

Aus dem Institut für Klinische Diabetologie des Deutschen Diabetes
Zentrums an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. Roden

**Oxidativer Stress als Prädiktor für die Entwicklung und Progression der
peripheren und kardialen autonomen diabetischen Neuropathie:
Eine prospektive Studie über 6 Jahre**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Stefanie Annika Buchholz (geb. Kühne)

2016

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

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Ziegler

Zweitgutachter: PD Dr. Felsberg

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

Ziegler D, Buchholz S, Sohr C, Nourooz-Zadeh J, Roden M. Oxidative stress predicts progression of peripheral and cardiac autonomic nerve dysfunction over 6 years in diabetic patients. *Acta Diabetologica* 2015; 52: 65-72.

Abkürzungen

ABEL	<i>Analysis By Emitted Light</i>
ABI	<i>Ankle-Brachialis-Index</i>
ADA	<i>American Diabetes Association</i>
ADN	autonome diabetische Neuropathie
ADVANCE	<i>Action in Diabetes and Vascular disease: Preterax and Diamicron-MR Controlled Evaluation</i>
AGE	<i>advanced glycation end products</i>
ASR	Achillessehnenreflex
BMI	<i>Body Mass Index</i>
Ca²⁺	Calcium-Ion
CAT	Catalyse
Chol	Cholesterin
Cl⁻	Chlorid
COX	Cyclooxygenase
Cp	Coeruloplasmin
DAG	Diacylglycerol
DCCT	<i>Diabetes Control and Complications Trial</i>
DDZ	Deutsches Diabetes Zentrum
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSPN	diabetische sensomotorische Polyneuropathie
EDIC	<i>Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications</i>
eNOS	<i>endothelial nitric oxide synthase</i>
ET-1	Endothelin-1
Fe²⁺ /Fe³⁺	zweiwertiges Eisen / dreiwertiges Eisen
GADPH	Glyceraldehyd Dehydrogenase
GGT	γ -Glutamyl-Transferase
GlcNAc	O-glykosidisch verknüpftes N-Acetylglucosamin
GPX	Glutathionperoxidase
GSH	Glutathion
GSSG	Glutathiondisulfid
GSSH	reduziertes Glutathion
H⁺	Wasserstoffion
Hcy	Homocystein
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HNO₂	salpetrige Säure
H₂O₂	Wasserstoffperoxid
HO₂[·]	Hydroxyperoxyl-Radikal
HOBr	hypobromige Säure (= unterbromige Säure)
HOCl	hypochlorige Säure (= unterchlorige Säure)
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>

HRV	<i>heart rate variation</i> (= Variabilität der Herzfrequenz)
ICAM-1	<i>intercellular adhesion molecule 1</i>
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthase</i>
KADN	kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie
KHK	koronare Herzkrankheit
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
m	männlich
MCP-1	<i>monocyte chemoattracting protein 1</i>
MCR	<i>mean circular resultant</i>
MDA	Malondialdehyd
MnSOD	Mangan-Superoxiddismutase
MPO	Myeloperoxidase
Na⁺	Natrium-Ion
NAD⁺	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NDS	<i>Neuropathy Disability Score</i>
NF-κB	<i>nuclear factor-κB</i>
NGF	<i>nerve growth factor</i>
NIS	<i>Neuropathy Impairment Score</i>
NLG	Nervenleitgeschwindigkeit
NNT	<i>number needed to treat</i>
NO[•]	Stickstoffmonoxid-Radikal
NO⁺	Nitrosyl-Kation
NO⁻	Nitrosyl-Anion
NO₂	Nitrat
NO₂[•]	Stickstoffdioxid-Radikal
N₂O₄	Distickstofftetroxid
NO₃	Nitrit
NOx	Nitrat/Nitrit
NSMRI	nichtselektive Monoamin- <i>Reuptake</i> -Inhibitoren
NSS	<i>Neuropathy Symptom Score</i>
NYHA	<i>New York Heart Association</i>
O₂	molekularer Sauerstoff
O₂^{•-}	Superoxidanion / -radikal
O₃	Ozon
OCI⁻	Hypochlorid-Ion
OH[•]	Hydroxyl-Radikal
OH⁻	Hydroxidion
ONOO	Peroxynitrit
ONOO⁻	Peroxynitrit-Anion
ONOOH	Peroxynitrit-Säure
OSI	oxidativer Stress-Index

PARP	Poly (ADP-ribose) Polymerase
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PKC	Protein-Kinase C
PSR	Patellarsehnenreflex
QST	quantitative sensorische Tests
RAGE	Rezeptor für AGE
RMSSD	<i>root mean squared successive difference</i>
RNS	<i>reactive nitrogen species</i>
RO[•]	Alkoxy-Radikal
RO₂[•]	Peroxy-Radikal
ROOH	Lipid-Hydroperoxide
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RR	Blutdruckmesswert nach Riva Rocci (in mmHg)
RYGB	<i>Roux-Y-gastric bypass</i>
SD	Standardabweichung
SEM	<i>standard error of the mean</i>
SIN-1	3-Morpholino-Sydnomin Hydrochlorid (= C ₆ H ₁₀ N ₄ O ₂ ·HCl)
SNRI	selektiver Serotonin-Noradrenalin- <i>Reuptake</i> -Inhibitor
SOD	Superoxiddismutase
SOD1	Cu/Zn-Superoxiddismutase
SOD2	Mn-Superoxiddismutase
STZ	Streptozotocin
SYDNEY	<i>Symptomatic Diabetic Neuropathy</i>
TAC	<i>total antioxidant capacity</i> (= totale antioxidative Kapazität)
TAS	<i>total antioxidant status</i>
TG	Triglyzeride
TGF	<i>transforming growth factor</i>
TOS	totaler oxidativer Status
TPT	Temperaturwahrnehmungsschwelle (= <i>thermal perception threshold</i>)
UKPDS	<i>United Kingdom Prospective Diabetes Study</i>
VADT	<i>Veterans Affairs Diabetes Trial</i>
VC	Vitamin C
VCAM-1	<i>vascular cellular adhesion molecule 1</i>
VE	Vitamin E
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i> (= vaskulo-endothelialer Wachstumsfaktor)
VE/L	Vitamin E/Lipid-Quotient
VK	Variationskoeffizient
VPT	Vibrationswahrnehmungsschwelle (= <i>vibration perception threshold</i>)
w	weiblich
WHO	<i>World Health Organization</i>

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen.....	I
Inhaltsverzeichnis.....	IV
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Diabetes mellitus.....	1
1.2 Folgeschäden des Diabetes mellitus.....	1
1.3 Diabetische Neuropathie.....	2
1.3.1 Diabetische Polyneuropathie.....	2
1.3.1.1 Klinik der diabetischen distal symmetrischen Polyneuropathie.....	2
1.3.1.2 Klinische Bedeutung der DSPN.....	3
1.3.1.3 Morphologie.....	4
1.3.1.4 Diagnostik.....	4
1.3.2 Autonome Neuropathie.....	4
1.3.2.1 Kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie (KADN).....	5
1.3.2.2 Klinik der KADN.....	5
1.3.2.3 Klinische Bedeutung der KADN.....	5
1.4 Therapie der diabetischen Neuropathie.....	6
1.4.1 Kausale Therapie.....	6
1.4.2 Pathogenetisch begründbare Therapie.....	7
1.4.3 Schmerztherapie.....	8
1.4.4 Vermeidung von Risikofaktoren und Komplikationen.....	9
1.5 Pathogenese der diabetischen Neuropathie.....	9
1.5.1 Oxidativer Stress und Diabetes mellitus.....	9
1.5.2 Freie Sauerstoff- und Stickstoffradikale.....	10
1.6 Induktion von oxidativem Stress.....	12
1.6.1 Erhöhte Aktivität des Polyolstoffwechselweges.....	13
1.6.2 Verstärkte Aktivierung der Protein-Kinase C β	14
1.6.3 Advanced glycation end products (AGE).....	15
1.6.3.1 Wirkung der Glykosylierung auf periphere Nerven.....	16
1.6.3.2 AGE- und Hyperglykämie-induzierte Aktivierung von Redox- sensitiven Transkriptionsfaktoren.....	16
1.6.4 Erhöhter Fluss durch den Hexosamin-Stoffwechselweg.....	17
1.6.5 Reduzierte antioxidative Abwehr.....	17
1.6.6 Stickstoffmonoxid.....	19
1.7 Plasma-Marker für oxidativen Stress.....	19
1.7.1 Superoxidanion (O $_2^{\cdot-}$).....	19
1.7.2 Peroxynitrit (ONOO-).....	20
1.7.3 Isoprostane.....	21
1.7.4 Vitamin E und Vitamin C.....	22
1.8 Plasma-Marker für Inflammation.....	22
1.9 Vorarbeiten zum Thema (Ziegler et al. [170]).....	23

2	ZIEL DER ARBEIT	23
3	PATIENTEN	24
4	METHODEN	26
4.1	Marker für oxidativen Stress und antioxidative Abwehr	26
4.2	Erfassung der peripheren Nervenfunktion	27
4.2.1	Nervenleitgeschwindigkeit (NLG)	27
4.2.2	Quantitative sensorische Tests	27
4.3	Kardiovaskuläre autonome Funktionstests	33
4.4	Augenfundus	35
4.5	Dopplerdruckmessung	35
4.6	Laboruntersuchungen	36
4.7	Statistische Analysen	37
5	ERGEBNISSE	38
5.1	Marker für oxidativen Stress	40
5.2	Entwicklung bzw. Progression der Neuropathie	41
5.2.1	NLG des sensiblen N.medianus	42
5.2.2	Motorische NLG des N. peroneus	47
5.2.3	Malleolare Vibrationsschwelle (VPT)	49
5.2.4	Variationskoeffizient (VK) der Herzfrequenzvariabilität.....	51
5.2.5	6-Jahres-Mortalität.....	53
6	DISKUSSION	56
6.1	Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)	56
6.2	Vitamin E	58
6.3	Vitamin C	59
6.4	8-epi-PGF_{2α}	60
6.5	Peroxynitrit ($ONOO^-$)	60
6.6	HOCl	61
6.7	Andere Biomarker für oxidativen Stress	61
6.8	Limitierungen der Studie	63
6.9	Schlussfolgerungen	64
7	ZUSAMMENFASSUNG	65
8	LITERATURVERZEICHNIS	66

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

Diabetes mellitus ist durch eine Gruppe metabolischer Erkrankungen charakterisiert, deren gemeinsames Kennzeichen die durch relativen oder absoluten Insulinmangel bedingte Hyperglykämie ist. Zur Entstehung der Hyperglykämie tragen unterschiedliche Faktoren bei, zu denen eine gesteigerte Glukoseproduktion, eine gestörte Glukoseverwertung oder auch eine gestörte Insulinsekretion zählen. Unter den verschiedenen Diabetestypen kommen dem Typ 1 und dem Typ 2 die größte Bedeutung zu. Beim Typ 1 Diabetes handelt es sich um einen absoluten Insulinmangel, der durch Destruktion der insulinproduzierenden β -Zellen entsteht. Typ 2 Diabetes hingegen ist pathophysiologisch gekennzeichnet durch einen relativen Insulinmangel, der durch verschiedene Ursachen wie eine Insulinresistenz mit resultierender Hyperinsulinämie und einen sekretorischen Defekt der β -Zellen ausgelöst werden kann [1, 2].

Einer der wichtigsten Risikofaktoren für die Entstehung des Diabetes mellitus Typ 2 ist die Adipositas. Da das Ausmaß der Überernährung weltweit steigt, nimmt auch die Inzidenz des Typ 2 Diabetes kontinuierlich zu. Es sind zunehmend jüngere Altersgruppen betroffen [2]. Weiterhin sind Bewegungsmangel, soziokulturelle Faktoren und eine genetische Disposition an der Entwicklung eines Typ 2 Diabetes mellitus beteiligt [3].

1.2 Folgeschäden des Diabetes mellitus

Diabetes mellitus kann in zahlreichen Organsystemen Folgeschäden verursachen:

- Zu den chronischen Komplikationen zählt die diabetesspezifische Mikroangiopathie, die sich als Retinopathie, Nephropathie oder Neuropathie manifestiert. Die Endstadien dieser Folgeschäden sind durch Erblindung, terminale Niereninsuffizienz und Amputationen der unteren Extremitäten gekennzeichnet.
- Die Makroangiopathie stellt bei Diabetikern die häufigste chronische Komplikation dar und ist von entscheidender Bedeutung für die Prognose eines Patienten. Zu den makroangiopathischen Erkrankungen zählen die koronare Herzkrankheit, periphere arterielle Verschlusskrankheit und zerebrovaskuläre Insuffizienz.

1.3 Diabetische Neuropathie

Unter dem Begriff diabetische Neuropathie versteht man eine klinisch manifeste oder subklinische Erkrankung, die im Rahmen des Diabetes mellitus auftritt und auf keine anderen Ursachen einer peripheren Neuropathie zurückzuführen ist. Die neuropathische Erkrankung umfasst Manifestationen im Bereich der somatischen und / oder autonomen Anteile des peripheren Nervensystems [4]. Eine unzureichende Diabeteseinstellung, lange Diabetesdauer und viszerale Adipositas sind wichtige Risikofaktoren für die Entstehung einer diabetischen Neuropathie. Auch Alter, Rauchen, Hypertonie, Hypoinsulinämie und Dyslipidämie spielen möglicherweise eine Rolle [5].

Die diabetische Neuropathie gilt als häufigste erworbene Neuropathieform in den westlichen Industrieländern [6]. Sie trägt als essentieller Faktor in der Pathogenese des diabetischen Fußes vielfach zur Amputation bei [7]. Unterteilt wird die diabetische Neuropathie in die symmetrischen und asymmetrischen Neuropathien. Die distale symmetrische sensomotorische Polyneuropathie (DSPN) ist die häufigste klinische Manifestation [8].

1.3.1 Diabetische Polyneuropathie

Die typische DSPN ist eine chronische, symmetrische, längenabhängige sensomotorische Polyneuropathie. Sie entwickelt sich vor dem Hintergrund einer langfristigen Hyperglykämie, assoziierten aberrierenden metabolischen Stoffwechselwegen und kardiovaskulären Risikofaktoren [9]. Sie wird auf Bevölkerungsebene bei ca. 30% aller Diabetiker beobachtet [10-18]. Die Inzidenz der DSPN beträgt ca. 2% pro Jahr [5]. Nach 25 Jahren Diabetesdauer findet sich die DSPN bei annähernd der Hälfte der Patienten [19] und liegt bei mehr als 40% der Diabetespatienten im Alter von 70-79 Jahren vor [20]. In den letzten Jahren wurde auf eine enge Beziehung der DSPN zur viszeralen Adipositas (Taillenumfang) und zur peripheren arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) als wichtiger Komorbidität hingewiesen [21].

1.3.1.1 Klinik der distalen symmetrischen Polyneuropathie

Die DSPN manifestiert sich insbesondere in den distalen Abschnitten meist der unteren Extremitäten mit typischen Symptomen wie Schmerzen, Parästhesien und

Taubheitsgefühl. Die Beschwerden treten symmetrisch auf, beginnen distal und schreiten strumpfförmig nach proximal fort. Der Schmerzcharakter wird häufig als brennend („*burning feet*“), bohrend, krampfartig oder stechend beschrieben. Folgende neuropathische Symptome und Defizite treten bei der DSPN an den unteren und manchmal auch oberen Extremitäten auf [5, 8]:

- Neuropathische Symptome („Positivsymptome“):
 1. distal betonte Schmerzen, Parästhesien und Taubheitsgefühl sowie Dysästhesien (unangenehme Parästhesien) und Krämpfe
 2. vor allem nächtliche Exazerbation der Beschwerden sowie Besserung der Schmerzen beim Gehen
 3. evozierte Schmerzen:
 - Hyperalgesie (leicht schmerzhafter Reiz wird als stark schmerzhaft empfunden)
 - Allodynie (nicht schmerzhafter Reiz wird als schmerzhaft empfunden)
- Neuropathische Defizite („Negativsymptome“):
 1. Sensibilitätsstörungen:
 - reduzierte bzw. fehlende Temperatur- und Schmerzsensibilität
 - reduzierte bzw. fehlende Tiefensensibilität (Lagesinn und Vibrationssinn)
 2. Muskeleigenreflexe sind abgeschwächt oder fehlen (z.B. Achillessehnen- oder Patellarsehnenreflexe)
 3. Muskelschwäche bzw. -lähmung bei motorischer Beteiligung

1.3.1.2 Klinische Bedeutung der DSPN

Die Nervenfunktionstests, die in der zur Diagnostik der Polyneuropathie zum Einsatz kommen wie Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) und Vibrationswahrnehmungsschwelle (*vibration perception threshold* [VPT]) sind als Prädiktoren für erhöhte Mortalität und klinische Endpunkte wie neuropathische Fußulzera bei Diabetikern anzusehen [22, 23]. Neuropathische Fußulzera sind ein häufiger Grund für Krankenhausaufenthalte und Amputationen bei Diabetikern [24].

Unter den verschiedenen Schmerzsyndromen gelten neuropathische Schmerzen als besondere Herausforderung. Sie sind unterdiagnostiziert, werden nicht optimal behandelt und gehen mit zahlreichen Komorbiditäten einher. Neuropathische

Schmerzen beeinträchtigen nachhaltig die Lebensqualität, insbesondere weil sie die Leistungsfähigkeit herabsetzen und Schlafstörungen verursachen. Neuropathische Schmerzen sind bei 8-26% der Patienten mit Diabetes anzutreffen [21, 25].

1.3.1.3 Morphologie

Bei der DSPN können die großkalibrigen bemarkten ($A\alpha$, $A\beta$) sowie die kleinkalibrigen dünn bemarkten ($A\delta$) und unbemarkten (C) Nervenfaserp Populationen betroffen sein. Schmerzen treten im Rahmen einer Beteiligung der kleinkalibrigen Fasern auf [26]. Histologische Veränderungen bei der DSPN umfassen den Verlust der großen und kleinen myelinisierten Fasern mit Hinweisen auf Degeneration und Demyelinisierung [6, 27]. Weiterhin wurden eine verstärkte Fibrose und endoneurale Kollagenbildung beobachtet [28, 29].

1.3.1.4 Diagnostik

Elektrophysiologische Untersuchungen werden als objektive Verfahren und quantitative sensorische Tests (QST) als psychophysische Verfahren zur Funktionsprüfung der Nervenfasern eingesetzt [24]:

- großkalibrige, schnell leitende $A\alpha$ - und $A\beta$ - Fasern werden objektiv mit Hilfe der NLG untersucht, die Funktion der großkalibrigen Fasern durch QST
- kleinkalibrige, dünn bemarkte $A\delta$ - Fasern werden quantitativ durch Messung der Kaltschwelle untersucht
- unbemarkte C- Fasern werden quantitativ durch Messung der Warmschwelle untersucht

1.3.2 Autonome Neuropathie

Die autonome diabetische Neuropathie (ADN) ist neben der sensomotorischen Neuropathie die häufigste Form von Störungen am peripheren Nervensystem. Die ADN kann jedes autonom innervierte Organ betreffen. Klinisch relevant sind v.a. folgende Manifestationen:

- am kardiovaskulären System mit z.B. verminderter Herzfrequenzvariabilität, Ruhetachykardie und Belastungsintoleranz

- am Gastrointestinaltrakt mit postprandialen Hypoglykämien, gastrointestinalen Symptomen, gastro-ösophagealem Reflux, Hypomotilität des Kolons oder selten Stuhlinkontinenz
- am Urogenitaltrakt einhergehend mit erektiler Dysfunktion und Blasenentleerungsstörung mit Blasenlähmung

Zudem können Funktionsstörungen des respiratorischen Systems, der Thermoregulation / Schweißsekretion oder der Pupillenmotorik vorkommen [30, 31]. Auszuschließen ist die Funktionsstörung des autonomen Nervensystems nicht diabetischer Genese. Als Auslöser einer autonomen Dysfunktion kommen auch z.B. Alkoholismus, Malignome, Niereninsuffizienz oder Infektionen in Frage.

1.3.2.1 Kardiovaskuläre autonome diabetische Neuropathie (KADN)

Die KADN gilt als Leiterkrankung der ADN und erlaubt eine Frühdiagnose vor Manifestation klinischer Symptome am kardiovaskulären System und anderen Organsystemen. Dieser Sachverhalt gewinnt durch gehäuft auftretende asymptomatisch (stumm) verlaufende Myokardischämien an Bedeutung [32, 33]. Die Prävalenz der Erkrankung erhöht sich mit zunehmendem Alter, Diabetesdauer und unzureichender Blutzuckereinstellung. Beim Typ 2 Diabetes sind Rauchen und Übergewicht zusätzliche Risikofaktoren für eine reduzierte Herzfrequenzvariabilität [34].

1.3.2.2 Klinik der KADN

Als frühestes Zeichen der KADN gilt die Verminderung der Herzfrequenzvariabilität (HRV) bzw. der respiratorischen Sinusarrhythmie. In fortgeschrittenen Stadien kommt es zu einer Erhöhung der Ruheherzfrequenz bzw. Ruhetachykardie (vorwiegend Vagusläsion) und einer orthostatischen Hypotonie (vorwiegend Sympathikusläsion) mit entsprechenden Symptomen wie Schwindel und Synkopen [35].

1.3.2.3 Klinische Bedeutung der KADN

Bei Diabetikern mit KADN besteht im Vergleich zu denen ohne diese Komplikation ein erhöhtes Risiko für eine stumme Myokardischämie unter körperlicher Belastung und einen stummen Myokardinfarkt [36, 37]. Es besteht ein erhöhtes Mortalitätsrisiko durch KADN. Patienten mit KADN zeigen Mortalitätsraten von 27-

53% gegenüber Patienten ohne KADN mit Raten von 5-15%, aufgetreten in einem Zeitraum von 5-10 Jahren [35]. Inwieweit hierfür u.a. eine erhöhte Inzidenz von plötzlichem Herztod verantwortlich ist, wird weiterhin diskutiert.

1.4 Therapie der diabetischen Neuropathie

Die Therapie der diabetischen Neuropathie umfasst vier Ansätze [38]:

- Kausale Therapie mit dem Ziel einer Nahe-Normoglykämie
- Pathogenetisch begründbare Therapie
- Schmerztherapie
- Vermeidung von Risikofaktoren und Komplikationen

1.4.1 Kausale Therapie

Als Kausalansatz zur Prävention und Therapie der diabetischen Polyneuropathie gilt die normnahe bzw. möglichst optimale Diabeteseinstellung. Dies ist für den Typ 1 Diabetes belegt (z.B. DCCT, EDIC). Beim Typ 1 Diabetes kann durch eine intensive gegenüber einer konventionellen Insulintherapie (HbA_{1c}: 7,2 vs 9,1%) das Risiko für eine DSPN um 68% reduziert und deren Progression verlangsamt werden [39]. Hierfür ist nicht die Therapieform entscheidend, sondern der erreichte HbA_{1c}-Wert, welcher 92% des Gruppenunterschiedes erklärt [40]. In der EDIC-Studie ließen sich die günstigen Effekte auf die DSPN über 13-14 Jahre nach Beendigung der DCCT-Studie nachbeobachten, obwohl beide Gruppen über diesen Zeitraum ähnliche HbA_{1c}-Werte aufwiesen [41]. Dieser Effekt wurde als "hyperglykämisches bzw. metabolisches Gedächtnis" bezeichnet und auch bei der kardialen autonomen Neuropathie, der diabetischen Retinopathie und der Nephropathie beschrieben. Bei Typ 1 Diabetikern mit langer Diabetesdauer kann durch intensivierete konventionelle Insulintherapie [42,43] oder durch kombinierte Pankreas-Nieren-Transplantation [44] die Neuropathie langfristig stabilisiert werden.

Bei Typ 2 Diabetes sind solche klaren Aussagen nicht möglich: In der UKPDS konnte bei neu diagnostiziertem Typ 2 Diabetes bei einzelnen Variablen nach sehr langer Beobachtungszeit insgesamt eine geringe statistische Überlegenheit der besseren Stoffwechseleinstellung gezeigt werden [45]. Neuere Studien (ADVANCE, VADT, Steno Type 2) bei Typ 2 Diabetes mit längerer Erkrankungsdauer zu Studienbeginn und kürzeren Behandlungszeiten [46-48] zeigten keine Hemmung der Progression

bzw. Abnahme der Inzidenz der diabetischen Polyneuropathie. Somit ist ein Nutzen der intensiven gegenüber der konventionellen Diabetestherapie mit Senkung des HbA1c-Wertes um durchschnittlich 0,8-1,9% hinsichtlich Inzidenz und Progression der diabetischen Polyneuropathie beim Typ 1 Diabetes, jedoch nicht beim Typ 2 Diabetes belegt. Möglicherweise ist nur bei kurzer bekannter Diabetesdauer und sehr langen Behandlungszeiten eine minimale Wirkung zu erzielen. Es sollte jedoch eine optimale Diabeteseinstellung nach den allgemeinen Therapieleitsätzen [49] angestrebt werden. Alle Risikofaktoren (z.B. arterielle Hypertonie, Hyperlipidämie, Rauchen, übermäßiger Alkoholkonsum) müssen erfasst und ggf. behandelt werden. Zu beachten ist, dass sich neuropathische Symptome unterschiedlicher Schweregrade innerhalb von Wochen bis Monaten ohne gezielte Maßnahmen bessern können, allerdings ohne dass dies mit einer Verbesserung der elektroneurographischen Befunde verbunden sein müsste. In fortgeschrittenen Fällen kann die Abnahme von Schmerzen das endgültige Leitungsversagen in den letzten zunächst noch leitfähig verbliebenen Nervenfasern anzeigen.

1.4.2 Pathogenetisch begründbare Therapie

Bei der pathogenetisch-begründbaren Therapie handelt sich um medikamentöse Therapieformen, die aus den pathogenetischen Konzepten der diabetischen Neuropathie heraus entwickelt wurden, von denen lediglich die antioxidative Therapie mit α -Liponsäure zur Therapie der symptomatischen DSPN zugelassen ist. Sie bestehen in der

- Inhibition des Polyolstoffwechselweges durch Aldose-Reduktase-Inhibitoren
- Gabe von Antioxidantien (α -Liponsäure) zur Reduktion der Bildung von freien Sauerstoffradikalen, die zu erhöhtem oxidativen Stress führen
- Hemmung der erhöhten Aktivität der Protein-Kinase β (PKC β) durch den PKC β -Inhibitor Ruboxistaurin
- Verbesserung des reduzierten endoneuralen Blutflusses und der konsekutiven Hypoxie durch Vasodilatoren (ACE-Hemmer, AT1-Blocker, Prostaglandin-Analoga)
- Hemmung der Bildung von sog. *advanced glycation endproducts* (AGE) durch Gabe von Inhibitoren der Glykierung
- Unterstützung des Neurotrophismus durch Nervenwachstumsfaktoren (NGF)

Weitere Ansätze umfassen die Gabe von C-Peptid s.c. und phVEGF165-Gen Transfer [50]. Eine Meta-Analyse von vier Studien zeigte, dass die Infusionstherapie mit α -Liponsäure über 3 Wochen mit 600mg/Tag (15 Infusionen) zu einem signifikanten Rückgang der neuropathischen Symptome wie Schmerzen, Parästhesien und Taubheitsgefühl führt [51]. Die SYDNEY 2-Studie zeigte kürzlich, dass eine orale Therapie mit 600–1800mg über 5 Wochen ebenfalls effektiv ist, wobei die NNT (*number needed to treat*) für einen $\geq 50\%$ igen Rückgang der neuropathischen Symptome bei 2,8–4,2 lag [52]. Hervorzuheben ist, dass die Substanz auch eine Besserung der neuropathischen Defizite wie Sensibilitätsstörungen bewirkt [51, 52].

Der Erfolg einer antioxidativen Therapie mit α -Liponsäure bei diabetischer Polyneuropathie wurde in der NATHAN 1-Studie über 4 Jahre getestet. Hierbei ergab sich, dass die Substanz bei milder bis mäßiger Polyneuropathie gut vertragen wird und einige neurologischen Defizite und Symptome sich verbessern lassen, jedoch nicht die Nervenleitgeschwindigkeit [53].

1.4.3 Schmerztherapie

Die Schmerztherapie kann sich schwierig gestalten, da nur bei etwa der Hälfte der Patienten eine klinisch relevante, d.h. mindestens 50%ige durch eine Einzelsubstanz bedingte Schmerzreduktion zu erwarten ist. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass multiple Mechanismen zur Generierung der neuropathischen Schmerzen beitragen [54, 55]. Schmerztherapeutisch stehen insbesondere nichtselektive Monoamin-*Reuptake*-Inhibitoren (NSMRI) wie Amitriptylin, der duale selektive Serotonin-Noradrenalin-*Reuptake*-Inhibitor (SNRI) Duloxetin, Kalziumkanal- $\alpha 2$ - δ -Modulatoren wie Pregabalin und als Mittel der zweiten Wahl bzw. zur Kombinationstherapie schwache und starke Opioide zur Verfügung. Nichtpharmakologische Therapieoptionen (physikalische und psychologische Therapie) sind stets mit zu berücksichtigen. Eine sorgfältige Nutzen-Risiko-Abwägung steht am Anfang einer adäquaten Therapie mit dem Ziel, die Lebensqualität der Betroffenen dauerhaft zu verbessern oder zu stabilisieren [56].

1.4.4 Vermeidung von Risikofaktoren und Komplikationen

Langfristig unzureichende Stoffwechseleinstellung, Adipositas, chronischer Alkoholabusus, Hypertonie, Dyslipidämie und Rauchen sind vermeidbare bzw. therapierbare Risikofaktoren für die Ausbildung und Progression der diabetischen Polyneuropathie. Schulung des Patienten über die Neuropathie und Verhütung von ernsthaften Komplikationen wie Fußulzera sind obligat. Eine Schlüsselrolle kommt der Prävention und Früherkennung der diabetischen Neuropathie als dem wichtigsten pathogenetischen Faktor zu [56].

1.5 Pathogenese der diabetischen Neuropathie

1.5.1 Oxidativer Stress und Diabetes mellitus

Freie Radikale sind instabile Moleküle, die ein freies ungepaartes Elektron besitzen. Diese Ausgangssituation ist für die ausgeprägte Reaktivität dieser Moleküle verantwortlich. Die Radikale benötigen ein zweites Elektron, um Stabilität zu erreichen. Bei dieser Reaktion verliert das reagierende Molekül ein Elektron und wird damit selbst zum freien Radikal, wodurch eine Kettenreaktion beginnt. Sie wird erst beendet, wenn zwei freie Radikale aufeinander treffen und sich neutralisieren. Durch Bildung von freien Radikalen können Biomoleküle geschädigt werden.

Da der Angriff der Radikale meist ungesättigte Verbindungen (Doppel- oder Dreifachbindungen) betrifft, werden häufig die Proteine und Phospholipide in Zellmembranen geschädigt. DNA, Membranlipide und Enzymproteine können ihre Funktion verlieren, denn oxidierende Reaktionen rufen Strangbrüche und chemische Veränderungen hervor [57]. Die Integrität der Zellwand kann durch Lipidperoxide geschädigt werden, die durch die Reaktion von freien Radikalen mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Mehrfachbindungen entstehen.

Als Prooxidantien bezeichnet man die freien Radikale, die vom Körper selbst gebildet werden. Antioxidantien können diese unschädlich machen. Eine Verschiebung des Gleichgewichts von Prooxidantien / Antioxidantien zugunsten der Prooxidantien, die potentiellen Schaden anrichten können, wird als erhöhter „oxidativer Stress“ bezeichnet [58-60].

Einem gesteigerten oxidativen Stress wird eine wichtige Rolle in der Entstehung des Diabetes mellitus und anderen chronischen Erkrankungen wie M. Alzheimer, Krebs

und Arteriosklerose zugeschrieben [61-66]. An der Zytokin-induzierten β -Zellzerstörung beim Diabetes mellitus Typ 1 sind die zytotoxische Aldehydproduktion und die Lipidperoxidation durch freie Radikale mitbeteiligt [67]. Zudem belegen Studien, dass bereits bei Jugendlichen mit Typ 1 Diabetes systemisch ein oxidativer Stress vorliegen kann, der durch einen bis zum Erwachsenenalter anhaltenden Anstieg gekennzeichnet ist [68].

Weitere Studien haben bei Patienten mit Diabetes Typ 1 und Typ 2, die zum Teil bereits Folgeschäden aufwiesen, einen erhöhten oxidativen Stress beschrieben [63, 65, 69-72]. Prospektive Daten zur möglichen Prädiktion der Entwicklung bzw. Progression der Polyneuropathie und der autonomen Neuropathie durch Plasma-Marker für oxidativen Stress liegen jedoch nicht vor.

1.5.2 Freie Sauerstoff- und Stickstoffradikale

Es gibt verschiedene Gruppen von Molekülen, die oxidativen Stress verursachen. ROS (*reactive oxygen species*) und RNS (*reactive nitrogen species*) werden in ihrer Klassifikation unterschieden [73]:

- ROS:
 - Radikale: Superoxid ($O_2^{\cdot-}$), Hydroxyl (OH^{\cdot}), Peroxyl (RO_2^{\cdot}), Hydroxyperoxyl (HO_2^{\cdot}) und Alkoxyl (RO^{\cdot})- Radikale
 - Moleküle, die sich erst sekundär zu Radikalen umwandeln: molekularer Sauerstoff (O_2), Wasserstoffperoxid (H_2O_2), Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$), hypochlorige Säure ($HOCl$) und Ozon (O_3)
 - RNS:
 - Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot})- und Stickstoffdioxid (NO_2^{\cdot})-Radikale
 - nicht-Radikale, die später umgewandelt werden:
 - Peroxynitrit ($ONOO^{\cdot}$; kann wegen Sauerstoff- und Stickstoff-Gehalt sowohl zu den ROS als auch den RNS gezählt werden)
 - Nitrosyl-Kation (NO^+)
 - Nitrosyl-Anion (NO^-)
 - salpetrige Säure (HNO_2)
 - Distickstofftetroxid (N_2O_4)
- und weitere Substanzen

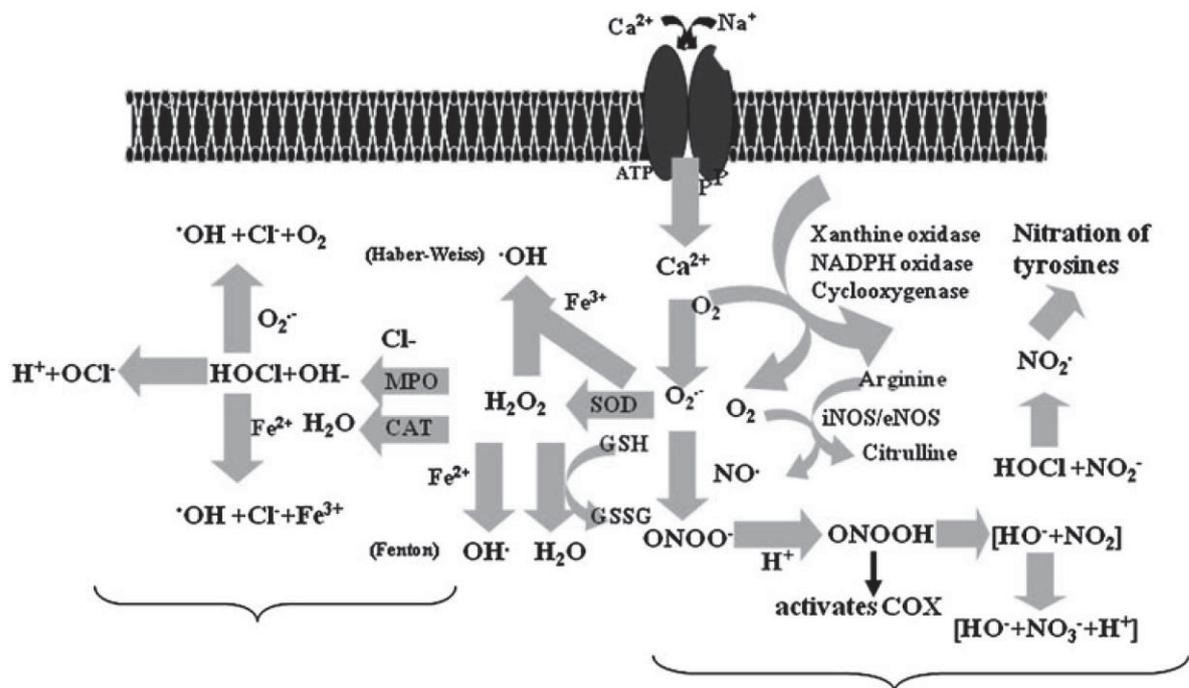
Der durch ROS und RNS ermittelte Gehalt an Oxidationsprodukten in Geweben und Plasma sowie Veränderungen im antioxidativen Status sind Messparameter für gesteigerten oxidativen Stress. Durch diesen können DNA-Schädigung (durch Mutation, Deletion, Rearrangement, Insertion oder Sequenzveränderung), Zelltod durch Apoptose oder Nekrose und Proteinschädigung hervorgerufen werden [63, 74, 75]. Auf lange Sicht ist die Rolle von ROS und RNS auf Grund der Entstehung peripherer Nervenschädigung für eine erhebliche Anzahl von atraumatischen Amputationen der unteren Extremitäten verantwortlich [76].

Der oxidative Stress kann in Biomolekülen wie Lipiden, DNA-Basen und Proteinen, die durch ROS / RNS oxidativ verändert sind, gemessen werden. Dabei sind Malondialdehyde, konjugierte Diene und Hydroperoxide sowie 9α - 11α -8-epi-PGF_{2 α} (ein F₂-Isoprostan) unter den Lipidoxidationsprodukten am besten erforscht [77]. Aus der Bestimmung der antioxidativen Kapazität und Vitaminen kann man Rückschlüsse auf den oxidativen Stress ziehen.

Unter den Substanzen, die den Gruppen ROS / RNS zugeordnet sind, bestehen ausgeprägte Unterschiede bezüglich der Reaktivität. Sehr schnell reagiert das Superoxid-Radikal, allerdings nur mit einigen Molekülen, und OH[•] mit fast jedem Molekül. HOCl und ONOO⁻ haben dagegen nur eine mittelmäßig ausgeprägte Reaktivität. Die Substanzen entstehen in jedem menschlichen Körper und sind auf aeroben Stoffwechsel angewiesen [78, 79]. Auch Strahlung kann die Bildung freier Radikale induzieren [79, 80].

Die Pfade der reaktiven Arten des Sauerstoffes/Stickstoffes sind nochmals in der unten aufgeführten Abbildung (Abb.1) dargestellt.

Abb.1: Signalwege der Produktion und Eliminierung der reaktiven Sauerstoff-/Stickstoffspezies [76]



1.6 Induktion von oxidativem Stress

Es bestehen unterschiedliche Möglichkeiten, den oxidativen Stress zu erhöhen. Zum Einen geschieht dies durch eine erhöhte Produktion von ROS durch Autoxidation von Glukose und ihren Metaboliten. Dabei werden Superoxid ($O_2^{\cdot-}$)- und Hydroxyl (OH^{\cdot})-Radikale gebildet [81], die Glykosylierung wird gesteigert, es kommt zu mitochondrialer Dysfunktion, Ischämie und einem erhöhten Durchsatz durch den Polyolstoffwechselweg [65, 82]. Zum Anderen entsteht oxidativer Stress auch durch eine Störung antioxidativer Schutzmechanismen. Die geringere Kapazität ROS abzufangen, konnte in mehreren Studien nachgewiesen werden [83, 84].

Brownlee beschreibt folgende Mechanismen, die bei der Entstehung diabetischer mikrovaskulärer Komplikationen durch Hyperglykämie eine Rolle spielen [85, 86]:

1. erhöhte Aktivität des Polyolstoffwechsels [86, 87]
2. erhöhte Aktivität von Protein-Kinase C (PKC)- Isoformen wie z.B. der PKC- β [85, 86]
3. gesteigerte Bildung von *advanced glycation end products* (AGE) [85, 86, 88]
4. gesteigerte Aktivität des Hexosaminstoffwechsels [86]

Der erhöhte Umsatz in den o.g. Stoffwechselwegen wird als unmittelbare Folge der mitochondrialen Überproduktion von Superoxidanionen im Rahmen der Hyperglykämie angesehen. Somit wird dem oxidativen Stress als dem Initialereignis eine Schlüsselrolle bei der Entstehung der diabetischen mikrovasulären Komplikationen zugeschrieben [85,86].

1.6.1 Erhöhte Aktivität des Polyolstoffwechselweges

Der Polyolstoffwechsel wird bei Hyperglykämie als zusätzlicher Weg des Glukoseabbaus aktiviert. Dabei wird Glukose durch die Aldose-Reduktase vermehrt zu Sorbitol reduziert und Sorbitol im nächsten Schritt durch die Sorbitol-Dehydrogenase zu Fruktose oxidiert [86]. Aldose-Reduktase (NADPH-abhängig) und Sorbitol-Dehydrogenase (NAD⁺-abhängig) sind zwei Enzyme, die gerade in für Komplikationen des Diabetes bekannten Organen wie Nerven, Augen und Nieren stark exprimiert werden [89]. Bei Nicht-Diabetikern mit normaler Glukosekonzentration ist der Glukoseabbau durch die Aldose-Reduktase zu vernachlässigen, da sie eine geringe Affinität zu Glukose hat. Bei Hyperglykämie jedoch wird vermehrt Sorbitol aus intrazellulärer Glukose gebildet. Dabei benötigt die Aldose-Reduktase NADPH und die Sorbitol-Dehydrogenase oxidiert unter Reduktion von NAD⁺ zu NADH das entstandene Sorbitol zu Fruktose.

Verschiedene Mechanismen spielen bei den potentiell schädlichen Effekten des Hyperglykämie-induzierten Anstieges der Aktivität des Polyolstoffwechselweges eine Rolle:

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

Die Überaktivität des Polyolstoffwechsels und damit die Anhäufung von Sorbitol führt zur Abnahme von Taurin und Myoinositol. Myoinositol ist für die Aufrechterhaltung der Na⁺-K⁺-ATPase verantwortlich. Der Verlust von Myoinositol bedingt eine reduzierte Verfügbarkeit von Diacylglycerol (DAG), was zu einer Reduktion der

neuralem $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ -Aktivität führt [6, 90]. Durch diese Störung im Ionenpumpenmechanismus kann das für die Nervenfunktion wichtige Ruhepotential nicht aufrecht erhalten werden. Es kommt zu einer intra-axonalen Na^+ -Anhäufung und einem reduzierten nodalen Na^+ -Gleichgewichtspotential. Die Aktivitätsminderung der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ löst einen Circulus vitiosus aus, da Myoinositol auf diese Weise nur vermindert ins Nervengewebe aufgenommen werden kann [90]. Durch den Verlust von Taurin wird der oxidative Stress weiter gefördert. Als potentes Antioxidans wirkt es in normaler Konzentration pathogenetischen Prozessen entgegen [91]. Bei diabetischen Ratten konnte gezeigt werden, dass der Tauringehalt in peripheren Nerven erniedrigt ist [92].

1.6.2 Verstärkte Aktivierung der Protein-Kinase C β

In der Retina und in den Glomeruli diabetischer Tiere wird bei intrazellulärer Hyperglykämie ein erhöhter Gehalt des *second messengers* Diacylglycerol (DAG) in mikrovaskulären Kulturen festgestellt. Dieser entsteht durch Erhöhung der *de novo*-Synthese aus dem glycolytischen Intermediärprodukt Dihydroxyacetonphosphat, durch Reduktion zu Glycerol-3-Phosphat und schrittweise Acylierung. Die PKC-Familie besteht aus mindestens 11 Isoformen, von denen 9 durch die *de novo*-Synthese in kultivierten vaskulären Zellen, in Glomeruli und Retina diabetischer Tiere aktiviert werden. Primär werden β - und δ -Isoformen der PKC aktiviert.

Die PKC verursacht eine Reduktion der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion, die sowohl glomerulär als auch in glatten Muskelzellen stattfindet. Es konnte gezeigt werden, dass diese Aktivierung der PKC- β -Isoformen Veränderungen des retinalen und renalen Blutflusses bedingen. Weiterhin induziert die aktivierte PKC die Expression des Permeabilitäts-steigernden Faktors VEGF in glatten Muskelzellen und unterstützt die Akkumulierung von mikrovaskulären Matrixproteinen durch Expression von TGF- β 1, Fibronectin und Typ IV-Kollagen. Darüber hinaus ist die inhibierte NO-Produktion an der Aktivierung von NF- κ B in kultivierten Endothelzellen und vaskulären glatten Muskelzellen beteiligt [86].

Ruboxistaurin ist ein spezifischer PKC- β -Inhibitor, der in der Behandlung diabetischer Tiere die PKC-Aktivität in renalen Glomeruli und Retina signifikant reduziert hat. Unter dieser Therapie ließen sich tierexperimentell der endoneurale Blutfluss und die Nervenleitgeschwindigkeit steigern [93] sowie der oxidative Stress reduzieren [94].

1.6.3 *Advanced glycation end products (AGE)*

Intra- und extrazelluläre *advanced glycation end products* (AGE) entstehen durch die chronisch erhöhte intrazelluläre Glukosekonzentration. Dabei verbinden sich reduzierte Monosaccharide der Glukose mit Aminogruppen der körpereigenen Proteine oder anderen zellulären Molekülen zu Schiff'schen Basen. Aus denen entstehen dann die frühen, noch reversiblen Amadori-Glykosylierungsprodukte [95].

Die irreversiblen AGE entstehen durch chemische Umbildung, Dehydrierung, Fragmentierung, Kreuzverkettung und Oxidation von reaktiven intrazellulären Dikarbonylen mit Aminogruppen intra- und extrazellulärer Proteine. Dazu gehört der Abbau der Amadori-Produkte, die intrazelluläre Autoxidation von Glukose zu Glyoxal und die Fragmentierung von Glyceraldehyd-3-phosphat und Dihydroxyaceton-Phosphat zu Methylglyoxal.

Durch die Irreversibilität dieser Vorgänge kommt es zur kontinuierlichen Akkumulation der AGEs.

Mehrere Mechanismen können die Zielzellen durch Produktion intrazellulärer AGE-Vorstufen schädigen:

- intrazelluläre Proteine, die durch AGE modifiziert wurden, weisen eine veränderte Funktion auf
- extrazelluläre Matrixbestandteile, die durch AGE-Vorstufen modifiziert wurden, interagieren in abnormer Weise mit anderen Matrixbestandteilen und mit Rezeptoren für Matrix-Proteine (Integrine)
- Plasmaproteine, die durch AGE-Vorstufen modifiziert wurden, binden an AGE-Rezeptoren auf endothelialen Zellen, Mesangialzellen und Makrophagen. Die Rezeptor-aktivierte Produktion von ROS wird so induziert. Die AGE-Rezeptor-Verbindung aktiviert den Transkriptionsfaktor NF- κ B, was wiederum pathologische Veränderungen der Genexpression nach sich zieht

Die Protein-Kreuzverkettung führt durch die AGE-Bildung zu einer Veränderung der dreidimensionalen Struktur mehrerer wichtiger Matrixmoleküle. Damit kommt es zu einer Veränderung der Gewebefunktionen und -eigenschaften. So ist z.B. die Struktur- und Permeabilitätsveränderung von Gefäßwänden durch Kollagen-Modifikation zu erklären.

Durch die AGE-bedingten Kreuzvernetzungen von Proteinen wird eine Beschleunigung der Arteriosklerose sowie endotheliale Dysfunktion ausgelöst. Auch die glomeruläre Dysfunktion wird begünstigt und die Struktur und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix verändert. Es kommt zu Koagulation und Thrombose und zur Stimulation der Expression von AGE-Rezeptoren (RAGE) durch Makrophagen: Atherosklerose entsteht [5, 86]. Auf diese Weise tragen AGE ebenso wie eine erhöhte Lipidperoxidation und eine erhöhte Intima Media Dicke zur Entstehung diabetischer mikrovaskulärer Störungen bei [96].

Quenching wird das Abfangen von NO durch AGE genannt. Es führt dazu, dass die Relaxation der Gefäßwand bzw. -muskulatur reduziert ist. Funktionseinbußen können auch durch Änderung anderer Proteineigenschaften wie den Diffusionskoeffizienten, die Elastizität und Viskosität entstehen [97].

Die durch den Diabetes verursachte Hyperpermeabilität der Kapillarwand scheint zum Teil durch die Bindung von Liganden an endotheliale AGE-Rezeptoren hervorgerufen zu werden. Basalmembranproteine können auch gegen ihren Abbau resistent werden und an Dicke und Steifheit zunehmen [98].

Im Tierversuch wurde belegt, dass unter Blockade des RAGE-Rezeptors die Entstehung einer makrovaskulären Erkrankung vergleichsweise gering ausfiel. Zusätzlich waren eine Verbesserung der Wundheilung und eine Prävention der diabetischen Nephropathie zu beobachten [86].

1.6.3.1 Wirkung der Glykosylierung auf periphere Nerven

Bei diabetischen Patienten konnte wie im Tierexperiment im peripheren Nerven eine erhöhte nicht-enzymatische Glykosylierung nachgewiesen werden. Durch Akkumulation der entstandenen AGE im peripheren Nerven soll es dort zur segmentalen Demyelinisierung kommen. Dieser Vorgang beruht auf AGE-spezifischen Rezeptoren auf Makrophagen, die Myelinprotein erkennen, das Myelin zerstören und anschließend zur Phagozytose führen [99-101].

1.6.3.2 AGE- und Hyperglykämie-induzierte Aktivierung von Redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren

Die Interaktion von AGE-modifizierten Proteinen mit spezifischen AGE-Rezeptoren (RAGE) hat neben der bisher hauptsächlich diskutierten AGE-Protein-Elimination die

Aufgabe verschiedene Signalübertragungswege zu aktivieren, die verschiedene Ziele haben:

- Bildung von ROS
- Depletion von zellulären antioxidativen Abwehrmechanismen (z.B. Glutathion, Ascorbat)
- Aktivierung redox-sensitiver Transkriptionsfaktoren wie NF-κB [102, 103]

Die Aktivierung von redox-sensitiven Transkriptionsfaktoren wie NF-κB unterstützt die Expression einer Vielzahl von Kininen:

- *Procoagulant tissue factor*
- Endothelin-1
- Zytokine
- Adhäsionsmolekül VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule 1*)
- Adhäsionsmolekül ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*)
- MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*) [102, 104-106]

Bei Patienten mit Diabetes wurde eine Erhöhung dieser Substanzen nachgewiesen [107].

1.6.4 Erhöhter Fluss durch den Hexosamin-Stoffwechselweg

Die Aktivierung des Hexosamin-Stoffwechselweges wird ebenfalls durch Hyperglykämie ausgelöst und kann zu diversen Veränderungen der Genexpression und Proteinfunktion führen. Der Hexosamin-Stoffwechselweg spielt ebenfalls bei der Entstehung diabetischer Komplikationen eine Rolle.

Diese von Brownlee diskutierten Hyperglykämie-induzierten Stoffwechselveränderungen entstehen durch eine Überproduktion von Superoxid in der mitochondrialen Elektronen-Transportkette. Der Zusammenhang zwischen den o.g. aktivierten Stoffwechselwegen und der Bildung von ROS als Erklärung für die Entstehung diabetischer Komplikationen konnte experimentell durch Inhibition der einzelnen Stoffwechselwege deutlich gemacht werden [85].

1.6.5 Reduzierte antioxidative Abwehr

Die antioxidative Abwehr gliedert sich in drei Schutzebenen: Prävention, Abfangen und Reparatur [108]. Die reduzierte antioxidative Abwehr in peripheren Nerven spielt

neben den oben genannten von Brownlee diskutierten Mechanismen bei der Entstehung von oxidativem Stress eine wichtige Rolle. Folgende synergistisch arbeitende antioxidative Schutzmechanismen finden sich im menschlichen Körper:

- Superoxiddismutase (SOD) katalysiert die Umwandlung zellulärer Superoxidradikale [$O_2^{\cdot-}$] in oxidativ wirksames Wasserstoffperoxid
- Vitamin E
- Glutathion
- α -Liponsäure
- die Reduktionsäquivalente NADH und NADPH
- Glutathion-Peroxidase [109]

Diese Substanzen neutralisieren Lipid-Hydroperoxide und Wasserstoffperoxide. Sie werden beim Abfangen freier Radikale selbst oxidiert und durch Regenerationssysteme wieder in ihre aktive reduzierte Form gebracht. Zu den antioxidativen Abwehrmechanismen gehören auch Schutzsubstanzen. Das sind Moleküle, die durch ihre Schädigung andere Moleküle, die wertvoller sind als sie, vor einem Angriff schützen. Eine solche Substanz ist beispielsweise das Albumin. Schutzsubstanzen werden in hydrophobe Verbindungen (z.B. Vitamin E [α -Tocopherol], Ubiquinon und Karotinoide, die hydrophobe ROS inaktivieren) und hydrophile Verbindungen (z.B. Vitamin C und Zystin, die hydrophile ROS inaktivieren) eingeteilt [110].

Für Vitamin E, Vitamin C, β -Karotin bzw. andere Karotinoide und verwandte Pflanzenpigmente und Flavonoide konnte in vielen Versuchen eine antioxidative Wirkung nachgewiesen werden. Dabei müssen einige dieser Substanzen über die Nahrung aufgenommen werden, während andere (z.B. Superoxiddismutase, Katalase) im menschlichen Körper selbst produziert werden [111-114].

Eine Prävention bzw. Korrektur der Störung des Nerven-Blutflusses und der NLG, sowie eine Normalisierung der mechanischen und thermischen Hyperalgesie durch Gabe verschiedener Antioxidantien konnte in experimentellen Studien gezeigt werden für: u.a. Acetylcystein, α -Tocopherol, Probuco, Glutathion, butyliertes Hydroxytoluen, α -Liponsäure [115-122].

Als Abwehrmoleküle der freien Radikale finden sich im Zytosol der peripheren Nerven Ascorbat (Vitamin C), Urat, Albumin, β -Karotin, Zystein, Coeruloplasmin, Transferrin, Glutathion und als am wichtigsten geltend Glutathion-Peroxidase,

Glutathion-Reduktase, Katalase und Superoxiddismutase. Als einziges lipophiles / hydrophobes physiologisches Antioxidans in Zellmembranen ist das α -Tocopherol (Vitamin E) zu finden. Es kann dort die Oxidation ungesättigter Membranlipide verhindern. In experimentellen Untersuchungen wurde diese Funktion bestätigt, indem bei nicht-diabetischen Tieren durch Verringerung des Vitamin E-Gehalts eine sensorische Polyneuropathie ausgelöst wurde. Bei diabetischen Tieren kam es zu einer Verschlechterung der bestehenden Polyneuropathie [84].

1.6.6 Stickstoffmonoxid

Ein Mangel an Stickstoffmonoxid kann bei oxidativem Stress durch eine Neutralisation von NO entstehen. Diese wird von der Superoxiddismutase induziert, indem sie Peroxynitrit aus NO bildet. Peroxynitrit seinerseits ist für Hydroxyl-Radikale verantwortlich, die einen Endothelschaden hervorrufen können [123]. Weiterhin ist ein NO-Mangel verantwortlich für:

- Beschleunigung der Expression von Adhäsionsmolekülen
- Begünstigung der Bildung von Superoxid-Radikalen
- Beeinträchtigung der Blut-Nerven-Schranke in ihrer Permeabilität
- Beeinträchtigung der Adhäsionsfähigkeit der Gefäßwand und der Hemmung des Wachstums der glatten Muskelzellen
- Verringerung des mikrovaskulären Blutflusses
- Aktivierung von PKC und NF- κ B

Bei der chronischen Hyperglykämie führt der erhöhte Umsatz im Polyolstoffwechsel zu einem NO-Mangel im Endothel des Nerven [124, 125].

1.7 Plasma-Marker für oxidativen Stress

1.7.1 Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)

Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) und Hydroxyl-Radikal (OH^{\cdot}) sind zwei freie Radikale, die durch Reduktion von Sauerstoff bzw. Wasserstoffperoxid gebildet werden. Superoxid ist ein Nebenprodukt bei der Xanthinoxidase und Aldehydoxidase. Weiterhin setzen aktivierte phagozytierende Zellen mit dem NADPH Oxidase-System Superoxid frei. Das Entweichen von Elektronen aus Sauerstoff während der

Elektronentransportkette sowie Autoxidation von Hydrochinonen, Thiolen und Katecholaminen sind ebenso Mechanismen zur Entstehung von Superoxid [126].

Wasserstoffperoxid kann durch die Enzyme D-Aminosäure-Oxidase oder Aminooxidase sowie aus Superoxid entstehen. Aus Wasserstoffperoxid oder aus dem Superoxidanion werden besonders in Anwesenheit von Eisen- oder Kupferkatalysatoren die Hydroxyl-Radikale gebildet.

Die antioxidative Kapazität ist ein globaler Messwert, der alle bekannten und unbekanntes antioxidativen Aktivitäten in einer Probe, sowie deren Interaktionen, erfasst. In einem neuen Verfahren wird die Fähigkeit einer Probe gemessen, freie Radikale und andere Oxidantien in Gegenwart des Photoproteins Pholasin[®] abzufangen [127]. In einem Versuchsansatz, in dem viel Superoxid vorhanden ist, emittiert Pholasin[®] umso mehr Licht. Durch die Anwesenheit von Antioxidantien in der Probe, die Superoxid abfangen bzw. neutralisieren können, kommt es zu einer Konkurrenz zwischen den Antioxidantien und Pholasin[®] um das Superoxid.

1.7.2 Peroxynitrit (ONOO-)

Das prooxidative Peroxynitritanion entsteht durch die Reaktion von einem Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$) mit Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) [65, 128, 129]. Peroxynitrit entsteht bei Entzündungen in Neutrophilen und Makrophagen. Es kann Bakterien und weitere Mikroorganismen vernichten. Wenn Peroxynitrit mit DNA reagiert, kann es diese schädigen [130, 131]. Es entstehen Brüche in der DNA, Modifikation der Basen und Mutationen. Dieses wirkungsvolle Oxidans kann auch vaskuläre Dysfunktion verursachen [123], LDL oxidieren [132] und Tyrosinreste in Proteinen nitrieren [133].

Im Plasma kann Peroxynitrit wie Superoxid indirekt mit Hilfe des lichtemittierenden Proteins Pholasin[®] nachgewiesen werden. Dabei wird die Zeit gemessen, bis das Maximum der Lichtemission (*Peak* der Lumineszenz) erreicht ist. Die *lag time* (zeitliche Verzögerung) ist Ausdruck der antioxidativen Kapazität der Probe. Dies wird verdeutlicht, wenn sich antioxidativ wirksame Substanzen wie Vitamin E in der Probe befinden, die mit dem Pholasin[®] um das Peroxynitrit konkurrieren. Es kommt dadurch zu einer Verlängerung der *lag time* bis zum maximalen *Peak* [127].

1.7.3 Isoprostane

F₂-Isoprostane sind Isomere von Prostaglandinen, die durch nicht-enzymatische Peroxidation von Arachidonsäure unabhängig vom Zyklooxygenase-Stoffwechselweg entstehen [134]. Unter 64 F₂-Isoprostan-Isomeren kommt 8-epi-PGF_{2α} mit seinen biologisch zytotoxischen Eigenschaften die größte Bedeutung zu [135]. In menschlichen Körperflüssigkeiten wie Urin und Blut sind Isoprostane, wenn auch in geringer Konzentration, gut nachweisbar [134, 136-142]. Sie entstehen bei der Peroxidation ungesättigter Fettsäuren in Lipiden und liegen meist mit Lipiden verestert im Plasma vor [138, 143-151].

Bei Erkrankungen, die mit einem erhöhten oxidativen Stress einhergehen, fand sich ein erhöhtes 8-epi-PGF_{2α}. Genauso war diese Erhöhung bei Erkrankungen oder Toxinen, die eine Prädisposition zur beschleunigten Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen (wie z.B. Rauchen, Diabetes, Leberzirrhose, Alkoholabusus) zeigen, zu beobachten [141, 143, 144, 149, 152-156]. Auch bei diabetischen Patienten, die keine chronischen Komplikationen aufwiesen, wurden erhöhte Marker der Lipidperoxidation gefunden [157-161].

Die Messung von 8-epi-PGF_{2α} in Blut und Urin wird als aussagekräftiger Parameter für die Lipidperoxidation und damit für erhöhten oxidativen Stress angesehen [138, 142, 162-164]. Dabei ist die Messung von 8-epi-PGF_{2α} im Urin der Messung im Plasma überlegen. Im Plasma kann es durch Autoxidation von Arachidonsäure zur artifiziellen Bildung von Isoprostanen kommen, wenn die Probe nicht ordnungsgemäß gelagert bzw. nicht rechtzeitig bearbeitet wird. Eine Lagerungstemperatur von -70°C bis zu 6 Monaten gilt als unbedenklich bezüglich des Auftretens nachträglicher F₂-Isoprostan-Bildung durch Autoxidation. Im Urin ist Autoxidation kein relevantes Problem, da Urin kaum Lipide enthält [134].

Unter hyperglykämischen Bedingungen wurde eine gesteigerte Bildung und Freisetzung von 8-epi-PGF_{2α} festgestellt. Dieser Zusammenhang zeigte sich sowohl *in vivo* [149] als auch bei *in vitro*-Untersuchungen [165]. Bei verbesserter Blutzuckereinstellung kam es dabei zu einer Abnahme der 8-epi-PGF_{2α}-Exkretion [149]. Allerdings gibt es auch Studienergebnisse von Typ 2 Diabetikern, die eine Korrelation zwischen der Blutzuckereinstellung und einem erhöhten Plasmagehalt an verestertem 8-epi-PGF_{2α} nicht bestätigen konnten [143].

F₂-Isoprostane haben als Marker der Lipidperoxidation *in vivo* günstige Eigenschaften. Sie sind als spezifische Produkte der Lipidperoxidation stabiler als andere Substanzen und treten in allen Geweben und Flüssigkeiten zwar in geringen Mengen, trotzdem aber gut nachweisbar auf. Außerdem ist die Konzentration der Isoprostane allein abhängig von oxidativem und antioxidativem Status und korreliert nicht mit dem Gesamtfettgehalt der untersuchten Körperflüssigkeit [166].

Die Konzentration von 8-epi-PGF_{2α} stellt somit ein Maß für den oxidativen Stress *in vivo* dar.

1.7.4 Vitamin E und Vitamin C

Beim Diabetes wurden Störungen verschiedener antioxidativer Schutzmechanismen wie z.B. des Vitamin C / Vitamin E-Zyklus festgestellt [83]. Diese Feststellung bestätigt sich in einer Studie, in der Diabetiker nach Myokardinfarkt mit Vitamin E und Vitamin C behandelt wurden. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der Sterblichkeit post Infarkt [167]. In Tierversuchen mit Ratten zeigte sich ein positiver Effekt bezüglich der Prävention von diabetischer Nephropathie und diabetes-induziertem Katarakt durch Substitution der Vitamine E und C sowie moderates Training [168].

1.8 Plasma-Marker für Inflammation

Hypochlorige Säure (= HOCl = unterchlorige Säure) entsteht durch die Reaktion von Myeloperoxidase in Neutrophilen und Monozyten mit Wasserstoffperoxid und Chlor. Findet die Reaktion mit Brom anstelle von Chlor statt, kommt es zur Entstehung von hypobromiger Säure (= HOBr = unterbromige Säure). Die Freisetzung dieser Zellenzyme kann an Entzündungsherden, an denen sich vermehrt Leukozyten finden, schwere Schäden verursachen.

HOCl ist ein proinflammatorisches Oxidans, das bei der Gewebeschädigung von entscheidender Bedeutung ist. Unter inflammatorischen Bedingungen kann es durch Modifikation von L-Arginin endotheliale Dysfunktion induzieren [169]. Weiterhin wird die α₁-Antiprotease schnell durch HOCl inaktiviert. Durch diese Reaktion können proteolytische Enzyme wie Elastase nicht mehr daran gehindert werden, Gewebe zu zerstören. Das Gewebe kann nur geschützt werden, wenn ein Antioxidans wie

Ascorbinsäure ebenfalls vorliegt und die Inaktivierung der α_1 -Antiprotease verhindern kann.

1.9 Vorarbeiten zum Thema (Ziegler et al. [170])

Da bislang keine prospektiven Daten hinsichtlich des prädiktiven Wertes erhöhter Plasma-Marker für oxidativen Stress im Hinblick auf die Entwicklung bzw. Progression der diabetischen Neuropathie vorliegen, wurde die vorliegende Studie prospektiv über 6 Jahre angelegt. Sie basiert auf einer eigenen Querschnittsuntersuchung, die gezeigt hat, dass der oxidative Stress bereits bei Diabetikern ohne Hinweise für eine DSPN gesteigert ist. Bei Diabetikern mit DSPN ist der oxidative Stress jedoch gegenüber denen ohne DSPN abermals gesteigert und korreliert in multivariaten Modellen mit dem Schweregrad der DSPN [170].

2 Ziel der Arbeit

Ziel dieser prospektiven Studie über 6 Jahre war es, festzustellen, inwieweit Plasma-Marker für oxidativen Stress, Prädiktoren der Entwicklung bzw. Progression der diabetischen Polyneuropathie und kardialen autonomen Neuropathie sowie der Mortalität sind.

3 Patienten

Insgesamt wurden 72 der initial untersuchten Diabetiker [170] bezüglich der peripheren und autonomen Nervenfunktion nachuntersucht, während 17 Teilnehmer zwischenzeitlich verstorben sind. Von den Verstorbenen erlitten zwei einen plötzlichen Tod, vier einen Myokardinfarkt, weitere vier starben an Karzinomen, ein Studienteilnehmer an Sepsis und sechs Todesfälle blieben unklar. Alle Studienteilnehmer erklärten ihr Einverständnis zur Teilnahme an der Studie. Zu Beginn der Studie galten die folgenden Ein- 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, Primaquin, Chloroquin) oder Prooxidantien (z.B. Eisenpräparate) 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 Stoffwechselentgleisungen unmittelbar vor Untersuchungsbeginn)

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

Für die Patientin-/Probandenuntersuchungen wurde von der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität im Rahmen der ethischen und rechtlichen Beratung das Aktenzeichen 2423 vergeben.

4 Methoden

4.1 Marker für oxidativen Stress und antioxidative Abwehr

Die nachstehenden Marker des oxidativen Stresses wurden bei der *Baseline*-Untersuchung im Plasma bestimmt.

- Produktion von Superoxidanion (O₂⁻)
ABEL[®] assay (= *Analysis By Emitted Light*) basierend auf dem lichtemittierendem Protein Pholasin[®]:
Oxidation von Xanthin mit Xanthinoxidase → O₂⁻
Signalaufzeichnung über 5 min auf einem 121 LKB Recorder
Antioxidative Kapazität: gezählt (mV) bei maximaler Lichtemission
- *Lag time* zur Peroxynitritoxidation (ONOO⁻)
ABEL[®] assay: SIN-1 Lösung: O₂⁻ + NO. → ONOO⁻
Antioxidative Kapazität: Zeit (min) bei maximaler Lichtemission
- Produktion hypochloriger Säure (HOCl)
ABEL[®] assay: 40 µL Chloramin-T (44 mM in Wasser)
 $\text{Cl}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HOCl} + \text{HCl}$
Antioxidative Kapazität: gezählt (mV) bei maximaler Lichtemission
- 8-epi-Prostaglandin F₂α (8-epi-PGF₂α)
Alkalische Hydrolyse, Extraktion der Gesamtlipide, NH₂-Chromatographie, Pentafluorobenzyl (PFB) Derivatisierung, Trimethylsilyl (TMS) Äther Derivatisierung, Gaschromatographie-Massenspektrometrie/Negative Ion-chemische Ionisierung (GC-MS/NICI)
- Vitamin C
Fluorimetrische Messung (λEX350 und λEM430) mit o-Diphenylendiamin als Probe
- Vitamin E / *lipid ratio*
HPLC unter Verwendung einer Gilson Pumpe Modell 305 in Verbindung mit einem Gilson Fluorimeter Modell 121 (IEX 295 nm and IEX 340 nm)

[170-173].

4.2 Erfassung der peripheren Nervenfunktion

Zur Erfassung der peripheren Nervenfunktion wurden die Messung der Nervenleitgeschwindigkeit, quantitative sensorische Tests wie Temperatursensitivität und Vibrationsschwellentest sowie klinische neurologische Untersuchungen durchgeführt. Die klinischen Untersuchungen umfassten die Erhebung des *Neuropathy Symptom Score* (NSS) nach Young et al. [20, 174, 175] und des *Neuropathy Impairment Score* für die unteren Extremitäten (NIS[LL]) nach Dyck et al. [176-178].

4.2.1 Nervenleitgeschwindigkeit (NLG)

Die Messung der NLG wurde an motorischen und sensiblen Nerven durchgeführt. Sie ist weitgehend standardisiert und zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität, Spezifität, Objektivität und Präzision aus [179]. Durch Messung der NLG wird die Funktion der großkalibrigen myelinisierten, schnell leitenden A α - und A β -Nervenfaserp Populationen erfasst. Diese stellen ca. 20% der peripheren Nervenfasern dar [8, 180].

Mit Hilfe von Oberflächenelektroden unter Verwendung eines Sapphire Elektromyographen (Medelec, Woking, Surrey, England) wurde die Messung bei einer Hautoberflächentemperatur von 33-34°C durchgeführt. Motorisch wurde die NLG an N. medianus und N. peroneus, sensibel an N. medianus und N. suralis gemessen [8].

4.2.2 Quantitative sensorische Tests

Mit der Durchführung dieser Tests kann eine absolute sensorische Schwelle bestimmt werden [181]. Sie sind nichtinvasiv, einfach in der Handhabung und dazu sehr sensitiv. Die Stimulusintensität und der Testalgorithmus können genau kontrolliert werden.

Folgende quantitative sensorische Tests wurden durchgeführt:

1. Temperaturwahrnehmungsschwelle (TPT). Es wurden Warm- und Kaltreize zur Wahrnehmung geboten (jeweils n=5). Die erste Wahrnehmung einer Temperaturänderung ausgehend von 32°C sollte von den Patienten durch Knopfdruck signalisiert werden. Dabei wurden Daumenballen (Thenar) und

Fußbrücken (laterales Dorsum pedis) mit Hilfe der *method of limits* (= Eingrenzungsmethode) als Messorte gewählt. An den genannten Stellen wurde die Thermode des Thermotesters TSA-II (medoc system, WIN TSA-Software, Haifa, Israel) zur Durchführung der Messung angelegt.

Die Messung der TPT ermöglicht die Funktion der kleinkalibrigen A δ - und C-Fasern zu beurteilen. Ein Großteil der peripheren Nervenfaserpopulationen, ca. 80%, wird von diesen Fasertypen gebildet [8].

2. Vibrationswahrnehmungsschwelle (VPT). Als Messorte wurden das Os metacarpale des Digitus II rechts und der Malleolus medialis mit Hilfe der *method of limits* (= Eingrenzungsmethode) (Vibrometer, Somedic, Stockholm, Schweden) gewählt. Zunächst wurde in 3 Durchgängen gemessen wie hoch die Amplitude der Vibration bei der ersten Wahrnehmung eines Anstiegs war (sog. *appearance threshold*). Danach sollten die Patienten in 3 weiteren Durchgängen angeben bei welcher Amplitude sie die Vibration nicht mehr wahrnehmen konnten (sog. *disappearance threshold*). Der Mittelwert dieser 6 Messungen stellt das Ergebnis der VPT in μm dar.

Mit der VPT kann die Funktion der großkalibrigen Afferenzen nach Stimulation der Mechanorezeptoren geprüft werden [8].

Die Symptome und Defizite der diabetischen Neuropathie wurden im Rahmen der klinisch neurologischen Untersuchung mit dem *Neuropathy Symptom Score* (NSS) [20, 174, 175] und dem *Neuropathy Impairment Score of the Lower Limbs* (NIS[LL]) [176-178] erfasst.

Die Kriterien für die Diagnose der DSPN entsprachen weitgehend denen von Dyck et al. [177]:

- 1.) Abnahme der motorischen NLG des N. peroneus und/oder der sensiblen NLG des N. suralis
- 2) erhöhte malleolare VPT
- 3) erhöhte Warm- und/oder Kaltschwelle am Fuß
- 4) NIS-LL \geq 2
- 5) NSS \geq 3

Der Schweregrad der diabetischen Neuropathie wurde nach Dyck et al. [175] 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, NSS <3 = asymptomatische Neuropathie

Stadium 2 = ≥ 2 der Kriterien 1-4 treffen zu, NSS ≥ 3 = symptomatische Neuropathie.

Die Abbildungen 2 und 3 zeigen diese Scores:

Abbildung 2:

Neuropathy Symptom Score (NSS)

	Punkte
- Brennen, Taubheitsgefühl oder Kribbeln (= 2)	
- Ermüdung, Krämpfe oder Schmerzen (= 1)	
<u>Lokalisation der Beschwerden:</u>	
- Füße oder (= 2)	
- Waden oder (= 1)	
- andere Lokalisation (= 0)	
Zeitpunkt der Beschwerden:	
- nur nachts oder (= 2)	
- Tag und Nacht vorhanden oder (= 1)	
- nur tagsüber vorhanden (= 0)	
- Aufwachen wegen der Beschwerden (= 1)	
Verminderung der Beschwerden durch:	
- Gehen oder (= 2)	
- Stehen oder (= 1)	
- Sitzen bzw. Liegen (= 0)	

Die Summe der vorliegenden Beschwerden bildet den NSS.

Folgendes *Scoring* gilt für den NSS-Punktwert:

- 3-4 = leichte Symptome,
- 5-6 = mäßige Symptome,
- 7-9 = schwere neuropathische Symptome.

Abbildung 3:

Neuropathy Impairment Score of the Lower Limbs (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

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 und Nadelstich wurden an der terminalen Phalanx der Großzehe getestet:

- Berührungsdruk: beurteilt mit langfaseriger Baumwolle
- Nadelstich: beurteilt mit Pin-prick

Vibrationswahrnehmung wurde am Malleolus medialis gemessen mit einer 128 Hz Stimmgabel (nach Rydel-Seiffer)

Die Addition der Punktwerte für die rechte und linke Körperhälfte ergibt den NIS[LL].

4.3 Kardiovaskuläre autonome Funktionstests

Zur Diagnostik der KADN wurde das Computersystem VariaCardio TF5 (Advanced Medical Diagnostics Group, Buckinghamshire, UK) verwendet [182].

Es wurden nach Ziegler [8] die folgenden Tests durchgeführt:

1. Herzfrequenzvariabilität (*heart rate variability* = HRV) in Ruhe

Zunächst erfolgte eine Ruheperiode von 5 Minuten. Danach wurde die HRV unter normaler Atmung jeweils 5 Minuten im Liegen und im Stehen gemessen. Herzfrequenz, Variationskoeffizient der R-R-Intervalle und die Wurzel der mittleren quadrierten aufeinanderfolgenden Differenzen (RMSSD = *root mean squared successive difference*) wurden aus 150 artefaktfreien R-R-Intervallen errechnet. Dazu wurde eine Spektralanalyse durchgeführt, die die Auftrennung der HRV in ihre verschiedenen Komponenten erlaubt. So konnten sympathischer und parasympathischer Einfluss auf das Herz weitgehend getrennt quantifiziert werden.

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

Die niederfrequente HRV wird vor allem durch das sympathische Nervensystem beeinflusst. Fluktuationen des Vasomotorentonus stehen mit Thermoregulation in Verbindung und sind Ausdruck des Leistungsspektrums.

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

Das Mittelfrequenzband steht unter dem Einfluss von Sympathikus und Parasympathikus. Es steht in Beziehung zum 10-Sekunden-Rhythmus (Mayer-Wellen). Dieser wird durch Barorezeptoren moduliert.

Das HF Band wird hauptsächlich vom Parasympathikus beeinflusst.

4. Herzfrequenzvariabilität unter tiefer Atmung

Der Proband hielt in liegender Position eine Atemfrequenz von 6 Atemzügen pro Minute ein (Inspirationszeit 6 Sekunden, Expirationszeit 4 Sekunden). Herzfrequenz, Variationskoeffizient der R-R-Intervalle und *root mean squared successive difference* (RMSSD) wurden aus 100 artefaktfreien R-R-Intervallen berechnet.

Es wurde der Atemzyklus mit der maximalen HRV ausgewählt. Aus diesem wurden das längste R-R-Intervall während der Expiration ($R-R_{\max}$) und das kürzeste R-R-Intervall während der Inspiration ($R-R_{\min}$) herausgesucht. Diese dienen zur Berechnung der Differenz $R-R_{\max} - R-R_{\min}$ (E-I-Differenz) und des Quotienten $R-R_{\max} / R-R_{\min}$ (E/I-Quotient).

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

Der liegende Proband wurde während der Untersuchung aufgefordert, sich neben die Untersuchungsfläche zu stellen. Im Moment des aktiven Aufstehens startete der Test.

Zunächst kommt es bei dieser Untersuchung durch eine Hemmung des Parasympathikus zu einem Frequenzanstieg mit einem Maximum um den 15. Schlag. Darauf folgt ein Frequenzabfall mit einem Minimum um den 30. Schlag. Eine parasympathische Innervationsstörung ist durch geringere Ausprägung bzw. Aufhebung dieser Sofortreaktion der Herzfrequenz gekennzeichnet.

Das kürzeste R-R-Intervall liegt im Bereich des 5.-25. Herzschlages und das längste R-R-Intervall im Bereich des 20.-40. Herzschlages nach dem Aufstehen. Entsprechend wurde der Max/Min 30:15-Quotient aus dem längsten/kürzesten R-R-Intervall berechnet:

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

6. Valsalva-Quotient

Bei diesem Test hielt der Proband im Sitzen über das Mundstück eines Manometers (Maxi-Sabil 3, Speidel und Keller) einen Druck von 40 mmHg über 15 Sekunden aufrecht. Während des Manövers sowie in den sich anschließenden 15 Sekunden wurden die R-R-Intervalle aufgezeichnet. Der Valsalva-Quotient errechnet sich aus dem längsten R-R-Intervall während der dem Pressversuch folgenden 15 Sekunden, geteilt durch das kürzeste R-R-Intervall während des Manövers. Ein erniedrigter Valsalva-Quotient kann Ausdruck einer herabgesetzten Funktion des Sympathikus, des Parasympathikus oder der Barorezeptoren sein. Somit ist der Test für eine allgemeine Beurteilung des kardiovaskulären Systems geeignet.

Bei Patienten mit proliferativer Retinopathie wurde dieser Test wegen der Gefahr der Auslösung von Fundus- oder Glaskörperblutungen nicht durchgeführt.

7. Systolische Blutdruckänderung nach aktivem Aufstehen aus liegender Position (Orthostase-Test)

Die automatische Blutdruckmessung nach Riva Rocci wurde in einer Ruhephase von 5 Minuten Dauer minütlich erfasst (Dynamap 1846 SX von Critikon, Johnson & Johnson, Norderstedt, Deutschland; Messbereiche systolisch 30-245 mmHg, diastolisch 10-210 mmHg). Danach wurden die Probanden aufgefordert aufzustehen. In dieser Position wurde der Blutdruck erneut minütlich über 5 Minuten gemessen. Die aus den Messungen gewonnenen systolischen und diastolischen Blutdruckwerte wurden für die Berechnungen verwendet: Die Differenz zwischen dem niedrigsten Wert vor dem Aufstehen und dem ersten Wert nach dem Aufstehen ergab die systolische Blutdruckänderung. Die diastolische Blutdruckänderung wurde aus der Differenz zwischen dem letzten gemessenen diastolischen Wert im Liegen und dem ersten diastolischen Wert im Stehen gebildet. Ein positiver Orthostasetest lag bei einem systolischen Blutdruckabfall ≥ 28 mmHg vor. Ein systolischer als auch diastolischer Blutdruckabfall kommt häufig bei Patienten mit KADN vor. Im Sinne einer asympathikotonen orthostatischen Hypotonie fehlt meist auch ein adäquater Frequenzanstieg.

4.4 Augenfundus

Für die Fundoskopie und das Fundusfoto nach Pupillenerweiterung kam die Kamera CR3-45NN (Canon, Tokyo, Japan) zum Einsatz. Die Beurteilung des Augenhintergrundes wurde im DDZ von einem erfahrenen Arzt durchgeführt.

4.5 Dopplerdruckmessung

Die systolische Dopplerdruckmessung in Ruhe wurde mittels Blutdruckmessung am Oberarm sowie an beiden distalen Unterschenkeln durchgeführt, um eine pAVK

ausschließen zu können. Dabei wurde ein *Ankle-Brachialis-Index* (ABI) von $<0,7$ als pAVK und $>1,3$ als Mediasklerose eingestuft.

4.6 Laboruntersuchungen

Es fand eine periphervenöse Blutentnahme nach einer 10-14stündigen Nahrungskarenz statt.

Die Analyse des glykosylierten Hämoglobins (HbA_{1c}) wurde mit Hilfe der Ionenaustauscherchromatographie und dem vollautomatischen Analysensystem Diamat (Biorad, München, Deutschland) durchgeführt. Der Referenzbereich wurde mit 3,9-6,5% angegeben.

Der Blutglukose-Wert wurde zum Teil mit Patienteneigenen Geräten oder im DDZ mit Hilfe einer Hexokinase-basierten Methode bestimmt (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland).

Die *Cholesterol-C high performance* CHOD-PAP Methode wurde zur Messung des Gesamtcholesterins im Serum verwendet (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland).

Nach der CHOD-PAP Methode wurde auch der HDL-Anteil des Cholesterins enzymatisch gemessen (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland).

Der LDL-Anteil an den Blutfetten wurde aus den Werten für Gesamtcholesterin, HDL und Triglyceride mit der Friedewald-Formel errechnet.

Die Gesamt-Triglyceride wurden mit einem GPO-PAP *high performance*, enzymatischen und kolorimetrischen / photometrischen Test analysiert (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland).

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

Der Kreatingehalt in Urin und Serum wurde mit einem auf Kreatinase basierenden Test gemessen (Boehringer Mannheim GmbH, Diagnostica & Biochemicals, Mannheim, Deutschland). Für die Analyse von Fibrinogen kam ein Verfahren zur Anwendung, das den Einsatz von Natriumcitrat beinhaltetete (Dade Behring Marburg GmbH, Marburg, Deutschland).

Zur Messung der Leukozyten wurde 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]) verwendet.

Die Albuminausscheidung im 12h-Urin wurde mit Hilfe der kinetischen Nephelometrie [183] (Array Protein System, Beckman, Fullerton, CA, USA) bestimmt. Eine diabetische Nephropathie wurde definiert als Albumin-Ausscheidungsrate von ≥ 20 $\mu\text{g}/\text{min}$.

4.7 Statistische Analysen

Mittels Regressionsanalysen wurde festgestellt, welche Beziehungen zwischen einer abhängigen und mehreren unabhängigen Variablen bestehen. Dabei kamen multiple lineare Regressionsanalysen, binär logistische Regressionsanalysen sowie Cox-Regressionsanalysen zum Einsatz. Im Regressionsmodell nach Cox wurde die Sterblichkeitsrate anhand des Zusammenhangs zwischen Einflussfaktoren und der Hazardfunktion hergestellt. Kontinuierliche Variablen wurden als Mittelwert und Standardabweichung (SD) oder Standardschätzfehler (SEM) angegeben. Das Signifikanzniveau lag definitionsgemäß bei $\alpha=0,05$. Die *Baseline*-Daten 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.

Um herauszufinden, welche Parameter für eine Progression der Polyneuropathie bzw. auch der autonomen Neuropathie verantwortlich sind, wurden multiple logistische Regressionsanalysen durchgeführt. Dabei wurden NLG, VPT, Kaltschwelle (Fuß), HRV sowie die Marker für oxidativen Stress Superoxidanion, Peroxynitrit *lag time*, HOCl, 8-epi-PGF_{2a}, Vitamin E/lipid ratio und Vitamin C in verschiedenen Modellen als abhängige Variablen verwendet. Unabhängige Variablen in diesen Modellen umfassten Alter, Geschlecht, BMI, Diabetestyp und -dauer, Körpergröße, HbA_{1c}, Albuminurie, Kreatinin, Triglyzeride, HDL, LDL, Retinopathie, arterielle Hypertonie und das Superoxidanion.

5 Ergebnisse

Die demographischen und klinischen *Baseline*-Daten der 72 Diabetiker mit *Follow-up* und der 17 verstorbenen Patienten zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Demographische und klinische Daten der Patienten mit *Follow-up* und der Verstorbenen.

	<i>Follow-up</i> komplett	Verstorbene	P value
N	72	17	--
Zeit bis zum <i>Follow-up</i> /Tod (Jahre)	6.2±0.8	4.2±1.0	--
Geschlecht (m/f)	41/31	7/10	0.286
Alter (Jahre)	51.0±14.2	65.1±8.3	<0.001
BMI (kg/m ²)	28.2±4.3	28.4±5.9	0.897
Diabetesdauer (Jahre)	10.8±8.6	14.6±13.4	0.276
Typ 1/Typ 2 Diabetes (n)	26/46	2/15	0.080
HbA1c (%)	9.2±1.7	10.4±1.4	0.008
LDL Cholesterin (mg/dl)	129±37.5	135±41.5	0.572
HDL Cholesterin (mg/dl)	50.1±16.7	47.3±18.6	0.542
Albuminurie (µg/min)*	10.5 (4.0-23.8)	64.0 (12.0-244.5)	0.001
Hypertonus (n [%])	32 (44.4)	13 (76.5)	0.029
Retinopathie (n [%])	38 (52.8)	12 (70.6)	0.277
Polyneuropathie (n [%])	39 (54.2)	12 (70.6)	0.281

arithmetischer Mittelwert ± SEM; *Median (*interquartile range*)

Die Gruppe der Verstorbenen war signifikant älter als die Diabetiker mit *Follow-up* ($p < 0,05$). Darüber hinaus wiesen die Verstorbenen ein signifikant höheres HbA1c und höhere Albuminurie-Werte sowie häufiger eine arterielle Hypertonie auf ($p < 0,05$). Unter den Verstorbenen fanden sich grenzwertig signifikant häufiger Typ 2- als Typ 1 Diabetiker ($p = 0,08$). Für Geschlecht, BMI, Diabetesdauer, LDL-Cholesterin, HDL-Cholesterin sowie bezüglich der Häufigkeit der Retinopathie und Polyneuropathie ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 1). Der mittlere HbA1c-Wert fiel nach 6 Jahren zum Zeitpunkt des *Follow-up* um $1,4 \pm 1,6\%$ (SEM) gegenüber dem Ausgangswert ab.

5.1 Marker für oxidativen Stress

In Abbildung 4 sind die Plasma-Marker für oxidativen Stress bei *Baseline* bei Diabetikern ohne DSPN im Vergleich zu denen mit DSPN dargestellt. Dabei zeigten Patienten mit DSPN eine signifikante Erhöhung der Superoxidanion-Produktion gegenüber Patienten ohne DSPN ($p < 0,05$) und Reduktion des Vitamin E/Lipid-Quotienten ($p < 0,05$).

Abbildung 4: Superoxidanion-Produktion und Vitamin E/Lipid-Quotient im Plasma bei Diabetikern mit *Follow-up* mit und ohne Polyneuropathie bei *Baseline*

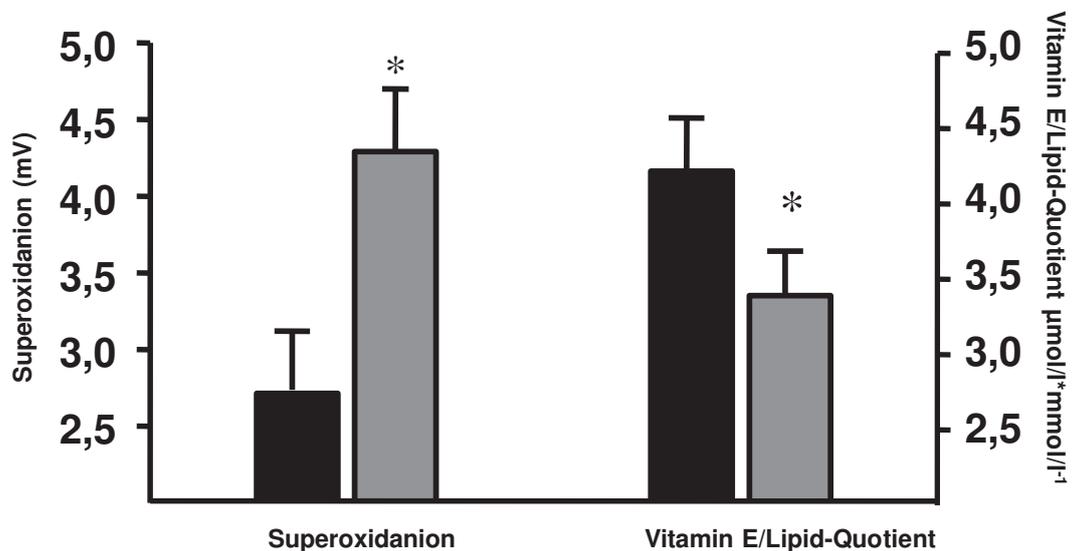


Abb.4:  ohne DSPN (n=31)
 mit DSPN (n=39)
*P<0.05 vs ohne DSPN

Abbildung 5 zeigt, dass die *lag time* der Peroxynitritproduktion bei Patienten mit DSPN gegenüber denen ohne DSPN signifikant verkürzt ist ($p < 0,05$). Beim Vitamin C sind die Werte der Diabetiker ohne DSPN numerisch höher als die der Diabetiker mit DSPN, jedoch ohne signifikanten Unterschied. Darüber hinaus ergaben sich keine Unterschiede zwischen der Gruppe mit und ohne DSPN hinsichtlich der Plasmakonzentrationen von 8-epi-PGF_{2α} und HOCl.

Abbildung 5: Peroxynitrit *lag time* und Vitamin C im Plasma im Plasma bei Diabetikern mit *Follow-up* mit und ohne Polyneuropathie bei *Baseline*

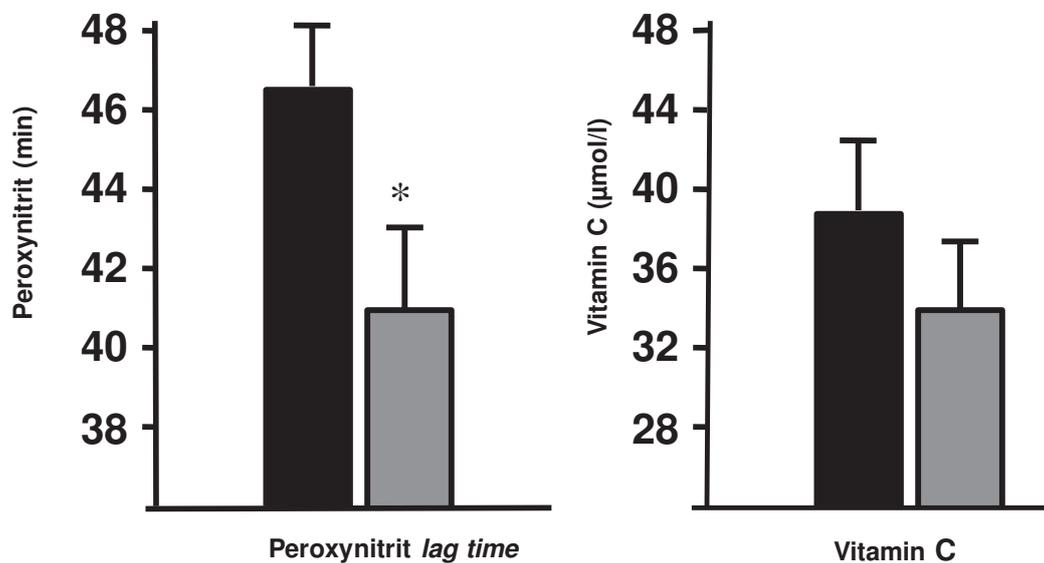


Abb.5:  ohne DSPN (n=31)

 mit DSPN (n=39)

* $P < 0.05$ vs ohne DSPN

5.2 Entwicklung bzw. Progression der Neuropathie

Signifikante Veränderungen in der *Follow-up*-Untersuchung gegenüber den *Baseline*-Daten ergaben sich für folgende Parameter:

- NLG des sensiblen N.medianus (Abbildung 6, Tabelle 2-4)
- NLG des motorischen N.peroneus (Abbildung 7, Tabelle 5)
- Malleolare VPT (Abbildung 8, Tabelle 6)
- Variationskoeffizient (VK) der Herzfrequenzvariabilität (Abbildung 9, Tabelle 7)
- 6-Jahres-Mortalität (Tabelle 8-10)

Im Folgenden sind die Ergebnisse der multivariaten Regressionsanalysen dargestellt.

5.2.1 NLG des sensiblen N.medianus

In Abbildung 6 sind der Verlauf der NLG des sensiblen N. medianus nach 6 Jahren gegenüber den *Baseline*-Werten und die Ausgangswerte der Verstorbenen dargestellt. Dabei zeigte sich eine signifikante Abnahme der NLG des sensiblen N.medianus nach sechs Jahren gegenüber den Ausgangswerten ($p < 0,05$). Die NLG des sensiblen N. medianus der Verstorbenen bei *Baseline* war im Vergleich zur *Follow-up*-Gruppe grenzwertig signifikant vermindert ($p = 0,067$).

Abbildung 6: Verlauf der sensiblen NLG des N. medianus nach 6 Jahren gegenüber *Baseline* und Ausgangswerte der Verstorbenen.

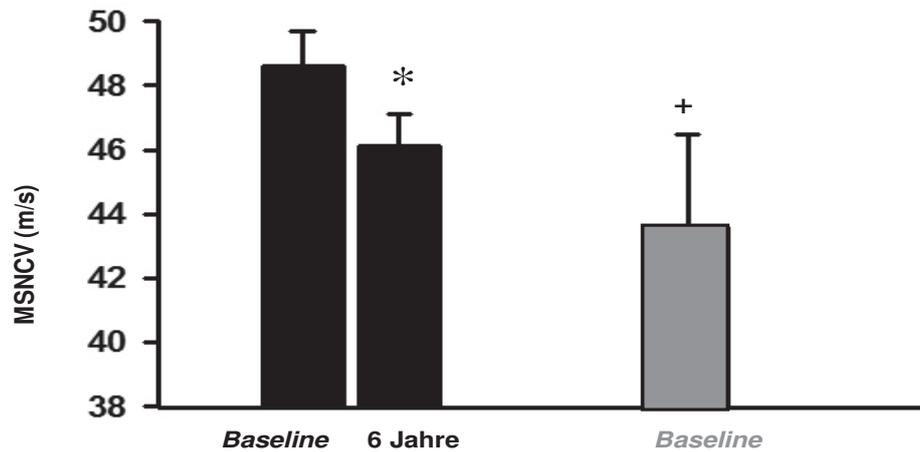


Abb.6:  6 J. *Follow-up* (n=69)

 Verstorbene (n=16)

*P<0.05 vs *Baseline*

+P<0.067 vs *Baseline*

Veränderung HbA1c: $-1.4 \pm 1.6\%$ (arithmetischer Mittelwert \pm SEM)

Tabelle 2 zeigt die multiple lineare Regressionsanalyse (Tabelle 2) für die Änderung der NLG des sensiblen N.medianus über 6 Jahre als abhängige Variable und Superoxidanion als unabhängige Variable, adjustiert um Alter, Geschlecht, BMI, Diabetesdauer und HbA1c. Erhöhte Werte der Superoxidanionproduktion im Plasma waren neben höherem BMI ein signifikanter Prädiktor für die Abnahme der NLG des sensiblen N.medianus ($p < 0,05$). Die übrigen Variablen waren nicht signifikant beteiligt.

Tabelle 2: Multiple lineare Regressionsanalyse für die Änderungen der NLG des sensiblen N.medianus über 6 Jahre.

	β	<i>P value</i>
Superoxidanion (mV)	-1.035	0.014
Alter (Jahre)	0.065	0.434
Geschlecht	-1.115	0.597
BMI (kg/m ²)	0.591	0.034
Diabetesdauer (Jahre)	0.034	0.789
HbA1c (%)	-0.975	0.173

$R^2 = 0.196$; $p = 0.045$ für Modell

Eine zusätzliche um arterielle Hypertonie sowie Änderungen des HbA1c und der Albuminurie adjustierte multiple lineare Regressionsanalyse für die Änderungen der NLG des sensiblen N.medianus über 6 Jahre zeigt Tabelle 3. Erhöhte Werte der Superoxidanionproduktion im Plasma blieben ein signifikanter Prädiktor für die Abnahme der NLG des sensiblen N.medianus ($p < 0,05$), während BMI nur grenzwertige Signifikanz erreichte ($p < 0,1$).

Tabelle 3: Multiple lineare Regressionsanalyse für die Änderungen der NLG des sensiblen N.medianus über 6 Jahre mit zusätzlicher Adjustierung um arterielle Hypertonie sowie Änderungen des HbA1c und der Albuminurie.

	β	<i>P value</i>
Superoxidanion (mV)	-0.997	0.036
Alter (Jahre)	0.018	0.864
Geschlecht	-0.899	0.716
BMI (kg/m ²)	0.553	0.075
Diabetesdauer (Jahre)	0.197	0.194
Delta-HbA1c (%)	-0.692	0.420
Delta-Albuminurie ($\mu\text{g}/\text{min}$)	-0.009	0.184
Hypertonus (Krankenakte)	3.290	0.252

$R^2 = 0.272$; $p = 0.068$ für Modell

Um festzustellen, ob ausschließlich Superoxidanion unter den Markern für oxidativen Stress als Prädiktor für die Änderungen der NLG des sensiblen N.medianus anzusehen ist, wurden in einem um Alter und BMI adjustierten Modell der Vitamin E/Lipid-Quotient und die *lag time* für Peroxynitritbildung als zusätzliche unabhängige Variablen analysiert (Tabelle 4). Auch in diesem Modell blieb Superoxidanion ein signifikanter Prädiktor für die Entwicklung bzw. Progression einer abnehmenden NLG des sensiblen N.medianus ($p < 0,05$).

Tabelle 4: Multivariates Modell für die Änderungen der NLG des sensiblen N.medianus mit Superoxidanion- und *lag time* für Peroxynitritbildung sowie dem Vitamin E/Lipid-Quotienten und Adjustierung um Alter und BMI.

	β	P value
Superoxidanion (mV)	-1.162	0.038
Vitamin E/Lipid-Quotient	-0.318	0.697
Peroxynitrit <i>lag time</i> (min)	0.030	0.806
Alter (Jahre)	0.058	0.488
BMI (kg/m ²)	0.475	0.080

5.2.2 Motorische NLG des N. peroneus

In Abbildung 7 sind der Verlauf der motorischen NLG des N. peroneus nach 6 Jahren gegenüber den *Baseline*-Werten und die Ausgangswerte der Verstorbenen dargestellt. Die motorische NLG des N. peroneus nahm nach 6 Jahren gegenüber den Ausgangswerten signifikant ab ($p < 0,05$). Die motorische NLG des N. peroneus der Verstorbenen bei *Baseline* war im Vergleich zur *Follow-up*-Gruppe grenzwertig signifikant vermindert ($p = 0,083$).

Abbildung 7: Verlauf der motorischen NLG des N. peroneus nach 6 Jahren gegenüber *Baseline* und Ausgangswerte der Verstorbenen.

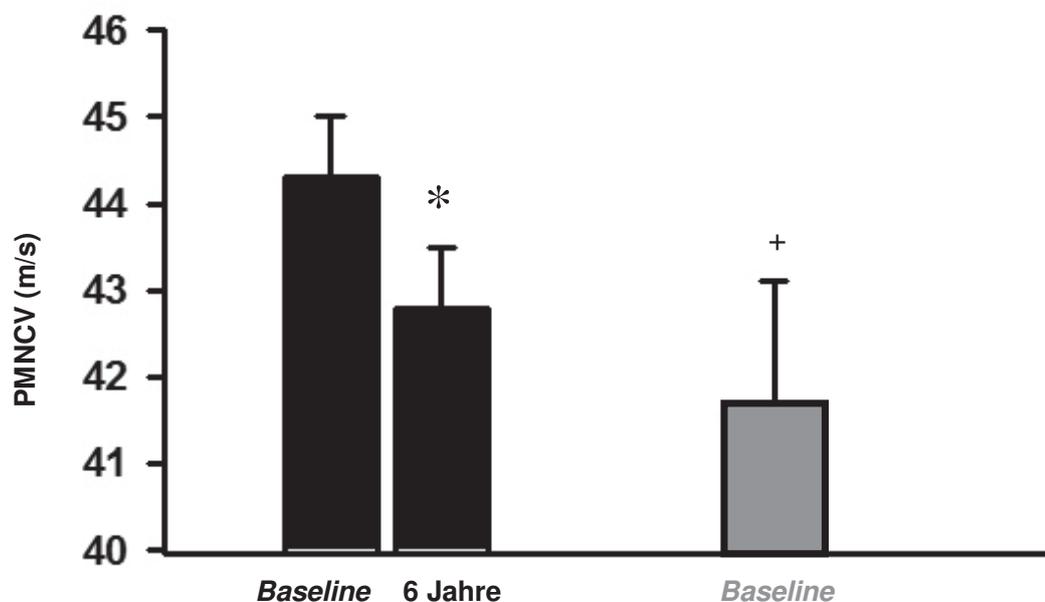


Abb.7: ■ 6 J. *Follow-up* (n=71)

■ Verstorbene (n=16)

*P < 0.05 vs *Baseline*

+P < 0.083 vs *Baseline*

Veränderung HbA1c: $-1.4 \pm 1.6\%$ (arithmetischer Mittelwert \pm SEM)

Tabelle 5 zeigt eine multiple lineare Regressionsanalyse für die Änderungen der motorischen NLG des N. peroneus über 6 Jahre als abhängige Variable und den Vitamin E/Lipid-Quotienten als unabhängige Variable, adjustiert um Alter, Geschlecht, BMI, Diabetesdauer und HbA1c. Ein niedriger Vitamin E/Lipid-Quotient war grenzwertig signifikant mit der Verlangsamung der motorischen NLG des N.peroneus assoziiert ($p=0,057$). Die übrigen Variablen lieferten keinen signifikanten Beitrag.

Tabelle 5: Multiple lineare Regressionsanalyse für die Änderungen der motorischen NLG des N. peroneus über 6 Jahre

	β	<i>P value</i>
Vitamin E/Lipid-Quotient	0.781	0.057
Alter (Jahre)	-0.049	0.281
Geschlecht	-0.530	0.655
BMI (kg/m ²)	0.123	0.428
Diabetesdauer (Jahre)	0.044	0.536
HbA1c (%)	0.483	0.266

$R^2 = 0.196$; $p = 0.045$ für Modell

5.2.3 Malleolare Vibrationsschwelle (VPT)

Abbildung 8 vergleicht die Änderungen der malleolaren VPT der *Follow-up*-Gruppe nach 6 Jahren mit ihren *Baseline*-Werten sowie die *Baseline*-Daten der Verstorbenen mit den *Baseline*-Daten der *Follow-up* Teilnehmer. Es zeigt sich bei diesem Vergleich eine signifikante Zunahme der VPT nach 6 Jahren ($p < 0,05$). Bei den Verstorbenen war die malleolare VPT im Vergleich zu den Überlebenden signifikant erhöht ($p < 0,05$).

Abbildung 8: Änderungen der malleolaren VPT der *Follow-up*-Gruppe nach 6 Jahren und *Baseline*-Daten der verstorbenen Gruppe.

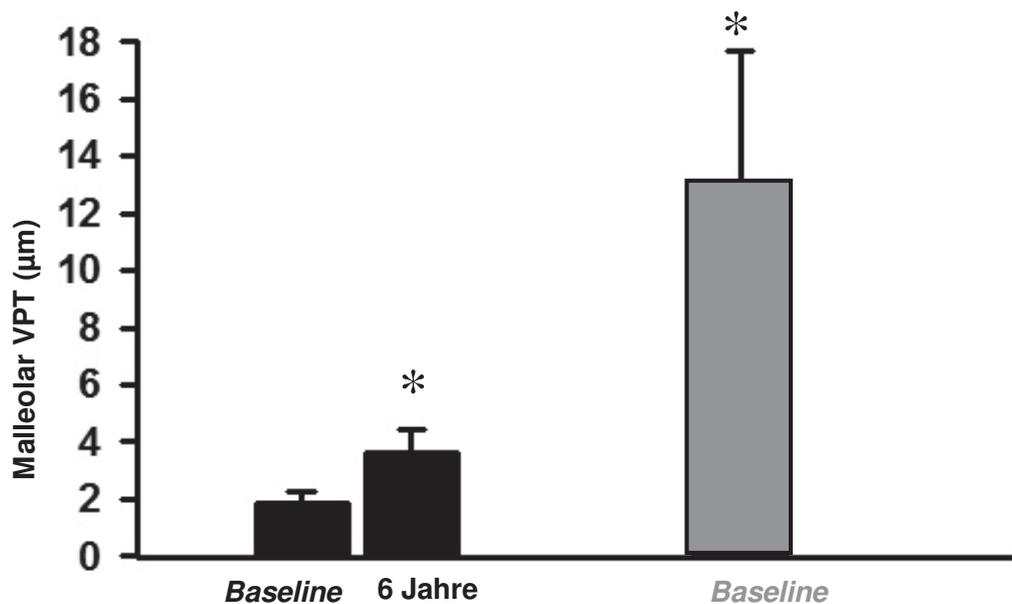


Abb.8: ■ 6 J. *Follow-up* (n=71)

■ Verstorbene (n=16)

* $P < 0.05$ vs *Baseline*

Veränderung HbA1c: $-1.4 \pm 1.6\%$ (arithmetischer Mittelwert \pm SEM)

Tabelle 6 zeigt eine multivariate Regressionsanalyse für die Änderungen der malleolaren VPT als abhängige Variable. Ein reduzierter Vitamin E/Lipid-Quotient war nach Adjustierung um Alter, Geschlecht und BMI ein grenzwertig signifikanter Prädiktor für eine zunehmende VPT ($p=0,077$).

Tabelle 6: Malleolare Vibrationswahrnehmungsschwelle

	β	<i>P value</i>
Vitamin E/Lipid-Quotient	-0.725	0.077
Alter (Jahre)	0.107	0.019
Geschlecht	0.211	0.863
BMI (kg/m ²)	0.033	0.818

$R^2 = 0.150$; $p = 0.037$ für Modell

5.2.4 Variationskoeffizient (VK) der Herzfrequenzvariabilität

Abbildung 9 zeigt die Entwicklung der Herzfrequenzvariabilität in Ruhe in der Gruppe mit *Follow-up* über 6 Jahre sowie die *Baseline*-Daten der Verstorbenen. Der VK nahm innerhalb von 6 Jahren ab, jedoch nicht signifikant. Der VK bei *Baseline* der Verstorbenen ist im Vergleich zu den *Baseline*-Daten der *Follow-up*-Teilnehmer niedriger, jedoch ebenfalls nicht statistisch signifikant.

Abbildung 9: Entwicklung der Herzfrequenzvariabilität in Ruhe in der Gruppe mit *Follow-up* über 6 Jahre und *Baseline*-Daten der Verstorbenen

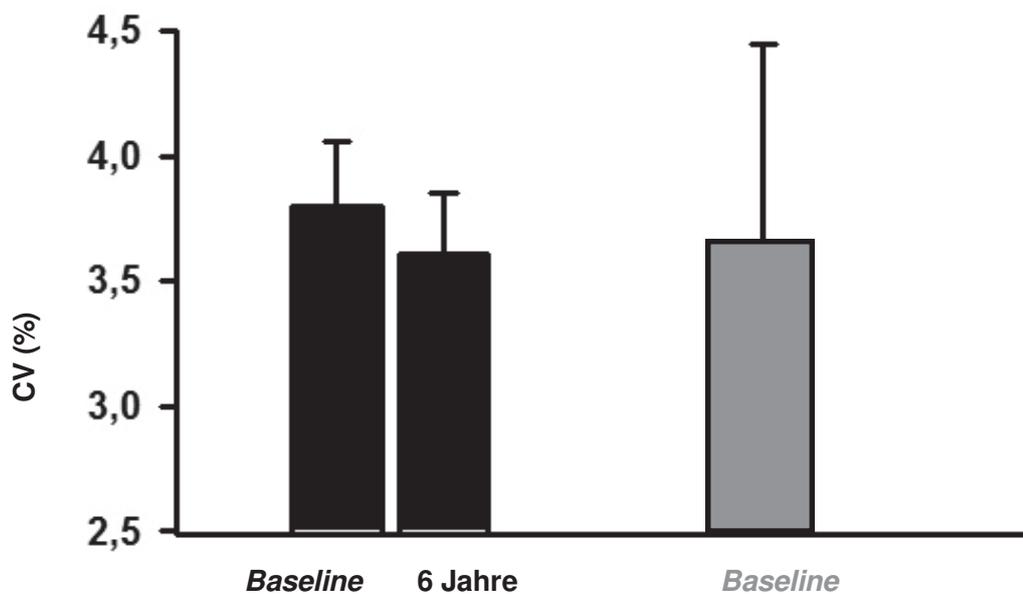


Abb.9:  6 J. *Follow-up* (n=67)

 Verstorbene (n=17)

Veränderung HbA1c: $-1.4 \pm 1.6\%$ (arithmetischer Mittelwert \pm SEM)

In Tabelle 7 wurde in einer binär logistischen Regressionsanalyse die 1. Quartile des VK der HRV in Ruhe der 2. bis 4. Quartile gegenübergestellt, adjustiert um Alter, Geschlecht, BMI und Diabetesdauer sowie um die Veränderungen des HbA1c und der Albuminurie über 6 Jahre, Albuminurie bei *Baseline* und Hypertonie. Superoxidanion war ein signifikanter Prädiktor für die Änderungen des VK ($p < 0,05$).

Tabelle 7: Binär logistische Regressionsanalyse für die 1. Quartile vs. 2.-4. Quartile der Änderungen des VK der HRV über 6 Jahre als abhängige Variable.

	OR (95% CI)	P value
Superoxidanion (mV)	1.63 (1.09-2.44)	0.017
Alter (Jahre)	0.89 (0.80-0.99)	0.032
Männliches Geschlecht	13.605 (1.38-134.11)	0.025
BMI (kg/m ²)	1.00 (0.75-1.31)	0.973
Diabetesdauer (Jahre)	1.03 (0.91-1.15)	0.678
Änderungen des HbA1c (%)	1.78 (0.80-3.93)	0.158
Albuminurie (µg/min)	0.99 (0.97-1.00)	0.329
Änderungen der Albuminurie (µg/min)	1.00 (0.99-1.01)	0.949
Hypertonus (mmHg)	3.58 (0.33-38.43)	0.293

5.2.5 6-Jahres-Mortalität

Die Tabelle 8 vergleicht die Werte der Marker für oxidativen Stress bei *Baseline* der Teilnehmer am *Follow-up* mit denen der Verstorbenen. Superoxidanion war der einzige Marker, der bei den Verstorbenen signifikant höher war ($p < 0,05$). Der Vitamin E/Lipid-Quotient ist bei den Verstorbenen grenzwertig signifikant reduziert ($p = 0,070$). Die übrigen Plasmamarker für oxidativen Stress sind zwischen den Gruppen nicht signifikant verschieden.

Tabelle 8: Biomarker für oxidativen Stress und Mortalität

	<i>Follow-up</i> komplett (n=72)	Verstorbene (n=17)	<i>P value</i>
Superoxidanion (mV)	3.56±2.58	5.45±3.73	0.021
Peroxynitrit <i>lag time</i> (min)	43.3±10.7	40.0±11.7	0.289
HOCl (mV)	3.81±3.31	5.00±3.57	0.219
8-iso-PGF _{2α} (nmol/l)	1.16±1.33	0.92±0.57	0.514
Vitamin E/Lipid-Quotient	3.73±1.52	2.94±1.17	0.070
Vitamin C (μmol/l)	36.5±16.0	37.9±15.4	0.764

Tabelle 9 zeigt eine Cox proportionale Regressionsanalyse zur Mortalität, die zur Modellierung von Überlebenszeiten benutzt wird. Die 4. Quartile (hohes) Superoxidanion, Alter, Geschlecht, BMI, HbA1c, Diabetesdauer und –typ wurden dabei als Einflussfaktoren untersucht. Es ergab sich, dass neben höherem Alter erhöhte Werte der Superoxidanionproduktion signifikante Prädiktoren für die Sterblichkeit innerhalb von 6 Jahren darstellen ($p < 0,05$).

Tabelle 9: Cox proportionale Regressionsanalyse zur Mortalität über 6 Jahre.

	HR (95% CI)	P value
Superoxidanion (4. Quartile)	8.97 (1.92-41.95)	0.005
Alter (Jahre)	1.14 (1.03-1.27)	0.012
Geschlecht	1.08 (0.31-3.72)	0.907
BMI (kg/m ²)	1.01 (0.87-1.20)	0.884
HbA1c (%)	1.24 (0.85-1.81)	0.265
Diabetesdauer (Jahre)	1.07 (0.99-1.16)	0.103
Typ 1/Typ 2 Diabetes	0.18 (0.01-3.64)	0.261

In Tabelle 10 wurden ergänzend zu Tabelle 9 die Einflussfaktoren Hypertonie, die 1. Quartile (niedriges) Vitamin E, die 1. Quartile (kurze) Peroxynitrit *lag time* und die 4. Quartile (hohes) HOCl hinzugefügt. Auch nach dieser Adjustierung waren ein hohes Superoxidanion sowie das Alter signifikante Prädiktoren für die 6-Jahres-Mortalität ($p < 0,05$). In diesem Modell war die Albuminurie als ebenfalls ein prognostischer Faktor ($p < 0,05$). Die übrigen Einflussfaktoren zeigten keinen signifikanten Zusammenhang zur 6-Jahres-Mortalität.

Tabelle 10: Cox proportionale Regressionsanalyse zur Mortalität über 6 Jahre nach Adjustierung um die verschiedenen Marker für oxidativen Stress.

	HR (95% CI)	P value
Superoxidanion (4. Quartile)	23.20 (1.05-513)	0.047
Vitamin E (1. Quartile)	0.27 (0.02-3.75)	0.329
Peroxynitrit <i>lag time</i> (1. Quartile)	6.00 (0.43-84.46)	0.184
HOCl (4. Quartile)	0.19 (0.01-2.76)	0.224
Alter (Jahre)	1.14 (1.01-1.28)	0.030
Geschlecht	0.27 (0.03-2.52)	0.252
BMI	1.07 (0.85-1.36)	0.561
HbA1c (%)	1.73 (0.84-3.53)	0.135
Diabetesdauer (Jahre)	1.14 (0.96-1.35)	0.126
Hypertonus (mmHg)	0.29 (0.03-2.76)	0.280
Albuminurie ($\mu\text{g}/\text{min}$)	1.01 (1.00-1.01)	0.035

6 Diskussion

Die Ergebnisse dieser prospektiven Studie zeigen erstmalig, dass eine Assoziation zwischen einer gesteigerten Superoxidanionproduktion im Plasma und der Entwicklung bzw. Progression der diabetischen Neuropathie besteht. Eine erhöhte Superoxidanionproduktion bei Diabetikern war sowohl ein Prädiktor für die Abnahme der sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit des N.medianus als auch für die Abnahme der Herzfrequenzvariabilität in Ruhe innerhalb von 6 Jahren. Darüber hinaus stellte die Überproduktion von Superoxidanion einen Prädiktor für die 6-Jahres-Mortalität dar. Andere Biomarker des oxidativen Stresses zeigten nur grenzwertig signifikante Trends zur Prädiktion von Veränderungen der Nervenfunktion. So war die Abnahme der motorischen NLG des N.peroneus und Zunahme der VPT grenzwertig signifikant mit initial niedrigem Vitamin E/Lipid-Quotienten assoziiert.

Um festzustellen, ob die Entwicklung bzw. Progression der diabetischen Neuropathie von Parametern des oxidativen Stresses abhängig ist, wurde eine Quantifizierung der peripheren und kardialen autonomen Nervenfunktion durch detaillierte quantitative neurophysiologische Testverfahren vorgenommen. Die Biomarker für oxidativen Stress wurden allerdings nur bei *Baseline* bestimmt, so dass eine Regressionsanalyse der zeitlichen Veränderungen dieser Marker und denen der Nervenfunktion nicht möglich war. Wir sind jedoch der Auffassung, dass die einmalige initiale Messung eine valide Aussage zum prädiktiven Wert des oxidativen Stresses hinsichtlich der Progression der verschiedenen Nervenfunktionsstörungen erlaubt.

6.1 Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$)

Die Ergebnisse dieser Studie stehen im Einklang mit der Schlüsselrolle des Superoxidanions in der Entstehungskaskade der biochemischen Mechanismen der diabetischen mikrovaskulären Komplikationen einschließlich der experimentellen Neuropathie. Diesen vier postulierten Mechanismen (erhöhter Umsatz im Polyolstoffwechsel, Hexosaminstoffwechselweg, Proteinkinase C Stoffwechselweg und der AGE) geht die Hyperglykämie-induzierte Erhöhung des in Mitochondrien produzierten Superoxidanions voran [184]. Die mitochondriale Überproduktion von

Superoxidanion induziert demnach oxidativen Stress und damit offensichtlich auch die diabetischen mikrovaskulären Komplikationen wie die Neuropathie.

Überschüssiges Superoxid leitet vorgeschaltete Metaboliten der Glykolyse in Wege der Glykose-Überschussnutzung, indem die Glyceraldehyd-Dehydrogenase (GAPDH) gehemmt wird. Diese Hemmung führt zu einer Aktivierung der Protein-Kinase C (PKC) bei erhöhtem Fluss von Dihydroxyacetonphosphat (DHAP) zu Diacylglycerol (DAG) und zu erhöhtem Fluss von Triosephosphat zu Methylglyoxal, dem vorrangigen intrazellulären AGE-Vorläufer. Außerdem wird die Modifikation von Proteinen durch O-glykosidisch verknüpftes N-Acetylglucosamin (GlcNAc) initiiert durch erhöhten Fluss von Fructose-6-Phosphat zu UDP-N-Acetylglucosamin, während erhöhter Glucosefluss durch den Polyol-Pathway NADPH verbraucht und GSH aufbraucht [184]. Dieses Konzept ließ sich dadurch bestätigen, dass gezeigt werden konnte, dass 1.) Hyperglykämie-induzierte Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies durch Überexpression der mitochondrialen Mangan-Superoxid-Dismutase (MnSOD) verhindert wird, welche die Disproportionierung von Superoxid in Sauerstoff und Peroxid katalysiert und 2.) eine Hemmung der Hyperglykämie-induzierten Überproduktion von mitochondrialem Superoxid durch MnSOD komplett die Aktivierung der vier genannten Mechanismen für mikrovaskuläre Schäden verhindert [184]. Experimentelle Studien bei diabetischer Neuropathie unterstützen dieses Konzept, indem sie zeigen, dass die Aktivität der Cu/Zn-Superoxid-Dismutase (SOD1) im Ischiasnerv von Streptozotocin (STZ)-behandelten diabetischen Ratten erniedrigt ist [185]. Außerdem zeigen epineurale Arteriolen, die den Ischiasnerv von STZ-behandelten diabetischen Ratten versorgen, erhöhte Konzentrationen an mitochondrialem Superoxid [186]. Darüber hinaus wurde berichtet, dass eine verminderte Expression von MnSOD in den Spinalganglien von STZ-behandelten diabetischen Ratten zu einer Verminderung der antioxidativen Abwehr führt und eine Verminderung des axonalen Wachstums und eine dystrophe Nervenstruktur auslösen oder verschlimmern könnte [187]. Spinalganglien von SOD 1 *Knockout*-Mäusen haben eine ausgeprägte axonale Degeneration gezeigt, die durch die Gabe von SOD 1 verhindert wurde. Ferner verursacht oxidativer Stress, der durch Superoxid-erzeugende Pflanzenschutzgifte induziert wird, eine dosisabhängige axonale Degeneration, was darauf hinweist, dass eine erhöhte Anfälligkeit von Spinalganglienaxonen gegenüber oxidativem Stress auf einen Verlust von SOD 1

oder erhöhte Superoxidproduktion zurückzuführen ist [188]. Diese Nervenveränderungen konnten durch antioxidative Behandlung verhindert werden [187, 188]. In einer experimentellen Studie, in der eine Protein-Transduktionstechnologie eingesetzt wurde, um die Abgabe von exogenen Proteinen in lebende Zellen zu ermöglichen, führte eine einzelne intraperitoneale Injektion von Tat-SOD bei Typ 2 diabetischen Ratten zu verbesserten Radikalfänger-Eigenschaften und abnehmender Apoptose. Eine längerfristige Behandlung verbesserte die Myelinisierung von Ischiasnerven und verzögerte die Entwicklung einer Neuropathie [189].

In Übereinstimmung mit den experimentellen Daten war erhöhtes Superoxid im Plasma der einzige Biomarker für oxidativen Stress, der in der aktuellen Studie signifikant die Progression der DSPN und kardialen autonomen Dysfunktion und sogar der Gesamtmortalität vorhersagte.

6.2 Vitamin E

Vitamin E schützt Gewebe und biologische Flüssigkeiten vor einer Schädigung durch freie Radikale. Es stellt damit ein wichtiges lipidlösliches, kettenbrechendes Antioxidans dar [190, 191]. Nerven von diabetischen Ratten zeigen eine geringere Menge an Vitamin E im Vergleich zu Kontrolltieren [192].

Initial war bei den Teilnehmern mit gegenüber denen ohne Polyneuropathie ein signifikant reduzierter Vitamin E/Lipid-Quotient zu beobachten. Dies ist im Einklang mit einer Studie, in der sich im Vergleich mit einem Kontrollkollektiv eine Abnahme des Vitamin E-Gehalts bei Typ 2 Diabetikern ergab [193]. Obwohl wir zuvor erniedrigte Level des Vitamin E/Lipid-Quotienten bei Patienten mit DSPN gefunden haben [170], war die systemische Konzentration an Vitamin E nur ein schwacher Prädiktor für die Progression der Neuropathie über 6 Jahre.

Im Vergleich mit dem Superoxidanion war der Vitamin E/Lipid-Quotient ein deutlich schwächerer Prädiktor für Veränderungen der motorischen NLG des N. peroneus und der malleolaren Vibrationswahrnehmungsschwelle mit lediglich grenzwertig signifikanten Trends. Dies bestätigte sich in den multivariaten Modellen, in denen neben dem Superoxidanion die weiteren Marker für oxidativen Stress mit eingeschlossen wurden. Lediglich Superoxid war hierbei eine signifikante

unabhängige Determinante für die abnehmende Nervenfunktion, jedoch nicht Vitamin E und die übrigen Biomarker.

6.3 Vitamin C

Das Antioxidans Vitamin C ist ein potenter Fänger von Superoxidanion ($O_2^{\cdot-}$), hypochloriger Säure (HOCl), Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}), Stickstoffdioxid (NO_2^{\cdot}) und Thiolradikalen. Daher ist Vitamin C auch ein wichtiger Bestandteil des antioxidativen Systems, das auch Vitamin E und Glutathion beinhaltet [194, 195]. Vitamin C wird bei der Abgabe eines Wasserstoffatoms an das Vitamin E-Radikal selbst in ein Radikal (Ascorbylradikal) umgewandelt. Mit Hilfe von Glutathion kann dieses Radikal dann wieder enzymatisch in das wieder antioxidativ wirksame Vitamin C zurückverwandelt werden.

Im Gegensatz zu Vitamin E ließ sich für Vitamin C prospektiv keine Assoziation zur Änderung der peripheren und autonomen Nervenfunktion nachweisen. Dies könnte damit zusammenhängen, dass Vitamin C auf die Anwesenheit von Glutathion angewiesen ist, um in das antioxidativ wirksame Vitamin C verwandelt zu werden [195]. Weiterhin kommt dem Vitamin C als Radikalfänger eher eine passive Rolle im antioxidativen System zu, wohingegen Vitamin E als schützendem Antioxidans vor Schädigung durch freie Radikale eine aktivere Rolle zukommt [191].

Allerdings hat eine Studie zur Beurteilung des Effektes von Yoga über 3 Monate auf Anthropometrie, Blutdruck, Blutzucker und oxidativen Stress bei Typ 2 Diabetikern ergeben, dass im Vergleich zur Regelversorgung ohne Yoga, Yoga einen signifikanten Anstieg von Glutathion und Vitamin C zur Folge hatte. Weiterhin kam es durch Yoga zu einer Reduktion des BMI, des Blutzuckers und des Malondialdehyd. Es gab keine Unterschiede im Taillenumfang, im Taillen-Hüft-Quotienten, Blutdruck, Vitamin E oder Superoxid-Dismutase in der Yoga-Gruppe beim *Follow-up*. Die Schlussfolgerung dieser Studie war, dass Yoga als effektive Therapie in der Reduktion von oxidativem Stress bei Typ 2 Diabetikern eingesetzt werden kann. Yoga zusätzlich zur Regelversorgung hilft bei der Reduktion des BMI und verbessert die Blutzuckerwerte bei Typ 2 Diabetikern [196].

6.4 8-epi-PGF_{2α}

Die Lipidperoxidation einer Probe wird durch die Messung des F₂-Isoprostans 8-epi-PGF_{2α} im Plasma erfasst. Diese Lipidperoxidation zeigte sich in mehreren Studien bei Diabetikern erhöht [197-200]. F₂-Isoprostane werden durch die Wirkung der Phospholipase A₂ freigesetzt, nachdem sie während der Peroxidation der Arachidonsäure durch einen vom Cyclooxygenase-Stoffwechsel unabhängigen Mechanismus entstehen, in dem Arachidonsäure mittels einer Esterbindung an Phospholipide gebunden wird. Das Hauptprodukt der Lipidperoxidation stellt das biologisch aktive F₂-Isoprostans 8-epi-PGF_{2α} dar [201].

Die erhöhte Lipidperoxidation wird als Schlüsselmechanismus für die Entwicklung der Arteriosklerose und inflammatorischen Gefäßschäden angesehen [96, 202]. Es kann z.B. die Aktivität von Antithrombin III eingeschränkt, die Koagulation gefördert, die Thrombozytenaggregation verstärkt und Gefäßreaktionen moduliert werden [203]. In der vorliegenden Studie war 8-epi-PGF_{2α} allerdings nicht mit der Entwicklung oder Progression der diabetischen Neuropathie assoziiert. Frühere Studien konnten signifikant erhöhte Plasmakonzentrationen von 8-epi-PGF_{2α} bei verschiedenen Gruppen von Diabetikern nachweisen [204, 205]. Allerdings handelte es sich hierbei ausschließlich um Querschnittsstudien, die aus diesem Grund keine Prädiktion bezüglich der diabetischen Komplikationen erlauben. Darüber hinaus wurden die Patienten in diesen Studien nicht nach dem Vorhandensein oder Fehlen der DSPN stratifiziert.

6.5 Peroxynitrit (ONOO⁻)

Bei Diabetikern mit Polyneuropathie fanden wir im Vergleich zu denen ohne DSPN eine signifikant verkürzte *lag time* für Peroxynitritproduktion. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Daten anderer Studien, die zeigen, dass der aus der Überproduktion von Peroxynitrit resultierende nitrosative Stress durch stickstoffhaltige Moleküle bei Patienten mit Diabetes erhöht ist [206-208].

In der vorliegenden Studie war eine verkürzte *lag time* für Peroxynitritproduktion im Plasma nicht mit der Entwicklung bzw. Progression der diabetischen Neuropathie assoziiert. Dies steht offensichtlich im Gegensatz zu einer Studie über 3 Jahre von Hoeldtke et al. [207] bei Typ 1 Diabetikern mit kurzer Diabetesdauer. Diese Studie umfasste 37 Patienten, bei denen kürzlich ein Typ 1 Diabetes diagnostiziert wurde

[208-211]. Gemessen wurden Malondialdehyd (MDA) Ausscheidung im Urin als Marker für Lipidperoxidation und Plasmanitrit und -nitrat als Marker für nitrosativen Stress [209-211]. Allerdings war die MDA-Ausscheidung nach 3 Jahren nur bei Frauen, jedoch nicht bei Männern mit Diabetes erhöht [209]. Oxidativer DNA-Schaden, der durch 8-Hydroxydeoxyguanosin-Ausscheidung quantifiziert wurde, konnte nicht festgestellt werden [210]. Da in der Kohorte von Hoeldtke et al. [208-211] Patienten mit neuropathischen Symptomen ausgeschlossen wurden und keine multivariate Analyse erfolgte, konnte diese Studie nicht die Frage beantworten, ob oxidativer Stress ein Prädiktor für die diabetische Neuropathie ist.

In einer neueren Studie zur Frage der Assoziation zwischen DSPN und oxidativem Stress zeigte sich, dass Patienten mit DSPN eine Erhöhung des glykosylierten Hämoglobins (HbA1c), des Malondialdehyds (MDA), des Nitrat/Nitrit (NOx), der γ -Glutamyl-Transferase (GGT), des Coeruloplasmin (Cp), der totalen antioxidativen Kapazität (TAC), des Homocysteins (Hcy) und des Endothelin-1 (ET-1) aufwiesen. Zusammenfassend wurde aus den Ergebnissen geschlossen, dass Biomarkern für oxidativen Stress und vaskulären Risikofaktoren eine Bedeutung in der Pathogenese der DSPN zukommen könnte [212].

6.6 HOCl

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, handelt es sich bei HOCl um ein proinflammatorisches Oxidans, das bei der Gewebeschädigung von entscheidender Bedeutung ist. In der vorliegenden Studie ergab sich hinsichtlich der Plasmakonzentration von HOCl kein Unterschied zwischen der Gruppe mit und ohne DSPN. Aus der vorangegangenen Querschnittsstudie wurde gefolgert, dass die autonome Neuropathie mit einer gesteigerten Inflammation einhergeht bzw. HOCl spezifisch eine endotheliale Dysfunktion bei KADN anzeigt [170]. Die prospektiven Daten konnten diese Vermutung jedoch nicht bestätigen.

6.7 Andere Biomarker für oxidativen Stress

In einer Querschnittsstudie wurden bei Diabetikern mit bzw. ohne DSPN der totale oxidative Status (TOS), die totale antioxidative Kapazität (TAC) im Serum, der oxidative Stress-Index (OSI) und die Aktivität von Prolidase durch neue automatisierte Methoden bestimmt. Bei Prolidase handelt es sich um eine

zytosolische Exopeptidase, die vor allem zur Erhaltung von Kollagen dient. Dabei ist die Prolidase für die Wiederverwertung von Prolin bei der Kollagen-Synthese verantwortlich sowie für das Zellwachstum. Die TAC-Konzentration war niedriger, während die Konzentrationen von TOS und OSI sowie die Prolidase-Aktivität bei Diabetikern mit und ohne Neuropathie im Vergleich zu den gesunden Teilnehmern höher waren. Die Prolidase-Aktivität war in der Gruppe der Patienten mit DSPN höher als in der Gruppe der Diabetiker ohne DSPN [213, 214].

In einer weiteren Studie wurden die Parameter Serumprolidaseaktivität, NO, TAS und MDA bei Personen mit diabetischer Neuropathie sowie Kontrollpersonen gemessen. Es zeigte sich, dass die Serum MDA und NO Spiegel bei Diabetikern signifikant höher waren als bei den Kontrollpersonen. Serumprolidase und TAS waren bei Diabetikern erniedrigt. Damit ist diese Studie die erste, die eine erniedrigte Prolidasaktivität bei Diabetikern nachweist, die mit erhöhten NO Spiegeln verbunden zu sein scheint. Diese Ergebnisse weisen auf einen erniedrigten Kollagenumsatz bei Diabetikern mit erhöhtem oxidativen Stress und erhöhten NO-Spiegeln hin [215].

In einer weiteren Querschnittsstudie wurden die antioxidative Kapazität von antioxidativen Enzymen (Katalase [CAT], Superoxiddismutase [SOD], Glutathionperoxidase [GPX]) und die totale antioxidative Kapazität (TAC) bei Patienten mit Typ 2 Diabetes mit bzw. ohne DSPN untersucht. Mit dem alkalischen *Comet Assay* wurde das Ausmaß der DNA-Schädigung von oxidierten Purinen und oxidierten Pyrimidinen bestimmt. Es wurde eine signifikante Abnahme der SOD und GPX, jedoch nicht der CAT und TAC bei Typ 2 Diabetikern mit DSPN im Vergleich zu denen ohne DSPN und den Kontrollpersonen gefunden. Typ 2 Diabetiker mit und ohne DSPN zeigten im Vergleich zu den Kontrollpersonen eine signifikant niedrigere Plasmakonzentration von Distickstoffoxid. Die Konzentration von oxidativen DNA-Schäden bei Typ 2 Diabetikern mit DSPN war signifikant höher sowohl im Vergleich zu den Kontrollen als auch zu den Typ 2 Diabetikern ohne DSPN. Darüber hinaus waren Lymphozyten von Typ 2 Diabetikern mit DSPN anfälliger für oxidative DNA-Schäden durch Wasserstoffperoxid als die von Typ 2 Diabetikern ohne DSPN [216].

In einer Studie aus unserer Arbeitsgruppe wurde bei kürzlich diagnostizierten Typ 2 Diabetikern die subepidermale SOD2-Fläche mittels Hautbiopsien immunhistochemisch untersucht sowie die periphere Nervenfunktion und die Herzfrequenzvariabilität bestimmt. Die antioxidative Abwehr der Haut war in

Beziehung zur Diabetesdauer erhöht und mit einer sympathovagalen Imbalance in Richtung einer sympathischen Prädominanz verbunden. Subepidermale SOD2 war im distalen Bein von Diabetikern im Vergleich zur Kontrollgruppe durchschnittlich um 60% erhöht. Ein endothelialer Zellschaden konnte anhand Anti-CD31-Markierung nicht nachgewiesen werden [217].

Kürzlich publizierte experimentelle und klinische Daten legen weiterhin eine enge Verbindung zwischen diabetischer Neuropathie und oxidativem Stress nahe.

Zwei kürzlich publizierte Studien untersuchten die Effekte der Verbesserung der Diabeteseinstellung auf Parameter des oxidativen, nitrosativen und Carbonyl-Stress. In der ersten Studie bei 20 adipösen Typ 2 Diabetikern führte eine Roux-Y-Magenbypass-Operation nach 12 Monaten zu einer Verbesserung des NDS und zu einer Abnahme von Nitrotyrosin, Carboxymethyl-Lysin und Methylglyoxal. Die Verbesserung des NDS nach 12 Monaten korrelierte mit der Abnahme von Nitrotyrosin und Methylglyoxal, jedoch nicht mit der Senkung des HbA1c-Wertes. Somit ließ sich eine Verbindung zwischen einer Verbesserung des oxidativen, nitrosativen und Carbonyl-Stress herstellen. Einschränkend ist hier allerdings ein unkontrolliertes Studiendesign anzumerken [218]. Hingegen ließen sich bei 54 kürzlich diagnostizierten Diabetikern verschiedene Parameter für oxidativen Stress als kombinierter Endpunkt durch eine Optimierung der Diabeteseinstellung nach 8 Wochen in Beziehung zur Zunahme der β -Zellfunktion und Abnahme der Insulinresistenz verbessern [219]. Weitere prospektive Studien sind erforderlich, um zu klären, inwieweit verschiedene Interventionen zur Verbesserung der Diabeteseinstellung und des kardiovaskulären Risikoprofils durch langfristige Minderung des oxidativen Stresses zur Prävention von diabetischen Komplikationen einschließlich Neuropathie beitragen.

6.8 Limitierungen der Studie

Eine Einschränkung der Aussagekraft der vorliegenden Studie ist in der insgesamt relativ geringen Patientenzahl zu sehen. Dadurch kann das Auftreten von Typ II-Fehlern nicht vollständig ausgeschlossen werden. Eine weitere Limitierung ist die lediglich einmalige Messung der Marker für oxidativen Stress bei *Baseline* sowie die fehlende Information über den Verlauf der Diabeteseinstellung innerhalb der 6 Jahre zwischen *Baseline* und *Follow-up*. Es ist denkbar, dass eine erneute Messung der

Marker für oxidativen Stress und eine mögliche Veränderung dieser Werte über die Zeit das Hauptergebnis dieser Studie verstärkt hätten.

Eine weitere Limitierung dieser Studie ist die Messung von Markern für oxidativen Stress im Plasma statt in Nervengewebe. Daher müssen die Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden, da wir die Möglichkeit nicht ausschließen können, dass die Plasmakonzentrationen nicht adäquat die Situation im Nerven widerspiegeln. Dieses Problem könnte theoretisch mit einer Nervenbiopsie-Studie angegangen werden, die jedoch aus ethischen Gründen kaum durchführbar wäre. Interessanterweise zeigte eine tierexperimentelle Studie, dass systemisch nachgewiesener oxidativer Stress zu einer ausgeprägteren Nervendysfunktion führte als lokaler endoneuraler oxidativer Stress [220].

6.9 Schlussfolgerungen

Eine gesteigerte Produktion von Superoxid im Plasma bei Diabetikern ist ein Prädiktor für die Verschlechterung der sensiblen NLG und der kardialen autonomen Nervenfunktion sowie für erhöhtes Mortalitätsrisiko über einen Zeitraum von 6 Jahren. Die Vorhersagekraft der übrigen untersuchten Marker war entweder wie für Vitamin E deutlich schwächer oder wie für die restlichen Biomarker klinisch nicht relevant.

Diese Daten könnten die Grundlage für eine verbesserte Patientenselektion bei zukünftigen klinischen Studien bilden, in denen Antioxidantien im Hinblick auf ihre Wirksamkeit in der Prävention oder Therapie der diabetischen Neuropathie untersucht werden. Es ist denkbar, dass Patienten, die eine deutlich erhöhte Superoxidanionproduktion im Plasma aufweisen, von einer Therapie mit Antioxidantien besonders profitieren könnten. Weitere prospektive Studien sollten den prädiktiven Wert von Biomarkern für oxidativen Stress bestätigen.

7 Zusammenfassung

Fragestellung: Oxidativer Stress wird durch gesteigerte Bildung freier Radikale und/oder einen Defekt der antioxidativen Abwehr hervorgerufen. Obwohl er eine wichtige Rolle in der Pathogenese der experimentellen diabetischen Neuropathie spielt, fehlen bislang diesbezügliche prospektive klinische Studien. Ziel dieser Studie über 6 Jahre war es daher festzustellen, ob Plasma-Marker für oxidativen Stress Prädiktoren der Entwicklung bzw. Progression der diabetischen Polyneuropathie und kardialen autonomen Neuropathie sowie der Mortalität sind.

Patienten und Methoden: Wir untersuchten 89 Diabetiker (Alter: 54 ± 14 Jahre, Diabetesdauer: 12 ± 10 Jahre, HbA1c: $9.4 \pm 1.7\%$, 54% Männer, 69% Typ 2 Diabetes, 59% mit Polyneuropathie), von denen 72 nach 6.2 ± 0.8 Jahren nachuntersucht werden konnten, während 17 Patienten nach durchschnittlich 4.2 ± 1.0 Jahren verstarben. Initial wurden folgende Marker für oxidativen Stress im Plasma gemessen: Produktion des Superoxidanions und hypochloriger Säure, *lag time* bis zur Oxidation von Peroxynitrit, 8-Iso-Prostaglandin F₂ α , Vitamin E/Lipid-Quotient und Vitamin C. Die periphere bzw. kardiale autonome Nervenfunktion wurde klinisch durch neuropathische Symptome und Defizite sowie quantitativ durch Messung der motorischen und sensiblen Nervenleitgeschwindigkeit (NLG), Vibrationswahrnehmungsschwellen (VPT), Temperaturwahrnehmungsschwellen (TPT) bzw. Herzfrequenzvariabilität (HRV) erfasst.

Ergebnisse: Trotz einer Verbesserung des HbA1c um $-1.4 \pm 1.6\%$ ($p < 0.001$ vs *Baseline*), verschlechterten sich nach 6 Jahren die sensible NLG des N. medianus und N. suralis, motorische NLG des N. peroneus, malleolare VPT sowie TPT für Warmreize (alle $p < 0.05$). Multivariate Regressionsanalysen zeigten, dass eine gesteigerte Generierung von Superoxid im Plasma mit einer Abnahme der sensiblen NLG des N. medianus ($p = 0.036$) und der HRV in Ruhe ($p = 0.017$) nach 6 Jahren assoziiert war. Ein niedriger Vitamin E/Lipid-Quotient war grenzwertig mit der Abnahme der motorischen NLG des N. peroneus ($p = 0.057$) und Zunahme der malleolaren VPT assoziiert ($p = 0.077$). Darüber hinaus war Superoxid (höchste Quartile) mit erhöhter Mortalität assoziiert ($p = 0.005$).

Schlussfolgerungen: Eine gesteigerte Produktion von Superoxid im Plasma bei Diabetikern ist ein Prädiktor für die Verschlechterung der sensiblen NLG und der kardialen autonomen Nervenfunktion sowie für erhöhtes Mortalitätsrisiko über einen Zeitraum von 6 Jahren. Die Vorhersagekraft der übrigen untersuchten Marker war entweder wie für Vitamin E deutlich schwächer oder wie für die restlichen Biomarker klinisch nicht relevant.

8 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: 5-19.
- [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, Thieme 2003; 1-39.
- [3] Hanefeld M., Leonhardt, W. *Das metabolische Syndrom: ein integriertes Konzept zur Diagnostik und Therapie eines Clusters von Zivilisationskrankheiten*, Jena-Stuttgart: Gustav Fischer Verlag 1996.
- [4] American Diabetes Association, American Academy of Neurology. Consensus statement. Report and recommendations of the San Antonio conference on diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1988; 11: 592-597.
- [5] 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: Thieme 2003: 64-82.
- [6] 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.
- [7] Boulton AJM. The diabetic foot: neuropathic in aetiology? *Diabetic Med* 1990; 7: 852-858.
- [8] Ziegler D. *Diabetische Neuropathie: Charakterisierung, Frühdiagnostik, natürlicher Verlauf, metabolische Einflussfaktoren und Effekte einer pathogenetisch begründeten Intervention*. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg 1993.
- [9] Tesfaye S, Boulton AJ, Dyck PJ, Freeman R, Horowitz M, Kempler P, Lauria G, Malik RA, Spallone V, Vinik A, Bernardi L, Valensi P, Toronto Diabetic

- Neuropathy Expert Group. Diabetic neuropathies: update on definitions, diagnostic criteria, estimation of severity, and treatments. *Diabetes Care* 2010; 33: 2285-2293.
- [10] 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.
- [11] Tesfaye S, Stevens LK, Stephenson JM, Fuller JH, Plater M, Ionescu-Tirgoviste C, Nuber A, Pozza G, Ward JD. 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.
- [12] Fedele D, Comi G, Coscelli C, Cucinotta D, Feldman EL, Ghirlanda G, Greene DA, Negrin P, Santeusano F. A multicenter study on the prevalence of diabetic neuropathy in Italy. Italian Diabetic Neuropathy Committee. *Diabetes Care* 1997; 20: 836-843.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] Herman WH, Aubert RE, Engelgau MM, Thompson TJ, Ali MA, Sous ES, Hegazy M, Badran A, Kenny SJ, Gunter EW, Malarcher AM, Brechner RJ, Wetterhall SF, DeStefano F, Smith PJ, Habib M, abd el Shakour S, Ibrahim AS, el Behairy EM. Diabetes mellitus in Egypt: glycaemic control and microvascular and neuropathic complications. *Diabet Med* 1998; 15: 1045-1051.
- [19] 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.
- [20] 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.
- [21] Ziegler D, Rathmann W, Dickhaus T, Meisinger C, Mielck A, KORA Study Group. Prevalence of polyneuropathy in pre-diabetes and diabetes is associated with abdominal obesity and macroangiopathy: the MONICA/KORA Augsburg Surveys S2 and S3. *Diabetes Care* 2008; 31: 464–469.
- [22] 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.
- [23] Forsblom CM, Sane T, Groop PH, Tötterman KJ, Kallio M, Saloranta C, Laasonen L, Summanen P, Lepäntalo M, Laatikainen L, Matikainen E, Teppo AM, Groop L. 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.
- [24] Ziegler D. Klinik, Diagnostik und Therapie der diabetischen Neuropathie. *Ther Umsch* 1996; 53: 948-957.

- [25] Benbow SJ, Wallymahmed ME, MacFarlane IA. Diabetic peripheral neuropathy and quality of life. *QJM* 1998; 91: 733-737.
- [26] Dyck PJ. The causes, classification, and treatment of peripheral neuropathy. *N Engl J Med* 1982; 307: 283-286.
- [27] Sugimura K, Dyck PJ. Multifocal fiber loss in proximal sciatic nerve in symmetric distal diabetic neuropathy. *J Neurol Sci* 1982; 53: 501-509.
- [28] Thomas PK, Lascelles RG. The pathology of diabetic neuropathy. *Q J Med* 1966; 35: 489-509.
- [29] Bradley JL, King RHM, Muddle JR, Thomas PK. The extracellular matrix of peripheral nerve in diabetic polyneuropathy. *Acta Neuropathol (Berl)* 2000; 99: 539-546.
- [30] Haslbeck M. Autonomic neuropathies in diabetes mellitus: diagnosis-therapy-risks. *Z Gesamte Inn Med* 1993; 48: 162-176.
- [31] Ziegler D, Gries F. Klassifikation, Epidemiologie, Prognose und sozialmedizinische Bedeutung. *Deutsches Ärzteblatt* 1996; 93: 680-684.
- [32] Inoguchi T, Yamashita T, Umeda F, Mihara H, Nakagaki O, Takada K, Kawano T, Murao H, Doi T, Nawata H. High incidence of silent myocardial ischemia in elderly patients with non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 47: 37-44.
- [33] Milan Study on Atherosclerosis and Diabetes (MiSAD) Group. Prevalence of unrecognized silent myocardial ischemia and its association with atherosclerotic risk factors in noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 1997; 79: 134-139.
- [34] Ziegler D, Zentai C, Perz S, Rathmann W, Haastert B, Meisinger C, Lowel H. Diminished heart rate variability (HRV) and prolonged QTc interval, but not increased QT dispersion (QTD) are predictors of mortality in the diabetic population. *Diabetes* 2004; 53 (suppl 2): A 57.

- [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] Ziegler D. Treatment of diabetic neuropathy and diabetic pain, *Diabetes Care* 2008; 31 (Suppl. 2): 255–261.
- [39] The Diabetes Control and Complications Trial 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.
- [40] Lachin JM, Genuth S, Nathan DM, Zinman B, Rutledge BN. Effect of glycemic exposure on the risk of microvascular complications in the diabetes control and complications trial--revisited. *Diabetes* 2008; 57: 995-1001.
- [41] Albers JW, Herman WH, Pop-Busui R, Feldman EL, Martin CL, Cleary PA, Waberski BH, Lachin JM; Diabetes Control and Complications Trial /Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications Research Group. Effect of prior intensive insulin treatment during the Diabetes Control and Complications Trial (DCCT) on peripheral neuropathy in type 1 diabetes during the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) Study. *Diabetes Care* 2010; 33: 1090-1096.
- [42] Reichard P, Pihl M, Rosenqvist U, Sule J. Complications in IDDM are caused by elevated blood glucose level: The Stockholm Diabetes Intervention Study (SDIS) at 10-year follow-up. *Diabetologia* 1996; 39: 1483-1488.

- [43] Amthor K-F, Dahl-Jørgensen K, Berg TJ, Skard Heier M, Sandvik L, Aagenaes A; Hanssen KF. The effect of 8 years of strict glycaemic control on peripheral nerve function in IDDM patients: the Oslo Study. *Diabetologia* 1994; 37: 579-584.
- [44] Kennedy WR, Navarro X, Goetz FC, Sutherland DE, Najarian JS. Effects of pancreatic transplantation on diabetic neuropathy. *N Engl J Med* 1990; 322: 1031-1037.
- [45] 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.
- [46] The ADVANCE Collaborative Group. Intensive blood glucose control and vascular outcomes in patients with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358: 2560-2572.
- [47] Duckworth W, Abraira C, Moritz T, Reda D, Emanuele N, Reaven PD, Zieve FJ, Marks J, Davis SN, Hayward R, Warren SR, Goldman S, McCarren M, Vitek ME, Henderson WG, Huang GD, for the VADT Investigators. Glucose control and vascular complications in veterans with type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2009; 360: 129-139.
- [48] Gaede P, Lund-Andersen H, Parving HH, Pedersen O. Effect of a multifactorial intervention on mortality in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 358: 580-591.
- [49] Khan C, Abholz HH, Ellger B, Gries FA, Haller N, Haslbeck M, Hübner P, Keller J, Landgraf R, Layer P, Maier C, Marx N, Meyerrose B, Neundörfer B, Ollenschläger G, Pannek J, Prange H, Richter B, Rietzsch H, Spranger J, Weikert B, Weinbrenner S, Wilm S, Ziegler D. Nationale VersorgungsLeitlinie Neuropathie bei Diabetes im Erwachsenenalter. In: *Diabetologie und Stoffwechsel*, Stuttgart, New York: Thieme 2012; 7: 243-285.

- [50] Ziegler D. Treatment of diabetic polyneuropathy: Update 2006. *Ann N Y Acad Sci* 2006; 1084: 250–266.
- [51] Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA. Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant alpha-lipoic acid: a meta-analysis. *Diabet Med* 2004; 21: 114–121.
- [52] Ziegler D, Ametov A, Barinov A, Dyck PJ, Gurieva I, Low PA, Munzel U, Yakhno N, Raz I, Novosadova M, Maus J, Samigullin R. Oral treatment with alpha-lipoic acid improves symptomatic diabetic polyneuropathy: the SYDNEY 2 trial. *Diabetes Care* 2006; 29: 2365–2370.
- [53] Ziegler D, Low PA, Litchy WJ, Boulton AJ, Vinik AI, Freeman R, Samigullin R, Tritschler H, Munzel U, Maus J, Schütte K, Dyck PJ. Efficacy and safety of antioxidant treatment with α -lipoic acid over 4 years in diabetic polyneuropathy: the NATHAN 1 trial. *Diabetes Care* 2011; 34: 2054-2060.
- [54] Finnerup NB, Otto M, McQuay HJ, Jensen TS, Sindrup SH. Algorithm for neuropathic pain treatment: an evidence based proposal. *Pain* 2005; 118: 289–305.
- [55] Jensen TS, Backonja MM, Hernandez Jimenez S, Tesfaye S, Valensi P, Ziegler D. New perspectives on the management of diabetic peripheral neuropathic pain. *Diab Vasc Dis Res* 2006; 3: 108–119.
- [56] Ziegler D. Periphere Neuropathie bei Diabetes. *Der Diabetologe* 2008; 04: 295-306.
- [57] Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215: 213-219.
- [58] Sies H. Biochemistry of oxidative stress. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1986; 25: 1058-1071.
- [59] Sies H. Oxidative stress. Fink, G. eds. *Encyclopedia of Stress*. Academic Press San Diego, CA 2000; 3: 102-105.

- [60] Sies H. What is oxidative stress?. Keane, J. F. eds. Oxidative Stress and Vascular Disease. Kluwer Academic Publishers Boston, MA 2000; 1-8.
- [61] Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 2 ed. Oxford: Clarendon Press 1989.
- [62] Slater TF. Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochem J* 1984; 222: 1-15.
- [63] Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 405-412.
- [64] 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.
- [65] Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996; 19: 257-267.
- [66] Smith MA, Perry G, Richey PL, Sayre LM, Anderson VE, Beal MF, Kowall N. Oxidative damage in Alzheimer's. *Nature* 1996; 382: 120-121.
- [67] 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.
- [68] 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.
- [69] Ghiselli A, Laurenti O, De Mattia G, Maiani G, Ferro Luzzi A. Salicylate hydroxylation as an early marker of in vivo oxidative stress in diabetic patients. *Free Radic Biol Med* 1992; 13: 621-626.
- [70] 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.

- [71] Bucala R, Makita Z, Koschinsky T, Cerami A, Vlassara H. Lipid advanced glycosylation: pathway for lipid oxidation in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6434-6438.
- [72] 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.
- [73] Halliwell B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. *Free Radic Res* 1996; 25: 57-74.
- [74] Oberley LW. Free radicals and diabetes. *Free Radic Biol Med* 1988; 5: 113-124.
- [75] 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.
- [76] Premkumar LS, Pabbidi RM. Diabetic Peripheral Neuropathy: Role of Reactive Oxygen and Nitrogen Species. *Cell Biochem Biophys* 2013; 67: 373-383.
- [77] 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.
- [78] Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 329: 2002-2012.
- [79] Halliwell B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutr Rev* 1994; 52: 253-265.
- [80] von Sonntag C. *The chemical basis of radiation biology*. London: Taylor and Francis 1987.

- [81] Wolff SP, Dean RT. Glucose autoxidation and protein modification: The potential role of "autoxidative glycosylation" in diabetes. *Biochem J* 1987; 245: 243-250.
- [82] 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.
- [83] Godin DV, Wohaieb SA, Garnett ME, Goumeniouk AD. Antioxidant enzyme alterations in experimental and clinical diabetes. *Mol Cell Biochem* 1988; 84: 223-231.
- [84] 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.
- [85] 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.
- [86] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-820.
- [87] 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.
- [88] 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.
- [89] Greene DA, Sima AAF, Stevens MJ, Feldman EL, Killen PD, Henry DN, Thomas T, Dananberg J, Lattimer SA. Aldose reductase inhibitors: as approach to the treatment of diabetic nerve damage. *Diabetes Metab Rev* 1993; 9: 189-217.

- [90] 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.
- [91] 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.
- [92] 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.
- [93] 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.
- [94] 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.
- [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] Polidori MC, Praticó D, Parente B, Mariani E, Cecchetti R, Yao Y, Sies H, Cao P, Mecocci P, Stahl W. Elevated lipid peroxidation biomarkers and low antioxidant status in atherosclerotic patients with increased carotid or iliofemoral intima media thickness. *J Investig Med*. 2007; 55: 163-167.
- [97] Bucala R, Tracey K J, Cerami A. Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J Clin Invest*. 1991; 87: 432-438.
- [98] Mc Nulty M, Mahmud A, Feely J. Advanced glycation end-products and arterial stiffness in hypertension. *Am J Hypertens*. 2007; 20: 242-247.

- [99] 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.
- [100] Vlassara H, Brownlee M, Cerami A. Recognition and uptake of human diabetic peripheral nerve myelin by macrophages. *Diabetes* 1985; 34: 553-557.
- [101] 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.
- [102] 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.
- [103] Bierhaus A, Schiekofer S, Schwaninger M, Andrassy M, Humpert PM, Chen J, Hong M, Luther T, Henle T, Klötting I, Morcos M, Hofmann M, Tritschler H, Weigle B, Kasper M, Smith M, Perry G, Schmidt AM, Stern DM, Häring HU, Schleicher E, Nawroth PP. Diabetes-associated sustained activation of the transcription factor nuclear factor- κ B. *Diabetes* 2001; 50: 2792-2808.
- [104] 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.
- [105] Tomlinson DR. Mitogen-activated protein kinases as glucose transducers for diabetic complications. *Diabetologia* 1999; 42: 1271-1281.
- [106] 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.
- [107] 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.
- [108] Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* 1993; 215: 213–219.
- [109] Packer L. Interactions among antioxidants in health and disease - vitamin E and its redox cycle. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Conference on Molecular and Comparative Nutrition*: 1991.
- [110] 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.
- [111] 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.
- [112] 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.
- [113] Halliwell B. How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic Res Comm* 1990; 9: 1-32.
- [114] Laughton MJ, Evans PJ, Moroney MA, Houtt JR, Halliwell B. Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem Pharmacol* 1991; 42: 1673-1681.
- [115] 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.

- [116] 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.
- [117] 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.
- [118] 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.
- [119] Nagamatsu M, Nickander KK, Schmelzer JD, Raya A, Wittrock DA, Tritschler H, Low PA. Lipoic acid improves nerve blood flow, reduces oxidative stress and improves distal nerve conduction in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes Care* 1995; 18: 1160-1167.
- [120] 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.
- [121] 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.
- [122] 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.
- [123] 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.

- [124] 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.
- [125] Kihara M, Low PA. Impaired vasoreactivity to nitric oxide in experimental diabetic neuropathy. *Exp Neurol* 1995; 132: 180-185.
- [126] Knight J, Ganderton M. ABEL[®] antioxidant test kits with Pholasin[®]. Knight Scientific Limited (KSL), Produktinformation, 2001.
- [127] 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.
- [128] Huie RE, Padmaja S. The reaction of NO with superoxide. *Free Radic Res Commun* 1993; 18: 195-199.
- [129] Ischiropoulos H. Biological tyrosine nitration: a pathophysiological function of nitric oxide and reactive oxygen species. *Arch Biochem Biophys* 1998; 356: 1-11.
- [130] Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxy nitrite in vitro. *Carcinogenesis* 1995; 16: 2045-2050.
- [131] Douki T, Cadet J, Ames BN. An adduct between peroxy nitrite and 2'-deoxyguanosine: 4,5-dihydro-5-hydroxy-4-(nitrosooxy)-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 1996; 9: 3-7.
- [132] Graham A, Hogg N, Kalyanaraman B, O'Leary V, Darley-Usmar V, Moncada S. Peroxy nitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor. *FEBS Lett* 1993; 330: 181-185.
- [133] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxy nitrite: the good, the bad, and the ugly. *Am J Physiol* 1996; 271: C 1424-C 1437.

- [134] 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.
- [135] J. Rokach, S. Kim, S. Bellone, J.A. Lawson, D. Pratico, W.S. Powell, G.A. FitzGerald, Total synthesis of isoprostanes: discovery and quantitation in biological systems, Chem. Phys. Lipids, 2004, 128: 35-56.
- [136] 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.
- [137] Takahashi K, Nammour TM, Fukunaga M, Ebert JD, Morrow JD, Roberts LJ 2nd, Hoover RL, Badr KF. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-iso-prostaglandin F_{2a}, in the rat: evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. J Clin Invest 1992; 90: 136-141.
- [138] 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.
- [139] Morrow JD, Roberts LJ. Mass spectrometry of prostanoids: F₂-isoprostanes produced by non-cyclooxygenase free radical-catalyzed mechanism. Methods Enzymol 1994; 233: 163-174.
- [140] Nourooz-Zadeh J, Gopaul NK, Barrow S, Mallet AI, Ånggård 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.
- [141] Wang Z, Ciabattoni G, Créminon C, Lawson JA, FitzGerald GA, Patrono C, Maclouf J. Immunological characterization of urinary 8-epi-Prostaglandin F_{2a} excretion in man. J Pharmacol Exp Ther 1995; 275: 94-100.

- [142] Morrow JD, Roberts LJ. The isoprostanes: current knowledge and directions for future research. *Biochem Pharmacol* 1996; 51: 1-9.
- [143] Gopaul NK, Änggard EE, Mallet AI, Betteridge DJ, Wolff SP, Nourooz-Zadeh J. Plasma 8-epi-PGF_{2a} levels are elevated in individuals with non-insulin dependent diabetes mellitus. *FEBS Lett* 1995; 368: 225-229.
- [144] Bachi A, Zuccato E, Baraldi M, Fanelli R, Chiabrando C. Measurement of urinary 8-epi-Prostaglandin F_{2a}, 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.
- [145] Praticò G, Iuliano L, Mauriello A, Spagnoli L, Lawson JA, Rokach J, Maclouf J, Violi F, FitzGerald GA. Localization of distinct F₂-isoprostanes in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest* 1997; 100: 2028-2034.
- [146] Roberts LJ, Morrow JD. The generation and actions of isoprostanes. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1345: 121-135.
- [147] Basu S. Metabolism of 8-iso-prostaglandin F_{2a}. *FEBS Lett* 1998; 428: 32-36.
- [148] Mallat Z, Philip I, Lebreton M, Chatel D, Maclouf J, Tedgui A. Elevated levels of 8-iso-prostaglandin F_{2a} in pericardial fluid of patients with heart failure. *Circulation* 1998; 97: 1536-1539.
- [149] Davi G, Ciabattini G, Consoli A, Mezzetti A, Falco A, Santarone S, Pennese E, Vitacolonna E, Capani F. In vivo formation of 8-iso-prostaglandin F_{2a} and platelet activation in diabetes mellitus: effects of improved metabolic control and vitamin E supplementation. *Circulation* 1999; 99: 224-229.
- [150] 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.
- [151] Praticò D. F₂-isoprostanes: sensitive and specific non-invasive indices of lipid peroxidation in vivo. *Atherosclerosis* 1999; 147: 1-10.

- [152] 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.
- [153] Morrow JD, Frei B, Longmire AW, Lynch SM, Shyr Y, Strauss WE, Oates JA, Roberts LJ 2nd. 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.
- [154] Reilly MP, Delanty N, Lawson JA, FitzGerald GA. Modulation of oxidant stress in vivo in chronic cigarette smokers. *Circulation* 1996; 94: 19-25.
- [155] 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.
- [156] Praticò D, Barry OP, Lawson JA, Adiyaman M, Hwang S-W, Khanapure H, Iuliano L, Rokach J, FitzGerald GA. IPF_{2α}-I: an index of lipid peroxidation in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 3449-3454.
- [157] 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.
- [158] Collier A, Rumley A, Rumley AG, Paterson JR, Leach JP, Lowe GD, Small M. Free radical activity and hemostatic factors in NIDDM patients with and without microalbuminuria. *Diabetes* 1992; 41: 909-913.
- [159] 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.
- [160] Griesmacher A, Kindhauser M, Andert SE, Schreiner W, Toma C, Knoebl P, Pietschmann P, Prager R, Schnack C, Schernthaner G, Mueller MM. Enhanced serum levels of thiobarbituric-acid reactive substances in diabetes mellitus. *Am J Med* 1995; 98: 469-475.

- [161] Niskanen L, Salonen JT, Nyyssönen K, Uusitupa MI. Plasma lipid peroxidation and hyperglycaemia: a connection through hyperinsulinaemia? *Diabet Med* 1995; 12: 802-808.
- [162] 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.
- [163] 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.
- [164] Patrono C, FitzGerald GA. Isoprostanes: potential markers of oxidant stress in atherothrombotic disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2309-2315.
- [165] 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: H 159-H 165.
- [166] 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.
- [167] Jaxa-Chamiec T, Bednarz B, Herbaczynska-Cedro K, Maciejewski P, Ceremuzynski L; MIVIT Trial Group. Effects of vitamins C and E on the outcome after acute myocardial infarction in diabetics: a retrospective, hypothesis-generating analysis from the MIVIT study. *Cardiology*. 2009; 112: 219-223.
- [168] Kutlu M, Nazıroğlu M, Simşek H, Yılmaz T, Sahap Kükner A. Moderate exercise combined with dietary vitamins C and E counteracts oxidative stress in the kidney and lens of streptozotocin-induced diabetic-rat. *Int J Vitam Nutr Res*. 2005; 75: 71-80.
- [169] Zhang C, Patel R, Eiserich JP, Zhou F, Kelpke S, Ma W, Parks DA, Darley-Usmar V, White CR. Endothelial dysfunction is induced by proinflammatory

oxidant hypochlorous acid. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281: H 1469-H 1475.

- [170] 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.
- [171] Nourooz-Zadeh J, Sohr CG, Durand T, Ziegler D. Impact of diabetic polyneuropathy and cardiovascular autonomic neuropathy on the excretion of urinary 8-epi-PGF_{2a} and its metabolites (2,3-dinor and 2,3-dinor-5, 6-dihydro). *Free Radical Res* 2006; 40: 723-729.
- [172] Nourooz-Zadeh J, Ziegler D, Sohr C, Betteridge JD, 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.
- [173] Nourooz-Zadeh J, Cooper MB, Ziegler D, Betteridge DJ. Urinary 8-epi-PGF_{2a} and its endogenous beta-oxidation products (2,3-dinor and 2,3-dinor-5,6-dihydro) as biomarkers of total body oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 330: 731-736.
- [174] 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.
- [175] Dyck PJ. Detection, characterization, and staging of polyneuropathy: assessed in diabetics. *Muscle Nerve* 1988; 11: 21-32.
- [176] 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.
- [177] 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.

- [178] Bril V. NIS-LL: The primary measurement scale for clinical trial endpoints in diabetic peripheral neuropathy. *Eur Neurol* 1999; 41: 8-13.
- [179] Dyck PJ. Evaluative procedures to detect, characterize, and assess the severity of diabetic neuropathy. *Diabet Med* 1991; 8: S 48-S 51.
- [180] 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.
- [181] Arezzo JC, Bolton CF, Boulton A, Casey KL, Cornblath D, Dyck PJ, Fields HL, Hanson P, Greenspan J, Harati Y, Jamal GA, Kennedy WR, Kenshalo DR, Light AR, Lindblom U, O'Brien P, Ochoa J, Zimmerman I. Quantitative sensory testing: a consensus report from the Peripheral Neuropathy Association. *Neurology* 1993; 43: 1050-1052.
- [182] 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.
- [183] Sternberg JC. A rate nephelometer for measuring specific proteins by immunoprecipitin reactions. *Clin Chem* 1977; 23: 1456-1464.
- [184] Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414: 813-820.
- [185] Low PA, Nickander KK: Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* 1991; 40: 873-877.
- [186] Coppey LJ, Gellett JS, Davidson EP, Yorek MA. Preventing superoxide formation in epineurial arterioles of the sciatic nerve from diabetic rats restores endothelium-dependent vasodilation. *Free Radic Res* 2003; 37: 33-40.

- [187] Zherebitskaya E, Akude E, Smith DR, Fernyhough P. Development of selective axonopathy in adult sensory neurons isolated from diabetic rats: role of glucose-induced oxidative stress. *Diabetes* 2009; 58: 1356-1364.
- [188] Fischer LR, Glass JD. Oxidative stress induced by loss of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) or superoxide-generating herbicides causes axonal degeneration in mouse DRG cultures. *Acta Neuropathol* 2010; 119: 249-259.
- [189] Min D, Kim H, Park L, Kim TH, Hwang S, Kim MJ, Jang S, Park Y. Amelioration of diabetic neuropathy by TAT-mediated enhanced delivery of metallothionein and SOD. *Endocrinology* 2012; 153: 81-91.
- [190] Diplock AT, Charleux J-L, Crozier-Willi G, Kok FJ, Rice-Evans C, Roberfroid M, Stahl W, Viña- Ribes J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. *Br J Nutr* 1998; 80: S 77-S 112.
- [191] Romero F. Antioxidants in peripheral nerve. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 925-932.
- [192] 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.
- [193] Nourooz-Zadeh J, Rahimi A, Tajaddini-Sarmadi J, Tritschler H, Rosen P, Halliwell B, Betteridge DJ. Relationships between plasma measures of oxidative stress and metabolic control in NIDDM. *Diabetologia* 1997; 40: 647-653.
- [194] 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.
- [195] Packer L, Kraemer K, Rimbach G. Molecular aspects of lipoic acid in the prevention of diabetic complications. *Nutrition* 2001; 17: 888-895.
- [196] Hegde SV, Adhikari P, Kotian S, Pinto VJ, D'Souza S, D'Souza V. Effect of 3-month yoga on oxidative stress in type 2 diabetes with or without complications: a controlled clinical trial. *Diabetes Care* 2011; 34: 2208-2210.

- [197] 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.
- [198] Ahlskog JE, Uitti RJ, Low PA, Tyce GM, Nickander KK, Petersen RC, Kokmen E. No evidence for systemic oxidant stress in Parkinson's or Alzheimer's disease. *Mov Disord* 1995; 10: 566-573.
- [199] 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.
- [200] 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.
- [201] Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F₂-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 505-513.
- [202] Minuz P, Fava C, Lechi A. Lipid peroxidation, isoprostanes and vascular damage. *Pharmacol Rep.* 2006; 58 Suppl: 57-68.
- [203] Warso MA, Lands WEM. Lipid peroxidation in relation to prostacyclin and thromboxane physiology and pathophysiology. *Br Med Bull* 1993; 39: 277-280.
- [204] Gopaul NK, Anggård 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.
- [205] Katsuki A, Sumida Y, Urakawa H, Gabazza EC, Maruyama N, Morioka K, Kitagawa N, Hori Y, Nakatani K, Yano Y, Adachi Y. Increased oxidative stress is associated with elevated plasma levels of Adrenomedullin in hypertensive patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 2003; 26: 1642-1643.

- [206] Ceriello A, Mercuri F, Quagliaro L, Assaloni R, Motz E, Tonutti L, Taboga C. Detection of nitrotyrosine in the diabetic plasma: evidence of oxidative stress. *Diabetologia* 2001; 44: 834-838.
- [207] Hoeldtke RD, Bryner KD, McNeill DR, Hobbs GR, Riggs JE, Warehime SS, Christie I, Ganser G, Van Dyke K. Nitrosative stress, uric acid, and peripheral nerve function in early type 1 diabetes. *Diabetes* 2002; 51: 2817-2825.
- [208] 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.
- [209] Hoeldtke RD, Bryner KD, Hoeldtke ME, Christie I, Ganser G, Hobbs G, Riggs J. Sympathetic sudomotor disturbance in early type 1 diabetes mellitus is linked to lipid peroxidation. *Metabolism* 2006; 55: 1524-1531.
- [210] Hoeldtke RD, Bryner KD, Corum LL, Hobbs GR, Van Dyke K. Lipid peroxidation in early type 1 diabetes mellitus is unassociated with oxidative damage to DNA. *Metabolism* 2009; 58: 731-734.
- [211] Hoeldtke RD, Bryner KD, Van Dyke K. Oxidative stress and autonomic nerve function in early type 1 diabetes. *Clin Auton Res* 2011; 21: 19-28.
- [212] El Boghdady NA, Badr GA. Evaluation of oxidative stress markers and vascular risk factors in patients with diabetic peripheral neuropathy. *Cell Biochem Funct* 2012; 30: 328-334.
- [213] Uzar E, Tamam Y, Evliyaoglu O, Tuzcu A, Beyaz C, Acar A, Aydın B, Tasdemir N. Serum prolidase activity and oxidative status in patients with diabetic neuropathy. *Neurol Sci* 2012; 33: 875-880.
- [214] Palka JA. The role of prolidase as an enzyme participating in the metabolism of collagen. *Rocz Akad Med Bialymst.* 1996; 41: 149-160.

- [215] Sayin R, Aslan M, Kucukoglu ME, Luleci A, Atmaca M, Esen R, Demir H. Serum prolidase enzyme activity and oxidative stress levels in patients with diabetic neuropathy. *Endocrine* 2014; 47: 146–151.
- [216] Kasznicki J, Kosmalski M, Sliwinska A, Mrowicka M, Stanczyk M, Majsterek I, Drzewoski J. Evaluation of oxidative stress markers in pathogenesis of diabetic neuropathy. *Mol Biol Rep* 2012; 39: 8669-8678.
- [217] Ziegler D, Strom A, Brüggemann J, Ziegler I, Ringel B, Püttgen S, Roden M, GDS Group. Overexpression of cutaneous mitochondrial superoxide dismutase in recent-onset type 2 diabetes. *Diabetologia* 2015; 58: 1621-1625.
- [218] Müller-Stich BP, Billeter AT, Fleming T, Fischer L, Büchler MW, Nawroth PP. Nitrosative stress but not glycemic parameters correlate with improved neuropathy in nonseverely obese diabetic patients after Roux-Y gastric bypass. *Surg Obes Relat Dis* 2015; 11: 847-854.
- [219] Acharyai JD, Pande AJ, Joshi SM, Yojnik CS, Ghaskadbi SS. Treatment of hyperglycaemia in newly diagnosed diabetic patients is associated with a reduction in oxidative stress and improvement in β -cell function. *Diabetes Metab Res Rev* 2014; 30: 590–598.
- [220] 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.

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides statt, dass die Dissertation selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe erstellt worden ist und die hier vorgelegte Dissertation nicht von einer anderen Medizinischen Fakultät abgelehnt worden ist.

Stefanie Annika Buchholz (geb. Kühne)

Ort, Datum

Unterschrift