

Aus dem Institut für Neuroendokrinologie

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Jan Born

**Die Wirkung intranasal applizierten Insulins
auf das transkraniale Gleichspannungspotential
beim Menschen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

-Aus der Medizinischen Fakultät-

Vorgelegt von

Julia Bredthauer

aus Hamburg

Lübeck, 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. soc. Jan Born
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Werner Kern

Tag der mündlichen Prüfung: 14.12.2006

Zum Druck genehmigt: 14.12.2006

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis	III
1. Einleitung	1
1.1 Insulin: Aufbau und sein Weg in das Zentrale Nervensystem	2
1.1.1 Aufbau des Insulins	2
1.1.2 Aufnahme des Insulins in das Gehirn	2
1.2 Zellen des Nervensystems	7
1.3 Insulinrezeptoren und ihre Verbreitung im Gehirn.....	8
1.4 Zentralnervöse Insulinwirkungen	9
1.4.1 Beeinflussung neurokognitiver Funktionen	10
1.4.2 Beeinflussung des Essverhaltens.....	10
1.5 DC-Potentiale.....	11
1.5.1 Zustandekommen der Potentiale	13
1.6 Die Wirkung intravenös verabreichten Insulins auf das DC-Potential	14
2. Fragestellung.....	17
3. Methoden.....	17
3.1 Probanden	17
3.2 Versuchsvorbereitungen:	18
3.3 Versuchsdurchführung	19
3.4 Erfassung und Auswertung der DC-Potentiale.....	21
3.5 Ermittlung der Blut-Hormon-Spiegel.....	22
3.6 Statistische Auswertung	22
4. Ergebnisse	23
4.1 DC-Potentiale nach intranasaler Insulin-Gabe	23
4.2 Blut-Hormon-Spiegel nach der intranasalen Gabe von Insulin.....	24
4.3 Subjektives Empfinden vor und nach Gabe des Nasensprays.....	28
5. Diskussion	31
5.1 DC-Potential-Verschiebung und Veränderung der Blutparameter nach intranasaler Insulingabe	32
5.2 Subjektives Empfinden vor und nach Gabe des Nasensprays.....	33
5.3 Artefaktquellen bei der Ableitung von DC-Potentialen	35
5.4 Mögliche Aufnahmewege des intranasal applizierten Insulins	37
5.5 Überlegungen zu den physiologischen Grundlagen der DC-Veränderung.....	39

5.6 Vergleich der DC-Veränderungen nach intravenöser und nach intranasaler Gabe	40
5.7 Zukunft der intranasalen Insulingabe	41
6. Zusammenfassung.....	44
Literaturverzeichnis.....	45
Anhang	IV
Lebenslauf.....	V
Danksagung.....	VII

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DC-Potentiale nach intravenöser Gabe von Insulin.....	15
Abbildung 2: Position der Kopfelektroden (F,FC,C).....	19
Abbildung 3: Nach Platzierung der Kopf- und Gesichtselektroden.....	20
Abbildung 4: Anschluss der Elektroden und Aufzeichnung der DC-Potentiale.....	20
Abbildung 5: Blutentnahme nach einem festgelegten Schema.....	21
Abbildung 6: DC-Potentiale nach Gabe des Nasensprays.	24
Abbildung 7: Insulin.....	25
Abbildung 8: Glucose.....	26
Abbildung 9: Cortisol.....	27
Abbildung 10: Glucagon.....	27
Abbildung 11: ACTH.....	28
Abbildung 12: Hunger.....	29
Abbildung 13: Durst.....	30
Abbildung 14: Müdigkeit.....	31

1. Einleitung

Hört man das Wort „Insulin“, so denkt man in erster Linie an die Regulation des Blutzuckerspiegels und die damit in Zusammenhang stehende Krankheit „Diabetes mellitus“.

Insulin übt jedoch sehr vielfältige Aufgaben im Organismus aus, und dies zu einem großen Teil über das Gehirn. Betrachtet man z.B. die Gedächtnisleistung des menschlichen Gehirns, wird deutlich, dass das Insulin hier eine große Rolle spielt. So treten bei zentralnervösem Insulinmangel oder Insulinrezeptor-Funktionsstörungen erhebliche Defizite auf. Ein Beispiel ist der Morbus Alzheimer, den Hoyer als “the brain equivalent of non-insulin-dependent diabetes mellitus” bezeichnet (Hoyer, 1998). Die Beeinflussung zentraler Strukturen kann man schon anhand eines EEGs darstellen: In einer Studie der hiesigen Arbeitsgruppe zeigte sich, dass das langsame Gleichspannungspotential, das sich an der Kopfhaut ableiten lässt, sich nach intravenöser Gabe von Insulin schon nach wenigen Minuten verändert (Hallschmid et al., 2004a). Insulin, das intravenös verabreicht wird, beeinflusst jedoch auf seinem Weg aus dem Blutkreislauf in das Zentrale Nervensystem (ZNS) vermutlich auch Zellen der Blut-Hirn-Schranke in ihrer Aktivität. Somit stellt sich die Frage, inwieweit die gezeigten Hirnstromveränderungen auf zentralnervöse Wirkungen des Insulins zurückzuführen sind oder ob z.B. schon allein durch den Transport des Hormons durch die unten näher beschriebenen Schrankensysteme in das Gehirn diese elektrischen Potentialveränderungen entstehen. Dies ist die zentrale Frage der vorliegenden Dissertation. Da es sehr schwierig ist, die zentralen Wirkungen separat zu untersuchen, muss der systemische Weg (also der Blutweg) umgangen werden. Dies ist durch die intranasale Gabe einer geeigneten Dosis möglich, bei der das Insulin nur zu einem sehr geringen Teil in die Peripherie gelangt und dort keine Auswirkungen hat. Das Insulin gelangt so unter Umgehung der unten beschriebenen Schrankensysteme in das Gehirn.

In den hier durchgeführten Versuchen erhielten gesunde männliche Probanden per Nasenspray eine zuvor festgelegte Dosis Insulin, dessen Wirkung auf die Hirnaktivität mit denen eines auf die gleiche Weise applizierten Placebopräparates verglichen wurde. Die Beeinflussung der Hirnaktivität wurde während zweistündiger DC-Potential-Ableitungen dargestellt. Durch Blutuntersuchungen wurde sichergestellt, dass das Insulin nicht in nennenswerten Mengen in den systemischen Kreislauf gelangte und der Blutglukosespiegel also konstant blieb. Sollte das Insulin nach intranasaler Gabe wirklich primär zentrale Strukturen beeinflussen, ohne jedoch den Blutzuckerspiegel zu senken, wäre dieses ein weiterer Beleg für die Möglichkeit eines Therapieansatzes für einige ZNS-Störungen, die durch gestörte Insulinfunktionen hervorgerufen werden.

1.1 Insulin: Aufbau und sein Weg in das Zentrale Nervensystem

Die Geschichte des Insulins begann wohl 1869, als der Medizinstudent Paul Langerhans die nach ihm benannten „Langerhansschen Inseln“ im Pankreas entdeckte. Erst 30 Jahre später fand man heraus, dass hier das blutzuckersenkende Hormon Insulin produziert wird (Sakula, 1988). Mittlerweile kennt man die genaue Struktur und ist in der Lage, dieses Hormon synthetisch herzustellen.

1.1.1 Aufbau des Insulins

Insulin ist ein hydrophiles Peptidhormon mit 51 Aminosäuren und besteht aus zwei Polypeptidketten (A und B). Diese sind unterschiedlich lang und durch zwei Disulfidbrücken miteinander verbunden. Innerhalb der A-Kette befindet sich eine weitere Disulfidbrücke. Das periphere Insulin wird im endokrinen Teil des Pankreas in den B-Zellen hergestellt. Es wird über mehrere Schritte in den Zellen synthetisiert: Zu allererst entsteht das Präproinsulin, ein einkettiges unverzweigtes Polypeptid, welches im rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) zum Proinsulin abgebaut wird. Dieses besitzt schon die Disulfidbrücken und unterscheidet sich vom fertigen Insulin nur noch durch das C-Peptid oder C-Sequenz. Im Golgi-Apparat wird es in sekretorische Granula (Vesikel) verpackt und dort bis zum Gebrauch als Insulin-Zink-Komplex gespeichert. Steigt der Blutglukosespiegel, schneiden Peptidasen im Vesikel die C-Sequenz heraus, so dass das aktive Insulin entsteht. Dieses wird zusammen mit seinem C-Peptid und dem Zink ausgeschüttet. Die Freisetzung von Insulin im Pankreas wird durch den Abbau von Glukose induziert. Hieraufhin wird ATP gebildet, worauf ATP-abhängige K-Kanäle geschlossen werden. Durch die dadurch entstehende Depolarisation kommt es zum Einstrom von extrazellulärem Ca. Letztendlich wird hierdurch die Exozytose von in Granula gespeichertem Insulin in Gang gesetzt (Kozlowski und Ashford, 1990). Insulin im ZNS scheint die gleichen biochemischen und immunologischen Kriterien wie im Pankreas zu erfüllen (Plata-Salaman, 1991).

1.1.2 Aufnahme des Insulins in das Gehirn

In diesem Kapitel wird erläutert, welche Möglichkeiten das Insulin besitzt, in das Gehirn zu gelangen. Hierbei gibt es in Abhängigkeit von der Applikationsform unterschiedliche Wege.

Der Weg nach intravenöser Gabe:

Es stellt sich immer wieder die Frage, ob die Zellen des ZNS in der Lage sind, Insulin selbst zu produzieren (Hoyer, 2004). Den größten Anteil des Insulins bezieht das Gehirn aber wohl aus der Peripherie. Hierbei besitzt das Insulin mehrere Möglichkeiten, in das ZNS zu gelangen, was immer wieder Bestandteil größerer Studien ist. Unter anderem ist die zentralnervöse Wirkung des systemischen Insulins von einem zeitaufwändigen Transport durch die Schrankensysteme des Gehirns abhängig. Dieses ist zum einen die Blut-Hirn-Schranke (BHS) und zum anderen die Blut-Liquor-Schranke (BLS). Beide bilden die Basis für die Osmoregulation von Gehirn und Liquor, und sind damit auch für die Kontrolle des intrakraniellen Druckes und Hirnvolumens zuständig.

Der Weg über die Blut-Hirn-Schranke:

Durch die Blut-Hirn-Schranke wird verhindert, dass Stoffe, die nicht ins ZNS gelangen sollen, durch die Kapillarwand ins Gehirn eintreten. Diese Barriere ist aus drei Schichten aufgebaut: Den Endothelien der Kapillaren, der darunter liegenden Basalmembran und schließlich den Fortsätzen von Astrozyten. Die Endigungen dieser Zellen liegen dicht aneinander gereiht an der Basalmembran der Hirnkapillaren und bilden somit die dritte und äußere Schicht der Blut-Hirn-Schranke. Die eigentliche „Filterschicht“ bilden jedoch die Endothelzellen mit ihren tight junctions (deren Bildung wird jedoch durch die Astrozyten induziert). Hier werden also die sonst kapillargängigen Stoffe entweder selektiv durchgelassen oder an der Penetration in das Hirngewebe gehindert. Dieses geschieht in Abhängigkeit von der chemisch-physikalischen Beschaffenheit des Stoffes (Molekülgröße, Ionen, Ladung usw.). Biochemisch gesehen ist die BHS gut für Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 500 Dalton durchlässig, hydrophile Stoffe werden jedoch nicht durchgelassen. Diese Verbindungen gelangen über Transportsysteme (Carrier) in das Gehirn.

Das Insulin gelangt über die BHS überwiegend über einen sättigbaren aktiven transendothelialen Transport (Schwartz et al., 1990), welcher anscheinend spezifisch für Insulin und unabhängig von Änderungen des peripheren Blutglukosespiegels ist (Park, 2001). So sind sowohl an der BHS (Pardridge, 1987; Frank et al., 1985) als auch an der unten beschriebenen Blut-Liquor-Schranke (hier am Epithel des Plexus choroideus) Insulin-Rezeptoren vorhanden (Baskin et al., 1986). Des Weiteren haben Untersuchungen an der Blut-Hirn-Schranke gezeigt, dass Insulin die Enzym- und Transporterfunktion an diesem Schrankensystem verändern kann (Banks et al., 1997).

Der Weg über den Liquor:

Eine Möglichkeit für einen Stoff, in den Liquor zu gelangen, besteht über die Blut-Liquor-Schranke. Sie wird durch das Kapillarendothel, die darunter liegende Basalmembran und das Plexusepithel gebildet, so dass das Blut aus dem Plexus choroideus vom Liquor getrennt wird. Im Gegensatz zur BHS ist sie für wasserlösliche Serumbestandteile (z.B. Serumproteine) durchlässig, für lipidlösliche dagegen nicht. Messungen der Aufnahme von Insulin in den Liquor nach intravenöser Verabreichung bei Hunden und Menschen zeigten, dass Insulin sehr lange braucht, um hier nachweisbar zu sein. So war erst 15 bis 30 min nach dem systemischen Insulinspiegelanstieg ein signifikanter Anstieg im Liquor erkennbar (Schwartz et al., 1991). Andererseits fand man in Versuchen mit Nagetieren heraus, dass Insulin sich im Hirngewebe schon fünf Minuten nach intravenöser Gabe ansammelt (Banks et al., 1997).

Ein Anstieg des Liquor-Insulin-Spiegels beträgt typischerweise nur 5% des Insulin-Plasma-Spiegels (Baura et al., 1993), wohingegen in Proben von Rattengehirn die Insulinkonzentration 30-40% des Plasmaspiegels ausmacht (Yalow und Eng, 1983). Deshalb wird vermutet, dass Insulin bevorzugt ins Hirngewebe und nur in geringen Maßen und auch viel langsamer in den Liquor aufgenommen wird. Ebenfalls braucht man sehr viel höhere Insulindosen, um insulintypische Wirkungen beobachten zu können, wenn man das Hormon in den Liquor infundiert, als wenn man es direkt in den Hypothalamus spritzt. Die Rolle, die der Liquor in der Aufnahme des Insulins aus der Peripherie in das Hirngewebe spielt, wird also immer wieder in Frage gestellt, da hierbei vor allem im Bereich der Hirnventrikel und der Subarachnoidalräume (also der eigentlichen Liquorräume) vermehrt Insulinrezeptoren vorkommen müssten, was jedoch nicht der Fall ist (Baskin et al., 1983).

Das Drei-Kompartimente-System:

Schwartz und seine Mitarbeiter (Schwartz et al., 1991) vermuteten anhand einiger Studien, dass die Aufnahme des zirkulierenden Insulins sowohl ins Gehirn als auch in den Liquor primär eher über das Endothel der BHS als über die BLS erfolgt. So ist die Gesamtfläche der BHS um den Faktor 5000 größer als die der BLS (Pardrige, 1987). Bezüglich der BHS postulieren Schwartz et al. ein so genanntes Drei-Kompartimente-System, bei dem das Insulin über die BHS in ein drittes Kompartiment (interstitielle Flüssigkeit) und von dort ins ZNS und später in den Liquor gelangt. Letztendlich gelangt die interstitielle Flüssigkeit in den Liquor und ist somit zu mehr als 30% an seiner Bildung beteiligt. Außerdem hat sie einen Anteil von 15% an der Hirnsubstanz. In der interstitiellen Flüssigkeit ist der Insulinanteil auch um ein Vielfaches größer als im Liquor (Yang et al., 1989). Der größte Teil des Insulins verschwindet relativ schnell aus der interstitiellen Flüssigkeit, indem es an neuronale und gliale Rezeptoren

bindet oder über zervikale Lymphe verloren geht, so dass letztendlich doch nur ein geringer Teil im Liquor ankommt (Schwartz et al., 1991). Dieser doch etwas längere Weg würde für die Beobachtung sprechen, dass nach intravenöser Gabe erst nach solch einer langen Zeit ein signifikanter Anstieg des Insulin-Spiegels im Liquor nachweisbar ist (Schwartz et al., 1990).

Die zirkumventrikulären Organe:

Neben den beschriebenen Schrankensystemen gibt es spezielle Gliazellen (Tanyzyten) und spezialisierte Neuronen, die in einem direkten Kontakt mit dem Liquor, und auch, zum Teil unter Umgehung der BHS, mit dem Blut stehen. Normalerweise trifft man diese Zellen nur vereinzelt an. An manchen Stellen verdichten sie sich jedoch zu Gruppen, den zirkumventrikulären Organen. Zu ihnen gehören die Area postrema, die Eminentia mediana, die Epiphyse und das Subfornikal- und Subkommissuralorgan. Hier können Stoffe also per diffusionem ins Gehirn gelangen. So kann es sein, dass durch die Diffusion in die Eminentia mediana dem Insulin der Zugang zu den hypothalamischen Kerngruppen, die auch für das Essverhalten verantwortlich sind, erleichtert wird. Man fand in diesen Regionen auch radioaktiv markiertes Insulin, nachdem man dieses Ratten intravenös gespritzt hatte (Van Houten et al., 1979).

Der Weg des intranasal applizierten Insulins:

Die ersten Versuche, Insulin per Nasenspray zu geben, gehen auf das Jahr 1958 zurück (Moses et al., 1983). Verabreicht man das Insulin auf diesem Wege, gelangt es über die olfaktorische Region ins Gehirn (Pardridge, 1991; Thorne et al., 1995). Art und Effektivität der Aufnahme eines Stoffes nach intranasaler Gabe hängen von vielen Faktoren ab. So ist hierfür die Molekülgröße, der Grad der Lipophilie und der Dissoziationszustand (je weniger dissoziiert, desto besser ist die Aufnahme in den Liquor; Sakane et al., 1994) von entscheidender Bedeutung. Die Nasenschleimhaut stellt durch 1) die mukoziliäre Clearance (MCC; Markus et al., 1989), 2) die aufgelagerte Mukusschicht (Khanvilcar et al., 2001) und 3) die hohe Enzymaktivität eine Art Barriere dar, so dass es schwierig ist, Stoffe intranasal zu applizieren. Voraussetzung für die Mukoadhäsion und eine damit verbundene längere Verweildauer eines Stoffes auf der Nasenschleimhaut und/oder eines engeren Kontaktes mit der Schleimhaut ist eine Penetration in die Mukusschicht und eine Adhäsion an die nasale Membran (Madsen et al., 1989). Hat die Substanz die Nasenschleimhaut erreicht, muss sie diese ebenfalls durchdringen (vgl. Illum, 2000). Die olfaktorische Region umfasst beim Menschen einige cm² und befindet sich auf der oberen Nasenmuschel und gegenüber des Nasenseptums. Sie befindet sich direkt unterhalb der Lamina cribrosa des Os ethmoideums, welches das Gehirn von den Nasenhöhlen trennt. Die Nasenschleimhaut besitzt drei Zelltypen: a) olfaktorische Rezeptorzellen, die eigentlichen Sinneszellen, b) Stützzellen und c) Basalzellen. Unter der Basalmembran befin-

det sich die Lamina propria, welche Blutgefäße, olfaktorische Axonbündel, trigeminale und autonome Nervenfasern und die Bowmansche Drüsen enthält. Die Sinneszellen erstrecken sich mit einem verjüngenden Fortsatz in Richtung Nasenlumen. Auf ihnen befinden sich Riechrezeptoren, welche Chemorezeptoren sind (vermutlich Rezeptor-Protein-Moleküle). Hier werden die verschiedensten Moleküle in der Atemluft gebunden, was zu einer Reizung der Sinneszelle führt. An der basalen Seite der Rezeptorzelle befindet sich ein nicht-myliniertes Axon, welches durch die Basalmembran zieht, um mit anderen Axonen zusammen große Nervenbündel in der Lamina cribrosa zu bilden. Die Axone werden dann von Schwannzellen umhüllt und gelangen durch die Lamina ins Kranium. Die Gesamtheit der zentral gerichteten Riechepithelfortsätze (Fila olfactoria) bildet den N. olfactorius. Sie durchbrechen die Dura mater und ziehen zur Oberfläche des Riechkolbens, welcher sich in der Cavitas subarachnoidea im Stirnhirn befindet. Bevor die Substanz überhaupt ins Hirngewebe oder den Liquor gelangt, muss sie erst einmal durch das Riechepithel und die daran anschließende Arachnoidea gelangen. Hierbei unterscheidet man den extraneuronalen, den neuronalen und auch den systemischen Weg.

Beim extraneuronalen Weg gibt es zwei Möglichkeiten: a) transzellulär, hier sehr wahrscheinlich rezeptorvermittelt oder über passive Diffusion durch die Stützzellen und b) parazellulär über die tight junctions zwischen den Stützzellen oder über Spalten zwischen Stützzellen und Rezeptorzellen (Jackson et al., 1979). Lipophile Moleküle nehmen primär den transzellulären Weg, wohingegen der parazelluläre Weg von hydrophilen Substanzen bevorzugt wird. Dieser Weg soll auf jeden Fall sehr schnell sein und vor allem für Substanzen mit einem geringen Molekulargewicht gelten (Frey et al., 1997).

Beim neuronalen Weg wird die Substanz über Endo- oder Pinozytose in die Nervenzelle aufgenommen und dann über intrazellulären axonalen Transport zum Riechkolben weiter transportiert. Dieser Weg ist jedoch sehr langsam, so dass die Substanzen den Liquor frühestens nach 24 Stunden erreichen (Kristensson and Olsson, 1971). Außerdem kann es hier schneller zur Proteolyse der Substanz durch lysosomalen Abbau kommen (Illum, 2003; Thorne et al., 1995). Ob eine Substanz auf neuronalem Weg ins Gehirn gelangt, hängt von dem Vorhandensein von Rezeptoren auf den olfaktorischen Neuronen ab.

Den systemischen Weg schlagen vor allem lipophile Moleküle ein. Sie werden sofort in den Blutkreislauf absorbiert und hieraus dann über normale Reinigungsmechanismen eliminiert (Hussain et al., 1980). Vom Blut aus können diese Substanzen aber auch über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen. Wird eine Substanz intranasal appliziert, bestehen

also mehrere Möglichkeiten, in das Gehirn zu gelangen. Der genaue Weg des Insulins ist hierbei noch nicht genau bekannt. Dieses wird im später folgenden Abschnitt diskutiert.

1.2 Zellen des Nervensystems

Die Grundeinheit des Nervensystems ist die Nervenzelle (Neuron), wobei das menschliche Nervensystem ca. 10^{11} Neuronen enthält. Neben dieser Zellart sind die im Folgenden beschriebenen Gliazellen im ZNS weit verbreitet. Das Gliagewebe besteht in der Peripherie aus den Schwannzellen und im ZNS aus den Ependymzellen, den Oligodendrozyten und den Astrozyten (AZ). Die Hauptfunktion dieser Zellen ist die Regulation der extrazellulären Ionenkonzentration, die Beseitigung von Neurotransmittern aus dem synaptischen Spalt (Bergles und Jahr, 1998) und die Herstellung einer optimalen metabolischen Bedingung, welches vor allem bei den Übertragungsprozessen an den Synapsen der Neuronen wichtig ist (Shulman et al., 2001). Die Gliazellen machen vom Volumen her insgesamt beinahe die Hälfte des gesamten ZNS aus und stellen ca. 90% seiner Zellen (Robitaille, 1998; Castonguay und Robitaille, 2001; Reist und Smith, 1992; Jahromi et al., 1992).

Ein besonderes Augenmerk gilt den AZ, deren Funktion im ZNS schon oft Bestandteil größerer Studien war. Sie erstrecken sich strahlenförmig von den Hirnventrikeln durch das gesamte Gehirn bis an dessen Oberfläche, und in ihrer Morphologie ähneln sie sehr stark den Neuronen. Vor allem dieser Zellart wird eine sehr enge Verbindung mit den Neuronen zugeschrieben. Dieses wird schon daran deutlich, dass sie mit ihren Fortsätzen die kleinen marklosen Axonbündel der Nervenzellen und deren Synapsen und synapsenfreie Oberfläche umhüllen. Im Bereich der Synapsen dienen sie der Synapsenabschirmung, so dass die freigesetzten Transmitter nicht an andere Synapsen gelangen. AZ ziehen mit ihren Fortsätzen zu Blutgefäßen, wo sie zum Beispiel am Austausch von Nährstoffen (z.B. Glukose) und Stoffwechselprodukten zwischen Neuronen und Blut beteiligt sind, da Neuronen üblicherweise mit der Blutbahn nicht in Berührung kommen (Laming et al., 2000). Eine besonders wichtige Rolle spielen AZ bei der Regulation der extrazellulären Ionenkonzentration: K^+ - Ionen werden zum Beispiel von diesen Zellen aufgenommen und an entferntere Areale geschafft (Kuffler und Nicholls, 1966). Orkand beschrieb schon 1966 diesen Prozess als „K spatial buffering“ (Orkand et al., 1966). Durch diesen Mechanismus wird einer erhöhten interstitiellen K-Konzentration und einer damit verbundenen unerwünschten anhaltenden Depolarisierung von Neuronen vorgebeugt, sie besitzen also eine Art Pufferfunktion (Laming et al., 2000). Es wird

immer wieder deutlich, dass sich Gliazellen (vor allem AZ) und Neuronen in ihrer Funktion gegenseitig beeinflussen: Werden zum Beispiel Neuronen erregt, erhöht sich die extrazelluläre K-Konzentration, welches wiederum die Gliazellen depolarisiert (Speckmann und Elger 1998). Durch die sehr enge Verbindung der Gliazellen können sich beträchtliche Potentialfelder aufbauen. Ein weiteres wichtiges Ion ist das Ca. AZ können über Ca-Wellen Neuronen in ihrer Funktion beeinflussen. Laming beschreibt dieses als eine Art Kommunikation zwischen diesen beiden Zellarten, da auch Neuronen über Substanzen (ATP, Glutamat) die Ca-Konzentration im Intrazellularraum der AZ erhöhen können (Laming et al., 2000; Kuffler und Nicholls, 1966; Plata-Salaman, 1991; Clarke et al., 1986).

Es wird also deutlich, dass die einzelnen Zellarten des Zentralen Nervensystems sehr eng miteinander in Verbindung stehen. Es stellt sich die Frage, welche Zellart am stärksten durch das Insulin beeinflusst wird und an dem Zustandekommen der DC-Potential-Veränderung beteiligt ist.

1.3 Insulinrezeptoren und ihre Verbreitung im Gehirn

Sowohl Neuronen als auch Gliazellen sind mit Insulinrezeptoren ausgestattet (Boyd und Raizada, 1983; Boyd et al., 1985; Clarke et al., 1984; Lowe et al., 1986). Hierbei befinden sich vor allem auf Neuronen eine sehr hohe Anzahl dieser Rezeptoren, Gliazellen besitzen nicht ganz so viele (Gerozissis, 2003). So war man sich auch eine lange Zeit nicht sicher, ob Gliazellen überhaupt Insulinrezeptoren besitzen. Dieses wurde zum ersten Mal 1982 von Albrecht et al. in Gehirnen adulter Ratten nachgewiesen. Man findet diese Rezeptoren sowohl am Zellkörper als auch an den Synapsen (Potau et al., 1991). Im ZNS kann man zwei Arten von Rezeptoren unterscheiden. So gibt es den a) peripheren Typ und den b) neuronalen Typ. Beide Rezeptoren unterscheiden sich nicht sehr stark voneinander. Ein Unterschied des Insulinrezeptors vom neuronalen Typ sind die α - und β - Untereinheiten, welche ein geringeres Molekulargewicht aufweisen (Heidenreich et al., 1983). Auch kommt es unter hyperinsulinämischen Bedingungen nicht, wie bei den peripheren Rezeptortypen, zu einer Down-Regulation der neuronalen Insulinrezeptoren. (Zahniser et al., 1984). Den peripheren Rezeptortyp trifft man bei den Gliazellen an, diese sind aber nur mit einer geringen Dichte an Rezeptoren ausgestattet (Adamo et al., 1989). Pearce und Langley (Pearce und Langley, 1994) berichten hingegen, dass die α - und β - Untereinheiten der Insulinrezeptoren von Astrozyten ein Molekulargewicht aufweisen, welches sich zwischen dem des peripheren und dem des neuronalen Typ befindet. Außerdem besitzen periphere Neurone und Kapillarendothelien Insulinrezeptoren

vom peripheren Typ (Waldbilling und LeRoith, 1987). Den neuronalen Rezeptor trifft man lediglich bei Neuronen an.

Bezüglich der Verteilung der Rezeptoren im Gehirn ist es sehr erstaunlich, dass diese dort weit verbreitet sind, da das Gehirn, wenn überhaupt, nur einen sehr geringen Teil an Insulin selber produzieren kann (Schwartz et al., 1992). Die Rezeptoren sind mit der größten Dichte in Plexus choroideus, Bulbus olfactorius und Hypothalamus (hier vor allem im Nucleus arcuatus) vorhanden. Ebenfalls sind Rezeptoren in Striatum und Hirnrinde (Schulinkamp et al., 2000), Hippocampus, im Limbischen System (Unger et al., 1991), im Cerebellum und auch in Strukturen wie der unteren Olive nachweisbar. Vor allem der Bulbus olfactorius ist besonders reich an Insulinrezeptoren. Untersuchungen zeigen, dass eine hohe Dichte an Rezeptor-mRNA im Stratum granulosum, Stratum mitrale und Stratum granulosum vorhanden ist (Marks und Eastman, 1990), wohingegen im Stratum plexiforme externum ein hohes Insulin-Bindungsvermögen und eine hohe Rezeptor-Immunität gefunden wurde (Baskin et al., 1986; Moss et al., 1990). Schwitzer erklärte dieses dadurch, dass Insulin-Rezeptoren im Stratum granulosum synthetisiert und anschließend zu ihren Dendriten im Stratum plexiforme externum transportiert werden (Switzer et al., 1985). Im Vergleich zum fetalen Rattenhirn nimmt die Zahl der Rezeptoren im adulten Gehirn ab. Dieses trifft sowohl für die Hirnrinde als auch für den Hirnstamm zu. Ausgeschlossen davon ist jedoch der Bulbus olfactorius, hier nimmt die Rezeptordichte zu und bleibt dann relativ konstant (Marks und Eastman, 1990).

1.4 Zentralnervöse Insulinwirkungen

Noch vor drei Jahrzehnten wurde das Gehirn als ein „insulin-insensitive tissue“ bezeichnet (Gerozisis, 2003). In den letzten Jahren wurde jedoch bewiesen, dass Insulin eine wichtige Rolle als Neuromodulator in verschiedenen Regionen des Gehirns spielt, wie die nachfolgenden Ausführungen zeigen. Neben seiner Rolle als Adipositassignal und anaboles Hormon in der Regulation des Energiehaushaltes (Schwartz et al., 1992; 2000) stellte sich heraus, dass Insulin entscheidende Einflüsse auf zentralnervöser Ebene besitzt. Eine sehr wichtige Aufgabe ist hier vor allem die Modulation neurokognitiver Funktionen.

1.4.1 Beeinflussung neurokognitiver Funktionen

Da, wie oben beschrieben, die Insulinrezeptordichte im fetalen Rattenhirn größer ist als im adulten, nimmt man an, dass Insulin bei der Entwicklung des fetalen Gehirns eine große Rolle spielt. So stimuliert Insulin *in vitro* die neurotransmitterspezifische Differenzierung von Neuronen in embryonalem Rattenhirn (Knusel et al., 1990). Es wird jedoch vermutet, dass Insulin eher primär auf die Neurogenese als auf die Gangliogenese oder Synaptogenese einen wesentlichen Einfluss nimmt (Marks und Eastman, 1990). Auch im adulten Gehirn wirkt sich Insulin positiv auf die Gedächtnisleistung aus, was viele Versuche zeigen: Die Verabreichung von Insulin in die Hirnventrikel verbessert das Lernverhalten und die Speicherung von Vermeidungsverhalten bei Ratten (Schwarzberg et al., 1989; Park et al., 2000), während das gleiche Verhalten beeinträchtigt scheint, wenn man im Gehirn Insulinrezeptoren blockiert (Lannert und Hoyer, 1998). Auch Versuche bei Menschen zeigen, dass sich Aufmerksamkeit und Gedächtnisleistungen durch Hyperinsulinämie verbessern (Kern et al., 2001). Dementsprechend kommt es also auch zu einer Herabsetzung der Gedächtnisleistung, wenn Insulin nicht vorhanden ist oder nicht wirken kann. So wird die Verschlechterung der Leistung von Insulinrezeptoren in einen engen Zusammenhang mit alterungsbedingten Hirndegenerationen wie Morbus Alzheimer oder Gedächtnisstörungen bei älterer Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 gebracht (Zhao et al., 2004). Regionen wie der Hippocampus und die Hirnrinde scheinen für die Gedächtnisleistung die größte Rolle zu spielen (Zhao et al., 2004).

1.4.2 Beeinflussung des Essverhaltens

Ein weiteres großes Gebiet ist die Regulation des Essverhaltens. Insulin übernimmt eine Art Vermittlerrolle zwischen Peripherie und ZNS (vor allem Hypothalamus), indem die Nahrungsaufnahme dem kalorischen Bedarf angepasst wird (Schwartz et al., 1992). Dieses zeigt auch eine kürzlich veröffentlichte Studie. So sind hypothalamische Insulin-Signalwege sogar für die Hemmung der hepatischen Glukoseproduktion vonnöten (Obici et al., 2002b). Infundiert man Insulin Versuchstieren zentral und anderen Tieren peripher (hier unter euglykämischen Bedingungen), wird eine bemerkenswerte Verminderung der Nahrungsaufnahme bei beiden Gruppen erzielt (McGowan et al., 1990; Woods et al., 1979; Vanderweele et al., 1982). So nimmt Stein (Stein et al., 1987) aufgrund einer Studie mit fettleibigen Zucker-Ratten an, dass diese entweder durch einen Defekt Insulin trotz erhöhter Liquorspiegel nicht in das Hirngewebe aufnehmen können oder dass die Sensitivität des Zentralen Nervensystems

für Insulin herabgesetzt ist, das Essverhalten kann hierbei also dem Bedarf nicht adäquat angepasst werden. Dieses wird auch durch die Beobachtung von Ikeda unterstützt, wo die Nahrungsaufnahme fettleibiger Ratten nicht durch die intraventrikuläre Gabe von Insulin supprimiert wird (Ikeda et al., 1986), so wie es bei anderen Studien mit normalgewichtigen Tieren der Fall ist (Woods et al., 1979).

Man kann bestimmte Hirnareale hervorheben, die bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme eine große Rolle spielen. Zu nennen sind vor allem der Hypothalamus (dabei insbesondere der Nucleus paraventricularis) und der Bulbus olfactorius, wo die Neurone besonders viele Insulinrezeptoren aufweisen (Baskin et al., 1988). Natürlich spielen auch noch eine Reihe weiterer Hormone, die sich wiederum untereinander beeinflussen, bei der Kontrolle der Nahrungsaufnahme eine Rolle. Auch nimmt man an, dass Insulin nicht nur direkt, sondern auch auf indirektem Wege über Modulation der verschiedenen Hormonsysteme das Essverhalten beeinflusst. Es wird vermutet, dass unter Insulineinwirkungen im Nucleus arcuatus weniger Neuropeptid Y, das die Nahrungsaufnahme steigert, produziert wird (Schwartz et al., 1992). Vergleicht man die Wirkung des Insulins in der Peripherie mit der Wirkung im ZNS, wird deutlich, dass hier teilweise entgegen gesetzte Effekte erzielt werden. So erhöht Insulin im Gehirn den Glukosespiegel und supprimiert, wie schon aufgeführt wurde, das Essverhalten. In der Peripherie kommt es jedoch zu einer Senkung des Blutglukosespiegels und zu einem gesteigerten Essverhalten (Ajaya und Haranath, 1982). Banks et al. beschreiben diesen Effekt als eine Art Feedback-Schleife – die zentrale Insulinwirkung wirkt der peripheren entgegen (Banks et al., 1997). Natürlich hat das Insulin auf die unterschiedlichen Zellen des ZNS verschiedene Wirkungen. Hierzu sei nur kurz gesagt, dass das Hormon auf neuronaler Ebene eher einen neuromodulierenden Einfluss hat, hier vor allem auf die Neurotransmitter, auf glialer Ebene reguliert es eher Metabolismus und Zellwachstum (Boyd et al., 1985; Clarke et al., 1986; Palovcik et al., 1984).

1.5 DC-Potentiale

Im Jahr 1875 berichtete Caton zum ersten Mal von elektrischen Potentialen, die vom Gehirn ausgingen, nachdem er Experimente mit den Gehirnen von Kaninchen und Affen gemacht hatte. Er beschrieb diese Potentiale als „*feeble currents of varying directions*“. Caton stellte fest, dass bei der Durchführung spezieller Handlungen bestimmte Hirnareale, die diesen Handlungen zugeordnet werden konnten, eine stärkere Negativierung aufwiesen als andere

(vgl. Curry und Pleydell-Pearce, 1995). Hier musste also „ein Zusammenhang zwischen kortikaler Aktivität und der Negativierung der Oberflächenpolarität, die ebenfalls einer bestimmten Region zugeordnet werden konnte, bestehen“ (Curry und Pleydell-Pearce, 1995). 1912 entwickelte Prawdicz-Neminski ein Verfahren, um evozierte Potentiale darzustellen. 1925 konnte eine relativ lange Zeitspanne aufgezeichnet werden, in denen sich die Potentiale des Gehirns in Bezug auf periphere Stimuli veränderten (Haschke et al., 1993).

Bei all diesen Studien befanden sich die Elektroden, die die Hirnströme aufzeichneten, direkt auf dem Gehirn. Messungen der Gehirnaktivität durch die schützenden, aber auch störenden Schädelknochen hindurch waren zu diesem Zeitpunkt nicht möglich. Dieses gelang 1924 erstmalig dem Nervenarzt Hans Berger in Jena, was er jedoch erst 1929 publizierte. Er nahm viele Messungen an sich selbst und an seinem Sohn vor und prägte den Begriff EEG, zu dieser Zeit stand diese Abkürzung noch für das Wort „Elektroencephalogramm“. Berger stellte fest, dass die Messkurven vom Wachheitsgrad bzw. dem Bewusstseinszustand der Probanden abhingen und dass sie sich nicht nur durch sensorische Reize, sondern auch durch geistige Tätigkeiten (z.B. Kopfrechnen) veränderten. Ab den späten Fünfzigern und frühen Sechzigern (Caspers, 1959) war man mit Hilfe bestimmter Geräte in der Lage, auch sehr langsame Potentiale darzustellen. Um die Aufzeichnungen möglichst artefaktfrei zu bekommen, wurden Spannungsverstärker und Hochpassfilter eingesetzt, die die langsamen Potentialschwankungen jedoch herausfilterten. So wurden diese Potentiale eine ganze Zeit lang vernachlässigt. Seitdem in den letzten Jahrzehnten aber immer mehr Fortschritte mit den Aufnahmetechniken erzielt wurden, die genauere Messungen ermöglichten, wurde erneutes Interesse an diesem spannenden Gebiet geweckt. So wurden nun auch intensive Studien zu den langsamen Potentialen durchgeführt und deren Zustandekommen immer genauer erforscht. Nachdem es für diese Potentiale eine Vielfalt von Namen gab, entschied man sich letztendlich für den Namen DC-Potentiale. DC steht für „direct current“ (Gleichspannung), gibt also die elektrische Verstärkerart wieder, mit der die Hirnströme aufgezeichnet werden.

DC-Potentiale bezeichnen länger anhaltende Verschiebungen der Grundlinie (baseline) (DC-Verschiebung – *DC-Shift*). Neben dem Frequenzbereich eines herkömmlichen Elektroencephalogramms (EEG) werden so auch die langsamen Potentiale dargestellt (Caspers, 1993). Zur Aufzeichnung der Potentiale benötigt man, wie oben erwähnt, einen Gleichspannungsverstärker (Speckmann und Elger, 1998). Der Verstärker besitzt eine Zeitkonstante, die im Unendlichen liegt (Caspers, 1974; Speckmann et al., 1984), was eine Darstellung der langsamen Komponenten ermöglicht. Beim EEG hingegen benutzt man Verstärker, die Frequenzen mit einer Bandbreite von 0,3-100 Hz aufnehmen (Curry und Pleydell-Pearce, 1995). Die-

se Geräte besitzen eine Zeitkonstante von einer Sekunde oder weniger. Hier werden die langsamen und Gleichspannungskomponenten herausgefiltert und nur Wechsellspannungskomponenten (alternating current – AC) zugelassen. In vielen Versuchen wird die Beeinflussung der Nervenzellen in ihrer Aktivität nur anhand der DC-Potentiale dargestellt. Ein Beispiel ist ein Versuch, in dem einige Nervenzellen einer Hyperkapnie, und wiederum weitere Zellen einer Asphyxie ausgesetzt werden. Hier kann nur anhand der DC-Potentiale ein genaues Bild über den momentanen Zustand der Zellen gemacht werden, das EEG hingegen zeigt keine entsprechenden Änderungen (Speckmann und Elger, 1998).

1.5.1 Zustandekommen der Potentiale

Bei der Ableitung der DC-Potentiale wird die dauerhafte Potentialdifferenz zwischen Kortex- oder Kopfoberfläche und einem extrazerebralen Referenzpunkt gemessen (Tennigkeit et al., 1993). Das Zustandekommen der DC-Potentiale beruht vor allem auf Veränderungen des Umgebungsmilieus, die durch die verschiedenen Aktivitätszustände der einzelnen Zellen entstehen. Bei der Ableitung der Hirnströme spielt vor allem der Kortex durch seine Nähe zu den ableitenden Elektroden eine wesentliche Rolle. Außerdem wird dessen Umgebungsmilieu durch die vertikal angeordneten Pyramidenzellen, die sich mit ihren apikalen Dendriten bis in die Kortexschicht I erstrecken, sehr stark beeinflusst, wie auch Lutzenberger et al. (Lutzenberger et al., 1987) und Braun et al. (Braun et al., 1991) beschreiben. Durch die Depolarisation dieser Neurone kommt es zu einer Negativierung der Zellumgebung, die sich an der Schädeloberfläche als negative Potentialverschiebung ableiten lässt (Creutzfeld et al., 1993). Es werden also die anhaltenden Depolarisationen höher gelegener Strukturen sichtbar. Erstreckt sich eine Zelle, wie die Pyramidenzelle, über mehrere Kortexschichten, fließt innerhalb der Zelle während der Erregung ein Strom in entgegengesetzter Richtung zum extrazellulären Strom. Kommt es zur Depolarisation des apikalen Dendriten, wird dessen Pol negativ. Aufgrund des intrazellulären Stromflusses von Dendriten zum Zellsoma, kommt es zu einem positiven Pol um das Soma. Als Polarisierung des Kortex wird hier also ein Dipol messbar. Vor allem Nerven- und Gliazellen weisen aufgrund der frei beweglichen Ionen in der extrazellulären Flüssigkeit eine hohe Leitfähigkeit auf. An dem Zustandekommen der abgeleiteten Aktivität sind mehrere Vorgänge beteiligt, die untereinander über komplizierte Regelmechanismen in Verbindung stehen und sich beeinflussen: So entspringt der Impuls der Erregung hierbei der *Formatio reticularis*. Dieser wird wiederum durch exzitatorische und auch inhibitorische Einflüsse der verschiedenen Hirnareale (Thalamus, Basalganglien usw.) kontrolliert,

so dass es nicht zu einer unkontrollierten Ausbreitung erregender Impulse wie bei der Epilepsie oder zu einer eingeschränkten Erregbarkeit, wie etwa beim Parkinson-Syndrom, kommt.

Viele Untersuchungen zeigen, dass DC-Potentiale Aufschluss über den momentanen Aktivitätszustand eines entsprechenden Hirnareals geben und somit Hinweise auf den motivationalen Zustand eines Organismus liefern (Birbaumer et al., 1990). Somit werden die Negativierungen primär in Vorbereitungs- oder Erwartungssituationen registriert. Zum Beispiel signalisiert ein Warnreiz, dass sich nach einem bestimmten Zeitintervall ein zweiter so genannter imperativer Stimulus anschließen wird, der letztendlich zu einer definierten Reaktion (motorische Reaktion, Entscheidung usw.) führt. Die Veränderung dieser Potentiale repräsentiert also einen Mobilisierungszustand: Die Zellen des Gehirns sind in dieser Situation erregt (also depolarisiert). Das Ausmaß der Amplitude der Negativierung hängt von vielen Parametern ab, unter anderem spielen die Aufmerksamkeit und die Motivation der Person eine große Rolle (Rockstroh et al., 1982). Dies wird daran deutlich, dass eine Ablenkung des Probanden (competitive factors) zu einer Verminderung der Negativierung führt (Rowland, 1968). Wird der imperative Reiz verarbeitet oder kommt es zu der assoziierten Reaktion, so führt dieses zu einer positiven Verschiebung bzw. zu einem Rückgang der negativen Potentialverschiebung.

Hier sei auf das integrative Modell von Rockstroh verwiesen (Rockstroh et al., 1982). In diesem Modell bringt man die negativen Potentialverschiebungen mit Prozessen der Vorbereitung für eine Informationsverarbeitung oder eine zerebrale Leistung in Zusammenhang – die Bereitstellung eines Potentials. Besonders große Ausschläge werden in anterioren Hirnarealen beobachtet, der Ort, an dem sich unter anderem Amygdala oder der laterale Hypothalamus (Irwin und Rebert, 1970) befinden, Strukturen, die zum limbischen System gehören oder wichtige Schaltkreise mit diesem bilden. Neben den oben beschriebenen Situationen werden die langsamen kortikalen Veränderungen auch z.B. beim Übergang vom Wachzustand zum Schlaf oder zwischen den verschiedenen Schlafphasen beobachtet (Caspers, 1993; Marshall et al., 1994).

1.6 Die Wirkung intravenös verabreichten Insulins auf das DC-Potential

Die in der vorliegenden Dissertation beschriebenen Versuchsreihen bauen auf einer vorher durchgeführte Studie auf (Hallschmid et al., 2004a). Hierbei wurden 27 männliche Probanden zwischen 21 und 31 Jahren per Zufall (randomisiert) auf drei Gruppen (n = 9) verteilt. Den Probanden der ersten Gruppe (Insulin-Eu) wurde intravenös eine Bolusinjektion Insulin verabreicht (0,1 mU/kg KG; H-Insulin, Avenis Pharma, Inc., Bad Soden, Deutschland). Hierbei

wurde zusätzlich Glukose in variablen Mengen infundiert, um euglykämische Bedingungen herzustellen. Die zweite Gruppe bekam Insulin (Insulin-Hypo), welches wie erwartet eine Hypoglykämie erzeugte (Blutzuckerspiegel bis 43 mg/dl 30 Minuten nach der Injektion). Durch diese Einteilung konnte man somit die Wirkung des Insulins von denen der Hypoglykämie unterscheiden. Versuchspersonen der dritten Gruppe bekamen eine Placeboinfusion anstelle von Insulin und Glukose.

Innerhalb von 7 Minuten nach der Injektion bewirkt Insulin bei allen Versuchspersonen eine deutliche DC-Potential-Verschiebung (Abbildung 1). Hierbei zeigt sich, dass in der Gruppe unter euglykämischen Bedingungen eine stärkere DC-Potential-Negativierung herbeigeführt wird. So erfolgt unter euglykämischen Bedingungen 40-50 Minuten nach der Insulingabe eine Potentialverschiebung bis auf $-621,3 \mu\text{V}$ in allen Aufnahmepositionen ($p < 0,001$, im Vergleich zu Placebo). Läßt man eine Hypoglykämie nach Insulingabe zu, sinkt das Potential nur auf $-331,2 \mu\text{V}$ ($p < 0,05$).

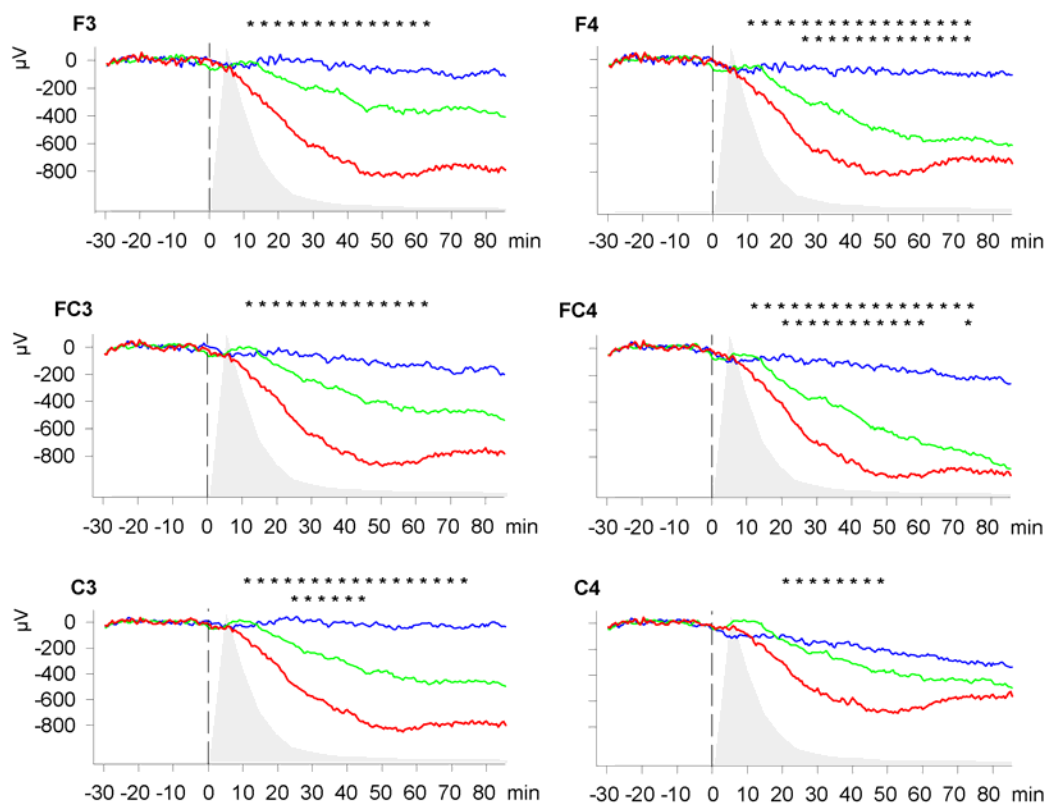


Abbildung 1: DC-Potentiale nach intravenöser Gabe von Insulin

Die Elektroden befanden sich jeweils rechts und links frontal (F3, F4), frontozentral (FC3, FC4) und zentral (C3, C4) des Kortex. Die rote Linie repräsentiert die Personengruppe, bei der durch eine Glucosekonzentration euglykämische Verhältnisse aufrechterhalten wurden. Die grüne Linie steht für die Probanden, bei der eine Hypoglykämie nicht verhindert wurde. Die Gruppe, die ein Placebopräparat erhielt, wird durch die blaue Linie dargestellt.

Analysen des Intervalls 10-60 Minuten postinjektionem (ANOVA) bestätigen ebenfalls eine stärkere Potentialnegativierung unter euglykämischen Bedingungen als unter Placebo ($F(1,13)=22,42$; $P<0,001$) oder unter einer Hypoglykämie ($F(1,13)=4,84$; $P<0,05$; $F(2,19)=9,06$; $P<0,01$). Analysen von einzelnen Aufnahmezeitpunkten zeigen (an der frontalen Ableitung) unter euglykämischen Bedingungen eine starke Negativierung der DC-Potentiale. Im Vergleich zu einem Baseline-Level, welcher vor der Injektion bestand, wird diese Negativierung nach 7 min signifikant, im Vergleich zu der Placebogruppe erst nach 10 Minuten. Bei einer Hypoglykämie werden diese Negativierungen im Vergleich zum Baseline-Level nicht vor 17 min nach Insulingabe beobachtet.

Während Insulin an sich keine Auswirkungen auf die Spontan-EEG-Aktivitäten hat, verursacht die Hypoglykämie 25-30 min nach Insulingabe ($F(2,22)=3,68$; $p<0,04$) einen schnellen Anstieg in der EEG-Theta-Aktivität (4-8 Hz). Hierbei zeigt sich die stärkste Änderung im Vergleich zur Euglykämie bei den Elektrodenpositionen F3 und F4 ($F(1,14)=5,9$ und $6,3$; $P<0,03$) und im Vergleich zu Placebo bei den Positionen F4 und FC4 ($F(1,14)=5,3$ und $4,8$; $P<0,05$). Es wird angenommen, dass dieser Anstieg auf den Abfall des Blutzuckerspiegels zurückzuführen sei, wobei Glukosesensoren (z.B. Zellen des Glomus caroticum) stimuliert werden, die einen Feedback über den derzeitigen Glukosespiegel ans Gehirn und limbische Strukturen geben (Pardal, R. und Lopez-Barneo, 2002).

Die vorangegangene Versuchsreihe hat also gezeigt, dass die intravenöse Gabe eines Insulinbolus eine schnell einsetzende negative Verschiebung des DC-Potentials auslöst, wobei unter hypoglykämischen Bedingungen die DC-Potential-Verschiebungen verzögert und mit vermindertem Ausmaß auftreten. Man kann also sagen, dass das Insulin die Zellen des Gehirns in ihrer Funktion beeinflusst und dass dieser Effekt schon sehr schnell einsetzt. Diese Reaktion ist auch nicht auf die periphere Wirkung, also die Senkung des Blutzuckerspiegels zurückzuführen. Es wird also deutlich, dass Insulin entweder direkt an den Zellen des ZNS wirkt oder dieses über noch nicht genau bekannte Mechanismen geschieht. Ebenfalls zeigt die Studie, dass die Wirkung des Insulins nicht nur von kurzer Dauer ist, sondern dass diese über einige Stunden anhält.

2. Fragestellung

In der vorangegangenen Versuchreihe (i.v.-Gabe von Insulin) konnten erhebliche DC-Potential-Verschiebungen beobachtet werden. Es stellt sich nun die Frage, inwieweit die Negativierung des DC-Potentials durch Prozesse an der Blut-Hirn-Schranke zustande kommt oder ob sie eher durch intrakranielle Potentialverschiebungen hervorgerufen wird. Um dieses zu untersuchen, muss der Weg über das Blut-Hirn-Schrankensystem ausgeschlossen werden, was durch die intranasale Insulingabe möglich ist. Kommt es also hierbei ebenfalls zu Veränderungen der Hirnstromaktivität, wären Prozesse an der Blut-Hirnschranke nicht allein verantwortlich. Ebenfalls ist zu untersuchen, ob die Negativierung nach intranasaler Gabe genau so stark wie nach intravenöser Gabe ist und ob sie auch so lange anhält.

Die Hauptfrage dieser Studie ist also, inwieweit und wie stark es nach intranasaler Insulingabe, also unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke, zu transkranial ableitbaren DC-Potential-Verschiebungen kommt. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob die intranasale Gabe von Insulin die Blutspiegel von Insulin, Glucose, ACTH, Cortisol, hGH, Glucagon und Elektrolyten verändert, um Aufschluss darüber zu gewinnen, ob intranasal verabreichtes Insulin der hier verabreichten Dosis (60 IU) periphere Parameter beeinflusst. Außerdem wurde erhoben, ob die intranasale Insulingabe einen Effekt auf die subjektive Einschätzung von Hunger, Durst und Müdigkeit ausübt.

3. Methoden

Der nun folgende Abschnitt befasst sich mit dem Aufbau des experimentellen Teils der Doktorarbeit. Hierbei wird auf die Anforderungen, die an die einzelnen Probanden gestellt wurden eingegangen. Außerdem erfolgt die Beschreibung über die Versuchsvorbereitung und den genauen Ablauf und zuletzt die Auswertung der einzelnen Parameter.

3.1 Probanden

An der Studie nahmen 16 gesunde, normalgewichtige männliche Probanden zwischen 18 und 30 Jahren teil. Sie wurden per Aushang in der Universität gesucht, und ihnen wurde eine Vergütung von 50 Euro für zwei Sitzungen à jeweils 4 Stunden gezahlt. Ausschlusskriterien waren chronische oder akute Krankheiten, Medikamente jeglicher Art, Rauchen, Alkohol- oder

Drogenmissbrauch, Fettleibigkeit und Diabetes (auch nicht bei Verwandten ersten Grades). Wegen der zu erfolgenden Blutentnahmen stellte das Blutspenden in einem Zeitraum von 4 Wochen vor und nach der Testung ebenfalls ein Ausschlusskriterium dar. In einem zuvor geführten Anamnesegespräch wurden die Ein- und Ausschlusskriterien sowie der aktuelle Gesundheitsstatus erfasst. Anhand eines Informationsblattes, welches über den Versuch und eventuelle unerwünschte Wirkungen aufklärte, konnte sich der Proband ein Bild machen und hinterher die beigegefügte Einverständniserklärung unterschreiben.

Jedem Teilnehmer wurde gesagt, dass er an dem Tag vor dem Versuch keinen Alkohol trinken, keinen extremen Sport treiben und nicht später als 22.00 Uhr ins Bett gehen sollte. Für jeden Probanden waren insgesamt zwei Sitzungen geplant, wobei einmal das Verum (Insulin) und das andere Mal Placebo verabreicht wurde. Zwischen den jeweiligen Testungen mussten mindestens sieben Tage liegen. Da der Versuch doppelblind war, war weder dem Probanden noch der Versuchsleiterin bekannt, welchen Stoff das Nasenspray an dem jeweiligen Versuchstag enthielt. Die Ethikkommission der Universität Lübeck hatte den Versuch vorher bewilligt.

3.2 Versuchsvorbereitungen:

Am Abend vor dem Versuchstag wurden acht nicht-polarisierbare Ag/AgCl-Elektroden (8mm Durchmesser, EVM-Instrumente, Österreich) mit Gel gefüllt und jeweils zwei Stück zusammengeklebt, damit sich das Elektrode/Elektrolyt-System stabilisieren konnte. In acht rote Monovetten wurde für die Glucagonbestimmung jeweils 0,1 ml des Proteaseinhibitors Aprotinin (1000 kIU; Trasyolol 0,5 ®, Bayer Vital, 51368 Leverkusen) gefüllt, hiermit sollte eine spätere Fibrinolyse verhindert werden. Hinterher mussten diese bis zu den Blutentnahmen im Kühlschrank gelagert werden. Ebenfalls wurde der Verstärker für die Datenübertragung am Computer angestellt. Kurz vor Eintreffen des Probanden wurde die NaCl-Infusionslösung angeschlossen und der Schlauch mittels Dreiwegehahnssystem und Injectomat®-Leitung (150 cm) verlängert. An dessen Ende wurde ein weiterer Dreiwegehahn angeschlossen, um diesen dann später an der Braunüle zu befestigen.

3.3 Versuchsdurchführung

Am Tag des Experimentes kamen die Probanden um 8.00 Uhr ins Labor, nachdem sie mindestens 10 Stunden lang nichts mehr gegessen hatten. Zu allererst wurde der Blutdruck mit einem elektronischen Blutdruckmessgerät kontrolliert. Anschließend wurde eine grüne Braunüle in der linken cubitalen Vene platziert und die Infusion angeschlossen. Nun erfolgte die Befestigung der Elektroden, wobei hierbei jeweils zwei frontal (F3, F4), zwei zentral (C3,C4) und zwei weitere zwischen den frontalen und zentralen Positionen (FC3, FC4) angebracht wurden. Zwei Elektroden an den Mastoiden stellten die Referenzelektroden dar (M1, M2). Auf das Anlegen von okzipitalen Elektroden wurde verzichtet, da diese durch die Nähe zur Rückenlehne des Stuhles sehr anfällig für Artefakte wie Temperaturschwankungen gewesen wären. Ebenfalls ergaben vorangegangene Studien, dass EEG-Effekte des Insulins sich vor allem auf den frontocentralen Kortex konzentrieren (Tamburrano et al., 1988; Tallroth et al., 1990).

Die Position der Elektroden auf dem Schädel wurde nach dem 10-20-System ermittelt

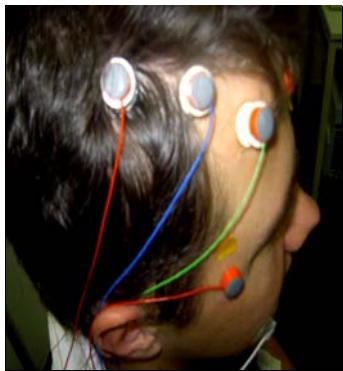


Abbildung 2: Position der Kopfelektroden (F,FC,C)

(vgl. Marshall et al., 2000; Hallschmid et al., 2002) und die jeweiligen Orte mit einem Eddingstift markiert. Nun wurden eventuell vorhandene Verunreinigungen der Haut wie Talg und Fett mit einer Cutasept®-Lösung weitestgehend beseitigt und die Sockel mit Kollodium befestigt. Die weitere Vorgehensweise bestand in dem „Anritzen“ der Kopfhaut mit einer subkutanen Injektionsnadel, um den Hautwiderstand herabzusetzen. Nun konnte das Elektrodengel (Electrode Electrolyte, TECA Corp., NY) in die Sockel gefüllt werden, wobei darauf geachtet werden musste, dass keine Luftblasen entstehen, da diese eine weitere Störungsquelle dargestellt hätten. Die zuvor

mit Gel präparierten Elektroden konnten nun auf den Sockeln befestigt werden, auch hier durften keine Luftblasen entstehen.

Für die Erfassung der Elektromyogramm (EMG)- und Elektrookulogramm- (EOG)-Signale wurden sieben Elektroden mittels Elektrodenpflaster im Gesicht befestigt. Das linke Auge erhielt supra- und infraorbital je eine Elektrode, zwei weitere wurden jeweils lateral beider Augen platziert (vertikales und horizontales EOG). Für die EMG-Ableitungen wurden zwei weitere Elektroden links und rechts am Kinn befestigt. Um



in dieser Position bessere Ergebnisse zu erhalten, wurde als Gel hierfür eine Grass-Paste (EC2TM) verwendet.

Nun konnten die Impedanzen der Kopfelektroden mittels Messgerät ermittelt werden, wobei der Widerstand nicht mehr als 5 k Ω betragen durfte. Waren alle Impedanzen im grünen Bereich, gab der Proband auf einer Skala von 1-10 sein momentanes Hunger-, Durst- und Müdigkeitsgefühl an (im Anhang). Nach einer Vorbereitungszeit von ca. 1,5 – 2 Stunden konnte der Proband nun für die Messungen an den Computer angeschlossen werden.

In diesem separaten Raum (der Computer befand sich nebenan) sollte der Proband möglichst entspannt sitzen, die Augen geradeaus halten und auf einen auf der Wand befestigten Punkt blicken. Es war wichtig, dass sich dieser Punkt in direkter Augenhöhe befand und der Proband versuchte, so wenig wie nur möglich mit den Augen zu blinzeln. Reden oder gar Schlafen während der Aufnahmezeit waren nicht erlaubt. Die Probanden wurden instruiert, einen Druckknopf alle 30 Sekunden zu drücken, um einen konstanten mentalen Aktivitätszustand zu erreichen und sie am Einschlafen zu hindern. Das regelmäßige Drücken der Taste wurde mit der EEG-Aufnahme aufgezeichnet.

Die Aufnahme begann mit einer Grundlinien-Phase von 30 Minuten. Hiernach wurde, nachdem dies in der Aufnahme markiert worden war, dem Probanden das Insulin/Placebo (60 Einheiten in 0,6 ml) innerhalb höchstens einer Minute appliziert. Hierbei wurde je ein Hub pro Nasenloch verabreicht, 15 sec gewartet, und das ganze wiederholt, bis der Proband insgesamt drei Hübe pro Nasenloch erhalten hatte. Hierbei wurde ihm vor der Aufnahme gesagt, dass er versuchen sollte, möglichst ruhig zu bleiben, um die Potentialschwankungen so gering wie möglich zu halten.

Abbildung 3: Nach Platzierung der Kopf- und Gesichtselektroden

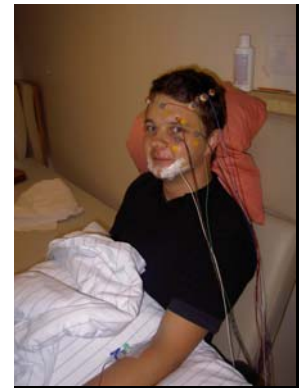


Abbildung 4: Anschluss der Elektroden und Aufzeichnung der DC-Potentiale



Abbildung 5: Blutentnahme nach einem festgelegten Schema

Die Blutentnahmen geschahen mittels des Dreiwegehahnsystems an dem Infusionsschlauch, welcher unter der geschlossenen Tür hindurchführte. Der Infusionsständer befand sich somit auf der Seite des Untersuchers, so dass die Messungen durch die Entnahmen so wenig wie nur möglich gestört wurden. Es wurden hierbei Blutproben für die Bestimmung von Insulin, Wachstumshormon (hGH), Cortisol (Serum), ACTH (Plasma), Glucagon (Plasma), Elektrolyte und Glucose alle 15 Minuten in dem Zeitraum von -30 bis 0 (= Applikation des Nasensprays) abgenommen. In den folgenden 60 Minuten wurden der Parameter Insulin alle 5 Minuten und die übrigen nach einem vorgeschriebenen Schema (im Anhang) abgenommen. In den letzten 30 Minuten ging man bei allen Werten wieder im 15 min-Takt vor.

Nach insgesamt 120-minütiger Aufzeichnung wurde die Aufnahme gestoppt, die Werte gespeichert und der Proband wieder wegen seines Befindens bezüglich Hunger, Durst und Müdigkeit interviewt. Wieder zurück im Vorbereitungsraum wurden die Impedanzen ein weiteres Mal gemessen, die Elektroden abgenommen und die Elektrodensockel mit Aceton entfernt.

3.4 Erfassung und Auswertung der DC-Potentiale

Es wurde ein SynAmps-DC-Verstärker (NeuroScan Inc., Herndon, Virginia, USA) für die Verstärkung benutzt. Er war auf einen Tiefpassfilter von 30 Hz und eine Abtastrate von 100 Hz eingestellt. Vertikales und horizontales Elektrokulogramm (EOG) wurden als DC-Aufnahme mit einem Tiefpassfilter von 30 Hz aufgezeichnet, das Elektromyogramm (EMG) wurde bipolar mit einem Hochpassfilter von 10 Hz und einem Tiefpassfilter von 40 Hz festgehalten.

Der Verstärker wurde wiederholt kurzgeschlossen und auf DC-Potentialschwankungen getestet, sie betragen stets weniger als 5 $\mu\text{V}/\text{h}$. Wurden nur die mit Gel gefüllten Elektroden an den Verstärker angeschlossen, betragen die Schwankungen, wenn überhaupt, weniger als 20 $\mu\text{V}/\text{h}$. Die durchschnittlichen DC-Potential-Werte wurden offline für aufeinander folgende 30 s-Intervalle bestimmt. Lineare Potentialschwankungen während der Aufnahmezeit wurden mittels linearer Regression beseitigt (Henninghausen et al., 1993). Um Unregelmäßigkeiten zu vermeiden, wurde der Verstärker mindestens zwei Stunden vor Aufnahmebeginn einge-

schaltet. Die Abtastfrequenz der DC-Ableitungen wurde von den ursprünglichen 250 Hz auf eine Rate von 1 Wert/5 Sekunden transformiert und als Fixzeitpunkt $t = 0$ der Zeitpunkt der Nasenspraygabe festgelegt. Der statistischen Auswertung wurde schließlich der Zeitabschnitt nach Gabe des Nasensprays unterworfen, wobei das Niveau des durchschnittlichen DC-Potentials vor der Gabe als Grundlinie diente.

3.5 Ermittlung der Blut-Hormon-Spiegel

Nach Beendigung der Testung wurden die Blutproben 10 Minuten lang bei 4000 Umdrehungen und 4°C zentrifugiert. Hinterher wurden je ca. 600 µl mit Hilfe von Eppendorf-Pipetten abpipettiert und in separate Eppendorfhütchen gefüllt. Bis zur Bestimmung der Parameter ACTH, Glucagon, Insulin, hGH und Cortisol wurden die Behälter tiefgefroren. Im Labor wurden Routine-Analysen benutzt, um die Konzentration von Serum-Insulin (Pharmacia Insulin RIA 100, Pharmacia Diagnostics, Uppsala, Schweden; interassay coefficient of variation (CV) < 5,4 %), hGH (human GH radioimmunoassay; Biermann, Bad Nauheim, Deutschland; intra- and interassay CV < 6,0 %, beziehungsweise, zwischen 1,6 und 10,0 ng/ml), und Plasma-ACTH (LUMI-Test ACTH, Brahms Diagnostica, Berlin, Deutschland; Interassay CV < 12 %, intraassay CV < 8 %) zu bestimmen. Das Blut in den gelben Monovetten wurde zur Bestimmung der Elektrolyte (K, Na, CL, Ca) in die klinische Chemie gebracht.

3.6 Statistische Auswertung

Nach der Artefaktbereinigung der DC-Ableitungen wurde aus den Ableitungen der Einzelelektroden durch Mittelung für beide Bedingungen jeweils eine frontozentrale Ableitung errechnet. Diese Kurvenverläufe der Bedingungen Ins (Insulin) und Pla (Placebo) wurden mittels parametrischer t-Tests für abhängige Stichproben verglichen, um kritische Intervalle mit einer Häufung von signifikanten Unterschieden zwischen den Bedingungen zu erkennen. Außerdem wurden Unterschiede zum jeweiligen Grundlinienniveau errechnet, um das erste Auftreten etwaiger Abweichungen vom Grundlinienniveau festzustellen. Dabei stellte sich der Bereich von 40-85 min nach Insulingabe als der Zeitraum mit den größten Unterschieden heraus. Die Mittelwerte für diesen Zeitraum wurden einer Varianzanalyse mit dem Faktor Bedingung (Ins vs. Pla) und univariaten Varianzanalysen (Ins bzw. Pla) unterworfen. Die grundlinienkorrigierten Blutparameter (wie Insulin und Glukose) wurden Varianzanalysen mit

Messwiederholungen mit den Faktoren Bedingung und Zeitpunkt (Abnahmezeitpunkt) unterworfen. Wurde ein Haupteffekt des Faktors Bedingung festgestellt, wurden die (wiederum grundlinienkorrigierten) Werte der Einzelzeitpunkte mittels parametrischer t-Tests für abhängige Stichproben miteinander verglichen. Die Ratings von Hunger, Durst und Müdigkeit, die vor und nach dem Versuch erhoben worden waren, wurden zunächst innerhalb und zwischen den Bedingungen per Wilcoxon-Test miteinander verglichen, anschließend wurden die Differenzen zwischen den Erhebungszeitpunkten mit demselben Test nach Unterschieden zwischen den beiden Versuchsbedingungen untersucht.

4. Ergebnisse

In diesem Abschnitt wird dargestellt, welche Auswirkung das intranasal applizierte Insulin auf die elektrische Aktivität des Gehirns hat. Da außerdem untersucht wurde, in wieweit das Insulin einen Effekt auf das periphere System hat, erfolgt die genaue Betrachtung einiger Hormone (ACTH, hGH, Cortisol, Glukagon) und Elektrolyte, um eine eventuelle Beeinflussung dieser Parameter zu erfassen. Im Anschluss wird auf die Beeinflussung von Hunger, Durst und Müdigkeit eingegangen.

4.1 DC-Potentiale nach intranasaler Insulin-Gabe

Ebenso wie nach intravenöser Insulin-Gabe ist nach intranasaler Gabe von 60 IU Insulin eine starke DC-Potential-Negativierung zu verzeichnen (Abbildung 6). Im Vergleich zur Grundlinie wird die Negativierung bereits nach 25 Minuten nach Gabe signifikant, im Vergleich zur Placebo-Gruppe ist dieses nach ca. 40 Minuten der Fall. Die DC-Negativierung verstärkt sich hierbei noch in den darauf folgenden 45 Minuten und verändert sich danach nicht mehr stark.

Im Zeitintervall 40-85 Minuten nach Applikation kommt es nach Insulingabe zu einer DC-Negativierung bis auf $-469,3 \pm 80,7 \mu\text{V}$, die sich signifikant von jener unter der Placebobedingung unterscheidet ($-196,6 \pm 105,3 \mu\text{V}$; $F(1,10)=6,97$, $p<0,025$). Die Negativierung unter der Insulinbedingung ist im Vergleich zur Grundlinie hochsignifikant ($F(1,10)=33,8$; $p<0,0002$; Placebo: $F(1,10)=4,2$, n.s).

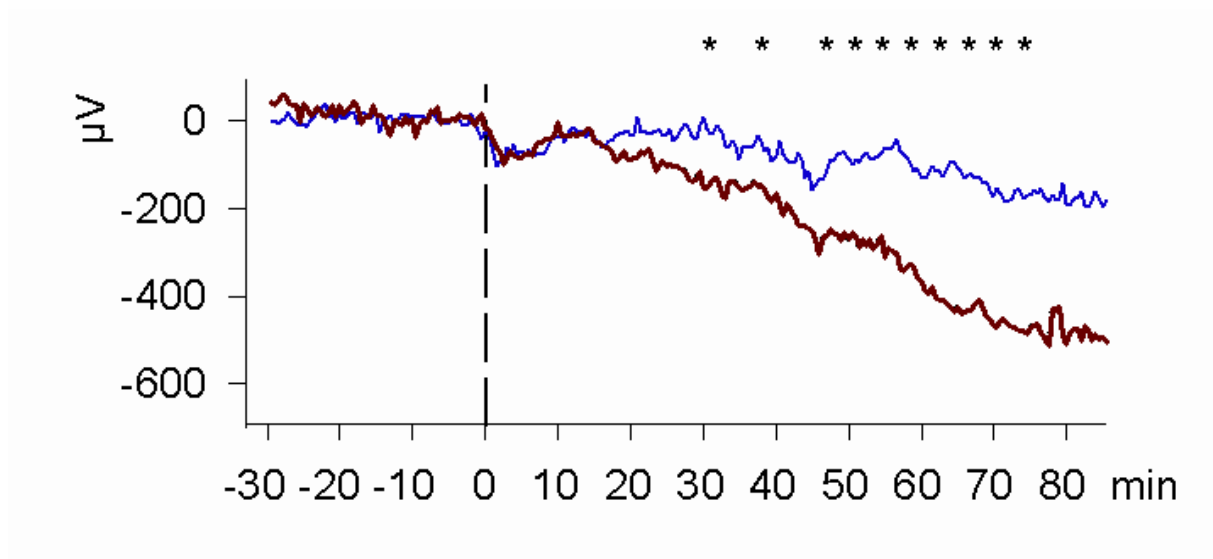


Abbildung 6: DC-Potentiale nach Gabe des Nasensprays.

DC-Potentiale nach intranasaler Gabe von Insulin (rot) und nach intranasaler Gabe von Placebo (blau). Die Aufzeichnung erfolgte in einem Zeitraum von 30 Minuten vor bis 90 Minuten nach Gabe des Nasensprays zum Zeitpunkt 0 min.

4.2 Blut-Hormon-Spiegel nach der intranasalen Gabe von Insulin

Während der Hirnstromableitung wurde in vorgegebenen Zeiträumen Blut abgenommen, um die Konzentration von Insulin, Glukose, Cortisol, ACTH, hGH, Glukagon und Elektrolyten zu bestimmen. Die Insulinkonzentration im Blut steigt nach intranasaler Gabe leicht an ($F(1,10)=6,69$; $p<0,027$). So kommt es nach 15 Minuten zu einem Anstieg von einer durchschnittlichen Anfangskonzentration von $4,67 \mu\text{g/ml} \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$ auf $8,07 \mu\text{g/ml} \pm 1,92 \mu\text{g/ml}$. Danach sinkt der Wert jedoch schnell wieder ab und liegt bei Beendigung der Aufzeichnung bei $4,37 \mu\text{g/ml} \pm 0,36 \mu\text{g/ml}$ (siehe Abbildung 7).

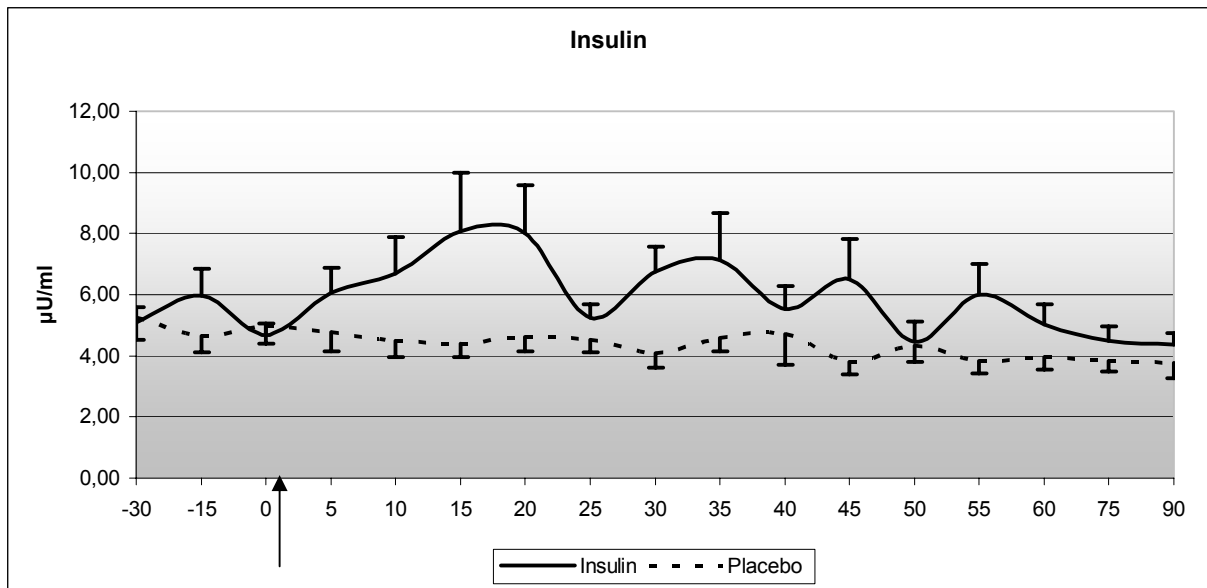


Abbildung 7: Insulin

Kurvenverlauf der Insulinkonzentration im Blut in einem Zeitraum 30 Minuten vor Gabe des Nasensprays bis 90 Minuten nach Gabe des Nasensprays. Die Konzentration wurde unter Insulin- (durchgezogene Linie) und Placebogabe (gestrichelte Linie) bestimmt.

Im dem Zeitraum nach Applikation von Insulin herrscht im Mittel eine Glukose-Konzentration ($F(1,10)=2,96$; $p=0,12$) von $90,36 \pm 1,68$ mg/dl nach Insulingabe und von $88.79 \pm 1,87$ mg/dl nach Placebogabe (Abbildung 8).

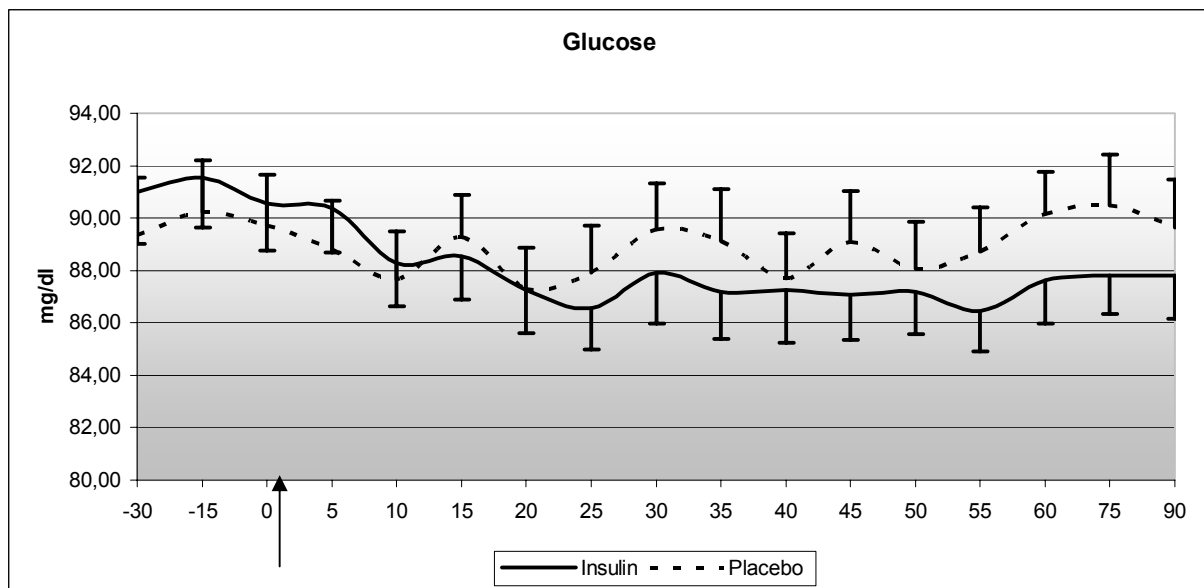


Abbildung 8: Glucose

Kurvenverlauf der Glukosekonzentration im Blut in einem Zeitraum 30 Minuten vor Gabe des Nasensprays bis 90 Minuten nach Gabe des Nasensprays. Die Konzentration wurde unter Insulin- (durchgezogene Linie) und Placebogabe (gestrichelte Linie) bestimmt.

Bei den anderen Parametern sieht man ebenfalls keine Unterschiede in den Varianzanalysen. So bleibt die Konzentration von Cortisol ($F(1,10)=0,019$; $p=0,89$), ACTH ($F(1,9)=0,11$; $p=0,74$), hGH ($F(1,10)=2,18$; $p=0,17$), Glukagon ($F(1,10)=1,12$; $p=0,31$) und Elektrolyten weitestgehend konstant (Cortisol: Abbildung 9; Glukagon: Abbildung 10, ACTH: Abbildung 11). Es ist darauf hinzuweisen, dass es in einigen Blutproben zur Hämolyse kam oder aufgrund von Schwierigkeiten nicht immer eine geeignete Menge an Blut abgenommen werden konnte. Doch war zur Bestimmung eine ausreichend vorhandene Blutprobenmenge vorhanden, um eine gute Aussage über den Verlauf der Konzentration der einzelnen Parameter während des Zeitraumes der DC-Ableitungen zu machen.

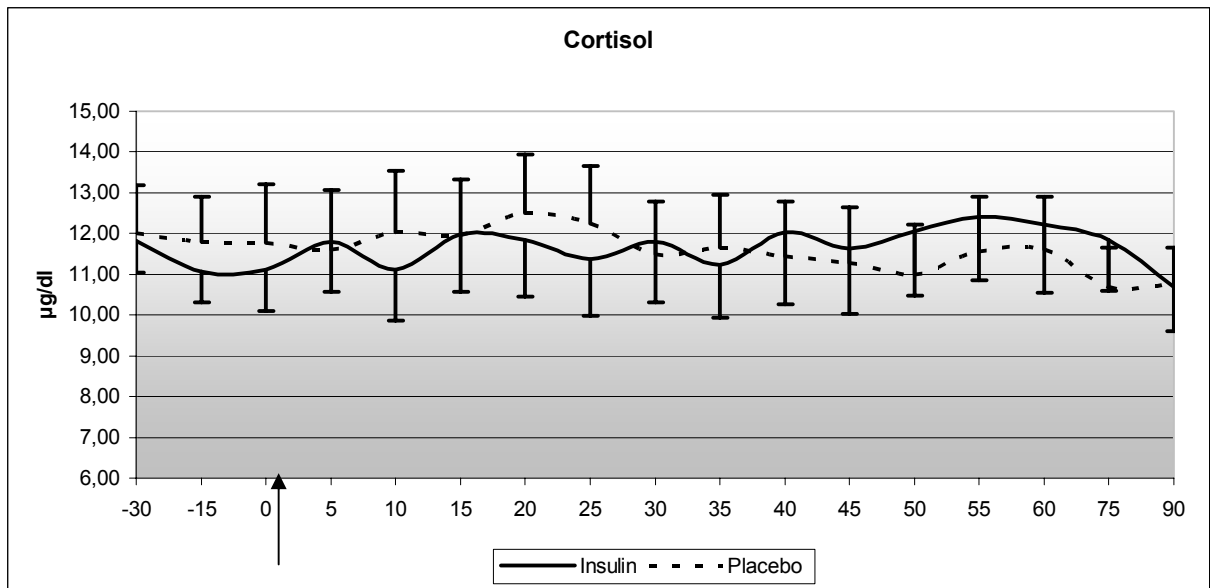


Abbildung 9: Cortisol

Kurvenverlauf der Cortisolkonzentration im Blut in einem Zeitraum 30 Minuten vor Gabe des Nasensprays bis 90 Minuten nach Gabe des Nasensprays. Die Konzentration wurde unter Insulin- (durchgezogene Linie) und Placebogabe (gestrichelte Linie) bestimmt.

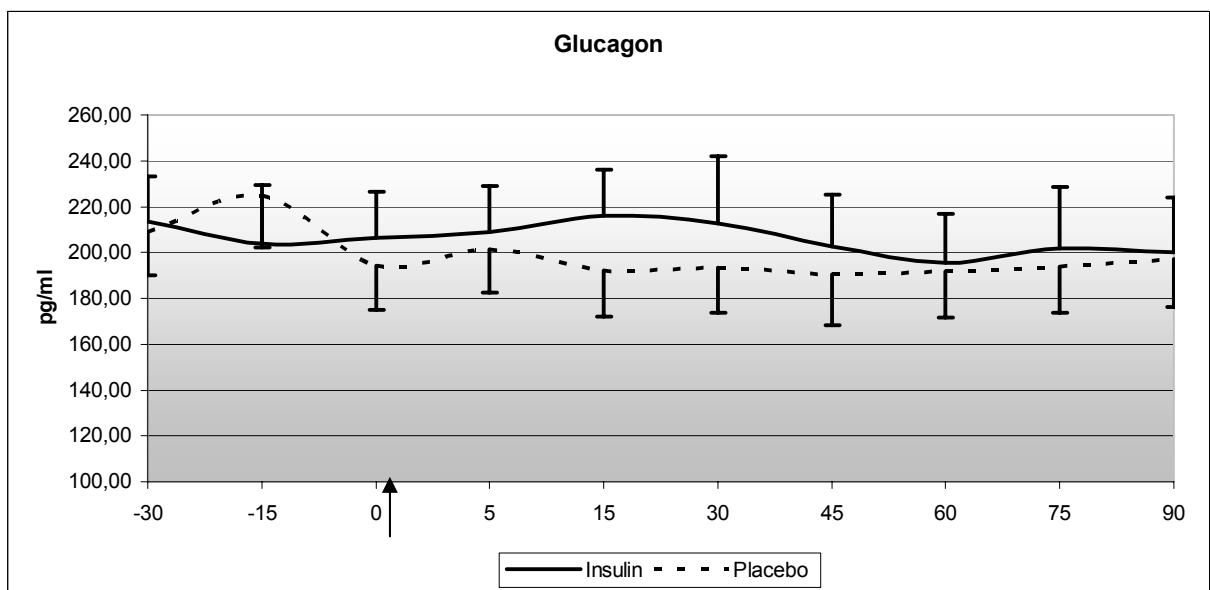


Abbildung 10: Glucagon

Kurvenverlauf der Glucagonkonzentration im Blut in einem Zeitraum 30 Minuten vor Gabe des Nasensprays bis 90 Minuten nach Gabe des Nasensprays. Die Konzentration wurde unter Insulin- (durchgezogene Linie) und Placebogabe (gestrichelte Linie) bestimmt.

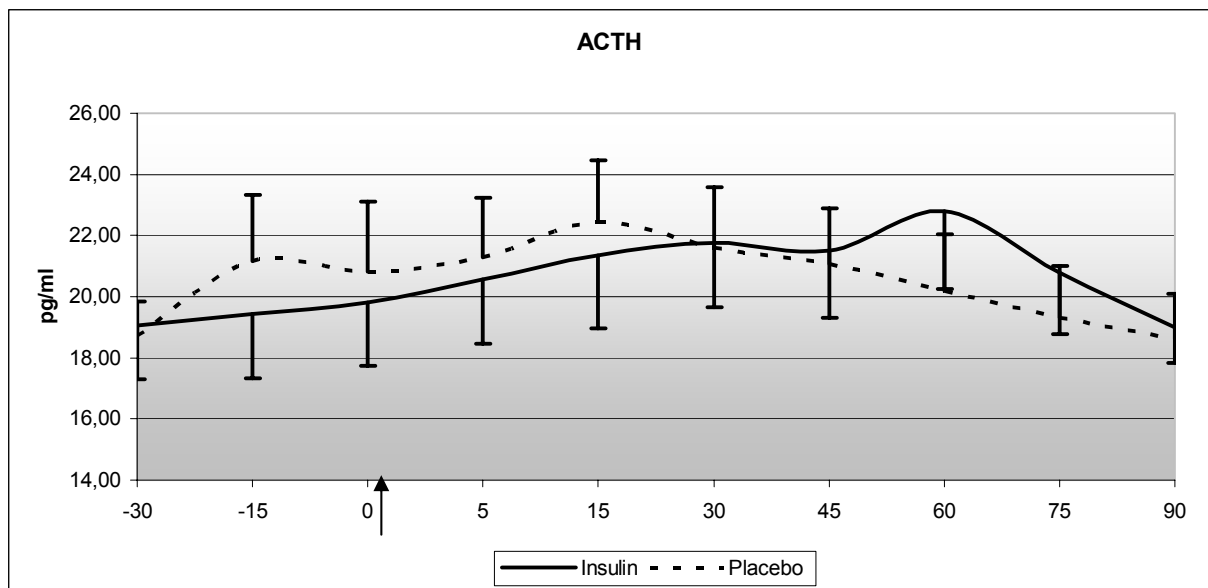


Abbildung 11: ACTH

Kurvenverlauf der ACTH-Konzentration im Blut in einem Zeitraum 30 Minuten vor Gabe des Nasensprays bis 90 Minuten nach Gabe des Nasensprays. Die Konzentration wurde unter Insulin- (durchgezogene Linie) und Placebogabe (gestrichelte Linie) bestimmt

4.3 Subjektives Empfinden vor und nach Gabe des Nasensprays

Die Probanden sollten jeweils vor dem Beginn und nach Beendigung der DC-Potential-Aufzeichnung anhand einer Punkteskala von 1-10 (1=niedrig, 10=hoch) einschätzen, wie groß ihr Hunger, ihr Durst und ihre Müdigkeit waren. Die Einschätzungen bezüglich aller drei Parameter unterschieden sich nicht zwischen den Bedingungen ($P > 0,19$ für alle Vergleiche).

Die Probanden gaben ihren Hunger vor Beginn der Aufzeichnung mit einem durchschnittlichen Wert von $5,69 \pm 0,35$ und nach Gabe des Insulins und Beendigung der Aufzeichnung mit $6,31 \pm 0,49$ an. Unter Placebobedingungen wurde der Hunger jeweils vor und nach der Hirnstromaufzeichnung mit $5,92 \pm 0,61$ angegeben (siehe Abbildung 12).

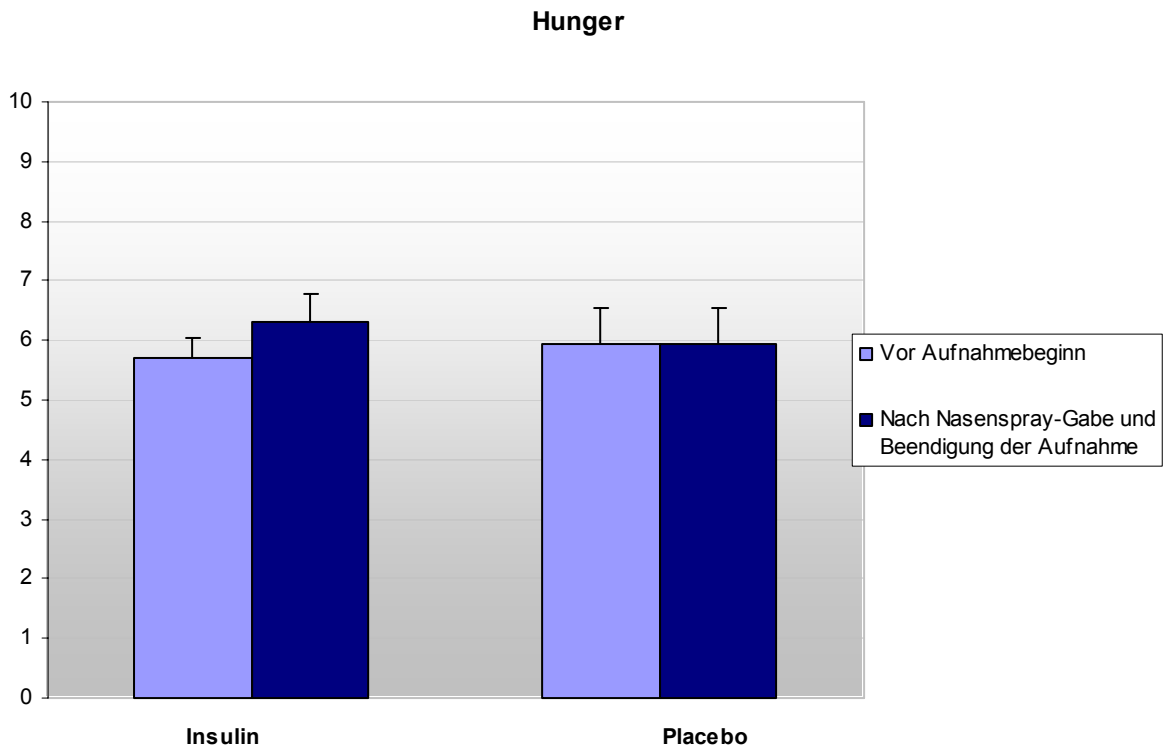


Abbildung 12: Hunger

Durchschnittswerte (\pm SEM) der Einschätzung des Hungergefühls vor (hellblauer Balken) und nach Gabe des Nasensprays und Beendigung der Aufzeichnung (dunkelblauer Balken).

Ihren Durst schätzen die Probanden mit durchschnittlich 5,15 \pm 0,45 vor der Aufzeichnung ein, nach Gabe des Insulins und Beendigung der Aufzeichnung lag der Wert bei 5,69 Punkten \pm 0,44. Erhielten sie Placebo, war vor der Testung der Durst bei durchschnittlich 5,69 Punkten \pm 0,55 und am Ende bei 5,77 Punkten \pm 0,5, dieses gibt die Abbildung 13 wieder.

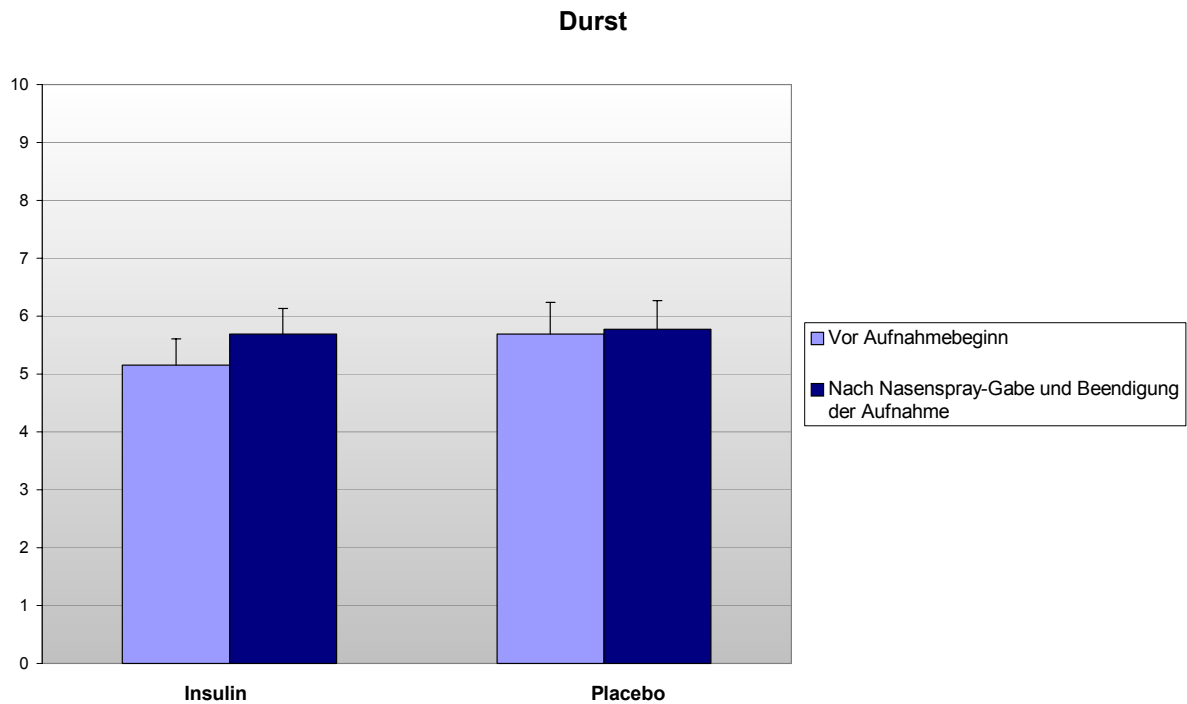


Abbildung 13: Durst

Durchschnittswerte (\pm SEM) der Einschätzung des Durstgefühls vor (hellblauer Balken) und nach Gabe des Nasensprays und Beendigung der Aufzeichnung (dunkelblauer Balken).

Befragungen nach der Müdigkeiten ergaben bei den Testungen mit Insulin vor der Aufnahme einen durchschnittlichen Wert von $4,54 \pm 0,47$ und nach Beendigung der Aufnahme von $5,69 \pm 0,36$. Unter Placebogabe schätzten die Probanden sich am Anfang mit $5,77 \pm 0,61$ und am Ende mit $4,54 \pm 0,48$ auf der Punkteskala ein (siehe Abbildung 14).

Müdigkeit

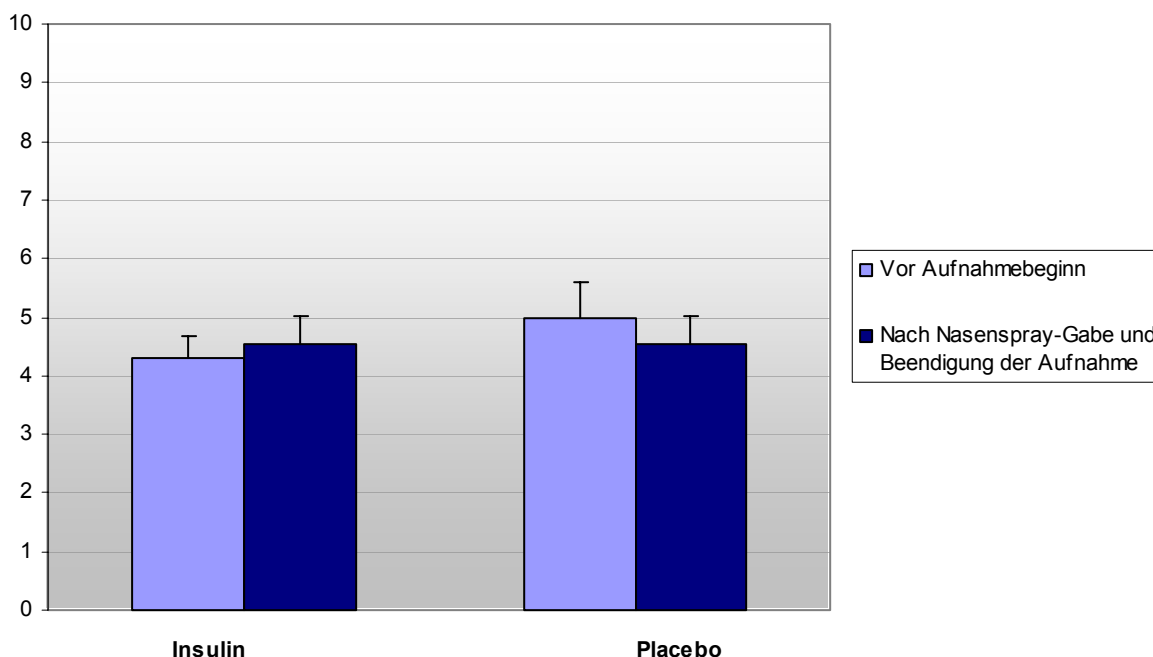


Abbildung 14: Müdigkeit

Durchschnittswerte (\pm SEM) der Einschätzung der Müdigkeit vor (hellblauer Balken) und nach Gabe des Nasensprays und Beendigung der Aufzeichnung (dunkelblauer Balken).

5. Diskussion

In dem nun folgenden Kapitel werden die zuvor dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit diskutiert. Zu Beginn erfolgt die genaue Betrachtung der Veränderung der DC-Potentiale und der Blutparameter nach intranasaler Insulingabe. Ebenfalls folgt im Anschluss daran die Diskussion über die Einschätzung des subjektiven Empfindens der einzelnen Probanden vor Beginn und nach Abschluss der DC-Potential-Aufzeichnung. Da die Aufzeichnung von DC-Potentialen doch sehr störanfällig ist, befasst sich der nächste Unterpunkt mit den möglichen Artefaktquellen, die während einer solchen Aufnahme auftreten können. Auch stellt sich die Frage, auf welchem Weg das intranasal applizierte Insulin ins Gehirn gelangt. Somit wird im darauf folgenden Punkt versucht, den wahrscheinlichsten Weg des Insulins darzustellen. Neben diesen Überlegungen kommt ebenfalls die Frage auf, welche Veränderungen im Gehirn die DC-Negativierungen verursachen und welche Zellen im ZNS hierfür primär verantwortlich sind. Dieses soll im darauf Folgenden erörtert werden. Als nächstes werden die Ergebnisse bezüglich der DC-Potential-Veränderung nach intranasaler Gabe mit denen nach intravenö-

ser Verabreichung verglichen und die Unterschiede genau dargestellt. Der letzte Punkt dieses Kapitels befasst sich mit der Frage, welche Zukunft die Gabe von Insulin per Nasenspray haben könnte, wenn es nur auf zentraler Ebene eine Wirkung erzielt und die peripheren (Neben-)Wirkungen nicht nachweisbar sind.

Es lässt sich zu Beginn schon einmal folgendes sagen: Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe zeigen, dass es nach Gabe einer Dosis von 60 IU Insulin zu einer Negativierung des transkraniellen DC-Potentials kommt. Regelmäßige Blutuntersuchungen während der Messung stellten nach intranasaler Gabe jedoch sicher, dass das Insulin nur im vernachlässigbaren Ausmaß in die Peripherie gelangte und somit bestimmte Blutparameter wie zum Beispiel der Blutglukose- oder Cortisolspiegel konstant blieben. Periphere Nebenwirkungen traten hierbei also nicht auf. Auf die subjektive Einschätzung von Hunger, Durst und Müdigkeit hatte die Gabe des Insulins keinen Einfluss.

5.1 DC-Potential-Verschiebung und Veränderung der Blutparameter nach intranasaler Insulingabe

Da das Gehirn ein Hauptziel für zirkulierendes Insulin darstellt (Unger et al., 1991; Schwartz et al., 1992), war die Annahme, dass es unter Insulineinfluss zu einer Änderung der DC-Potentiale kommt. In der Tat konnte man schon nach 25 Minuten eine signifikante Negativierung der DC-Potentiale im Vergleich zur Grundlinie feststellen. Im Vergleich zur Placebogruppe war dieses nach 45 Minuten der Fall.

Die geringfügige DC-Potential-Verschiebung, die man unter Placeboeinfluss erkennen kann, kann man durch mögliche Artefaktbelastungen erklären. Mögliche Störungsquellen werden weiter unten beschrieben. Während die Potential-Verschiebung unter Placeboeinfluss nicht signifikant war, war nach Insulingabe eine weitaus größere DC-Negativierung zu beobachten, so dass hier die Wirkung des Insulins auf die Gehirnaktivität doch sichtbar wird. Es wird also deutlich, dass das Insulin nach intranasaler Gabe das Gehirn in seiner Aktivität beeinflussen kann. Dieses wird auch in Versuchen durch Kern et al. deutlich, in denen nachgewiesen wurde, dass nach intranasaler Insulingabe trotz nicht vorhandener Konzentrationen im Blut Effekte in den Hirnableitungen nachweisbar sind (Kern et al., 1999). Das Insulin muss also nicht die Blut-Hirn-Schranke passieren, um Effekte auf das DC-Potential auszuüben, der direkte Weg aus der Nasenhöhle in die Hirnsubstanz ermöglicht offenbar eine Wirkung auf zentral-

nervöse Strukturen, die sich in der beobachteten Veränderung des DC-Potentials widerspiegelt.

Um nachzuweisen, dass das intranasal applizierte Insulin nicht in die Peripherie gelangt, wurden während der Aufnahmen zu bestimmten Zeitpunkten die Bluthormonspiegel bestimmt. Betrachtet man den Insulinspiegel in der Peripherie, wird deutlich, dass dieser nach Gabe der Substanz von durchschnittlich $4,67 \mu\text{g/ml} \pm 0,39 \mu\text{g/ml}$ auf $8,07 \mu\text{g/ml} \pm 1,92 \mu\text{g/ml}$ ansteigt. Er fällt jedoch bis zur Beendigung der Hirnstromaufzeichnung wieder bis auf das Ausgangsniveau ab, so dass bisherige Arbeiten bestätigt werden, die keinen einschneidenden Einfluss auf den Blutinsulinspiegel nach intranasaler Insulingabe feststellten (Kern et al., 1999; Born et al., 2002). Die anderen Blutparameter, hier vor allem der Blutglukosespiegel, verändern sich nach Gabe des Insulins nicht. Man sieht zwar, dass eine geringe Insulinkonzentration für kurze Zeit in das periphere System übertritt. Die Konzentration ist aber zu gering, um einen Effekt auf die anderen Hormonspiegel zu haben. Aus diesem Grund wäre die Insulinmenge an der Blut-Hirn-Schranke wohl auch zu gering, um solch eine starke Auswirkung auf die Hirnstromableitung zu haben. So sind diese Veränderungen doch primär auf zentrale Wirkungen des Insulins zurückzuführen. Neben diesen objektiven Parametern wurde ebenfalls die subjektive Einschätzung der einzelnen Probanden bezüglich Hunger, Durst und Müdigkeit vor Beginn und nach Beendigung der DC-Potential-Aufzeichnung untersucht. Mit diesen Beobachtungen befasst sich der nun folgende Abschnitt.

5.2 Subjektives Empfinden vor und nach Gabe des Nasensprays

Die Auswertung der subjektiven Ratings ergab Widererwartens keine signifikanten Unterschiede zwischen den Bedingungen. Betrachtet man das Hungergefühl, hätte man von der Insulingabe eine Supprimierung des Hungergefühls erwarten können, da viele Studien anorektische Effekte des Insulins belegen (McGowan et al., 1990; Vanderweele et al., 1982; Woods et al., 1979). Es sei allerdings darauf hingewiesen, dass in vielen Versuchen das Insulin direkt in den Hirnventrikel gespritzt wurde, so dass in diesem Fall eine viel höhere Konzentration im Gehirn wirken konnte. Nach intranasaler Applikation geht auf dem Weg von der Nasenschleimhaut in das Gehirn natürlich ein Teil verloren, kommt also gar nicht im Gehirn an. Zwar reicht diese Menge aus, um zu Veränderungen der DC-Potentiale zu führen, doch könnte die Konzentration letztendlich zu gering sein, um derartig große Effekte auf den menschlichen Organismus zu erzielen. Hier könnte man versuchen, eine höhere Insulindosis

zu wählen, die aber trotzdem noch keine bedeutenden peripheren Wirkungen erzielen darf. Ebenfalls kann man weitere Studien durchführen, bei denen dem Insulin eine andere Träger-substanz beigefügt wird, so dass es effektiver zur Nasenschleimhaut und von dort in das Gehirn gelangen kann. Der Zeitraum nach der Insulingabe betrug auch nur zwei Stunden. Aus diesem Grund könnte man den Zeitraum, in dem die Probanden bezüglich des Hungers untersucht werden, in zukünftigen Studien länger wählen, um eventuell vorhandene Langzeitveränderungen des Insulins zu beobachten. Man muss ebenfalls davon ausgehen, dass man Insulin wohl über einen längeren Zeitraum applizieren muss, um Änderungen im Essverhalten beobachten zu können.

Auch sieht man bezüglich der Müdigkeit keine Unterschiede zwischen den beiden Bedingungen. Da einige Studien belegen, dass es nach Insulingabe zu einer Verbesserung der Aufmerksamkeit im Verbund mit verbesserter Gedächtnisleistung kommt (Schwarzberg et al., 1989; Park et al., 2000), müsste auch hier davon ausgegangen werden, dass die Müdigkeit bei den Probanden nach Insulingabe weniger ausgeprägt ist als nach Placebogabe. Während der Hirnstromableitung mussten diese jedoch zwei Stunden in dem Raum sitzen, ohne sich zu beschäftigen. Allein diese Tatsache ist schon sehr ermüdend, so dass alle Probanden nach den zwei Stunden nach Einschätzung der Versuchsleiterin nervlich doch sehr geschafft waren. Ebenfalls sei, wie schon oben erwähnt, auf die unterschiedliche Applikationsform, die in den einzelnen Versuchen gewählt wurden, hingewiesen. Zusammenfassend lässt sich zu diesen Ergebnissen sagen, dass das Insulin keinen kurzfristigen Effekt auf die subjektiven Parameter Hunger, Durst und Müdigkeit hat. Dieses kann zum einen daran liegen, dass die Dosis des Insulins in dem Nasenspray zu gering ist oder dass zu wenig Insulin letztendlich auf der Nasenschleimhaut oder in weiter zentral gelegenen Strukturen ankommt. Es müsste also eine höhere Dosis oder eine andere Träger-substanz im Nasenspray gewählt werden. Auch kann man diese Ergebnisse schlecht mit Beobachtungen anderer Studien vergleichen, da hierbei eine viel längere Zeitspanne gewählt wurde, in der man das Insulin kontinuierlich verabreichte.

5.3 Artefaktquellen bei der Ableitung von DC-Potentialen

Dieses Kapitel befasst sich mit möglichen Störungsquellen, die während der Aufzeichnung der DC-Potentiale auftreten können. Wie schon beschrieben wurde, werden bei EEG-Ableitungen Spannungsverstärker und Hochpassfilter eingesetzt, die die langsamen und auch anfälligen Potentialschwankungen herausfiltern, um die Aufzeichnung möglichst Artefaktfrei zu halten. Da dieses bei DC-Aufnahmen eben nicht der Fall ist, muss man auch erhöht mit einigen Störquellen rechnen. Um diese so gering wie möglich zu halten, wäre eine optimale Ableitungsform direkt von der Kortexoberfläche (Elektrokortikogramm – ECoG), welches aber nur in Tierexperimenten zu realisieren ist. So muss man bei Ableitungen von der Kopfhaut durch gründliche Vorbereitung und sorgfältiges Arbeiten versuchen, diese Störungsquellen so gering wie möglich zu halten.

Trotz allem muss man doch mit einigen Artefaktbelastungen rechnen, die in erster Linie okuläre Einflüsse, elektrodermale Störungsquellen (die trockene Kopfhaut besitzt einen hohen elektrischen Widerstand), Muskelspannung und die Bewegung geladener oder polarisierter Körperglieder darstellen (Rockstroh et al., 1989). Besonders okuläre Einflüsse werden als eine wichtige Störungsquelle angesehen. Da der menschliche Augapfel einen Dipol darstellt, dessen kaudale Seite negativ ist (Birbaumer et al., 1990), verschiebt sich jedes Mal das elektrische Potential, wenn der Proband sein Auge bewegt – der Bulbus also rotiert. Auch nimmt das Augenlid die Ladung der positiv geladenen Kornea auf, wenn es sich auf und ab bewegt (Matsuo et al., 1975). Aus diesem Grund könnte man annehmen, dass die DC-Verschiebungen durch okuläre Bewegungen beeinflusst worden sind. Da aber die DC-Verschiebungen sich auf den gesamten Kortex ausstrecken und nicht nur auf den orbitofrontalen Kortex beschränkt sind, kann man diese Ursache als alleinige Quelle für diese Verschiebungen ausschließen. Zudem ist ein okulärer Einfluss eher unwahrscheinlich wegen des langsamen Zeitverlaufs der DC-Verschiebung. Dieser würde voraussetzen, dass sich die Augen extrem langsam über drei Minuten nach unten bewegen müssten. Um Bewegungen der Gesichtsmuskulatur bei der Aufzeichnung als mögliche Störungsquelle auszuschließen, wurden eventuelle Aktivitäten dieser Muskelgruppen mittels EOG- und EMG-Elektroden aufgezeichnet und konnten somit möglichen DC-Potentialverschiebungen zugeordnet und gegebenenfalls von der Bewertung ausgeschlossen werden. Der Proband wurde ebenfalls vor jeder Aufnahme dazu angehalten, sich so wenig wie möglich zu bewegen und die Augen ruhig geradeaus zu halten und einen Punkt an der Wand zu fixieren. Die Augen sollten die ganze Zeit über

geöffnet bleiben, da das Schließen zu großen Ausschlägen des Elektrookulogramms (EOG) führen kann (Waszak und Obrist, 1969).

Die stärkste Störungsquelle ist die Kopfhaut, da diese einen sehr hohen Widerstand aufweist. Die elektrodermalen Aktivitäten wurden durch Anritzen der Kopfhaut möglichst minimiert, da hierdurch der Hautwiderstand gesenkt wird, es wurde also ein direkter Kontakt zwischen Elektrolyt und Gewebeflüssigkeit hergestellt. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die so genannte Elektrodenpolarisation. Diese entsteht durch driftende Potentiale an der Verbindung zwischen Elektrode und Elektrolyt und jener zwischen Elektrolyt und Haut. Girton und Kamiya (Girton und Kamiya, 1974) bezeichnen dieses als „electrode bias potential“, welches wohl durch ein mangelndes chemisches Gleichgewicht an den beiden Verbindungen verursacht wird. Um dieses möglichst gering zu halten, muss man Elektroden für die Ableitung wählen, die nicht so störanfällig sind. Besonders günstig sind hierfür Zusammensetzungen aus einem Metall mit seinem Salz, wie zum Beispiel Silber/Silberchlorid-Elektroden (Ag/AgCl; Butler, 1993; Birbaumer et al., 1990). Auch wurde vorzugsweise ein Elektrolyt gewählt, welches möglichst dem extrazellulären Plasma des Körpers gleicht (Butler, 1993).

30 Minuten nach Beginn der Aufzeichnung wurde dem Probanden das Nasenspray verabreicht. Dieser Vorgang stellte natürlich eine starke Störungsquelle dar, dem Probanden wurde vorher jedoch der genaue Ablauf erklärt und ihm wurde gesagt, dass er sich trotzdem möglichst ruhig verhalten sollte. Aber auch die intranasale Applikation kann ebenfalls Potentialveränderungen hervorrufen, so dass der Zeitraum 6 sec vor und 6 sec nach der Gabe in die Datenanalyse nicht mit einbezogen wurde.

Es wird also deutlich, dass im Vorfeld schon viele Vorkehrungen getroffen wurden, um die Artefaktbelastung so gering wie möglich zu halten oder sie frühzeitig zu erkennen und aus der Datenanalyse auszuschließen. Natürlich können die DC-Aufzeichnungen mit geringen Artefakten beladen sein, doch sieht man bei Betrachtung der Potentiale nach Insulingabe im Vergleich zur Placebogabe einen signifikanten Unterschied, welcher primär auf die Wirkung des Insulins zurückzuführen ist. In dem nun folgenden Abschnitt werden die unterschiedlichen Möglichkeiten diskutiert, wie das Insulin ins Gehirn gelangt, nachdem es intranasal verabreicht wurde.

5.4 Mögliche Aufnahmewege des intranasal applizierten Insulins

Man vermutet, dass das Insulin trotz seiner hohen Molekülgröße das Gehirn von der Nasenhöhle aus direkt erreicht (Kern et al., 1999). Betrachtet man den in der Einleitung beschriebenen extraneuronalen Weg, den eine Substanz nach intranasaler Gabe ins Gehirn nehmen kann, muss man davon ausgehen, dass das Insulin wohl eher über den parazellulären Weg, also zwischen den Stützzellen hindurch (Sayani und Chien, 1996; Schneider et al., 1996), in den Liquor gelangt. Dieser Weg wird vor allem von hydrophilen Verbindungen bevorzugt, was für das Insulin zutrifft. Dieser Weg ist auch sehr schnell: Einige Studien zeigen, dass nach intranasaler Insulingabe schon 10 Minuten später ein starker Anstieg dieser Substanz im Liquor nachweisbar ist. Hierbei wird der höchste Insulinspiegel nach 30 bis 40 Minuten erreicht (Born et al., 2002). Es wird immer wieder berichtet, dass Substanzen, die man intranasal verabreicht, viel schneller und in höheren Konzentrationen im Liquor nachweisbar sind, als wenn man sie intravenös geben würde (Seki et al., 1994). Es wird also deutlich, dass bei dieser Applikationsform der Weg über den Liquor eine entscheidende Rolle spielt.

Da vor allem Schwartz et al. (Schwartz et al., 1990, Schwartz et al., 1991) immer wieder berichten, dass der Liquor bei der Aufnahme des intravenös applizierten Insulins eine sehr geringe Rolle spielt, ist davon auszugehen, dass nach intranasaler Gabe das Insulin nicht nur in den Liquor übertritt, sondern dass es auch einen direkten Weg in das Hirnparenchym gibt. Somit werden Effekte auf die Hirnaktivität erzielt, welche auch vergleichbar mit denen nach intravenöser Gabe (Born et al., 2002; Kern et al., 2001) oder nach direkter Applikation in die Ventrikel (Park et al., 2000) sind. Es ist jedoch ebenfalls denkbar, dass das Insulin vom Liquor in das Hirngewebe übertritt. Versuche mit radioaktiv markiertem Insulin haben gezeigt, dass das Insulin nach Gabe in den Liquor in die Hirnsubstanz aufgenommen wird (Baskin et al., 1983).

Das Ausmaß der Aufnahme von Insulin, oder von in den Liquor gebrachten Substanzen überhaupt, ist nicht genau bekannt. Tierstudien zeigen jedoch, dass es zu einer signifikanten Aufnahme von Substanzen in spezielle Hirnareale, wie zum Beispiel in die Amygdala kommt (Chen et al., 1998). Dieses Hirnareal ist, wie auch schon erwähnt, mit einer hohen Dichte an Insulin-Rezeptoren ausgestattet. So kann man annehmen, dass das Insulin nicht gleichmäßig in das Gehirn aufgenommen wird, sondern dieses vor allem an Orten geschieht, bei denen das Hormon eine besondere Rolle spielt, wo also viele Rezeptoren vorhanden sind. Ebenfalls spielen wohl auch die zirkumventrikulären Organe, Orte, an denen das Gehirn direkt mit dem Blut oder Liquor in Verbindung steht, eine Rolle. Über die Eminentia media

könnte somit das Insulin in hypothalamische Kerngruppen gelangen. Plata-Salaman nimmt hierbei an, dass das Hormon die zirkumventrikulären Organe über passive Diffusion durchquert, es also hierfür kein spezifisches Transportsystem gibt (Plata-Salaman, 1991). Gerade durch Beeinflussung dieser Strukturen hat dieses Hormons einen erheblichen Einfluss auf den Organismus.

Neben diesem so genannten extraneuronalen Weg wurde ebenfalls der neuronale Weg beschrieben, der nach intranasaler Insulin-Gabe nicht auszuschließen ist: Wie berichtet wurde, besitzt der Bulbus olfactorius in seinem Stratum plexiforme externum eine sehr hohe Anzahl an Insulinrezeptoren. Dieses ist die wichtigste Voraussetzung für eine Substanz, die über den neuronalen Weg aufgenommen wird. Die DC-Potentiale verändern sich jedoch sehr schnell, so dass schon nach 25 Minuten Effekte erkennbar sind. Substanzen, die über diesen Weg aufgenommen werden, erreichen erst nach Stunden den Bulbus olfactorius, so dass dieser Weg nicht primär für die schnelle Wirkung des Insulins verantwortlich sein kann. Da die Hirnaktivität jedoch nur über einen Zeitraum von zwei Stunden nach der Insulingabe aufgezeichnet wurde, ist der neuronale Weg an der Aufnahme des Insulins schon allein wegen der hohen Rezeptordichte auf dem Bulbus nicht auszuschließen. Dieser könnte vielleicht für Effekte auf das Gehirn, die später auftreten, verantwortlich sein.

Es sei noch einmal auf die dritte Möglichkeit hingewiesen, die das Insulin besitzt, nach intranasaler Gabe ins Gehirn zu gelangen. Dieser wäre der systemische Weg, der nach Gabe einer höheren Dosis an Insulin sicher von Bedeutung gewesen wäre und in Zukunft vielleicht ja auch bei der Behandlung des Insulin-abhängigen Diabetes mellitus eine große Rolle spielen wird. In diesem Versuch wurde Insulin jedoch in einer so geringen Dosis verabreicht, dass im systemischen Kreislauf nur ein sehr schwacher Anstieg nachzuweisen war. Das Insulin ist somit höchstwahrscheinlich auch nicht retrograd aus dem Gehirn durch vor allem die Blut-Hirn-Schranke in die Peripherie gelangt. Der Weg über dieses Schrankensystem ist somit auszuschließen, was ja auch beabsichtigt war.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass die schnelle Wirkung des Insulins auf das ZNS primär wahrscheinlich dadurch zustande kommt, dass es auf extrazellulärem Wege (hier vor allem parazellulär) zum größten Teil über den Liquor aber auch direkt in das Hirnparenchym gelangt. Da der Weg über den Liquor ja wie gesagt nicht ganz so effektiv sein soll, würde dieses somit auch die schnellere Wirkung des intravenös gegebenen Insulins erklären, da hierbei das Hormon ja nicht primär über den Liquor in das ZNS gelangt. Neben diesem extrazellulären Weg ist der neuronale Weg aber schon aufgrund der hohen Rezeptordichte auf dem Bulbus olfactorius nicht auszuschließen. Da dieser Weg jedoch eine erheblich längere

Zeit in Anspruch nimmt, werden hierbei erst mit einiger Verzögerung Effekte des Insulins auf zentrale Strukturen sichtbar. Gelangt das Insulin nun in das Gehirn, kann es hier die verschiedensten Zellen in ihrer Aktivität beeinflussen, welches man anhand der Veränderung der Hirnströme darstellen kann. Mit der Frage, welche Strukturen im ZNS nun primär für diese Negativierung verantwortlich sind, befasst sich der nächste Abschnitt.

5.5 Überlegungen zu den physiologischen Grundlagen der DC-Veränderung

Wie schon erwähnt, sind vor allem Neuronen mit sehr vielen Insulinrezeptoren ausgestattet, Gliazellen besitzen nicht ganz so viele (Gerozissis, 2003). Trotzdem beeinflusst Insulin beide Zelltypen in ihrer Funktion. Wie schon beschrieben, hat das Hormon auf neuronaler Ebene eher einen neuromodulierenden Einfluss, hier vor allem auf die Neurotransmitter, auf glialer Ebene reguliert dieses Hormon eher Metabolismus und Zellwachstum (Boyd et al., 1985; Clarke et al., 1986; Palovcik et al., 1984).

Obwohl Neurone sehr viele Insulinrezeptoren besitzen, sprechen folgende Punkte gegen die Annahme, dass diese Zellen an dem Zustandekommen der Änderung der Hirnstromaktivität primär beteiligt sind: Nach intravenöser Insulingabe ändert sich nur unter hypoglykämischen Bedingungen die EEG-Aktivität. Unter euglykämischen Bedingungen kommt es zu keiner Veränderung. Man nimmt hierbei an, dass die Änderung des EEGs durch die Reaktion auf die Unterzuckerung zustande kommt, indem zum Beispiel Glukoserezeptoren im Glomus caroticum stimuliert werden (Pardal und Lopez-Barneo, 2002). Es ist anzunehmen, dass es aufgrund der fehlenden EEG-Veränderung unter euglykämischen Bedingungen eher unwahrscheinlich ist, dass Neurone die Hauptrolle an dem Zustandekommen der DC-Negativierung spielen. Würden nämlich Neurone in ihrer Aktivität beeinflusst werden, käme es auf jeden Fall zu einer Änderung des EEGs. Gegen die Annahme, dass die beobachteten Veränderungen primär neuronal generiert werden, sprechen ebenfalls der hohe Ausschlag und die lange Dauer dieser DC-Veränderung, die auf eine Beteiligung von Gliazellen hinweisen.

Wie schon berichtet, sind sowohl Gliazellen als auch Neurone in ihrer Aktivität sehr stark von dem Aktivitätszustand der anderen Zelle abhängig. Untersucht man Gliazellen mit Mikroelektroden, so kann man ein Membranpotential aufzeichnen, welches in etwa dem einer Nervenzelle ähnelt. Dieses Membranpotential liegt allerdings im Bereich des Kalium-Gleichgewichtes, also etwas über dem der Nervenzelle. Auch ist das Glia-Membran-Potential nicht konstant. Ein Anstieg der extrazellulären Kalium-Konzentration führt zu einer Depolari-

sation der Gliazelle (Speckmann und Elger, 1998). Kuffler und Nicholls vergleichen die Gliazelle auch mit einer Kaliumelektrode (Kuffler und Nicholls, 1966). Die Tatsache, dass diese Zellen auf die extrazelluläre Kalium-Konzentration angewiesen sind, erklärt auch die enge Verbindung zu angrenzenden Neuronen, da neuronale Aktivität von einem Ausstrom von Kalium-Ionen begleitet wird (Speckmann und Elger, 1998). Wenn es nur zu einer lokalen K-Erhöhung kommt, nehmen Gliazellen diese Ionen auf und verlagern sie an Orte geringerer extrazellulärer K-Konzentrationen (Laming et al., 2000). Die elektrische Ladung wird also verschoben, so dass sich entlang der Gliazelle ein Potentialgefälle aufbaut. Dadurch, dass die Gliazellen so eng untereinander verzahnt sind, kann sich das zustande gekommene Potential weit ausbreiten (Caspers, 1991). Es ist davon auszugehen, dass die Beeinflussung der Neurone in ihrer Aktivität nicht stark genug ist, um eine DC-Veränderung der beobachteten Größe hervorzurufen. Die Gliazellen könnten in diesem Fall als eine Art Verstärker fungieren, die Aktivität der Neurone also spiegelbildlich wiedergeben. Somit käme es also zu einer massiven Verstärkung und auch Verlängerung dieses Effektes. Vergleicht man nun die Stärke der Negativierung, die nach intranasaler Insulingabe zustande kommt mit derjenigen nach intravenöser Applikation, fallen doch einige Unterschiede auf. Dieses soll der nächste Punkt erläutern.

5.6 Vergleich der DC-Veränderungen nach intravenöser und nach intranasaler Gabe

Das Ziel dieses Versuches war, herauszufinden, ob nach intranasaler Gabe ebenfalls Effekte auf die Hirnaktivität, wie sie sich in DC-Potentialverschiebungen widerspiegelt, zu beobachten sind, so wie es nach intravenöser Gabe der Fall ist. Nach intravenöser Gabe kommt es schon nach 7 Minuten zu einer sichtbaren DC-Potential-Negativierung. Da diese Veränderung besonders ausgeprägt ist, wenn der Blutzuckerspiegel konstant gehalten wird und da auch schon unter hypoglykämischen Bedingungen vor Auftreten der Unterzuckerung DC-Veränderungen zu Verzeichnen sind, muss das Insulin direkt für die Veränderung der Hirnströme verantwortlich sein. Die Negativierungen sind also nicht primär auf Veränderungen des Organismus wie z.B. auf die Unterzuckerung zurückzuführen.

Im Vergleich dazu ist die Negativierung nach intranasaler Gabe erst später (nach 25 Minuten) zu beobachten. Außerdem ist diese Negativierung nicht so stark ausgeprägt wie nach intravenöser Gabe. Die Verzögerung der DC-Veränderung könnte man durch die unter-

schiedlichen Wege erklären, die das Insulin je nach Applikationsform in das Gehirn nimmt. So nehmen vor allem Schwartz et al. (Schwartz et al., 1991) an, dass das Insulin nach intravenöser Gabe primär über die Blut-Hirn-Schranke direkt in das Gehirn (oder über die oben beschriebene interstitielle Flüssigkeit, das dritte Kompartiment) aufgenommen wird. Hierbei spielt also der Liquor, der bei der Aufnahme von Stoffen in das Gehirn ja nicht ganz so effizient sein soll, eine nicht so große Rolle, wie es nach intranasaler Gabe der Fall ist. Man könnte also annehmen, dass der Weg von der Nasenhöhle direkt oder über den Liquor in die Hirnsubstanz etwas mühsamer ist und längere Zeit in Anspruch nimmt als der Transport über die Blut-Hirn-Schranke. Ein Grund für die langsamere und geringere Potentialveränderung kann auch sein, dass das Insulin nicht effektiv genug von der Nasenschleimhaut resorbiert wurde, da die Trägersubstanz zeitgleich mit dem Insulin die Schleimhaut erreichen muss.

Es stellt sich außerdem die Frage, ob die DC-Negativierung nach intravenöser Insulingabe allein durch Effekte an den Zellen des Gehirns oder, besonders was den Zeitraum unmittelbar nach Bolusgabe angeht, nicht auch noch zusätzlich durch den Transport durch die Blut-Hirn-Schranke zustande kommt. Prozesse an diesem Schrankensystem, wie etwa das Binden des Insulins an den endothelialen Rezeptor oder der Transport hindurch können zu Bewegungen von Ionen führen, welche sich über die gesamte Hirnregion zu großen Potentialschwankungen aufsummieren können und dann abgeleitet werden (Qian et al., 2002; Partridge, 1993). Ebenfalls wird auch über pCO₂-abhängige Potentialdifferenzen an diesem Schrankensystem berichtet, die an dem Zustandekommen von DC-Potential-Verschiebungen beteiligt sind (Steriade, 2001). Die DC-Negativierung nach intranasaler Gabe von Insulin unter Umgehung der Blut-Hirn-Schranke spricht jedoch gegen die primäre Rolle der Veränderungen an diesem System und, was die Hauptfaktoren der Negativierung angeht, für zentrale Prozesse. Jedoch kann man Prozesse an der Blut-Hirn-Schranke als zusätzlichen und auch verstärkenden Faktor nicht ganz ausschließen.

5.7 Zukunft der intranasalen Insulingabe

Wie schon erwähnt, bezeichnet Hoyer (Hoyer, 1998) den Morbus Alzheimer als „the brain equivalent of non-insulin-dependent diabetes mellitus“. Frölich et al. (Frölich et al., 1997) nehmen an, dass bei dieser Krankheit eine „Dysfunktion der neuronalen Insulin-Signal-Transduktions-Kaskade“ vorliegt. Die Verabreichung von Insulin in die Hirnventrikel verbessert das Lernverhalten und die Speicherung von Vermeidungsverhalten bei Ratten (Schwarzberg et al., 1989; Park et al., 2000), während das gleiche Verhalten beeinträchtigt scheint,

wenn man im Gehirn Insulinrezeptoren blockiert (Lannert und Hoyer, 1998). Schon 1922 berichteten Miles und Root, dass Diabetes mellitus eine negative Auswirkung auf das Gedächtnis hat (Miles und Root, 1922), und viele weitere Studien belegen kognitive Defizite bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I und II. Eine Kohortenstudie von Biessels et al. (Biessels et al., 2002) zeigt, dass Patienten mit Diabetes Typ II ein doppelt so hohes Risiko besitzen, an einer Demenz zu erkranken. Ebenfalls besteht ein erhöhtes Risiko bei dieser Patientengruppe, einen Morbus Alzheimer zu bekommen. Versuche mit an Diabetes leidenden Ratten lassen im ZNS einen Rückgang an Dendriten und verringerte Übertragungsprozesse an NMDA-Rezeptoren bei Neuronen des Hippocampus erkennen, was wiederum zu einer Atrophie des Hippocampus und einer nachlassenden Gedächtnisleistung führt (Magarinos et al., 2000). Auch Krankheiten wie Chorea Huntington und der Morbus Parkinson werden mit Insulin-funktionsstörungen im ZNS in Verbindung gebracht (Holden et al., 1999; Wickelgren, 1998). Es wäre somit ein geeigneter Therapieansatz, dieses Insulindefizit durch eine Insulingabe zu beheben. Natürlich dürften die erheblichen Nebenwirkungen einer Insulintherapie, wie Unterzuckerungen und Elektrolytstörungen, möglichst nicht auftreten. Aus diesem Grund stellt die intranasale Insulingabe eine sehr gute Alternative zur intravenösen Therapie dar. Wie in diesem Versuch nachgewiesen, könnte man also das Gehirn in seiner Funktion beeinflussen, ohne jedoch einen beträchtlichen Insulinanstieg in der Peripherie zu bewirken. Hier sei auch noch einmal auf Versuchsreihen von Kern et al. zu verweisen, wo sich bei Menschen die Aufmerksamkeit und Gedächtnisleistungen während Hyperinsulinämie verbesserten, wenn der Blutglukosespiegel aufrechterhalten wurde (Kern et al., 2001).

Ein ebenfalls großes Problem der Gesellschaft stellt die zunehmende Fettleibigkeit dar. Wie schon mehrfach erwähnt, spielt das Insulin beim Essverhalten eine sehr große Rolle und führt auf zentraler Ebene zu einer Verringerung der Essensaufnahme (Schwartz et al., 1992). Da das Übergewicht zu weiteren schwerwiegenden Erkrankungen führen kann und letztendlich natürlich auch erhebliche psychische Belastungen mit sich bringt, stellt auch hier die intranasale Insulingabe eine potentielle Möglichkeit zur Gewichtsreduktion bei adipösen Patienten dar. Versuche mit normalgewichtigen Probanden zeigten, dass die subchronische Gabe von intranasalem Insulin zu Gewichtsabnahme und Fettverlust führt (Hallschmid et al., 2004b).

Ein weiterer Aspekt wäre ebenfalls der positive Effekt, den das Insulin auf die Stimmungslage hat (Kern et al., 2001). Versuche zeigten, dass es sofort nach intranasaler Insulingabe zu einer Verbesserung des Wohlbefindens und des Selbstvertrauens kommt. Auch nach einer längeren Zeitspanne fühlten sich die Probanden extrovertierter und weniger depressiv

und zeigten eine Verbesserung ihrer Gedächtnisleistung (Benedict et al., 2004). Mögliche Therapieansätze bezüglich depressiver Erkrankungen müssen jedoch noch genauer untersucht werden.

Wie schon beschrieben, kommt es nach intranasaler Gabe zu einer DC-Potential-Veränderung, die erst später einsetzt und nicht ganz so stark ausgeprägt ist wie nach intravenöser Gabe. Um gute Effekte auf das Gehirn zu erzielen, benötigt man somit entweder eine längere Behandlungsdauer oder eine höhere Dosis. Die Dosis muss natürlich noch so niedrig sein, um keine Effekte auf die Peripherie zu erzielen. Trotz dieser schwächeren Wirkung nach intranasaler Gabe ist dieser Weg natürlich dem intravenösen vorzuziehen, um die erwähnten Nebenwirkungen zu umgehen und schonendere Therapieansätze zu ermöglichen.

6. Zusammenfassung

Beobachtungen, dass die intravenöse Gabe von Insulin das transkranielle Gleichspannungspotential verändert, ließen die Frage aufkommen, ob diese Veränderungen durch intrakranielle Potentialverschiebungen hervorgerufen werden oder ob sie nicht schon allein durch den Transport des Hormons über die Blut-Hirn-Schranke zustande kommen. Um diese Frage zu klären, musste der Weg über dieses Schrankensystem umgangen werden. Dies ist durch die intranasale Gabe einer geeigneten Dosis möglich.

Gesunden männlichen Probanden zwischen 18 und 30 Jahren wurde Insulin per Nasenspray verabreicht und die Hirnströme (DC-Potentiale) anhand zweistündiger Messungen beobachtet und mit denen nach Gabe eines Placebo-Präparates verglichen. Parallele Blutentnahmen sollten sicherstellen, dass das Insulin keinen Effekt auf die Peripherie ausübt, es zum Beispiel nicht zu einer Unterzuckerung kommt. Ebenfalls wurden die Probanden vor Beginn und nach Beendigung der Aufzeichnung nach ihrem Befinden bezüglich Hunger, Durst und Müdigkeit befragt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es nach intranasaler Insulin-Gabe zu einer deutlichen DC-Potential-Negativierung kommt. Diese Negativierung tritt jedoch später und auch weniger stark als nach intravenöser Gabe auf. Bezüglich der Parameter Hunger, Durst und Müdigkeit kam es zu keiner signifikanten Veränderung. Auch die peripheren Blutparameter zeigten bis auf eine vorübergehende Erhöhung des Insulinspiegels keine Veränderungen durch die Substanzgabe. Die Ergebnisse zeigen, dass die DC-Potential-Veränderungen auf die Beeinflussung der Hirnaktivität auf zentraler Ebene zurückzuführen sind und dass Prozesse an der Blut-Hirn-Schranke nicht primär für diese Effekte verantwortlich sind. Da das Insulin unter anderem die Gedächtnisleistung positiv beeinflusst und auf zentraler Ebene anorexigen wirkt, unterstützt diese Beobachtung die Überlegung, die intranasale Gabe als mögliche Therapie für Krankheiten wie Morbus Alzheimer oder Fettleibigkeit einzusetzen.

Literaturverzeichnis

- Adamo M, Raizada MK, LeRoith D, 1989. Insulin and Insulin-like growth factors in the nervous system. *Mol Neurobiol.* 3(1-2), 71-100
- Ajaya B, Haranath PS, 1982. Effects of insulin administered into cerebrospinal fluid spaces on blood glucose in unanaesthetized and anaesthetized dogs. *Indian J Med Res.* 75, 607-15
- Albrecht J, Wroblewska B, Mossakowski MJ, 1982. The binding of insulin to cerebral capillaries and astrocytes of the rat. *Neurochem Res.* 7(4), 489-94
- Banks WA, Jaspan JB, Huang W, Kastin AJ, 1997. Transport of insulin across the blood-brain barrier: saturability at euglycemic doses of insulin. *Peptides* 18(9), 1423-1429
- Baskin DG, Woods SC, West DB, vanHouten M, Posner BI, Dorsa DM, Porte D, 1983. Immunocytochemical detection of insulin in rat hypothalamus and its possible uptake from cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 113, 1818-1825
- Baskin DG, Brewitt DA, Davidson DA, Corp E, Pacquette T, Figlewicz DP, Lewellen TK, Graham MK, Woods SC, Dorsa DM, 1986. Quantitative autoradiographic evidence for insulin receptors in the choroid plexus of the rat brain. *Diabetes* 35, 246-249
- Baskin GD, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM, 1988. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *Trends Neurosci.* 11, 107-111
- Baura GD, Foster DM, Porte D Jr., Kahn SE, Bergman RN, Cobelli C, Schwartz MW, 1993. Saturable transport of insulin from plasma into the central nervous system of dogs in vivo. A mechanism for regulated insulin delivery to the brain. *J. Clin. Invest.* 92(4), 1824-1830
- Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W, 2004. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology* 29(10), 1326-34
- Bergles DE, Jahr CE, 1998. Glial contribution to glutamate uptake at Schaffer collateral-commissural synapses in the hippocampus. *J. Neurosci.* 18(19), 7709-16
- Biessels GJ, Van der Heide LP, Kamal A, Bleyers RLA, Gispen WH, 2002. Ageing and diabetes: Implications for brain function. *Eur. J. Pharmacol.* 441, 1-14
- Birbaumer N, Elbert T, Canavan AGM, Rockstroh B, 1990. Slow potentials of the cerebral cortex and behavior. *Physiol Rev.* 70, 1-41
- 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 (6), 514-516
- Boyd FT, Raizada MK, 1983. Effects of insulin and tunicamycin on expression of neuronal insulin receptors. *Am. J. Physiol.* 245, C283-287
- 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
- Braun Ch, Lutzenberger W, Miltner W, Elbert T, 1991. Can subcortical structures generate potentials large in amplitude? In: *Psychophysiological brain research.*, edited by Brunia CHM, Gaillard AWK, Kok A. Tilburg University Press, Tilburg, 31-35

- Butler S, 1993. Methodological issues in the measurement of DC biopotentials. In: *Slow potential changes in the human brain*, edited by Mc Callum WC, Curry SH. Plenum Press, New York, London, 63-76
- Caspers H, 1959. Über die Beziehungen zwischen Dendritentpotential und Gleichspannung an der Hirnrinde. *Pflügers Arch.* 269, 157-181
- Caspers H, 1974. DC-potentials recorded directly from the cortex. In: *Handbook of Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*, edited by Remond A, Amsterdam: Elsevier, vol. 10A, 71-89
- Caspers, H., 1991. DC-Potentials of the brain. In: *Slow potential changes in the brain*, edited by Haschke W, Speckmann EJ, Roitbak AI, Birkhäuser, Boston, 9-20
- Caspers H, 1993. DC potentials of the brain. In: editors. *Slow potential changes in the brain*, edited by Haschke W, Speckmann EJ, Roitbak AI, Birkhäuser, Boston, 9-20
- Castonguay A, Robitaille J, 2001. *Neurosci.* 21, 1911
- Caton R, 1875. The electric currents of the brain. *British Medical Journal* 2, 278
- Chen XQ, Fawcett JR, Rahman YE, Ala TA, Frey WH, 1998. *J. Alzheimer's Dis.* 1, 35-44
- Clarke DW, Boyd FT, Kappy MS, Raizada MK, 1984. Insulin binds to specific receptors and stimulates 2-deoxy-D-glucose uptake in cultured glial cells from rat brain. *J. Biol. Chem.* 259, 11672-11675
- Clarke DW, Mudd L, Boyd FT Jr, Fields M, Raizada MK, 1986. Insulin is released from rat brain neuronal cells in culture. *J Neurochem.* 47(3), 831-6
- Creutzfeld OD, Ojemann GA, Chatrian GE, 1993. Activity of single neurons and their relationship to normal EEG waves and interictal epilepsy potentials in humans. In: *Slow potential changes in the brain*, edited by Haschke W, Speckmann EJ, Roitbak AI, Birkhäuser, Boston, 21-42
- Curry SH, Pleydell-Pearce C, 1995. Use of DC recording in the demonstration of functional specialization. *J Med Eng Technol.* 19(2-3), 42-51
- Fields, RD, Stevens-Graham B, 2002. New insights into neuronal glia communication. *Science* 298(5593),556-5562
- Frank HJL, Jankovic-Vokes T, Pardridge M, Morris WL, 1985. Enhanced insulin binding to blood-brain barrier in vivo and to brain microvessels in vitro in newborn rabbits. *Diabetes* 34, 728-733
- Frey WH, Liu J, Chen X, Thorne RG, Fawcett RG, Ala TA, Rahman Y-E, 1997. Delivery of I-NGF to the brain via the olfactory route. In: *Research Advance in Alzheimer's Disease and Related Disorders*, edited by Iqbal K, Mortimer JA, Winblad B, Wisniewski HM, Wiley J, New York, 329-335
- Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, 1998. Insulin and insulin receptors in the brain in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J. Neural Transm.* 105, 423-438
- Gerozissis K, 2003. Brain Insulin: Regulation, Mechanisms of Action and Functions. *Cell Mol Neurobiol.* 23(4-5), 873-4
- Girton DG, Kamiya J, 1974. A very stable electrode system for recording human scalp potentials with direct coupled amplifiers. *Electroenceph Clin Neurophysiol.* 37, 85-88

- Hallschmid M, Möller M, Fischer S, Born J, 2002. EEG synchronization upon reward in man. *Clin. Neurophysiol.* 113(7), 1059-1065
- Hallschmid M, Schultes B, Marshall L, Molle M, Kern W, Bredthauer J, Fehm HL, Born J, 2004a. Transcortical direct current potential shift reflects immediate signaling of systemic insulin to the human brain. *Diabetes.* 53(9), 2202-8
- Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W. 2004b. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes* 53(11), 3024-9
- Hamai M, Minokoshi Y, Shimazu T, 1999. L-Glutamate and insulin enhance glycogen syntheses in cultured astrocytes from the rat brain through different intracellular mechanisms. *J. Neurochem.* 73(1), 400-407
- Haschke W, Rother M, Zwiener U, 1992. Neurophysiological fundamentals of EEG and slow brain potentials. Quantitative EEG Analysis – Clinical Utility and New Methods. Jena Universitätsverlag
- Heidenreich KA, Zahniser NR, Berhanu P, Brandenburg D, Olefsky JM, 1983. Structural differences between insulin receptors in the brain and peripheral target tissues. *J. Biol. Chem.* 258, 8527-8530
- Heinemann U, Lux HD, Marciani MG, Hofmeier G, 1979. In: *Origin of cerebral field potentials* , edited by Speckmann, EJ, Caspers H. Georg Thieme Publishers, Stuttgart, Germany, 33-43
- Hennighausen E, Heil M, Rösler F, 1993. A correction method für DC drift artifacts. *Electroencephalogr. Cllin. Neurophysiol.* 86, 199-204
- Holden RJ, Pakula IS, Mooney A, 1999. The role of brain insulin in the neurophysiology of serious mental disorders. *Med. Hypotheses.* 52, 193-200
- Hoyer S, 1998. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J. Neural. Transm.* 109, 341-360
- Hoyer S, 2004. Causes and consequences of disturbances of cerebral glucose metabolism in sporadic Alzheimer disease: therapeutic implications. *Adv Exp Med Biol.* 541, 135-152
- Hussain A, Foster T, Hirai S, Kashihara T, Batenhorst R, Jones M, 1980. Nasal absorption of propranolol in humans. *J. Pharm. Sci.* 69, 1240-42
- Ikeda H, West DB, Pustek JJ, Figlewicz DP, Greenwood MR, Porte D, Jr., Woods, SC, 1986. Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of lean but not obese Zucker rats. *Appetite.* 7(4), 381-386
- Illum L, 2000. Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur J Pharm Sci.* 11(1), 1-18
- Illum L, 2003. Nasal drug delivery – possibilities, problems and solutions. *J Control Release.* 87(1-3), 187-98
- Irwin DA, Rebert CS, 1970. Slow potential changes in cat brain during classical appetitive conditioning of jaw movements using two levels of reward. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 28, 119-26
- Jackson RT, Tigges J, Arnold W, 1979. Subarachnoid space of the CNS, Nasal mucosa and lymphatic system. *Arch. Otolaryngol.* 105, 180-184

- Jahromi BS, Robitaille R, Charlton MP, 1992. Transmitter release increase intracellular calcium in perisynaptic Schwann cells in situ. *Neuron*. 8(6), 1069-77
- Kern W, Born J, Schreiber H, Fehm HL, 1999. Central nervous system effects of intranasally administered insulin during euglycemia in men. *Diabetes*. 48 (3), 557-563
- 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(4),270-280
- Khanvilcar K, Donovan MD, Flanagan DR, 2001. Drug transfer through mucus. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 48, 173-193
- Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, Hefti F, 1990. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development in vitro by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *Neurosci*. 10, 557-570
- Kozlowski RZ, Ashford ML, 1990. ATP-sensitive K(+)-channel run-down is Mg²⁺ dependent. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 240(1298), 397-410
- Kristensson K, Olsson Y, 1971. Uptake of exogenous proteins in mouse olfactory cells. *Acta Neuropathol*. 19, 145-154
- Kuffler SW, Nicholls JG, 1966. The physiology of neuroglial cells. *Ergeb. Physiol*. 57, 1-90
- Kum, W, Zhu SQ, Ho SK, Young JD, Cockram CS, 1992. Effect of insulin on glucose and glycogen metabolism and leucine incorporation into protein in cultured mouse astrocytes. *Glia* 6(4), 264-268
- Laming PR, Kimelberg H, Robinson S, Salm A, Hawrylak N, Muller C, Roots B, Ng K, 2000. Neuronal-glial interactions and behaviour. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 24(3), 295-340
- Lannert H, Hoyer S, 1998. Intracerebroventricular administration of streptozotocin causes long-term diminutions in learning and memory abilities and in cerebral energy metabolism in adult rats. *Behav. Neurosci*. 112(5),1199-1208
- Lowe WL, Boyd FT, Clarke DW, Raizada MK, Hart C, Le Roith D, 1986. Development of brain insulin receptors: Structure and functional studies of insulin receptors from whole brain and primary cell culture. *Endocrinology*. 119, 25-35
- Lutzenberger W, Elbert T, Rockstroh B, 1987. A brief tutorial on the implications of volume conduction for the interpretation of the EEG. *J Psychophysiology* 1, 81-89
- Madsen F, Eberth K, Smart JD, 1989. A rheological examination of the mucoadhesive/mucus interaction: The effect of mucoadhesive type and concentration. *J. Control. Release*. 50, 167-178
- Magarinos AM, Jain K, Blount ED, Reagan L, Smith BH, McEwen BS, 2001. Peritoneal implantation of macroencapsulated porcine pancreatic islets in diabetic rats ameliorates severe hyperglycemia and prevents retraction and simplification of hippocampal dendrites. *Brain Res*. 902, 282-287
- Marczynski TJ, Allen SL, Rick JH, Sherry CJ, 1971. Steady potential correlates of positive reinforcement and sleep onset in the cat; `reward contingent positive variation` (RCPV). *Brain Res*. 26, 305-332
- Marks JL, Eastman CJ, 1990. Ontogeny of insulin binding in different regions of the rat brain. *Dev Neurosci*. 12(6), 3234-6

- Markus FW, Verhoef JC, Schipper NG, Marttin E, 1989. Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv. Drug deliv. Rev.*, 29, 13-38
- Marshall L, Mölle M, Schreiber H, Fehm HL, Born J, 1994. Scalp recorded direct current potential shifts associated with the transition to sleep in man. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 91, 346-52
- Marshall L, Mölle M, Fehm HL, Born J, 2000. Changes in direct current (DC) potentials and infraslow EEG oscillations at the onset of the luteinizing hormone (LH) pulse. *Eur.J.neurosci.* 12(11), 3935-3943
- Matsuo F, Peters JF, Reilly EL, 1975. Electrical phenomena associated with movements of the eyelid. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol.* 38(5), 507-11
- Mc Gowan MK, Andrews KM, Kelly J, Grossman SP, 1990. Effects of chronic intrahypothalamic infusion of insulin on food intake and diurnal meal patterning in the rat. *Behav. Neurosci.* 104, 371-383
- Miles WR, Root HF, 1922. Psychologic tests applied to diabetes patients. *Arch. Intern. Med.* 30, 767-777
- Moore MS, Mahaffey DT, Brodsky FM, Anderson RG, 1987. Assembly of clathrin-coated pits onto purified plasma membranes. *Science* 236(4801), 558-563
- Moses AC, Gordon GS, Carey MC, Flier JS, 1983. Insulin administered intranasally as an insulin-bile salt aerosol. Effectiveness and reproducibility in normal and diabetic subjects. *Diabetes* 32(11), 1040-7
- Moss A, Unger JW, Moxley RT, Livingston JN, 1990. Location of phosphotyrosine-containing proteins by immunocytochemistry in the rat forebrain corresponds to the distribution of the insulin receptor. *Proc Natl Acad Sci.* 87, 4453-4457
- Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L, 2002b. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med* 8, 1376-1382
- Orkand RK, Nicholls JG, Kuffler SW, 1966. Effect of nerve impulses on the membrane potential of glial cells in the central nervous system of amphibia. *J Neurophysiol.* 29(4), 788-806
- Palovcik RA, Phillips MI, Kappy MS, Raizada MK, 1984. Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res.* 309(1), 187-91
- Pardal R, Lopez-Barneo J, 2002. Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat. Neurosci.* 5, 197-198
- Pardrige WM, 1987. Receptor-mediated transport through the blood-brain barrier. *Endoc. Rev.* 7, 314-330
- Pardrige WM, 1991. *Peptide Drug Delivery to the Brain.* Raven Press, New York. 99-122
- Pardrige WM, 1993. Transport of insulin-related peptides and glucose across the blood-brain-barrier. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 692, 126-137
- Park CR, Seeley RJ, Craft S, Woods SC, 2000. Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav.* 68(4),509-514

- Park CR, 2001. Cognitive effects of insulin in the central nervous system. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 25(4), 311-323
- Pearce B, Langley D, 1994. Purine- and pyrimidine-stimulated phosphoinositide breakdown and intracellular calcium mobilisation in astrocytes. *Brain Res.* 660(2), 329-32.
- Perdal R, Lopez-Barneo J, 2002. Low glucose-sensing cells in the carotid body. *Nat. Neurosci.* 5(3), 197-198
- Plata-Salaman CR, 1991. Insulin in the cerebrospinal fluid, *Neurosci. Biobehav Rev.* 15(2), 243-258
- Potau N, Escofet MA, Martinez MC, 1991. Ontogenesis of insulin receptors in human cerebral cortex. *J Endocrinol Invest.* 14(1), 53-8
- Qian ZM, Li H, Sun H, Ho K, 2002. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol Rev.* 54, 561-587
- Reist NE, Smith SJ, 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 7625
- Robitaille R, 1998. *Neuron* 21, 847
- Rockstroh B, Elbert T, Birbaumer N, Lutzenberger W, 1982, in *Slow Brain Potentials and Behaviour.* Urban & Schwarzenberg, Baltimore
- Rockstroh B, Elbert T, Canavan A, Lutzenberger W, Birbaumer N, 1989, in *Slow cortical potentials and behaviour.* Urban & Schwarzenberg, Baltimore Munich Vienna
- Rowland V, 1968. Cortical steady potential in reinforcement and learning. In: *Progress in Physiological Psychology*, edited by Stellar E, Sprague JM, New York 2, 1-11
- 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 dissociation of the drug. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 378-379
- Sakula A, 1988. Paul Langerhans (1847-1888): a centenary tribute. *J R Soc Med* 81 (7), 414-415
- Sayani AP, Chien YW, 1996. Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13 (1-2), 85-184
- Schneider NG, Lunell E, Olmstead RE, Fagerström K-O, 1996. Clinical pharmacokinetics of nasal nicotine delivery. A review and comparison to other nicotine systems. *Clin. Pharmacokinet.* 31 (1), 56-80
- Schulingkamp RJ, Pagano TC, Hung D, Raffa RB, 2000. Insulin receptors and insulin action in the brain: review and clinical implications. *Neurosci Biobehav Rev.* 24(8), 855-72
- Schwartz MW, Sipols A, Kahn SE, Lattemann DF, Taborsky GJ Jr., Bergman RN, Woods SC, Porte D Jr., 1990. Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am. J. Physiol.* 259 (3 Pt 1), E378-E383
- Schwartz MW, Bergman RN, Kahn SE, Taborsky GJ Jr., Fisher LD, Sipols AJ, Woods SC, Steil GM, Porte D Jr., 1991. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. *J. Clin. Invest.* 88(4), 1272-1281

- 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(3),387-414
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D Jr., Seeley RJ, Baskin DG, 2000. Central nervous system control of food intake. *Nature* 404(6778),661-671
- Schwarzberg H, Bernstein HG, Reiser M, Gunther O, 1989. Intracerebroventricular administration of insulin attenuates retrieval of a passive avoidance response in the rats. *Neuropeptides.* 13(2), 79-81
- Seki T, Sato N, Hasegawa T, Kawaguchi T, Juni K, 1994. Nasal absorption of zidovudine and its transport to cerebrospinal fluid in rats. *Biol Pharm Bull.* 17(8), 1135-7
- Shulman RG, Hyder F, Rothman DL, 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6417
- Speckmann E-J, Caspers H, Elger C, 1984. Neuronal mechanisms underlying the generation of field potentials. In: *Self-Regulation of the Brain and Behavior*, edited by Elbert T, Rockstroh B, Lutzenberger W, Birbaumer, N, Springer-Verlag, Berlin 9-25
- Speckmann E-J, Elger CE, 1998. Introduction to the neurophysiological basis of the EEG and DC potentials. In: *Electroencephalography*, 4th ed. Edited by Niedermeyer E, da Silva FL. Williams & Wilkins, Baltimore 15-26
- Stein LJ, Dorsa DM, Baskin DG, Figlewicz DP, Porte D, Jr., Woods SC, 1987. Reduced effect of experimental peripheral hyperinsulinemia to elevate cerebrospinal fluid insulin concentrations of obese Zucker rats. *Endocrinology* 121:1611-5
- Steriade M, 2001. Impact of network activities on neuronal properties in corticothalamic systems. *J. Neurophysiol.* 86,1-39
- Switzer RC, De Olmos J, Heimer L, 1985. Olfactory system. In: *The rat nervous system*, Vol 1., edited by Paxinos G. Academic Press, New York 1-31
- Tallroth G, Lindgren M, Stenberg G, Rosen I, Agardh CD, 1990. Neurophysiological changes during insulin-induced Hypoglycaemia and in the recovery period following glucose infusion in type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus and in normal man. *Diabetologia.* 33(5),319-323
- Tamburrano G, Lala A, Locuratolo N, Leonetti F, Sbraccia P, Giaccari A, Busco S, Porcu S, 1988. Electroencephalography and visually evoked potentials during moderate hypoglycemia. *J. Clin. Endocrinol. Metab* 66(6), 1301-1306
- Tennigkeit M, Lehmann H-J, Haschke R, 1993. Interactions between the DC potential of the brain and slow potential shifts under mental load. In: *Slow potential changes in the brain*, edited by Haschke W, Speckmann EJ, Roitbak AI. Birkhäuser, Boston 85-95
- Thorne RG, Emory CR, Ala TA, Frey WH, 1995. Quantitative analysis of the olfactory pathway for drug delivery to the brain. *Brain Res.* 692, 278-282
- Unger JW, Livingston JN, Moss AM, 1991. Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog. Neurobiol.* 36(5), 343-362
- Vanderweele DA, Haraczkiwicz E, Van Itallie TB, 1982. Elevated insulin and satiety in obese and normal weight rats. *Appetite.* 2(2), 99-109
- Verkhatsky A, Orkand RK, Kettenmann H, 1998. Glial calcium: homeostasis and signaling function. *Physiol Rev.* 78(1), 99-141

- Van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR, 1979. Insulin binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology*. 105 (3), 666-73
- Waldbillig RJ, LeRoith D, 1987. Insulin receptors in the peripheral nervous system: a structural and functional analysis. *Brain Res*. 409(2), 215-20
- Waszak M, Obrist WD, 1969. Relationship of slow potential changes to response speed and motivation in man. *Electroenceph Clin Neurophysiol*. 27, 113-120
- Wickelgren I, 1998. Tracking insulin to the mind. *Science*. 208, 517-519
- Woods SC, Lotter EC, McKay D, Porte D Jr, 1979. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight in baboons. *Nature*. 282, 503-505
- Quian ZM, Li H, Sun H, Ho K, 2002. Targeted Drug Delivery via the Transferrin Receptor-Mediated Endocytosis Pathway. *Pharmacol. Rev*. 54(4), 561-587
- Yalow RS, Eng J, 1983. Insulin in the central nervous system. *Adv. Metab disord*. 10, 341-354
- Yang YJ, Hope ID, Ader M, Bergman RN, 1989. Insulin transport across capillaries is rate limiting for insulin action in dogs. *J. Clin. Invest*. 84, 1620-1628
- Zahniser NR, Goens MB, Hanaway PJ, Vinych JV, 1984. Characterization and regulation of insulin receptors in rat brain. *J. Neurochem*. 42, 1354-1362
- Zhao WQ, Chen H, Quon MJ, Alkon DL, 2004. Insulin and the Insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol*. 490(1-3), 71-81

Anhang

Anhang 1: Ratingskala

Anhand der Ratingskala sollten die Probanden ihr momentanes Befinden bezüglich der drei Parameter Hunger, Durst und Müdigkeit auf einer Skala von 1-10 einschätzen (10=viel, 1=wenig).

Die Befragung erfolgte jeweils vor Beginn und nach Beendigung der Aufnahme.

1-10	vor Aufnahme	nach Aufnahme
Hunger		
Durst		
Müdigkeit		

Anhang 2: Protokoll

Zeitschema, nachdem das Blut zur Bestimmung der einzelnen Parameter abgenommen wurde

Versuchszeit (min)	Zeit	Insulin, Glucose	GH, ACTH, Cortisol, Glukagon, Elektrolyte
-30	1		1
-15	2		2
0 (vor Applikation)	3		3
5	4		4
+10	5		
+15	6		6
+20	7		
+25	8		
+30	9		9
+35	10		
+40	11		
+45	12		12
+50	13		
+55	14		
+60	15		15
+75	16		16
+90	17		17

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name: Julia Bredthauer
Geburtsdatum: 11.12.1979
Geburtsort: Hamburg
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1986-1990	Grundschule Redder in Hamburg
1990-1999	Gymnasium Grootmoor in Hamburg
1999	Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife

Hochschulausbildung:

1999-2000	Studium der Humanmedizin (Vorklinik) an der Carl Gustav Carus Universität in Dresden
2001	Ärztliche Vorprüfung
2001-2006	Studium der Humanmedizin (Klinischer Abschnitt) an der Medizinischen Universität zu Lübeck
2002	I. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2005	II. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006	III. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion:

Dezember 2002 Beginn der Dissertationsarbeit zu dem Thema „Die Wirkung intranasal applizierten Insulins auf das transkraniale Gleichspannungspotential beim Menschen“ am Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, Institut für Neuroendokrinologie (Direktor: Prof. Dr. Jan Born). Abschluss des experimentellen Abschnittes nach 1,5 Jahren.

Veröffentlichung:

Hallschmid M, Schultes B, Marshall L, Molle M, Kern W, Bredthauer J, Fehm HL, Born J, 2004a. Transcortical direct current potential shift reflects immediate signaling of systemic insulin to the human brain. *Diabetes*. 53(9), 2202-8

Beruflicher Werdegang:

- | | |
|-----------------|--|
| 4/2005-8/2005 | 1. Tertial Praktisches Jahr
Klinik für Innere Medizin in der Asklepiosklinik Bad Oldesloe, Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität zu Lübeck |
| 08/2005–12/2005 | 2. Tertial Praktisches Jahr
Klinik für Allgemeinchirurgie im Royal Hobart Hospital (Tasmanien/Australien), Klinik für Neurochirurgie und Klink für Herzchirurgie im Royal North Shore Hospital (Sydney/Australien). |
| 12/2005-4/2006: | 3. Tertial Praktisches Jahr
Klinik für Neurologie, Universitätsklinikum Schleswig–Holstein, Campus Lübeck. |
| Seit 12/2006 | Assistenzärztin Neurologie
Marienkrankenhaus Hamburg |

Danksagung

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. J. Born und Herrn Professor Dr. H.L. Fehm für die Vergabe des Dissertationsthemas sowie die Überlassung des Arbeitsplatzes und der Materialien. Ganz besonders danke ich Herrn Dr. Manfred Hallschmid, der mich während der gesamten Zeit unterstützt hat und mir mit Rat und Tat beiseite stand. Vielen Dank für die nette und zuverlässige Betreuung.

Ein weiterer Dank gilt Frau Dr. L. Marshall für die nette und hilfsbereite Unterstützung bei der Aufzeichnung der DC-Potentiale.

Ebenfalls danke ich Frau A. Otternbein für die Beschaffung der Materialien und Frau Otten und Frau von Lützu für die schnelle Auswertung der Blutparameter.

Zuletzt möchte ich natürlich meiner Familie danken. Meiner Mutter und meinem Vater, dass sie mich vor allem moralisch unterstützt und mich immer wieder angespornt haben, meinem Bruder Peter, dass er gleich drei Mal mein Proband war und meiner Schwester Anna für die Hilfe bei der graphischen Ausgestaltung meiner Arbeit.