

Aus dem Institut für Neuroendokrinologie
der
Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. Jan Born

**BEDEUTUNG VON INSULIN FÜR ZENTRALNERVÖSE
FUNKTIONEN BEIM MENSCHEN**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von
Dipl. oec. troph. Christian Benedict
aus Lübeck

Lübeck, 2008

1. Berichterstatter : Prof. Dr. Jan Born
2. Berichterstatter : Prof. Dr. Kerstin Oltmanns
3. Berichtserstatter : Prof. Dr. Hans - Ulrich Häring

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2008

Zum Druck genehmigt: 03.09.2008

Abkürzungsverzeichnis	5
Einleitung	6
Die zentralnervöse Regulation von Hunger und Sättigung	8
<i>Die hypothalamische Steuerung des Körpergewichts</i>	8
<i>Hunger und Sättigung</i>	10
Formen und Mechanismen der Gedächtnisbildung	11
Intranasale Insulinapplikation	13
Insulin und zentralnervöse Funktionen	14
Fragestellung	15
Experiment I: Intranasales Insulin verringert die Energieaufnahme bei Männern und verbessert hippokampal-präfrontale Gedächtnisfunktionen bei Frauen.....	17
Hintergrund	17
Methoden	18
<i>Probanden</i>	18
<i>Experimenteller Ablauf</i>	18
<i>Kognitive Tests</i>	20
<i>Digit Span</i>	20
<i>2-D-Objekt-Lokalisations-Aufgabe</i>	21
<i>Hormon – und Glucosebestimmung</i>	22
<i>Datenaufbereitung und Statistik</i>	23
Ergebnisse	23
<i>Nahrungsaufnahme und Hungergefühle</i>	23
<i>Gedächtnisleistung</i>	24
<i>Plasmaglukose und Hormone</i>	25
Diskussion	27
Experiment II: Intranasales Insulin verbessert das deklarative Gedächtnis beim Menschen.....	30
Hintergrund	30
Methoden	31
<i>Probanden</i>	31
<i>Experimenteller Ablauf</i>	31
<i>Hormon – und Glucosebestimmung</i>	32
<i>Kognitive Tests und Befindlichkeitsmessung</i>	32
<i>Wortliste</i>	32
<i>Wordstem priming</i>	33
<i>Stroop-Test</i>	33
<i>Eigenschaftswörterliste (EWL-N)</i>	34
<i>Datenaufbereitung und Statistik</i>	34
Ergebnisse	34
<i>Hormone und Glukose</i>	34
<i>Wortliste, Wordstem priming und Stroop-Test</i>	36
<i>Eigenschaftswörterliste</i>	37
Diskussion	39
Experiment III: Intranasales Insulin verbessert das Gedächtnis des Menschen: Humaninsulin vs. Insulin Aspart.	42
Hintergrund	42
Methoden	43
<i>Versuchspersonen</i>	43
<i>Experimenteller Ablauf</i>	43

<i>Datenaufbereitung und Statistik</i>	44
Ergebnisse	45
Diskussion	47
Experiment IV: Effekte einer akuten und achtwöchigen intranasalen Insulingabe auf den Blutdruck beim Menschen	50
Hintergrund	50
Methoden	51
<i>Teilexperiment I: Akuteffekte von intranasalem Insulin auf den Blutdruck</i>	51
<i>Teilexperiment II: Langzeiteffekte von intranasalem Insulin auf den Blutdruck</i>	53
<i>Messung der Glukosekonzentration</i>	53
<i>Datenaufbereitung und Statistik</i>	53
Ergebnisse	54
<i>Teilexperiment I: Akuteffekte von intranasalem Insulin auf den Blutdruck, die Herzrate und die muskuläre sympathische Nervenaktivität (MSNA)</i>	54
<i>Teilexperiment II: Effekte einer achtwöchigen intranasalen Gabe von Insulin auf den Blutdruck und die Herzrate</i>	55
<i>Plasmaglukose</i>	55
Diskussion	57
Zusammenfassende Diskussion	60
Insulin und Gedächtnis	60
Insulin und Nahrungsregulation	62
Insulin und Blutdruck	63
Ausblick	63
Zusammenfassung	65
Literaturverzeichnis	66
Danksagung	79
Lebenslauf	80

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon; Kortikotropin
AgRP	Agouti-verwandtes Protein
Alpha-MSH	Alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon
ANOVA	Varianzanalyse
ATP	Adenosintriphosphat
BMI	Body-Mass-Index
bpm	beats per minute (= Schläge pro Minute)
CCK	Cholecystokinin
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
HAWIE	Hamburger Wechsler Intelligenz Eignungstests
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse
H-Insulin	Humaninsulin
HOMA	Homeostatic model assessment
I-Asp	Insulin Aspart
I.E.	Internationale Einheiten
IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor
izv.	intrazerebroventrikulär
Alpha-MSH	Alpha-Melanozyten stimulierendes Hormon
MK-R	Melanocortin-Rezeptor
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MSNA	muskuläre sympathische Nervenaktivität
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NPY	Neuropeptid Y
POMC	Proopiomelanocortin
SEM	Standardfehler
ZNS	Zentrales Nervensystem

Einleitung

Bereits vor mehr als 20 Jahren wurden Insulinrezeptoren im Gehirn des Menschen nachgewiesen (Sara *et al.* 1982), dennoch beruhen die Kenntnisse über die neuroendokrinen Funktionen von Insulin hauptsächlich auf Ergebnissen von Tierstudien. Im zentralen Nervensystem (ZNS) übernimmt das Hormon eine wichtige regulatorische Rolle in der Energiehomöostase (Roth *et al.* 1986), indem es als Indikator den Stand peripherer Energiespeicher an das Gehirn meldet (Rohner-Jeanrenaud, 1999; Woods and Seeley, 2001; Benoit *et al.* 2004a; Schwartz *et al.* 2000). Neben der Funktion als Adipositassignal moduliert Insulin auch Prozesse, die zur Bildung des deklarativen Gedächtnisses, welches das Erlernen von Fakten und Ereignissen umfasst, beitragen (Zhao and Alkon, 2001; Park *et al.* 2000; Benedict *et al.* 2007; Reger *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2004). Die Verarbeitung des deklarativen Gedächtnisses hängt maßgeblich vom Hippokampus ab (Squire and Zola, 1996; Eichenbaum, 2004), der sich durch das Vorkommen zahlreicher Insulinrezeptoren auszeichnet (Unger *et al.* 1991). Neben diesen Befunden konnten Studien mit Hunden außerdem zeigen, dass Insulin über autonome Zentren im Bereich des ZNS den systemischen Blutdruck erhöht (Davis *et al.* 1995; Davis *et al.* 1997).

Insulin wird entweder passiv über eine Diffusion im Bereich der zirkumventrikulären Organe (van Houten *et al.* 1983) oder aktiv mit Hilfe eines rezeptorvermittelten Transportes ins Gehirn aufgenommen (Woods *et al.* 2003; Schwartz *et al.* 1992a). Da die Liquorinsulinspiegel sich proportional zu der Serumkonzentration des Hormons (Wallum *et al.* 1987; Schwartz *et al.* 1990) verhalten, galt die intravenöse Gabe des Peptides als die bisher am besten geeignete Applikationsmethode, um die Bedeutung von Insulin für Hirnfunktionen beim Menschen zu klären. Die intravenöse Gabe von Insulin beeinflusst Prozesse der zentralnervösen Energiehomöostase und deklarativen Gedächtnisbildung beim Menschen (Kern *et al.* 2001; Craft *et al.* 1996). Allerdings verursacht sie auch zahlreichen Nebenwirkungen, wie eine gesteigerte sekretorische Aktivität unterschiedlicher Stressachsen (Kern *et al.* 2000; Fruehwald-Schultes *et al.* 1999) und eine Hypoglykämie. Daher ist die intravenöse Infusion von Insulin ungeeignet, um den direkten Einfluss von Insulin auf Hirnfunktionen beim Menschen selektiv zu untersuchen bzw. zu bewerten. Eine andere Methode ist die intranasale Gabe. Dieses Verfahren ermöglicht einen direkten Übertritt von Insulin von der Nase ins Gehirn ohne dabei periphere Nebenwirkungen des Hormons zu verursachen

(Born *et al.* 2002). Daher wurde in dieser Dissertation eine experimentelle Serie konzipiert, die dazu diente, die Bedeutung von Insulin für Hirnfunktionen beim Menschen mit Hilfe der intranasalen Applikationsmethode zu erforschen. So konnte in den dieser Dissertation zugrunde liegenden Versuchen herausgefunden werden, dass

- 1) eine kurzzeitige Anhebung zentralnervöser Insulinspiegel hippokampal-präfrontale Gedächtnisfunktionen bei Frauen verbessert und die Gesamtenergieaufnahme bei Männern reduziert (*Experiment I*),
- 2) eine achtwöchige intranasale Behandlung mit Humaninsulin das deklarative Gedächtnis und die allgemeine Stimmung bei beiden Geschlechtern positiv beeinflusst (*Experiment II*),
- 3) eine intranasale Gabe des Insulinanalogons Insulin Aspart über acht Wochen den positiven deklarativen Gedächtniseffekt von Humaninsulin überragt (*Experiment III*) und
- 4) eine akute nicht aber eine achtwöchige intranasale Anwendung von Insulin den systemischen Blutdruck beim Menschen erhöht (*Experiment IV*),

Vor der Darstellung der einzelnen Experimente wird zunächst ein Überblick über zentralnervöse Regelkreise der Körpergewichts- und Essregulation gegeben. Danach werden grundlegende Prinzipien der Gedächtnisbildung und -differenzierung vorgestellt und methodische und theoretische Aspekte der intranasalen Insulinapplikation erörtert. Abschließend werden die relevantesten Befunde zu den Wirkungen von Insulin auf Hirnfunktionen, die dieser Dissertation als Anregung dienten, präsentiert.

Die zentralnervöse Regulation von Hunger und Sättigung

Die hypothalamische Steuerung des Körpergewichts

Durch Studiendaten zu den zentralnervösen Regelkreisen, die das Nahrungs- und Energiegleichgewicht steuern, ist es gesichert, dass die Insulin- und Leptinkonzentrationen den Stand der als Körperfett gespeicherten Energie an das Gehirn melden (Baskin *et al.* 1999; Benoit *et al.* 2004b; Hallschmid *et al.* 2004b; Woods and Seeley, 2000). Ebenso konnten die hypothalamischen Kerngebiete, die diese peripheren Signale verarbeiten und die Kalorienzufuhr regulieren, teilweise identifiziert werden (Woods *et al.* 1998; Schwartz *et al.* 2000; Seeley and Woods, 2003).

Bislang erfüllt neben Leptin, welches im Folgenden vernachlässigt wird (zur Vertiefung, siehe (Huang and Li, 2000; Blevins *et al.* 2002)), nur das Hormon Insulin die Bedingungen, die eine Substanz als ein Adipositassignal erfüllen muss (Seeley and Woods, 2003). Die peripheren Spiegel des Insulins verhalten sich proportional zur Körperfettmasse (Gerozissis, 2003). In Hirnregionen wie dem Hypothalamus und dem Hirnstamm, die für die Nahrungsregulation von grundlegender Bedeutung sind (Porte, Jr. *et al.* 2002), finden sich zahlreiche Insulinrezeptoren (Baskin *et al.* 1994; Havrankova *et al.* 1978). Dies lässt vermuten, dass Insulin in die zentralnervöse Regulation der Kalorienaufnahme integriert ist (Porte, Jr. *et al.* 1998). Diese Annahme wird auch durch den postprandialen Anstieg der Konzentration von Insulin im Liquor cerebrospinalis und im Hypothalamus gestützt (Schwartz *et al.* 1992a). Bei Ratten führt die intrazerebroventrikuläre (izv.) Gabe von Insulin sowohl zu einer Reduktion der kumulativen Nahrungsaufnahme über 24 Stunden als auch zu einer Abnahme der Körperfettmasse (Seeley *et al.* 1996; Woods *et al.* 1979). Analog dazu konnte in einer in unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Humanstudie gezeigt werden, dass die Erhöhung von zentralnervösen Insulinspiegeln über einen achtwöchigen Zeitraum zum Verlust von etwa 1 kg Körperfett bei normalgewichtigen Männern führt (Hallschmid *et al.* 2004b).

Im ZNS angekommen, aktiviert Insulin ein multipeptidgeres Netzwerk im Nukleus arcuatus des Hypothalamus. Dieser hypothalamische Kernbereich steuert im gesunden Organismus die Balance zwischen anorexigenen und orexigenen Signalwegen (Porte, Jr. *et al.* 1998; Schwartz *et al.* 2000; Seeley and Woods, 2003). Orexigene Signale stimulieren die Nahrungsaufnahme und vermindern den Energieumsatz und resultieren somit in einer Gewichtszunahme. Eine Aktivierung anorexigener Schaltwege senkt die Kalorienzufuhr und führt in Kombination mit einem erhöhten Ruheenergieumsatz zum Gewichtsverlust

(Abbildung 1). Als bisher wichtigstes anorexigenes Neuropeptid gilt das durch enzymatische Spaltung entstehende Derivat des Proopiomelanokortins (POMC), das Alpha-Melanozyten-stimulierende Hormon (Alpha-MSH) (Fan *et al.* 1997; Cone *et al.* 2001). Die Expression und Freisetzung von POMC wird durch die *izv.* Gabe von Insulin gesteigert und stellt darum einen wichtigen Signalweg in der anorexigenen Wirkung von Insulin dar (Benoit *et al.* 2002). Alpha-MSH interagiert mit Melanokortinrezeptoren des Typs 3 und 4 (MK3-R, MK4-R). Die Gabe von Alpha-MSH oder MK3/4-R-Agonisten reduziert die Nahrungsaufnahme und das Körpergewicht (Fan *et al.* 1997; Thiele *et al.* 1998). Analog dazu führt die Gabe von MK3/4-R-Antagonisten zu einer gesteigerten Nahrungsaufnahme und einer Gewichtszunahme (Fan *et al.* 1997; Ollmann *et al.* 1997; Benoit *et al.* 2000) bzw. eine genetische Störung in der Ausbildung von POMC- und MK4-R zu einem adipösen, hyperphagen Phänotypen (Huszar *et al.* 1997; Yaswen *et al.* 1999). In einer in Lübeck durchgeführten Studie (Fehm *et al.* 2001) induzierte die

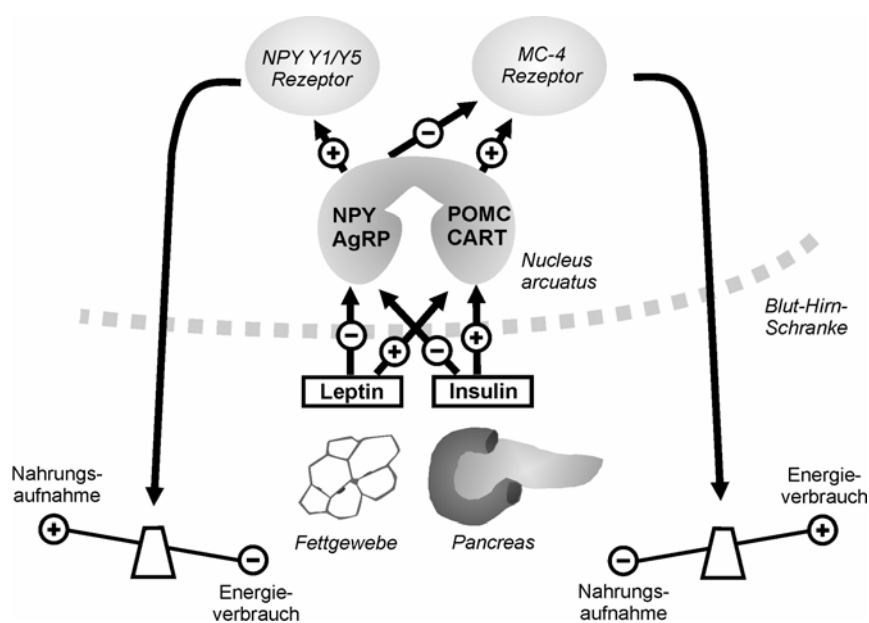


Abbildung 1. Modell der zentralnervösen Energiehomöostase (nach Schwartz *et al.* 2003). Die mit dem Blutkreislauf zirkulierenden Adipositas-Signale Leptin und Insulin übermitteln nach dem Überqueren der Blut-Hirn-Schranke den Stand der als Fett gespeicherten Energie an Neurone des Nucleus arcuatus. Neurone, die Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-verwandtes Protein (AgRP) exprimieren, stimulieren die Nahrungsaufnahme und senken den Energieverbrauch, was zu einer Gewichtszunahme führt (anabole Schaltwege). Die Expression von Proopiomelanocortin (POMC) und seinem Derivat alpha-MSH hemmt die Nahrungsaufnahme und steigert den Energieverbrauch (katabole Schaltwege). Leptin und Insulin hemmen AgRP/NPY-Neurone und stimulieren POMC-Neurone, während niedrige Leptin- und Insulinspiegel wahrscheinlich umgekehrte Effekte auslösen.

sechswöchige intranasale Gabe des MK4-R-Agonisten MSH/ACTH₄₋₁₀ eine Senkung des Körperfettanteils um etwa 1 kg. Eine Vermittlung dieses Effektes über periphere Mechanismen ist unwahrscheinlich, da MSH/ACTH₄₋₁₀ nicht an die peripheren MK-R (MK1-R, MK2-R) bindet.

Im Bereich der orexigenen Schaltsysteme, die durch Insulin beeinflusst werden, spielen die im Nukleus arcuatus freigesetzten Signalträger Neuropeptid Y (NPY) und Agouti-verwandtes Protein (AgRP) eine entscheidende Rolle. Durch Stimulation der Nahrungsaufnahme und Reduktion des Ruhenergieumsatzes fördern diese Peptide die Gewichtszunahme (Morton *et al.* 2006). Die orexigene Wirkung entfaltet NPY über die Aktivierung seiner Y1 und/oder Y5-Rezeptoren (Raposinho *et al.* 2004), die in hohen Konzentrationen im Nukleus paraventricularis zu finden sind (Gerald *et al.* 1996; Zimanyi *et al.* 1998). Das AgRP übt seine anabole Wirkung über einen kompetitiven Antagonismus am MK3- oder MK4-Rezeptor (Ellacott and Cone, 2004) aus. AgRP- und NPY-Neurone werden von Insulin gehemmt (Porte, Jr. *et al.* 2002).

Hunger und Sättigung

Hunger erfüllt die biologische Funktion, den Körper mit Nährstoffen zu versorgen, um den Energiebedarf und somit die Erhaltung körperlicher Funktionen sicherzustellen. Die Intensität des Hungers wird durch die Verfügbarkeit von Energiemetaboliten (Kennedy, 1952; Mayer, 1955) bestimmt. Beispielsweise werden die Hungergefühle durch die Höhe des Blutzuckers moduliert (Schultes *et al.* 2003). Jüngste Theorien postulieren, dass der Hunger maßgeblich durch die Höhe der intraneuronalen ATP-Spiegel beeinflusst wird und letztlich sicherstellt, dass dem Gehirn stets genügend Energie zur Verfügung steht (Lee *et al.* 2005; Peters *et al.* 2004).

Der Vorgang der Nahrungsaufnahme wird in die zephale, gastrale und intestinale Phase getrennt. Die zephale Phase steht vor der Nahrungsaufnahme und ist durch sensorische Einflussgrößen, die den Körper auf die Nahrungsverwertung vorbereiten, gekennzeichnet. Während der gastralen Phase, wenn sich bereits Nahrung im Magen befindet, wird die Magendehnung dem ZNS über vagale Afferenzen zurückgemeldet und wirkt als ein erstes Sättigungssignal. Durch die Magenfüllung kommt es auch zu einer gesteigerten Freisetzung von Gastrin, das die Magensäuresekretion steigert (Schusdziarra, 1985). Weiterhin kommt es im Rahmen der gastralen Phase zu einer reduzierten Freisetzung von Ghrelin. Dieses Hormon fördert den Appetit durch Stimulation von Neuronen im Nukleus arcuatus, die NPY und AgRP bilden (Willeßen *et al.* 1999). Die

Ghrelinkonzentration im Blut steigt vor Mahlzeiten an und sinkt danach ab (Cummings *et al.* 2001). Sobald Nahrungsbestandteile in das Darmlumen gelangen, beginnt die intestinale Phase. Diese ist mit der Aktivierung des intrinsischen Nervensystems und der Freisetzung einer Vielzahl weiterer Inkretine verbunden. Das hierbei ausgeschüttete Hormon Cholecystokinin wirkt anorexigen (Strader and Woods, 2005). Vor kurzem wurde mit dem Peptid YY ein weiterer Botenstoff identifiziert, der nach dem Essen proportional zum kalorischen Gehalt der Mahlzeit von Zellen im Dünndarm sezerniert wird und via Inhibition des Y2-Rezeptors von NPY/AgRP-Neuronen zur Sättigung beitragen soll (Tschop *et al.* 2004). Die bereits besprochenen hypothalamischen Kerne sind eng mit dem kaudalen Hirnstamm sowie limbischen und kortikalen Strukturen vernetzt, und es ist davon auszugehen, dass die vielfältigen neuronalen und endokrinen Signale, die durch eine Nahrungsaufnahme freigesetzt und moduliert werden, diese Schaltkreise aktivieren und so das Ende einer einzelnen Mahlzeit einleiten. Insgesamt ist jedoch noch nicht geklärt, wie die Rückmeldung über langfristig (d.h. in Fettdepots) gespeicherte Energie in die Regelkreise, die den Zellen die kurzfristig zur Verfügung stehenden Energiereservoirs signalisieren, auf zentralnervöser bzw. zellulärer Ebene integriert wird (Seeley and Woods, 2003).

Formen und Mechanismen der Gedächtnisbildung

Die menschliche Gedächtnisbildung ist ein komplexer Vorgang der Informationsspeicherung und -verarbeitung, der verschiedene Teilsysteme und -prozesse umfasst. Das Gedächtnis lässt sich in deklarative (explizite) und nondeklarative (implizite) Verarbeitungsebenen differenzieren (Squire 1992; Squire und Zola 1996; siehe Abbildung 2). Das deklarative Gedächtnis umfasst das Lernen von Fakten (semantisches Gedächtnis) und Ereignissen (episodisches Gedächtnis) und hängt im Wesentlichen vom Hippokampus ab, der durch eine hohe Dichte von Insulinrezeptoren gekennzeichnet ist (Baskin *et al.* 1994; Havrankova *et al.* 1978). Das deklarative, hippokampusabhängige Gedächtnis wird typischerweise mit Aufgaben getestet, in denen Probanden sich Wortlisten, Texte oder Bildmaterial einprägen, aber auch durch Aufgaben zum räumlichen Lernen (Eichenbaum, 2000). In zahlreichen Studien wurde nachgewiesen, dass hippokampale Läsionen zu erheblichen Beeinträchtigungen in der deklarativen Gedächtnisverarbeitung führen (Squire and Zola, 1996). Die unmittelbar an den Hippokampus angrenzenden Strukturen des medialen Temporallappens wie parahippokampaler, perirhinaler und entorhinaler Kortex

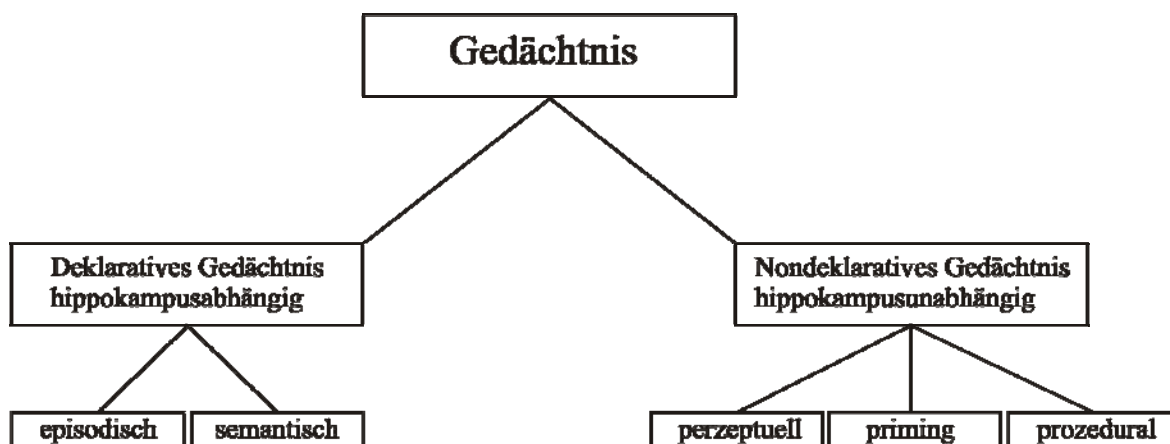


Abbildung 2. Neurobiologische Aufteilung des Gedächtnissystems

spielen dabei ebenfalls eine Rolle. Da aber funktional zwischen diesen Regionen und dem Hippokampus selbst in der Regel nicht unterschieden wird, ist in diesem Zusammenhang im Folgenden meistens nur vereinfachend vom Hippokampus die Rede. Aufgaben des nondeklarativen, hippocampusunabhängigen Gedächtnisses sind typischerweise durch das wiederholte Einüben und Ausführen bestimmter Prozeduren oder Fähigkeiten perzeptueller, motorischer oder kognitiver Natur gekennzeichnet, wie zum Beispiel beim Erlernen des Fahrradfahrens oder (als typische Laboraufgaben) das Erlernen des Spiegelzeichens (Nachzeichnen von Figuren, die man nur über einen Spiegel sehen kann). Neben diesen prozeduralen Aufgaben umfasst das nondeklarative Gedächtnis auch das Phänomen des „Priming“, bei dem die Präsentation eines Reizes in einer ersten Experimentalphase dessen Verarbeitung in einer späteren zweiten Experimentalphase begünstigt (Tulving and Schacter, 1990). Obwohl die einzelnen Aufgabentypen des nondeklarativen Gedächtnisses auf jeweils eigene, domänenspezifische Gehirnstrukturen rekurren (z.B. motorische Fähigkeiten auf Basalganglien und Zerebellum, Priming auf neokortikale Strukturen), so ist ihnen doch in Abgrenzung zu den deklarativen Aufgaben im Wesen gemeinsam, dass sie nicht als bewusste Erinnerungen erlebt werden und keine Beteiligung des Hippokampus erfordern. Grundsätzlich lassen sich beim Vorgang der Gedächtnisbildung drei verschiedene Teilphasen unterscheiden: die Lernphase (= Enkodierungsphase), die durch die Informationsaufnahme charakterisiert ist, die nachfolgende Konsolidierungsphase (= Retentionsphase), die der Speicherung der neuen

Informationen dient, und die Phase des Gedächtnis- bzw. Informationsabrufs (= Testphase).

Intranasale Insulinapplikation

Obgleich Insulin aus dem Blutkreislauf ins Gehirn gelangt (Woods *et al.* 2003; Schwartz *et al.* 1992a), ist die intravenöse Insulinapplikation zur Untersuchung zentralnervöser Funktionen aufgrund von zahlreichen peripheren Nebenwirkungen (Kern *et al.* 2000; Fruehwald-Schultes *et al.* 1999) gering aussagekräftig. Dagegen ist die intranasale Insulinapplikation eine Methode, die unter Umgehung des peripheren Blutkreislaufes Peptide und Proteine in das Gehirn schleust (Born *et al.* 2002); Abbildung 3). Seit mindestens 45 Jahren ist bekannt, dass es einen direkten Zugangsweg von der Nasenschleimhaut über den Nervus olfaktorius in das zentrale Nervensystem gibt (Krompecher, 1954). Es ist inzwischen im Tierversuch gut belegt, dass verschiedene Substanzen wie Viren (Barnett and Perlman, 1993; Carbone *et al.* 1987), Metallionen (Evans and Hastings, 1992) und Medikamente (Sakane *et al.* 1991) direkt von der

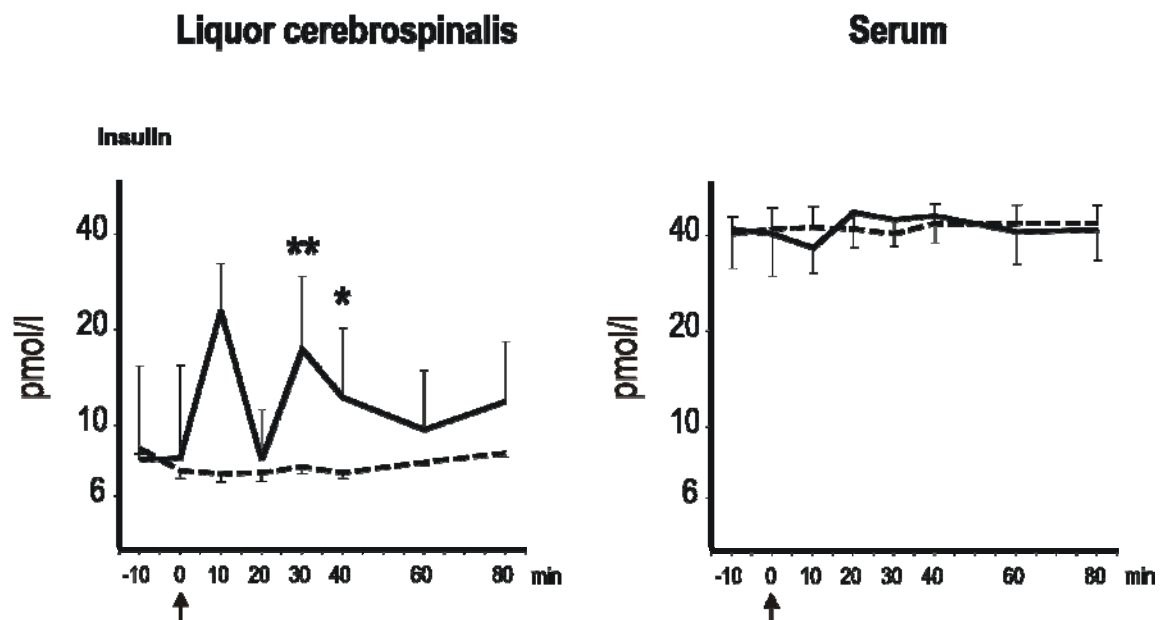


Abbildung 3. Intranasal verabreichtes Insulin steigert die Insulinkonzentration im Gehirn (nach Born *et al.* 2002 modifiziert). Insulinkonzentration im Liquor cerebrospinalis und im Blutserum vor und innerhalb von 80 Minuten nach der intranasalen Gabe von Humaninsulin (40 I.E.; Durchgezogene Linie, n = 8) und Plazebo (steriles Wasser, gestrichelte Linie, n = 5). Die Pfeile indizieren den Zeitpunkt der Substanzgabe. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt und für die Werte der Grundlinie korrigiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen sind durch Sternchen [* , $P < 0.05$; ** , $P < 0.01$] indiziert.

Nasenschleimhaut ins Gehirn gelangen. Im Prinzip können Substanzen wie Insulin entweder extrazellulär per Diffusion oder intraaxonal mittels Endozytose über das Nasenriechepithel zum Gehirn transportiert werden. Beide Wege führen dabei durch die Lamina zirkulosa entlang des Bulbus und des Tractus olfactorius bis in tiefer gelegene Strukturen. Der axonale Transport ist dabei deutlich langsamer als der extrazelluläre Transport (Kristensson and Olsson, 1971). Außerdem scheint die Geschwindigkeit der Substanzaufnahme von der Nase ins Gehirn von Größen wie Molekulargewicht, Lipophilie und Ionisation abzuhängen (Illum, 2000). Parallele Messungen von Insulin im Liquor cerebrospinalis und Blut nach intranasaler Gabe von 40 I.E. Humaninsulin zeigten ein signifikantes Maximum des Hormons in der Hirnflüssigkeit nach ca. 30 Minuten. Diese Effekte waren dabei vollständig unabhängig von Veränderungen des Seruminsulins (Born *et al.* 2002). Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass die intranasale Applikation eine Untersuchungsmethode darstellt, die die Insulinkonzentration im Gehirn selektiv erhöht und deshalb eine gezielte Untersuchung von zentralnervösen Insulineffekte beim Menschen ohne störende periphere Veränderungen erlaubt.

Insulin und zentralnervöse Funktionen

Wie bereits oben beschrieben, ist der Insulinrezeptor in verschiedenen Regionen des Gehirns lokalisiert (Baskin *et al.* 1994; Unger *et al.* 1991). Zahlreiche Studien konnten beobachten, dass Insulin durch Bindung an seinen Rezeptor die Funktionen von Nervenzellen beeinflusst (Baskin *et al.* 1994; Schwartz *et al.* 1992a)va. Beispielsweise reduziert Insulin die neuronale Feuerungsrate in hippocampalen und hypothalamischen Zellen (Palovcik *et al.* 1984; Shibata *et al.* 1986). Ferner wurde gezeigt, dass Insulin die Wiederaufnahme von Noradrenalin am synaptischen Spalt in verschiedenen Gehirnzellen des Rattenhirns inhibiert (Figlewicz *et al.* 1996), dass es den Katecholaminsatz im Hypothalamus beeinflusst (Peinado and Myers, 1987) und dass es über eine Stimulation der adrenergen Aktivität zu einem Anstieg des Phosphoinositolumsatzes im Hippokampus führt (Figlewicz and Szot, 1991). Das Hormon moduliert auch den N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor vermittelten Ionenfluss (Liu *et al.* 1995) und die GABA-Rezeptoraktivierung in den Neuronen (Wan *et al.* 1997).

Obwohl zahlreiche Wirkungen von Insulin auf einzelne Nervenzellen oder isolierte Gehirnstrukturen gut dokumentiert sind, ist die Bedeutung des Hormons für integrative Funktionen des ZNS beim Menschen noch weitgehend unklar. Neben der Frage nach der

physiologischen Relevanz zentralnervöser Insulineffekte beim Menschen könnten Insulinwirkungen im Gehirn auch durchaus von klinischer Bedeutung sein. Es wurde nachgewiesen, dass bei Patienten mit einer Demenz vom Alzheimer Typ die Insulinkonzentration im Liquor cerebrospinalis erniedrigt und diese Abnahme mit dem Grad der Demenz korreliert ist (Craft *et al.* 1998). Da immer mehr Studien von vorteilhaften Effekten des Insulins auf die Gedächtnisfunktion berichten (Wickelgren, 1998), gelangen die zentralnervösen Insulineffekte immer mehr in den Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses. Insulin fördert beispielsweise die neuronale Bildung und Aussprossung von Dendriten im ZNS (Wallace *et al.* 1997) und reduziert die bei Ratten auftretenden Gedächtnisdefizite nach einer Frontalhirnischämie (Voll *et al.* 1989). Neben solchen neurotrophen und neurokognitiven Effekten scheint Insulin auch Aspekte der Körpergewichtshomöostase über einen zentralnervösen Mechanismus zu regulieren. Im Tierversuch führt die izv. Gabe von Insulin über eine Hemmung der NPY-Synthese (Schwartz *et al.* 1992b) zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichts (Woods *et al.* 1979; Woods *et al.* 1996).

Bei Hunden führt eine intrakarotidale Infusion von Insulin zu einem Anstieg des Blutdrucks, der deutlich stärker ausfällt als nach einer vergleichbaren Infusion des Hormons in die Arteria femoralis. Diese Befunde deuten an, dass Insulin über zentralnervöse Mechanismen den systemischen Blutdruck erhöht.

Fragestellung

Zahlreiche Arbeiten deuten an, dass Insulin beim Menschen in die zentralnervöse Regulation des Essverhaltens, der Gedächtnisbildung und des systemischen Blutdrucks integriert ist. Um die physiologische Bedeutung des Insulins für die oben genannten zentralnervösen Funktionen beim Menschen genauer zu untersuchen, wurde daher eine vierteilige Serie von Experimenten entwickelt.

- Im *Experiment I* wurde erforscht, inwiefern eine akute intranasale Gabe von Humaninsulin die Nahrungsaufnahme und die Gedächtnisleistung bei Männern und Frauen beeinflusst.

- Im *Experiment II* wurde eruiert, ob eine tägliche intranasale Anwendung von Humaninsulin über acht Wochen die Gedächtnisbildung bei Männern und Frauen beeinflusst.
- Im *Experiment III* wurde überprüft, ob die Verbesserung der deklarativen Gedächtnisbildung, die nach subchronischer Gabe von Humaninsulin im *Experiment II* beobachtet wurde, durch die Anwendung eines Insulinanalogons zu steigern ist.
- Im *Experiment IV* wurde untersucht, inwieweit die akute bzw. subchronische intranasale Gabe von Humaninsulin den Blutdruck beim Menschen beeinflusst.

Experiment I: Intranasales Insulin verringert die Energieaufnahme bei Männern und verbessert hippocampal-präfrontale Gedächtnisfunktionen bei Frauen

Publiziert in: Benedict C, Kern W, Schultes B, Born J, and Hallschmid M. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory improving effects of intranasal insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008 Apr;93(4):1339-44..

Hintergrund

Das Pankreashormon Insulin übt eine entscheidende Rolle in der Regulation zentralnervöser Funktionen aus. Dazu gehört insbesondere die neuroendokrine Kontrolle des Energiestoffwechsels (Woods *et al.* 1979; Clegg *et al.* 2003; Porte, Jr. *et al.* 2005; Hallschmid *et al.* 2004a) als auch die Bildung von hippocampusabhängigen Gedächtnisinhalten (Zhao *et al.* 2004; Messier and Teutenberg, 2005; Strachan, 2005). Systemisches Insulin erreicht das Gehirn über einen rezeptorvermittelten, sättigbaren Transport (Baura *et al.* 1993). Im Gehirn bindet das Hormon an Insulinrezeptoren, die vor allem im Bereich des Kortex, Bulbus olfaktorius, Hippokampus, Zerebellum und Hypothalamus vorkommen (Havrankova *et al.* 1978; Unger *et al.* 1991). Da die peripheren Insulinspiegel sich proportional zur Körperfettmasse verhalten und die zentralnervöse Gabe des Hormons die Nahrungsaufnahme im Tiermodell vermindert (Woods *et al.* 1979; Brown *et al.* 2006), gilt Insulin als wichtiges negatives Rückkopplungssignal in der zentralnervösen Regulation des Körpergewichtes (Schwartz *et al.* 2000; Porte, Jr. *et al.* 2005). Interessanterweise reagieren männliche Ratten sensitiver auf die anorexigenen Eigenschaften von Insulin als die weiblichen Versuchstiere. Die *izv.* Gabe von Insulin führt ausschließlich in den männlichen Ratten zu einer Verminderung der kumulativen Nahrungsaufnahme (Clegg *et al.* 2003). In Übereinstimmung mit diesen Tierdaten konnte in einer Humanstudie unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass eine achtwöchige intranasale Gabe von Insulin (Dosis: 160 I.E./Tag), die dem Hormon den Übertritt von der Nase ins Gehirn ermöglicht (Born *et al.* 2002), nur zu einer Abnahme des Körperfettes bei den Männern führte (Hallschmid *et al.* 2004b).

Neben diesem Effekt des Hormons auf die Energiehomöostase konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die deklarative Gedächtnisbildung, die das Erlernen von Fakten und Ereignissen umfasst (Squire and Zola, 1996), durch Insulin gefördert wird. So führt die *izv.* Gabe von Insulin bei Ratten zu einer verbesserten räumlichen

Orientierungsfähigkeit im Rahmen einer Stressaufgabe (Park *et al.* 2000; Babri *et al.* 2007) und erhöht die Expression von Insulinrezeptoren im Bereich des Hippokampus (Zhao *et al.* 1999). Analog dazu konnten beim Menschen positive Effekte von Insulin auf das deklarative Gedächtnis beobachtet werden (Reger *et al.* 2007; Reger *et al.* 2005).

Obgleich bisherige Befunde andeuten, dass Männer sensitiver für die anorexigene Wirkung von Insulin sind als Frauen, wurden nicht dezidiert untersucht, ob eine akute Erhöhung von zentralnervösem Insulin die Gehirnfunktionen beim Menschen geschlechtsspezifisch moduliert. In diesem Experiment wurden daher die Effekte einer einzelnen intranasalen Insulindosis auf die Energieaufnahme, die Plasmaglukose und verschiedene hormonellen Parameter bei Männern und Frauen untersucht. Des Weiteren wurde auch überprüft, inwieweit akut appliziertes Insulin die unterschiedlichen Gedächtnissysteme beeinflusst.

Methoden

Probanden

32 gesunde, normalgewichtige Nichtraucher (18 Frauen: BMI, $21.40 \pm 0.48 \text{ kg/m}^2$; Alter, 22.44 ± 0.63 Jahre; 14 Männer: BMI, $22.94 \pm 0.49 \text{ kg/m}^2$; Alter, 22.29 ± 0.62 Jahre) nahmen an dieser Studie teil. Die Frauen nahmen alle orale Kontrazeptiva (Östrogenhaltig, einphasisch). Ansonsten nahmen die Versuchsteilnehmer keine Medikamente. Die Gesundheit der Probanden wurde im Rahmen einer Voruntersuchung per Anamnese und Blutabnahme sichergestellt. Durch die Messung des Nüchternblutzuckers wurde bei allen Probanden ein Diabetes mellitus ausgeschlossen ($<7.0 \text{ mmol/l}$). Von 22:00 Uhr des Vortages bis 08:00 Uhr am Tag der experimentellen Sitzung mussten die Probanden auf Alkohol, Koffein und Nahrung verzichten.

Experimenteller Ablauf

Jeder Proband nahm an zwei Bedingungen (Insulin, Plazebo) teil. Um sicherzustellen, dass die Frauen an identischen Tagen innerhalb ihres Menstruationszyklus untersucht werden, lagen die experimentellen Sitzungen für alle Probanden vier Wochen auseinander. Die Versuchstage der Frauen wurden aber nicht während der Menstruation durchgeführt. Die Abfolge der Bedingungen war über alle Probanden ausgeglichen. Die Experimente fanden von 08:00 Uhr bis 11:00 Uhr statt, wobei die ersten 60 Minuten als Grundlinie dienten (Abbildung 10). Um 09:00 Uhr wurde entweder Insulin oder Plazebo insgesamt 16-mal

(0.1 ml/Puff; 8mal pro Nasenloch) in einem 30-Sekunden-Takt intranasal verabreicht. Somit bekamen die Probanden insgesamt 1.6 ml Insulin (160 I.E.; Insulin Actrapid; Novo Nordisk, Mainz, Deutschland) oder Plazebo (HOE 31 Lösungspuffer für Humaninsulin, Aventis Pharma, Bad Soden, Deutschland)

Nach der intranasalen Substanzgabe wurde eine Serie an Gedächtnistests von 09:20 Uhr bis 10:20 Uhr durchgeführt. Es kamen parallelisierte Testversionen zum Einsatz, die in ihrer Abfolge über alle Probanden ausgeglichen waren. Im Anschluss an die Gedächtnistests, d.h., 80 Minuten nach der Substanzgabe, wurde den Probanden ein standardisiertes Frühstücksbüffet (~ 4100 kcal, Tabelle 5) angeboten, von dem sie für insgesamt 30 Minuten ad libitum essen durften. Die Probanden wurden nicht über die hypothetisierten Behandlungseffekte von Insulin auf die Nahrungsaufnahme aufgeklärt.

Tabelle 5. Frühstückszusammensetzung

Nahrungsmittel	Gewicht (g)	Energie (kcal)	Kohlehydrate (g)	Fett (g)	Protein (g)
Kondensmilch	30	34	3	1	2
Zucker	24	101	24	0	0
Vollmilch	750	499	36	26	25
Brötchen	300	719	153	4	8
Vollkornbrot	165	372	71	2	12
Weißbrot	30	75	15	0.40	2
Butter	75	580	0.45	62	0.50
Marmelade	50	152	36	0.08	0.03
Nutella	40	142	30	0.32	3
Honig	40	127	30	0	0.14
Geflügelwurst	40	75	0.13	4	8
Cervelatwurst	34	120	0.07	10	6
Scheibenkäse	100	377	0.00	29	26
Streichkäse	33	87	0.63	8	3
Fruchtquark	150	172	23	4	9
Kräuterkäse	40	124	1	12	3
Orangensaft	800	356	72	2	8
Gesamt		4112	494	164	115

Das Frühstücksbüffet wurde mit Kaffee oder Tee serviert. Alle Werte sind gerundet.

Um die Blutkonzentrationen von Glukose und diversen Hormonen messen zu können, wurde zu Beginn der Grundlinienphase (08:00 Uhr) und 40 Minuten nach der Substanzgabe (09:40 Uhr) Blut mit Hilfe einer Einmalkanüle abgenommen. Außerdem mussten die Probanden ihren Hunger auf einer 9-Punkte-Skala (0 = kein Hunger; 9 = sehr großen Hunger) zu Beginn der Grundlinie (08:00 Uhr), 40 Minuten nach der Substanzgabe (09:40 Uhr) und unmittelbar nach dem Frühstück (10:50 Uhr) einschätzen.

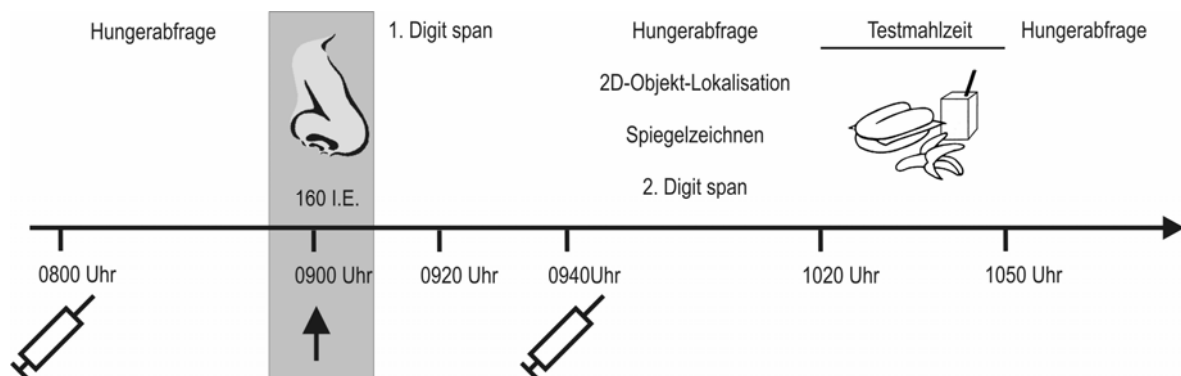


Abbildung 10. *Experimentelles Design.* Um 09:00 Uhr wurden 32 nüchternen, normalgewichtigen Probanden (14 Männer) 160 I.E. Insulin bzw. Plazebo intranasal verabreicht (Pfeil). Im Anschluss folgte eine Serie an Gedächtnistests und eine Testmahlzeit. Außerdem wurde Blut zur Bestimmung von Plasmaglukose und Hormonen abgenommen (symbolisiert durch die Spritzen) und Hungerabfragen vor und nach der Substanzgabe mit Hilfe einer 9-Punkte-Skala durchgeführt.

Kognitive Tests

Digit Span

20 Minuten und 75 Minuten nach der Substanzgabe, d.h., um 09:20 Uhr und um 10:15 Uhr, wurde die verbale Arbeitsgedächtnisfunktion des Versuchsteilnehmers durch das Zahlennachsprechen nach Wechsler (Tewes, 1994) getestet. Bei dieser Aufgabe werden dem Probanden bis zu neun Ziffern vorgelesen (eine Ziffer/Sekunde). Unmittelbar nach der Präsentation sollen die Ziffern chronologisch (Vorwärtstest) oder in umgekehrter Abfolge (Rückwärtstest) wiederholt werden. Nach jeder erfolgreichen Wiedergabe wird die Anzahl der Ziffern um jeweils eine erhöht (Vorwärtstest: maximal 9 Zahlen; Rückwärtstest: maximal 8 Zahlen). Wenn im ersten Versuch die wiedergegebene Ziffernfolge falsch ist, wird eine neue, aber gleichlange Zahlenreihe vorgetragen. Eine erneute falsche Wiedergabe führt zum Testabbruch. Korrekte Antworten im ersten Durchlauf werden mit zwei Punkten, zutreffende Wiederholungen nach der zweiten Präsentation mit einem Punkt

bewertet. Gemäß den Bestimmungen des Hamburger Wechsler Intelligenz Eignungstests (HAWIE) werden die Punkte aus dem Vorwärts- und Rückwärtstest zur Bewertung des verbalen Arbeitsgedächtnisses addiert (Maximal erreichbare Punktzahl: 28 Punkte).

2-D-Objekt-Lokalisations-Aufgabe

Die Bearbeitung dieses visuell räumliche Gedächtnistests (Illustration, siehe Abbildung 11), die im deutschen auch als Memory-Spiel bekannt ist, ist abhängig vom Medio-Temporal-Lappen inklusive des Hippokampus (Sommer *et al.* 2005). Der Test besteht aus insgesamt 15 Kartenpaaren, auf denen farbige Darstellungen alltäglicher Gegenständen

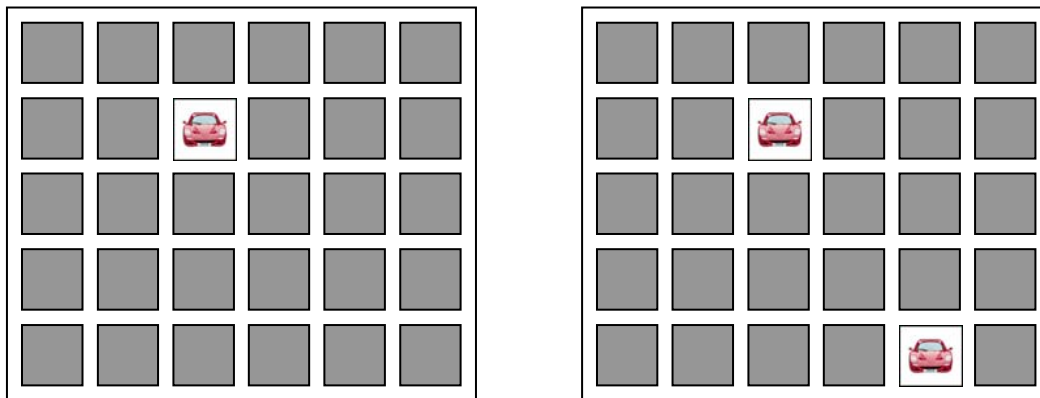


Abbildung 11. Memory-Spiel bzw. 2-D-Objekt-Lokalisations-Aufgabe

oder verschiedener Tiere abgebildet sind. Die Versuchspersonen müssen sich in diesem Test die Positionen der Kartenpaare merken, die dasselbe Motiv zeigen (intentionales Lernen). Während des Abrufs wird ihnen eine der beiden Karten gezeigt, und sie müssen den Ort der zugehörigen Karte wiedergeben (expliziter Abruf). Das Erlernen dieser Art von visuell-räumlichen Informationen wird dem deklarativen Gedächtnissystem zugeordnet und setzt eine intakte hippokampale Formation voraus. Patienten mit Schädigungen in diesen temporalen Hirnstrukturen zeigen stark gestörte Lernleistungen in visuell-räumlichen Gedächtnistests (Kessels, de Haan, Kappelle, & Postma, 2001). Gleichzeitig weisen Studien unter Verwendung der funktionellen Kernspintomographie (fMRT) auf eine mit der Lernleistung assoziierte Aktivität im Hippokampus in dieser Art von Gedächtnistests hin (Sommer, Rose, Glascher, Wolbers, & Büchel, 2005).

Spiegelzeichnen

Für die prozedurale, hippokampusunabhängige Spiegelzeichenaufgabe (Illustration, siehe Abbildung 12), die zwischen 09:50 Uhr und 10:15 Uhr stattfand, mussten die Probanden verschiedene Figuren, die nur in einem Spiegel zu sehen waren, mit einem Stift so schnell und so genau wie möglich nachzeichnen. Die Figuren bestehen aus 0.8 cm breiten Linien und erfordern jeweils 25-27 Richtungswechsel. Als Fehler zählt dabei jedes Verlassen der Linie mit dem Stift. Fehler konnten automatisch registriert werden, da der Stiftlichtsensitiv ist und die Figur von unten beleuchtet wird. Als Leistungsindikator



Abbildung 12. Spiegelzeichnen

werden Fehlerzahl und Gesamtzeit zum Nachzeichnen jeder Figur gewählt. Vor dem eigentlichen Lernen müssen die Probanden die Aufgabe an einer einfachen Figur (Stern) mindestens 6-mal üben oder vorher einen Durchgang in weniger als 60 Sekunden unter 12 Fehlern nachzeichnen. Anschließend müssen die Probanden die Testfiguren insgesamt viermal nachzeichnen. Dafür stehen zwei unterschiedliche Sets zur Verfügung, die hier in balancierter Reihenfolge verwendet wurden. Gesamtzeit und Fehlerzahl werden typischerweise über alle vier Durchgänge der Testfiguren gemittelt.

Hormon – und Glucosebestimmung

Die Blutproben wurden sofort nach der Abnahme zentrifugiert und das Plasma bei -20° Celsius aufbewahrt. Die Serumkonzentrationen von Insulin, C-Peptid und Leptin wurden

radioimmunologisch bestimmt (Insulin: Dako Cytomation, Cambridgeshire, England; Interessay-Variationskoeffizient [VK] 7.5%, Intraessay-VK 6.7%; C-Peptid: Dako Cytomation; Interessay-VK 5.2%, Intraessay-VK 4.7%; Kortisol: Enzymun-Test Kortisol, Roche Diagnostics; Interessay-VK CV <3.9%, Intraessay-VK <2.0%; Adiponektin: BioVendor GmbH, Heidelberg, Deutschland; Interessay-VK <7.3 %, Intraessay-VK <6.4 %; Leptin: Diagnostic Systems Laboratories, Sinsheim, Deutschland; Interessay-VK CV 4.4%, Intraessay-VK 3.8%). Die Plasmakonzentration von Glukose wurde im Fluoridplasma mittels Hexokinase-Methode bestimmt (Aeroset; Abbott, Wiesbaden, Deutschland).

Datenaufbereitung und Statistik

Vergleiche zwischen den Effekten von Insulin und Plazebo beruhten auf Varianzanalysen (ANOVA) mit dem Innersubjektfaktor „Behandlung“ und dem Zwischensubjektfaktor „Geschlecht“. Wo es angemessen war, wurden Behandlungseffekte separat für die Männer und Frauen bewertet. Signifikante Interaktionen wurden durch paarweise T-Tests spezifiziert. Alle Daten sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. Ein p-Wert < 0.05 gilt dabei als signifikant.

Ergebnisse

Nahrungsaufnahme und Hungergefühle

Die Analyse der Nahrungsaufnahme erbrachte eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und Geschlecht ($p < 0.02$). Die intranasale Gabe von Insulin führte zu einer Reduktion der Gesamtenergieaufnahme bei den Männern im Vergleich zu Plazebo (Insulin vs. Plazebo: 1158.81 ± 96.38 vs. 1351.38 ± 105.39 kcal; $p < 0.03$). Die Gesamtenergieaufnahme der Frauen blieb durch die intranasale Substanzgabe unverändert (Insulin vs. Plazebo: 787.12 ± 41.25 vs. 768.58 ± 44.35 kcal, $p > 0.67$, Abbildung 13A). Hinsichtlich der Nahrungsaufnahme erbrachte die ANOVA außerdem einen signifikanten Haupteffekt für das Geschlecht ($p < 0.05$). Allerdings zeigte sich im Vergleich einer männlichen und weiblichen Subgruppe (jeweils 6 Probanden), die sich nicht in ihrer Nahrungsaufnahme unterschieden ($p > 0.60$ für den Haupteffekt Geschlecht), dass der anorexigene Effekt der intranasalen Insulingabe wieder nur bei den Männern, nicht aber bei den Frauen, zu beobachten war (Insulin vs. Plazebo: Männer, vs. 889.60 ± 106.52 vs. 1087.61 ± 160.67 kcal, $P < 0.05$; Frauen, 876.27 ± 55.50 vs. 963.30 ± 22.63 kcal, $p > 0.25$).

Die subjektive Einschätzung des Hungers unterschied sich weder während der Grundlinienphase (08:00 Uhr, Insulin vs. Plazebo, 3.48 ± 0.43 vs. 3.87 ± 0.41 Punkte, $p > 0.33$), noch 45 Minuten nach der intranasalen Substanzgabe (09:45 Uhr, Insulin vs. Plazebo, 5.42 ± 0.46 vs. 5.84 ± 0.41 Punkte, $p > 0.28$) und auch nicht am Ende der Testmahlzeit (10:50 Uhr, Insulin vs. Plazebo, 0.26 ± 0.10 vs. 0.23 ± 0.09 Punkte, $p > 0.75$) zwischen den Bedingungen

Gedächtnisleistung

Die intranasale Gabe von Insulin führte zu keiner generellen Beeinflussung der Gedächtnisleistung im Rahmen des Memory-Spiels ($p < 0.49$). Allerdings erbrachte die ANOVA eine signifikante Interaktion zwischen den Faktoren Behandlung und Geschlecht ($p < 0.01$). Die Frauen erinnerten signifikant mehr Kartenpaarpositionen nach der intranasalen Insulingabe als in ihrer Plazebositzung (Insulin vs. Plazebo: 51.9 ± 5.7 vs. 39.0 ± 2.9 %; $p < 0.01$). Dagegen zeigten die Männer keinen signifikanten Behandlungseffekt (Insulin vs. Plazebo: 44.6 ± 5.9 vs. 52.3 ± 3.1 % korrekt erinnerte Kartenpaarpositionen, $p > 0.17$, Abbildung 13B). Ähnliche Ergebnisse konnten für die Bearbeitung der verbalen Arbeitsgedächtnisaufgabe beobachtet werden (Abbildung 13C, Behandlung x Geschlecht: $p < 0.03$). Die Insulinbehandlung verbesserte das verbale Arbeitsgedächtnis bei den Frauen während der zweiten Testung um 10:15 Uhr (Insulin vs. Plazebo: 20.0 ± 1.11 vs. 18.64 ± 1.28 Punkte, $p < 0.05$; Erste Testung um 09:20 Uhr: 19.0 ± 1.20 vs. 18.27 ± 0.87 Punkte, $p > 0.38$). Dagegen zeigten die Männer zu keinem Messzeitpunkt signifikante Veränderungen in ihrer verbalen Arbeitsgedächtnisleistung (Erste Testung um 09:20 Uhr: 16.4 ± 1.26 vs. 15.5 ± 0.91 Punkte, $p > 0.35$; Zweite Testung: 15.7 ± 1.17 vs. 17.2 ± 1.34 Punkte, $p > 0.20$). Die Lernleistung während des Spiegelzeichnens unterschied sich nicht zwischen der Insulin- und Plazebositzung (Insulin vs. Plazebo; Geschwindigkeit: 68.81 ± 2.28 vs. 70.84 ± 3.02 sec, $p > 0.56$; Genauigkeit: 31.41 ± 1.94 vs. 30.70 ± 3.46 Fehler, $p > 0.83$) und zeigte keine geschlechtsspezifischen Effekte ($p > 0.20$ für alle Vergleiche).

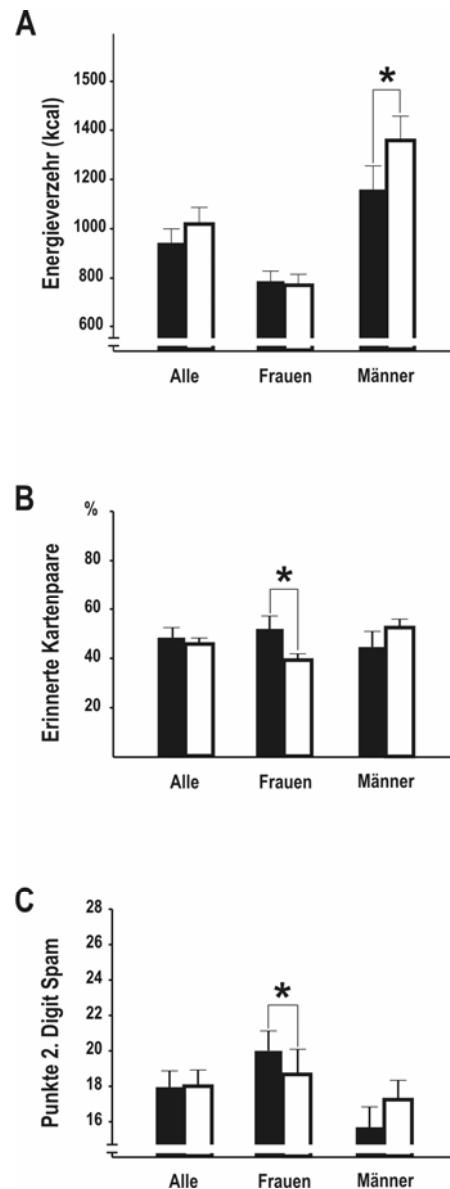


Abbildung 13. *Nahrungsaufnahme und Gedächtnisleistung nach akuter intranasaler Gabe von Insulin.* (A) Nahrungsaufnahme während eines 30-minütigen Frühstücksbuffets, welches 80 Minuten (10:20 Uhr) nach der intranasalen Gabe von 160 I.E. Insulin bzw. Placebo gestartet wurde. (B) Effekte der intranasalen Substanzgabe auf das räumliche deklarative Gedächtnis. Mit Hilfe einer 2-D-Objekt-Lokalisations-Aufgabe, bei der die Position von 15 Kartenpaaren auf einem Computerbildschirm erinnert werden mussten, wurde das deklarative Gedächtnis 45 Minuten nach der Substanzgabe überprüft. (C) Einfluss auf das verbale Arbeitsgedächtnis (Wechsler Digit Span) 75 Minuten nach der intranasalen Gabe von Insulin bzw. Placebo. Schwarze Balken = Insulin; weiße Balken = Placebo. Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. P-Werte < 0.05 sind als Sternchen angezeigt.

Plasmaglukose und Hormone

Die Blutparameter zeigten keine Unterschiede während der Grundlinienphase ($p > 0.16$ für alle Vergleiche). Keiner der Parameter war im Rahmen der Behandlung durch das Geschlecht beeinflusst (Behandlung \times Geschlecht \times Zeit, $p > 0.36$, für alle Vergleiche).

Sowohl die Plasmaglukose als auch das C-Peptid unterlagen einer signifikanten Interaktion zwischen den Faktoren Zeit und Behandlung ($p < 0.004$ bzw. $p < 0.05$; siehe Tabelle 6).

Tabelle 6. Plasmaglukose und Hormonkonzentrationen im Blut 60 Minuten vor (Grundlinie) und 45 Minuten nach der intranasalen Gabe (Behandlung) von 160 I.E. Insulin bzw. Plazebo

Parameter	Insulin	Plazebo	ANOVA Behandlung x Zeit
Glucose im Plasma (mmol/l)			
Grundlinie	4.66 ± 0.05	4.78 ± 0.07	0.004
Behandlung	4.42 ± 0.07**	4.72 ± 0.04	
Insulin im Serum (pmol/l)			
Grundlinie	47.70 ± 4.08	47.52 ± 4.74	0.98
Behandlung	46.86 ± 4.44	46.80 ± 5.7	
C-Peptid im Serum (nmol/l)			
Grundlinie	0.49 ± 0.03	0.51 ± 0.03	0.05
Behandlung	0.40 ± 0.02 *	0.53 ± 0.06	
Leptin im Serum (ng/ml)			
Grundlinie	5.39 ± 1.15	5.68 ± 1.20	0.38
Behandlung	4.08 ± 0.80	4.85 ± 1.25	
Adiponektin im Serum (µg/ml)			
Grundlinie	12.51 ± 1.24	13.43 ± 1.46	0.64
Behandlung	13.11 ± 1.64	13.27 ± 1.64	
Kortisol (nmol/l)			
Grundlinie	703.27 ± 54.63	657.75 ± 48.28	0.87
Behandlung	541.87 ± 56.84	484.76 ± 61.25	

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. Signifikante Unterschiede sind angezeigt (paarweise T-Tests; * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$). Es bleibt zu beachten, dass es keine signifikanten Interaktionen zwischen dem Faktoren Geschlecht, Behandlung und Zeit für irgendeinen Parameter gab ($P > 0.36$, für alle Vergleiche).

Allerdings zeigten Kovarianz-Analysen (Kovariate: Glukose-Werte nach der Insulinbehandlung), dass die oben beschriebenen Effekte der intranasalen Insulinbehandlung auf die Nahrungsaufnahme und die Gedächtnisleistung trotz der Senkung des Blutzuckers Bestand hatten. Die Blutkonzentrationen von Insulin, Kortisol, Leptin und Adiponektin wurden durch das intranasale Insulin nicht verändert (Tabelle 7).

Diskussion

Durch die akute intranasale Gabe von Insulin kam es zu einer Reduktion der Gesamtenergieaufnahme, die auf die männlichen Versuchspersonen beschränkt war. Im Gegensatz dazu war die Steigerung von hippocampal-präfrontalen Gedächtnisfunktionen ausschließlich bei den Frauen festzustellen. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung von Insulin für die zentralnervöse Kontrolle der Nahrungsaufnahme und die Gedächtnisbildung beim Menschen. Zusätzlich zeigt dieser Versuch, dass das Geschlecht die Intensität der Effekte einer akuten Insulingabe auf Hirnfunktionen determiniert.

Obwohl bisherige Studien keinen Einfluss von intranasalem Insulin auf die Plasmaglukosekonzentration gefunden haben (Hallschmid *et al.* 2004b; Born *et al.* 2002; Kern *et al.* 1999), kam es in diesem Experiment zu einer geringfügigen, aber dennoch signifikanten Senkung der Blutzuckers, die innerhalb des euglykämischen Bereiches lag. Es ist zu beachten, dass die intranasale Dosis von 160 I.E. Humaninsulin, die hier zur Anwendung kam, deutlich höher liegt als die der bisherigen transnasalen Studien (40 I.E.). Daher ist es denkbar, dass ein kleiner Anteil des intranasal applizierten Insulins über das Nasenepithel in den Blutkreislauf penetriert ist. Dieser Übertritt von Insulin in die Zirkulation könnte, wie durch die fallenden C-Peptid-Werte angedeutet, eine Kompensation der endogenen Insulinsekretion nach sich gezogen haben. Ebenso könnte die hier beobachtete Senkung des Blutzuckers durch die Wirkung von zentralnervösem Insulin auf neuronale Bezirke, die die endogene Glukoseproduktion kontrollieren und regulieren, bedingt sein (Pocai *et al.* 2005). Allerdings deuten die Ergebnisse der Kovarianz-Analyse an, dass die Effekte von Insulin auf die Nahrungsaufnahme und die Gedächtnisleistung durch den geringen Abfall der Plasmaglukosekonzentration unbeeinflusst waren. Die unveränderten Blutwerte von Kortisol, Adiponektin und Leptin sprechen auch gegen eine periphere Vermittlung der Insulineffekte.

Die akute intranasale Gabe von Insulin verbesserte die deklarative Gedächtnisfunktion bei den Frauen. Im Gegensatz dazu kam es im *Experiment II* und *III* (siehe unten) zu keiner Veränderung der deklarativen Gedächtnisleistung durch eine akute intranasale Insulinapplikation. Angesichts der deutlich höheren Dosis an Insulin, die hier verabreicht wurde, ist es denkbar, dass Insulin unter akuten Bedingungen erst bei höheren Dosen effektiv das deklarative Gedächtnis von gesunden Menschen fördert. Die These wird auch durch Befunde anderer Autoren gestützt. So führt die intravenöse Gabe von Insulin eher bei hohen und weniger bei geringen Dosen zu einer Verbesserung

hippokampusabhängiger Gedächtnisfunktionen (Kern, 2001}. Allerdings gibt es auch Studien, die eher bei niedrigen als bei hohen Dosen verbesserte deklarative Gedächtnisfunktionen beobachten konnten (Reger *et al.* 2005). Es könnte ebenso sein, dass die räumliche Lernaufgabe geeigneter als die in *Experiment II* und *III* eingesetzte verbale Lernaufgabe ist (siehe unten), um Effekte von Insulin auf das deklarative Gedächtnis zu erfassen. Zusätzlich konnte in diesem Experiment gezeigt werden, dass intranasales Insulin das verbale Arbeitsgedächtnis beim Menschen verbessert. Die Verarbeitung dieser Aufgabe beruht hauptsächlich auf einer Aktivierung von frontalen Kortexregionen, die sich durch eine hohe Dichte an Insulinrezeptoren auszeichnen (Unger *et al.* 1991).

Insulin scheint unter akuten Bedingungen präfrontal-hippokampale Funktionen, die maßgeblich an Prozessen des Lernens und des Abrufs von deklarativen Gedächtnisinhalten beteiligt sind (Tulving *et al.* 1994), bei Frauen zu verstärken. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Bedeutung des Insulins für neurokognitive Effekte unter akuten Bedingungen durch das Geschlecht beeinflusst wird. Die Mechanismen, die diesem Geschlechtsunterschied zugrunde liegen, können durch dieses Experiment nicht geklärt werden. Es ist denkbar, dass zentralnervöses Insulin durch ein Zusammenspiel mit Östrogen die Gedächtnisverarbeitung verbessert. Östrogen fördert die Gedächtnisverarbeitung auf verschiedenen Ebenen (Krug *et al.* 2006). Diese Effekte auf die Gedächtnisfunktionen scheinen dabei durch eine Interaktion mit neuroprotektiven Signalen wie dem IGF zurück zu führen sein (Quesada and Micevych, 2004). Bisherige Studien konnten nachweisen, dass Östrogen die Expression von neuronalen IGF-1-Rezeptoren erhöht. Das IGF-1-System vermittelt neuroprotektive, -modulatorische und – trophische Effekte im zentralnervösen System (Davila *et al.* 2007). Dabei werden die IGF-1-Rezeptoren nicht nur durch IGF-1 selbst, sondern auch mit einer vergleichsweise geringeren Bindungsaffinität durch Insulin aktiviert (Blakesley *et al.* 1996). Somit ist es vorstellbar, dass die akute intranasale Gabe des Hormons über das zentralnervöse IGF-System zu einer Verstärkung der präfrontal-hippokampalen Gedächtnisverarbeitung geführt hat. Die gesteigerte Expression von zentralnervösen Insulinrezeptoren durch Östrogen könnte ebenso zu diesem Geschlechtsunterschied beigetragen haben (Xu *et al.* 2007). Zukünftige Studien sollten daher untersuchen, inwiefern der verbessernde Effekt von Insulin auf die Gedächtnisverarbeitung von zentralnervösen Wirkungen des Östrogens abhängt. Außerdem ist zu beachten, dass die Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses nach achtwöchiger intranasaler Behandlung mit Insulin geschlechtsübergreifend zu

beobachten ist (siehe auch *Experiment II*). Längere Behandlungsphasen mit dem Hormon scheinen solche Prozesse zu fördern, die unabhängig vom Geschlecht neuronale Plastizität und Konnektivität begünstigen (Zhao and Alkon, 2001).

Die intranasale Gabe von Insulin führte nur bei den Männern zu einer Abnahme der Gesamtenergieaufnahme. Dieses Ergebnis deutet an, dass Männer empfindlicher auf die anorexigene Wirkung des Hormons reagieren als Frauen. Im Rattenmodell führt die izv. Gabe von Insulin zu einer Abnahme der 24-stündigen Nahrungsaufnahme bei den männlichen Tieren. Im Gegensatz dazu sprachen die weiblichen Tiere eher auf die anorexigene Wirkung von izv. Leptin an (Clegg *et al.* 2003). Darauf aufbauende Untersuchungen deckten auf, dass die Ansprechbarkeit auf die anorexigene Wirkung von zentralnervösem Insulin bzw. Leptin durch die Gonadenhormone determiniert wird (Clegg *et al.* 2006). In einer von unserer Arbeitsgruppe durchgeführten Studie konnten wir zeigen, dass eine achtwöchige intranasale Behandlung mit Insulin das Körpergewicht und die Körperfettmasse nur bei Männern reduziert. Die akute Reduktion der Energieaufnahme von ~ 200 kcal, die in diesem Experiment beobachtet wurde, würde, auf 8 Wochen hochgerechnet, zu einem ähnlichen Verlust an Körperfett führen, wie er in der Langzeit-Studie bei den Männern beobachtet wurde (Hallschmid *et al.* 2004b). Da der von den Probanden empfundene Hunger nicht durch die Insulingabe beeinflusst war, scheint Insulin seine anorexigene Wirkung über eine Interaktion mit kurzzeitigen Sättigungssignalen, und nicht über die Hungermotivation per se, zu vermitteln. Tatsächlich zeigen bisherige Arbeiten, dass zentralnervöses Insulin die Wirkung von Sättigungssignalen wie dem Cholezystokinin im ZNS verstärkt und darüber seine anorexigene Wirkung entfaltet (Riedy *et al.* 1995). Die reduzierte Nahrungsaufnahme nach intranasaler Insulingabe könnte auch dadurch bedingt sein, dass zentralnervöses Insulin die Freisetzung der orexigenen Neuropeptide NPY und AgRP hemmt und gleichzeitig die Bildung vom anorexigenen Alpha-MSH im ZNS stimuliert (Schwartz *et al.* 2000).

Zusammenfassend liefern die Ergebnisse des *Experimentes I* den ersten Beweis, dass das Adipositassignal Insulin maßgeblich in die akute Kontrolle der Nahrungsaufnahme beim Menschen eingebunden ist. Dieser Effekt ist höchstwahrscheinlich auf eine Interaktion von zentralnervösem Insulin mit kurzzeitigen Sättigungssignalen zurückzuführen. Weiterhin konnte diese Studie zeigen, dass die präfrontal-hippokampalen Gedächtnisverarbeitung durch Insulin gefördert wird. Ein entscheidender Faktor, der mit den akuten zentralnervösen Funktionen des Insulins im Zusammenhang steht, ist das Geschlecht.

Experiment II: Intranasales Insulin verbessert das deklarative Gedächtnis beim Menschen

Publiziert in: 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.

Hintergrund

Wie in der Einführung bereits beschrieben, spielt Insulin nicht nur eine wichtige Rolle im Rahmen der peripheren Blutzuckerhomöostase, sondern auch für unterschiedliche zentralnervöse Funktionen. Soweit sind zwei Hauptfunktionen für das Insulin im Gehirn eingehender beschrieben. Einerseits wirkt Insulin auf hypothalamische Strukturen, die an der Körpergewichts- und Nahrungsregulation beteiligt sind (Porte, Jr. and Woods, 1981), und andererseits begünstigt es die Bildung von deklarativen Gedächtnisinhalten (Marfaing *et al.* 1990; Park *et al.* 2000; Kern *et al.* 2001). Die Wirkung des Insulins auf das Gedächtnis wird dabei durch die zahlreichen Insulinrezeptoren im Bereich des Hippokampus und assoziierter limbischer Gehirnstrukturen vermittelt (Unger *et al.* 1991; Lannert and Hoyer, 1998). Diese Hirnregionen sind essentiell für die Bildung von deklarativem Gedächtnis (Squire and Zola, 1996). Dass Insulin deklarative Gedächtnisprozesse moduliert, konnte sowohl in Tier- als auch in Humanstudien nachgewiesen werden. So zeigen Ratten im Rahmen einer räumlichen Stressaufgabe nach *izv.* Gabe von Insulin ein besseres hippocampusabhängiges Vermeidungsverhalten (Park *et al.* 2000). Analog dazu führt eine intravenöse Infusion von Insulin beim Menschen zu einer Verbesserung des verbalen deklarativen Gedächtnisses (Kern *et al.* 2001). Allerdings ist die Infusion von Insulin in den Blutkreislauf aufgrund von zahlreichen Nebenwirkungen (Kern *et al.* 2000; Fruehwald-Schultes *et al.* 1999) ungeeignet, um Langzeiteffekte des Insulins auf das deklarative Gedächtnis beim Menschen zu untersuchen. Eine Methode, die diese Nebenwirkungen unterbindet und sich daher besonders für die Erforschung der psychophysiologischen Funktion von Insulin eignet, ist die intranasale Applikation (Born *et al.* 2002). Dieses Verfahren ermöglicht Substanzen wie Insulin die Aufnahme in den Liquor cerebrospinalis (Illum, 2000). Da das deklarative Gedächtnis nach intravenöser Infusion von Insulin verbessert ist und der Hippokampus, der für diese Prozesse essentiell ist, zahlreiche Insulinrezeptoren aufweist (Havrankova *et al.* 1978), wurde in diesem

Experiment angenommen, dass die Bearbeitung einer verbalen hippocampusabhängigen Lernaufgabe durch eine mehrwöchige intranasale Behandlung mit Insulin erleichtert wird. Außerdem wurde erwartet, dass die intranasale Insulingabe, ähnlich wie zuvor in Menschen nach intravenöser Insulingabe gezeigt (Kern *et al.* 2001), eine positive Wirkung auf die allgemeine Stimmungslage beim Menschen ausübt.

Methoden

Probanden

38 normalgewichtige Studenten (BMI: 19 bis 25 kg/m²; darunter 14 Frauen), die zwischen 18 und 34 Jahre alt waren, nahmen an dieser Studie teil. Die Gesundheit der Studenten wurde durch körperliche Untersuchungen und ein Anamnese-Gespräch vor Beginn der Studie sichergestellt.

Experimenteller Ablauf

Die Probanden wurden randomisiert in zwei Gruppen aufgeteilt (jede enthielt 12 Männer und 7 Frauen), die bezüglich des Alter (Insulin: 25.26 ± 1.21 Jahre, Plazebo: 25.63 ± 1.25 Jahre) und des BMIs (Insulin: 22.6 ± 0.3 kg/m², Plazebo: 22.7 ± 0.4 kg/m²) vergleichbar waren. Während einer zweiwöchigen Einstellphase erhielten alle Probanden Plazebo. In der darauf unmittelbar folgenden achtwöchigen Behandlungsphase setzte eine Gruppe die Gabe von Plazebo fort, während der anderen Gruppe Insulin zugeteilt wurde. Die Probanden mussten das Nasenspray am Morgen, am Mittag, am Abend und unmittelbar vor dem Schlafen anwenden. Zu jedem Zeitpunkt wurden mit insgesamt vier Hüben 0.4 ml Insulin (= 40 IU; Insulin Actrapid® HM, Novo Nordisk, Mainz, Deutschland) oder Plazebo (HOE 31 Lösungspuffer für Humaninsulin, Aventis Pharma, Bad Soden, Deutschland) intranasal appliziert (zwei Hübe pro Nasenloch). Somit belief sich die täglich applizierte Menge auf 1.6 ml Insulin (= 160 IU) oder Plazebo. Das Nasenspray wurde zwischen den Einnahmen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und im Rahmen der wöchentlich stattfindenden Untersuchung durch ein neu befülltes Fläschchen ersetzt. Ebenso mussten die Probanden die tägliche Anwendung protokollieren. Um die Zuverlässigkeit zu erhöhen wurde allen Teilnehmern suggeriert, dass die regelmäßige Anwendung der Nasensprays durch Messung spezieller Metabolite aus dem Urin, der zwischen den Sitzungen zu sammeln war, nachvollziehbar wäre.

Die Hauptsitzungen („Sofortabfrage“), die zur Testung von Insulineffekten auf die Lern- und Abruffunktion von Gedächtnisinhalten dienten, wurden immer um 08:00 Uhr am Morgen durchgeführt. Sie fanden zu Beginn der Einstellphase (Sitzung A), zum Start der Behandlungsphase und eine Woche vor dem Ende der Behandlungsphase (Sitzung B bzw. C) statt (Abbildung 4A) statt. Um die generelle Gedächtnisperformanz in beiden Gruppen erfassen zu können, wurde 60 Minuten nach der ersten intranasalen Gabe von Placebo eine Reihe von unterschiedlichen Gedächtnistests während der Sitzung A durchgeführt. Die Sitzung B diente der Erfassung von akuten Insulineffekten auf das Gedächtnis. Die Gedächtnistests wurden 60 Minuten nach der ersten Insulingabe durchgeführt. Die Langzeiteffekte von Insulin auf die Lern- und Abruffunktion wurden eine Woche vor dem Ende der Behandlungsphase (d.h., nach 7 Wochen) erhoben. In dieser Sitzung C bekamen alle Teilnehmer 60 Minuten vor der Durchführung der Gedächtnistests Placebo, um akute Einflüsse von Insulin auf das Gedächtnis auszuschließen. Das Langzeitgedächtnis bzw. die Konsolidierungsfähigkeit wurde jeweils eine Woche nach den Hauptsitzungen im Rahmen einer Spätabfrage geprüft. In und vor diesen Sitzungen wurde kein Insulinspray appliziert.

Hormon – und Glucosebestimmung

Für die Messung von Kortisol (Kortisol-RIA, DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Germany), Insulin (Pharmacia Insulin RIA100, Pharmacia & Upjohn, Inc., Uppsala, Sweden) und Plasmaglukose (Hexokinase-Methode, Abbott, Wiesbaden) wurde wöchentlich Blut abgenommen. Zusätzlich mussten die Probanden von 20:00 Uhr am Vortag bis 08:00 Uhr des Untersuchungstages 12-Stunden-Urin sammeln. Aus diesem wurde dann mittels einer Hochflüssigkeitschromatographie Adrenalin und Noradrenalin gemessen (Watches Co., Milford, MA).

Kognitive Tests und Befindlichkeitsmessung

Wortliste

Das deklarative Gedächtnis wurde mit Wortlisten (Fruehwald-Schultes *et al.* 2000; Kern *et al.* 2001), die jeweils 30 Wörter enthielten, getestet. Die Reihenfolge dieser standardisierten Listen wurde über alle Probanden ausbalanciert. Während der Hauptsitzungen wurden die Wörter in einem 1-Sekunden-Takt vom Versuchsleiter vorgetragen. Drei Minuten nach dem Ende der Präsentation schrieben die Probanden innerhalb von 90 Sekunden alle Wörter auf, die sie noch erinnerten. Eine Woche danach mussten die Probanden alle Wörter, die ihnen noch im Gedächtnis geblieben waren,

aufschreiben. Sowohl die Anzahl an korrekt erinnerten sowie die Anzahl an falsch erinnerten Wörtern wurden dabei dokumentiert.

Wordstem priming

Zweck dieses Tests ist es, das nondeklarative Gedächtnis zu prüfen (Plihal and Born, 1999). Er basiert auf zwei verschiedenen Listen von Worten, von denen die Erste dazu dient, das nondeklarative Lernen anzuregen („bekannte Liste“). Die darauf folgende Liste beinhaltet andere Worte, die nicht präsentiert werden und so dem Probanden unbekannt bleiben („unbekannte Liste“). Jede Liste besteht aus 52 Substantiven, die nach Länge, Emotionalität, Bedeutung und Greifbarkeit vergleichbar sind. Zum Testen des nondeklarativen Gedächtnisses sollte der Proband die erste („bekannte“) Liste mit der Instruktion bearbeiten, die Worte nach ihrem Klang zu beurteilen und auf einer Fünf-Punkte-Skala (von 1 = unangenehm bis 5 = angenehm) zu bewerten. Direkt im Anschluss erhielt der Proband eine Liste mit 52 Wortstämmen, die jeweils aus zwei Buchstaben bestehen. 26 Wortstämme waren Anfangsbuchstaben der bekannten und zuvor nach ihrem Klang beurteilten Worte und 26 entstammten den Substantiven der unbekannt List. Somit war die Versuchsperson mit der Hälfte der Wortanfänge bereits implizit vertraut, hingegen war die andere Hälfte komplett neu. Der Versuchsteilnehmer sollte die Wortstämme zu dem Substantiv vervollständigen, das ihm als erstes in den Sinn kam. Die zu beurteilende Größe war der zahlenmäßige Unterschied der Wortanfänge, die zu Worten aus der bekannten bzw. der unbekannt List ergänzt wurden. Zur Auswertung wurden die Differenzen aus korrekt und zufällig ergänzten Wortanfängen zwischen beiden Gruppen verglichen. Es gab mehrere Parallelversionen dieses Tests, die in ihrer Reihenfolge über alle Probanden ausbalanciert waren.

Stroop-Test

Der Stroop-Test wurde in dieser Studie durchgeführt um den Einfluss der intranasalen Insulinapplikation auf die selektive Aufmerksamkeit einzuschätzen. Er bestand aus den folgenden drei Teilen: dem Wort-Lese-Subtest, dem Farben-Benennungs-Subtest und dem Interferenz-Subtest. Zuerst bekommt der Versuchsteilnehmer ein Blatt, auf dem mit schwarzer Tinte gedruckte Farbworte (rot, grün, gelb und blau) in randomisierter Reihenfolge zu lesen sind. Der Proband muss diese Farbwörter innerhalb von 45 Sekunden möglichst schnell und fehlerfrei vorlesen. Im folgenden Farben-Benennungs-Subtest wird der Proband gebeten, Farben (rot, grün, gelb und blau), die in Form von Kreuzen (X) mit

farbiger Tinte auf ein anderes Blatt gedruckt waren, innerhalb von 45 Sekunden möglichst schnell und fehlerfrei zu benennen. Der Interferenz-Subtest dient der Überprüfung der selektiven Aufmerksamkeit (Golden, 1975). Hier sind die Wörter rot, grün, gelb und blau in farbiger Tinte dargestellt. Allerdings entspricht das geschriebene Wort nicht der Farbe der Tinte, in der es gedruckt ist (z.B. Wort Grün in roter Tinte). Ziel ist es, die jeweilige Farbe eines Wortes zu nennen, nicht aber das Wort selbst vorzulesen. Auch hier wird die Zeit nach 45 Sekunden gestoppt. Bei allen Tests wird die absolute Anzahl an richtigen Antworten zur Auswertung genutzt.

Eigenschaftswörterliste (EWL-N)

Bei diesem Test, der am Ende von Sitzung A, B und C durchgeführt wurde, handelt es sich um eine 161 Adjektive umfassende Liste, die zur mehrdimensionalen Einschätzung des aktuellen Befindens dient. Dabei soll der Proband einschätzen, ob die einzelnen Eigenschaften gegenwärtig für ihn zutreffend sind oder nicht. Zur Beurteilung lassen sich die Adjektive in 15 verschiedene Befindlichkeitskategorien einteilen (Aktiviertheit; Konzentriertheit; Desaktiviertheit; Müdigkeit; Benommenheit; Extrovertiertheit; Introvertiertheit; Selbstsicherheit; Wohlbefinden; Erregtheit; Empfindlichkeit; Ärger; Ängstlichkeit; Deprimiertheit und Verträumtheit). Für die Auswertung jeder Kategorie wird die Anzahl der „trifft zu“-Antworten gezählt.

Datenaufbereitung und Statistik

Die statistische Auswertung beruhte auf einer Kovarianz-Analyse (ANCOVA) mit den Zwischensubjekt-Faktoren Behandlung und Geschlecht. Die Werte der Hauptsitzungen und der Spätabfragen, die während der Grundlinie erhoben wurden, dienten als Kovariaten. Im Fall, dass die ANCOVA eine signifikante Interaktion der Faktoren Behandlung und Geschlecht ergab, wurden die Werte getrennt nach dem Geschlecht verglichen. Ein p-Wert <0.05 galt als signifikant.

Ergebnisse

Hormone und Glukose

Die durchschnittlichen Plasmakonzentrationen von Insulin (Insulin vs. Plazebo: 10.84 ± 1.31 vs. 9.83 ± 1.36 IU/ml, nicht-signifikant, ns) und Glukose (Insulin vs. Plazebo: 84.26 ± 0.8 vs. 86.12 ± 0.78 mg/dl; ns; Abbildung 4B) waren über die achtwöchige

Behandlungsphase statistisch zwischen den Gruppen vergleichbar. Die im Urin gemessenen Konzentrationen von Adrenalin (Insulin vs. Plazebo: 7.47 ± 0.71 vs. $6.66 \pm 0.66 \mu\text{g/l}$; ns) und Noradrenalin (Insulin vs. Plazebo: 18.91 ± 2.91 vs. $20.56 \pm 2.75 \mu\text{g/l}$; ns) waren ebenfalls unverändert. Die Serumkonzentration von Kortisol war während der ganzen Behandlungsphase innerhalb der Insulingruppe niedriger als in der Plazebogruppe, wobei die Abnahme erst nach acht Wochen signifikant wurde (Insulin vs. Plazebo: 14.03 ± 0.92 vs. $18.15 \pm 1.76 \mu\text{g/dl}$; $p < 0.05$; Abbildung 4C).

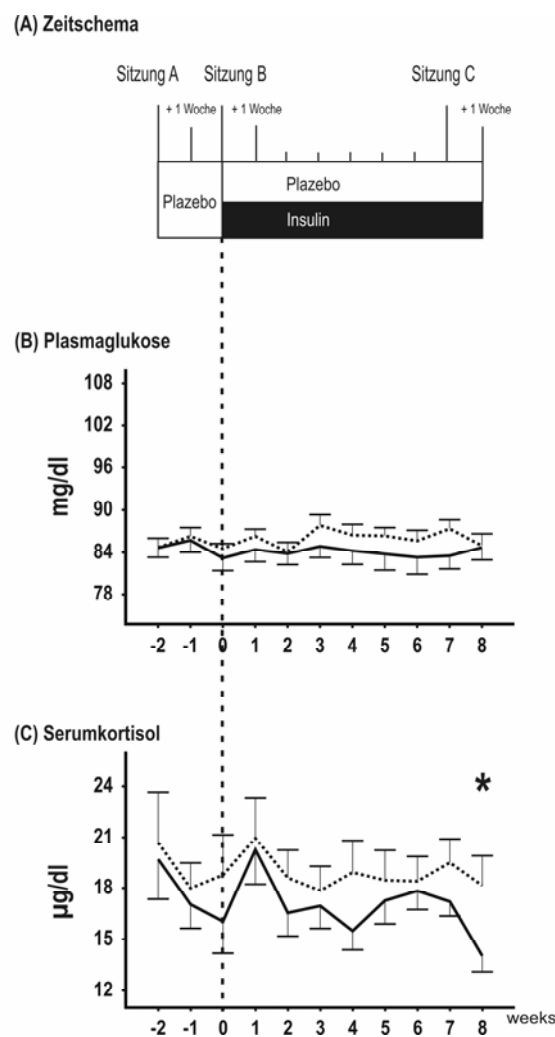


Abbildung 4. (A) Zwei Gruppen mit je 19 Probanden (sieben Frauen) wurden für zwei Wochen mit Plazebo vorbehandelt. Danach setzte eine Gruppe die intranasale Behandlung mit Insulin fort. Das Insulin wurde viermal pro Tag appliziert (160 I.E. Insulin/Tag). Die experimentellen Hauptsitzungen, in denen u.a. die Wortlisten gelernt und sofort abgefragt wurden, fanden zu Beginn der Studie (A), nach der ersten intranasalen Insulingabe (B) und nach der siebten Woche der Behandlungsphase (C) statt. Die Spätabfragen der Wortlisten wurden eine Woche nach der jeweiligen Hauptsitzung durchgeführt (A + 1 Woche, B + 1 Woche und C + 1 Woche). Plasmaglukose- und Serumkortisolwerte (B bzw. C; Mittelwert \pm SF) vor und nach der achtwöchigen intranasalen Behandlung mit Insulin (4 x 40 I.E./Tag) oder Plazebo. Das Blut wurde einmal die Woche zwischen 08:00 und 09:00 Uhr abgenommen. Die Werte sind mit Hilfe einer Kovarianz-Analyse korrigiert für die Werte der Einstellphasephase. $P < 0.05$ galt als signifikant.

Wortliste, Wordstem priming und Stroop-Test

Die Ergebnisse der deklarativen Wort-Lernaufgabe sind in Abbildung 5 zusammengefasst. Die Langzeit-Behandlung mit Insulin führte dazu, dass die Insulingruppe im Vergleich zur Placebogruppe signifikant mehr Wörter in der Spätabfrage, die eine Woche nach der Sitzung C durchgeführt wurde, erinnern konnte. Im Gegensatz dazu war die Anzahl richtig erinnelter Wörter im Rahmen der Sofortabfragen, die nach akuter bzw. nach subchronischer Insulinbehandlung durchgeführt wurden, nicht signifikant verändert.

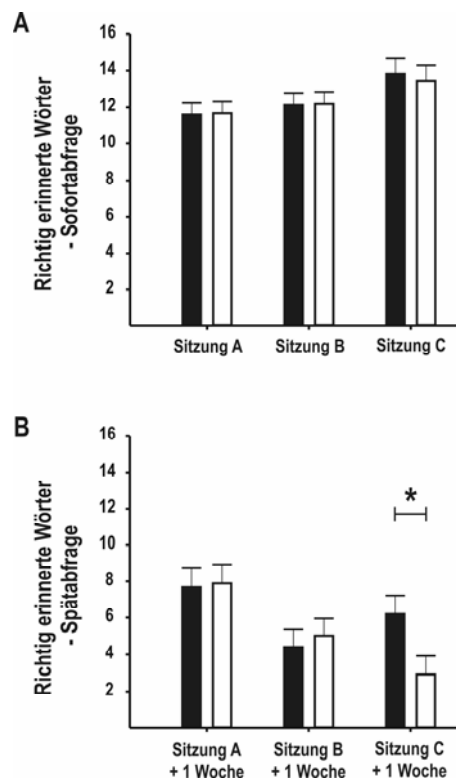


Abbildung 5. Akute und subchronische Effekte von intranasal appliziertem Insulin auf die Wortmerkfähigkeit unmittelbar nach der Präsentation einer Wortliste und eine Woche später. Einstellphase - Während der zweiwöchigen Einstellphase bekamen die Insulin (schwarz)- und Placebogruppe (weiß) Placebo. Nach der ersten intranasalen Gabe von Placebo wurde eine 30 Wörter umfassende Liste gelernt, die 3 Minuten nach der Präsentation abgefragt wurde (A). Eine Woche später wurde die Liste nochmals im Rahmen einer Spätabfrage vom Probanden wiedergegeben (A + 1 Woche). Akuteffekte - Um die unmittelbaren Effekte von Insulin auf das verbale deklarative Gedächtnis zu testen, wurde eine Wortliste nach der ersten intranasalen Gabe von 40 I.E. Humaninsulin bzw. Placebo gelernt und analog zur Einstellphase sofort (B) oder eine Woche später (B + 1 Woche) abgefragt. Langzeiteffekte- Nach siebenwöchiger intranasaler Behandlung mit Insulin (4 x 40 I.E./Tag) oder Placebo wurde wieder eine Wortliste präsentiert, die 3 Minuten nach der Präsentation (C) und eine Woche später (C + 1 Woche) abgefragt wurde. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt und mit Hilfe einer Kovarianz-Analyse für die Werte der Einstellphasephase korrigiert. $P < 0.05$ galt als signifikant.

Das nondeklarative Leistungsvermögen im Rahmen der „Wordstem-Priming“- Aufgabe war weder nach akuter (Insulin vs. Placebo: 4.98 ± 0.55 vs. 4.65 ± 0.55 Wörter; ns) noch nach subchronischer Insulinbehandlung (Insulin vs. Placebo: 4.25 ± 0.53 vs. 3.88 ± 0.50 Wörter; ns) signifikant verändert. Gleichermäßen gab es auf keiner Ebene des Stroop-Tests Leistungsunterschiede zwischen den Behandlungsgruppen (Tabelle 1). Weitere statistische Analysen ergaben keine geschlechtsspezifischen Unterschiede in den einzelnen Gedächtnistests ($p > 0.25$ für alle entsprechende Behandlung x Geschlecht- Interaktionen).

Tabelle 1 . Anzahl richtiger Antworten in den Stroop-Subtests nach akuter bzw. nach siebenwöchiger intranasaler Insulingabe

		Insulin	Plazebo	P-Wert
Wörter	Akuteffekte	102 ± 1.21	103 ± 1.15	0.47
	Langzeiteffekte	103 ± 1.71	105 ± 1.71	0.42
Farben	Akuteffekte	89 ± 2.10	89 ± 1.98	0.97
	Langzeiteffekte	87 ± 2.76	82 ± 2.76	0.28
Interferenzen	Akuteffekte	66 ± 2.19	63 ± 2.07	0.24
	Langzeiteffekte	60 ± 2.16	58 ± 2.16	0.68

Die Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler dargestellt. Alle Ergebnisse sind mit Hilfe einer Kovarianz-Analyse für die Messwerte der Einstellphase (A) korrigiert.

Eigenschaftswörterliste

Die Ergebnisse der Eigenschaftswörterliste sind in Tabelle 2 aufgeführt. Die akute intranasale Insulinapplikation steigerte die Anzahl der „trifft zu“ - Antworten für die Stimmungskategorien Wohlbefinden und Selbstsicherheit. Gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der „trifft zu“ - Antworten für die Kategorie Ärger. Außerdem steigerte sich durch die akute intranasale Insulingabe die Anzahl der „trifft zu“ - Antworten für die Kategorie Extrovertiertheit bei den männlichen (Insulin vs. Placebo: 6.09 ± 0.52 vs. 3.99 ± 0.52 „trifft zu“ - Antworten; $p < 0,01$), nicht aber bei den weiblichen Versuchsteilnehmern (Insulin vs. Placebo: 3.32 ± 1.03 vs. 4.58 ± 0.94 „trifft zu“ - Antworten; ns; $p < 0.05$ für Behandlung x Geschlecht). Nach achtwöchiger intranasaler Behandlung mit Insulin nahmen die „trifft zu“ - Antworten für die Kategorien Wohlbefinden, Selbstsicherheit und Extrovertiertheit im Vergleich mit der Placebogruppe signifikant zu. Außerdem wurden weniger „trifft zu“ – Antworten für die Kategorie Deprimiertheit nach achtwöchiger

Insulinbehandlung gegeben. Im Gegensatz zur akuten Sitzung kam es nach Abschluss der Behandlungsphase zu keiner signifikanten „Behandlung x Geschlecht“ – Interaktion.

Am Ende der Behandlungsphase gaben vier Probanden der Insulingruppe bzw. fünf Probanden der Plazebogruppe an, dass sie mit Insulin behandelt worden wären. Somit kann ausgeschlossen werden, dass die Substanzen sich für die Probanden bemerkbar unterschieden haben.

Tabelle 2. Akute und subchronische Effekte einer intranasalen Behandlung mit Insulin oder Plazebo auf die Stimmungslage unterteilt in 15 verschiedene Kategorien.

	Insulin	Plazebo	P-Wert
	Mittelwert ± Standardfehler	Mittelwert ± Standardfehler	
Akuteffekte			
Aktiviertheit	7.67 ± 0.99	6.10 ± 0.96	ns
Konzentriertheit	3.52 ± 0.39	3.51 ± 0.38	ns
Desaktiviertheit	4.81 ± 1.01	5.86 ± 0.98	ns
Müdigkeit	2.23 ± 0.47	2.52 ± 0.46	ns
Benommenheit	0.98 ± 0.25	1.02 ± 0.24	ns
Extravertiertheit	5.21 ± 0.50	4.17 ± 0.48	ns
Introvertiertheit	1.35 ± 0.51	1.62 ± 0.50	ns
Selbstsicherheit	4.56 ± 0.51	3.05 ± 0.49	0.04
Stimmung	9.30 ± 0.92	6.03 ± 0.89	0.02
Erregtheit	1.63 ± 0.35	1.88 ± 0.34	ns
Empfindlichkeit	0.88 ± 0.15	0.75 ± 0.15	ns
Ärger	-0.02 ± 0.20	0.76 ± 0.19	0.01
Ängstlichkeit	0.49 ± 0.12	0.43 ± 0.12	ns
Deprimiertheit	1.14 ± 0.53	2.08 ± 0.51	ns
Verträumtheit	3.24 ± 0.45	2.98 ± 0.43	ns
Langzeiteffekte			
Aktiviertheit	7.87 ± 1.23	6.28 ± 1.17	ns
Konzentriertheit	3.78 ± 0.41	3.36 ± 0.39	ns
Desaktiviertheit	3,95 ± 1.15	5.36 ± 1.08	ns
Müdigkeit	2.58 ± 0.51	2.48 ± 0.48	ns
Benommenheit	0.90 ± 0.28	1.40 ± 0.26	ns
Extravertiertheit	5.53 ± 0.43	3.84 ± 0.41	0.01
Introvertiertheit	0.76 ± 0.41	1.59 ± 0.39	ns
Selbstsicherheit	4.75 ± 0.50	3.17 ± 0.47	0.03
Stimmung	9.56 ± 1.03	6.61 ± 0.98	0.05
Erregtheit	2.01 ± 0.49	1.93 ± 0.47	ns

Empfindlichkeit	0.94 ± 0.32	1.32 ± 0.31	ns
Ärger	0.29 ± 0.30	0.74 ± 0.29	ns
Ängstlichkeit	0.43 ± 0.23	0.93 ± 0.21	ns
Deprimiertheit	1.01 ± 0.64	3.15 ± 0.61	0.02
Verträumtheit	3.51 ± 0.57	2.86 ± 0.54	ns

Die Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler dargestellt. Alle Ergebnisse sind mit Hilfe einer Kovarianz-Analyse für die Messwerte der Einstellphase (A) korrigiert. P<0.1, Tendenz; P<0,05, signifikant; P<0,01, hoch-signifikant.

Diskussion

Wie in diesem Experiment gezeigt, verbessert eine achtwöchige intranasale Gabe von Insulin das deklarative Langzeitgedächtnis beim Menschen ohne dabei systemische Nebenwirkungen wie Hypoglykämien zu verursachen. Dieses Ergebnis verdeutlicht die wichtige Rolle von Insulin für die deklarative Gedächtnisbildung beim Menschen und steht in einer Linie mit bisherigen Studienbeobachtungen, die eine verbesserte deklarative Gedächtnisperformanz nach intravenöser Insulingabe nachweisen konnten (Kern *et al.* 2001; Craft *et al.* 1999). Zusätzlich übt intranasales Insulin eine positive Wirkung auf verschiedene Stimmungskategorien aus. Da weder für die selektive Aufmerksamkeit noch für die nondeklarative Gedächtnisleistung signifikante Veränderungen im Studienverlauf beobachtet werden konnten, deuten diese Ergebnisse an, dass Insulin eher für die Bildung von hippocampusabhängigem Gedächtnis beim Menschen von Bedeutung ist.

Da die Anzahl der richtig genannten Wörter im Rahmen der Sofortabfragen weder nach einmaliger noch nach siebenwöchiger intranasaler Gabe von Insulin im Vergleich zu Placebo erhöht war, spricht die Verbesserung der deklarativen Gedächtnisleistung für das Mitwirken von Insulin Konsolidierungsprozessen. Es fällt auf, dass die Fähigkeit der insulinbehandelten Probanden, sich Wörter besser einzuprägen, von einer generell im Zeitablauf schlechter werdenden Erinnerungsleistung im Rahmen der Spätabfragen begleitet war. Diese Verschlechterung war nicht nur zwischen der zweiten und dritten Spätabfrage innerhalb der Placebobedingung signifikant, sondern trat ebenfalls zwischen der ersten und zweiten Spätabfrage gruppenübergreifend auf ($p < 0.01$). Dieses Phänomen scheint durch so genannte proaktive Interferenzen bedingt zu sein. Tatsächlich zeigte sich bei genauerer Betrachtung der Daten, dass die Erinnerungsleistung im Rahmen der letzten Spätabfrage durch Intrusionen (falsch erinnerte Wörter von vorherigen Wortlisten) gestört wurde. Allerdings waren die Intrusionen für die Insulin- und Placebogruppe numerisch

vergleichbar ($p > 0.41$) und können daher die Verbesserung der deklarativen Gedächtnisleistung nach acht Wochen nicht erklären. In diesem Zusammenhang muss ebenso beachtet werden, dass das gewählte Intervall von einer Woche zwischen dem Lernen und der Spätabfrage der Wortlisten deutlich länger ist als die häufig in Gedächtnisstudien benutzten Retentionsintervalle von 20 bis 30 Minuten. Es ist auch denkbar, dass die Gedächtnisbildung über solch lange Zeitintervalle anfälliger für interferierende Faktoren ist. Nichtsdestotrotz ist ein einwöchiges Retentionsintervall zulässig zur Testung des Langzeitgedächtnisses (Dudai, 2004).

Sowohl die akute als auch die achtwöchige intranasale Gabe von Insulin führten zu einem verbesserten Stimmungsbild bei den Probanden. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Kern et al., 1999) steigerte die akute intranasale Gabe von Insulin die allgemeine Stimmung und auch die Selbstsicherheit der Versuchsteilnehmer. Das Gleiche wurde nach achtwöchiger Behandlung mit Insulin beobachtet. Weiterhin fühlten sich die Probanden extrovertierter und weniger deprimiert. Das frühe Auftreten und die verschiedenen Dynamiken, mit dem Insulin die Anzahl der „trifft zu“-Antworten der verschiedenen Stimmungskategorien veränderte, weisen auf eine Beteiligung zentralnervöser Mechanismen hin, die zeitlich differentiell durch Insulin stimulierbar sind als die, die zur Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses beitragen. Allerdings steigerte die akute Gabe von Insulin nur bei den männlichen Probanden die „trifft zu“-Antworten für die Stimmungskategorie Extrovertiertheit. Diese Beobachtung könnte mit der Modulation der zentralnervösen Insulinwirkung durch das Geschlecht zusammenhängen, wie sie gleichfalls für die Effekte des Insulins auf das Körpergewicht und die Nahrungsaufnahme gezeigt werden konnten (Hallschmid *et al.* 2004b; Clegg *et al.* 2003; Clegg *et al.* 2006).

Die zellulären Vorgänge, die die verbesserte deklarative Gedächtnisleistung nach subchronischer Gabe von Insulin ermöglichten, sind durch das hier gewählte Studiendesign nicht identifizierbar. Da Insulinrezeptoren in hoher Dichte im Hippokampus vorkommen (Unger et al., 1991), könnte der verzögerte positive Effekt von Insulin auf das deklarative Gedächtnis auf plastisch-neuronale Veränderungsprozesse hinweisen. So zeigen Ratten, die unter einem Mangel an Insulin im Gehirn leiden, eine Verkürzung von neuronalen Dendriten und eine Atrophie des Hippokampus, die letztendlich in einer Verschlechterung der hippokampusabhängigen Gedächtnisbildung münden (Magarinos and McEwen, 2000; Gardoni et al., 2002). Außerdem stimuliert Insulin Gliazellen die synaptische Plastizität fördern (Dickson, 2003). Somit ist es vorstellbar, dass Insulin über

einen solch langen Zeitraum nicht nur protektiv, sondern auch stimulierend auf die neuronale Konnektivität innerhalb des Hippokampus gewirkt hat. Die verbesserte Verfestigung von verbalem Material könnte ebenso mit den niedrigeren Serumkonzentrationen von Kortisol, die während der letzten Spätabfrage gemessen wurden, zusammenhängen. Nach Bindung an ihren hippokampalen Rezeptor führen Glukokortikoide durch Hemmung der synaptischen Langzeitpotenzierung und durch Reduktion der hippokampalen Glutamatfreisetzung zu einer verschlechterten deklarativen Gedächtnisleistung (Sapolsky, 1993; Plihal and Born, 1999b). Darüber hinaus sind lang anhaltende Erhöhungen von Kortikoiden mit einer geringeren Vernetzung hippokampaler Dendriten (Bisagno et al., 2000; Sandi et al., 2001) und einer Atrophie des Hippokampus (Lupien et al., 1998) assoziiert. Dass die niedrigeren Serumkortisolspiegel die Verbesserung der hippokampalen Gedächtnisbildung begünstigt haben ist unwahrscheinlich, da Korrelationsanalysen keine signifikanten Abhängigkeiten zwischen diesen Parametern zeigen. Nichtsdestotrotz zeigt die Abnahme des Serumkortisols, dass Insulin hippokampale Funktionen moduliert. Der Hippokampus hemmt die Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse über direkte und indirekte Projektionen zum Nukleus paraventricularis und dem ventromedialen Hypothalamus (Jacobson and Sapolsky, 1991; Born and Fehm, 1998). Die Abnahme der Serumkonzentration von Kortisol könnte somit auf eine Steigerung der hippokampalen Rückkopplung durch intranasales Insulin zurück zu führen sein.

Die vorliegenden Daten dieses Experimentes zeigen, dass eine subchronische intranasale Gabe von Insulin sowohl die Wortmerkfähigkeit als auch die generelle Stimmungslage verbessert. Diese positiven Befunde machen einmal mehr deutlich, welch großes Potential die intranasale Insulingabe für die Behandlung von Gedächtnisdefiziten bei Patienten, die beispielsweise an einem Alzheimer erkrankt sind, haben könnte (Tschritter *et al.* 2006; Reger *et al.* 2007).

Experiment III: Intranasales Insulin verbessert das Gedächtnis des Menschen: Humaninsulin vs. Insulin Aspart.

Publiziert in: Benedict C, Hallschmid M, Schmitz K, Schultes B, Ratter F, Fehm HL, Born J, Kern W. (2007). Intranasal Insulin Improves Memory in Humans: Superiority of Insulin Aspart. *Neuropsychopharmacology* 32(1):239-43.

Hintergrund

Der Hippokampus ist essentiell für das Lernen und Abrufen von Fakten und Ereignissen verantwortlich und deshalb entscheidend für die Bildung von deklarativem Gedächtnis (Squire and Zola, 1996; Eichenbaum, 1999; Eichenbaum, 2004). Da diese Hirnregion zahlreiche Insulinrezeptoren besitzt (Baskin *et al.* 1994; Wickelgren, 1998), ist eine Beteiligung von Insulin an deklarativen Gedächtnisprozessen mehr als wahrscheinlich. Diese Annahme wird durch zahlreiche Tier- und Humanstudien gestützt. So ist die Insulinrezeptorexpression und -phosphorylierung im Hippokampus bei Ratten nach Durchführung einer räumlichen Lernaufgabe hoch reguliert (Zhao *et al.* 1999). Analog dazu führt eine intravenöse Infusion von Insulin zu einer verbesserten verbalen deklarativen Gedächtnisleistung (Kern *et al.* 2001; Craft *et al.* 2003) und zu einer Zunahme der neuronalen Feuerrate innerhalb des Medio-Temporallappens (Rotte *et al.* 2005). Obwohl Insulin vom Blutkreislauf ins Gehirn gelangen kann (Woods *et al.* 2003; Schwartz *et al.* 1992a), ist die intravenöse Insulinapplikation zur Untersuchung zentralnervöser Funktionen des Hormons wegen zahlreicher peripheren Nebenwirkungen gering aussagekräftig (Kern *et al.* 2000; Fruehwald-Schultes *et al.* 1999). Im Gegensatz dazu ermöglicht die intranasale Gabe von bioaktiven Substanzen einen direkten Transport ins Gehirn, ohne dass die Substanz dabei in die Peripherie gelangt (Born *et al.* 2002; Ross *et al.* 2004; Thorne *et al.* 2004; Illum, 2000). Da das Humaninsulin (H-Insulin) vorrangig Di-, Tetra- und Hexamere bildet, ist seine Aufnahme nach subkutaner Gabe verzögert (Kang *et al.* 1991). Dagegen liegt das Insulinanalogon Insulin Aspart (I-Asp), bei dem die Aminosäure Prolin an der Stelle B28 durch Aspartat ersetzt ist, hauptsächlich als Monomer vor (Brange *et al.* 1990; Brange and Volund, 1999). Trotz der Aminosäuresubstitution bindet Insulin Aspart mit vergleichbarer Affinität wie Humaninsulin an den Insulinrezeptor (Kurtzhals *et al.* 2000). Ergebnisse klinischer Studien weisen darauf hin, dass Insulin Aspart durch seine pharmakokinetischen Eigenschaften im Vergleich zu Humaninsulin

eine stärkere blutzuckersenkende Potenz besitzt (Gammeltoft *et al.* 1999). Daher wurde in diesem Experiment untersucht, ob das Insulinanalogon Insulin Aspart bei gleicher intranasaler Dosis eine stärkere Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses hervorruft als Humaninsulin.

Methoden

Versuchspersonen

In diesem Experiment wurden 36 Männer (Alter: 18-35 Jahre, BMI < 25 kg/m²) in einem doppelblinden, plazebokontrollierten Design untersucht. Alle Versuchsteilnehmer wurden vor Beginn der Studie untersucht, um sicherzustellen, dass sie gesund waren. Zehn Stunden vor Beginn der Testsitzungen mussten die Probanden nüchtern bleiben und auf den Verzehr Koffein- und Alkoholhaltiger Getränke verzichten.

Experimenteller Ablauf

Die Probanden wurden randomisiert in drei Gruppen mit je 12 Männern aufgeteilt, die für das Alter (H-Insulin: 24.92 ± 1.63 Jahre, I-Asp: 24.42 ± 1.33 Jahre, Plazebo: 26.25 ± 1.66 Jahre) und den BMI (H-Insulin: 22.60 ± 0.60 kg/m²; I-Asp: 22.98 ± 0.59 kg/m², Plazebo: 23.24 ± 0.43 kg/m²) vergleichbar waren. Die Datensätze der mit I-Asp und Plazebo behandelten Probanden stammen teilweise von den männlichen Probanden aus *Experiment II*. Beide Behandlungsgruppen (Gruppengröße = 12) wurden aber durch jeweils vier zusätzlich neu untersuchte Probanden ergänzt, um die Kriterien der Gruppenvergleichbarkeit für das Alter und den BMI erfüllen zu können. Während einer zweiwöchigen Einstellphase erhielten alle Probanden Plazebo. In der darauf unmittelbar folgenden achtwöchigen Behandlungsphase wurde eine Gruppe weiterhin mit Plazebo (HOE 31 Lösungspuffer für Humaninsulin, Aventis Pharma, Bad Soden, Germany) behandelt, die zweite Gruppe bekam Humaninsulin (Insulin Actrapid[®] HM, Novo Nordisk, Mainz, Germany) und die letzte Gruppe Insulin Aspart (Insulin NovoLog[®] HM, Novo Nordisk, Mainz, Germany). Die Probanden wurden instruiert, das Nasenspray am Morgen, am Mittag, am Abend und unmittelbar vor dem Schlafen anzuwenden. Zu jedem Zeitpunkt wurden insgesamt vier Hübe mit je 0.1 ml I-Asp bzw. H-Insulin (= 40 I.E.) oder Plazebo intranasal appliziert (zwei Hübe pro Nasenloch). Somit belief sich die täglich aufgenommene Menge auf 1.6 ml Insulin (= 160 I.E.) oder Plazebo. Das Nasenspray wurde zwischen den Einnahmen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt und im Rahmen der

wöchentlich stattfindenden Untersuchung durch eine Neue ersetzt. Um ihre Zuverlässigkeit hinsichtlich der Substanzeinnahmen zu sichern bzw. zu überprüfen, mussten die Probanden die tägliche Einnahme protokollieren.

Das deklarative Gedächtnis wurde mit Wortlisten (Fruehwald-Schultes et al, 2000; Kern et al, 2001), die jeweils insgesamt 30 Begriffe enthielten, getestet. Die Parallelversionen der Wortlisten sind in ihrer Schwierigkeit vergleichbar und wurden über alle Probanden in ihrer Reihenfolge ausbalanciert. Die Wortliste wird mit einem Wort pro Sekunde vom Versuchsleiter mündlich vorgetragen. Nach einer darauf folgenden Pause von 3 Minuten schreibt der Proband innerhalb von 90 Sekunden alle Wörter auf, die er noch erinnert (Sofortabfrage). Die Anzahl an korrekt erinnerten Wörtern sowie die Anzahl an falsch erinnerten Wörtern von vorherigen Wortlisten wurden dabei als abhängige Variablen gemessen. Die Sofortabfragen wurden am Beginn der Einstellphase (Sitzung A), zum Start der Behandlungsphase (Sitzung B) und eine Woche vor dem Ende der achtwöchigen intranasalen Substanzgabe statt (Sitzung C). Der verbales Lernetest wurde in der Hauptsitzung A bzw. C 60 Minuten nach der Gabe von Plazebo durchgeführt. In Sitzung B wurden je nach Gruppenzugehörigkeit entweder 40 I.E. I-Asp, 40 I.E. H-Insulin oder Plazebo 60 Minuten vor Testbeginn intranasal appliziert. Die Werte der Sitzung A dienten als Grundlinienwerte der Sofortabfrage. Mit Hilfe von Sitzung B konnten die Akuteffekte von I-Asp, H-Insulin und Plazebo auf die Sofortabfrage eingeschätzt werden. Die Wirkung einer subchronischen Gabe der Insulinsubstanzen auf die Sofortabfrage wurde in Sitzung C untersucht. Eine Woche nach den Sofortabfragen mussten die Probanden alle Wörter, die ihnen noch von der letzten Sofortabfrage im Gedächtnis geblieben waren, aufschreiben (Spätabfrage, Abbildung 8).

In den Sitzungen A, B und eine Woche nach Sitzung C wurde außerdem Blut abgenommen, um die Seruminsulinkonzentration (Pharmacia Insulin RIA100, Pharmacia & Upjohn, Inc., Uppsala, Sweden) und die Plasmaglukosekonzentration (Hexokinase-Methode; Abbott; Wiesbaden, Germany) bestimmen zu können.

Datenaufbereitung und Statistik

Die Grundlinienwerte wurden von allen Behandlungswerten abgezogen. Für die Differenzen der deklarativen Lernleistung erfolgte anschließend mit einer meßwiederholten ANOVA (Behandlung x Zeit) eine Signifikanzprüfung. Bei signifikanten Interaktionen zwischen den Faktoren Behandlung und Zeit wurden separate Analysen für die akuten bzw. subchronischen Behandlungseffekte mit einer einfaktoriellen ANOVA

(Zwischensubjektfaktor: Behandlung) gerechnet. Die Daten der hormonellen Parameter und der Plasmaglukose wurden einer meßwiederholten ANOVA (Behandlung x Zeit) unterworfen. Einzelvergleiche wurden mit unabhängigen T-Tests durchgeführt. Ein p-Wert <0.05 galt als signifikant.

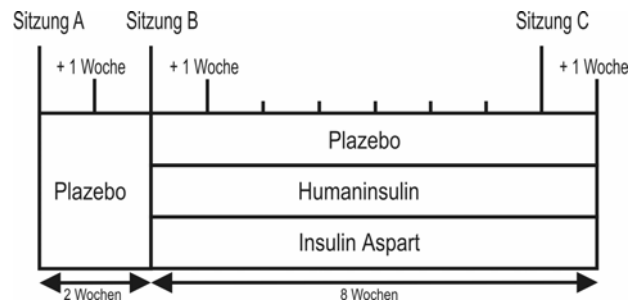


Abbildung 8. *Experimenteller Zeitplan.* Drei Gruppen mit je 12 Männern wurden zunächst für zwei Wochen mit Plazebo intranasal behandelt. Danach bekam eine Gruppe Humaninsulin (HI), die zweite Gruppe erhielt Insulin Aspart (I-Asp) und die dritte Gruppe setzte die Plazeboeinnahme fort. Die intranasale Behandlung wurde insgesamt viermal pro Tag durchgeführt (160 I.E./Tag). Die Testsitzungen wurden zu Beginn der Studie (Sitzung A), nach der ersten intranasalen Behandlung mit Insulin (Sitzung B) und in der siebenten Woche der Behandlungsphase (Sitzung C) durchgeführt. Die Wortlisten, die die Probanden in diesen Hauptsitzungen lernten, wurden jeweils eine Woche später nochmals abgefragt.

Ergebnisse

In der Grundlinienphase gab es weder während der Sofort- noch während der Spätabfrage signifikante Gruppenunterschiede in der Anzahl der richtig erinnerten Wörter (I-Asp vs. H-Insulin vs. Plazebo, Sofortabfrage: 11.25 ± 0.93 vs. 10.75 ± 0.93 vs. 12.17 ± 0.93 korrekt erinnerte Wörter, $p > 0.55$; Spätabfrage: 5.83 ± 1.01 vs. 6.75 ± 1.01 vs. 8.33 ± 1.01 korrekt erinnerte Wörter, $p > 0.22$). Eine meßwiederholter ANOVA zeigte, dass die deklarative Gedächtnisleistung der Probanden hochsignifikant durch die Behandlung über den Behandlungszeitraum beeinflusst wurde ($p < 0.001$). Dabei konnte durch anschließende Analysen ermittelt werden, dass die deklarative Gedächtnisleistung in der letzten Spätabfrage nach acht Wochen signifikant verbessert war ($p < 0.001$ für den ANOVA Haupteffekt, Abbildung 9). Während die Anzahl der richtig erinnerten Wörter nach achtwöchiger Behandlung mit H-Insulin signifikant besser war als die der Plazebogruppe ($p < 0.03$), steigerte die Behandlung mit I-Asp die Gedächtnisleistung im Rahmen der letzten Spätabfrage am deutlichsten ($p < 0.05$ vs. H-Insulin, $p < 0.001$ vs. Plazebo).

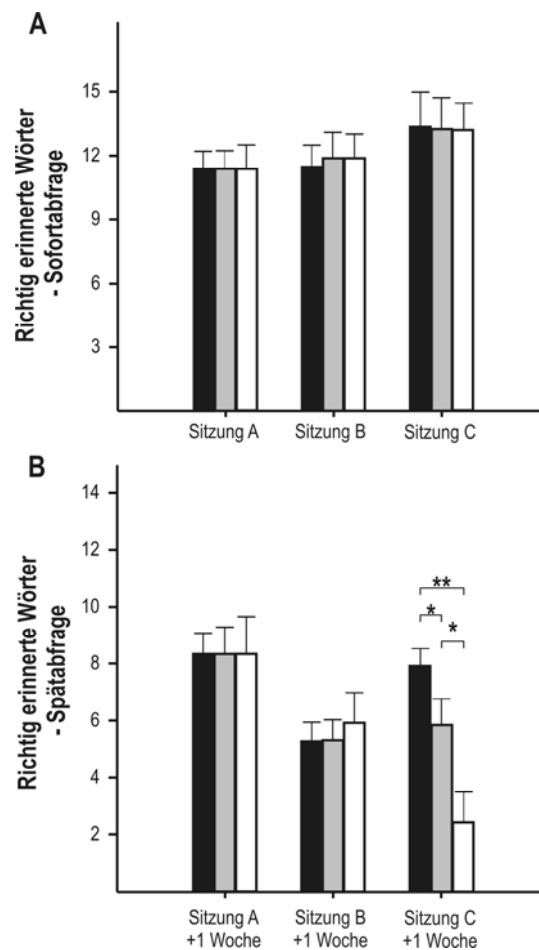


Abbildung 9. Akute und subchronische Effekte von intranasal appliziertem Insulin auf die Wortmerkfähigkeit unmittelbar nach der Präsentation einer Wortliste und eine Woche später. Die Wortabfrage wurde drei Minuten nach der Präsentation (obere Abbildung) einer 30 Wörter umfassenden Liste und eine Woche später (untere Abbildung) durchgeführt. Die Wörter wurden 60 Minuten nach der Applikation von 40 I.E. Insulin Aspart (I-Asp, schwarz), Humaninsulin (H-Insulin, grau) und Plazebo (weiß – Sitzung B) abgefragt. Nach sieben Wochen der intranasalen Behandlung (160 I.E. I-Asp bzw. H-Insulin/Tag) wurde 60 Minuten nach Gabe von Plazebo eine neue Wortliste vorgelegt und wieder drei Minuten nach der Präsentation und eine Woche später abgefragt (Sitzung C). Um eine Grundlinien-Korrektur durchzuführen, wurden die Werte der Einstellphase (Sitzung A bzw. Sitzung A + 1 Woche) von den Werten der Behandlungsphase subtrahiert. Signifikante Unterschiede zwischen den Bedingungen sind durch Sternchen [* , $p < 0.05$; ** , $p < 0.01$] indiziert.

Die Anzahl der Intrusionen, d.h., Wörter, die von anderen Wortlisten erinnert worden sind, war weder während der letzten Spätabfrage nach acht Wochen (I-Asp vs. H-Insulin vs. Plazebo: 1.50 ± 0.51 vs. 1.27 ± 0.41 vs. 1.67 ± 0.57 falsch erinnerte Wörter; $p > 0.86$ für den Haupteffekt Behandlung), noch für die Spätabfrage, die eine Woche nach der akuten Gabe von I-Asp, H-Insulin und Plazebo durchgeführt wurde (I-Asp vs. H-Insulin vs. Plazebo: 1.42 ± 0.45 vs. 1.25 ± 0.43 vs. 1.25 ± 0.28 falsch erinnerte Wörter; $p > 0.94$ für den Haupteffekt Behandlung), signifikant zwischen den Gruppen unterschiedlich. Weder die

akute noch die siebenwöchige intranasale Insulingabe führte zu einer signifikanten Veränderung in der Anzahl richtig erinnerter Wörter im Rahmen der Sofortabfragen ($p < 0.92$ Sitzung B bzw. 0.92 Sitzung C). Ebenso konnte kein Effekt auf die Gedächtnisleistung nach einer Woche der Insulinbehandlung im Rahmen der Spätabfrage von Sitzung B gefunden werden ($p < 0.78$, Abbildung 9).

In Übereinstimmung mit Beobachtungen aus unserer Arbeitsgruppe (Kern *et al.* 1999; Born *et al.* 2002) waren weder die Plasmaglukosespiegel noch die Seruminsulinkonzentration durch die akute bzw. subchronische Gabe des Hormons beeinflusst (Tabelle 4).

Tabelle 4. Plasmaglukose- und Seruminsulinkonzentrationen nach einer einmaligen und achtwöchigen intranasalen Insulinbehandlung.

	Insulin Apart	Humaninsulin	Plazebo	P-Wert
Plasmaglukose (mmol/l)				
Sitzung A	4.93 ± 0.17	4.80 ± 0.13	4.93 ± 0.17	0.71
Sitzung B	4.71 ± 0.09	4.73 ± 0.03	4.72 ± 0.12	0.43
Sitzung C + 1 Woche	4.94 ± 0.10	4.81 ± 0.09	4.74 ± 0.12	0.98
Seruminsulin (µIU/ml)				
Sitzung A	7.88 ± 1.51	5.56 ± 0.69	6.65 ± 1.14	0.38
Sitzung B	5.35 ± 0.72	6.18 ± 0.59	7.32 ± 1.43	0.25
Sitzung C + 1 Woche	6.13 ± 1.25	5.33 ± 0.72	6.49 ± 0.88	0.81

Das Blut wurde nach (A) der ersten intranasalen Gabe von Plazebo, (B) nach der ersten intranasalen Anwendung von Insulin Aspart (40 I.E.) bzw. Humaninsulin (40 I.E.) bzw. Plazebo und am Ende der achtwöchigen Behandlungsphase abgenommen (Sitzung C + 1 Woche). Alle Werte sind als Mittelwert ± Standardfehler dargestellt und durch Subtraktion um die Werte der Einstellphase korrigiert. Die rechte Spalte zeigt die P-Werte für die Haupteffekte einer einfaktoriellen ANOVA (Zwischensubjektfaktor: Behandlung) an.

Diskussion

In diesem Versuch wurden die kognitiven Effekte von intranasal verabreichtem Insulin Aspart (I-Asp) mit denen von Humaninsulin (H-Insulin) und Plazebo verglichen. Wie bereits in *Experiment II* berichtet wurde, verbessert eine achtwöchige intranasale Gabe von H-Insulin die Fähigkeit, sich Wörter einzuprägen. Im Vergleich dazu ist die

Wortmerkfähigkeit, die nach achtwöchiger Behandlung mit I-Asp beobachtet wurde, noch deutlicher ausgeprägt als in der H-Insulingruppe. Dieses Ergebnis deutet an, dass die positiven Effekte, die intranasales Insulin auf die deklarative Gedächtnisfunktion beim Menschen ausübt, durch die Gabe von I-Asp gesteigert werden kann. Da die Alzheimer-Erkrankung eine neuroendokrine Störung mit verringerter Bildung von Insulin- und IGF-I-Rezeptoren ist (Rivera *et al.* 2005), kann dieser Befund von klinischer Relevanz in der Behandlung von Gedächtnisstörungen sein.

Es fällt auf, dass die Fähigkeit der insulinbehandelten Probanden, sich Wörter besser einzuprägen, von einer generell im Zeitablauf schlechter werdenden Erinnerungsleistung im Rahmen der Spätabfragen begleitet war ($p < 0.02$, ANOVA mit dem Innersubjektfaktor Zeit). Diese Verschlechterung ist höchstwahrscheinlich durch Intrusionen von vorherigen Wortlisten, d.h., mit erinnerten Wörtern, die vor der Präsentation (Sitzung A + B) der eigentlichen Wortliste gelernt wurden (Underwood, 1957; Postman, 1962), bedingt. Ein bis zwei Intrusionen pro Sitzung, die in diesem Experiment beobachtet wurden, weisen auf proaktive Interferenzen hin. Allerdings spiegelt die Anzahl der Intrusionen nicht die tatsächliche Intensität dieser Interferenz wieder, die implizit durchaus noch größer sein könnte. Da die Anzahl der Intrusionen numerisch vergleichbar zwischen den Gruppen war, ist es eher denkbar, dass die gesteigerte deklarative Gedächtnisleistung, die am Ende der Behandlungsphase in beiden Insulingruppen im Vergleich zu Placebo zu beobachten war, durch direkte Wirkung des Insulin hervorgerufen worden ist. In diesem Zusammenhang muss unbedingt beachtet werden, dass ein einwöchiges Zeitintervall zwischen dem Lernen und der Abfrage der Wortlisten deutlich länger ist als die häufiger benutzten Retentionsintervalle von 20 bis 30 Minuten und deshalb anfälliger für Interferenzen ist. Nichtsdestotrotz ist ein einwöchiges Retentionsintervall zulässig zur Testung des Langzeitgedächtnisses (Dudai, 2004).

Ebenso ist es denkbar, dass Gruppenunterschiede in der zerebralen Insulinsensitivität die beobachteten Effekten bedingt haben. Diese Vermutung wird allerdings durch Berechnungen der „Homeostatic Model Assessment“ (HOMA) –Werte, die zur Einschätzung der Betazellfunktion und periphere Insulinresistenz dienen (Wallace and Matthews, 2002), nicht gestützt ($p < 0.43$).

Die zentralnervösen Vorgänge, die zur Verbesserung der deklarativen Gedächtnisleistung durch die intranasale Insulingabe beigetragen haben, können nicht mit Hilfe dieses Studiendesigns eruiert werden. Zentralnervöses Insulin ist an einer Vielzahl von neuronalen Prozessen, die Grundvoraussetzungen für die deklarative

Gedächtnisbildung darstellen, beteiligt (Zhao *et al.* 2004). Bisherige Studien konnten zeigen, dass die deklarative Gedächtnisbildung maßgeblich vom Hippokampus abhängt (Kessels *et al.* 2001; Bayley *et al.* 2005). Dabei spielen sowohl hippokampale als auch kortikale Insulinschaltwege eine entscheidende Rolle, indem sie die neuronale Aktivität modulieren und Prozesse auslösen, die für die Schaffung synaptischer Plastizität von großer Bedeutung sind (Gasparini and Xu, 2003; Zhao *et al.* 2004; Craft and Watson, 2004; Wada *et al.* 2005). Somit ist es gut vorstellbar, dass Insulin durch seine intranasale Anwendung hippokampal-neuronale Mechanismen verstärkt. Da Insulin die Expression von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren stimuliert (Skeberdis *et al.* 2001), könnte es außerdem sein, dass dieses die Ausbildung neuronaler Verknüpfungen begünstigt. Die unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften von I-Asp im Vergleich zu H-Insulin könnten daher die Effekte, die Insulin per se auf zentralnervöse Prozesse der deklarative Gedächtnisbildung ausübt, noch verstärkt haben. Das Insulinanalogon I-Asp bildet im Gegensatz zu H-Insulin vorrangig Monomere. Dieser pharmakokinetische Unterschied führt auch dazu, dass I-Asp im Vergleich zu H-Insulin schneller nach subkutaner Gabe ins Blut absorbiert wird und bei gleicher Dosis stärker blutzuckersenkend wirkt (Raslova *et al.* 2004; Hermansen *et al.* 2004). So könnte es sein, dass die Anzahl der Insulinmoleküle, die nach intranasaler Gabe ins Gehirn gelangen, durch die reduzierte Neigung von I-Asp, Hexamere zu bilden, höher ist und dadurch die Insulineffekte auf das Gedächtnis stärker ausfallen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass I-Asp im Vergleich zu H-Insulin bei gleicher intranasaler Dosis deutlich stärker das deklarative Gedächtnis beim Menschen verbessert. Da Insulin und Insulin-ähnliche Faktoren nicht nur protektiv auf das Gehirngewebe wirken, sondern auch Prozesse der Neurogenese und Synaptogenese fördern (O'Kusky *et al.* 2000; van der Heide *et al.* 2005), könnte die intranasale Gabe von Insulin Aspart ein viel versprechender Therapieansatz in der Behandlung von Gedächtnisstörungen wie der Alzheimer-Erkrankung sein.

Experiment IV: Effekte einer akuten und achtwöchigen intranasalen Insulingabe auf den Blutdruck beim Menschen

Publiziert in: Benedict C, Dodt C, Hallschmid M, Lepiorz M, Fehm HL, Born J, Kern W (2005). Immediate but not long-term intranasal administration of insulin raises blood pressure in human beings. *Metabolism*, 54(10):1356-61.

Hintergrund

Wie in der allgemeinen Einführung bereits beschrieben worden ist, übt Insulin wichtige neuromodulatorische Funktionen aus (Woods *et al.* 1979; Wickelgren, 1998; Kern *et al.* 1999; Porte, Jr. *et al.* 2002). Aus dem Blutkreislauf gelangt Insulin hauptsächlich über ein rezeptorabhängiges Transportsystem im Bereich der Endothelzellen, die die luminale Seite der hirnversorgenden Gefäße auskleiden, ins ZNS (Schwartz *et al.* 1992a; Woods *et al.* 2003). Die Insulinrezeptoren sind vor allem im Hippokampus, Hypothalamus und im limbischen System lokalisiert (Bruning *et al.* 2000; Havrankova *et al.* 1978). Eine Anhebung zentralnervöser Insulinspiegel führt durch eine Aktivierung hypothalamisch-neuronaler Netzwerke zu einer Reduktion der Nahrungsaufnahme und des Körpergewichtes (Hallschmid *et al.* 2004a; Sipols *et al.* 1995; Clegg *et al.* 2003; Woods *et al.* 1979). Dagegen löst die selektive Zerstörung von zentralnervösen Insulinrezeptoren umgekehrte Effekte aus (Bruning *et al.* 2000). Weiterhin verbessert Insulin die Gedächtnisverarbeitung (Marfaing *et al.* 1990; Park *et al.* 2000). So führt die *izv.* Gabe von Insulin bei Ratten zu einer Verbesserung der hippokampusabhängigen Gedächtnisleistung (Park *et al.* 2000). Analog dazu verbessert eine intravenöse Insulininfusion hippokampusabhängige Lernfunktionen beim Menschen (Kern *et al.* 2001). Dieser positive Effekt von Insulin auf das Gedächtnis könnte für Patienten, die an Alzheimer erkrankt sind, von klinischer Relevanz sein, da die Schwere der Erkrankung mit einer deutlichen Abnahme von zentralnervösen Insulinspiegeln korreliert ist (Craft *et al.* 1998). Allerdings ist die intravenöse Langzeitanwendung von Insulin, um das Gedächtnis zu verbessern oder katabole Effekte hervorzurufen, durch seine peripheren Nebenwirkungen nicht therapeutisch einsetzbar. Eine Methode, die diese systemischen Nebeneffekte vermeidet, stellt der intranasale Weg dar. Durch diese noninvasive Applikationsmethode können Substanzen wie Insulin unter Umgehung der Peripherie direkt ins Gehirn geschleust werden (Born *et al.* 2002). Somit stellt die intranasale Gabe

von Insulin eine geeignete Methode dar, um Langzeiteffekte des Insulins auf neuroendokrine Funktionen zu untersuchen. Bisherige Langzeitanwendungen von intranasalem Insulin beim Menschen haben gezeigt, dass das Hormon die deklarative Informationsverarbeitung fördert (Reger *et al.* 2007) und die Körperfettmasse reduziert (Hallschmid *et al.* 2004b).

Systemisch steigert Insulin den Blutdruck, indem es durch seine vasodilatative Eigenschaft anregend auf den Sympathikus wirkt. Der höhere Tonus des Sympathikus stellt dabei möglicherweise eine baroreflektive Antwort auf die periphere Vasodilatation dar (Scherrer and Sartori, 1997). Allerdings deuten Tierstudien an, dass die Stimulation des Sympathikus, die durch eine intravenöse Infusion von Insulin ausgelöst wird, ebenso durch die Wirkung von Insulin auf zentralnervöse autonome Zentren zurückzuführen sein könnte (Davis *et al.* 1995; Davis *et al.* 1997). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob eine intranasale Gabe von Insulin gleichfalls den Blutdruck über Aktivierung zentralnervöser Zentren, die den Sympathikustonus regulieren, steigert. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Einfluss einer akuten intranasalen Insulingabe, die zu einer Anhebung zentralnervöser Insulinspiegel führt, auf den Blutdruck und die muskuläre sympathische Nervenaktivität (MSNA) untersucht. In einem zusätzlichen Teilversuch wurde eruiert, inwieweit eine subchronische Erhöhung zentralnervöser Insulinspiegel Auswirkungen auf den Blutdruck hat.

Methoden

Teilexperiment I: Akuteffekte von intranasalem Insulin auf den Blutdruck

Dieses Teilexperiment wurde in einem Innersubjekt-Design durchgeführt. Acht männliche Studenten (Alter: 24.8 ± 0.5 Jahre, BMI: 22.6 ± 1.7 kg/m²) nahmen an zwei experimentellen Sitzungen teil (Insulin und Plazebo), die mindestens eine Woche auseinander lagen und in ihrer Abfolge über alle Probanden ausbalanciert waren. In der einen Bedingung bekamen die Versuchsteilnehmer Insulin (Insulin Actrapid HM, Novo Nordisk, Mainz, Deutschland), in der anderen Plazebo (HOE 31 Lösungspuffer für H-Insulin, Aventis Pharma, Bad Soden, Deutschland). Nach einer Grundlinienphase von 10 Minuten wurde entweder 0.2 ml Insulin (= 20 I.E.) oder Plazebo alle 10 Minuten intranasal appliziert. Insgesamt dauerte die Behandlungsphase 110 Minuten (Abbildung 6) und die Gesamtdosis, die jeder Proband während der Insulinsitzung bekam, belief sich auf 240 I.E. Insulin. Der Blutdruck wurde über die ganze experimentelle Sitzung (Grundlinie +

Interventionsintervall) mittels einer Finapres (Finapres, Ohmeda Monitoring System, Englewood, Colorado) photoplethysmografisch aufgezeichnet. Diese Messung ermöglicht eine kontinuierliche und noninvasive Erfassung von relativen Änderungen des arteriellen Blutdrucks. Zusätzlich wurde mittels eines Elektrokardiogramms die Herzrate erfasst und eine Mikroneurografie am Nervus peroneus zur Bestimmung der muskulären sympathischen Nervenaktivität (MSNA) abgeleitet (Dodt *et al.* 2000). Die Mikroneurografie ermöglicht die direkte Aufzeichnung von Summenpotentialen aus dem Anteil perkutan zugänglicher Nerven (Vallbo *et al.* 1979) und ist hoch korreliert mit den Plasmakonzentrationen von Katecholaminen (Rea *et al.* 1990). Um die MSNA quantifizieren zu können, wurden die Amplituden pro Minute gezählt, die durch die synchrone Entladung der sympathischen Neuronen entstehen und deren Höhe von der Anzahl der aktivierten Neuronen abhängt. Um die sekretorische Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinde-Achse (HNN-Achse) während der akuten intranasalen Insulingabe abbilden zu können, wurde Blut zu Beginn der Grundlinie (- 10 Minuten; Abbildung 6) und am Ende des Interventionsintervalls (+ 120 Minuten; Abbildung 6) zur Bestimmung von Kortikotropin (ACTH) abgenommen. Die Blutproben wurden unmittelbar nach der Abnahme zentrifugiert und bis zur Bestimmung bei mindestens - 20 °C aufbewahrt.

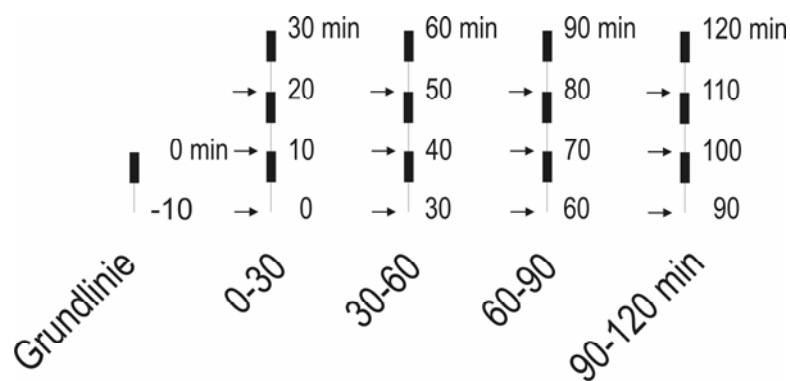


Abbildung 6. Ablauf des akuten Insulinexperimentes. Nach einer 10-minütigen Grundlinienperiode wurde 8 Männern 0.2 ml (= 20 I.E.) Humaninsulin oder Plazebo alle 10 Minuten über eine insgesamt 110 Minuten umfassende Behandlungsperiode intranasal appliziert (die Pfeile indizieren die Zeit der Substanzgabe). Die intranasal verabreichte Gesamtdosis belief sich somit auf 240 I.E. Humaninsulin. Der Blutdruck, die Herzrate und die muskuläre sympathische Nervenaktivität (MSNA) wurden während der letzten fünf Minuten der Grundlinienphase und jeweils während des zweiten fünfminütigen Intervalls nach einer intranasalen Substanzgabe bewertet (Zeitspanne der Messung = ■). Für die statistischen Analysen wurden die durchschnittlichen Werte drei aufeinander folgender Intervalle verglichen.

Teilexperiment II: Langzeiteffekte von intranasalem Insulin auf den Blutdruck

Die Probanden wurden randomisiert auf zwei experimentelle Gruppen (je acht Männer und Frauen) verteilt, die für das Alter (Insulin: 24.6 ± 1.3 Jahre, Plazebo: 25.8 ± 1.2 Jahre) und den BMI (Insulin: 22.6 ± 0.3 kg/m², Plazebo: 22.7 ± 0.4 kg/m²) vergleichbar waren. Während einer zweiwöchigen Grundlinie bekamen alle Probanden Plazebo, in der darauf folgenden achtwöchigen Behandlungsphase nahm je eine Hälfte der Probanden entweder Plazebo oder Insulin: am Morgen, am Mittag, am Abend und unmittelbar vor dem Schlafengehen. Da jede Dosis, die in vier Hüben verabreicht wurde, aus insgesamt 0.4 ml Insulin (40 I.E.; Insulin Actrapid® HM, Novo Nordisk, Mainz, Deutschland) oder Plazebo (HOE 31 Lösungspuffer für Humaninsulin, Aventis Pharma, Bad Soden, Deutschland) bestand, belief sich die Tagesdosis auf 1.6 ml Insulinlösung (160 I.E.). Die Sprays wurden zwischen den Einnahmen im Kühlschrank aufbewahrt und wöchentlich ersetzt. Außerdem mussten die Probanden die tägliche Einnahme der Substanzen mit Hilfe eines wöchentlich ausgehändigten Protokolls dokumentieren. Der Blutdruck und die Herzrate wurden zu Beginn der Grundlinie und am Ende der achtwöchigen Behandlungsphase jeweils eine Stunde nach der intranasalen Gabe von 0.4 ml Plazebo oszillometrisch mit einem Blutdruckmessgerät (Boso Prestige, Bosch & Sohn, Jungingen, Deutschland) gemessen. Im Gegensatz zur Akutstudie wurden in diesem subchronischen Experiment weder die MSNA abgeleitet noch ACTH gemessen.

Messung der Glukosekonzentration

Um die Plasmaglukosekonzentration während der akuten intranasalen Insulingabe (Teilexperiment I) messen zu können, wurde zu Beginn der Grundlinie und alle 30 Minuten während der Behandlungsphase (vom Start der Behandlungsphase ausgehend; 0 min) Blut abgenommen. Im Teilexperiment II wurde ebenfalls im nüchternen Zustand Blut abgenommen im wöchentlichen Rhythmus abgenommen. Die Plasmaglukose wurde mittels der Hexokinase-Methode photometrisch bestimmt (Aeroset, Abbott, Wiesbaden, Deutschland).²

Datenaufbereitung und Statistik

Für den akuten Insulinversuch wurden Zeitfenster gebildet, die die komplette Grundlinie und die letzten fünf Minuten einer jeden zehnminütigen Periode nach intranasaler Substanzgabe umfassten. Die Werte des Blutdrucks, der Herzrate und der MSNA wurden

über drei aufeinander folgende fünfminütige postintrasnale Perioden gemittelt (Abbildung 6). Die Werte wurden an die Grundlinie angepasst, indem der durchschnittliche Wert der zehnminütigen Grundlinie von den Behandlungswerten abgezogen wurde. Diese korrigierten Werte wurden einer zweifaktoriellen Varianzanalyse mit Messwiederholung unterworfen (ANOVA; Innersubjekt-Faktoren: Bedingung, Zeit). Im Fall, dass die ANOVA einen signifikanten Haupteffekt ergab, wurden die Differenzen der einzelnen Zeitintervalle mit gepaarten T-Tests verglichen. Die statistische Auswertung im Teilexperiment II beruhte auf einer Kovarianz-Analyse (ANCOVA; Kovariaten: Grundlinienwert). Ein p-Wert <0.05 galt als signifikant.

Ergebnisse

Teilexperiment I: Akuteffekte von intranasalem Insulin auf den Blutdruck, die Herzrate und die muskuläre sympathische Nervenaktivität (MSNA)

Im Vergleich zu Placebo löste die akute Gabe von Insulin einen leichten Anstieg des Blutdrucks zwischen der 90. und 120. Minute der Behandlungsphase aus. In Bezug auf die Blutdruckwerte, die in der Grundliniephase gemessen wurden (Insulin vs. Placebo; systolischer Blutdruck, 152.00 ± 6.25 vs. 160.65 ± 8.81 mmHg; diastolischer Blutdruck, 91.70 ± 7.00 vs. 99.90 ± 6.72 mmHg; mittlerer arterieller Blutdruck, 110.00 ± 6.20 vs. 117.40 ± 6.90 mmHg, $p > 0.51$ für alle Vergleiche), kam es zwischen der 90. und 120. Minute zu einem relativen Anstieg des diastolischen bzw. mittleren arteriellen Blutdrucks um 14.31 ± 4.5 % bzw. 12.29 ± 5.10 % in der Insulinsitzung und um 0.16 ± 2.99 % bzw. 0.46 ± 3.14 % in der Placebobedingung. Dies ergab einen signifikanten Unterschied zwischen der Insulin- und Placebobedingung in Hinblick auf den diastolischen bzw. mittleren arteriellen Blutdruck von 12.21 ± 5.10 % ($p < 0.05$) und 10.81 ± 4.32 % ($p < 0.04$, Abbildung 7). Die Veränderungen im systolischen Blutdruck zwischen der 90. und 120. Minute sind tendenziell signifikant (Differenz zwischen Insulin und Placebo: 9.53 ± 4.66 %, $p < 0.08$; Abbildung 7).

Während der Behandlungsphase waren die Herzrate, die Anzahl der Amplituden, die durch die Mikroneurografie ermittelt wurden, und die Plasmakonzentration von ACTH zwischen der Insulin- und Placebogruppe statistisch vergleichbar (Tabelle 3).

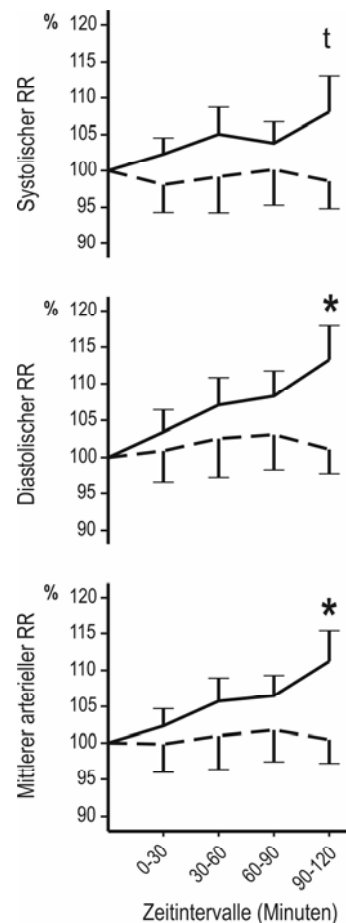


Abbildung 7. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardfehler des systolischen, diastolischen und mittleren arteriellen Blutdrucks während der Insulin (durchgezogene Linie)- und Plazebobedingung (gestrichelte Linie). Die Werte sind, wie durch die Messung mit dem Finapres erhoben, in prozentualer Veränderung gegenüber den Werten der Grundlinie (= 100 %) dargestellt. Signifikante Veränderungen zwischen Insulin und Plazebo sind durch Sternchen angezeigt [*; $P < 0.05$; ^t; $P < 0.1$].

Teilexperiment II: Effekte einer achtwöchigen intranasalen Gabe von Insulin auf den Blutdruck und die Herzrate

Im Vergleich zur Plazebo war der oszillometrisch gemessene Blutdruck nach achtwöchiger intranasaler Insulingabe unverändert (Insulin vs. Plazebo; systolischer Blutdruck: 115.29 ± 4.54 vs. 115.67 ± 3.81 mmHg; diastolischer Blutdruck: 68.64 ± 1.91 vs. 65.67 ± 1.82 mmHg; mittlerer arterieller Blutdruck: 84.19 ± 2.30 vs. 82.35 ± 2.21 mmHg; $p > 0.62$ für alle Vergleiche). Die Herzrate blieb ebenfalls im Gruppenvergleich unverändert (Insulin vs. Plazebo: 70.83 ± 2.75 vs. 66.71 ± 2.57 bpm, $p > 0.61$).

Plasmaglukose

In Übereinstimmung mit Studienbeobachtungen aus unserer Arbeitsgruppe (Kern *et al.* 1999; Born *et al.* 2002) ergab die ANOVA weder signifikanten Änderungen für die

Plasmaglukosekonzentration nach akuter ($p>0.44$; siehe auch Tabelle 3) noch nach subchronischer ($p>0.55$) Gabe von Insulin.

Tabelle 3. Muskuläre sympathischen Nervenaktivität (MSNA), Herzrate, Plasmakonzentrationen von Adrenokortikotropin (ACTH) und Glukose während einer akuten intranasalen Gabe von Insulin bzw. Placebo

	Insulin	Placebo
MSNA (Amplituden/Minute)		
Grundlinie	15.33 ± 2.45	13.13 ± 1.96
05-30 min	15.75 ± 1.48	14.97 ± 1.50
35-60 min	17.36 ± 1.52	18.39 ± 1.88
65-90 min	19.32 ± 1.78	18.55 ± 2.03
95-120 min	20.29 ± 1.76	19.23 ± 2.20
Herzrate (Schläge/Minute)		
Grundlinie	59.91 ± 2.10	63.11 ± 2.72
05-30 min	60.47 ± 1.06	63.77 ± 1.64
35-60 min	61.39 ± 1.13	64.12 ± 1.58
65-90 min	61.67 ± 0.98	63.54 ± 1.73
95-120 min	62.01 ± 0.99	63.67 ± 1.51
ACTH (pg/ml)		
-10 min	15.41 ± 0.53	16.60 ± 1.65
120 min	14.76 ± 2.13	14.84 ± 1.61
Plasmaglukose (mg/dl)		
-10 min	87.29 ± 2.29	86.46 ± 3.65
0 min	87.25 ± 1.74	84.75 ± 4.69
30 min	86.50 ± 4.26	85.00 ± 4.50
60 min	88.13 ± 2.09	89.63 ± 2.21
90 min	84.38 ± 3.70	88.50 ± 2.07
120 min	83.25 ± 2.40	84.25 ± 5.55

Nach einer 10-minütigen Grundlinienphase wurde 8 Männern alle 10 Minuten über 110 Minuten insgesamt jeweils 0.2 ml (= 20 I.E.) Humaninsulin intranasal verabreicht. Um die Wirkung der intranasalen Gabe von Insulin auf die Plasmakonzentration von ACTH einschätzen zu können, wurde Blut am Beginn der Grundlinienphase und am Ende der Behandlungsperiode abgenommen. Die Plasmaglukose wurde zu Beginn der Grundlinie (- 10 Minuten) und jede 30 Minuten, ausgehend vom Start der Behandlungsperiode (0 Minute), gemessen. Die Werte der muskulären sympathischen Nervenaktivität (MSNA) und Herzrate wurden jeweils in dem Zeitintervall von der 5 bis zur 10 Minute nach Beginn der Grundlinienphase als auch nach jeder intranasalen Substanzgabe während der Behandlungsphase aufgenommen. Für die statistische Analyse

wurden die Werte der Grundlinienphase von den Bahnadlungswerten abgezogen. Alle Daten sind als Mittelwert \pm Standardfehler dargestellt.

Diskussion

Bei Tieren kommt es durch die intrakarotidale Infusion von Insulin zu einem Anstieg des systemischen Blutdrucks, der von deutlich größerem Ausmaß ist als nach mengenmäßig gleicher intrafemorale Infusion des Hormons (Davis *et al.* 1995; Davis *et al.* 1997). Durch die Nutzung der intranasalen Applikationsmethode konnte mit dieser Studie der Beweis erbracht werden, dass ein selektiver Anstieg von Insulin im ZNS eine kurzfristige Erhöhung des Blutdrucks beim Menschen auslöst. Somit scheint die hypertensive Eigenschaft des Insulins, die das Hormon nach intravenöser Gabe zeigt (Kern *et al.* 2005; Fruehwald-Schultes *et al.* 1999), teilweise durch die Aktivierung zentralnervöser Prozesse bedingt zu sein. Wie im *Experimenten I* gezeigt, übt eine Langzeitanwendung von intranasalem Insulin positive Effekte auf die deklarative Gedächtnisbildung beim Menschen aus. Somit ist der Befund, dass der hypertensive Effekt nach subchronischer Insulingabe nicht auftritt, von besonderer Wichtigkeit, da er zeigt, dass eine dauerhafte Anwendung von intranasalem Insulin nicht von einer unerwünschten Blutdruckerhöhung begleitet ist.

Eine akute intranasale Gabe von Insulin führt beim Menschen zu einem Blutdruckanstieg. Dasselbe wurde ebenfalls nach einer akuten Infusion von Insulin in die Karotiden von Hunden beobachtet (Davis *et al.* 1995; Davis *et al.* 1997). Bei diesem Tierexperiment war der mittlere Blutdruckanstieg nach der intrakarotidalen Infusion des Hormons um etwa $17 \pm 5 \%$ größer als nach einer intrafemorale Insulininfusion. Allerdings scheint diese Erhöhung des Blutdrucks nicht, wie nach *izv.* Gabe von Insulin gezeigt, durch eine zentralnervöse Aktivierung des Sympathikus vermittelt zu sein (Muntzel *et al.* 1995). Daher ist es unwahrscheinlich, dass der Blutdruckanstieg, der nach intrakarotidaler Insulingabe bei Hunden beobachtet wurde, durch periphere Mechanismen vermittelt war. Im Blutkreislaufsystem löst Insulin eine durch Nitritoxid vermittelte Gefäßerweiterung aus, die einen Blutdruckabfall begünstigt (Anderson *et al.* 1991). Der darauf folgende baroreflektorische Anstieg des sympathischen Tonus im muskulären Gefäßbett (Berne *et al.* 1992) würde nur dann zu einem überkompensatorischen Blutdruckanstieg führen, wenn der Sollwert der Blutdruckregulation erhöht ist. In diesem Experiment scheint der hypertensive Effekt des intranasalen Insulins durch eine direkte

Wirkung des Hormons auf diesen Sollwert vermittelt zu sein. Dafür spricht insbesondere die Beobachtung, dass es infolge des Blutdruckanstieges zu keiner Hemmung der Herzrate oder der MSNA kam. Beide Parameter blieben nahezu unverändert während der intranasalen Insulingabe.

Neben dem sympathischen Nervensystem spielt die HHN-Achse eine wichtige Rolle in der Blutdruckregulation (Whitworth *et al.* 1995; Dodt *et al.* 1998; Whitworth *et al.* 2005). Der hypertensive Effekt der akuten intranasalen Gabe von Insulin könnte daher von einer gesteigerten sekretorischen Aktivität der HHN-Achse stammen. Diese Annahme ist auch deshalb plausibel, da intravenöses Insulin den Tonus dieser Stressachse steigert (Fruehwald-Schultes *et al.* 1999). In diesem Experiment scheint die Erhöhung des Blutdrucks allerdings nicht auf einer insulinabhängigen Stimulation der sekretorischen Aktivität der HHN-Achse zu beruhen, wie es durch die unveränderten ACTH-Spiegel im Plasma angedeutet ist.

Da vergangene Studien von einer positiven Korrelation zwischen dem Blutdruck und der Plasmaglukose berichten konnten (Miyazato *et al.* 2002; Lu *et al.* 1994), könnte der durch Insulin bedingte Blutdruckanstieg auch durch Veränderungen in der Plasmaglukosekonzentration bedingt sein. Allerdings ergeben die statistischen Vergleiche zwischen der Insulin- und Plazebobedingung keine signifikanten Differenzen für die Plasmakonzentration von Glukose.

Im Gegensatz zu den akuten Effekten von Insulin auf den Blutdruck führte die subchronische intranasale Gabe des Hormons zu keinen Veränderungen des Blutdrucks. Dieses Ergebnis wird durch tierexperimentellen Vorbefunde, die ebenfalls einen Blutdruckanstieg nach akuter nicht aber nach subchronischen Insulininfusion messen konnten (Hall *et al.* 2000; Hildebrandt *et al.* 1999; Davis *et al.* 1995; Davis *et al.* 1997; Muntzel *et al.* 1995), gestützt. Möglicherweise kommt es im Ablauf der subchronischen Behandlung mit Insulin zu gegenregulatorischen Mechanismen, die den akuten Blutdruckanstieg durch Insulin unterbinden. Nichtsdestotrotz müssen weitere Studien durchgeführt werden, um die genauen Mechanismen, die dem hypertensiven Insulineffekt entgegen wirken, zu klären.

Dieses Experiment zeigt, dass die intranasale Gabe von Insulin, ähnlich wie eine intravenöse Gabe des Hormons, den Blutdruck beim Menschen erhöht. Die hypertensive Eigenschaft des Hormons scheint also nicht nur durch periphere, sondern auch durch zentralnervöse Prozesse bedingt zu sein. Obgleich die Erhöhung des Blutdrucks nach intravenöser Gabe von Insulin durch eine Aktivierung von Stresssystemen erklärt wird

(Kern *et al.* 2000; Fruehwald-Schultes *et al.* 1999), weisen die Daten dieses Experimentes auf eine über das ZNS vermittelte Reduktion der Baroreflex-Sensitivität hin. Die Abwesenheit hypertensiver Effekte nach subchronischer intranasaler Insulingabe kann für einen potentiellen klinischen Einsatz von intranasalem Insulin wichtig sein.

Zusammenfassende Diskussion

In dieser experimentellen Serie wurde die Wirkung von zentralnervösem Insulin auf Hirnfunktionen beim Menschen untersucht. Bisherige Tierstudien und intravenöse Infusionsstudien beim Menschen haben bereits gezeigt, dass Insulin sowohl an der Körpergewichts- und Nahrungsregulation (Porte, Jr. and Woods, 1981) als auch an der deklarativen, hippocampusabhängigen Gedächtnisbildung (Marfaing *et al.* 1990; Park *et al.* 2000; Kern *et al.* 2001) beteiligt ist. Weiterhin scheint Insulin über zentralnervöse Prozesse den systemischen Blutdruck zu erhöhen (Davis *et al.* 1995; Davis *et al.* 1997). Die dieser Dissertation zugrunde liegenden Humanexperimente konnten auf der Basis der intranasalen Applikationsmethode, die den direkten Zugang von Insulin ins Gehirn ermöglicht (Born *et al.* 2002), zeigen, dass zentralnervöses Insulin das hippocampusabhängige Gedächtnis auf allen Ebenen der Informationsverarbeitung fördert, dass es positiv auf die Stimmung wirkt, dass es eine wichtige anorexigene Funktion bei Männern ausübt und dass es nach akuter nicht aber nach subchronischer Anwendung den systemischen Blutdruck erhöht. Im Folgenden werden die Ergebnisse dieser Experimente nach der Bedeutung für das Gedächtnis, die Nahrungsregulation und den Blutdruck beim Menschen zusammenfassend diskutiert.

Insulin und Gedächtnis

In den *Experimenten I - III* wurde untersucht, inwieweit eine einmalige bzw. achtwöchige intranasale Gabe von Insulin die Funktion des deklarativen und nondeklarativen Gedächtnisses moduliert. Zusätzlich wurde in den *Experimenten I* und *II* überprüft, ob die hypothetisierten positiven Effekte von Insulin auf das Gedächtnis vom Geschlecht abhängen. Wie durch die Versuche gezeigt werden konnte, fördert Insulin das deklarative Gedächtnis auf allen Ebenen der Informationsverarbeitung (Übersichtsarbeit: (Benedict *et al.* 2007)). Die Bearbeitung der nondeklarativen, hippocampusunabhängigen Gedächtnisaufgaben unterschied sich weder nach akuter noch nach achtwöchiger Behandlung mit Insulin signifikant von Placebo. Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass Insulin eine entscheidende Rolle für die Bildung des deklarativen Gedächtnisses beim Menschen spielt.

Im *Experiment I* waren die positiven Gedächtniseffekte von akut appliziertem Insulin auf die Frauen beschränkt. Sie schnitten unter der Hormongabe beim

hippokampusabhängigen Memoryspiel als auch während des Zahlennachsprechens, welches primär präfrontal prozessiert wird (Petrides *et al.* 1993), besser ab. Die Gedächtnisleistung der Männer blieb unter dem akuten Hormoneinfluss unverändert. Dass die Verbesserung des deklarativen Gedächtnisses durch Insulin nur bei den Frauen auftrat, könnte auf ein Zusammenspiel des Hormons mit Östrogen hinweisen. Östrogen übt eine stimulierende Wirkung auf das zentralnervöse IGF-1-System, das Prozesse der Gedächtnisbildung reguliert und durch Insulin aktiviert werden kann (Pons and Torres-Aleman, 1993), aus. Weiterhin ist Östrogen an der Regulation der Expression von Insulinrezeptoren im ZNS beteiligt (Xu *et al.* 2007). Im Gegensatz zu den Akuteffekten verbesserte eine achtwöchige intranasale Gabe von Insulin das deklarative Gedächtnis bei beiden Geschlechtern (*Experiment II*). Anscheinend stimuliert Insulin über einen längeren Zeitraum Prozesse im Gehirn, die unabhängig von den Sexualsteroiden hippokampale Gedächtnisfunktionen fördern. So steigert Insulin die Expression von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren (Skeberdis *et al.* 2001) und regt die Aussprossung von Synapsen und neuronalen Vernetzungsprozessen im ZNS an (Dickson, 2003) an. Diese Vorgänge sind wichtige Voraussetzungen für die Bildung des Langzeitgedächtnisses (Miyamoto, 2006).

Eine Steigerung der hippokampusabhängigen Gedächtnisleistung durch die akute intranasale Gabe von Insulin konnte im *Experiment II* nicht beobachtet werden. Da die Dosis von 160 I.E. Insulin, die beim *Experiment I* zum Einsatz kam, deutlich höher war als bei *Experiment II* (40 I.E.), fördert Insulin vermutlich das deklarative Gedächtnis dosisabhängig beim Menschen. Diese Annahme wurde bisher von mehreren unabhängigen Studien bestätigt (Reger *et al.* 2005; Kern *et al.* 2001). Ebenso kann es sein, dass das Memoryspiel geeigneter als die in *Experiment II* eingesetzte Wortliste ist, um Effekte von Insulin auf der Verhaltensebene sichtbar zu machen.

Im *Experiment III* wurden die Effekte von Insulin Aspart und Humaninsulin auf die deklarative Gedächtnisfunktion verglichen. Insulin Aspart besitzt im Vergleich zum Humaninsulin, welches primär Hexamere bildet (Kang *et al.* 1991), eine geringere Neigung zur Polymerisation (Brange *et al.* 1990; Brange and Volund, 1999). Wegen dieser pharmakokinetischen Unterschiede wurde im *Experiment III* hypothetisiert, dass Insulin Aspart besser als Humaninsulin nach intranasaler Gabe ins Gehirn aufgenommen wird und deshalb in einem stärkeren Ausmaß das deklarative Gedächtnis beim Menschen fördert. Die Fähigkeit, sich Wörter einzuprägen, fiel nach achtwöchiger Behandlung mit Insulin Aspart im Vergleich zu Humaninsulin größer aus. Somit können die vorteilhaften

Effekte von intranasalem Insulin auf das deklarative Gedächtnis durch die Gabe von Insulin Aspart gesteigert werden.

Wie im *Experiment II* zusätzlich gezeigt werden konnte, wirkt eine akute als auch eine langfristige Insulinbehandlung positiv auf verschiedene Stimmungskategorien. Allerdings steigerte die akute Behandlung mit Insulin die Extrovertiertheit nur bei Männern. Diese Beobachtung ist ein weiterer Beleg dafür, dass zentralnervöse Funktionen von Insulin durch das Geschlecht beeinflusst werden (Clegg *et al.* 2003; Hallschmid *et al.* 2004b).

Insulin und Nahrungsregulation

Die zentralnervöse Gabe von Insulin führt zu einer Gewichtsreduktion bei verschiedenen Tierspezies (Woods *et al.* 1979; Brown *et al.* 2006; Figlewicz *et al.* 1995; Florant *et al.* 1991). Dasselbe konnte beim Menschen nachgewiesen werden (Hallschmid *et al.* 2004b). Der Gewichtsverlust durch Insulin scheint über eine verringerte Nahrungsaufnahme und einen gesteigerten Ruheenergiebedarf vermittelt zu werden (Woods *et al.* 1979; Menendez and Atrons, 1991). Ein reduzierter Transport von Insulin über die Blut-Hirn-Schranke (Stein *et al.* 1987) und eine verminderte Insulinbindung im Gehirn (Melnik, 1987; Figlewicz *et al.* 1985) spielen dabei eine wichtige Rolle in der Entstehung von Adipositas (Kaiyala *et al.* 2000). Im *Experiment I* wurde untersucht, inwieweit eine akute Anhebung des Insulinspiegels im Gehirn die Nahrungsaufnahme von Männern und Frauen beeinflusst. Die männlichen Probanden aßen während der Insulinsitzung deutlich weniger Kalorien als während ihrer Placebobedingung. Im Vergleich dazu blieb die Nahrungsaufnahme bei den Frauen unverändert. Diese Ergebnisse decken sich mit tierexperimentellen Daten. So senkt *izv.* Insulin nur bei männlichen Versuchstieren die aufgenommene Energiemenge (Clegg *et al.* 2003; Clegg *et al.* 2006). Diese Tierdaten deuten in Kombination mit den Ergebnissen von *Experiment I* an, dass das Geschlecht die anorexigene Wirkung von Insulin determiniert. Da eine achtwöchige intranasale Gabe von Insulin einen Verlust von etwa 1 kg Körperfett bei normalgewichtigen Männern induziert (Hallschmid *et al.* 2004b), könnte die geringere Energieaufnahme im *Experiment I* den beschriebenen Verlust ermöglicht haben. Die zentralnervösen Prozesse, die die schnelle anorexigene Wirkung von Insulin vermitteln, können durch das Studiendesign von *Experiment I* nicht genauer charakterisiert werden. Höchstwahrscheinlich führt Insulin durch die erhöhte Expression und Freisetzung von anorexigenem Alpha-MSH (Benoit *et*

al. 2002) und den verringerten Umsatz an orexigenen Neuropeptiden wie AgRP und NPY (Porte, Jr. *et al.* 2002) zu einer reduzierten Nahrungsaufnahme bei den Männern.

Insulin und Blutdruck

Bei Tieren führt die intrakarotidale Infusion von Insulin zu einer akuten Erhöhung des systemischen Blutdrucks. Dieser fällt deutlich stärker aus als nach einer vergleichbaren intrafemorale Insulininfusion (Davis *et al.* 1995; Davis *et al.* 1997). Die Autoren dieser Arbeiten schlussfolgern, dass Insulin neben seinen peripheren Effekten auch über zentralnervöse Prozesse den systemischen Blutdruck erhöht. Durch die Nutzung der intranasalen Gabe konnte im *Experiment IV* nachgewiesen werden, dass zentralnervöses Insulin beim Menschen den systemischen Blutdruck steigert. Insbesondere die unveränderten Werte der Herzrate und muskulären sympathischen Nervenaktivität (MSNA) sprechen für eine Abnahme der Baroreflexivität, über die der Anstieg des systemischen Blutdrucks unter Insulingabe anscheinend vermittelt worden ist. Diese Ergebnisse liefern erste Beweise, dass eine akute Erhöhung von Insulin im Liquor cerebrospinalis den systemischen Blutdruck beim Menschen steigert.

Die achtwöchige intranasale Gabe von Insulin führte zu keiner Erhöhung des systemischen Blutdrucks. Dies kann ein Hinweis auf eine graduelle Aktivierung von gegenregulatorischen Vorgängen im Zeitablauf der Insulinbehandlung sein.

Ausblick

Wie in allen Experimenten nachgewiesen worden ist, stellt das Insulin ein wichtiges neuroendokrines Signal beim Menschen dar. Da Patienten mit einer Demenz des Alzheimer Typs eine verringerte zentralnervöse Expression von insulinabhängigen Genen zeigen (Steen *et al.* 2005), könnte die intranasale Insulingabe eine wichtige klinische Bedeutung in der Behandlung von Gedächtnisdefiziten erlangen. Sie hat nicht nur in den vorliegenden Experimenten, sondern auch in zwei mit Alzheimer-Patienten durchgeführten klinischen Studien eine Verbesserung der deklarativen Gedächtnisfunktion bewirkt (Reger *et al.* 2005; Reger *et al.* 2007), ohne dabei nennenswerte Veränderungen der Seruminsulin- oder Blutzuckerspiegel hervorzurufen.

Die Daten von *Experiment I* bestätigen ebenfalls die Hypothese, dass zentralnervöses Insulin eine bedeutende Funktion im Bereich anorexigener Schaltwege

besitzt. Wahrscheinlich tragen Störungen im zerebralen Insulinstoffwechsel, wie ein reduzierter Transport von Insulin über die Blut-Hirn-Schranke (Kern *et al.* 2006) und eine verminderte Insulinbindung im Gehirn (Melnyk, 1987; Figlewicz *et al.* 1985), zur Entstehung von Adipositas bei (Kern *et al.* 2006; Kaiyala *et al.* 2000). Daher böte sich die intranasale Anwendung von Insulin als ein viel versprechender Ansatz an, um therapeutisch zur Gewichtsreduktion bei Fettleibigen eingesetzt zu werden. Bei einer weiteren Studie unserer Arbeitsgruppe konnte diese Vermutung an adipösen Männern allerdings nicht verifiziert werden (Hallschmid *et al.* 2007). Nichtsdestotrotz untermauern die Ergebnisse von *Experiment I*, dass Insulin unter physiologischen Bedingungen ein wichtiges anorexigenes Signal bei Männern darstellt.

Der Anstieg des Blutdrucks, der normalerweise bei zunehmenden Seruminsulinspiegeln auftritt (Kern *et al.* 2000), ist beim Menschen, wie in unserem *Experiment IV* gezeigt wurde, höchstwahrscheinlich über zentralnervöse Schaltwege vermittelt. Dagegen bleibt eine längere Anhebung zentralnervöser Insulinspiegel ohne Wirkung auf den systemischen Blutdruck. Durch diesen Befund wird ein schwerwiegender Nebeneffekt einer intranasalen Insulintherapie ausgeschlossen.

Zusammenfassung

Im Gehirn werden zahlreiche Insulinrezeptoren exprimiert. Sie sind vor allem in solchen Hirnregionen zu finden, die maßgeblich an der Regulation des Essverhaltens und der Bildung von deklarativem Gedächtnis beteiligt sind. Daher setzte sich die vorliegende Dissertation zum Ziel, zu untersuchen, inwieweit Humaninsulin unter akuten bzw. subchronischen Bedingungen die deklarative Gedächtnisleistung beim Menschen beeinflusst und ob nach Nutzung eines pharmakokinetisch veränderten Insulinanalogons (Insulin Aspart) die Effekte auf das deklarative Gedächtnis im Vergleich zu denen von Humaninsulin verstärkt werden. Aufgrund von tierexperimentellen Befunden, die belegen, dass Insulin über zentralnervöse Mechanismen den systemischen Blutdruck erhöht, wurde zusätzlich untersucht, ob und inwieweit diese Ergebnisse auf den Menschen übertragbar sind. Bei allen Experimenten kam die intranasale Applikationsmethode zum Einsatz, die den direkten Transport von Insulin von der Nasenhöhle in den Liquor cerebrospinalis ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass zentralnervöses Insulin die hippokampusabhängige Gedächtnisbildung fördert, dass es stimmungsaufhellend wirkt, dass es eine wichtige anorexigene Funktion bei Männern nicht aber bei Frauen ausübt und dass es bei akuter nicht aber bei subchronischer Anwendung hypertensiv wirkt. Wie durch alle vier Experimente gezeigt wird, übt Insulin einen starken direkten Einfluss auf zentralnervöse Funktionen beim Menschen aus.

Literaturverzeichnis

- Anderson, E. A., Hoffman, R. P., Balon, T. W., Sinkey, C. A. & Mark, A. L.** (1991). Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J. Clin. Invest* **87**, 2246-2252.
- Babri, S., Badie, H. G., Khamenei, S. & Seyedlar, M. O.** (2007). Intrahippocampal insulin improves memory in a passive-avoidance task in male wistar rats. *Brain Cogn* **64**, 86-91.
- Barnett, E. M. & Perlman, S.** (1993). The olfactory nerve and not the trigeminal nerve is the major site of CNS entry for mouse hepatitis virus, strain JHM. *Virology* **194**, 185-191.
- Baskin, D. G., Figlewicz, L. D., Seeley, R. J., Woods, S. C., Porte, D., Jr. & Schwartz, M. W.** (1999). Insulin and leptin: dual adiposity signals to the brain for the regulation of food intake and body weight. *Brain Res.* **848**, 114-123.
- Baskin, D. G., Schwartz, M. W., Sipols, A. J., D'Alessio, D. A., Goldstein, B. J. & White, M. F.** (1994). Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology* **134**, 1952-1955.
- Baura, G. D., Foster, D. M., Porte, D., Jr., Kahn, S. E., Bergman, R. N., Cobelli, C. & Schwartz, M. W.** (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**, 1824-1830.
- Bayley, P. J., Gold, J. J., Hopkins, R. O. & Squire, L. R.** (2005). The neuroanatomy of remote memory. *Neuron* **46**, 799-810.
- Benedict, C., Hallschmid, M., Schultes, B., Born, J. & Kern, W.** (2007). Minireview: Intranasal insulin to improve memory in humans. *Neuroendocrinology*. 2007;86(2):136-42.
- Benoit, S. C., Air, E. L., Coolen, L. M., Strauss, R., Jackman, A., Clegg, D. J., Seeley, R. J. & Woods, S. C.** (2002). The catabolic action of insulin in the brain is mediated by melanocortins. *J. Neurosci.* **22**, 9048-9052.
- Benoit, S. C., Clegg, D. J., Seeley, R. J. & Woods, S. C.** (2004b). Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog. Horm. Res.* **59**, 267-285.
- Benoit, S. C., Clegg, D. J., Seeley, R. J. & Woods, S. C.** (2004a). Insulin and leptin as adiposity signals. *Recent Prog. Horm. Res.* **59**, 267-285.
- Benoit, S. C., Schwartz, M. W., Lachey, J. L., Hagan, M. M., Rushing, P. A., Blake, K. A., Yagaloff, K. A., Kurylko, G., Franco, L., Danhoo, W. & Seeley, R. J.** (2000). A novel selective melanocortin-4 receptor agonist reduces food intake in rats and mice without producing aversive consequences. *J. Neurosci.* **20**, 3442-3448.

- Berne, C., Fagius, J., Pollare, T. & Hjendahl, P.** (1992). The sympathetic response to euglycaemic hyperinsulinaemia. Evidence from microelectrode nerve recordings in healthy subjects. *Diabetologia* **35**, 873-879.
- Blakesley, V. A., Scrimgeour, A., Esposito, D. & Le, R. D.** (1996). Signaling via the insulin-like growth factor-I receptor: does it differ from insulin receptor signaling? *Cytokine Growth Factor Rev.* **7**, 153-159.
- Blevins, J. E., Schwartz, M. W. & Baskin, D. G.** (2002). Peptide signals regulating food intake and energy homeostasis. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **80**, 396-406.
- Born, J., Lange, T., Kern, W., McGregor, G. P., Bickel, U. & Fehm, H. L.** (2002). Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat. Neurosci.* **5**, 514-516.
- Brange, J., Owens, D. R., Kang, S. & Volund, A.** (1990). Monomeric insulins and their experimental and clinical implications. *Diabetes Care* **13**, 923-954.
- Brange, J. & Volund, A.** (1999). Insulin analogs with improved pharmacokinetic profiles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **35**, 307-335.
- Brown, L. M., Clegg, D. J., Benoit, S. C. & Woods, S. C.** (2006). Intraventricular insulin and leptin reduce food intake and body weight in C57BL/6J mice. *Physiol Behav.* **89**, 687-691.
- Bruning, J. C., Gautam, D., Burks, D. J., Gillette, J., Schubert, M., Orban, P. C., Klein, R., Krone, W., Muller-Wieland, D. & Kahn, C. R.** (2000). Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science* **289**, 2122-2125.
- Carbone, K. M., Duchala, C. S., Griffin, J. W., Kincaid, A. L. & Narayan, O.** (1987). Pathogenesis of Borna disease in rats: evidence that intra-axonal spread is the major route for virus dissemination and the determinant for disease incubation. *J. Virol.* **61**, 3431-3440.
- Clegg, D. J., Brown, L. M., Woods, S. C. & Benoit, S. C.** (2006). Gonadal hormones determine sensitivity to central leptin and insulin. *Diabetes* **55**, 978-987.
- Clegg, D. J., Riedy, C. A., Smith, K. A., Benoit, S. C. & Woods, S. C.** (2003). Differential sensitivity to central leptin and insulin in male and female rats. *Diabetes* **52**, 682-687.
- Cone, R. D., Cowley, M. A., Butler, A. A., Fan, W., Marks, D. L. & Low, M. J.** (2001). The arcuate nucleus as a conduit for diverse signals relevant to energy homeostasis. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **25 Suppl 5**, S63-S67.
- Craft, S., Asthana, S., Cook, D. G., Baker, L. D., Cherrier, M., Purganan, K., Wait, C., Petrova, A., Latendresse, S., Watson, G. S., Newcomer, J. W., Schellenberg, G. D. & Krohn, A. J.** (2003). Insulin dose-response effects on memory and plasma amyloid precursor protein in Alzheimer's disease: interactions with apolipoprotein E genotype. *Psychoneuroendocrinology* **28**, 809-822.

- Craft, S., Asthana, S., Newcomer, J. W., Wilkinson, C. W., Matos, I. T., Baker, L. D., Cherrier, M., Lofgreen, C., Latendresse, S., Petrova, A., Plymate, S., Raskind, M., Grimwood, K. & Veith, R. C.** (1999). Enhancement of memory in Alzheimer disease with insulin and somatostatin, but not glucose. *Arch. Gen. Psychiatry* **56**, 1135-1140.
- Craft, S., Newcomer, J., Kanne, S., gogo-Jack, S., Cryer, P., Sheline, Y., Luby, J., gogo-Jack, A. & Alderson, A.** (1996). Memory improvement following induced hyperinsulinemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **17**, 123-130.
- Craft, S., Peskind, E., Schwartz, M. W., Schellenberg, G. D., Raskind, M. & Porte, D., Jr.** (1998). Cerebrospinal fluid and plasma insulin levels in Alzheimer's disease: relationship to severity of dementia and apolipoprotein E genotype. *Neurology* **50**, 164-168.
- Craft, S. & Watson, G. S.** (2004). Insulin and neurodegenerative disease: shared and specific mechanisms. *Lancet Neurol.* **3**, 169-178.
- Cummings, D. E., Purnell, J. Q., Frayo, R. S., Schmidova, K., Wisse, B. E. & Weigle, D. S.** (2001). A preprandial rise in plasma ghrelin levels suggests a role in meal initiation in humans. *Diabetes* **50**, 1714-1719.
- Davila, D., Piriz, J., Trejo, J. L., Nunez, A. & Torres-Aleman, I.** (2007). Insulin and insulin-like growth factor I signalling in neurons. *Front Biosci.* **12**, 3194-3202.
- Davis, S. N., Colburn, C., Dobbins, R., Nadeau, S., Neal, D., Williams, P. & Cherrington, A. D.** (1995). Evidence that the brain of the conscious dog is insulin sensitive. *J. Clin. Invest* **95**, 593-602.
- Davis, S. N., Dunham, B., Walmsley, K., Shavers, C., Neal, D., Williams, P. & Cherrington, A. D.** (1997). Brain of the conscious dog is sensitive to physiological changes in circulating insulin. *Am. J. Physiol* **272**, E567-E575.
- Dickson, B. J.** (2003). Development. Wiring the brain with insulin. *Science* **300**, 440-441.
- Dodt, C., Keyser, B., Molle, M., Fehm, H. L. & Elam, M.** (2000). Acute suppression of muscle sympathetic nerve activity by hydrocortisone in humans. *Hypertension* **35**, 758-763.
- Dodt, C., Wallin, G., Fehm, H. L. & Elam, M.** (1998). The stress hormone adrenocorticotropin enhances sympathetic outflow to the muscle vascular bed in humans. *J. Hypertens.* **16**, 195-201.
- Dudai, Y.** (2004). The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? *Annu. Rev. Psychol.* **55**, 51-86.
- Eichenbaum, H.** (1999). The hippocampus and mechanisms of declarative memory. *Behav. Brain Res.* **103**, 123-133.
- Eichenbaum, H.** (2000). A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat. Rev. Neurosci.* **1**, 41-50.

- Eichenbaum, H.** (2004). Hippocampus: cognitive processes and neural representations that underlie declarative memory. *Neuron* **44**, 109-120.
- Ellacott, K. L. & Cone, R. D.** (2004). The central melanocortin system and the integration of short- and long-term regulators of energy homeostasis. *Recent Prog. Horm. Res.* **59**, 395-408.
- Evans, J. & Hastings, L.** (1992). Accumulation of Cd(II) in the CNS depending on the route of administration: intraperitoneal, intratracheal, or intranasal. *Fundam. Appl. Toxicol.* **19**, 275-278.
- Fan, W., Boston, B. A., Kesterson, R. A., Hruby, V. J. & Cone, R. D.** (1997). Role of melanocortineric neurons in feeding and the agouti obesity syndrome. *Nature* **385**, 165-168.
- Fehm, H. L., Smolnik, R., Kern, W., McGregor, G. P., Bickel, U. & Born, J.** (2001). The melanocortin melanocyte-stimulating hormone/adrenocorticotropin(4-10) decreases body fat in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **86**, 1144-1148.
- Figlewicz, D. P., Brot, M. D., McCall, A. L. & Szot, P.** (1996). Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res.* **736**, 54-60.
- Figlewicz, D. P., Dorsa, D. M., Stein, L. J., Baskin, D. G., Paquette, T., Greenwood, M. R., Woods, S. C. & Porte, D., Jr.** (1985). Brain and liver insulin binding is decreased in Zucker rats carrying the 'fa' gene. *Endocrinology* **117**, 1537-1543.
- Figlewicz, D. P., Sipols, A. J., Seeley, R. J., Chavez, M., Woods, S. C. & Porte, D., Jr.** (1995). Intraventricular insulin enhances the meal-suppressive efficacy of intraventricular cholecystokinin octapeptide in the baboon. *Behav. Neurosci.* **109**, 567-569.
- Figlewicz, D. P. & Szot, P.** (1991). Insulin stimulates membrane phospholipid metabolism by enhancing endogenous alpha 1-adrenergic activity in the rat hippocampus. *Brain Res.* **550**, 101-107.
- Florant, G. L., Singer, L., Scheurink, A. J., Park, C. R., Richardson, R. D. & Woods, S. C.** (1991). Intraventricular insulin reduces food intake and body weight of marmots during the summer feeding period. *Physiol Behav.* **49**, 335-338.
- Fruehwald-Schultes, B., Born, J., Kern, W., Peters, A. & Fehm, H. L.** (2000). Adaptation of cognitive function to hypoglycemia in healthy men. *Diabetes Care* **23**, 1059-1066.
- Fruehwald-Schultes, B., Kern, W., Bong, W., Wellhoener, P., Kerner, W., Born, J., Fehm, H. L. & Peters, A.** (1999). Supraphysiological hyperinsulinemia acutely increases hypothalamic-pituitary-adrenal secretory activity in humans. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **84**, 3041-3046.
- Gammeltoft, S., Hansen, B. F., Dideriksen, L., Lindholm, A., Schaffer, L., Trub, T., Dayan, A. & Kurtzhals, P.** (1999). Insulin aspart: a novel rapid-acting human insulin analogue. *Expert. Opin. Investig. Drugs* **8**, 1431-1442.

- Gasparini, L. & Xu, H.** (2003). Potential roles of insulin and IGF-1 in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **26**, 404-406.
- Gerald, C., Walker, M. W., Criscione, L., Gustafson, E. L., Batzl-Hartmann, C., Smith, K. E., Vaysse, P., Durkin, M. M., Laz, T. M., Linemeyer, D. L., Schaffhauser, A. O., Whitebread, S., Hofbauer, K. G., Taber, R. I., Branchek, T. A. & Weinshank, R. L.** (1996). A receptor subtype involved in neuropeptide-Y-induced food intake. *Nature* **382**, 168-171.
- Gerozissis, K.** (2003). Brain insulin: regulation, mechanisms of action and functions. *Cell Mol. Neurobiol.* **23**, 1-25.
- Golden, C. J.** (1975). A group version of the stroop color and word test. *J. Pers. Assess.* **39**, 386-388.
- Hall, J. E., Brands, M. W., Hildebrandt, D. A., Kuo, J. & Fitzgerald, S.** (2000). Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hypertension. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**, 605-618.
- Hallschmid, M., Benedict, C., Born, J., Fehm, H. L. & Kern, W.** (2004a). Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man. *Physiol Behav.* **83**, 55-64.
- Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Born, J. & Kern, W.** (2007). Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *Int. J. Obes. (Lond)* .
- Hallschmid, M., Benedict, C., Schultes, B., Fehm, H. L., Born, J. & Kern, W.** (2004b). Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes* **53**, 3024-3029.
- Havrankova, J., Schmechel, D., Roth, J. & Brownstein, M.** (1978). Identification of insulin in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **75**, 5737-5741.
- Hermansen, K., Fontaine, P., Kukulja, K. K., Peterkova, V., Leth, G. & Gall, M. A.** (2004). Insulin analogues (insulin detemir and insulin aspart) versus traditional human insulins (NPH insulin and regular human insulin) in basal-bolus therapy for patients with type 1 diabetes. *Diabetologia* **47**, 622-629.
- Hildebrandt, D. A., Smith, M. J., Jr. & Hall, J. E.** (1999). Cardiovascular regulation during insulin infusion into the carotid or vertebral artery in dogs. *J. Hypertens.* **17**, 251-260.
- Huang, L. & Li, C.** (2000). Leptin: a multifunctional hormone. *Cell Res.* **10**, 81-92.
- Huszar, D., Lynch, C. A., Fairchild-Huntress, V., Dunmore, J. H., Fang, Q., Berkemeier, L. R., Gu, W., Kesterson, R. A., Boston, B. A., Cone, R. D., Smith, F. J., Campfield, L. A., Burn, P. & Lee, F.** (1997). Targeted disruption of the melanocortin-4 receptor results in obesity in mice. *Cell* **88**, 131-141.
- Illum, L.** (2000). Transport of drugs from the nasal cavity to the central nervous system. *Eur. J. Pharm. Sci.* **11**, 1-18.

- Kaiyala, K. J., Prigeon, R. L., Kahn, S. E., Woods, S. C. & Schwartz, M. W.** (2000). Obesity induced by a high-fat diet is associated with reduced brain insulin transport in dogs. *Diabetes* **49**, 1525-1533.
- Kang, S., Creagh, F. M., Peters, J. R., Brange, J., Volund, A. & Owens, D. R.** (1991). Comparison of subcutaneous soluble human insulin and insulin analogues (AspB9, GluB27; AspB10; AspB28) on meal-related plasma glucose excursions in type I diabetic subjects. *Diabetes Care* **14**, 571-577.
- Kennedy, G. C.** (1952). The role of depot fat in the hypothalamic control of food intake in the rat. *Proceedings of the royal society of London, Series B* **140**, 578-592.
- Kern, W., Benedict, C., Schultes, B., Plohr, F., Moser, A., Born, J., Fehm, H. L. & Hallschmid, M.** (2006). Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia* **49**, 2790-2792.
- Kern, W., Born, J., Schreiber, H. & Fehm, H. L.** (1999). Central nervous system effects of intranasally administered insulin during euglycemia in men. *Diabetes* **48**, 557-563.
- Kern, W., Fittje, A., Fohr, W., Kerner, W., Born, J. & Fehm, H. L.** (2000). Increase in systolic blood pressure and catecholamine level during hyperinsulinemia in a placebo-controlled euglycemic clamp in healthy subjects. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **108**, 498-505.
- Kern, W., Peters, A., Born, J., Fehm, H. L. & Schultes, B.** (2005). Changes in blood pressure and plasma catecholamine levels during prolonged hyperinsulinemia. *Metabolism* **54**, 391-396.
- Kern, W., Peters, A., Fruehwald-Schultes, B., Deininger, E., Born, J. & Fehm, H. L.** (2001). Improving influence of insulin on cognitive functions in humans. *Neuroendocrinology* **74**, 270-280.
- Kessels, R. P., de Haan, E. H., Kappelle, L. J. & Postma, A.** (2001). Varieties of human spatial memory: a meta-analysis on the effects of hippocampal lesions. *Brain Res. Brain Res. Rev.* **35**, 295-303.
- Kristensson, K. & Olsson, Y.** (1971). Uptake of exogenous proteins in mouse olfactory cells. *Acta Neuropathol.* **19**, 145-154.
- Krompecher, I.** (1954). Development of the connective tissue and its capacity of transformation. *Acta Morphol. Acad. Sci. Hung.* **4**, 113-117.
- Krug, R., Born, J. & Rasch, B.** (2006). A 3-day estrogen treatment improves prefrontal cortex-dependent cognitive function in postmenopausal women. *Psychoneuroendocrinology* **31**, 965-975.
- Kurtzhals, P., Schaffer, L., Sorensen, A., Kristensen, C., Jonassen, I., Schmid, C. & Trub, T.** (2000). Correlations of receptor binding and metabolic and mitogenic potencies of insulin analogs designed for clinical use. *Diabetes* **49**, 999-1005.

- 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**, 1199-1208.
- Lee, K., Li, B., Xi, X., Suh, Y. & Martin, R. J.** (2005). Role of neuronal energy status in the regulation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, orexigenic neuropeptides expression, and feeding behavior. *Endocrinology* **146**, 3-10.
- Liu, L., Brown, J. C., III, Webster, W. W., Morrisett, R. A. & Monaghan, D. T.** (1995). Insulin potentiates N-methyl-D-aspartate receptor activity in *Xenopus* oocytes and rat hippocampus. *Neurosci. Lett.* **192**, 5-8.
- Lu, D., Willard, D., Patel, I. R., Kadwell, S., Overton, L., Kost, T., Luther, M., Chen, W., Woychik, R. P., Wilkison, W. O. & .** (1994). Agouti protein is an antagonist of the melanocyte-stimulating-hormone receptor. *Nature* **371**, 799-802.
- Marfaing, P., Penicaud, L., Broer, Y., Mraovitch, S., Calando, Y. & Picon, L.** (1990). Effects of hyperinsulinemia on local cerebral insulin binding and glucose utilization in normoglycemic awake rats. *Neurosci. Lett.* **115**, 279-285.
- Mayer, J.** (1955). Regulation of energy intake and the body weight: the glucostatic theory and the lipostatic hypothesis. *Ann NY Acad Sci* **63**, 15-43.
- Melnyk, R. B.** (1987). Decreased binding to hypothalamic insulin receptors in young genetically obese rats. *Physiol Behav.* **40**, 237-241.
- Menendez, J. A. & Atrens, D. M.** (1991). Insulin and the paraventricular hypothalamus: modulation of energy balance. *Brain Res.* **555**, 193-201.
- Messier, C. & Teutenberg, K.** (2005). The role of insulin, insulin growth factor, and insulin-degrading enzyme in brain aging and Alzheimer's disease. *Neural Plast.* **12**, 311-328.
- Miyamoto, E.** (2006). Molecular mechanism of neuronal plasticity: induction and maintenance of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Pharmacol. Sci.* **100**, 433-442.
- Miyazato, J., Horio, T., Takishita, S. & Kawano, Y.** (2002). Fasting plasma glucose is an independent determinant of left ventricular diastolic dysfunction in nondiabetic patients with treated essential hypertension. *Hypertens. Res.* **25**, 403-409.
- Morton, G. J., Cummings, D. E., Baskin, D. G., Barsh, G. S. & Schwartz, M. W.** (2006). Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* **443**, 289-295.
- Muntzel, M. S., Anderson, E. A., Johnson, A. K. & Mark, A. L.** (1995). Mechanisms of insulin action on sympathetic nerve activity. *Clin. Exp. Hypertens.* **17**, 39-50.
- O'Kusky, J. R., Ye, P. & D'Ercole, A. J.** (2000). Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci.* **20**, 8435-8442.

- Ollmann, M. M., Wilson, B. D., Yang, Y. K., Kerns, J. A., Chen, Y., Gantz, I. & Barsh, G. S.** (1997). Antagonism of central melanocortin receptors in vitro and in vivo by agouti-related protein. *Science* **278**, 135-138.
- Palovcik, R. A., Phillips, M. I., Kappy, M. S. & Raizada, M. K.** (1984). Insulin inhibits pyramidal neurons in hippocampal slices. *Brain Res.* **309**, 187-191.
- Park, C. R., Seeley, R. J., Craft, S. & Woods, S. C.** (2000). Intracerebroventricular insulin enhances memory in a passive-avoidance task. *Physiol Behav.* **68**, 509-514.
- Peinado, J. M. & Myers, R. D.** (1987). Norepinephrine release from PVN and lateral hypothalamus during perfusion with 2-DG or insulin in the sated and fasted rat. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **27**, 715-721.
- Peters, A., Schweiger, U., Pellerin, L., Hubold, C., Oltmanns, K. M., Conrad, M., Schultes, B., Born, J. & Fehm, H. L.** (2004). The selfish brain: competition for energy resources. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **28**, 143-180.
- Petrides, M., Alivisatos, B., Meyer, E. & Evans, A. C.** (1993). Functional activation of the human frontal cortex during the performance of verbal working memory tasks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **90**, 878-882.
- Plihal, W. & Born, J.** (1999). Effects of early and late nocturnal sleep on priming and spatial memory. *Psychophysiology* **36**, 571-582.
- Pons, S. & Torres-Aleman, I.** (1993). Estradiol modulates insulin-like growth factor I receptors and binding proteins in neurons from the hypothalamus. *J. Neuroendocrinol.* **5**, 267-271.
- Porte, D., Jr., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W.** (2002). Leptin and insulin action in the central nervous system. *Nutr. Rev.* **60**, S20-S29.
- Porte, D., Jr., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W.** (2005). Insulin signaling in the central nervous system: a critical role in metabolic homeostasis and disease from *C. elegans* to humans. *Diabetes* **54**, 1264-1276.
- Porte, D., Jr., Seeley, R. J., Woods, S. C., Baskin, D. G., Figlewicz, D. P. & Schwartz, M. W.** (1998). Obesity, diabetes and the central nervous system. *Diabetologia* **41**, 863-881.
- Porte, D., Jr. & Woods, S. C.** (1981). Regulation of food intake and body weight in insulin. *Diabetologia* **20 Suppl**, 274-280.
- Postman, L.** (1962). The temporal course of proactive inhibition for serial lists. *J. Exp. Psychol.* **63**, 361-369.
- Quesada, A. & Micevych, P. E.** (2004). Estrogen interacts with the IGF-1 system to protect nigrostriatal dopamine and maintain motoric behavior after 6-hydroxydopamine lesions. *J. Neurosci. Res.* **75**, 107-116.
- Raposinho, P. D., Pedrazzini, T., White, R. B., Palmiter, R. D. & Aubert, M. L.** (2004). Chronic neuropeptide Y infusion into the lateral ventricle induces sustained

- feeding and obesity in mice lacking either Npy1r or Npy5r expression. *Endocrinology* **145**, 304-310.
- Raslova, K., Bogoev, M., Raz, I., Leth, G., Gall, M. A. & Hancu, N.** (2004). Insulin detemir and insulin aspart: a promising basal-bolus regimen for type 2 diabetes. *Diabetes Res. Clin. Pract.* **66**, 193-201.
- Rea, R. F., Eckberg, D. L., Fritsch, J. M. & Goldstein, D. S.** (1990). Relation of plasma norepinephrine and sympathetic traffic during hypotension in humans. *Am. J. Physiol* **258**, R982-R986.
- Reger, M. A., Watson, G. S., Frey, W. H., Baker, L. D., Cholerton, B., Keeling, M. L., Belongia, D. A., Fishel, M. A., Plymate, S. R., Schellenberg, G. D., Cherrier, M. M. & Craft, S.** (2005). Effects of intranasal insulin on cognition in memory-impaired older adults: Modulation by APOE genotype. *Neurobiol. Aging* .
- Reger, M. A., Watson, G. S., Green, P. S., Wilkinson, C. W., Baker, L. D., Cholerton, B., Fishel, M. A., Plymate, S. R., Breitner, J. C., Degroodt, W., Mehta, P. & Craft, S.** (2007). Intranasal insulin improves cognition and modulates {beta}-amyloid in early AD. *Neurology* .
- Riedy, C. A., Chavez, M., Figlewicz, D. P. & Woods, S. C.** (1995). Central insulin enhances sensitivity to cholecystokinin. *Physiol Behav.* **58**, 755-760.
- Rivera, E. J., Goldin, A., Fulmer, N., Tavares, R., Wands, J. R. & de la Monte, S. M.** (2005). Insulin and insulin-like growth factor expression and function deteriorate with progression of Alzheimer's disease: link to brain reductions in acetylcholine. *J. Alzheimers. Dis.* **8**, 247-268.
- Rohner-Jeanrenaud, F.** (1999). Neuroendocrine regulation of nutrient partitioning. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **892**, 261-271.
- Ross, T. M., Martinez, P. M., Renner, J. C., Thorne, R. G., Hanson, L. R. & Frey, W. H.** (2004). Intranasal administration of interferon beta bypasses the blood-brain barrier to target the central nervous system and cervical lymph nodes: a non-invasive treatment strategy for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **151**, 66-77.
- Roth, R. A., Morgan, D. O., Beaudoin, J. & Sara, V.** (1986). Purification and characterization of the human brain insulin receptor. *J. Biol. Chem.* **261**, 3753-3757.
- Rotte, M., Baerecke, C., Pottag, G., Klose, S., Kanneberg, E., Heinze, H. J. & Lehnert, H.** (2005). Insulin affects the neuronal response in the medial temporal lobe in humans. *Neuroendocrinology* **81**, 49-55.
- Sakane, T., Akizuki, M., Yoshida, M., Yamashita, S., Nadai, T., Hashida, M. & Sezaki, H.** (1991). Transport of cephalexin to the cerebrospinal fluid directly from the nasal cavity. *J. Pharm. Pharmacol.* **43**, 449-451.
- Sara, V. R., Hall, K., Von, H. H., Humbel, R., Sjogren, B. & Wetterberg, L.** (1982). Evidence for the presence of specific receptors for insulin-like growth factors 1 (IGF-1) and 2 (IGF-2) and insulin throughout the adult human brain. *Neurosci. Lett.* **34**, 39-44.

- Scherrer, U. & Sartori, C.** (1997). Insulin as a vascular and sympathoexcitatory hormone: implications for blood pressure regulation, insulin sensitivity, and cardiovascular morbidity. *Circulation* **96**, 4104-4113.
- Schultes, B., Oltmanns, K. M., Kern, W., Fehm, H. L., Born, J. & Peters, A.** (2003). Modulation of hunger by plasma glucose and metformin. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **88**, 1133-1141.
- Schusdziarra, V.** (1985). *Gastrointestinale Hormone und Neuropeptide*. Hohlhammer: Stuttgart.
- Schwartz, M. W., Figlewicz, D. P., Baskin, D. G., Woods, S. C. & Porte, D., Jr.** (1992a). Insulin in the brain: a hormonal regulator of energy balance. *Endocr. Rev.* **13**, 387-414.
- Schwartz, M. W., Sipols, A., Kahn, S. E., Lattemann, D. F., Taborsky, G. J., Jr., Bergman, R. N., Woods, S. C. & Porte, D., Jr.** (1990). Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am. J. Physiol* **259**, E378-E383.
- Schwartz, M. W., Sipols, A. J., Marks, J. L., Sanacora, G., White, J. D., Scheurink, A., Kahn, S. E., Baskin, D. G., Woods, S. C., Figlewicz, D. P. & .** (1992b). Inhibition of hypothalamic neuropeptide Y gene expression by insulin. *Endocrinology* **130**, 3608-3616.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Porte, D., Jr., Seeley, R. J. & Baskin, D. G.** (2000). Central nervous system control of food intake. *Nature* **404**, 661-671.
- Schwartz, M. W., Woods, S. C., Seeley, R. J., Barsh, G. S., Baskin, D. G. & Leibel, R. L.** (2003). Is the energy homeostasis system inherently biased toward weight gain? *Diabetes* **52**, 232-238.
- Seeley, R. J., Matson, C. A., Chavez, M., Woods, S. C., Dallman, M. F. & Schwartz, M. W.** (1996). Behavioral, endocrine, and hypothalamic responses to involuntary overfeeding. *Am. J. Physiol* **271**, R819-R823.
- Seeley, R. J. & Woods, S. C.** (2003). Monitoring of stored and available fuel by the CNS: implications for obesity. *Nat. Rev. Neurosci.* **4**, 901-909.
- Shibata, S., Liou, S. Y., Ueki, S. & Oomura, Y.** (1986). Inhibitory action of insulin on suprachiasmatic nucleus neurons in rat hypothalamic slice preparations. *Physiol Behav.* **36**, 79-81.
- Sipols, A. J., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W.** (1995). Effect of intracerebroventricular insulin infusion on diabetic hyperphagia and hypothalamic neuropeptide gene expression. *Diabetes* **44**, 147-151.
- Skeberdis, V. A., Lan, J., Zheng, X., Zukin, R. S. & Bennett, M. V.** (2001). Insulin promotes rapid delivery of N-methyl-D- aspartate receptors to the cell surface by exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 3561-3566.

- Sommer, T., Rose, M., Glascher, J., Wolbers, T. & Buchel, C.** (2005). Dissociable contributions within the medial temporal lobe to encoding of object-location associations. *Learn. Mem.* **12**, 343-351.
- Squire, L. R. & Zola, S. M.** (1996). Structure and function of declarative and nondeclarative memory systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **93**, 13515-13522.
- Steen, E., Terry, B. M., Rivera, E. J., Cannon, J. L., Neely, T. R., Tavares, R., Xu, X. J., Wands, J. R. & de la Monte, S. M.** (2005). Impaired insulin and insulin-like growth factor expression and signaling mechanisms in Alzheimer's disease--is this type 3 diabetes? *J. Alzheimers. Dis.* **7**, 63-80.
- Stein, L. J., Dorsa, D. M., Baskin, D. G., Figlewicz, D. P., Porte, D., Jr. & Woods, S. C.** (1987). Reduced effect of experimental peripheral hyperinsulinemia to elevate cerebrospinal fluid insulin concentrations of obese Zucker rats. *Endocrinology* **121**, 1611-1615.
- Strachan, M. W.** (2005). Insulin and cognitive function in humans: experimental data and therapeutic considerations. *Biochem. Soc. Trans.* **33**, 1037-1040.
- Strader, A. D. & Woods, S. C.** (2005). Gastrointestinal hormones and food intake. *Gastroenterology* **128**, 175-191.
- Tewes, U.** (1994). Hamburg-Wechsler-Intelligenztest für Erwachsene- Revision Hawie-R. In (ed. Verlag Hans Huber), Bern Göttingen Toronto Seattle.
- Thiele, T. E., van, D. G., Yagaloff, K. A., Fisher, S. L., Schwartz, M., Burn, P. & Seeley, R. J.** (1998). Central infusion of melanocortin agonist MTII in rats: assessment of c-Fos expression and taste aversion. *Am. J. Physiol* **274**, R248-R254.
- Thorne, R. G., Pronk, G. J., Padmanabhan, V. & Frey, W. H.** (2004). Delivery of insulin-like growth factor-I to the rat brain and spinal cord along olfactory and trigeminal pathways following intranasal administration. *Neuroscience* **127**, 481-496.
- Tschop, M., Castaneda, T. R., Joost, H. G., Thone-Reineke, C., Ortmann, S., Klaus, S., Hagan, M. M., Chandler, P. C., Oswald, K. D., Benoit, S. C., Seeley, R. J., Kinzig, K. P., Moran, T. H., Beck-sickinger, A. G., Koglin, N., Rodgers, R. J., Blundell, J. E., Ishii, Y., Beattie, A. H., Holch, P., Allison, D. B., Raun, K., Madsen, K., Wulff, B. S., Stidsen, C. E., Birringer, M., Kreuzer, O. J., Schindler, M., Arndt, K., Rudolf, K., Mark, M., Deng, X. Y., Whitcomb, D. C., Halem, H., Taylor, J., Dong, J., Datta, R., Culler, M., Craney, S., Flora, D., Smiley, D. & Heiman, M. L.** (2004). Physiology: does gut hormone PYY3-36 decrease food intake in rodents? *Nature* **430**, 1.
- Tschritter, O., Preissl, H., Hennige, A. M., Stumvoll, M., Porubska, K., Frost, R., Marx, H., Klosel, B., Lutzenberger, W., Birbaumer, N., Haring, H. U. & Fritsche, A.** (2006). The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: a magnetoencephalographic study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 12103-12108.

- Tulving, E., Kapur, S., Craik, F. I., Moscovitch, M. & Houle, S.** (1994). Hemispheric encoding/retrieval asymmetry in episodic memory: positron emission tomography findings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **91**, 2016-2020.
- Tulving, E. & Schacter, D. L.** (1990). Priming and human memory systems. *Science* **247**, 301-306.
- Unger, J. W., Livingston, J. N. & Moss, A. M.** (1991). Insulin receptors in the central nervous system: localization, signalling mechanisms and functional aspects. *Prog. Neurobiol.* **36**, 343-362.
- Underwood, B. J.** (1957). Interference and forgetting. *Psychol. Rev.* **64**, 49-60.
- Vallbo, A. B., Hagbarth, K. E., Torebjork, H. E. & Wallin, B. G.** (1979). Somatosensory, proprioceptive, and sympathetic activity in human peripheral nerves. *Physiol Rev.* **59**, 919-957.
- van der Heide, L. P., Kamal, A., Artola, A., Gispen, W. H. & Ramakers, G. M.** (2005). Insulin modulates hippocampal activity-dependent synaptic plasticity in a N-methyl-d-aspartate receptor and phosphatidyl-inositol-3-kinase-dependent manner. *J. Neurochem.* **94**, 1158-1166.
- van Houten, H. M., Nance, D. M., Gauthier, S. & Posner, B. I.** (1983). Origin of insulin-receptive nerve terminals in rat median eminence. *Endocrinology* **113**, 1393-1399.
- Voll, C. L., Whishaw, I. Q. & Auer, R. N.** (1989). Postischemic insulin reduces spatial learning deficit following transient forebrain ischemia in rats. *Stroke* **20**, 646-651.
- Wada, A., Yokoo, H., Yanagita, T. & Kobayashi, H.** (2005). New twist on neuronal insulin receptor signaling in health, disease, and therapeutics. *J. Pharmacol. Sci.* **99**, 128-143.
- Wallace, T. M. & Matthews, D. R.** (2002). The assessment of insulin resistance in man. *Diabet. Med.* **19**, 527-534.
- Wallace, W. C., Akar, C. A., Lyons, W. E., Kole, H. K., Egan, J. M. & Wolozin, B.** (1997). Amyloid precursor protein requires the insulin signaling pathway for neurotrophic activity. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **52**, 213-227.
- Wallum, B. J., Taborsky, G. J., Jr., Porte, D., Jr., Figlewicz, D. P., Jacobson, L., Beard, J. C., Ward, W. K. & Dorsa, D.** (1987). Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab* **64**, 190-194.
- Wan, Q., Xiong, Z. G., Man, H. Y., Ackerley, C. A., Braunton, J., Lu, W. Y., Becker, L. E., MacDonald, J. F. & Wang, Y. T.** (1997). Recruitment of functional GABA(A) receptors to postsynaptic domains by insulin. *Nature* **388**, 686-690.
- Whitworth, J. A., Brown, M. A., Kelly, J. J. & Williamson, P. M.** (1995). Mechanisms of cortisol-induced hypertension in humans. *Steroids* **60**, 76-80.

- Whitworth, J. A., Williamson, P. M., Mangos, G. & Kelly, J. J.** (2005). Cardiovascular consequences of cortisol excess. *Vasc. Health Risk Manag.* **1**, 291-299.
- Wickelgren, I.** (1998). Tracking insulin to the mind. *Science* **280**, 517-519.
- Willesen, M. G., Kristensen, P. & Romer, J.** (1999). Co-localization of growth hormone secretagogue receptor and NPY mRNA in the arcuate nucleus of the rat. *Neuroendocrinology* **70**, 306-316.
- Woods, S. C., Chavez, M., Park, C. R., Riedy, C., Kaiyala, K., Richardson, R. D., Figlewicz, D. P., Schwartz, M. W., Porte, D., Jr. & Seeley, R. J.** (1996). The evaluation of insulin as a metabolic signal influencing behavior via the brain. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **20**, 139-144.
- Woods, S. C., Lotter, E. C., McKay, L. D. & Porte, D., Jr.** (1979). Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. *Nature* **282**, 503-505.
- Woods, S. C. & Seeley, R. J.** (2000). Adiposity signals and the control of energy homeostasis. *Nutrition* **16**, 894-902.
- Woods, S. C. & Seeley, R. J.** (2001). Insulin as an adiposity signal. *Int. J. Obes. Relat Metab Disord.* **25 Suppl 5**, S35-S38.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Baskin, D. G. & Schwartz, M. W.** (2003). Insulin and the blood-brain barrier. *Curr. Pharm. Des* **9**, 795-800.
- Woods, S. C., Seeley, R. J., Porte, D., Jr. & Schwartz, M. W.** (1998). Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* **280**, 1378-1383.
- Xu, W. H., Huber, R. & Riepe, M. W.** (2007). Gender- and region-specific expression of insulin receptor protein in mouse brain: effect of mild inhibition of oxidative phosphorylation. *J. Neural Transm.* **114**, 373-377.
- Yaswen, L., Diehl, N., Brennan, M. B. & Hochgeschwender, U.** (1999). Obesity in the mouse model of pro-opiomelanocortin deficiency responds to peripheral melanocortin. *Nat. Med.* **5**, 1066-1070.
- Zhao, W., Chen, H., Xu, H., Moore, E., Meiri, N., Quon, M. J. & Alkon, D. L.** (1999). Brain insulin receptors and spatial memory. Correlated changes in gene expression, tyrosine phosphorylation, and signaling molecules in the hippocampus of water maze trained rats. *J. Biol. Chem.* **274**, 34893-34902.
- Zhao, W. Q. & Alkon, D. L.** (2001). Role of insulin and insulin receptor in learning and memory. *Mol. Cell Endocrinol.* **177**, 125-134.
- Zhao, W. Q., Chen, H., Quon, M. J. & Alkon, D. L.** (2004). Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur. J. Pharmacol.* **490**, 71-81.
- Zimanyi, I. A., Fathi, Z. & Poindexter, G. S.** (1998). Central control of feeding behavior by neuropeptide Y. *Curr. Pharm. Des* **4**, 349-366.

Danksagung

Mein Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Jan Born, der mich während meiner Promotionszeit immer vorbildlich betreut und mich wissenschaftlich inspiriert hat. Weiterhin danke ich Prof. Dr. Horst-Lorenz Fehm, Dr. Manfred Hallschmid und allen anderen Mitgliedern des Institutes für Neuroendokrinologie.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christian Benedict, geb. Zabukovec

Adresse: Sedanstraße 3
23554 Lübeck
Tel. 0451-88 94 816

Geburtstag: 11.12.1976

Geburtsort: Hamburg

Familienstand: verheiratet / 5 Kinder

Schulbildung:

1996 Dorothea-Schlözer-Schule in Lübeck; Abschluss: Abitur

Zivildienst:

1996 - 1997 Radiologie – Angiographie, Medizinische Universität zu Lübeck

Studium:

WS 1997/98 –

WS 02/03 Studium der Ökotoxikologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel; Abschluss: Diplom (Note: sehr gut)

Beruflicher Werdegang:

seit 2003 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für Neuroendokrinologie der Medizinischen Universität zu Lübeck

Wissenschaftliche Auszeichnung:

2006 Silvia-King-Preis der Deutschen-Diabetes-Gesellschaft (DDG) für die Arbeit „Immediate but not long-term intranasal administration of insulin raises blood pressure in human beings“

Lübeck, den 26.09.2008

Publikationsliste Christian Benedict (Stand: 26.09.2008)

Originalarbeiten

1. Benedict C, Kern W, Schultes B, Born J, and Hallschmid M. Differential sensitivity of men and women to anorexigenic and memory improving effects of intranasal insulin. *J Clin Endocrinol Metab*, 2008 Apr;93(4):1339-44.
2. Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Born J, Kern W. Obese men respond to cognitive but not to catabolic brain insulin signaling. *Int J Obes (Lond)*, in press
3. Benedict C, Dimitrov S, Marshall L, Born J. Sleep enhances serum interleukin-7 concentrations in humans. *Brain Behav Immun*. 2007 Nov;21(8):1058-62.
4. Benedict C, Ghio AJ, Gehring H, Schultes B, Peters A, Oltmanns KM. Transient hypoxia and downregulation of circulating prohepcidin concentrations in healthy young men. *Haematologica*. 2007 Jan; 92: 125-126.
5. Benedict C, Hallschmid M, Schmitz K, Schultes B, Ratter F, Fehm HL, Born J, Kern W. Intranasal Insulin Improves Memory in Humans: Superiority of Insulin Aspart. *Neuropsychopharmacology*. 2007 Jan;32(1):239-43.
6. Kern W, Benedict C, Schultes B, Plohr F, Moser A, Born J, Fehm HL, Hallschmid M. Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia*. 2006 Nov;49(11):2790-2.
7. Dimitrov S, Lange T, Benedict C, Nowell MA, Jones SA, Scheller J, Rose-John S, Born J. Sleep enhances IL-6 trans-signaling in humans. *FASEB J*. 2006 Oct;20(12):2174-6.
8. Schultes B, Peters A, Hallschmid M, Benedict C, Merl V, Oltmanns KM, Born J, Fehm HL, Kern W. Modulation of food intake by glucose in patients with type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2005 Dec;28(12):2884-9.

9. Benedict C, Dodt C, Hallschmid M, Lepiorz M, Fehm HL, Born J, Kern W. Immediate but not long-term intranasal administration of insulin raises blood pressure in human beings. *Metabolism*. 2005 Oct;54(10):1356-61.
10. Benedict C, Hallschmid M, Scheibner J, Niemeyer D, Schultes B, Merl V, Fehm HL, Born J, Kern W. Gut protein uptake and mechanisms of meal-induced cortisol release. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Mar;90(3):1692-6. Epub 2004 Dec 7.
11. Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W. Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes*. 2004 Nov;53(11):3024-9.
12. Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, Kern W. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*. 2004 Nov;29(10):1326-34.

Übersichtsarbeiten

1. Hallschmid M, Benedict C, Born J, Kern W (2007). Targeting metabolic and cognitive pathways of the CNS by intranasal insulin administration. *Expert Opin Drug Deliv*. 2007 Jul;4(4):319-22.
2. Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Perras B, Fehm HL, Kern W, Born J (2007). Towards the therapeutic use of intranasal neuropeptide administration in metabolic and cognitive disorders. *Regulatory peptides*, in press.
3. Benedict C, Hallschmid M, Schultes B, Born J, Kern W (2007). Minireview: Intranasal insulin to improve memory in humans. *Neuroendocrinology*. 2007;86(2):136-42.
4. Hallschmid M, Benedict C, Born J, Fehm HL, Kern W. Manipulating central nervous mechanisms of food intake and body weight regulation by intranasal administration of neuropeptides in man. *Physiol Behav*. 2004 Oct 30;83(1):55-64. Review.