

2. Patienten und Methoden

2.1. Patienten

Wir untersuchten 20 Patienten mit Diabetes mellitus (Typ II) im Alter von 51 bis 83 Jahren. Neben der Anamneseerhebung zur Erkrankung erfolgte eine klinische und in den überwiegenden Fällen (N=15) auch eine elektrophysiologische Untersuchung mit Bestimmung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit des N. peroneus, Bestimmung der Amplitude des sensiblen antidromen Potentials des N. suralis und auch Untersuchung der sympathischen Hautreaktion (N=12). 15 dieser Patienten (Gruppe 3) hatten eine sensomotorische und vegetative Neuropathie. In dieser Gruppe waren 7 Männer und 8 Frauen. Alle Patienten dieser Gruppe hatten in unterschiedlicher Ausprägung folgende klinische Symptome: distale Parästhesien, Verlust des ASR und vermindertes Vibrationsempfinden am Malleolus. Bei allen Pat. dieser Gruppe fand sich ein Ausfall der Schweißbildung an den unteren Extremitäten (palpatorisch). Einige Patienten hatten weitere Symptome einer vegetativen Neuropathie wie orthostatischen Schwindel/Synkopen (Pat. 25,26,55,56,68,54,47,40), gastrointestinale Störungen wie Obstipation, Diarrhö oder Völlegefühl (Pat. 40,54,68,27,23,24,25,26,64) urogenitale Störungen wie Inkontinenz oder Impotenz (Pat. 25,68,54,47).

Elektrophysiologisch zeigte sich im Elektroneurogramm bei allen untersuchten Patienten eine verminderte Nervenleitgeschwindigkeit des Nervus peroneus ($< 40\text{m/s}$), eine verminderte Amplitude in der sensiblen antidromen Neurographie des Nervus suralis ($< 10\ \mu\text{V}$) sowie eine fehlende oder pathologische sympathische Hautreaktion. Einen Überblick über die genauen erhobenen Symptome und Befunde gibt Tabelle 1 im Kapitel Ergebnisse 3.1. (S.21).

Die übrigen 5 untersuchten Patienten mit Diabetes mellitus (3 Männer, 2 Frauen) bildeten die Gruppe 2. Die Patienten dieser Gruppe hatten alle keine klinischen Symptome einer vegetativen oder sensomotorischen Polyneuropathie und einen normalen sympathischen Hautreflex. Eine Patientin (ID 50) zeigte elektrophysiologisch deutliche Hinweise auf eine Polyneuropathie (Leitgeschwindigkeit des N.peroneus in der motorischen Neurographie $35\ \text{m/s}$ und Amplitude des N.suralis in der antidromen sensiblen Neurographie $0,4\ \mu\text{V}$). Bei unauffälliger sympathischer Hautreaktion und ohne jegliche klinische Symptomatik erfolgte trotzdem der Einschluß in diese Gruppe. Die

übrigen Patienten dieser Gruppe zeigten keine elektrophysiologische Veränderungen.

Die Tabelle 2 (Kapitel 3.1., S.22) fasst die Befunde dieser Gruppe zusammen.

Weiterhin untersuchten wir eine Kontrollgruppe (Gruppe 1) von 25 Probanden (9 Männer, 16 Frauen) im Alter von 52 bis 86 Jahren ohne Diabetes mellitus und ohne klinische Zeichen einer Polyneuropathie.

Ausgeschlossen wurden Patienten mit psychischen Erkrankungen, chronischem Alkoholabusus, Behandlung mit Betarezeptorenblockern, Antidepressiva, MAO-Hemmern oder Corticoiden, da hier eine Beeinflussung der Melatoninsekretion möglich war (7,24,36, 37).

2.2. Methode der Untersuchung von Melatonin

Der Plasmaspiegel des Melatonins erreicht sein Maximum zwischen 2 und 4 Uhr nachts und sein Minimum während des Tages. Da die Halbwertszeit von Melatonin im Blut etwa 45 Minuten beträgt, wäre es zu Untersuchungszwecken nötig gewesen die Probanden zur Blutprobeentnahme mehrmals zu wecken. Diese methodischen Probleme konnten vermieden werden durch die Bestimmung des Hauptmetaboliten 6-Hydroxymelatonin-Sulfat (MeSO₄) im Urin. Melatonin wird zu 80-90 % in der Form dieses Metaboliten im Urin ausgeschieden (13). Es wurde ein kompetitiver Enzymimmunoassay von IBL Hamburg zur direkten quantitativen Bestimmung verwendet. Als Detektionsantikörper kam polyklonales Antimelatonininsulfat vom Kaninchen zur Anwendung (Abbildung 2).

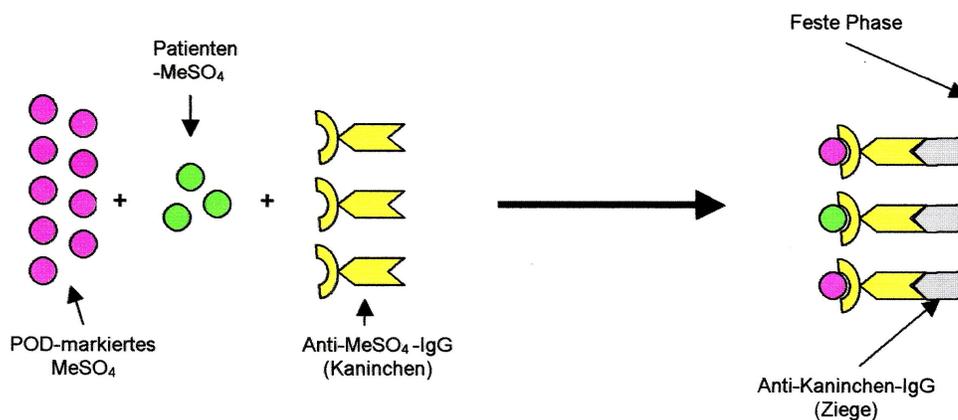


Abbildung 2 Testprinzip zur Bestimmung von 6-Hydroxymelatonininsulfat im Urin

In einer mit Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper beschichteten Mikrotiterplatte wurden die verdünnten Proben mit Peroxidase gekoppeltem Antigen und dem für MeSO₄ spezifischen Kaninchen-Antiserum gemischt. Während der Inkubation konkurriert das Antigen in den Proben und Standards mit dem Peroxidase gebundenen Antigen um die Bindungsstellen am Antikörper, der währenddessen an der Mikrotiterplatte immobilisiert wird. Nach einem Waschschrift wurde bei der anschließenden Substratreaktion die Menge der gebundenen Peroxidase visualisiert, die umgekehrt proportional zur

Melatonin-Sulfat-Konzentration ist. In einer Standardkurve konnten die Konzentrationen der unbekanntenen Proben anhand der bekannten Standards bestimmt werden (13).

Die im Morgenurin gemessene Melatonin-6-Sulfat-Konzentration korreliert gut mit der Konzentration des Melatonins im Blut während der entsprechenden nächtlichen Sammelperiode (13). Das Maximum der Melatoninproduktion erfolgt zwischen 2.00 und 4.00 Uhr bei Dunkelheit, das Minimum zwischen 11.00 und 19.00 Uhr (6). Um möglichst gleich lange Sammelzeiten zu erhalten wählten wir jeweils eine 6-stündige Sammelzeit mit Einschluss der Zeit der minimalen bzw. der maximalen Melatoninproduktion. Auf Grund der bekannten dosisabhängigen Suppression des Melatonins durch Licht (6) wurden Probanden und Schwestern angehalten in der nächtlichen Sammelperiode Lichteinwirkung zu vermeiden.

Die Probengewinnung zur Erfassung der Maximalsekretion erfolgte aus einem 6-Stunden-Sammelurin von 0 bis 6 Uhr, eine weitere Probengewinnung zur Erfassung des Minimums der Melatoninsekretion erfolgte aus einem 6-Stunden-Sammelurin von 12 bis 18 Uhr.

Aus den gemessenen 6-Hydroxy-Melatonin-Sulfat-Konzentrationen wurde die ausgeschiedene Menge bezogen auf die Sammelmenge und Zeit berechnet. Hierfür waren genaue Angaben über Sammelmenge und Sammelzeit durch die Probanden notwendig. Unter Praxisbedingungen konnte dies nicht immer gewährleistet werden. Daher wurde die 6-Hydroxy-Melatonin-Sulfat-Konzentration auch bezogen auf das ausgeschiedene Kreatinin berechnet. Die Bildungsrate und Ausscheidung von Kreatinin im Urin ist konstant und unabhängig von der Ernährung und kann daher als Bezugsgröße für die Ausscheidung anderer Metabolite dienen (38). Einige Probanden gaben gar keine Sammelmengen und –Zeiten an, so dass hier nur Werte bezogen auf das Kreatinin vorliegen. Zur Auswertung kamen die Tagwerte, die Nachtwerte und die Differenzen der Ausscheidungsmengen zwischen den jeweiligen Tag- und Nachtwerten.

2.3. elektrophysiologische Untersuchungsmethoden

2.3.1. Sympathischer Hautreflex

Zum Nachweis einer Mitbeteiligung des vegetativen Nervensystems erfolgte die Messung der sympathischen Hautreaktion (SSR).

Bei dieser Untersuchung lagen die Patienten auf einer Liege, weitgehend frei von störenden Außenreizen und wurden angehalten ruhig zu atmen. Es erfolgte 3-mal eine Reizung jeweils am N. medianus und N. tibialis mit ansteigender Reizstärke (15-30 mA) von 0,2 ms Dauer. Der Abstand zwischen den Reizungen war unregelmäßig von 1,5-3 Minuten, da eine rasche Habituation bei regelmäßigen und schnell aufeinanderfolgenden Reizungen auftritt. Abgeleitet wurde an der unbehaarten Haut an Handflächen und Fußsohlen, da sich hier am zuverlässigsten das emotionale Schwitzen auslösen lässt (32). Bei Ableitung an den Handinnenflächen wurde der N. tibialis am Malleolus medialis gereizt, bei Ableitung an den Fußsohlen erfolgte die Stimulation des N. medianus am Handgelenk mit bipolaren Oberflächen Elektroden. Die Analysezeit betrug 10 Sekunden. Es wurden die Potentiale mit der kürzesten Latenz und der höchsten Amplitude zur Beurteilung ausgewählt. Eine Reizantwort wurde als solche anerkannt, wenn sie zumindest einmal reproduzierbar war und eine Amplitude von mindestens 50 μV erreichte; andernfalls wurde das Fehlen der SSR angenommen. Der Nulllinienabgang erhielt die Bezeichnung P0, der erste nach oben gerichtete Gipfel N1. Neben diesen beiden Potentialparametern kam die Amplitude P0/ N1 zur Auswertung. Pathologisch wurden bei Reizung an der Hand eine P0 > 1,63 s, eine N1 > 2,68 s und eine Amplitude < 260 μV gewertet, sowie bei Reizung am Fuß eine P0 > 2,44s, eine N1 > 3,89s und eine Amplitude < 240 μV (33).

2.3.2. motorische und sensible Neurographie

Bei 15 Patienten mit Diabetes mellitus erfolgte ergänzend zur klinischen Untersuchung eine elektrophysiologische Untersuchung mit Bestimmung der motorischen Nervenleitgeschwindigkeit des N. peroneus und Ermittlung der Amplitude des sensiblen Potentials des N. suralis.

Die motorische Neurographie des N.peroneus umfasste die supramaximale Stimulation (60mA, mit einer Reizdauer von 0,1ms) in Höhe des Sprunggelenkes sowie in Höhe des Fibulaköpfchens. Die Ableitung der Muskelsummenpotentiale erfolgte vom M. extensor digitorum brevis mit Oberflächenelektroden. Die Nervenleitgeschwindigkeit errechnete sich durch Division der Distanz zwischen den Stimulationspunkten in Millimeter (mm) und der Differenz der Leitungszeit zum Muskel nach proximaler und distaler Stimulation in Millisekunden (ms).

Zur Untersuchung der Amplitude des sensiblen Nervenaktionspotentials des N.suralis erfolgte die sensibel antidrome Neurographie mit proximaler Reizung des Nerven im Bereich der Wade und Ableitung mit Oberflächenelektroden vom zugehörigen Hautareal am lateralen Fußrand. Die Untersuchungen erfolgten entsprechend den Standardverfahren (39, 40).

2.4. Statistische Untersuchungsmethoden

Die statistische Auswertung des Untersuchungsmaterials erfolgte mit Unterstützung der Abteilung Biometrie des Klinikums Berlin Buch. Die Patientendateien wurden EDV-gerecht verschlüsselt, erfasst und an einem PC mit dem Programmsystem SPSS bearbeitet.

Zur Beschreibung der Verteilung von quantitativen Merkmalen wurden statistische Maßzahlen berechnet:

- der arithmetische Mittelwert
- die Standardabweichung, Minimal- und Maximalwert zur Charakterisierung der Streuung,
- Konfidenzintervalle für die Mittelwerte.

Für die qualitativen Merkmale wurden die Häufigkeiten der Werte in Histogrammen dargestellt.

Die qualitativen Merkmale wurden mit der Kontingenztafelmethode und dem parameterfreien Chi²-Test ausgewertet. Die Nullhypothese H₀ geht von der Gleichverteilung der Merkmale in den einzelnen Gruppen aus. Bei Überschreitung des Tafelwertes durch den errechneten Chi²-Wert muss die Nullhypothese abgelehnt werden, es bestehen signifikante Unterschiede in den Häufigkeitsverteilungen zwischen den Gruppen. Für alle Berechnungen wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit alpha mit 5% festgelegt. Die Freiheitsgrade berechnen sich zu $FG=(k-1)(m-1)$, wobei k die Anzahl der Spalten und m die Anzahl der Zeilen der Kontingenztafel sind. Im Falle der Ablehnung der Nullhypothese gibt der Kontingenzkoeffizient Hinweise auf die Stärke des Zusammenhangs.

Zum Vergleich der Mittelwerte von Messwerten für einzelne Gruppen wurde zunächst mit dem F-Test geprüft, ob die Varianzen gleich sind. War dies der Fall, so wurden Mittelwertsvergleiche mit dem t-Test nach Student durchgeführt. Bei Inhomogenität der Varianzen wurden die Mittelwerte mit dem t-Test nach Welch verglichen. Beide Tests setzen die Normalverteilung der Messwerte voraus.

Da von einer Normalverteilung der Melatoninmeßwerte nicht ausgegangen werden konnte, mussten parameterfreie Tests angewandt werden. Die statistische Bewertung erfolgte daher mit dem u-Test von Mann-Whitney. Geprüft wird die Nullhypothese H₀,

die davon ausgeht, dass die Stichproben der gleichen Grundgesamtheit entstammen (d.h. die Verteilungen gleich sind). Wenn die berechnete Prüfgröße kleiner oder gleich dem kritischen Tafelwert ist, wird die Nullhypothese verworfen, und die Alternativhypothese muss angenommen werden (41, 42, 43).