

OLETF 쥐에서 발생한 당뇨병성 신경병증에 대한 알파 리포산의 피하신경 보존효과

전북대학교 의과대학 대학원¹, 내과학교실, 임상의학연구소

박명한¹ · 박지현 · 백홍선 · 박태선

The Effects of Alpha-Lipoic Acid on Epidermal Nerve Preservation in the Diabetic Neuropathy of OLETF Rats

Ming Han Piao¹, Ji Hyun Park, Hong Sun Baek, Tae Sun Park

Department of Medicine of the Graduate School¹ and Research Institute of Clinical Medicine,
Chonbuk National University Medical School

- Abstract -

Background: Alpha-Lipoic acid (ALA) administration has been reported to ameliorate some of symptoms of peripheral polyneuropathy in diabetic patients and to improve endoneurial nutritive neural blood flow and nerve conduction velocity in diabetic rats. But it is not clear whether ALA has the preservation effect on epidermal nerve fibers (ENFs) density.

Methods: We tested the efficacy of ALA in preserving current perception thresholds (CPTs) and ENFs (numbers/mm) in OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rats, an animal model of type 2 diabetes, which were fed with sucrose until diabetes mellitus developed. Thereafter, one group of OLETF rats was fed with ALA and the other was not for 40 weeks. Diabetic rats were administered with ALA (80 mg/kg of body weight/day) by oral feeding for 40 weeks. The effect of ALA treatment on ENFs preservation was assessed by protein gene product 9.5 immunostaining. Quantification of neuropathic symptoms on the dorsum of hind paws of rat was measured by CPT test every 4 weeks.

Results: Numbers of ENF significantly decreased in OLETF rats fed without ALA compared with OLETF rats fed with ALA ($P < 0.01$). The thresholds at 2000, 250 and 5 Hz in OLETF rats fed with ALA did not increased and OLETF rats without ALA significantly increased at 80 weeks ($P < 0.01$).

Conclusion: These observations suggest that administrations of ALA may be useful for preserving ENFs and CPTs in OLETF rats dorsum of hind paws skin. (*J Kor Diabetes Assoc* 30:170~176, 2006)

Key Words: Alpha-Lipoic Acid, Current perception threshold, Diabetic neuropathy, Epidermal nerve fiber density

서 론

당뇨병성 신경병증의 가장 흔한 형태는 원위부 대칭성 다발성 신경병증이다¹⁾. 당뇨병성 신경병증의 병인은 아직 잘 모

르지만 대사성과 혈관성 손상이 당뇨병성 신경병증의 발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁾. 이러한 병인들의 다양한 상호작용에 의해 나타나는 당뇨병성 신경병증 신경의 병리적 변화인 퇴행적 병변은 말초에 있는 무수신경 말

접수일자: 2006년 1월 16일, 통과일자: 2006년 4월 20일, 책임저자: 박태선, 전북대학교 의과대학 내분비대사 내과

* 본 논문은 2001년 전북대학교 지원연구비와 2004년 전북대학교 병원 연구비 지원에 의해 연구되었음

단에서부터 시작하는 것으로 알려져 있다³⁾. 그러나 피부 말초신경은 감각신경 말단의 손상에 대한 보상을 위해 손상을 받은 부위 외의 지역에서 수상돌기가 나타난다. 피부 신경섬유의 분포 형태는 면역조직화학 검사를 통하여 볼 수 있는데, 말초신경의 수나 두께의 변화와 말초 신경부전의 정도는 비복신경의 신경진도 속도변화나 유수신경 섬유밀도와 밀접한 관계가 있다고 알려져 있다⁴⁾. 말초신경섬유에 대한 연구는 무수신경섬유의 평가방법이 제한되어 유수신경만으로 한정되어 시행되었으나 최근에 민감한 면역조직학적 방법의 개발로 작은 신경을 확인하고 정량화할 수 있게 되었다. 신경 ubiquitin carboxy-terminal hydrolase인 PGP 9.5 (protein gene-product 9.5)를 이용하여 작은 유수신경과 무수신경의 분포를 나타내어 말초신경섬유를 정량적, 정성적으로 평가할 수 있게 되었다⁵⁾. 피부 생검에 의한 피하 신경의 평가가 당뇨병성 말초신경병증의 정도를 평가하는데 매우 유용하게 사용된다. 당뇨병성 신경병증에서 표피와 진피 신경섬유는 구조적인 이상을 나타내고⁶⁾ 신경섬유는 수직과 수평으로 주행하면서 모든 방향으로 가지를 내기 때문에 신경섬유의 정확한 정량적 분석은 쉽지 않다. 그러므로 면역 염색한 부위에서 표피 1 mm에 대한 표피 내 신경섬유 숫자 측정 (표피 내 신경밀도)에 의한 반정량적 분석이 유용하다.

당뇨병성 신경병증의 치료에 사용되는 약제는 크게 통증을 경감시키는 대증적 치료제와 병인에 따른 치료제로 나눌 수 있다. 삼환계 항우울제나 항 전간제 등 대부분의 약제들이 통증완화에 사용되고 알도스 환원효소 억제제, 감마 리놀렌산, 알파 리포산 등이 병인에 따른 치료제에 속한다. 이들 약제 중 알파 리포산은 항산화제로서 친지방 유리기의 제거와 조직 내 산화성 스트레스를 줄이는데 효과가 있는 것으로 알려져 있다⁷⁾. 또한 알파 리포산은 당뇨병성 신경병증의 증상개선에 효과가 탁월하다는 보고는 많이 있지만⁸⁾ 말초신경의 보존효과 및 형태학적 변화에 대한 연구는 많지 않다.

Kawano 등이 개발한 Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty (OLETF)⁹⁾ 쥐는 사람의 제2형 당뇨병과 병의 경과가 유사하고 당뇨병성 신경병증 연구에도 유용한 모델¹⁰⁾로 알려져 있다.

본 연구에서는 OLETF 쥐에서 30% 자당을 자유롭게 섭취시켜 당뇨병을 초기에 발생시킨 후 40주간 알파 리포산을 투여한 군과 대조군의 발등 피부 면역조직화학 검사를 시행하여 말초신경 밀도를 측정하고, Neurometer[®]CPT/C (Neurotron Inc, MD)를 사용하여¹¹⁾ 전류자극 역치의 변화를 검사하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물

생후 12주된 14마리의 OLETF 쥐 (Otsuka Pharmaceutical

Co., Tokushima, Japan)를 임의로 두 군으로 나누어 30% 농도의 자당 (Junsei chemical Co. Tokyo, Japan)을 포함하는 물 100 mL을 먹이고 사료는 자유롭게 먹게 하였다. 당뇨병의 발생을 확인한 후 40주부터 한 군에는 알파 리포산 (VIATRIS GmbH & Co, KG, Germany) (80 mg/kg/일)을 물에 용해하여 40주 동안 먹이고, 다른 군은 40주 동안 물만 먹인 후 희생하여 조직검사를 시행하였다. 양 군 모두 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

2. 전류자극역치 측정

OLETF 쥐의 감각과 통증 역치를 측정하기 위하여 Neurometer[®]CPT/C (Neurotron Inc, Baltimore, MD)를 이용하여 전류자극역치 검사를 하였다. Neurometer에 의해 발생된 3가지 주파수 5 Hz, 250 Hz와 2,000 Hz는 서로 다른 크기의 신경섬유를 선택적으로 자극하는 원리를 이용하여 측정하였다.

OLETF 쥐를 케타민 (50 mg/kg)과 럼폰 (5 mg/kg)을 복강내 주사하여 마취한 후, 오른쪽 발등에 작은 전극 (ATE 1925; Neurotron Inc, Baltimore, MD)을 붙이고 피부 접촉 전극은 꼬리 기시부로부터 2.5 cm 부위에 붙였다. Neurometer[®]CPT/C를 이용하여 실험동물의 반응을 보기 위해 실험 모드로 발 등에 자극을 주었다. 실험모드는 5 Hz, 250 Hz, 2,000 Hz의 전류 자극의 강도를 자동적으로 서서히 올리면서 쥐가 소리를 지르거나, 소리를 지르지 않고 꼬리를 흔들기 시작하면 꼬리 자극을 중지하고 전류자극 역치로 기록하였다. 세 종류의 파장에 의한 전류자극 역치는 2분 이내에 측정되었으며 10분 간격으로 반복하였다. 3회 반복 자극하여 모두 동일한 반응을 보일 때 이를 역치로 판정하여 $\times 0.1$ mA로 표시하였다. 4주 마다 한 번씩 전류자극에 대한 역치를 40주 동안 측정하였다.

3. 혈당 측정

혈당측정은 간이 혈당 측정기인 Accutrend[™] (Therasense inc. Alameda CA)을 이용하여 8시간 공복상태에서 꼬리에서 혈액을 채취하여 1주 간격으로 측정하였다.

4. 면역조직화학적 염색

알파 리포산을 40주 동안 투여한 군과 투여하지 않은 OLETF 쥐의 오른쪽 발등 피부를 적출하여 PLP (2% paraformaldehyde, 0.075 M lysine, 0.05 M phosphate buffer pH 7.4, 0.01 M sodium m-periodate) 고정액에 24시간 동안 고정한다. 냉동방어제 (Tissue-tec[®], OCT compound)에 담겨 액체질소로 신속히 얼린 후, 동결절편 박절기 (Leica CM 1510)로 40 μ m두께로 박절한다. 0.05 M TBS (Tris-buffer saline pH 7.6)를 이용하여 각각 10분간 2회의 세척 과정을 거친 후 멜라닌을 표백하기 위해 조직을

0.25% 과망간산 칼륨액에 넣고 상온에서 15분 동안 교반한다. TBS로 10분간 1회의 세척 과정을 거친 후 조직을 5% oxalic acid 에 2분간 놓는다. TBS로 10분간 2회의 세척과정을 거친 후 비특이적 배경 염색을 방지하기 위하여 조직을 TBS와 0.5% powdered milk, 1.0% Triton X-100, 1.5% normal goat serum과 Avidin-biotin complex (ABC; VECTASTAIN[®], VECTOR laboratories, CA) 교반기에 4 시간 동안 놓는다. 조직을 TBS와 0.5% powdered milk, 0.5% Triton x-100, 0.75% Normal goat serum 일차항체 (1:1000 PGP 9.5 polyclonal, Biogenesis[®], UK)를 더하여 교반기 위에 125 rpm으로 상온에서 하룻밤을 보낸다. TBS

로 10분간 2회의 세척 과정을 거친 후 조직을 TBS와 Triton X-100, 이차 항체 ABC (VECTASTAIN[®], VECTOR laboratories, CA)를 1:100로 섞는다. TBS로 10분간 2회의 세척 과정을 거친 후 내인성 과산화효소를 제거하기 위해 조직을 30% Methanol/PBS와 1% H₂O₂에 섞어 상온에서 30 분 동안 교반기에 놓는다. PBS (pH 7.4)로 10분간 1회의 세척 과정을 거친 후 조직을 ABC (VECTASTAIN[®], VECTOR laboratories, CA) A, B 혼합액에 1시간 동안 교 반기에 놓는다. PBS (pH 7.4) 로 10분간 2회의 세척 과정을 거친 후 발색제 SG chromogen (Vector[®], VECTOR laboratories, CA) 섞고 2분 정도 발색시킨다. PBS (pH 7.4)

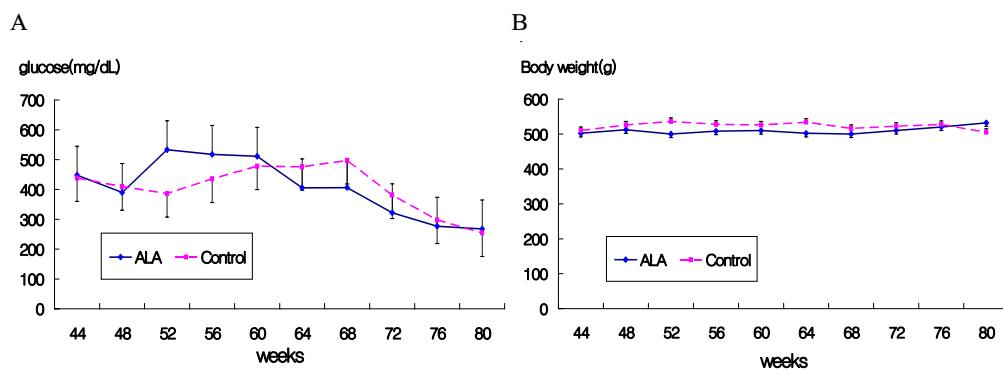


Fig. 1. Glucose concentration and body weight changes in ALA administration and control group during experiment.
ALA, alpha lipoic acid.

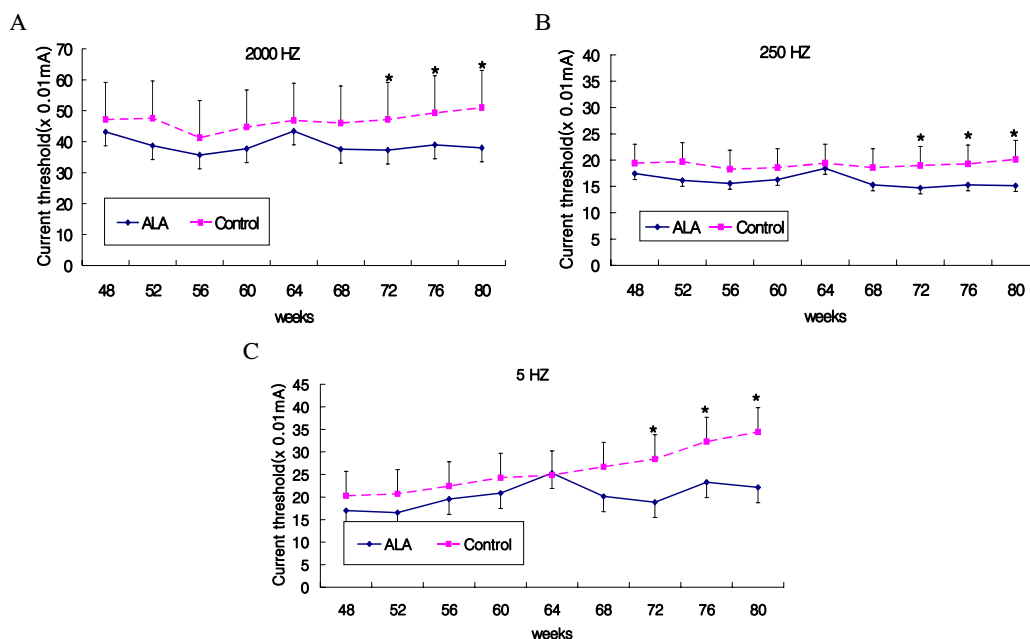


Fig. 2. Current perception thresholds change of 2000 Hz, 250 Hz, and 5 Hz of ALA administration and control group during experiment.
* $P < 0.01$ compare to control and ALA group; ALA, alpha lipoic acid.

로 10분간 2회의 세척 과정을 거친 후 조직을 용액에 담고 젤라틴 코팅된 슬라이드에 붙인 후 30분 이상 공기로 말린다. 증류수로 씻은 후 에오신으로 2분간 대조염색하고 탈수 투명화 과정을 거친 후 표본제작 후 봉입한다.

5. 피하신경의 반정량적 측정

각 피부 조직의 염색 슬라이드에서 PGP 9.5에 면역 반응한 신경섬유의 수를 광학 현미경 (Leica DMLB, McBAIN instruments, CA)으로 100배의 배율로 이미지 분석 프로그램 (SIS; Soft Imaging System. CO)을 이용하여 염색된 말초신경의 수를 측정하였다. 진피에서 표피로 통과한 신경을 표피의 신경섬유 수로 정의하였으며 표피 내에서 분지한 신

경섬유는 하나로 측정하고 표피-진피 접합부에서 추적할 수 없는 신경은 포함하지 않았다. 표피의 신경섬유 수는 각 군의 임상적 차이를 모르게 한 후 한 사람이 측정하였다. 표피 내 신경밀도 (수/mm)는 가피의 단위 길이에 있는 신경 섬유의 수로 표시하였다.

6. 통계분석

자료분석은 JMP Statistical Discovery 4.0[®] 프로그램을 사용하였다. 실험결과는 평균 \pm 표준 편차로 표시하고 알파 리포산 투여군과 대조군의 전류자극역치와 표피의 신경섬유 수 및 길이의 비교는 Student's *t*-test를 이용하여 분석하

Table 1. Current Perception Thresholds at the Beginning and the End of Experiment

	2,000 Hz			250 Hz			5 Hz		
	Begin	End	<i>P</i>	Begin	End	<i>P</i>	Begin	End	<i>P</i>
ALA group	43.1 \pm 5.6	38 \pm 4.5	< 0.05	17.4 \pm 1.7	15.7 \pm 1.1	< 0.05	17 \pm 4.7	22.1 \pm 3.4	> 0.05
Control group	47.1 \pm 11.9	51.0 \pm 12.0	> 0.12	19.4 \pm 1.7	20.1 \pm 3.6	> 0.24	20.3 \pm 4.9	34.4 \pm 5.4	< 0.01
<i>P</i> -value	> 0.12	< 0.01		> 0.12	< 0.01		> 0.15	< 0.01	

ALA, alpha lipoic acid.

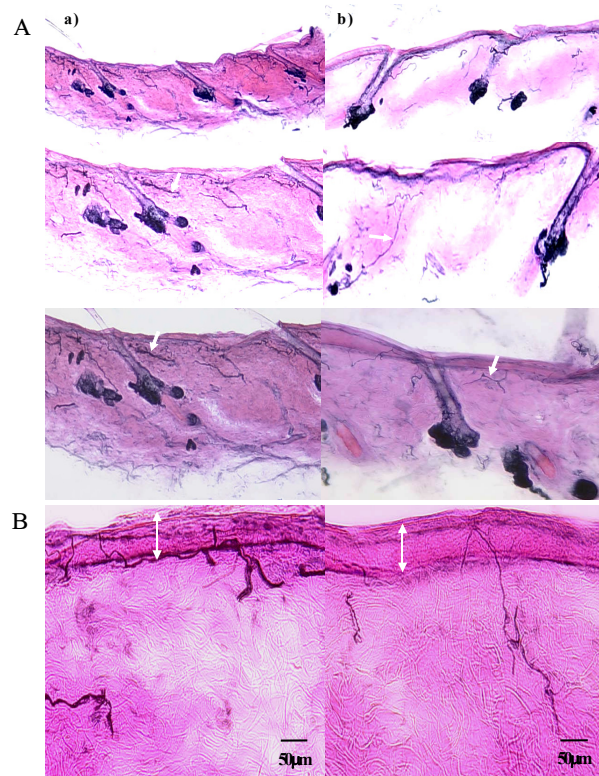


Fig 3. Morphological change of dermal (A) and epidermal nerve fibers (B) of OLETF rats dorsum of hind paws skin by protein gene product 9.5 immunostaining. A: ALA administration (a) and control (b) group show the preservation of dermal nerve fiber number and thickness(x 100); Arrow indicates dermal nerve fibers. B: Epidermal nerve fibers change in ALA administration and control group. Arrow indicates epidermis (\times 200).

었다. $P < 0.05$ 인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 대조군과 알파 리포산 투여군의 임상적 특징

시험 기간 동안 알파 리포산을 투여한 군과 대조군 모두에서 체중에 유의한 차이는 보이지 않았다. 두 군 모두에서 400 mg/dL 이상의 고혈당을 보였다. 알파 리포산 투여군에서 초기에는 대조군에 비하여 혈당이 증가하였고, 후기에는 감소하였는데 통계학적으로 유의한 차이는 없었고 종료시에 유의한 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1).

2. 전류자극 역치 검사

알파 리포산을 투여한 군에서 2,000 Hz와 250 Hz의 CPT는 시간의 경과에 따라 감소하였고 ($P < 0.05$), 5 Hz CPT는 시간의 경과에 따라 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다. 대조군에서는 2,000 Hz와 250 Hz의 CPT는 증가하는 경향을 보였고 5 Hz의 CPT가 유의하게 증가하였다 ($P < 0.01$, Table 1). 알파 리포산을 투여한 후 28주부터 알파 리포산 투여 군과 대조군 사이에 2,000 Hz, 250 Hz와 5 Hz 모두의 CPT는 유의한 차이가 나타났다 ($P < 0.01$, Fig. 2).

3. 피부신경 변화

대조군의 표피와 진피에서 신경섬유의 수가 뚜렷이 감소하였으며 ($P < 0.01$) 신경 섬유 두께가 가늘어진 소견을 보였다. 수평으로 진행하는 신경에서는 서로 연결되는 소견이 없고 수직으로 진행하는 신경들은 바로 표피로 진행하였다.

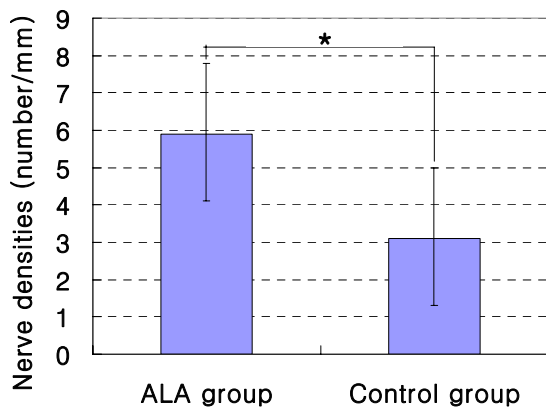


Fig. 4. Difference of epidermal nerve fiber densities between ALA administration group and control group.

* $P < 0.01$ compare to ALA administration and control group. ALA, alpha lipoic acid.

알파 리포산 투여군의 진피 상부에서 수평으로 진행하는 진피신경은 신경섬유가 서로 연결되어 있고 수직으로 진행하는 신경섬유는 표피 속으로 바로 진행하였다 (Fig. 3).

4. 표피신경 섬유의 반정량적 분석

발등 피부의 면역조직화학염색에 의해 나타난 표피신경의 밀도를 비교한 결과 표피 신경섬유 밀도는 알파 리포산 투여군 5.9 ± 1.9 개/mm, 대조군 3.2 ± 1.8 개/mm로 대조군에서 알파 리포산 투여군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

고 찰

당뇨병성 신경병증은 당뇨병의 가장 흔한 합병증으로 알려져 있지만 초기의 당뇨병성 신경병증의 진단을 위해 비침습적인 객관적 진단방법이 확립되어 있지 않고 정량적 감각 신경검사나 신경학적 증상에 의해 확인할 수 있다. 그러나 이것은 사람에서만 가능하고 동물실험에서는 불가능하다. 최근에 쥐에서 세 가지 종류의 주파수 (2,000 Hz, 250 Hz, 5 Hz)를 이용하여 피부를 통해 신경섬유에 선택적으로 자극을 가해 반응을 객관적으로 관찰할 수 있다는 보고가 있어¹¹⁾ 이를 이용하여 당뇨병의 진행에 따른 전류자극 역치의 변화를 관찰하였다.

본 연구에서 당뇨병의 진행에 따라 대조군에서 2,000 Hz (A β 섬유)와 250 Hz (A δ 섬유), 5 Hz (C 섬유) 모두에서 전류 자극 역치가 증가함을 관찰할 수 있었다. 그러나 알파 리포산을 투여한 군에서는 2,000 Hz와 250 Hz의 CPT는 유의하게 감소하였으며 ($P < 0.05$), 5 Hz의 CPT는 증가하는 경향을 보였으나 유의한 차이는 없었다 ($P > 0.05$). 이것은 알파 리포산으로 인해 A β , A δ 와 C 섬유 모두의 기능이 호전되거나 유지됨을 의미한다.

알파 리포산이 당뇨병성 신경병증의 주요한 증상인 통증, 감각이상, 작열감, 무감각 등을 개선시킨다는 보고는 많이 있지만 그 기전은 확실히 밝혀져 있지 않다. 많은 연구들에서 알파 리포산의 여러 가지 기전들이 제시되고 있지만 유리기를 해독시켜 항산화 효소의 활성을 증가시키거나, 유리기의 제거를 통한 지방의 과산화를 호전시켜 산화 스트레스를 감소시킨다는 가설이 가장 유력하다¹²⁾. 하지만 산화 스트레스의 감소에 의해 통증이 호전되는 기전에 관한 연구는 아직 없다.

PGP 9.5에 대한 항체를 이용한 염색방법으로 피부 신경의 분포를 조사하는 것이 당뇨병성 신경병증의 연구에 매우 유효하다는 것은 널리 알려져 있다¹³⁻¹⁶⁾. 신경섬유의 길이를 정량화 하는 것보다 반정량적 신경섬유 밀도 측정⁴⁾, 슬라이드에 나타난 부위의 신경을 측정하는 법¹⁷⁾, 그리고 미세 구조를 평가하는 법¹⁸⁾ 같은 방법들이 먼저 제시되었다. 이러

한 방법들을 사용할 때 가장 중요한 것은 피부 신경의 정확한 정량화이다. 앞의 방법들은 2차원 구조만 측정할 수 있고 신경의 분포는 3차원 구조로 진행하기 때문에 정확히 측정할 수 없다. 또한 표피 신경 밀도는 부위뿐만 아니라 같은 부위의 슬라이드에 따라서도 차이가 있으므로 측정 시마다 변이를 작게 하고 반복성을 높이는 것이 중요하다¹⁹⁾. 본 연구에서도 표피신경 밀도의 결과에 대한 검사자간 변이를 낮추고, 반복성을 높이기 위해 한 사람의 연구자에 의해 두 군에 대한 정보를 알려주지 않은 상태에서 양 군 모두 같은 슬라이드에서 표피신경의 밀도가 가장 높은 부분에서 측정하였다.

본 연구의 결과에서 대조군에서는 당뇨병의 진행에 따라 표피신경 밀도가 유의하게 감소하였으나 알파 리포산을 투여한 군에서는 유의한 감소가 일어나지 않았다. 이는 정확한 기전은 알 수 없지만 알파 리포산이 말초신경 섬유에 보존 효과가 있음을 의미한다. 또한 시험기간 동안 두 군 사이에서 혈당이나 체중의 유의한 차이를 보이지 않았는데, 이는 본 연구에서 투여한 알파 리포산의 양이 송 등²⁰⁾이 발표한 항 당뇨병 효과나 체중감소 효과를 보인 알파 리포산의 용량에 비해 매우 적었기 때문으로 생각되며 (80 mg/kg/일 vs 200 mg/kg/일), 당뇨병성 말초 신경병증의 증상완화나 표피신경 보존효과가 혈당의 조절이나 체중의 변화와 관계 없이 일어났음을 의미한다.

이상의 결과에서 당뇨병성 신경병증이 유발된 OLETF 쥐에 투여한 알파 리포산이 피하 말초신경 보존효과가 있으며, 특히 A β , A δ 섬유와 C 섬유 모두에 보존효과가 있는 것으로 생각된다. 본 연구의 결과는 약물 투여 후 시간의 경과에 따라 나타난 결과로, 이러한 결과를 보이는 기전에 대한 추가 연구가 필요하다. 또한 신경섬유의 밀도와 증상 호전의 관계에 대한 연구도 더 필요할 것으로 생각된다.

요 약

연구 배경: 당뇨병성 신경병증에서 말초신경섬유에 대한 연구는 무수신경섬유의 평가방법이 제한되어 유수신경만으로 한정되어 시행되었으나 최근에 민감한 면역조직학적 방법의 개발로 작은 무수신경을 확인하고 정량화할 수 있게 되었다. 피부 생검에 의한 피하 신경의 평가가 당뇨병성 말초신경병증의 정도를 평가하는데 매우 유용하게 사용된다. 알파 리포산 투여는 당뇨병환자의 다발성 말초신경병증의 증상을 호전시키고, 쥐에서 영양신경의 내막신경혈류를 증가시키며 신경전도속도를 호전시키나 말초신경의 보존효과 및 형태학적 변화에 대한 연구는 많지 않다.

대상 및 방법: OLETF쥐에서 30% 자당을 40주 동안 자유롭게 섭취시켜 당뇨병을 유발시킨 후 40주간 알파 리포산을 투여한 군과 대조군의 발등 피부 면역조직화학 검사를

시행하여 말초신경 밀도를 측정하고, Neurometer[®]CPT/C (Neurotron Inc, MD)를 사용하여 전류자극 역치의 변화를 측정하였다.

결과: 표피신경섬유의 수는 알파 리포산을 투여하지 않은 군에서 투여한 군에 비해 유의하게 감소하였다 ($P < 0.01$). 알파 리포산을 투여하지 않은 군에서 투여한 군에 비해 2,000, 250, 5 Hz의 전류자극 역치가 유의하게 증가하였다 ($P < 0.01$).

결론: 당뇨병성 신경병증 쥐에서 알파 리포산의 투여는 표피 신경 수의 보존과 전류자극 역치의 증가를 억제하는데 유용하다.

참 고 문 헌

1. Vinik AI, Park TS, Stansberry KB, Pittenger GL: *Diabetic neuropathies*. *Diabetologia* 43:957-73, 2000
2. Cameron NE, Eaton SE, Cotter MA, Tesfaye S: *Vascular factors and metabolic interactions in the pathogenesis of diabetic neuropathy*. *Diabetologia* 44:1973-88, 2001
3. Anand P, Terenghi G, Warner G, Kopelman P, Williams-Chestnut RE, Sinicropi DV: *The role of endogenous nerve growth factor in human diabetic neuropathy*. *Nat Med* 2:703-7, 1996
4. Levy DM, Terenghi G, Gu X-H, Abraham RR, Springall DR, Polak JM: *Immunohistochemical measurements of nerves and neuropeptides in diabetic skin: relationship to tests of neurological function*. *Diabetologia* 35:889-97, 1992
5. Wang L, Hilliges M, Jernberg T: *Protein gene product 9.5-immunoreactive nerve fibres and cells in human skin*. *Cell Tissue Res* 261:25-33, 1990
6. Holland NR, Crawford TO, Hauer P, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC: *Small-fiber sensory neuropathies: clinical course and neuropathology of idiopathic cases*. *Ann Neurol* 44:47-59, 1998
7. Ziegler D, Gries FA: *Alpha-lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy*. *Diabetes* 46 [Suppl 2]:S62-6, 1997
8. Ziegler D, Nowak H, Kempler P, Vargha P, Low PA: *Treatment of symptomatic diabetic polyneuropathy with the antioxidant α -lipoic acid: a meta-analysis*. *Diabet Med* 21:114-21, 2004
9. Kawano K, Hirashima T, Mori S, Natori T: *OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) rat: a new*

- NIDDM rat strain. Diabetes Res Clin Pract* 24:S317-20, 1994
10. Nakamura J, Hamada Y, Sakakibara F, Hara T, Wakao T, Mori K, Nakashima E, Naruse K, Kamijo M, Koh N, Hotta N: *Physiological and morphometric analyses of neuropathy in sucrose-fed OLETF rats. Diabetes Res Clin Pract* 51:9-20, 2001
 11. Kiso T, Nagakura Y, Toya T, Matsumoto N, Tamura S, Ito H, Okada M, Yamaguchi T: *Neurometer measurement of current stimulus threshold in rats. J Pharmacol Exp Ther* 297:352-6, 2001
 12. Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB: *Effects of -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. J Nutr Biochem* 14:288-94, 2003
 13. McCarthy BG, Hsieh ST, Stocks A, Hauer P, Macko C, Cornblath DR, Griffin JW, McArthur JC: *Cutaneous innervation in sensory neuropathies: evaluation by skin biopsy. Neurology* 45:1848-55, 1995
 14. Levy DM, Abraham RR, Abraham RM: *Small and Large-Fiber Involvement in Early Diabetic Neuropathy: A Study With the Medical Plantar Response and Sensory Thresholds. Diabetes Care* 10, NO.4:441-7, 1987
 15. Levy D, Abraham R, Reid G: *A comparison of two methods for measuring thermal thresholds in diabetic neuropathy. J Neurol Neurosurg Psychiatry* 52:1072-7, 1989
 16. Polydefkis M, Hauer P, Griffin JW, McArthur JC: *Skin Biopsy as a Tool to Assess Distal Small Fiber Innervation in Diabetic Neuropathy. Diabetes Technol Ther* 3:23-8, 2001
 17. Properzi G, Francavilla S, Poccia G, Aloisi P, Gu XH, Terenghi G, Polak JM: *Early increase precedes a depletion of VIP and PGP-9.5 in the skin of insulin-dependent diabetics--correlation between quantitative immunohistochemistry and clinical assessment of peripheral neuropathy. J Pathol* 169:269-77, 1993
 18. Yasuda H, Terada M, Maeda K, Kogawa S, Sanada M, Haneda M, Kashiwagi A, Kikkawa R: *Diabetic neuropathy and nerve regeneration. Prog Neurobiol* 69:229-85, 2003
 19. Hirai A, Yasuda H, Joko M, Maeda T, Kikkawa R: *Evaluation of diabetic neuropathy through the quantitation of cutaneous nerves. J Neurol Sci* 172:55-62, 2000
 20. Song KH, Lee WJ, Koh JM, Kim HS, Youn JY, Park HS, Koh EH, Kim MS, Youn JH, Lee KU, Park JY: *alpha-Lipoic acid prevents diabetes mellitus in diabetes-prone obese rats. Biochem Biophys Res Commun* 326:197-202, 2005