

Aus der Medizinischen Klinik I
der Universität zu Lübeck
komm. Direktor:
Prof. Dr. med. T. Wagner

**Intranasales Insulin verbessert das menschliche Gedächtnis:
Insulin Aspart erzielt noch stärkere Effekte**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Katrin Schmitz
aus Osnabrück

Lübeck 2006

1. Berichterstatter:

Prof. Dr. med. Werner Kern

2. Berichterstatter/Berichterstatterin:

Priv.-Doz. Dr. med. Rebekka Lencer

Tag der mündlichen Prüfung:

29.07.2008

Zum Druck genehmigt:

29.07.2008

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis	III
Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	IV
1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	2
2.1 Insulin	2
2.2 Wege des Insulins in das Gedächtnis	5
2.3 Das Insulinanalogon Insulin Aspart	7
2.4 Insulin und Morbus Alzheimer	10
2.5 Insulin und kognitive Funktionen	13
2.6 Zielsetzung	15
3. Methoden und Material	16
3.1 Versuchspersonen	16
3.2 Studiendesign	17
3.3 Zeitplan	18
3.4 Studienablauf	19

4. Testbeschreibung	20
4.1 Wortliste	20
4.2 Wordstem Priming	21
4.3 Stoop Test	21
4.4 Blutabnahme	22
5. Statistik	23
6. Ergebnisse	24
6.1 Laborparameter	24
6.1.1 Plasmaglukose und Seruminsulin	24
6.1.2 Blutbild	25
6.2. Kognitive Parameter	25
6.2.1 Wortliste	25
6.2.2 Wordstem Priming	28
6.2.3 Stroop Test	28
7. Diskussion	29
7.1 Kognitive Parameter	30
7.1.1 Wortliste	30
7.1.2 Wordstem Priming	33
7.1.3 Stroop Test	34
7.2 Laborparameter	34
7.2.1 Plasmaglukose und Seruminsulin	34

7.3 Schlussfolgerung	35
8. Literaturverzeichnis	37
9. Anhang	48
9.1 Protokoll für T0, T2, T9	48
9.2 Protokoll für die wöchentlichen Untersuchungen	49
9.3 Wortliste	50
9.4 Wordstem Priming	51
9.5 Stroop Test	57
10. Danksagung	60
11. Lebenslauf	61

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Bereiche mit einer hohen Dichte an Insulinrezeptoren	4
Abbildung 2: Strukturformel von Insulin Aspart	8
Abbildung 3a: Vergleich von Insulinkonzentrationen im Serum	9
Abbildung 3b: Vergleich von Glukosekonzentrationen im Serum	9
Abbildung 4: Zeitplan	19
Abbildung 5a und 5b: Korrekt erinnerte Wörter der Wortlisten	27

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Plasmaglucose- und Seruminsulinkonzentrationen	25
Tabelle 2: Akutwirkung (T2) und subchronische Wirkung (T9) beim Stroop-Test	29

Abkürzungsverzeichnis

IDE	Insulin degrading enzym
GLUT	Glukosetransporter
ZNS	Zentrales Nervensystem
ICT	Intensivierte konventionelle Insulintherapie
PHF	Paired Helical Filament
IGF	Insulin growth factor
APOE	Apolipoprotein E
fMRT	funktionelle Magnetresonanztomografie
BMI	Body Mass Index
IU	International Unit
NMDA-Rezeptoren	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren
u.a.	unter anderem
v.s.	versus
HOMA	basal homeostatic model assessment

1. Zusammenfassung

Frühere Studien haben gezeigt, dass das Pankreashormon Insulin einen positiven Einfluss auf die kognitiven Leistungen des Menschen hat. Darüber hinaus wurden zahlreiche Insulinrezeptoren, insbesondere im Hippokampus und im limbischen System nachgewiesen. In weiteren Untersuchungen wurde durch die intranasale Verabreichung von regulärem Humaninsulin eine Verbesserung der deklarativen Gedächtnisform erzielt (Benedict et al., 2004). Die vorliegende Studie beschäftigt sich nun mit der Frage, ob die intranasale Gabe eines monomeren Insulinanalogon (Insulin Aspart) einen noch stärkeren und schnelleren Effekt auf das Gedächtnis erzielen kann als Humaninsulin. Denn im Gegensatz zum regulären Humaninsulin, welches aufgrund seiner chemischen Eigenschaften Hexamere bildet, liegt das Insulinanalogon Insulin Aspart in monomerer Form vor.

Zu diesem Zweck wurden 32 gesunde, männliche Probanden über einen Zeitraum von insgesamt zehn Wochen untersucht. Nach einer zweiwöchigen Baselinephase erfolgte eine randomisierte Aufteilung der Teilnehmer in drei Gruppen, in denen sie doppelblind entweder Humaninsulin, Insulin Aspart oder Placebo (jeweils 4x40IE/Tag) erhielten. Zur Überprüfung der Gedächtnisfunktion wurden verschiedene kognitive Tests durchgeführt. Der Einfluss auf das deklarative Gedächtnis wurde mit Hilfe von Wortlisten überprüft, die den Probanden vorgetragen wurden und sowohl sofort als auch nach einer Woche wiedergegeben werden sollten. Mit dem so genannten Wordstem Priming, einem Test zur Überprüfung des nicht-deklarativen Gedächtnisses, sollten eventuelle Veränderungen dieser Gedächtnisfunktion nachgewiesen werden. Effekte auf die selektive Aufmerksamkeit wurden unter Verwendung des Stroop Tests ermittelt. Weder die Blutglukose- noch die Plasmainsulinspiegel zeigten im Verlauf signifikante Unterschiede

zwischen den verschiedenen Gruppen. Wie bereits veröffentlicht (Benedict et al., 2004), führte die achtwöchige Gabe von Humaninsulin zu einer signifikanten Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses im Vergleich zur Placebobedingung ($p < 0.05$). In der vorliegenden Studie konnten die mit Insulin Aspart behandelten Probanden im Vergleich sowohl mit der Placebogruppe ($p < 0.01$) als auch mit der Humaninsulingruppe von Benedict et al. ($p < 0.05$) nach achtwöchiger Gabe signifikant mehr Wörter erinnern. Somit konnte in dieser Versuchsreihe gezeigt werden, dass die intranasale Gabe von Insulin Aspart eine noch stärkere Verbesserung der deklarativen Gedächtnisleistung bewirkt als Humaninsulin. Da beide Insulinarten auf Rezeptorebene in gleicher Weise wirken (Kurtzhals, 2000), scheint die stärkere Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses nach Insulin Aspart durch einen effektiveren intranasalen Transport ins Gehirn bedingt zu sein. Vorteilhaft ist, dass die intranasale Einnahme von Insulin keinerlei systemische Nebenwirkungen hervorruft. Für die Zukunft sind diese Ergebnisse für die Behandlung von Patienten mit einer Schwäche kognitiver Funktionen, wie dies zum Beispiel bei Alzheimerpatienten der Fall ist, von wesentlicher Bedeutung. Die intranasale Applikation von Insulin kann eine nebenwirkungsarme und zukunftsweisende Behandlungsform darstellen.

2. Einleitung

2.1 Insulin

Insulin ist ein Proteohormon, das in den β -Zellen des Pankreas gebildet wird. Es besteht aus 2 Peptidketten, die als A-Kette (21 Aminosäuren) und B-Kette (30 Aminosäuren) bezeichnet werden. Diese beiden Ketten sind durch zwei Disulfidbrücken miteinander

verbunden. In der Peripherie ist Insulin dafür verantwortlich, die Blutglucosekonzentration während des Essens und des Fastens konstant zu halten. Unter physiologischen Bedingungen führt eine Erhöhung der Blutglucosekonzentration zu einer Steigerung der Insulinproduktion, was eine Aufnahme von Glucose in die Zellen und damit ein Absinken des Blutzuckers zur Folge hat. Der Abbau erfolgt dann in der Leber, den Nieren und den Muskeln durch das Insulin degrading Enzym (IDE). Außerdem fördert es die Aufnahme von Aminosäuren und Fetten und deren Umwandlung, sowohl in den Muskel- und Fettzellen als auch in der Leber, zu Glykogen, Triglyzeriden und Proteinen (Kahn, 1985). Die Verstoffwechslung von Glucose wird durch eine Vielzahl von Glucosetransportern (GLUTs) gewährleistet, die an den Membranen von Adipozyten und Muskelzellen lokalisiert sind. Insgesamt sind bis heute 13 verschiedene Untertypen bekannt, die alle verschiedene Insulinsensitivitäten aufweisen. So besitzen GLUT 1-3 eine geringe, GLUT 4 und 8 eine hohe Insulinsensitivität (Brant et al., 1993; El Messari et al., 1998).

Obwohl schon zahlreiche Wirkungen dieser wichtigen körpereigenen Substanz bekannt sind, wird Insulin bis jetzt nur zur Therapie des Diabetes mellitus eingesetzt. In der Vergangenheit wurde angenommen, dass Insulin nur in der Peripherie wirksam ist und nicht die Blut-Hirn Schranke passieren kann. Jedoch haben sich zahlreiche Versuchsreihen mit der Insulinwirkung auf das Gedächtnis beschäftigt und gezeigt, dass im Gehirn zahlreiche Insulinrezeptoren vorkommen. Verschiedene Arbeitsgruppen (z.B. Wickelgren et al., 1998) haben herausgefunden, dass das Gehirn der Ratte eine hohe Dichte von Insulinrezeptoren aufweist. Untersuchungen am Menschen haben bestätigt, dass auch dort eine große Zahl von Insulinrezeptoren im Gehirn vorhanden ist (Abbildung 1). Die höchste Rezeptordichte findet sich im Bulbus olfaktorius, Hypothalamus, Hippokampus und generell im Limbischen System (Unger et al., 1991). Auf zentraler Ebene hat Insulin zahlreiche Wirkungen. Einerseits hemmt es die Aktivität der Neurone im Hypothalamus

(Shibata et al., 1985) und Hippocampus (Palovcik et al., 1984), andererseits wird durch Insulin die Wiederaufnahme von Noradrenalin in die Neuronen verhindert (Masters et al., 1987; Oliver et al., 1989; Peinado und Meyers., 1991; Figlewicz et al., 1996).

Abbildung 1: Bereiche mit einer hohen Dichte an Insulinrezeptoren

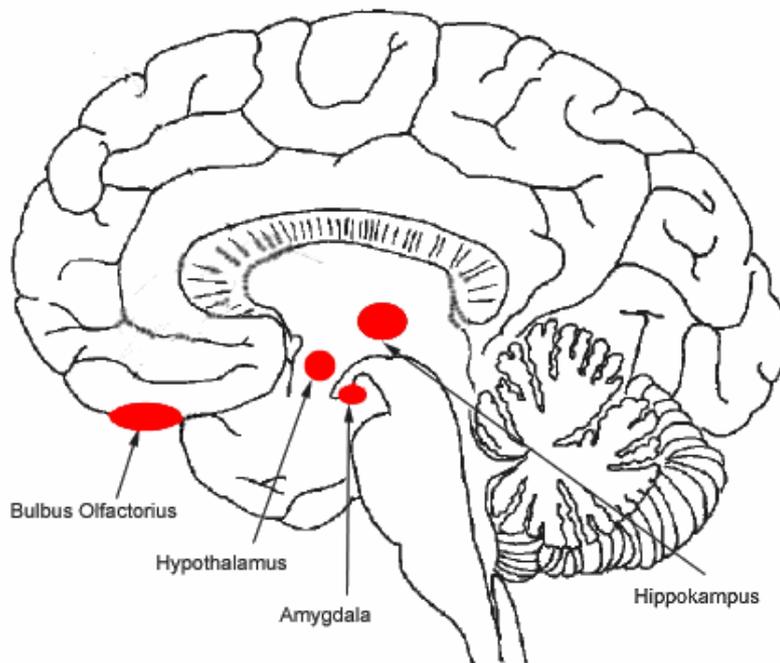


Abbildung 1:

Die roten Markierungen kennzeichnen die Bereiche mit einer besonders hohen Dichte an Insulinrezeptoren im ZNS des Menschen.

Außerdem besteht die Vermutung, dass Insulin eine wichtige Aufgabe in der Glucosebereitstellung im ZNS übernimmt (Doyle et al., 1995) und im zentralen Energiehaushalt sowie bei der Regulation der Nahrungsaufnahme eine Rolle spielt (Woods et al., 1990; Schwartz et al., 1992; Chavez et al., 1995; Brunning et al., 2000). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass sich Insulin im Gehirn durch einen gedächtnisverbessernden Effekt positiv auf kognitive Fähigkeiten auswirkt (Marfaing et al., 1990; Park et al., 2000; Kern et al., 2001). Aufgrund seiner zahlreichen zentralen Wirkungen wurde darüber nachgedacht, ob eine Störung des Insulinstoffwechsels der Grund für Erkrankungen des Gehirns sein könnte. Craft et al. (1998) haben zum Beispiel gezeigt, dass bei

Alzheimerpatienten ein Mangel an Insulin im Liquor besteht und dieser Mangel mit der Schwere der Demenz korreliert.

2.2 Weg des Insulins in das Gehirn

Die peripheren Wirkungen des Insulins sind derzeit sehr gut erforscht und dieses Wissen wird in der Diabetesbehandlung umgesetzt. Die bekannteste Applikationsform ist die subkutane Injektion. Von dort gelangt das Insulin direkt in den Blutkreislauf und kann dort die Blutzuckerregulation steuern.

Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine Barriere zwischen Blutkreislauf und Liquor dar, die das unerwünschte Übertreten von Substanzen in den Liquor verhindern soll. Sie wird von den Endothelzellen der Blutgefäße gebildet, die eng durch tight-junctions verbunden sind. Trotzdem gibt es Möglichkeiten, diese Barriere zu überwinden. Zum einen können sehr lipophile Stoffe die Schranke durch freie Diffusion durchwandern. Sehr kleine Moleküle nutzen die Poren, die zwischen den tight-junctions auftreten. Zum anderen existieren carriervermittelte Transportmechanismen, die z.B. Aminosäuren und Lactat in das Gehirn befördern. Einige Stoffe, wie auch das Insulin, haben wirkstoffspezifische Rezeptoren in den Zellen der Blut-Hirn-Schranke, welche nach Bindung des jeweiligen Wirkstoffes diesen in das Gehirn schleusen. Dabei ist es von großer Bedeutung, welche Polarität und Molekülgröße die verschiedenen Wirkstoffe aufweisen. Davon ist abhängig, mit welcher Geschwindigkeit und Wirksamkeit die Stoffe die Blut-Hirn-Schranke durchqueren können (Sakane et al., 1995). Insulin besitzt die Besonderheit, dass es sowohl über Lücken in der Blut-Hirn-Schranke, die so genannten zirkumventrikulären Organe (Van Houten und Posner, 1983), als auch über einen rezeptorvermittelten Transportmechanismus (Van Houten und Posner, 1983; Baskin et al., 1987; Schwartz et al., 1992) in das Gehirn gelangt.

Da aber in diesem Fall nur die zentralnervöse Wirkung des Insulins untersucht und keine Senkung des Blutzuckers herbeigeführt werden soll, wurde eine alternative Form gewählt, um Insulin direkt in das Gehirn zu transportieren. Die Beschreibung der intranasalen Applikationsform von Neuropeptiden durch Illum et al. (2000) machte auf dieses Verfahren aufmerksam. Insulin wird mit Hilfe eines Nasensprays in die Nase eingebracht. Von dort aus gelangt es, ohne den Umweg durch den systemischen Blutkreislauf, über den Nervus olfaktorius direkt in das Gehirn. Für diese Aufnahmeform sind drei Wege beschrieben. Eine Möglichkeit ist der transzelluläre Transport durch passive Diffusion oder mit Hilfe von rezeptorvermittelter Endozytose durch die Zellen des Nervus olfaktorius. Diese Art wird besonders von lipophilen Stoffen genutzt. Einige Stoffe diffundieren parazellulär durch die tight-junctions an ihren Wirkort und andere wandern am Axon (transaxonaler Transport) entlang und gelangen so von der Nasenhöhle in das Gehirn (Illum et al., 2000).

Die intranasale Einnahme von Insulin wurde schon in zahlreichen Studien verwendet und es hat sich gezeigt, dass der Blutglucose- und Seruminsulinspiegel von intranasal aufgenommenem Insulin nahezu unbeeinflusst bleibt (Kern et al., 1999, Born et al., 2002). Auf diesem Weg lassen sich systemische Hypoglykämien und Hypokaliämien vermeiden, die bei intravenöser Applikation auftreten und zu Verzerrungen und unerwünschten Wirkungen führen. Die intranasale Gabe von z.B. Peptidhormonen kann eine weitere Möglichkeit darstellen, therapeutisch wirksame Dosen der Stoffe in den Liquor zu transportieren. Benedict et al. (2004) haben eine Studie mit intranasaler Applikation von regulärem Humaninsulin durchgeführt, um heraus zu finden, ob sich unter Einnahme von regulärem Humaninsulin die Gedächtnisleistung der Versuchsteilnehmer verbessert. Es wurden 16 Männer und 16 Frauen über einen Zeitraum von acht Wochen in einer Doppelblindstudie unter intranasaler Gabe von Insulinlösung (4x40 IU pro Tag)

untersucht. Dieser Behandlungsphase ging eine zweiwöchige Baselinephase voraus. Im Laufe der Studie wurden verschiedene Gedächtnisparameter untersucht. Das deklarative Gedächtnis wurde mit Hilfe von Wortlisten erfasst, das nicht-deklarative mit dem Wordstem Priming. Die selektive Aufmerksamkeit testeten sie mit dem Stroop Test. Außerdem erforschten sie den Einfluss von Insulin auf die Stimmungslage der Probanden. Es stellte sich heraus, dass sich unter subchronischen Bedingungen, also nach acht Wochen der Insulinbehandlung, eine signifikante Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses in der Insulingruppe zeigte. Außerdem gaben die Teilnehmer dieser Gruppe eine verbesserte Stimmungslage an.

In der vorliegenden Studie wurde nun die Frage gestellt, ob ein monomeres Insulinanalogon die gezeigten Effekte durch eine schnellere und effektivere Wirkung auf das Gedächtnis übertreffen könnte.

2.3 Das Insulinanalogon Insulin Aspart

In der Diabetes-Behandlung kommen verschiedene Insulinanaloga, wie z.B. lang- und kurzwirksame Insuline, zur Anwendung. In der Gruppe von Benedict et al. (2004) wurde den Versuchsteilnehmern das reguläre Humaninsulin verabreicht. Dieses Insulin hat die Tendenz, sich zu Hexameren zusammen zu lagern und erst nach und nach im Körper zu Di- und Monomeren zu zerfallen und somit verzögert absorbiert zu werden (Kang et al., 1991). Das kurzwirksame Insulinanalogon Insulin Aspart (NovoRapid®) wird zur Behandlung von Diabetes im Rahmen der Intensivierten Konventionellen Insulintherapie (ICT) zur kurzfristigen Blutzuckersenkung während der Mahlzeiten eingesetzt. Im Gegensatz zum regulären Humaninsulin wurde die Aminosäure Prolin an der Stelle B28 durch Aspartat ersetzt (Abbildung 2).

Insulin Aspart wird nach subkutaner Injektion wesentlich schneller in den Blutkreislauf transportiert und bewirkt somit eine schnellere Senkung des Blutzuckers (Gammeltoft et al., 1999; Raslova et al., 2004; Hermansen et al., 2004) (Abbildung 3a und 3b). Grund für die schnellere Entfaltung der Insulinwirkung ist der Austausch der Aminosäure Prolin durch die Aminosäure Aspartat, wodurch die Fähigkeit Hexamere zu bilden verloren geht.

Abbildung 2: Strukturformel von Insulin Aspart

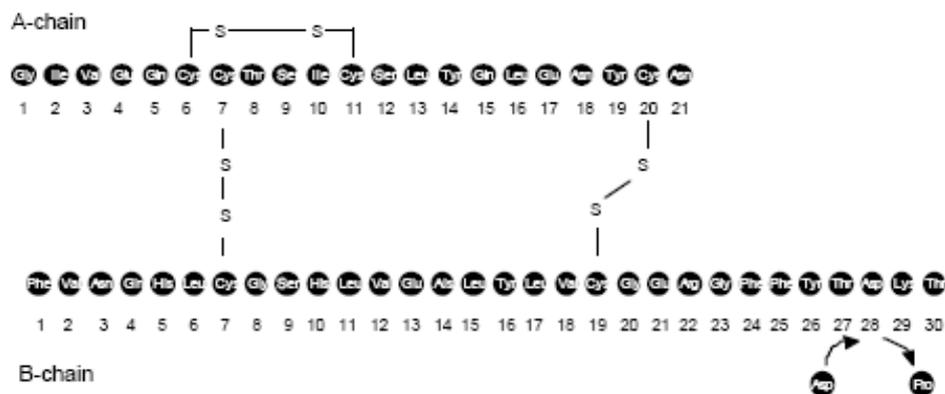
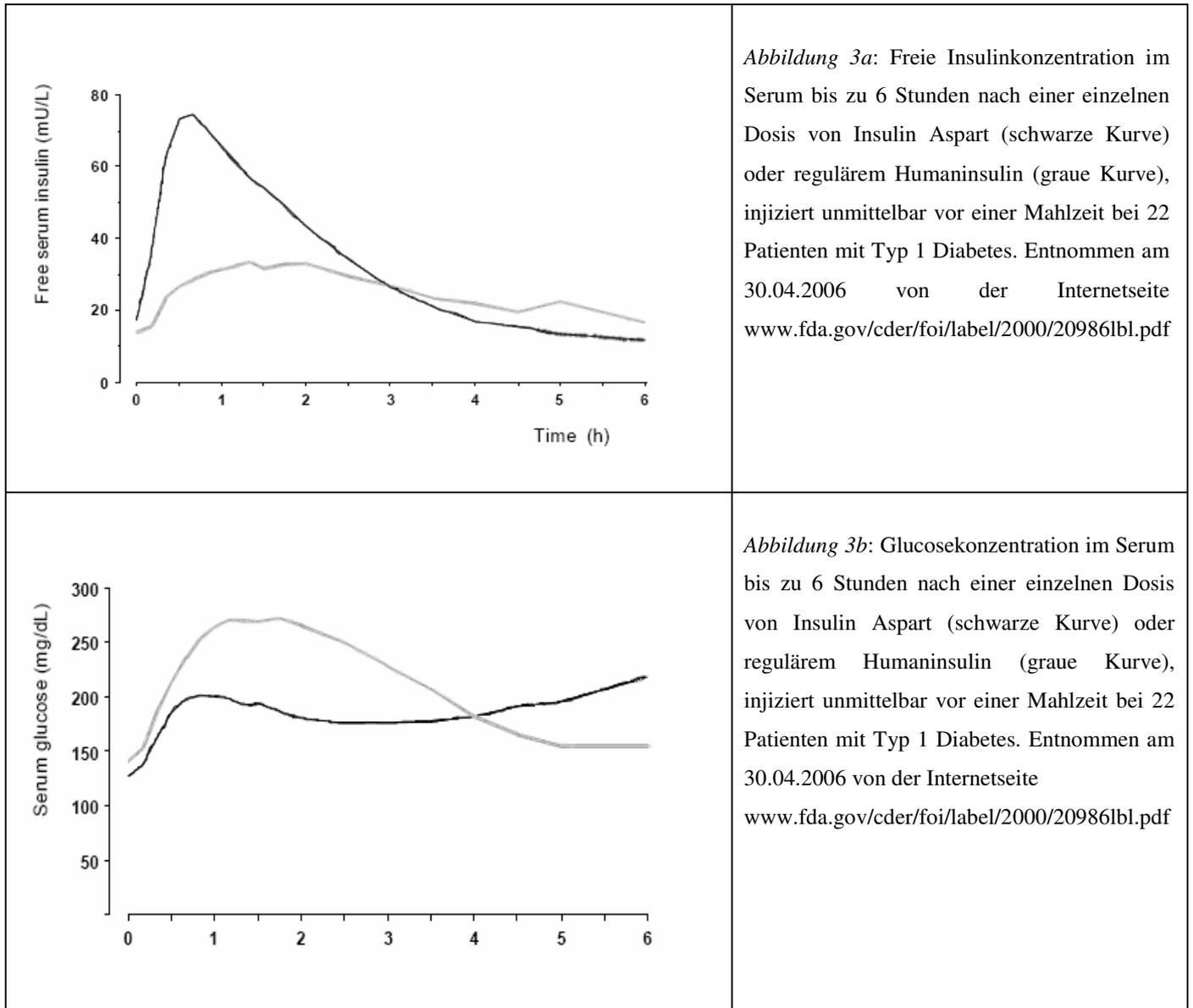


Abbildung 2: Strukturformel von Insulin Aspart. Entnommen am 30.04.2006 von der Internetseite www.fda.gov/cder/foi/label/2000/209861b1.pdf

Aufgrund dieser Struktur liegt Insulin Aspart gleich in monomerer und nicht wie Humaninsulin in hexamerer Form vor (Brange et al., 1990; Brange und Volund, 1999). So entfällt die Zeit, die beim Humaninsulin zur Umwandlung in Monomere benötigt wird.

Überlegung der vorliegenden Studie war, ob sich der chemische Aufbau auch bei der Passage von der Nase in das Gehirn bemerkbar macht und Insulin Aspart effektiver und schneller wirkt als das in der Studie von Benedict et al. verwendete Humaninsulin.

Abbildung 3a und 3b: Vergleich von Insulin- und Glukosekonzentrationen im Serum



Sakane et al. (1995) haben gezeigt, dass die Lipophililität und Molekülgröße eines Stoffes eine große Bedeutung dafür haben, in welcher Menge und mit welcher Geschwindigkeit Stoffe in das Gehirn gelangen können. Da beide Insuline nach Aufnahme ins Blut als Monomere vorliegen liegt die Vermutung nahe, dass Insulin Aspart, welches schon in monomerer Form aufgenommen wird, im Gegensatz zu Humaninsulin, welches in hexamerer Form aufgenommen, schneller und in größerer Konzentration in das Gehirn

gelangt. Somit könnte Insulin Aspart eine noch stärkere Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses erreichen. Nun kann die Hypothese aufgestellt werden, dass nach unmittelbarer Verabreichung des Insulin Asparts eine höhere Insulinkonzentration im Blut vorliegt, was einen unmittelbaren Transport bewirkt. In dieser Versuchsreihe wurde zur intranasalen Applikation das kurzwirksame Insulin Aspart (NovoRapid®) verwendet und deren Wirkung auf die Gedächtnisleistung im Vergleich mit Humaninsulin getestet.

2.4 Insulin und Morbus Alzheimer

Mit 60-80% ist die Demenz vom Alzheimer-Typ eine der häufigsten Demenzerkrankungen. Diese Erkrankung wird in drei Stadien eingeteilt: das Stadium der leichten, der mittelgradig schweren und schließlich das Endstadium, der schweren Demenz. Frühsymptom ist die Unfähigkeit, neue Informationen auf zu nehmen. Fakten und Ereignisse, an die sich ein Mensch bewusst erinnert, werden im deklarativen Gedächtnis gespeichert. Dieser Teil des Gehirns ist bei den Alzheimerpatienten gestört. Der Patient hat zunächst Schwierigkeiten mit neuen Situationen und findet sich allmählich auch in vertrauten Situationen nicht mehr zurecht. Vor allem das Kurzzeitgedächtnis lässt frühzeitig nach. Weitere wichtige Symptome der Demenz vom Alzheimer Typ sind Wortfindungsstörungen und Wortverwechslungen sowie Probleme bei der Abfolge der Bewegungsabläufe. Im schweren Krankheitsstadium treten Reflexe aus der frühen Kindheit, wie der Greifreflex und der Saugreflex, wieder auf. Nach weiterem Fortschreiten der Krankheit werden nahe Angehörige und Freunde nicht mehr erkannt. Ursache dieser Symptome ist eine langsam fortschreitende Degeneration von Nervenzellen vor allem im Hippokampus, Locus coeruleus und dem gesamten Kortex, welche sowohl makroskopisch durch z.B. Computertomographie als auch mikroskopisch durch Gewebeuntersuchungen darstellbar ist. Die wesentlichen mikroskopischen Kennzeichen der Alzheimer-Krankheit

sind Plaques, verklumpte Amyloidablagerungen und Fibrillen sowie ein massiver neuronaler Zelltod, der in bestimmten Hirnregionen bis zu 90% aller Nervenzellen betreffen kann. Alzheimerfibrillen sind fadenartige Ablagerungen innerhalb von Nervenzellen und bestehen aus zusammengelagerten Tau-Proteinen, die in Form von «Knäueln», sogenannten «Tangles» vorliegen. Tau-Proteine sind Mikrotubuli-assoziierte Proteine, die sich an die Axone der Neurone anlagern und so eine Stabilisierung der Neurone bewirken (Buee et al., 2000). Die Hauptbestandteile der Neurofibrillenbündel sind über- und abnormal phosphorylierte Tau-Proteine, die in Form von Paired Helical Filaments (PHFs) aggregieren. Die Hyperphosphorylierung reduziert die Affinität der Tau-Proteine, sich an die Mikrotubuli anzulagern (Bramblett et al., 1993). Die hyperphosphorylierte Form des Tau-Proteins ist ein wesentlicher Faktor in der Bildung von Neurofibrillen (Goedert et al., 1992). Dadurch werden die Neurone immer instabiler und degenerieren, ein weiterer Aspekt, der zur Entstehung der Alzheimer-Erkrankung beiträgt. Hong und Lee (1997) haben herausgefunden, dass Insulin und der Insulin-like growth factor 1 die Tau-Phosphorylierung reduzieren und die Bindung der Tau-Proteine an die Mikrotubuli fördern. Bei betroffenen Patienten wurde nachgewiesen, dass die Ausdehnung und die topographische Verteilung der neurofibrillären Läsionen mit dem Grad der Demenz korrelieren (Braak et al., 1991; Arriagada et al., 1992). Amyloide Plaques, welche auch als Alzheimer-Plaques bezeichnet werden, findet man am zahlreichsten extrazellulär. Die chemische Analyse ergab, dass der Hauptbestandteil ein Protein mit 39-43 Aminosäuren ist, das als β -Amyloid bezeichnet wird (Petrides und Becker, 2003), welches laut In-Vitro Studien neurotoxisch wirkt (Kienlen-Campard et al., 2002). Dies führt zum vermehrten Zelltod und somit zu einer Verschlechterung der Alzheimer-Symptomatik. Gasparini et al. (2001) haben in einer Studie herausgefunden, dass Insulin die intrazellulären Amyloidablagerungen reduziert. Einen weiteren Hinweis auf eine

Fehlregulation des Insulinmetabolismus im Gehirn von Alzheimerpatienten geben Frölich et al. (1998). Sie fanden heraus, dass bei Alzheimerpatienten die Aktivität der Insulinrezeptoren im Gehirn wesentlich geringer war als bei einer Kontrollgruppe. Kompensatorisch war die Anzahl der Rezeptoren im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht. Es wird vermutet, dass Morbus Alzheimer eine neuroendokrine Störung des ZNS sein könnte, die mit einer verringerter Expression von Genen, die den Insulin growth factor (IGF) I und II sowie IGF-I Rezeptoren kodieren, einhergeht (Rivera et al., 2005). Die Gabe von Insulin und Insulin-like Factors wirkt nicht nur protektiv auf das Gehirn, sondern fördert außerdem Prozesse wie Neurogenese und Synaptogenese (O'Kusky et al., 2000; van der Heide et al., 2005). Craft et al. (1998) haben in ihrer Versuchsreihe gezeigt, dass Alzheimerpatienten im Vergleich zu gesunden Testpersonen einen niedrigeren Insulinspiegel im Liquor und einen erhöhten im Plasma vorwiesen (Craft et al., 1998; Frölich et al., 1998). Sie schlossen aus ihren Ergebnissen, dass bei diesen Patienten eine Insulinresistenz in der Peripherie und ein Insulinmangel im Gehirn vorliegen. Des Weiteren zeigte sich, dass bei Betroffenen im Rahmen eines so genannten euglykämischen Clamps eine experimentell induzierte Hyperinsulinämie eine Verbesserung des Kurzzeitgedächtnisses bewirkt (Craft et al., 1996). Es mehren sich die Hinweise, dass eine Insulinresistenz Einfluss auf die Entwicklung von Alzheimer hat. Es wurde herausgefunden, dass Patienten mit Diabetes, und der damit verbundenen Insulinresistenz, ein höheres Risiko haben, an Alzheimer zu erkranken als gesunde Vergleichspersonen (Ott et al., 1996; Leibson et al., 1997). Offensichtlich weisen sowohl Diabetiker vom Typ 1 als auch vom Typ 2 zusätzlich zu Komplikationen an Augen, Nieren, Herz, Blutgefäßen und Nerven auch kognitive Defizite bezüglich Lernen und Gedächtnis auf (Gispens und Biessens, 2000; Knopman et al., 2001). Auch auf genetischer Ebene zeigt sich eine Prädisposition zu einem gestörten Insulinmetabolismus und dem damit verbundenen

erhöhtem Risiko an Alzheimer zu erkranken. Laut Corder et al. (1993) gibt es eine Verbindung zwischen einem gestörten Insulinmetabolismus und dem Apolipoprotein E (APOE) Genotyp. Patienten, die das APOE ϵ 4 Allel nicht besitzen und zusätzlich eine Hyperinsulinämie haben, stehen unter einem größeren Risiko an Alzheimer zu erkranken. Craft et al. (1998) haben in einer Studie gezeigt, dass Alzheimerpatienten, die das APOE ϵ 4 Allel nicht besitzen, im Vergleich zu gesunden Teilnehmern und ϵ 4-Homozygoten ein erhöhtes Verhältnis von Plasmainsulinkonzentration zu Liquorinsulinkonzentration hatten und eine höhere Insulindosis benötigten, um eine gedächtnisverbessernde Wirkung zu erzielen. Das deutet darauf hin, dass Insulinresistenz ein wesentlicher Faktor in der Entstehung der Alzheimer-Erkrankung sein könnte.

2.5 Insulin und kognitive Funktionen

Seit längerer Zeit verdichten sich die Hinweise, dass Insulin nicht nur an der peripheren Blutglucoseregulation beteiligt ist, sondern auch eine wesentliche Rolle bei den Gedächtnisfunktionen spielt. Das Gedächtnis wird in zwei verschiedene Formen unterteilt: Auf der einen Seite das deklarative Gedächtnis, das Fakten und Informationen speichert und auf der anderen Seite das prozedurale Gedächtnis, welches Bewegungsabläufe und -muster speichert (Squire, 1998). Squire und Zola-Morgan (1991) haben gezeigt, dass das deklarative Gedächtnis besonders in der medialen Temporalregion, dem Hippokampus und dem Gyrus Dentatus lokalisiert ist. Laut Wickelgren et al. (1998) ruft Insulin eine positive Beeinflussung der Gedächtnisleistung hervor. Außerdem wird vermutet, dass Insulin das neuronale Wachstum fördert (Wallace et al., 1997) und das Gehirn vor fokalen Ischämien schützt (Izumi et al., 1992).

Zhao et al. (1999) haben beschrieben, dass durch Gedächtnistraining (water maze tests) bei Ratten eine Zunahme der Insulinrezeptoren im Limbischen System und der

hippokampalen Region zu verzeichnen ist. Kern et al. (2001) haben daraufhin untersucht, ob Insulin auch bei gesunden Menschen eine Verbesserung der Gedächtnisleistung hervorruft. Heraus kam, dass besonders in der hippocampalen Region eine Reaktion auf eine Insulingabe zu finden war. Diese Annahme wurde schon in vorhergehenden Studien geäußert. Palovcik et al. (1984) haben beschrieben, dass Insulin die Feuerrate der Neurone im Hippokampus beeinflusst. Da der Hippokampus eine wesentliche Rolle in der Akquisition und dem Recall von Informationen (Squire, 1992) spielt und verschiedene Studien gezeigt haben, dass genau in dieser Region eine große Anzahl von Insulinrezeptoren (Unger et al., 1991) zu finden ist, liegt eine Einflussnahme der Insulinkonzentration im Liquor auf die deklarative Gedächtnisleistung nahe. Rotte et al. (2005) haben versucht, die Regionen, die besonders auf Insulin ansprechen, mit Hilfe der funktionellen Magnetresonanztomografie (fMRT) hervorzuheben. Diese Untersuchungsmethode dient dazu, stoffwechselaktive Regionen sichtbar zu machen. Dazu wurden die Hirnaktivitäten während verschiedener Gedächtnistests gemessen und dargestellt, wobei besonders der Fusiforme Gyrus im mediotemporalen Lappen auf Insulin ansprach. Nun galt es heraus zu finden, ob die intranasale Applikation von Insulin auch die Gedächtnisleistung bei Alzheimerpatienten verbessert. Craft et al. haben mehrere Studien mit Alzheimerpatienten durchgeführt und sich genau mit dieser Fragestellung beschäftigt. Dabei haben sie herausgefunden, dass eine Erhöhung der Insulinkonzentration im Liquor eine Verbesserung der Gedächtnisleistungen bei Alzheimerpatienten bewirkt. Eine neuere Studie mit Alzheimerpatienten hat herausgefunden, dass besonders Patienten, die das APOE ϵ 4 Allel nicht besitzen, eine Gedächtnisverbesserung unter Insulinzufuhr zeigen (Reger et al., 2005).

2.6 Zielsetzung

Nach dem anfänglichen Dogma, dass Insulin die Blut-Hirn-Schranke nicht durchqueren könne und somit keinerlei Wirkung auf das Gedächtnis habe, zeigte sich in vielen Studien, dass diese Vermutung falsch war. Basierend auf vorangegangene Untersuchungsergebnisse zeigten sich vor allem im Bulbus olfactorius, Hypothalamus, Hippokampus und im Limbischen System eine Vielzahl von Insulinrezeptoren. Aufgrund dieser Lokalisation lassen sich mehrere Vermutungen über Einflüsse von Insulin auf Gedächtnis und Aufmerksamkeit anstellen. Bereits in früheren Studien beobachtete man unter systemischer Insulingabe eine Verbesserung der deklarativen Gedächtnisfunktion. Um die systemischen Nebenwirkungen des Insulins zu umgehen, wurde in einer vorhergehenden Studie (Benedict et al., 2004) die Wirkung von intranasal aufgenommenem Humaninsulin auf die Gedächtnisleistungen untersucht. Neben Verbesserungen der Gedächtnisleistungen wirkte sich die intranasale Einnahme von Insulin nicht auf die Glukose- und Insulinkonzentrationen im Blut aus. Für die vorliegende Studie wurde ebenso die intranasale Applikationsform gewählt, um systemischen Nebenwirkungen vorzubeugen. Hier wurde versucht, eine Darreichungsform des Insulins zu finden, die noch schneller und effektiver in das Gehirn eindringt, als es das Humaninsulin der Vorgängerstudie (Benedict et al., 2004) getan hat.

Die Hypothesen:

- Insulin Aspart ruft eine stärkere Verbesserung der deklarativen Gedächtnisleistung hervor als reguläres Humaninsulin.
- Insulin Aspart hat keinen Einfluss auf die nicht-deklarative Gedächtnisleistung.
- Die selektive Aufmerksamkeit wird durch Insulin Aspart verbessert.

3. Methoden und Material

3.1 Versuchspersonen

An dieser Versuchsreihe nahmen 36 männliche, normalgewichtige Probanden im Alter von 18-35 Jahren, Body-Mass-Index (BMI) $<25 \text{ kg/m}^2$ teil. Bei einer Voruntersuchung wurden der Blutdruck, die Herzrate, das Körpergewicht und die Größe bestimmt und sichergestellt, dass alle einen BMI zwischen 18,5 und 25 aufweisen. Außerdem wurden Ausschlusskriterien erfasst, wozu bekannte psychiatrische, neurologische, kardiovaskuläre, pulmonale, endokrinologische und gastroenterologische Erkrankungen und/oder arterieller Hypertonus mit Medikation ($>150/90$), Diabetes mellitus, Fettstoffwechselstörungen, Hyperlipoproteinämie ($>$ doppelte Norm), Rauchen (mehr als drei Zigaretten am Tag), regelmäßige Medikamenteneinnahme und Essstörungen in der Anamnese zählten. Die Versuchsteilnehmer wurden vor Beginn der Untersuchung darauf hingewiesen, dass sie nüchtern zu der Voruntersuchung kommen sollten. Außerdem sollte ein normaler Schlaf-Wach-Rhythmus vorliegen, d.h. die Probanden sollten keine Nachtwachen oder Schichtarbeit in den letzten Nächten absolviert haben. Nachfolgend wurden folgende Blutparameter bestimmt: Creatinin, Gamma-Glutamyltransferase, Natrium, Calcium, Kalium, Harnstoff, Harnsäure, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Testosteron im Serum, Nüchtern-glucose, Osmolalität, TSH basal, Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Thrombozyten und MPV. Vor Beginn der Studie wurden alle 36 Probanden auf drei Gruppen aufgeteilt und nach Alter und BMI randomisiert (Humaninsulin: 25.83 ± 1.70 Jahre, Insulin Aspart: 24.67 ± 1.65 Jahre, Placebo: 26.25 ± 1.63 Jahre) und BMI (Humaninsulin: $22.60 \pm 0.60 \text{ kg/m}^2$; Insulin Aspart: $23.52 \pm 0.28 \text{ kg/m}^2$; Placebo: $23.24 \pm 0.43 \text{ kg/m}^2$). 12 der

Probanden erhielten das Insulinanalogon Insulin Aspart (Insulin NovoRapid® HM, Novo Nordisk, Mainz, Germany), 12 Probanden erhielten das reguläre Humaninsulin (durchgeführt von Benedict et al., 2004) (Insulin Actrapid® HM, Novo Nordisk, Mainz, Germany) und 12 eine Placebolösung (HOE 31 dilution buffer for H-Insulin, Aventis Pharma, Bad Soden, Germany).

Die Zuteilung erfolgte doppelt-blind. Die Studie wurde durch die Ethikkommission der Universität zu Lübeck (Aktenzeichen 03-159) genehmigt, alle Teilnehmer waren umfassend aufgeklärt und haben vor Studienbeginn eine Einverständniserklärung unterschrieben.

Die Ergebnisse der Humaninsulingruppe (12 Probanden) und die der Placebogruppe (12 Probanden) stammen von einer bereits durchgeführten Studie (Benedict et al., 2004). Um möglichen Fehlern vorzubeugen, die durch die unterschiedlichen Untersucher auftreten könnten, wurden alle Gruppen mit exakt den gleichen Untersuchungsbedingungen konfrontiert. So fanden z.B. alle Untersuchungen in demselben Untersuchungsraum, zur selben Tageszeit und nach einem genauen Untersuchungsplan statt. So wurde gewährleistet, dass die Teilnehmer aller Gruppen unter standardisierten Bedingungen getestet wurden. Außerdem wurden die Gedächtnistests und körperlichen Untersuchungen nach einem festgelegten Zeitplan (siehe Anhang) durchgeführt, so dass bei jedem Probanden derselbe Untersuchungsablauf stattfand. Mit diesen Maßnahmen wurde versucht, der Einfluss von äußeren Bedingungen möglichst gering zu halten

3.2 Studiendesign

Für jeden Versuchsteilnehmer, der nach der Eingangsuntersuchung für diese Studie in Frage kam, wurden elf Untersuchungstage angesetzt; drei größere Untersuchungen und

wöchentliche Kontrolluntersuchungen, so dass die gesamte Studie über zehn Wochen andauerte. Bei diesen Untersuchungen wurden die Probanden, genau wie bei der Eingangsuntersuchung, darauf hingewiesen, nüchtern zur Untersuchung zu kommen und die Nächte davor keine Nachtschichten zu absolvieren.

Den Versuchsteilnehmern wurde erklärt, dass sie vier Mal täglich zwei Hübe des Nasensprays in jedes Nasenloch applizieren sollten. Sie erhielten je nach Gruppe pro Einnahme 0.4 ml Insulin Aspart (entspricht 40 IU), 0.4 ml Humaninsulin (entspricht 40 IU) oder 0.4 ml einer Pufferlösung. Insgesamt nahmen die Probanden täglich eine Menge von 1.6 ml (160 IU) Insulin oder Placebolösung ein. Sie wurden aufgefordert, jede Einnahme auf einem Protokoll zu dokumentieren. Die Einnahme sollte jeweils vor den Mahlzeiten (morgens, mittags, abends) und vor der Nachtruhe erfolgen. Zwischen den Einnahmen sollte das Spray kühl (4° C) gelagert werden. Außerdem wurden die Versuchsteilnehmer darauf hingewiesen, an den Untersuchungstagen das Spray erst nach Erhalt einer neuen Flasche und eines neuen Einnahmeprotokolls während der Untersuchung einzunehmen.

3.3 Zeitplan

Zur Ermittlung einer Baseline wurde in den ersten beiden Wochen (T0 und T1) allen Teilnehmern nur Placebo verabreicht. Danach wurden die Probanden in die drei Gruppen unterteilt. Ziel war es hier, die Akutwirkung des Insulin Asparts auf kognitive und nichtkognitive Parameter im Vergleich mit Humaninsulin und Placebo zu testen (Abbildung 4). Am Untersuchungszeitpunkt T9 und T10 bekamen wiederum alle Teilnehmer Placebo, um die subchronische Wirkung des Insulins zu testen.

Abbildung 4: Zeitplan

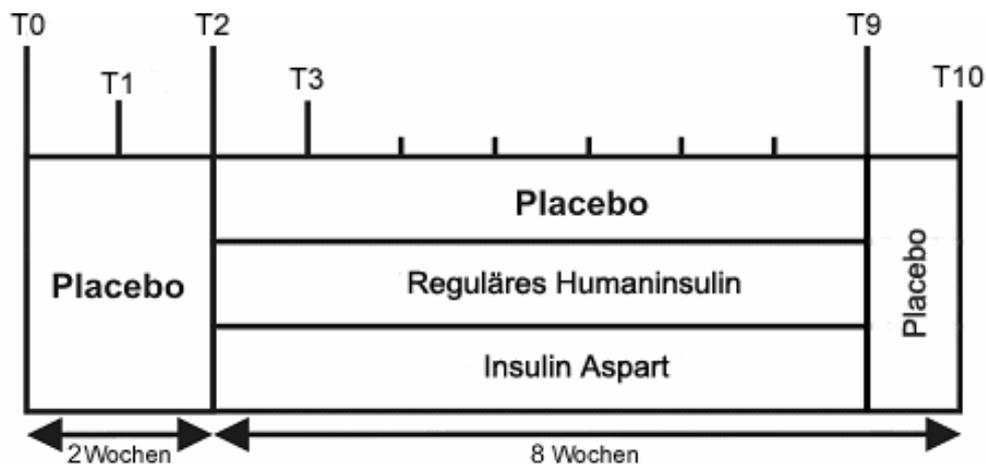


Abbildung 4: Zeitplan der Studie. Sofortabfrage der Gedächtnistests bei T0, T2 und T9. Spätabfrage bei T1, T3 und T10.

Zum Zeitpunkt T0 (nach der ersten Applikation von Placebo), nach der Baseline (T2) und nach dem Treatment (T9) wurden die im Abschnitt „Testbeschreibung“ (S.20) näher beschriebenen Gedächtnis- und Konzentrationstests durchgeführt. Bei den Untersuchungen T1, T3 und T10 fand die Spätabfrage dieser Tests statt. An den Untersuchungstagen T4-T8 wurden die auf Seite 22 beschriebenen Laborwerte kontrolliert.

3.4 Studienablauf

Zu Beginn der größeren Untersuchungstage (T0, T2 und T9) bekam jeder Proband sein neues Nasenspray und wurde angewiesen es zu applizieren. 60 Minuten nach Einnahme fand zuerst die Blutabnahme statt. Anschließend starteten der deklarative Gedächtnistest in Form einer Wortliste, der Stroop Test und das Wordstem Priming als prozeduraler Gedächtnistest.

Zum Zeitpunkt T9 bekam jeder Proband direkt vor den Tests (Sofortabfrage von Wortliste und Wordstem Priming) die Placebolösung, während bei T10 zwischen Placebogabe und Tests (Stroop Test, Spätabfrage von Wortliste und Wordstem Priming)

wiederum 60 Minuten lagen. Die Gabe von Placebo an den letzten beiden Untersuchungstagen sollte eine Akutwirkung des Insulins ausschließen, so dass eine mögliche subchronische Wirkung von Insulin gemessen werden konnte.

Die kleinen wöchentlichen Untersuchungen (T4-T8) dienten einerseits dazu, eine neue Flasche Nasenspray und ein neues Einnahmeprotokoll an die Probanden zu verteilen, und andererseits wurden die gleichen Blutwerte wie bei den größeren Untersuchungen und der Eingangsuntersuchung (siehe S.22) bestimmt. An den Untersuchungstagen nach den größeren Untersuchungen (T1, T3) und bei T10 wurde eine Spätabfrage (delayed recall) der Wortliste und des Wordstem Priming durchgeführt.

4. Testbeschreibung

4.1 Wortliste

Nach einer 60-minütigen Pause startete als erster Test eine standardisierte und validierte Wortliste zur Überprüfung des deklarativen Gedächtnisses (Fruehwald-Schultes et al., 2000; Kern et al., 2001). Die aus 30 Wörtern bestehende Liste wurde mit einem Tempo von einem Wort pro Sekunde vorgelesen und die Teilnehmer wurden aufgefordert, alle Wörter, die ihnen nach drei Minuten noch im Gedächtnis geblieben sind, aufzuschreiben (Sofortabfrage [immediate recall]). Eine Woche später fand die Spätabfrage (delayed recall) statt, bei der wiederum alle erinnerten Wörter aufgelistet werden sollten. Es existierten drei verschiedene Versionen der Wortlisten, die in zufälliger Reihenfolge auf die Probanden verteilt wurden. So wurde jedem Teilnehmer ein unbekanntes Exemplar vorgelesen und es wurde sichergestellt, dass jeder Teilnehmer alle drei Versionen der

Wortliste erhielt. Dokumentiert wurden jeweils die Anzahl der richtig erinnerten Wörter in den verschiedenen Kategorien.

4.2 Wordstem Priming

Zur Überprüfung des prozeduralen Gedächtnisses diente das Wordstem Priming (Plihal und Born, 1999a). Der Test bestand aus zwei verschiedenen Listen; in der ersten wurden die Probanden aufgefordert, verschiedene Wörter nach ihrem Klang zu beurteilen (von 1= unangenehm bis 5= angenehm). Dies diente dazu, das implizite Lernen anzuregen („bekannte Liste“). In der zweiten Liste sollten verschiedene Wortanfänge (bestehend aus zwei Buchstaben) zu einem Wort ergänzt werden (z.B. NA-Nagel). Insgesamt bestand jede Liste aus 52 Wörtern, die nach Länge, Emotionalität und Bedeutung randomisiert waren. Direkt im Anschluss an den ersten Teil (Sofortabfrage bei T0, T2 und T9) wurden die Teilnehmer aufgefordert, den zweiten Teil des Tests auszufüllen. Dieser beinhaltete die schon oben erwähnten 52 Wortanfänge. 26 entstammten aus den in der ersten Liste schon beurteilten Wörtern; sie waren den Teilnehmern also bekannt. Die restlichen 26 entstammten aus einer unbekanntem Liste. Aufgabe war es, die Wortanfänge zu einem Substantiv zu vervollständigen. Dabei sollten die Probanden das erste passende Wort, das ihnen in den Sinn kam, aufschreiben. Dokumentiert wurden die richtig ergänzten Wörter. Das bedeutet, dass die Wörter gezählt wurden, die in der ersten Liste aufgetaucht und in der zweiten Liste von den Teilnehmern ergänzt worden waren. Dieser Anzahl wurden die zufällig ergänzten Wörter der unbekanntem Liste entgegengesetzt.

4.3 Stroop Test

Als Letztes wurde bei allen größeren Untersuchungen der Stroop Test mit den Teilnehmern durchgeführt. Bei diesem Test sollte die selektive Aufmerksamkeit der Probanden getestet

werden. Er bestand aus 3 verschiedenen Teilen: Worte-Lese-Teil, Farben-Benennung-Teil und dem Interferenz-Teil. Im Wort-Lese-Teil wurden die Teilnehmer aufgefordert, verschiedene Farbwörter (rot, gelb, grün, blau), die in schwarzer Tinte gedruckt waren, in 45 Sekunden so schnell und so richtig wie möglich vorzulesen. Beim zweiten Teil, dem Farben-Benennungs-Teil, bekamen die Probanden farbig gedruckte Kreuze (X). Die Aufgabe war wiederum, 45 Sekunden lang die Farben aufzuzählen. Der Interferenz-Teil kombinierte die ersten beiden Testteile miteinander: Die Teilnehmer erhielten farbig gedruckte Farbwörter, wobei die gedruckte Farbe nicht mit dem niedergeschriebenen Farbwort übereinstimmte (z.B. stand die Farbe „grün“ in blauer Druckfarbe). Aufgabe war es nun, die Druckfarbe der verschiedenen Farbwörter zu benennen. Dazu hatten sie wieder 45 Sekunden Zeit. Dieser dritte Teil diente zur Testung der selektiven Aufmerksamkeit (Golden C, 1978). Bei allen drei Abschnitten wurden die richtig und falsch genannten Farbenwörter gezählt und notiert.

4.4 Blutabnahme

Wöchentlich fand eine Blutabnahme statt. Dabei wurden die Parameter, die auch schon bei der Eingangsuntersuchung abgenommen worden waren, kontrolliert. Dazu gehörten Creatinin, Gamma-Glutamyltransferase, Natrium, Calcium, Kalium, Harnstoff, Harnsäure, Cholesterin, HDL-Cholesterin, LDL-Cholesterin, Triglyceride, Nüchtern glucose, Osmolalität, Leukozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, MCV, MCH, MCHC, Thrombozyten und MPV. Außerdem wurden Serumproben zentrifugiert und der Überstand mithilfe von Präzisionspipetten der Firma Eppendorf in Eppendorfgläser pipettiert und eingefroren. Aus diesen Proben erfolgte die Bestimmung der Insulinkonzentration im Serum (Pharmacia-Insulin RIA100, Pharmacia & Upjohn, Inc., Uppsala, Sweden).

Außerdem wurden Messungen auf der Grundlage des basal homeostatic model assessment (HOMA) durchgeführt (Wallace und Matthews, 2002). Dabei werden nüchtern Glucose- und Insulinkonzentrationen oder die C-Peptid-Konzentration zur Berechnung der Beta-Zell Funktion und der Insulinresistenz verwendet.

5. Statistik

Die Ergebnisse der Einstellphase wurden von den Ergebnissen der Behandlungsphase subtrahiert und im Anschluss die Differenzen mit Hilfe eines T-Tests für unabhängige Stichproben statistisch verglichen. Im Falle der wöchentlich erhobenen Daten (d.h. Insulin und Glucose) wurden T-Tests für unabhängige Stichproben nur dann durchgeführt, wenn die Varianzanalyse mit Messwiederholung (ANOVA, Faktoren: Behandlung, Zeit) signifikant wurde. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Das Signifikanzniveau betrug $p < 0.05$.

Folgende Differenzpaare ergaben sich:

- Wortliste Sofortabfrage, akut [T2 – T0]
- Wortliste Sofortabfrage, subchronisch [T9 – T0]
- Wortliste Spätabfrage, akut [T3 – T1]
- Wortliste Spätabfrage, subchronisch [T10 – T1]
- Wordstem priming Sofortabfrage, akut [T2 – T0]
- Wordstem priming Sofortabfrage, subchronisch [T9 – T0]
- Wordstem priming Spätabfrage, akut [T3 – T1]
- Wordstem priming Spätabfrage, subchronisch [T10 – T1]
- Stroop Test, akut [T2 – T0]

- Stroop Test, subchronisch [T10 – T0]
- Insulinkonzentration im Blut subchronisch [T2 bis T10 – T0]
- Nüchtern-glucose, subchronisch [T2 bis T10 – T0]

6. Ergebnisse

6.1 Laborparameter

6.1.1 Plasmaglukose und Seruminsulin

Die folgende Tabelle (Tabelle 1) zeigt die Seruminsulin- und Plasmaglukosekonzentrationen nach der Einnahme von Insulin Aspart, Humaninsulin und Placebo zu Beginn der Baseline (T0), zu Beginn der Behandlungsphase (T2) und zum Ende der Behandlung (T10). Wie in vorhergegangenen Studien gezeigt (Kern et al., 1999; Born et al., 2002, Benedict et al., 2004), bewirkt die intranasale Applikation von Insulin keine Veränderungen von Insulin- und Glucosespiegeln im Plasma. Das trifft sowohl für die Behandlung mit Humaninsulin als auch für die Behandlung mit Insulin Aspart zu.

Tabelle 1: Plasmagluco- und Seruminsulinkonzentrationen

	Insulin Aspart Mittel ± SEM	Humaninsulin Mittel ± SEM	Placebo Mittel ± SEM	p
Plasma Glucose (mmol/l)				
T0	4.93 ± 0.17	4.80 ± 0.13	4.93 ± 0.17	0.71
T2	4.71 ± 0.09	4.73 ± 0.03	4.72 ± 0.12	0.43
T10	4.94 ± 0.10	4.81 ± 0.09	4.74 ± 0.12	0.98
Serum Insulin (pmol/l)				
T0	54.73 ± 10.49	38.61 ± 4.79	46.18 ± 7.92	0.38
T2	37.16 ± 5.00	42.92 ± 4.10	50.84 ± 9.93	0.25
T10	45.57 ± 8.68	37.02 ± 5.00	45.07 ± 6.11	0.81

Tabelle 1: Plasma-Glucose und Serum-Insulinkonzentrationen der Insulin Aspart, Humaninsulin und Placebogruppe am Zeitpunkt (T0), (T2) und (T10). Mittelwerte und SEM. Alle Ergebnisse sind mit den Messwerten zu Beginn der Einstellungsphase (T0) als Covariaten abgeglichen.

6.1.2 Blutbild

Die übrigen Blutwerte (siehe S.22) zeigten im Verlauf der Versuchsreihe keine signifikanten Veränderungen. Die Messungen auf der Grundlage des basal homeostatic model assessment (HOMA) ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Placebo $23,31 \pm 5,61$; Humaninsulin $26,54 \pm 8,29$; Insulin Aspart $23,09 \pm 10,65$; $F(2,32)=0.56$, $p<0.43$).

6.2 Kognitive Parameter

6.2.1 Wortliste

Die Auswertung der Wortliste ergab, dass in der Baselinephase weder bei der Sofort- noch bei der Spätabfrage Unterschiede zwischen den beiden Insulingruppen und der

Placebogruppe festzustellen waren (Insulin Aspart vs. Humaninsulin vs. Placebo, Sofortabfrage: 11.25 ± 0.93 vs. 10.75 ± 0.93 vs. 12.17 ± 0.93 , $F(2,35)=0.60$, $p>0.55$; Spätabfrage: 5.83 ± 1.01 vs. 6.75 ± 1.01 vs. 8.33 ± 1.01 , $F(2,35)=1.57$, $p>0.22$). Die Analysen zeigten unter Insulin eine signifikante Verbesserung der Gedächtnisleistung bei der letzten Spätabfrage (delayed recall) acht Wochen nach Studienbeginn ($F(2,34)=10.12$, $p<0.0019$). Während die Anzahl der erinnerten Wörter nach Humaninsulin, verglichen mit Placebo, signifikant größer war ($F(1,21) = 1.18$, $p<0.03$), verursachte Insulin Aspart eine noch stärkere Verbesserung der Leistung bei der Spätabfrage der Wortliste ($F(1,21) = 0.33$, $p<0.05$ verglichen mit Humaninsulin; $F(1,22) = 3.81$, $p<0.001$ verglichen mit Placebo) (Abbildung 5a und 5b). Generell wurde im Verlauf der zehn Wochen in allen drei Gruppen eine Abnahme der Anzahl erinnerter Worte bei der Spätabfrage verzeichnet ($F(1,84)=11.09$, $p<0.02$) (Abbildung 5b). Diese Abnahme unterschied sich aber nicht signifikant zwischen den Gruppen (Insulin Aspart: 1.50 ± 0.51 Wörter, reguläres Humaninsulin: 1.27 ± 0.41 Wörter, Placebo: 1.67 ± 0.57 Wörter; $F(2,34)=0.15$, $p>0.86$ bei der Sofortabfrage; Insulin Aspart: 1.42 ± 0.45 Wörter, reguläres Humaninsulin: 1.25 ± 0.43 Wörter, Placebo: 1.25 ± 0.28 Wörter; $F(2,35)=0.06$, $p>0.94$ bei der Spätabfrage). In der Insulin Aspart Gruppe wurden trotz dieser Abnahme über die zehn Wochen signifikant mehr Wörter erinnert als in den anderen beiden Gruppen.

Sowohl bei Humaninsulin als auch bei Insulin Aspart wurden keine Verbesserungen der Gedächtnisleistungen beim Immediate Recall (Sofortabfrage) festgestellt.

Abbildung 5a und 5b: Korrekt erinnerte Wörter der Wortlisten

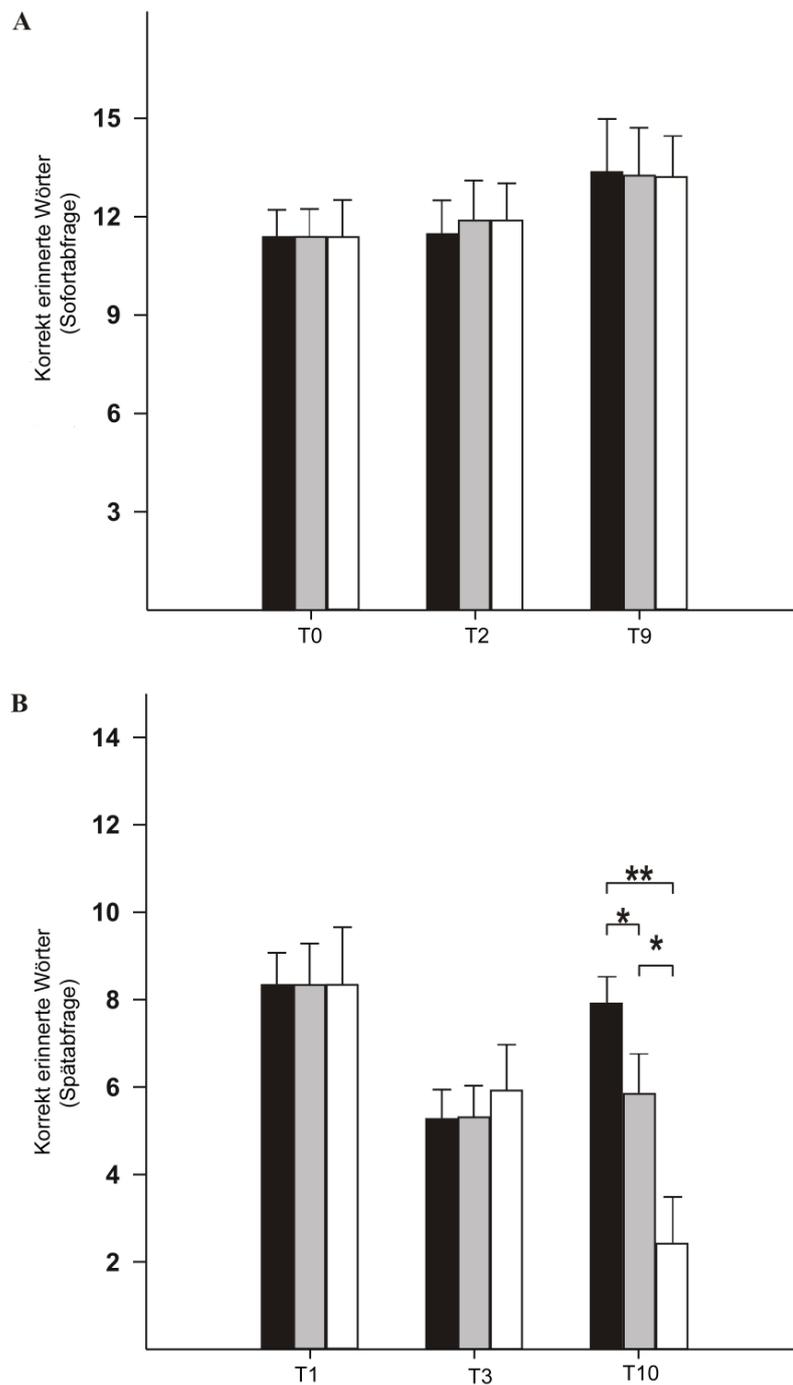


Abbildung 5a und 5b: Korrekt erinnerte Wörter der Wortlisten bei der Sofortabfrage (5a) zu den Zeitpunkten T0, T2 und T9 und bei der Spätabfrage (5b) bei T1, T3 und T10 im Vergleich zwischen Insulin Aspart (schwarz), Humaninsulin (grau) und Placebo (weiß). Mittelwerte und SEM. $P \leq 0,05$ [], $p \leq 0,01$ = hoch signifikant [**]. Alle Ergebnisse sind mit den Messwerten zu Beginn der Baseline (T0) als Covariaten abgeglichen.*

6.2.2 Wordstem Priming

In der vorliegenden Studie ist das nicht-deklarative Gedächtnis in Form des Wordstem Priming getestet worden. Weder unter Humaninsulin (4.95 ± 0.81 Wörter) noch unter Insulin Aspart (3.84 ± 0.54 Wörter) war nach akuter Einnahme (T2) im Vergleich mit Placebo (4.70 ± 0.94 , $F(2,34) = 0.52$, $p=0.60$) eine Verbesserung der Gedächtnisleistung zu verzeichnen. Auch nach subchronischer Gabe (T9) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen (Humaninsulin: 3.64 ± 1.06 ; Insulin Aspart: 3.92 ± 0.91 ; Placebo: 4.50 ± 0.85 , $F(2,34) = 0.13$, $p>0.88$).

6.2.3 Stroop Test

Die selektive Aufmerksamkeit wurde mit Hilfe des Stroop Tests gemessen (Tabelle 2). Die akute Insulinwirkung auf den Stroop Test wurde zum Zeitpunkt T2, 60 Minuten nach der ersten intranasalen Applikation von Insulin, getestet. Zum Zeitpunkt T9 wurden die subchronischen Effekte nach der Langzeitbehandlung mit Insulin auf den Stroop Test und damit die selektive Aufmerksamkeit geprüft.

Bei der Auswertung des Stroop Tests fanden sich weder unter akuter noch unter subchronischer Insulineinnahme signifikante Verbesserungen. Sowohl beim Worte-Lese-Teil, Farben-Benennung-Teil und dem Interferenz-Teil gab es keine nennbaren Unterschiede zwischen den Insulin- und Placebogruppen.

Tabelle 2: Akutwirkung (T2) und subchronische Wirkung (T9) beim Stroop Test

	Insulin Aspart	Humaninsulin	Placebo	ANOVA
	Mittel ± SEM	Mittel ± SEM	Mittel ± SEM	P- Wert
Baseline				
Wort-Lese-Teil	111.00 ± 4.62	103.08 ± 2.43	102.60 ± 2.98	0.18
Farb-Benennung	78.25 ± 3.14	80.08 ± 2.54	73.92 ± 3.81	0.39
Interferenz-Teil	50.67 ± 3.54	51.58 ± 5.21	47.50 ± 3.04	0.76
nach Akutbehandlung T2				
Wort-Lese-Teil	116.38 ± 2.60	110.82 ± 1.53	111.71 ± 1.95	0.15
Farb-Benennung	90.93 ± 2.68	92.16 ± 3.42	96.09 ± 1.59	0.35
Interferenz-Teil	69.21 ± 1.96	75.82 ± 4.63	74.54 ± 2.07	0.28
nach Langzeitbehandlung T9				
Wort-Lese-Teil	116.70 ± 3.08	112.79 ± 2.13	115.33 ± 3.71	0.66
Farb-Benennung	94.73 ± 3.91	93.27 ± 1.99	96.91 ± 2.14	0.66
Interferenz-Teil	63.45 ± 2.99	61.82 ± 5.16	64.00 ± 0.96	0.90

Tabelle 2: Anzahl der richtig genannten Farben in den drei Teilen des Stroop Tests. Die Tabelle zeigt an die Baselinephase adaptierte Mittelwerte und SEM der Insulin- und Placebogruppe.

7. Diskussion

Viele Studien haben sich mit der Wirkung von Insulin auf die Gedächtnisleistung beschäftigt. Zahlreiche Versuchsreihen haben gezeigt, dass sich intranasal aufgenommenes Insulin positiv auf die deklarative Gedächtnisleistung auswirkt und keinerlei systemische Nebenwirkungen hervorrufen. In der vorliegenden Versuchsreihe sollte herausgefunden werden, ob das monomere Insulinanalogon Insulin Aspart (NovoRapid®) eine noch stärkere Wirkung als Humaninsulin erzielt. Auch hier wirkt sich Insulin besonders

fördernd auf die im Hippokampus gelegenen Gedächtnisanteile aus. So fand sich lediglich eine Verbesserung des deklarativen Gedächtnisanteils, während der nicht-deklarative keinerlei Wirkung auf Insulin zeigte. Die Vermutung, dass Insulin Aspart noch schneller und effektiver auf das deklarative Gedächtnis wirkt als reguläres Humaninsulin, hat sich bestätigt.

7.1 Kognitive Parameter

Nachfolgend wird die Wirkung von Insulin auf das Gedächtnis in Anlehnung an unsere Untersuchungsergebnisse näher erläutert. Dabei ist besonders die Differenzierung der Gedächtnisverbesserungen durch Insulin im deklarativen und nicht-deklarativen Anteil der Gedächtnisfunktion von Bedeutung.

7.1.1 Wortliste

In der vorliegenden Versuchsreihe wurde mit Hilfe von Wortlisten die Wirkung von intranasal aufgenommenem Insulin auf das deklarative Gedächtnis untersucht. Die deklarativen Gedächtnisanteile sind in bestimmten Regionen des Gehirns lokalisiert. Wie schon in einigen Studien bestätigt wurde, sind besonders die mittleren Temporallappenanteile (Squire und Zola-Morgan, 1991; Mishkin und Murray, 1994) und der Hippokampus an der Verarbeitung von Fakten und Ereignissen beteiligt. Genau dort findet sich eine große Anzahl von Insulinrezeptoren (Unger et al., 1991). Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass nur mit einer intakten Hippokampusfunktion das deklarative Gedächtnis vollständig funktionieren kann (Kessels et al., 2001; Bayley et al., 2005). So haben Skeberdis et al. (2001) erforscht, dass Insulin die Expression von NMDA-Rezeptoren fördert, welche eine wichtige Aufgabe in der Formation von neuronalen

Verbindungen übernehmen und somit für das deklarative Gedächtnis von großer Bedeutung sind (Castellano et al., 2001; Liu et al., 2004). Magarinos und Mc Ewen (2000) und Gardoni et al. (2002) haben eine Studie mit Ratten durchgeführt, in der gezeigt wurde, dass ein Mangel an Insulin zu einer Abnahme der NMDA-Rezeptoren in hippocampalen Neuronen führt und eine Atrophie des Hippokampus hervorruft. Im Verlauf fanden sie eine Verschlechterung der deklarativen Gedächtnisanteile. Es mehren sich also die Hinweise, dass Insulin eine wichtige Rolle für die Bildung vom deklarativen Gedächtnis einnimmt. Benedict et al. (2004) haben in der Humaninsulingruppe diese Vermutung bestätigt und gezeigt, dass nach Einnahme von Humaninsulin die Probanden signifikant mehr Wörter erinnerten als die Placebogruppe. In dem vorliegenden Experiment sollte nun herausgefunden werden, ob durch die Gabe von monomeren Insulinanaloga eine noch stärkere Verbesserung der deklarativen Gedächtnisanteile eintritt. Die Vermutungen wurden bestätigt. Daraus lässt sich ableiten, dass Insulin Aspart effektiver in das Gehirn gelangen kann und eine stärkere Wirksamkeit entfaltet als Humaninsulin. Da Insulin Aspart auf Rezeptorebene in gleicher Weise wirkt wie Humaninsulin (Kurtzhals, 2000), erscheint die stärkere Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses nach Insulin Aspart verglichen mit Humaninsulin durch einen effektiveren intranasalen Transport bedingt zu sein. Möglicherweise ließen sich durch eine Erhöhung der Humaninsulindosis ähnliche Effekte wie mit Insulin Aspart erzielen. Die pharmakologisch stärkere Wirkung des Insulinanalogons lässt sich aber nicht bestreiten.

Aufgrund der von Kern et al. (2001) gezeigten Resultate wäre am ehesten eine Akutwirkung auf das deklarative Gedächtnis zu erwarten gewesen. Dort mussten die Probanden unter kontinuierlicher Insulinzufuhr Gedächtnistests (u.a. die Wortlisten) absolvieren. Kern hat gezeigt, dass die Probanden mit höherer Insulinzufuhr bessere Ergebnisse zeigten, als die mit niedrigerer. Diese Verbesserung der Gedächtnisleistung trat

nach 6-stündiger Insulinzufuhr auf. Reger et al. (2005) berichteten, dass bei Patienten mit Alzheimer nach Einnahme von 40 IU Humaninsulin eine akute Verbesserung der Gedächtnisleistung zu verzeichnen war. Durch ein herabgesetztes Verhältnis von Insulinkonzentration im Liquor zu Insulinkonzentration im Plasma bei Alzheimerpatienten (Craft et al., 1996) steigt möglicherweise die Sensitivität des Gehirns auf die gedächtnisfördernden Wirkungen von Insulin. Bei gesunden Menschen ist aber, wie auch bei der vorliegenden Versuchsreihe gezeigt, keine akute Wirkung des intranasal aufgenommenen Insulins zu erkennen (Benedict et al., 2004). In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass weder eine einzelne Dosis (40 IU) Humaninsulin noch eine Einzelgabe Insulin Aspart eine Verbesserung der deklarativen Gedächtnisleistung hervorruft.

Vergleicht man die Leistungen der Spätabfragen der Wortlisten über die zehn Wochen, so wurde im Verlauf dieser Studie in allen drei Gruppen eine Abnahme der Anzahl erinnerter Wörter von T1 über T3 bis zu T10 verzeichnet (Abbildung 5b). Dies lässt sich durch den Einfluss von Störungen (Intrusions) durch früher gelernte Wortlisten erklären. So wurden Wörter aus einer älteren Liste in die aktuell vorgetragene Liste importiert (Underwood 1957; Postman 1962). Diese Blockade neu zu lernender Inhalte durch bereits zuvor aufgenommene Informationen wird als proaktive Interferenz bezeichnet. Die Anzahl der erinnerten Wörter aus früheren Listen unterschied sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Das zeigt, dass das Auftreten von Intrusions keine Wirkung der Insulingabe ist. In diesem Zusammenhang sollte bemerkt werden, dass, im Vergleich mit vorangegangenen Studien, in dieser Versuchsreihe der zeitliche Abstand zwischen Lernen und Spätabfrage wesentlich größer war (20-30 Minuten vs. 1 Woche). Dadurch ist die Wahrscheinlichkeit erheblich größer, dass die Ergebnisse durch Interferenzen verzerrt werden. Je länger die Zeit zwischen dem Vorlesen der Liste und der

Abfrage ist, desto größer sind die Störungen. Dudai (2004) hat aber gezeigt, dass sich ein Zeitraum von einer Woche zwischen Lernen und Abfrage sehr gut zur Testung des Langzeitgedächtnisses eignet.

Nun kann diskutiert werden, ob Differenzen in der Insulinsensitivität der Probanden zu den verbesserten Ergebnissen in der Insulin-Aspart-Gruppe geführt haben. Obwohl keine Insulin/Glukosetoleranztestungen durchgeführt worden sind, zeigten Messungen auf der Grundlage des basal homeostatic model assessment (HOMA) Werte, die die Beta-Zell Funktion und Insulinresistenz widerspiegeln (Wallace und Matthews 2002) und somit die oben genannten Vermutungen widerlegen.

7.1.2 Wordstem Priming

Anhand des Wordstem Priming sollte die Wirkung von Insulin auf das nicht-deklarative Gedächtnis untersucht werden. Hier konnten wir die Ergebnisse von Benedict et al. (2004) bestätigen, die zeigten, dass sich Insulin nicht auf das nicht-deklarative Gedächtnis auswirkt. Da sich, wie schon oben beschrieben, im mediotemporalen und hippokampalen Bereich besonders viele Insulinrezeptoren befinden (Unger et al., 1991), liegt es nahe, dass auch nur die Gedächtnisanteile, die in dieser Region liegen, eine Wirkung auf Insulin zeigen. Da sich die nicht-deklarativen (impliziten) Gedächtnisanteile nicht in der hippokampalen Gehirnregion befinden, sondern eher im Bereich des Neokortex und der Basalganglien (Squire, 1998) lokalisiert sind, zeigen sich in diesen Gedächtnisanteilen auch keine Verbesserungen unter Insulineinnahme. Weder unter akuten noch unter subchronischen Bedingungen finden sich im Wordstem Priming Unterschiede zwischen den Insulin- und Placebogruppen.

7.1.3 Stroop Test

Anhand des Stroop Test sollte eine Steigerung der selektiven Aufmerksamkeit unter Insulineinfluss gezeigt werden. Genau wie in der vorangegangenen Studie (Benedict et al., 2004) haben wir auch bei dieser Studie keine Verbesserung der selektiven Aufmerksamkeit und des Konzentrationsvermögens herausfinden können.

Kern et al. (2001) haben gezeigt, dass Testpersonen, die einer höheren Insulinzufuhr ausgesetzt waren als die Kontrollgruppe, eine signifikante Verbesserung im Interferenzteil des Stroop Tests aufwiesen. Die anderen Teile des Tests „Wörter lesen“ und „Farben nennen“ waren zwischen den beiden Gruppen nicht signifikant verschieden. Wie schon in der Einleitung beschrieben, wirkt sich Insulin auf die Aufnahme von Noradrenalin in die Zellen des Hippokampus aus (Boyd et al., 1985). Im Tierversuch wurde gezeigt, dass diese Region und deren Sensitivität gegenüber Noradrenalin eine entscheidende Bedeutung für die Regulation der selektiven Aufmerksamkeit hat (McEwen, 1988). Anhand der Daten dieser Studie, unterstützt durch die Studie von Benedict et al. (2004), konnte keine Verbesserung der selektiven Aufmerksamkeit unter Insulin festgestellt werden.

7.2 Laborparameter

7.2.1 Plasmaglukose und Seruminsulin

Bei jeder wöchentlichen Untersuchung haben wir den Probanden Blutproben entnommen und u.a. den Insulin- und Blutglucosewert gemessen. Wie schon bei früheren Studien gezeigt (Kern et al., 1999; Born et al., 2002; Benedict et al., 2004), findet man bei der

intranasalen Applikation keine Veränderungen der systemischen Insulin- und Blutglucosewerte. Dies konnte in diesem Experiment bestätigt werden.

Für die vorliegende Studie wurde die intranasale Applikation von Insulin als Einnahmemodus gewählt, um möglichen systemischen Nebenwirkungen vorzubeugen. Illum et al. (2000) haben diese Applikationsart beschrieben, bei der die Insulinmoleküle ohne den Umweg des systemischen Kreislaufes, direkt über die Nasenschleimhaut aufgenommen werden und ins Gehirn gelangen. Born et al. (2002) haben ihren Versuchsteilnehmern intranasal Melanocortin und Insulin verabreicht und nach 80 Minuten deren Konzentration im Blut gemessen. Auch dort wurde gezeigt, dass sich keine signifikanten Veränderungen dieser Komponenten im Blut ergaben. Bei Probanden, die intranasal Insulin aufgenommen hatten, wurden ebenfalls keinerlei Veränderungen der Insulin- und Blutglucosespiegel festgestellt (Kern et al., 1999). Auch in dieser Versuchsreihe konnten die schon vorher aufgestellten Vermutungen, dass intranasal aufgenommenes Insulin sich nicht auf den Insulin- und Glucosespiegel im Blut auswirken, bestätigt werden. Auf diesem Weg lassen sich systemische Hypoglykämien und Hypokaliämien vermeiden, die zur einer wesentlichen Beeinträchtigung der Probanden führen würde.

7.3 Schlussfolgerung

Die intranasale Gabe von Insulin Aspart stellt im Vergleich mit regulärem Humaninsulin eine erheblich effektivere Möglichkeit dar, um Insulin in das Gehirn zu befördern. Aufgrund seiner chemischen Strukturformel kann Insulin Aspart offensichtlich wesentlich schneller und effektiver von der Nase in das Gehirn gelangen und somit eine noch größere und schnellere Verbesserung der deklarativen Gedächtnisfunktionen hervorrufen als das reguläre Humaninsulin. Wie schon in vielen Studien beschrieben, haben sich auch bei der

vorliegenden Studie keinerlei systemische Nebenwirkungen, wie z.B. Hypoglykämien, durch die intranasale Einnahme von Insulin gezeigt. Für die Zukunft stellt die Aufnahme von Insulin Aspart über die Nasenschleimhaut eine effektive und nebenwirkungsarme Applikationsoption für Patienten mit einer Schwäche kognitiver Funktionen bei Demenzerkrankungen dar.

8. Literaturverzeichnis

Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and Severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42: 631-639.

Baskin DG, Figlewicz DP, Woods SC, Porte D Jr, Dorsa DM. 1987. Insulin in the brain. *Annu Rev Psychol* 49: 334-347.

Bayley PJ, Gold JJ, Hopkins RO, Squire LR. 2005. The neuroanatomy of remote memory. *Neuron* 46: 799-810.

Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, et al. 2004. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29: 1326-1334.

Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL. 2002. Sniffing neuropeptides-A transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci* 5: 514-516.

Braak H, Braak E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol* 82: 239-259.

Bramblett GT, Goedert M, Jakes R, Merrick SE, Trojanowski JQ, Lee VM. 1993. Abnormal tau phosphorylation at Ser396 in Alzheimer's disease recapitulates development and contributes to reduced microtubule binding. *Neuron* 10: 1089-1099.

- Brange J, Owens DR, Kang S, Volund A. 1990. Monomeric insulins and their experimental and clinical implications. *Diabetes Care* 13: 923-954.
- Brange J, Volund A. 1999. Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Adv Drug Deliv Rev* 35: 307-335.
- Brant AM, Jess TJ, Milligan G, Brown CM, Gould GW. 1993. Immunological analysis of glucose transporters expressed in different regions of the rat brain and central nervous system. *Biochem Biophys Res Commun* 192(3):1297-302.
- Bruning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, Klein R, Krone W, Muller-Wieland D, Kahn CR. 2000. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* 289: 2122-2125.
- Buee L, Bussiere T, Buee-Scherrer V, Delacourte A, Hof PR. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev* 33: 95-130.
- Boyd FT, Clarke DW, Muther TF, Raizada MK. 1985. Insulin receptors and insulin modulation of norepinephrine uptake in neuronal cultures from rat brain. *J Biol Chem* 260: 15880-15884.
- Castellano C, Cestari V, Ciamei A. 2001. NMDA receptors and learning and memory processes. *Curr Drug Targets* 2: 273-283.
- Chavez M, Kaiyala K, Madden LJ, Schwarz MW, Woods SC. 1995. Intraventricular insulin and the level of maintained body weight in rats. *Behav Neurosci* 109: 528-531.

Corder E, Saunders A, Strittmatter W, et al. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 261 (5123):921-3.

Craft S, Newcomer J, Kanne S, Dagogo-Jack S, Cryer P, Sheline Y, Luby J, Dagogo-Jack A, Alderson A. 1996. Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 17: 123-130.

Craft S, Peskind E, Schwartz MW, Schellenberg GD, Raskind M, Porte D Jr. 1998. Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease. *Neurology* 50: 164-168.

Craft S, Asthana S, Schellenberg G, Baker L, Cherrier M, Boyt AA, Martins RN, Raskind M, Peskind E, Plymate S. 2000. Insulin effects on glucose metabolism, memory, and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease differ according to apolipoprotein-E genotype. *Ann NY Acad Sci* 903: 222-228.

Craft S, Asthana S, Cook DG, Baker LD, Cherrier M, Purganan K, et al. 2003. Insulin dose response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology* 28(6):809-22.

Doyle P, Cusin I, Rohner-Jeanrenaud F, Jeanrenaud B. 1995. Fourday hyperinsulinemia in euglycemic conditions alters local cerebral glucose utilization in specific brain nuclei of freely moving rats. *Brain Res* 684: 47-55.

Dudai Y. 2004. The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu Rev Psychol* 55: 51-86.

- El Messari S, Leloup C, Quignon M, Brisorgueil MJ, Penicaud L, Arluison M. 1998. Immunocytochemical localization of the insulinresponsive glucose transporter 4 (Glut4) in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 399(4):492–512.
- Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P. 1996. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res* 736: 54-60.
- Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein H-G, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, Muschner D, Thalheimer A, Turk A, Hoyer S, Zochling R, Boissl KW, Jellinger K, Riederer P. 1998. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 105, 423-438.
- Gammeltoft S, Hansen BF, Dideriksen L, Lindholm A, Schaffer L, Trub T, et al. 1999. Insulin aspart: a novel rapid-acting human insulin analogue. *Expert Opin Investig Drugs* 8: 1431-1442.
- Gardoni F, Kamal A, Bellone C, Biessels GJ, Ramakers GM, Cattabeni F, Gispen WH, Di Luca M. 2002. Effects of streptozotocin-diabetes on the hippocampal NMDA receptor complex in rats. *J Neurochem*: 80(3):438-47.
- Gasparini L, Gouras GK, Wang R, Gross, RS, Beal MF, Greengard P, Xu H. 2001. Stimulation of beta-amyloid precursor protein trafficking by insulin reduces intraneuronal beta-amyloid and requires mitogen-activated protein kinase signaling. *J Neurosci* 21: 2561-2570.
- Gispen WH und Biessels GJ. 2000. Cognition and synaptic plasticity in diabetes mellitus. *Trends Neurosci* 23: 542-549.

Goedert M, Spillantini MG, Cairns NJ, Crowther RA. 1992. Tau proteins of Alzheimer paired helical filaments: abnormal phosphorylation of all six brain isoforms. *Neuron* 8: 159-168.

Hermansen K, Fontaine P, Kukulja KK, Peterkova V, Leth G, Gall MA. 2004. Insulin analogues (insulin detemir and insulin aspart) versus traditional human insulins (NPH insulin and regular human insulin) in basal-bolus therapy for patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* 47: 622-629.

Hong M, Lee VMY. 1997. Insulin and insulin-like growth factor-1 regulate tau phosphorylation in cultured human neurons. *J Biol Chem* 272: 19547.

Illum L. 2000. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J Pharm Sci* 11: 1-18.

Izumi Y, Pinard E, Roussel S, Seylaz J. 1992. Insulin protects brain tissue against focal ischemia in rats. *Neurosci Lett* 144:121-123.

Kahn CR. 1985. The molecular mechanism of insulin action. *Annu Rev Med.* 36, 429-451.

Kang S, Creagh FM, Peters JR, Brange J, Volund A, Owens DR. 1991. Comparison of subcutaneous soluble human insulin and insulin analogues (AspB9, GluB27; AspB10; AspB28) on meal-related plasma glucose excursions in type I diabetic subjects. *Diabetes Care* 14: 571-577.

- Kienlen-Campard P, Miolet S, Tasiaux B, et al. 2002. Intracellular amyloid-beta 1-42, but not extracellular soluble amyloid-beta peptides, induces neuronal apoptosis. *J Biol Chem* 277 (18): 15666-70.
- Kern W, Peters A, Fruehwald-Schultes B, Deininger E, Born J, Fehm HL. 2001. Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* 74: 270-280.
- Kern W, Born J, Schreiber H, Fehm HL. 1999. Central nervous system effects of intranasally administered insulin during euglycemia in men. *Diabetes* 48: 557-536.
- Kessels RP, de Haan EH, Kappelle LJ, Postma A. 2001. Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res Brain Res Rev* 35:295-303.
- Knopman D, Boland LL, Mosley T, Howard G, Liao D, Szklo M, McGovern P, Folsom AR. 2001. Cardiovascular risk factors and cognitive decline in middle-aged adults. *Neurology* 56: 42-48.
- Kurochkin IV, Goto S. 1994. Alzheimer's b-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 345:33-37.
- Kurtzhals P, Schaffer L, Sorensen A, Kristensen C, Jonassen I, Schmid C, Trub T. 2000. Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes* 49(6):999-1005.

Leibson CL, Rocca WA, Hanson VA, Cha R, Kokmen E, O`Brian PC, Palumbo PJ. 1997. Risk of dementia among persons with diabetes mellitus: a population-based cohort study. *Am J Epidemiol* 145: 301-308.

Liu L, Wong TP, Pozza MF, Lingenhoehl K, Wang Y, Sheng M, et al. 2004. Role of NMDA receptor subtypes in governing the direction of hippocampal synaptic plasticity. *Science* 304: 1021-1024.

Magarinos AM, McEwen BS. 2000. Experimental diabetes in rats causes hippocampal dendritic and synaptic reorganization and increased glucocorticoid reactivity to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97(20):11056-61.

Marfaing P, Pénicaud L, Broer Y, Mraovitch S, Calando Y, Picon L. 1990. Effect of hyperinsulinemia on local cerebral insulin binding and glucose utilization in normoglycemic awake rats. *Neurosci Lett* 115:279.

Masters BA, Shemer J, Judkins JH, Clarke DW, LeRoith D, Raizada MK. 1987. Insulin receptors and insulin action in dissociated brain cells. *Brain Res* 417: 247-256.

McEwen B. 1988. Glucocorticoid receptors in the brain. *Hosp Pract* 23: 107-121.

Mishkin M, Murray EA. 1994. Stimulus recognition. *Curr. Opin. Neurobiol* 4: 200-206.

Oliver EH, Sartin JL, Dieberg G, Rahe CH, Marple DN, Kemppainen RJ. 1989. Effects of acute insulin deficiency on catecholamine and indolamine content and catecholamine turnover in

- microdissected hypothalamic nuclei in streptozotocin-diabetic rats. *Acta Endocrinol (Copenh)* 120: 343-350.
- Ott A, Stolk RP, Hofman A, Van Harskamp F, Grobbee DE, Breteler MM. 1996. Association of diabetes mellitus and dementia: the Rotterdam Study. *Diabetologia* 39: 1392-1397.
- Pavlovic RA, Phillips MI, Kappy MS, Raizada MK. 1984. Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res* 309: 187-191.
- Petrides PE, Becker CM. 2003. Gehirn & Nervengewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg): *Biochemie und Pathobiochemie*. 7. Aufl., 1060. Springer-Verlag. Berlin.
- Peinado JM, Meyers RD. 1991. Norepinephrine release from PVN and lateral hypothalamus during perfusion with 2-DG or insulin in the sated and fasted rat. *Pharmacol Biochem Behav* 27: 715-721.
- Postman L. 1962. The temporal course of proactive inhibition for serial lists. *J Exp Psychol* 63: 361-369.
- Raslova K, Bogoev M, Raz I, Leth G, Gall MA, Hancu N. 2004. Insulin detemir and insulin aspart: a promising basal-bolus regimen for type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 66: 193-201.
- Reger MA, Watson GS, Frey WH, Baker LD, Cholerton B, Keeling ML, et al. 2005. Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: Modulation by APOE genotype. *Neurobiol Aging* 2005.

- Rivera EJ, Goldin A, Fulmer N, Tavares R, Wands JR, de la Monte SM. 2005. Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J Alzheimers Dis* 8: 247-268.
- Rotte M, Baerecke C, Pottag G, Kloese S, Kanneberg E, Heinze HJ, et al. 2005. Insulin affects the neuronal response in the medial temporal lobe in humans. *Neuroendocrinology* 81: 49-55.
- Sakane T, Akizuki M, Yamashita S, Sezaki H, Nadai T. 1995. Direct drug transport from the rat nasal cavity to the cerebrospinal fluid: the relation to the molecular weight of drugs. *J Pharm Pharmacol* 47, 379-381.
- Schwartz MW, Figlewicz DP, Baskin DG, Woods SC, Porte D Jr. 1992. Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr Rev* 13: 387-413.
- Shibata S, Liou SY, Ueki S, Oomura Y. 1985. Inhibitory action of insulin on suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slice preparation. *Physiol Behav* 36: 79-81.
- Skeberdis VA, Lan J, Zheng X, Zukin RS, Bennett MV. 2001. Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3561-3566.
- Squire LR, Ojemann JG, Miezin FM, Petersen SE, Videen TO, Raichle ME. 1992. Activation of the hippocampus in normal humans: A functional anatomical study of memory. *Proc Nat Acad Sci* 89: 1837-1841.
- Squire LR. 1998. Memory systems. *Proc Natl Acad Sci* 321: 153-156.

Squire LR, Zola-Morgan S. 1991. The medial temporal lobe memory system. *Science* 253: 1380-1386.

Underwood BJ. 1957. Interference and forgetting. *Psychol Rev* 64: 49-60.

Unger JW, Livingston JN, Moss AM. 1991. Insulin receptors in the central nervous system: localisation, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog Neurobiol* 36: 343-362.

Van Houten M, Posner BI. 1983. Circumventricular organs: receptors and mediators of direct peptide hormone action on brain. *Adv Metab Disord* 10: 269-289.

Wallace WC, Akar CA, Lyons WE, Kole HK, Egan JM, Wolozin B. 1997. Amyloid precursor protein requires the insulin signaling pathway for neurotrophic activity. *Brain Res Mol Brain Res.* 52:213–227.

Wallace TM, Matthews DR. 2002. The assessment of insulin resistance in man. *Diabet Med* 19: 527-534.

Wickelgren I. 1998. Tracking insulin to the mind. *Science* 280: 517-519

Woods SC, Lotter EC, McKay LD, Porte D Jr. 1979. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* 282:503–505.

Woods SC, Figlewicz Lattemann DP, Schwartz MW, Porte D Jr. 1990. A re-assessment of the regulation of adiposity and appetite by the brain insulin system. *Int J Obes* 14: 69-73.

Zhao W, Chen H, Xu H, Moore E, Meiri N, Quon MJ, Alkon DL. 1999. Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and

signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J Biol Chem* 274:
34893-34902.

9. Anhang

9.1 Protokoll für T0, T2, T9

Protokoll für den großen Untersuchungstag

Datum:

Kürzel -Woche: _____

nüchtern seit 5 h: _____

ausreichend Schlaf: _____

kein Alkohol/Koffein: _____

(bitte bei allen Gedächtnistests Auswertung erst wenn der Proband weg ist!!!)

⇒ **Substanzgabe um (Intervall 6.30-8.30) : Uhr**

60 min nach Substanzgabe

Blutabnahme (Hämolyse vermeiden, Schwenken nicht vergessen)

Wortliste (T0, T2, T9) erinnerte Wörter

	Nach drei Minuten
Nahrung (blau)	
Emotion (rot)	
Neutral (schwarz)	

Stroop-Test (T0, T2, T9): 45 sec

	Worte	Farben	Farbworte
Richtige			
Fehler			

Wordstempriming (T0,T2, T9)

Anzahl der richtig ergänzten Wörter (rot): _____

Anzahl der zufällig richtig ergänzten Wörter (schwarz): _____

Ausgabe des neuen Nasensprays inkl. Checkliste als auch Besprechung des Folgetermins.
Hinweis: kein Nasenspray am Morgen des Untersuchungstages, erst danach morgendliche Einnahme nachholen!!!

9.2 Protokoll für die wöchentlichen Untersuchungen

Protokoll für den kleinen wöchentlichen Untersuchungstag

Datum:

Kürzel -Woche: _____

nüchtern seit 5 h: _____

ausreichend Schlaf: _____

kein Alkohol/Koffein: _____

Blutabnahme

Wordstempriming (delayed – bei T1, T3, T10)

Anzahl der richtig ergänzten Wörter (rot): _____

Anzahl der zufällig richtig ergänzten Wörter (schwarz): _____

Wortliste: erinnerte Wörter von letzter Woche (bei T1, T3, T10)

Nahrung (blau)	
Emotion (rot)	
Neutral (schwarz)	

Uhrzeit Versuchsende:

Ausgabe von Nasenspray + Checkliste

Nächster Termin:

9.3 Wortliste (Beispiel)

Naturschutzgebiet

Kirschkuchen

Herbst

Geilheit

Fels

Belohnung

Muskeln

Aal

Praline

Gurkensalat

Eros

Pommes

Sturm

Wanderer

Gratulation

Feld

Liebe

Rollmops

Tannenwald

Schenkel

Au

Vater

Mars

Knödel

Haselnüsse

Titten

Kitz

Rührei

Schweiß

Vogelnest

9.4 Wordstem Priming (Sofortabfrage)

Lieber Versuchsteilnehmer!

In dieser Aufgabe geht es darum, Wörter nach ihrem Klang zu beurteilen.
Bitte kreuzen Sie für jedes Wort auf der danebenstehenden Skala an, ob es für Sie:

- **unangenehm (1)**
- **eher unangenehm (2)**
- **neutral (3)**
- **eher angenehm (4) oder**
- **angenehm (5) klingt.**

Die Stufen (2) und (4) sind Zwischenstufen („**eher unangenehm**“ / „**eher angenehm**“):

Dabei geht es um Ihren spontanen Eindruck.
Bitte antworten Sie dementsprechend, ohne lange zu überlegen.

→ Sollten Sie jetzt noch Fragen haben, wenden Sie sich bitte an den Versuchsleiter!

Probandennummer:

	unangenehm		neutral	angenehm	
SEGEN	1	2	3	4	5
MUTMABUNGEN	1	2	3	4	5
ARM	1	2	3	4	5
GNADE	1	2	3	4	5
EXPLOSION	1	2	3	4	5
SCHEINWERFER	1	2	3	4	5
SACHE	1	2	3	4	5
FLEXIBILITÄT	1	2	3	4	5
EMPFEHLUNG	1	2	3	4	5
KERN	1	2	3	4	5
TINTE	1	2	3	4	5
EHRFURCHT	1	2	3	4	5
ELEND	1	2	3	4	5
KRANKENHAUS	1	2	3	4	5
ROLLE	1	2	3	4	5
DRUCKMITTEL	1	2	3	4	5
UNDANK	1	2	3	4	5
CHANCE	1	2	3	4	5
HOTEL	1	2	3	4	5

POL	1	2	3	4	5
GIFT	1	2	3	4	5
ZITRONE	1	2	3	4	5
PFEIFE	1	2	3	4	5
ABFALL	1	2	3	4	5
MEINUNG	1	2	3	4	5
BILD	1	2	3	4	5
HEKTAR	1	2	3	4	5
GABEL	1	2	3	4	5
KLUFT	1	2	3	4	5
DICHTER	1	2	3	4	5
FROSCH	1	2	3	4	5
LIEBE	1	2	3	4	5
IMPFUNG	1	2	3	4	5
GOLD	1	2	3	4	5
LAGER	1	2	3	4	5
NIVEAU	1	2	3	4	5
OBJEKT	1	2	3	4	5
SPIRALE	1	2	3	4	5

Lieber Versuchsteilnehmer!

Als nächste Aufgabe erhalten Sie eine Liste mit Wortanfängen. Bitte ergänzen Sie diese Anfänge mit dem ersten Hauptwort, das Ihnen in den Sinn kommt.

Es kommt nicht darauf an, kreative oder seltene Wörter zu notieren, sondern auf Ihre spontane Antwort.

Schreiben Sie einfach das erste Wort, das Ihnen einfällt!

Bitte bearbeiten Sie die Liste zügig.

→ Wörter aus Fremdsprachen und Eigennamen sind nicht erlaubt !

GR

EI

LA

EP

DR

RO

DU

KL

FL

IL

EM

EX

VE

ZI

AP

OR

SP

BE

FO

SE

LE

EH

MI

PF

OB

DE

GO

HE

UN

KA

GA

SC

NE

BR

ME

HI

KO

RA

9.5 Stroop Test

blau	blau	rot	gelb	grün
rot	grün	gelb	gelb	blau
grün	rot	rot	blau	blau
grün	gelb	gelb	gelb	gelb
gelb	grün	grün	grün	rot
gelb	rot	rot	rot	blau
blau	blau	blau	grün	grün
gelb	rot	grün	blau	rot
blau	grün	rot	blau	gelb
blau	grün	rot	blau	grün
blau	grün	gelb	rot	gelb
grün	blau	gelb	blau	grün
gelb	rot	grün	blau	grün
rot	blau	grün	gelb	blau
rot	grün	blau	rot	grün
blau	grün	rot	rot	grün
grün	rot	blau	gelb	grün

blau	blau	rot	gelb	grün
rot	grün	gelb	gelb	blau
grün	rot	rot	blau	blau
grün	gelb	gelb	gelb	gelb
gelb	grün	grün	grün	rot
gelb	rot	rot	rot	blau
blau	blau	blau	grün	grün
gelb	rot	grün	blau	rot
blau	grün	rot	blau	gelb
blau	grün	rot	blau	grün
blau	grün	gelb	rot	gelb
grün	blau	gelb	blau	grün
gelb	rot	grün	blau	grün
rot	blau	grün	gelb	blau
rot	grün	blau	rot	grün
blau	grün	rot	rot	grün
grün	rot	blau	gelb	grün
grün	rot	gelb	rot	blau
blau	grün	rot	blau	grün

10. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Werner Kern für die Stellung des Themas, die kompetente Betreuung und die umfassende Unterstützung bei allen Fragen im Verlauf der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Horst Lorenz Fehm und Herrn Prof. Dr. Jan Born danke ich für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und der entsprechenden Materialien, die für die Durchführung der Versuche notwendig waren.

Mein besonderer Dank geht an Herrn Dipl. oec. troph. Christian Benedict für seine Hilfestellung bei der Planung, Organisation und Ausführung sowie bei der statistischen Auswertung dieser Doktorarbeit. Er hat es verstanden mir jederzeit mit Geduld motivierend zur Seite zu stehen und es mir so überhaupt erst ermöglicht die Dissertation in diesem Umfang fertig zu stellen.

Für eine gute Zusammenarbeit und freundschaftliche Unterstützung in jeder Phase dieser Arbeit möchte ich Herrn Dipl. Psych. Manfred Hallschmidt aufrichtig danken.

Außerdem möchte ich Ingrid von Lützu und den medizinisch-technischen Assistentinnen des Institutes für Klinische Chemie für ihre technische Unterstützung und Anja Bublitz für ihre Hilfe bei der Durchführung der Untersuchungen danken.

Der Firma Aero Pump GmbH, 65239 Hochheim, bin ich für die Bereitstellung einer ausreichenden Anzahl an Nasenspray-Sprühflaschen und der Firma NovoNordisk, 55127 Mainz, für die Bereitstellung von regulärem Humaninsulin und Insulin Aspart zu Dank verpflichtet.

Ein großer Dank geht an die Probanden, die durch ihr Engagement und Durchhaltevermögen diese Versuchsreihe erst möglich gemacht haben.

Abschließend möchte ich einen Dank an meine Familie und Freunde aussprechen, die mich jederzeit unterstützt und motiviert haben.

Lebenslauf

Name: Katrin Schmitz
Geburtsdatum: 05.02.1982
Geburtsort: 49124 Georgsmarienhütte
wohnhaft: Edvard-Munch-Straße 18
23564 Lübeck
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulische Ausbildung:

1988-1992: Besuch der Grundschule Eversburg in
Osnabrück
1992-1994 Besuch der Orientierungsstufe Eversburg in Osnabrück
1994- 2001 Besuch des Ratsgymnasium Osnabrück
2001 Abitur

Studium:

2001 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der
Universität zu Lübeck
2003 Ärztliche Vorprüfung/ Physikum
2004 Beginn der Arbeit an der Dissertation

Ableistung des Praktischen Jahres:

Rheumaklinik Bad Bramstedt – Innere Medizin
Sanakliniken Lübeck – Anästhesie
Stadtpital Waid (Zürich)/Schweiz – Chirurgie