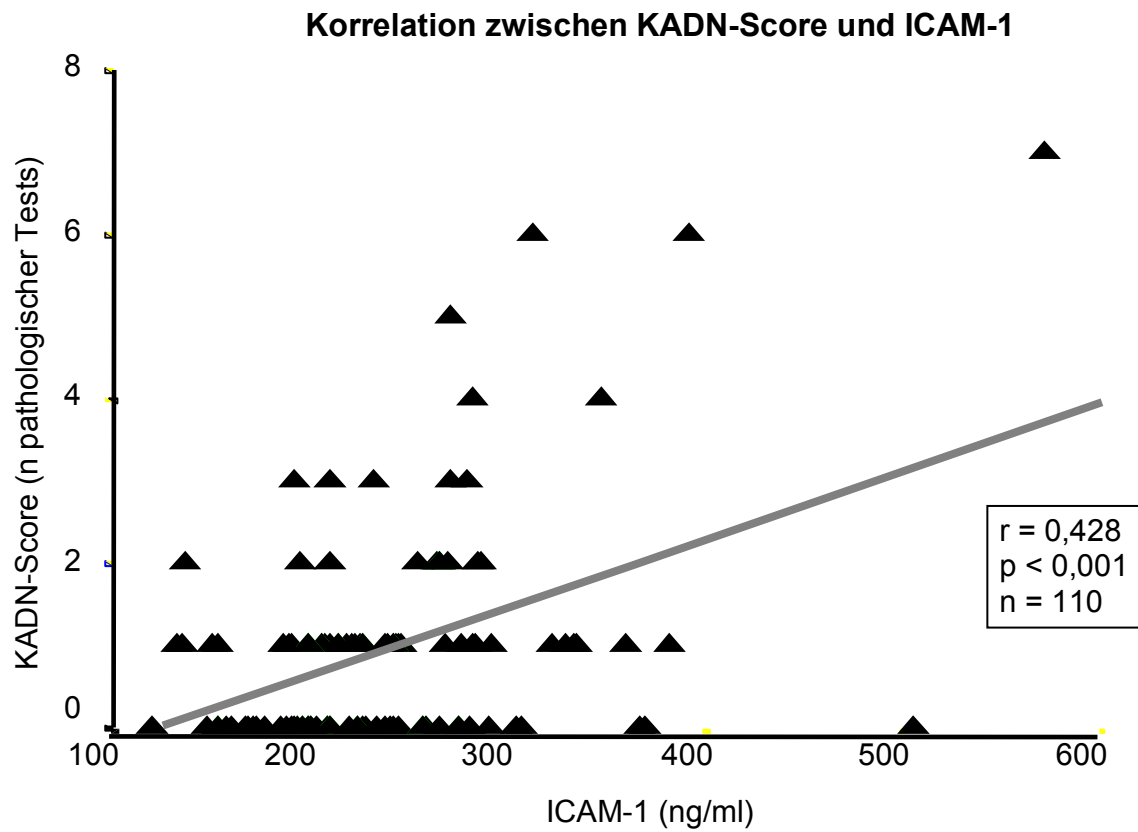


Abbildung 15:



In die Regressionsanalyse mit KADN als abhängige Variable wurden als unabhängige Variablen Alter, Geschlecht, BMI, Triglyzeride, HDL, LDL, Diabetestyp, Diabetesdauer, HbA_{1c}, Albuminurie, Retinopathie und arterieller Hypertonus aufgenommen (forward stepping). Mit KADN unabhängig assoziiert waren Albuminurie, Diabetesdauer und Triglyzeride (Tabelle 6).

Wurde die Produktion von hypochloriger Säure zum Modell hinzugefügt, fand sich die Albuminurie als einziger Faktor, der mit KADN unabhängig assoziiert war ($p < 0,05$). Nach Hinzufügen von ICAM-1 zum Modell ergaben sich entsprechend ICAM-1 selbst und die Diabetesdauer als mit der KADN unabhängig assoziierte Faktoren ($p < 0,05$). Fügte man dem Originalmodell VCAM-1 hinzu, ergaben sich lediglich die Triglyzeride als mit der KADN unabhängig assoziierter Faktor ($p < 0,05$) (Tabelle 6).

Tabelle 6: Multivariate Modelle zur Identifizierung von Faktoren, die unabhängig mit KADN assoziiert sind

<i>hinzugefügte Variablen</i>	<i>in das Modell eingeschlossene Variablen</i>
■ = Originalmodell	Albuminurie Diabetesdauer Triglyzeride
■ + HOCl	Albuminurie
■ + ICAM-1	ICAM-1 Diabetesdauer
■ + VCAM-1	Triglyzeride

7. Diskussion

Die Ergebnisse dieser Studie belegen eine unabhängige Assoziation zwischen verschiedenen Plasmamarkern für oxidativen Stress und dem durch den NIS[LL] erfassten Schweregrad der diabetischen Polyneuropathie. Die einzige andere unabhängige Variable, die mit dem NIS[LL] assoziiert war, war die Diabetesdauer. Die Marker des oxidativen Stresses waren jedoch auch bei Patienten ohne Polyneuropathie bzw. autonome Neuropathie, wenn auch in geringerem Ausmaß, verändert. Patienten mit PNP und zusätzlicher KADN, zeigten keine weitere Zunahme des oxidativen Stresses, obwohl diese Patienten die längste Diabetesdauer und die höchsten Raten an Begleiterkrankungen wie Nephropathie, Retinopathie und arterielle Hypertonie aufwiesen. Dies ist offenbar darauf zurückzuführen, dass das Maximum des oxidativen Stresses bereits in früheren Stadien des Diabetes erreicht ist. Bei den Patienten mit PNP und KADN ergaben sich jedoch Hinweise für eine gesteigerte Inflammation und endotheliale Dysfunktion.

Grundvoraussetzungen, um die Rolle des oxidativen Stresses bei der diabetischen Neuropathie zu untersuchen, sind auf der einen Seite eine detaillierte neurologische Untersuchung sowie sensitive und spezifische quantitative Messungen für eine adäquate Charakterisierung und Staging der Neuropathie. Auf der anderen Seite sind sensitive und verlässliche Labortechniken zur Messung der Marker des oxidativen Stresses notwendig. In dieser Studie wurden die periphere und autonome Nervenfunktion durch aufwendige neurophysiologische Testverfahren einschließlich klinisch-neurologischer Untersuchung quantifiziert. Zur Charakterisierung des oxidativen Stresses wurden eine Reihe sensitiver und spezifischer Marker wie 8-epi-

PGF_{2α}, Lag time zur Peroxynitrit-Oxidation, Superoxidanion-Produktion, Vitamin E, Vitamin C sowie die Produktion von HOCl und Adhäsionsmoleküle als Marker für Inflammation und endotheliale Dysfunktion untersucht.

7.1. F₂-Isoprostan 8-epi-PGF_{2α}

Die Messung des F₂-Isoprostans 8-epi-PGF_{2α} im Plasma dient der Erfassung des Ausmaßes der Lipidperoxidation in einer Probe. In früheren Studien erwiesen sich die Lipidperoxidation und so auch die Plasmaspiegel der entstehenden Lipidperoxide bei Diabetikern als erhöht [209-212], wobei dieser Anstieg bereits in einem frühen Stadium der Erkrankung auftreten kann [52].

Die F₂-Isoprostane sind eine Familie von PGF_{2α}-ähnlichen Produkten, die während der Peroxidation der Arachidonsäure durch einen vom Cyclooxygenase-Stoffwechsel unabhängigen Mechanismus entstehen, in dem Arachidonsäure mit einer Esterbindung an Phospholipide gebunden wird und die F₂-Isoprostane durch die Wirkung der Phospholipase A₂ freigesetzt werden. Von allen F₂-Isoprostanen hat 8-epi-PGF_{2α} die größte Aufmerksamkeit erregt, weil es eines der Hauptprodukte der bereits beschriebenen Peroxidation darstellt und sich als biologisch aktiv erwiesen hat. Daher ist die Konzentration von 8-epi-PGF_{2α} ein spezifischerer Index der Lipidperoxidation als die mit Routine-Labortechniken erhobenen Konzentrationen von Malondialdehyd oder Lipid-Hydroperoxiden (ROOH) [213].

Wie bereits in der Einleitung geschildert, ist die Lipidperoxidation ein Prozeß, bei dem LDL und andere lipidhaltige Moleküle, bevorzugt die ungesättigten Verbindungen wie z.B. eine Vielzahl der Membranlipide, oxidiert werden. Produkte der Lipidperoxidation üben ungünstige Effekte auf eine Vielzahl von Prozessen aus. So können sie z.B. die Aktivität von Antithrombin III einschränken, die Koagulation fördern, die

Thrombozytenaggregation verstärken, Gefäßreaktionen modulieren und als Mitogene wirken [214]. Eine gesteigerte Bildung von Lipidperoxidationsprodukten ist ein Charakteristikum der experimentellen diabetischen Neuropathie [60].

In der vorliegenden Studie zeigte sich, dass der Mittelwert der Konzentration von Plasma 8-epi-PGF_{2α} bei Diabetikern ohne Neuropathie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen deutlich erhöht war. Diese Werte sind im Einklang mit denen einer früheren Arbeit, welche die Plasma 8-epi-PGF_{2α}-Level bei Typ 2 Diabetikern mit denen von Kontrollpersonen verglich [132]. Das hier vorliegende Ergebnis, dass sich zwischen den Diabetikergruppen mit bzw. ohne periphere oder autonome Neuropathie für 8-epi-PGF_{2α} keine signifikanten Unterschiede ergaben, sind ebenfalls kompatibel mit einer vorangegangenen Arbeit dieses Labors. Hier zeigte sich, dass ROOHs im Plasma nicht durch chronische diabetische Komplikationen beeinflusst werden [204]. Allerdings befasste sich die vorangegangene Arbeit nicht spezifisch mit der diabetischen Neuropathie.

7.2. Totale antioxidative Kapazität gegenüber Superoxidanion und Peroxynitrit

Die antioxidative Kapazität ist ein globaler Messwert, der alle bekannten und unbekanntes antioxidativen Aktivitäten in einer Probe, sowie deren Interaktionen, erfasst. In der vorliegenden Studie wurde ein neues Verfahren verwendet, das auf der Kapazität einer Probe, freie Radikale und Oxidantien in Gegenwart des Photoproteins Pholasin® abzufangen, basiert. Es wurden hier Plasmaproben auf ihre antioxidativen Eigenschaften gegenüber O₂^{•-} und ONOO⁻ untersucht. O₂^{•-} wird dabei durch die Oxidation von Xanthin durch das Enzym Xanthinoxidase gebildet, ONOO⁻ entsteht aus einer Reaktion von Superoxid und Stickstoffmonoxid durch Freisetzung aus einer Lösung von SIN-1: O₂^{•-} + NO• → ONOO⁻. Tatsächlich waren die Lag time

bis zur Produktion von ONOO^- und die Fähigkeit der Probe O_2^- zu quenchen – als Parameter für die totale antioxidative Kapazität des Plasmas – zwei unabhängige Determinanten der Schwere der Neuropathie in den multivariaten Modellen.

Die totale antioxidative Kapazität des Plasmas, bestimmt anhand der Lag time für ONOO^- , die Pholasin[®]-Chemolumineszenz zu induzieren (TAC- ONOO^-), war bei den Diabetikern mit oder ohne Polyneuropathie verglichen mit den Kontrollpersonen signifikant reduziert. Durch die Messung der Superoxidanion-Produktion ergab sich jedoch ein zusätzlicher Hinweis für die Abnahme der antioxidativen Kapazität mit zunehmendem Fortschreiten der Neuropathie.

Die mit dieser Studie vorliegenden Ergebnisse decken sich mit denen anderer Studien, die zeigen, dass der aus der Überproduktion von Peroxynitrit resultierende nitrosative Stress (d.h. oxidativer Stress durch Stickstoff-haltige Moleküle) bei Patienten mit Diabetes erhöht ist [215-217]. Konkret wurde in anderen Studien z.B. Nitrotyrosin, das als indirekter Marker für die Peroxynitritbildung dient, im Plasma von Typ 1 und Typ 2 Diabetikern vermehrt vorgefunden [215-217]. Bei Patienten mit früh aufgetretenem Typ 1 Diabetes waren erhöhte Konzentrationen von Nitrotyrosin mit einer Verschlechterung der MNCV in den Nervi medianus, ulnaris und peroneus nach einer 3jährigen Erkrankungsdauer assoziiert [216]. Unsere Ergebnisse belegen darüber hinaus, dass eine verkürzte Lag time zur Peroxynitrit-Produktion einen unabhängigen Risikofaktor für den Schweregrad der diabetischen Polyneuropathie darstellt. Dies passt zu der Annahme, dass ONOO^- toxisch auf das Endothel und Perineurium wirkt [216]. Eine frühere immunhistochemische Studie an Biopsiematerial des N. suralis von Patienten mit verschiedenen Polyneuropathien – einschließlich der Polyneuropathie diabetischer Herkunft – zeigte, dass N^ϵ -

Carboxymethyllysine (CML) als Hauptbestandteil der advanced glycation end products (AGE), welches aus der Glykoxidation und Lipidperoxidation entsteht, sowohl im Perineurium, als auch in epineuralen, perineuralen und endoneuralen Gefäßen nachgewiesen werden konnte [218].

7.3. *Vitamin E*

Vitamin E ist ein wichtiges lipidlösliches ketten- / bindungsbrechendes Antioxidans, das vor Schädigung durch freie Radikale in Geweben und Flüssigkeiten schützt [219]. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass eine diätetische Gabe von 600 mg Vitamin E pro Tag die kardiale autonome Nervenfunktion und die NLG bei Patienten mit Typ 2 Diabetes verbessern kann [220, 221].

Die vorliegende Studie zeigt, dass der Vitamin E/Lipid-Quotient bei Diabetikern ohne Neuropathie verglichen mit den Kontrollpersonen signifikant niedriger ist. Dieses Ergebnis stimmt überein mit dem Ergebnis einer früheren Studie, in der sich im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv eine Abnahme des Vitamin E-Gehalts bei Typ 2 Diabetikern ergab [204]. Interessanterweise war in der vorliegenden Studie das Vitamin E/Lipid-Verhältnis deutlich niedriger bei den diabetischen Patienten mit Polyneuropathie verglichen mit denen ohne Polyneuropathie. Dieser Befund wird weiterhin bekräftigt durch die Tatsache, dass der Plasma Vitamin E/Lipid-Quotient in inverser Beziehung sowohl zur TWS als auch zum NIS[LL] steht.

Durch die Standardisierung der Messwerte für Vitamin E-Konzentrationen mittels der Bildung des VE/L-Quotienten, wurde die Vergleichbarkeit der Messwerte untereinander verbessert. Im Gegensatz zu unserer Studie wurde in früheren Untersuchungen als Parameter in erster Linie die Konzentration des Vitamin E

gemessen und nicht das Vitamin E/Lipid-Verhältnis errechnet. Dies könnte erklären, weshalb einige Studien zwar reduzierte Konzentrationen von Vitamin E in den Thrombozyten [222, 223] und Erythrozyten [224], jedoch nicht im Plasma bei Diabetikern nachgewiesen haben [222, 223].

7.4. *Vitamin C*

Vitamin C ist das bedeutendste wasserlösliche Antioxidans im menschlichen Blutplasma und ein potenter Fänger von Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), hypochloriger Säure (HOCl), Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}), Stickstoffdioxid (NO_2^{\cdot}) und Thiolradikalen. Aus diesem Grund ist Vitamin C auch ein wichtiger Bestandteil des antioxidativen Systems, das auch Vitamin E und Glutathion umfaßt [225, 226]. Der Radikalfänger Vitamin C wirkt durch die Abgabe eines Wasserstoffatoms an das Vitamin E-Radikal und wird bei dieser Reaktion selbst in ein Radikal (Ascorbylradikal) umgewandelt. Das Ascorbylradikal kann mit Hilfe von Glutathion enzymatisch in das wieder antioxidativ wirksame Ascorbat (Vitamin C) zurückverwandelt werden.

Ein wichtiger Befund dieser Studie ist, dass die Vitamin C-Konzentrationen bei den Diabetikern mit Polyneuropathie signifikant niedriger waren als bei denen ohne Polyneuropathie. Ältere Studien hatten eine Abnahme der Konzentrationen an Ascorbinsäure sowohl bei Menschen mit Diabetes mellitus als auch im diabetischen Tiermodell nachweisen können [227-230], während sich der Gehalt ihres primären Oxidationsproduktes, dem Dehydroascorbat, als erhöht erwies [228]. Darüber hinaus fand man reduzierte Konzentrationen von Vitamin C in den weißen Blutzellen von Diabetikern [231]. In diesen Studien wurde jedoch nicht zwischen Diabetikern mit und denen ohne periphere und / oder autonome Neuropathie unterschieden. Dies ist

insofern wichtig, da in der vorliegenden Studie die Konzentration von Vitamin C bei Diabetikern ohne Neuropathie nicht signifikant von dem der Kontrollpersonen verschieden war, während Vitamin C in den Gruppen mit Neuropathie signifikant unter dem Niveau der Kontrollpersonen lag.

7.5. Marker der Inflammation und der endothelialen Dysfunktion

7.5.1. Hypochlorige Säure

Die Bedeutung der HOCl als proinflammatorisches Oxidans ist unumstritten (s. Einleitung bzw. Material und Methoden). Die HOCl-Produktion war bei den Patienten mit peripherer und autonomer Neuropathie gegenüber den Kontrollpersonen signifikant erhöht. Dieser Befund weist darauf hin, dass die autonome Neuropathie mit einer gesteigerten Inflammation einhergeht. Dies wird durch das Resultat für ICAM-1 unterstrichen (s.u.).

7.5.2. Adhäsionsmoleküle

Die Adhäsionsmoleküle treten u.a. bei Entzündungsreizen auf [159, 169], welche wiederum mit oxidativem Stress assoziiert sind [172]. Vielfach konnten vermehrt Adhäsionsmoleküle im Plasma bei Patienten mit Typ 1 und Typ 2 Diabetes nachgewiesen werden [182-184].

In der vorliegenden Studie zeigt sich – ähnlich den Messungen für HOCl – ein signifikanter Unterschied für die ICAM-1-Messungen nur zwischen der Gruppe mit autonomer Neuropathie und den Kontrollpersonen. Allerdings zeigte diese Gruppe gegenüber Patienten mit PNP aber ohne KADN erhöhte ICAM-1-Konzentrationen an

der Grenze zur statistischen Signifikanz. Hingegen war VCAM-1 in allen 3 Diabetikergruppen gegenüber den gesunden Kontrollpersonen signifikant erhöht. Somit könnte VCAM-1 einen von Neuropathie unabhängigen globalen Marker für endotheliale Dysfunktion bei Diabetes darstellen, während ICAM-1 und HOCl spezifischer eine endotheliale Dysfunktion bei KADN anzeigen. Entsprechend haben vorangegangene Studien erhöhte Werte von VCAM-1 bei Diabetikern ergeben [184, 189]. Dies kann mit den hier vorliegenden Daten bestätigt werden. Die Ergebnisse dieser Studie können jedoch nicht die Daten von Koga et al. [176] bestätigen, die eine signifikante Erhöhung von sVCAM-1 bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und Neuropathie gegenüber denen ohne Neuropathie zeigten.

Die Aussagekraft dieser Studie wird dadurch eingeschränkt, dass hier lediglich Messungen von Markern für oxidativen Stress im Plasma, nicht jedoch im Nervengewebe durchgeführt wurden. Die hier dargestellten Untersuchungsergebnisse müssen daher mit einiger Vorsicht interpretiert werden, da unklar ist, ob die Plasmakonzentrationen der Marker für oxidativen Stress die Situation im Nerven adäquat widerspiegeln. Dies könnte theoretisch in einer Studie geklärt werden, in der zusätzlich Nervenbiopsien durchgeführt werden. Hier könnte es jedoch aus ethischen Gründen schwierig sein, gesunde Kontrollpersonen und Diabetiker ohne Polyneuropathie teilnehmen zu lassen. Frühere experimentelle Studien zeigten jedoch, dass vor allem der systemische oxidative Stress und weniger der endoneurale oxidative Stress zu einer Nervendysfunktion führen kann [232].

Eine weitere Einschränkung der vorliegenden Studie findet sich in den Unterschieden einzelner demographischer Variablen zwischen den einzelnen untersuchten Gruppen. Da die Ergebnisse jedoch durch multivariate Modelle bestätigt wurden, ist

davon auszugehen, dass die beobachteten Assoziationen unabhängig und valide sind.

Eine dritte Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Studie ist in der relativ geringen Patientenzahl in der Gruppe von Patienten mit Polyneuropathie und KADN verglichen mit den anderen drei Gruppen zu sehen. Aufgrund dessen, dass $O_2^{\cdot-}$ in der Patientengruppe mit Polyneuropathie und KADN am höchsten und die ONOO⁻-Lag time am kürzesten waren, kann das Vorliegen eines Typ II-Fehlers nicht vollständig ausgeschlossen werden.

7.6. Schlussfolgerungen

Die vorliegende Studie sollte klären, inwieweit oxidativer Stress in den verschiedenen Stadien und Manifestationen der diabetischen Neuropathie festzustellen ist. Unter den untersuchten Biomarkern für oxidativen Stress waren in der vorliegenden Studie der Vitamin E/Lipid-Quotient und TAC- $O_2^{\cdot-}$ die sensitivsten Indikatoren für erhöhten oxidativen Stress bzw. reduzierte antioxidative Abwehr bei Diabetikern mit Polyneuropathie.

Die Messung der antioxidativen Vitamine im Plasma oder die der totalen antioxidativen Kapazität zeigte sich gegenüber dem Nachweis von 8-epi-PGF_{2α} im Plasma als Marker für oxidativen Stress überlegen. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der oxidative Stress bei Diabetikern mit Polyneuropathie verglichen mit denen ohne Polyneuropathie stärker ausgeprägt ist. Ein weiterer Anstieg des oxidativen Stresses bei zusätzlich auftretender kardiovaskulärer autonomer Neuropathie war nicht zu beobachten. Hingegen war die KADN mit gesteigerter Inflammation und endothelialer Dysfunktion assoziiert. Jedoch müssen weitere unabhängige Determinanten der Polyneuropathie – wie z.B. Diabetesdauer und

Triglyzerid-Konzentration – als mögliche beeinflussende Faktoren berücksichtigt werden.

Diese Ergebnisse können die Grundlage einer verbesserten Patientenselektion für zukünftige klinische Studien darstellen, die Antioxidantien – wie z.B. α -Liponsäure oder Vitamin E – im Hinblick auf ihre Wirksamkeit in der Prävention oder Therapie der diabetischen Neuropathie untersuchen.

8. Zusammenfassung

Fragestellung

Einer durch oxidativen Stress gesteigerten Bildung freier Radikale und / oder einem Defekt der antioxidativen Abwehr wird eine wichtige Rolle in der Pathogenese der experimentellen diabetischen Neuropathie zugesprochen. Das Ziel der vorliegenden Studie war die Messung verschiedener Biomarker für oxidativen Stress, Inflammation und endotheliale Dysfunktion bei Diabetikern mit bzw. ohne Polyneuropathie (PNP) und / oder einer kardiovaskulären autonomen diabetischen Neuropathie (KADN).

Methoden und Probanden

Plasma 8-epi-Prostaglandin $F_{2\alpha}$ (8-epi-PGF $_{2\alpha}$), Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)- Bildung, Lag time zur Peroxidation durch Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot-}$), hypochlorige Säure (HOCl), Vitamin E/Lipid-Quotient (VE/L), Vitamin C (VC) und die Adhäsionsmoleküle Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) bzw. Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) wurden bei Diabetikern gemessen, die weder PNP noch KADN (PNP-/KADN-; n = 62), eine PNP jedoch keine KADN (PNP+/KADN-; n = 105), oder sowohl eine PNP als auch eine KADN (PNP+/KADN+; n = 22) aufwiesen. Darüber hinaus wurden gesunde Kontrollpersonen (n = 85) ohne Diabetes mellitus evaluiert.

Ergebnisse

Alle Marker für oxidativen Stress (bis auf HOCl) waren in der Gruppe PNP+/KADN- im Vergleich mit den Kontrollpersonen signifikant verändert (jeweils $p < 0,05$). Die Gruppe PNP-/KADN- zeigte im Vergleich mit den Kontrollpersonen eine signifikante

Beeinträchtigung für $O_2^{\cdot-}$, VE/L und Vitamin C (jeweils $p < 0,05$). In der Gruppe PNP+/KADN- zeigte sich im Vergleich mit Gruppe PNP-/KADN- eine Beeinträchtigung für $O_2^{\cdot-}$, VE/L und VC (jeweils $p < 0,05$). Bei fünf Markern für oxidativen Stress (Plasma 8-epi-PGF_{2α}, $O_2^{\cdot-}$, ONOO⁻, VE/L und Vitamin C) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen PNP+/KADN- und PNP+/KADN+. HOCl war in der Gruppe PNP+/KADN+ signifikant gegenüber den Kontrollen erhöht ($p < 0,05$). Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 war ebenfalls signifikant in Gruppe PNP+/KADN+ gegenüber den Kontrollen sowie grenzwertig gegenüber PNP+/KADN- erhöht, während VCAM-1 in allen 3 Diabetikergruppen erhöht war ($p < 0,05$). In multivariaten Modellen waren $O_2^{\cdot-}$ und ONOO⁻ unabhängig mit dem NIS[LL] assoziiert, während ICAM-1 eine unabhängige Determinante der KADN darstellte.

Schlussfolgerungen

Plasmamarker für oxidativen Stress sind bei Diabetikern bereits vor der Entwicklung einer Polyneuropathie erhöht. Bei Patienten mit diabetischer Polyneuropathie sind die Marker jedoch deutlich höher als bei denen ohne Polyneuropathie. Gesteigerter oxidativer Stress ist unabhängig mit dem Schweregrad der Polyneuropathie assoziiert. Kein weiterer Anstieg des oxidativen Stresses findet sich bei Patienten, die zusätzlich zur PNP noch eine KADN aufweisen. Die KADN ist jedoch mit erhöhter Inflammation und endothelialer Dysfunktion assoziiert.

9. Literaturverzeichnis

- [1] The Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. American Diabetes Association. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 1998; 21(suppl 1):S5-19.
- [2] Gries FA, Eckel J, Rösen P, Ziegler D. Diabetes mellitus: an introduction. In: Gries FA, Cameron NE, Low PA, Ziegler D, editors. *Textbook of diabetic neuropathy*. Stuttgart, New York 2003; 1-39.
- [3] Shaw JE, Zimmet PZ, Gries FA, Ziegler D. Epidemiology of diabetic neuropathy. In: Gries FA, Cameron NE, Low PA, Ziegler D, editors. *Textbook of diabetic neuropathy*. Stuttgart, New York: 2003: 64-82.
- [4] Ziegler D. Diabetische Neuropathie: Charakterisierung, Frühdiagnostik, natürlicher Verlauf, metabolische Einflussfaktoren und Effekte einer pathogenetisch begründeten Intervention. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg 1993.
- [5] Greene DA, Sima AAF, Albers JW, Pfeifer MA. Diabetic neuropathy. In: Rifkin H, Porte D, editors. *Diabetes mellitus: Theory and Practice*. New York: Elsevier, 1990: 710-775.
- [6] Young MJ, Breddy JL, Veves A, Boulton AJM. The prediction of diabetic neuropathic foot ulceration using vibration perception thresholds. A prospective study. *Diabetes Care* 1994; 17:557-560.
- [7] Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C et al. Prevalence of diabetic peripheral neuropathy and its relation to glycaemic control and potential risk factors: the EURODIAB IDDM Complications Study. *Diabetologia* 1996; 39:1377-1384.
- [8] Fedele D, Comi G, Coscelli C, Cucinotta D, Feldman EL, Ghirlanda G et al. A multicenter study on the prevalence of diabetic neuropathy in Italy. Italian Diabetic Neuropathy Committee. *Diabetes Care* 1997; 20:836-843.
- [9] Wikblad K, Smide B, Bergström A, Kessi J, Mugusi F. Outcome of clinical foot examination in relation to self-perceived health and glycaemic control in a group of urban Tanzanian diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 1997; 37:185-192.
- [10] Walters DP, Gatling W, Mullee MA, Hill RD. The prevalence of diabetic distal sensory neuropathy in an English community. *Diabet Med* 1992; 9:349-353.
- [11] Franklin GM, Shetterly SM, Cohen JA, Baxter J, Hamman RF. Risk factors for distal symmetric neuropathy in NIDDM. The San Luis Valley Diabetes Study. *Diabetes Care* 1994; 17:1172-1177.

- [12] Beghi E, Monticelli ML, The Italian General Practitioner Study Group (IGPSG). Diabetic polyneuropathy in the elderly. Prevalence and risk factors in two geographic areas of Italy. *Acta Neurol Scand* 1997; 96:223-228.
- [13] Cabezas-Cerrato J. The prevalence of clinical diabetic polyneuropathy in Spain: a study in primary care and hospital clinic groups. *Neuropathy Spanish Study Group of the Spanish Diabetes Society (SDS). Diabetologia* 1998; 41:1263-1269.
- [14] Herman WH, Aubert RE, Engelgau MM, Thompson TJ, Ali MA, Sous ES et al. Diabetes mellitus in Egypt: glycaemic control and microvascular and neuropathic complications. *Diabet Med* 1998; 15:1045-1051.
- [15] Pirart J. Diabetes mellitus and its degenerative complications: a prospective study of 4400 patients observed between 1947 and 1973. *Diabetes Care* 1978; 1:168-188.
- [16] Young MJ, Boulton AJM, Macleod AF, Williams DRR, Sonksen PH. A multicentre study of the prevalence of diabetic peripheral neuropathy in the United Kingdom hospital clinic population. *Diabetologia* 1993; 36:150-154.
- [17] Resnick HE, Vinik AI, Schwartz AV, et al. Independent effects of peripheral nerve dysfunction on lower-extremity physical function in old age. The Women's Health and Aging Study. *Diabetes Care* 2000; 23:1642-1647.
- [18] Abbott CA, Vileikyte L, Williamson S, Carrington AL, Boulton AJM. Multicenter study of the incidence of and predictive risk factors for diabetic neuropathic foot ulceration. *Diabetes Care* 1998; 21:1071-1075.
- [19] Forsblom CM, Sane T, Groop PH, et al. Risk factors for mortality in type II (non-insulin-dependent) diabetes: evidence of a role for neuropathy and a protective effect of HLA-DR4. *Diabetologia* 1998; 41:1253-1262.
- [20] Ziegler D. Klinik, Diagnostik und Therapie der diabetischen Neuropathie. *Ther Umsch* 1996; 53:948-957.
- [21] Sugimura K, Dyck PJ. Multifocal fiber loss in proximal sciatic nerve in symmetric distal diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 1982; 53:501-509.
- [22] Behse F, Buchthal F, Carlsen F. Nerve biopsy and conduction studies in diabetic neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1977; 40:1072-1082.
- [23] Ohnishi A, Harada M, Tateishi J, Ogata J, Kawanami S. Segmental demyelination and remyelination in lumbar spinal roots of patients dying with diabetes mellitus. *Ann Neurol* 1983; 13:541-548.
- [24] Sima AAF, Nathaniel V, Brill V, McEwen TA, Greene DA. Histopathological heterogeneity of neuropathy in insulin-dependent and non-insulin-dependent diabetes, and demonstration of axo-glial dysjunction in human diabetic neuropathy. *J Clin Invest* 1988; 81:349-364.
- [25] Yagihashi S, Matsunaga M. Ultrastructural pathology of peripheral nerves in patients with diabetic neuropathy. *Tohoku J Exp Med* 1979; 129:357-366.

- [26] Bischoff A. Morphology of diabetic neuropathy. *Horm Metab Res* 1980; 9(suppl):18-28.
- [27] Thomas PK, Lascelles RG. Schwann-cell abnormalities in diabetic neuropathy. *Lancet* 1965; 281:1355-1357.
- [28] Thomas PK, Lascelles RG. The pathology of diabetic neuropathy. *Q J Med* 1966; 35:489-509.
- [29] Said G, Slama G, Selva J. Progressive centripetal degeneration of axons in small fiber type diabetic polyneuropathy. A clinical and pathological study. *Brain* 1983; 106:791-807.
- [30] Bradley JL, King RHM, Muddle JR, Thomas PK. The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000; 99:539-546.
- [31] Appenzeller O, Richardson EP Jr. The sympathetic chain in patients with diabetic and alcoholic polyneuropathy. *Neurology* 1966; 16:1205-1209.
- [32] Duchon LW, Anjorin A, Watkins PJ, MacKay JD. Pathology of autonomic neuropathy in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1980; 92:301-303.
- [33] Kristensson K, Nordborg C, Olsson Y, Sourander P. Changes in the vagus nerve in diabetes mellitus. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1971; A79:684-685.
- [34] Guo YP, McLeod JG, Baverstock J. Pathologic changes in the vagus nerve in diabetes and chronic alcoholism. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1987; 50:1449-1453.
- [35] Ziegler D, Gries FA. Diagnostik und Therapie der kardiovaskulären autonomen diabetischen Neuropathie. *Diab Stoffw* 1994; 3:22-31.
- [36] Niakan E, Harati Y, Rolak LA, Comstock JP, Rokey R. Silent myocardial infarction and diabetic cardiovascular autonomic neuropathy. *Arch Intern Med* 1986; 146:2229-2230.
- [37] Murray DP, O'Brien T, Mulrooney R, O'Sullivan DJ. Autonomic dysfunction and silent myocardial ischaemia on exercise testing in diabetes mellitus. *Diabet Med* 1990; 7:580-584.
- [38] The Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-986.
- [39] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352:837-853.

- [40] UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Effect of intensive blood-glucose control with metformin on complications in overweight patients with type 2 diabetes (UKPDS 34). *Lancet* 1998; 352:854-865.
- [41] Gæde P, Vedel P, Larsen N, Jensen GVH, Parving H, Pedersen O. Multifactorial intervention and cardiovascular disease in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2003; 348:383-393.
- [42] Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215:213-219.
- [43] Sies H. Oxidative stress. Academic Press, London 1985; 1-8.
- [44] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew Chem Int Ed Engl* 1986; 25:1058-1071.
- [45] Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. Academic Press, London 1991; XV-XXII.
- [46] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.
- [47] Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222:1-15.
- [48] Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40:405-412.
- [49] Wolff SP. Diabetes mellitus and free radicals. Free radicals, transition metals and oxidative stress in the aetiology of diabetes mellitus and complications. *Br Med Bull* 1993; 49:642-652.
- [50] Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19:257-267.
- [51] Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF et al. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 1996; 382(6587):120-121.
- [52] Dominguez C, Ruiz E, Gussinye M, Carrascosa A. Oxidative stress at onset and in early stages of type 1 diabetes in children and adolescents. *Diabetes Care* 1998; 21:1736-1742.
- [53] Rabinovitch A, Suarez-Pinzon W, Strynadka K, Lakey JRT, Rajotte RV. Human pancreatic islet beta-cell destruction by cytokines involves oxygen free radicals and aldehyde production. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 71:152-156.
- [54] Ghiselli A, Laurenti O, De Mattia G, et al. Salicylate hydroxylation as an early marker of in vivo oxidative stress in diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 1992; 13:621-626.
- [55] Asayama K, Uchida M, Nakane T. Antioxidants in the serum of children with insulin-dependent diabetes mellitus. *Free Radic Biol Med* 1993; 15:597-602.

- [56] Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, et al. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:6434-6438.
- [57] Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, McCarthy S, Betteridge DJ, Wolff SP. Elevated levels of authentic plasma hydroperoxides in NIDDM. *Diabetes* 1995; 44:1054-1058.
- [58] Low PA, Tuck RR, Dyck PJ, Schmelzer JD, Yao JK. Prevention of some electrophysiologic and biochemical abnormalities with oxygen supplementation in experimental diabetic neuropathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81:6894-6898.
- [59] Cameron NE, Cotter MA, Low PA. Nerve blood flow in early experimental diabetes in rats: relation to conduction deficits. *Am J Physiol* 1991; 261:E1-E8.
- [60] Low PA, Nickander KK. Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* 1991; 40:873-877.
- [61] Hermenegildo C, Raya A, Roma J, Romero FJ. Decreased glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels. *Neurochem Res* 1993; 18:893-896.
- [62] Nickander KK, Schmelzer JD, Rohwer DA, Low PA. Effect of α -tocopherol deficiency on indices of oxidative stress in normal and diabetic peripheral nerve. *J Neurol Sci* 1994; 126:6-14.
- [63] Nickander KK, McPhee BR, Low PA, Tritschler H. Alpha-lipoic acid: antioxidant potency against lipid peroxidation of neural tissues in vitro and implications for diabetic neuropathy. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:631-639.
- [64] Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997; 46 (suppl 2):S38-S42.
- [65] Kishi Y, Schmelzer JD, Yao JK, Zollman PJ, Nickander KK, Tritschler HJ et al. α -Lipoic acid: effect on glucose uptake, sorbitol pathway, and energy metabolism in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1999; 48:2045-2051.
- [66] Stevens MJ, Obrosova I, Cao X, van Huysen C, Greene DA. Effects of DL- α -lipoic acid on peripheral nerve conduction, blood flow, energy metabolism, and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2000; 49(6):1006-1015.
- [67] Obrosova IG, Fathallah L, Stevens MJ. Taurine counteracts oxidative stress and nerve growth factor deficit in early experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol* 2001; 172:211-219.
- [68] van Dam PS. Oxidative stress and diabetic polyneuropathy: Pathophysiological mechanisms and treatment perspectives. *Diabetes Metab Res Rev* 2002; 18:176-184.

- [69] Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 1996; 25:57-74.
- [70] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329:2002-2012.
- [71] Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52:253-265.
- [72] von Sonntag C. The chemical basis of radiation biology. London: Taylor and Francis, 1987.
- [73] Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1988; 5:113-124.
- [74] van Dam PS, van Asbeck BS, Erkelens DW, Marx JJ, Gispen WH, Bravenboer B. The role of oxidative stress in neuropathy and other diabetic complications. *Diabetes Metab Rev* 1995; 11:181-192.
- [75] Ceriello A, dello Russo P, Amstad P, Cerutti P. High glucose induces antioxidant enzymes in human endothelial cells in culture. Evidence linking hyperglycemia and oxidative stress. *Diabetes* 1996; 45:471-477.
- [76] Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification: The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem J* 1987; 245:243-250.
- [77] Cosentino F, Hishikawa K, Katusic ZS, Lüscher TF. High glucose increases nitric oxide synthase expression and superoxide anion generation in human aortic endothelial cells. *Circulation* 1997; 96:25-28.
- [78] Godin DV, Wohaiieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 1988; 84:223-231.
- [79] Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993; 18:195-199.
- [80] Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356:1-11.
- [81] Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* 1993; 330:181-185.
- [82] Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:1620-1624.

- [83] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-C1437.
- [84] Ischiropoulos H, Zhu L, Beckman JS. Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1992; 298:446-451.
- [85] Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991; 288:481-487.
- [86] Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxynitrite in vitro. *Carcinogenesis* 1995; 16:2045-2050.
- [87] Douki T, Cadet J, Ames BN. An adduct between peroxynitrite and 2'-deoxyguanosine: 4,5-dihydro-5-hydroxy-4-(nitrosooxy)-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 1996; 9:3-7.
- [88] Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, Kaneda Y, Yorek MA, Beebe D, Oates PJ, Hammes HP, Giardino I, Brownlee M. Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 2000; 404: 787-790.
- [89] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-820.
- [90] Cameron NE, Cotter MA, Hohman TC. Interactions between essential fatty acid, prostanoid, polyol pathway and nitric oxide mechanisms in the neurovascular deficit of diabetic rats. *Diabetologia* 1996; 39:172-182.
- [91] Brownlee M, Cerami A, Vlassara H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1988; 318:1315-1321.
- [92] Cameron NE, Cotter MA. The relationship of vascular changes to metabolic factors in diabetes mellitus and their role in the development of peripheral nerve complications. *Diabetes Metab Rev* 1994; 10:189-224.
- [93] Stevens MJ, Lattimer SA, Kamijo M, van Huysen C, Sima AAF, Greene DA. Osmotically-induced nerve taurine depletion and the compatible osmolyte hypothesis in experimental diabetic neuropathy in the rat. *Diabetologia* 1993; 36:608-614.
- [94] Greene DA, Lattimer SA, Sima AAF. Sorbitol, phosphoinositides and sodium-potassium-ATPase in the pathogenesis of diabetic complications. *N Engl J Med* 1987; 316:599-606.
- [95] Vlassara H. Recent progress on the biologic and clinical significance of advanced glycosylation end products. *J Lab Clin Med* 1994; 124:19-30.
- [96] Bierhaus A, Chevion S, Chevion M, Hofmann M, Quehenberger P, Illmer T, Luther T, Berentshtein E, Tritschler H, Mueller M, Wahl P, Ziegler R, Nawroth PP. Advanced glycation end product-induced activation of NF- κ B is

- suppressed by α -lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes* 1997; 46:1481-1490.
- [97] Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Excessive nonenzymatic glycosylation of peripheral and central nervous system myelin components in diabetic rats. *Diabetes* 1983; 32:670-674.
- [98] Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Recognition and uptake of human diabetic peripheral nerve myelin by macrophages. *Diabetes* 1985; 34:553-557.
- [99] Weimbs T, Stoffel W. Topology of CNS myelin proteolipid protein: evidence for the nonenzymatic glycosylation of extracytoplasmic domains in normal and diabetic animals. *Biochemistry* 1994; 33:10408-10415.
- [100] Nawroth PP, Borcea V, Bierhaus A, Joswig M, Schiekofer S, Tritschler HJ. Oxidative stress, NF- κ B activation, and late diabetic complications. In: Packer L, Rösen P, Tritschler HJ, King GL, Azzi A, editors. *Antioxidants in diabetes management*. New York: Marcel Dekker, 2000: 185-204.
- [101] Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, et al. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *Diabetes* 2001; 50:2792-2808.
- [102] Bierhaus A, Hofmann MA, Ziegler R, Nawroth PP. AGEs and their interaction with AGE-receptors in vascular disease and diabetes mellitus. I. The AGE concept. *Cardiovasc Res* 1998; 37:586-600.
- [103] Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 1999; 42:1271-1281.
- [104] Evans JL, Goldfine ID, Maddux BA, Grodsky GM. Oxidative stress and stress-activated signalling pathways: A unifying hypothesis of type 2 diabetes. *Endocr Rev* 2002; 23:599-622.
- [105] Cameron NE, Cotter MA, Jack AM, Basso MD, Hohman TC. Protein kinase C effects on nerve function, perfusion, Na⁺K⁺-ATPase activity and glutathione content in diabetic rats. *Diabetologia* 1999; 42:1120-1130.
- [106] Martinez-Blasco A, Bosch-Morell F, Trenor C, Romero FJ. Experimental diabetic neuropathy: role of oxidative stress and mechanisms involved. *Biofactors* 1998; 8:41-43.
- [107] Cameron NE, Cotter MA. Oxidative stress and abnormal lipid metabolism in diabetic complications. In: Sima AAF, editor. *Frontiers in animal diabetes research. Chronic complications in diabetes*. Amsterdam: Harwood Academic, 2000: 97-130.
- [108] Hodnick WF, Kung FS, Roettger WJ, Bohmont CW, Pardini RS. Inhibition of mitochondrial respiration and production of toxic oxygen radicals by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 1986; 35:2345-2357.

- [109] Rahman A, Shahabuddin S, Hadi SM, Parish JH, Ainley K. Strand scission in DNA induced by quercetin and Cu(II): role of Cu(I) and oxygen free radicals. *Carcinogenesis* 1989; 10:1833-1839.
- [110] Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Comm* 1990; 9:1-32.
- [111] Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, et al. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem Pharmacol* 1991; 42:1673-1681.
- [112] Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O, et al. The antioxidant role of vitamin C. *Free Radic Biol Med* 1986; 2:419-444.
- [113] Bravenboer B, Kappelle AC, Hamers FPT, van Buren T, Erkelens DW, Gispen WH. Potential use of glutathione for the prevention and treatment of diabetic neuropathy in the streptozotocin-induced diabetic rat. *Diabetologia* 1992; 35:813-817.
- [114] Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK. Anti-oxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1993; 36:299-304.
- [115] Cameron NE, Cotter MA, Archibald V, Dines KC, Maxfield EK. Anti-oxidant and pro-oxidant effects on nerve conduction velocity, endoneurial blood flow and oxygen tension in non-diabetic and streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 1994; 37:449-459.
- [116] Cotter MA, Love A, Watt MJ, Cameron NE, Dines KC. Effects of natural free radical scavengers on peripheral nerve and neurovascular function in diabetic rats. *Diabetologia* 1995; 38:1285-1294.
- [117] Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H et al. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18:1160-1167.
- [118] Love A, Cotter MA, Cameron NE. Effects of the sulphhydryl donor N-acetyl-L-cysteine on nerve conduction, perfusion, maturation and regeneration following freeze damage in diabetic rats. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:698-706.
- [119] Love A, Cotter MA, Cameron NE. Effects of α -tocopherol on nerve conduction velocity and regeneration following a freeze lesion in immature diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 355:126-130.
- [120] Cameron NE, Jack AM, Cotter MA. Effect of α -lipoic acid on vascular responses and nociception in diabetic rats. *Free Radic Biol Med* 2001; 31:125-135.
- [121] Cameron NE, Cotter MA. Effects of chronic treatment with a nitric oxide donor on nerve conduction abnormalities and endoneurial blood flow in streptozotocin-diabetic rats. *J Clin Invest* 1995; 25:19-24.

- [122] Kihara M, Low PA. Impaired vasoreactivity to nitric oxide in experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol* 1995; 132:180-185.
- [123] Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology* 1994; 107:1050-1058.
- [124] Morrow JD, Hill KE, Burk RF, Nammour TM, Badr KF, Roberts LJ. A series of prostaglandin F₂-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87:9383-9387.
- [125] Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, Blair IA, Roberts LJ. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F₂-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:10721-10725.
- [126] Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert JD, Morrow JD, Roberts LJ et al. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-iso-prostaglandin F_{2α}, in the rat: evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. *J Clin Invest* 1992; 90:136-141.
- [127] Awad JA, Morrow JD, Takahashi K, Roberts LJ. Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F₂-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J Biol Chem* 1993; 268:4161-4169.
- [128] Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometry of prostanoids: F₂-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism. *Methods Enzymol* 1994; 233:163-174.
- [129] Nourooz-Zadeh J, Gopaul NK, Barrow S, Mallet AI, Ånggard EE. Analysis of F₂-isoprostanes as indicators of non-enzymatic lipid peroxidation in vivo by gas chromatography-mass spectrometry: development of a solid-phase extraction procedure. *J Chromatogr B: Biomedical Applications* 1995; 667:199-208.
- [130] Wang Z, Ciabattini G, Créminon C, Lawson JA, FitzGerald GA, Patrono C et al. Immunological characterization of urinary 8-epi-Prostaglandin F_{2α} excretion in man. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 275:94-100.
- [131] Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996; 51:1-9.
- [132] Gopaul NK, Ånggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF_{2α} levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995; 368:225-229.
- [133] Bachi A, Zuccato E, Baraldi M, Fanelli R, Chiabrando C. Measurement of urinary 8-epi-Prostaglandin F_{2α}, a novel index of lipid peroxidation in vivo, by immunoaffinity extraction/gas chromatography-mass spectrometry. Basal levels in smokers and nonsmokers. *Free Radic Biol Med* 1996; 20:619-624.

- [134] Praticò G, Iuliano L, Mauriello A, et al. Localization of distinct F₂-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100:2028-2034.
- [135] Roberts LJ, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1345:121-135.
- [136] Basu S. Metabolism of 8-iso-prostaglandin F_{2α}. *FEBS Lett* 1998; 428:32-36.
- [137] Mallat Z, Philip I, Lebreton M, et al. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F_{2α} in pericardial fluid of patients with heart failure. *Circulation* 1998; 97:1536-1539.
- [138] Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S et al. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F_{2α} and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999; 99:224-229.
- [139] Lawson JA, Rokach J, FitzGerald GA. Isoprostanes: formation, analysis and use as indices of lipid peroxidation in vivo. *J Biol Chem* 1999; 274:24441-24444.
- [140] Praticò D. F₂-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999; 147:1-10.
- [141] Nanji AA, Khwaja S, Tahan SR, Sadrzadeh SMHJ. Plasma levels of a novel noncyclooxygenase-derived prostanoid (8-isoprostane) correlate with severity of liver injury in experimental alcoholic liver disease. *Pharmacol Exp Ther* 1994; 269:1280-1285.
- [142] Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE et al. Increase in circulating products of lipid peroxidation (F₂-isoprostanes) in smokers: smoking as a cause of oxidative damage. *N Engl J Med* 1995; 332:1198-1203.
- [143] Reilly MP, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996; 94:19-25.
- [144] Montine TJ, Markesbery WR, Morrow JD, Roberts LJ. Cerebrospinal fluid F₂-isoprostane levels are increased in patients with Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 1998; 44:410-413.
- [145] Praticò D, Barry OP, Lawson JA, Adiyaman M, Hwang S-W, Khanapure H et al. IPF_{2α}-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95:3449-3454.
- [146] Davi G, Alessandrini P, Mezzetti A, Minotti G, Bucciarelli T, Costantini F et al. In vivo formation of 8-epi-prostaglandin F_{2α} is increased in hypercholesterolaemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3230-3235.
- [147] Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med (Metab Biol)* 1979; 21:104-107.

- [148] Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP, Lowe GD et al. Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes* 1992; 41:909-913.
- [149] Neri S, Bruno CM, Raciti C, D'Angelo G, D'Amico R, Cristaldi R. Alteration of oxide reductive and haemostatic factors in type 2 diabetics. *J Intern Med* 1994; 236:495-500.
- [150] Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P et al. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98:469-475.
- [151] Niskanen L, Salonen JT, Nyysönen K, Uusitupa MI. Plasma lipid peroxidation and hyperglycaemia: a connection through hyperinsulinaemia? *Diabet Med* 1995; 12:802-808.
- [152] Morrow JD, Harris TM, Roberts LJ. Noncyclooxygenase oxidative formation of a series of novel prostaglandins: analytical ramifications for measurement of eicosanoids. *Anal Biochem* 1990; 184:1-10.
- [153] Delanty N, Reilly M, Praticò D, Fitzgerald DJ, Lawson JA, FitzGerald GA. 8-epi PGF_{2α} : specific analysis of an isoeicosanoid as an index of oxidant stress in vivo. *Br J Clin Pharmacol* 1996; 42:15-19.
- [154] Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:2309-2315.
- [155] Natarajan R, Lanting L, Gonzales M, Nadler J. Formation of F₂-isoprostane in vascular smooth muscle cells by elevated glucose and growth factors. *Am J Physiol* 1996; 271:H159-H165.
- [156] Catella-Lawson F, Kapoor S, Praticò D, Braunstein SN, Caraballo V, FitzGerald GA. Oxidative stress and diabetes mellitus. *J Invest Med* 1996; 44:223A.
- [157] Longmire AW, Swift LL, Roberts LJ, Awad JA, Burk RF, Morrow JD. Effect of oxygen tension on the generation of F₂-isoprostanes and malondialdehyde in peroxidizing rat liver microsomes. *Biochem Pharmacol* 1994; 47:1173-1177.
- [158] Zhang C, Patel R, Eiserich JP, Zhou F, Kelpke S, Ma W, Parks DA et al. Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory oxidant hypochlorous acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:H1469-H1475.
- [159] Gearing AJH, Hemingway I, Pigott R, Hughes J, Rees AJ, Cashman SJ. Soluble forms of vascular adhesion molecules, E-selectin, ICAM-1, and VCAM-1: pathological significance. *Ann N Y Acad Sci* 1992; 667:324-331.
- [160] Gearing AJ, Newman W. Circulating adhesion molecules in disease. *Immunol Today* 1993; 14:506-512.
- [161] Leeuwenberg JFM, Smeets EF, Neefjes JJ, Shaffer MA, Cinek T, Jeunhomme TM et al. E-selectin and intercellular adhesion molecule-1 are

- released by activated human endothelial cells in vitro. *Immunology* 1992; 77:543-549.
- [162] Nakai K, Itoh C, Kawazoe K et al. Concentration of soluble vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) correlated with expression of VCAM-1 mRNA in the human atherosclerotic aorta. *Coron Artery Dis* 1995; 6:497-502.
- [163] Libby P, Li H. Vascular cell adhesion molecule-1 and smooth muscle cell activation during atherogenesis. *J Clin Invest* 1993; 92:538-539.
- [164] Luscinskas FW, Kansas GS, Ding H, Pizcueta P, Schleiffenbaum BE, Tedder TF et al. Monocyte rolling, arrest and spreading on IL-4-activated vascular endothelium under flow is mediated via sequential action of L-selectin, β_1 -integrins, and β_2 -integrins. *J Cell Biol* 1994; 125:1417-1427.
- [165] Alon R, Kassner PD, Carr MW, Finger EB, Hemler ME, Springer TA. The integrin VLA-4 supports tethering and rolling in flow on VCAM-1. *J Cell Biol* 1995; 128:1243-1253.
- [166] Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR et al. α_4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell* 1995; 80:413-422.
- [167] Gerszten RE, Luscinskas FW, Ding HT, Dichek DA, Stoolman LM, Gimbrone MA et al. Adhesion of memory lymphocytes to vascular cell adhesion molecule-1-transduced human vascular endothelial cells under simulated physiological flow conditions in vitro. *Circ Res* 1996; 79:1205-1215.
- [168] Banks RE, Gearing AJH, Hemingway IK, Norfolk DR, Perren TJ, Selby PJ. Circulating intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in human malignancies. *Br J Cancer* 1993; 68:122-124.
- [169] Wellicome SM, Kapahi P, Mason JC, Lebranchu Y, Yarwood H, Haskard DO. Detection of a circulating form of vascular cell adhesion molecule-1: raised levels in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1993; 92:412-418.
- [170] Wenisch C, Myskiw D, Parschalk B, Hartmann T, Dam K, Graninger W. Soluble endothelium-associated adhesion molecules in patients with Graves' disease. *Clin Exp Immunol* 1994; 98:240-244.
- [171] Rabb H, Calderon E, Bittle PA, Ramirez G. Alterations in soluble intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 1996; 27:239-243.
- [172] Blake DR, Allen RE, Lunec J. Free radicals in biological systems. A review orientated to inflammatory processes. *Br Med Bull* 1987; 43:371-385.
- [173] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362:801-809.

- [174] Jang Y, Lincoff AM, Plow EF, Topol EJ. Cell adhesion molecules in coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24:1591-1601.
- [175] Jager A, van Hinsbergh VW, Kostense PJ, Emeis JJ, Nijpels G, Dekker JM et al. Increased levels of soluble vascular cell adhesion molecule 1 are associated with risk of cardiovascular mortality in type 2 diabetes: the Hoorn Study. *Diabetes* 2000; 49:485-491.
- [176] Koga M, Otsuki M, Kubo M, Hashimoto J, Kasayama S. Relationship between circulating vascular cell adhesion molecule-1 and microvascular complications in type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 1998; 15:661-667.
- [177] Schmidt AM, Crandall J, Hori O, Cao R, Lakatta E. Elevated plasma levels of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in diabetic patients with microalbuminuria: a marker of vascular dysfunction and progressive vascular disease. *Br J Haematol* 1996; 92:747-750.
- [178] Fasching P, Veitl M, Rohac M, et al. Elevated concentrations of circulating adhesion molecules and their association with microvascular complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:4313-4317.
- [179] Yoshizawa M, Nagai Y, Ohsawa K, Ohta M, Yamashita H, Hisada A et al. Elevated serum levels of soluble vascular cell adhesion molecule-1 in NIDDM patients with proliferative diabetic retinopathy. *Diabetes Res Clin Pract* 1998; 42:65-70.
- [180] Clausen P, Jacobsen P, Rossing K, Jensen JS, Parving HH, Feldt-Rasmussen B. Plasma concentrations of VCAM-1 and ICAM-1 are elevated in patients with type 1 diabetes mellitus with microalbuminuria and overt nephropathy. *Diabet Med* 2000; 17:644-649.
- [181] Jude EB, Abbott CA, Young MJ, Anderson SG, Douglas JT, Boulton AJM. The potential role of cell adhesion molecules in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Diabetologia* 1998; 41:330-336.
- [182] Lampeter ER, Kishimoto TK, Rothlein R, Mainolfi EA, Bertrams J, Kolb H et al. Elevated levels of circulating adhesion molecules in IDDM patients and in subjects at risk for IDDM. *Diabetes* 1992; 41:1668-1671.
- [183] Steiner M, Reinhardt KM, Krammer B, Ernst B, Blann AD. Increased levels of soluble adhesion molecules in type 2 (non-insulin dependent) diabetes mellitus are independent of glycaemic control. *Thromb Haemost* 1994; 72:979-984.
- [184] Fasching P, Waldhäusl W, Wagner OF. Elevated circulating adhesion molecules in NIDDM: potential mediators in diabetic macroangiopathy. *Diabetologia* 1996; 39:1242-1244.
- [185] Otsuki M, Hashimoto K, Morimoto Y, Kishimoto T, Kasayama S. Circulating vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in atherosclerotic NIDDM patients. *Diabetes* 1997; 46:2096-2101.

- [186] Kawamura T, Umemura T, Kanai A, Uno T, Matsumae H, Sano T et al. The incidence and characteristics of silent cerebral infarction in elderly diabetic patients: association with serum-soluble adhesion molecules. *Diabetologia* 1998; 41:911-917.
- [187] Cominacini L, Fratta Pasini A, Garbin U, Davoli A, De Santis A, Campagnola M et al. Elevated levels of soluble E-selectin in patients with IDDM and NIDDM: relation to metabolic control. *Diabetologia* 1995; 38:1122-1124.
- [188] Bannan S, Mansfield MW, Grant PJ. Soluble vascular cell adhesion molecule-1 and E-selectin levels in relation to vascular risk factors and to E-selectin genotype in the first degree relatives of NIDDM patients and in NIDDM patients. *Diabetologia* 1998; 41:460-466.
- [189] Kado S, Nagata N. Circulating intercellular adhesion molecule-1, vascular cell adhesion molecule-1, and E-selectin in patients with type 2 diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 1999; 46:143-148.
- [190] Dyck PJ, Sherman WR, Hallcher LM, Service FJ, O'Brien PC, Grina LA et al. Human diabetic endoneurial sorbitol, fructose, and myo-inositol related to sural nerve morphometry. *Ann Neurol* 1980; 8:590-596.
- [191] Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle Nerve* 1988; 11:21-32.
- [192] Dyck PJ, Litchy WJ, Lehman KA, Hokanson JL, Low PA, O'Brien PC. Variables influencing neuropathic endpoints: The Rochester Diabetic Neuropathy Study of Healthy Subjects. *Neurology* 1995; 45:1115-1121.
- [193] Dyck PJ, Davies JL, Litchy WJ, O'Brien PC. Longitudinal assessment of diabetic polyneuropathy using a composite score in the Rochester Diabetic Neuropathy Study cohort. *Neurology* 1997; 49:229-239.
- [194] Brill V. NIS-LL: The primary measurement scale for clinical trial endpoints in diabetic peripheral neuropathy. *Eur Neurol* 1999; 41 (suppl 1):8-13.
- [195] Dyck PJ. Evaluative procedures to detect, characterize, and assess the severity of diabetic neuropathy. *Diabet Med* 1991; 8:S48-S51.
- [196] Todnem K, Knudsen G, Riise T, Nyland H, Aarli JA. The non-linear relationship between nerve conduction velocity and skin temperature. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1989; 52:497-501.
- [197] Arezzo JC, Bolton CF, Boulton A et al. Quantitative sensory testing: a consensus report from the Peripheral Neuropathy Association. *Neurology* 1993; 43:1050-1052.
- [198] Ziegler D, Dannehl K, Mühlen H, Spüler M, Gries FA. Prevalence of cardiovascular autonomic dysfunction assessed by spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses at various stages of diabetic neuropathy. *Diabet Med* 1992; 9:806-814.

- [199] Ziegler D, Laux G, Dannehl K, Spüler M, Mühlen H, Mayer P, Gries FA. Assessment of cardiovascular autonomic function: age-related normal ranges and reproducibility of spectral analysis, vector analysis, and standard tests of heart rate variation and blood pressure responses. *Diabet Med* 1992; 9:166-175.
- [200] Weinberg CR, Pfeifer MA. An improved method for measuring heart-rate variability: assessment of cardiac autonomic function. *Biometrics* 1984; 40:855-861.
- [201] Sternberg JC. A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions. *Clin Chem* 1977; 23:1456-1464.
- [202] Nourooz-Zadeh J. Gas chromatography-mass spectrometry assay for measurement of plasma isoprostanes. *Methods Enzymol* 1999; 300:13-17.
- [203] Ziegler D, Sohr CGH, Nourooz-Zadeh J. Oxidative stress and antioxidant defense in relation to the severity of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy. *Diabetes Care* 2004; 27:2178-2183.
- [204] Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B et al. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40:647-653.
- [205] Obrosova IG, Minchenko AG, Marinescu V, Fathallah L, Kennedy A, Stockert CM et al. Antioxidants attenuate early up regulation of retinal vascular endothelial growth factor in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 2001; 44:1102-1110.
- [206] Knight J, Ganderton M, Hothersall J, Zitouni K, Nourooz-Zadeh J. The ABEL peroxy nitrite antioxidant test with pholasin measures the antioxidant capacity of plasma to protect against peroxy radical attack. In: Stanley PE, Kricka LJ, editors. *Bioluminescence Chemiluminescence: Progress and current applications*. London: 2002: 256-260.
- [207] Nourooz-Zadeh J, Ziegler D, Sohr CGH, Betteridge DJ, Knight J, Hothersall J. The use of Pholasin[®] as a probe for the determination of plasma total antioxidant capacity. *Clin Biochem* 2006; 39:55-61.
- [208] Knight J, Ganderton M. ABEL[®] antioxidant test kits with Pholasin[®]. Knight Scientific Limited (KSL), Produktinformation, 2001.
- [209] Matkovics B, Varga SI, Szabo L, Witas H. The effect of diabetes on the activities of the peroxide metabolism enzymes. *Horm Metab Res* 1982; 14:77-79.
- [210] Ahlskog JE, Uitti RJ, Low PA, Tyce GM, Nickander KK, Petersen RC et al. No evidence for systemic oxidant stress in Parkinson's or Alzheimer's disease. *Mov Disord* 1995; 10:566-573.
- [211] Jain SK, Krueger KS, McVie R, Jaramillo JJ, Palmer M, Smith T. Relationship of blood thromboxane-B₂ (TxB₂) with lipid peroxides and effect

- of vitamin E and placebo supplementation on TxB₂ and lipid peroxide levels in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 1998; 21:1511-1516.
- [212] Nuttall SL, Dunne F, Kendall MJ, Martin U. Age-independent oxidative stress in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Q J Med* 1999; 92:33-38.
- [213] Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F₂-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000; 28:505-513.
- [214] Warso MA, Lands WEM. Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br Med Bull* 1993; 39:277-280.
- [215] Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L et al. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001; 44:834-838.
- [216] Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, et al. Nitrosative stress, uric acid, and peripheral nerve function in early type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51:2817-2825.
- [217] Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, Warehime SS, van Dyke K, Hobbs G. Oxidative stress and insulin requirements in patients with recent-onset type 1 diabetes. *J Clin Endocrinol Metab* 2003; 88:1624-1628.
- [218] Haslbeck KM, Schleicher ED, Friess U, Kirchner A, Neundörfer B, Heuss D. N^ε-Carboxymethyllysine in diabetic and non-diabetic polyneuropathies. *Acta Neuropathol (Berl)* 2002; 104:45-52.
- [219] Diplock AT, Charleux J-L, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M et al. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 1998; 80(suppl 1):S77-112.
- [220] Tütüncü NB, Bayraktar M, Varli K. Reversal of defective nerve conduction with vitamin E supplementation in type 2 diabetes: a preliminary study. *Diabetes Care* 1998; 21:1915-1918.
- [221] Manzella D, Barbieri M, Ragno E, Paolisso G. Chronic administration of pharmacologic doses of vitamin E improves the cardiac autonomic nervous system in patients with type 2 diabetes. *Am J Clin Nutr* 2001; 73:1052-1057.
- [222] Karpen CW, Cataland S, O'Dorisio TM, Panganamala RV. Interrelation of platelet vitamin E and thromboxane synthesis in type I diabetes mellitus. *Diabetes* 1984; 33:239-243.
- [223] Loven DP, Oberley LW. Free radicals, insulin action and diabetes. In: Oberley LW, editor. *Superoxide dismutase, vol 3. Disease states*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 1985: 151-190.
- [224] Gandhi CR, Roychowdhury D. Effect of diabetes mellitus on activities of some glycolytic, hexose monophosphate and other enzymes of erythrocytes of different ages. *Indian J Exp Biol* 1982; 20:347-349.

- [225] Frei B. On the role of vitamin C and other antioxidants in atherogenesis and vascular dysfunction. *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222:196-204.
- [226] Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetic complications. *Nutrition* 2001; 17:888-895.
- [227] Ginter E, Zdichynec B, Holzerova O et al. Hypercholesterolemic effect of ascorbic acid in maturity-onset diabetes mellitus. *Int J Vitam Nutr Res* 1978; 48:368-373.
- [228] Som S, Basu S, Mukherjee D, Deb S, Choudhury PR, Mukherjee S, Chatterjee SN, Chatterjee IB. Ascorbic acid metabolism in diabetes mellitus. *Metabolism* 1981; 30:572-577.
- [229] Stankova L, Riddle M, Larned J, Burry K, Menashe D, Hart J, Bigley R. Plasma ascorbate concentrations and blood cell dehydroascorbate transport in patients with diabetes mellitus. *Metabolism* 1984; 33:347-353.
- [230] Sun F, Iwaguchi K, Shudo R et al. Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Clin Sci* 1999; 96:185-190.
- [231] Akkus I, Kalak S, Vural H, Caglayan O, Menekse E, Can G, Durmus B. Leukocyte lipid peroxidation, superoxide dismutase, glutathione peroxidase and serum and leukocyte vitamin C levels of patients with type II diabetes mellitus. *Clin Chim Acta* 1996; 244:221-227.
- [232] van Dam PS, Bravenboer B, van Asbeck BS, van Oirschot JF, Marx JJ, Gispen WH. Effects of insulin treatment on endoneurial and systemic oxidative stress in relation to nerve conduction in streptozotocin-diabetic rats. *Eur J Clin Invest* 1996; 26:1143-1149.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. D. Ziegler gilt mein besonderer Dank für das zur Verfügung gestellte Thema und seine allzeit tatkräftige Betreuung und Unterstützung.

Herrn Dr. J. Nourooz-Zadeh und Herrn Prof. Dr. med. P. Rösen danke ich sehr für die Durchführung der labortechnischen Untersuchungen.

Weiterhin danke ich Frau M. Behler, Frau A. Surkamp und Frau M. Teuber für die Durchführung von Patientenuntersuchungen und für die großartige Hilfe bei der Studienorganisation, Herrn R. Piolot und Herrn F. Akila für die Unterstützung im Studienverlauf.

Ebenfalls gilt mein Dank der Augenarztpraxis Dr. med. R. Sohr für die Mitwirkung bei der Rekrutierung von Kontrollpersonen.

Auch den im einzelnen nicht genannten übrigen ärztlichen und nicht-ärztlichen Mitarbeitern des Deutschen Diabetes-Zentrums danke ich für die allseits geleistete Unterstützung bei der Durchführung der vorliegenden Studie.

11. Lebenslauf

Persönliche Daten

geboren am 07. August 1975 in Düsseldorf

Schulbildung

1982 - 1986

Grundschule in Langenfeld (Rheinland)

1986 - 1995

Konrad-Adenauer-Gymnasium in Langenfeld (Rheinland); Abitur

Studium

1995 - 2003

Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

9/1998

Ärztliche Vorprüfung

3/2002

Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

9/2002

Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

11/2003

Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Ärztliche Tätigkeit

seit 4/2004

Anstellung als Arzt im Praktikum und Assistenzarzt in der Klinik für Innere Medizin im Alfried Krupp Klinikum Essen - Lutherhaus - zunächst bei Dr. med. V. von Osten, jetzt Prof. Dr. med. D. Ameis und Prof. Dr. med. J. Pfeilschifter