

Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen Abteilung Innere Medizin IV
Schwerpunkt: Endokrinologie und Diabetologie, Angiologie,
Nephrologie und klinische Chemie

Die zentralnervöse Wirkung von Insulin auf die
periphere Insulinsensitivität

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von

Benkendorff, Charlotte Friederike Helga Corinna

2018

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. A. Fritsche

2. Berichterstatter: Professor Dr. R. Lobmann

Gewidmet meinem Vater

<u>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</u>	<u>4</u>
<u>1 EINLEITUNG</u>	<u>7</u>
1. DIABETES MELLITUS TYP 2.....	7
2. INSULINWIRKUNG IM GEHIRN	8
2.1. WIRKUNG IM MAUSMODELL	8
1.2.2 WIRKUNG BEIM MENSCHEN.....	9
3. INSULINSENSITIVITÄT DES KÖRPERS	10
3.1. REGULATION DER INSULINSENSITIVITÄT.....	10
3.2. EINFLUSS DES GEHIRNS AUF DIE INSULINSENSITIVITÄT	11
4. EINFLUSS DES GEHIRNS AUF DIE LIPOLYSE	11
5. MÖGLICHEN EINFLUSS DES GEHIRNS AUF DAS CHOLESTERIN	12
1.6 FRAGESTELLUNG	13
<u>2 MATERIAL UND METHODEN</u>	<u>14</u>
2.1 STUDIENAUFBAU	14
2.2 PROBANDEN	14
2.2.1 EINSCHLUSSKRITERIEN UND TEILNAHMEVORRAUSSETZUNGEN	14
2.2.1 TEILNEHMER.....	15
2.3 VERSUCHSPROTOKOLL.....	15
2.3.1 EUGLYKÄMISCHER HYPERINSULINÄMISCHER GLUKOSE CLAMP	16
2.3.2 INTRANASALE INSULINGABE.....	17
2.4 MATERIALIEN	18
2.5 BLUTENTNAHMEN.....	18
2.6 MESSUNGEN	19
2.6.1 BLUTGLUKOSESPIEGEL UND HBA1C	19
2.6.2 LABORPARAMETER.....	19
2.7 BERECHNUNGEN	19
2.8 STATISTISCHE AUSWERTUNG	20
<u>3 ERGEBNISSE</u>	<u>21</u>

3.1 PROBANDENCHARAKTERISTIKA	21
3.2 INSULINSENSITIVITÄT IM HYPERINSULINÄMEN EUGLYKÄMISCHEN CLAMP.....	22
3.2.1 NORMALGEWICHTIGE	23
3.2.2 ÜBERGEWICHTIGE.....	28
3.2.3 VERGLEICH NORMALGEWICHTIGE VERSUS ÜBERGEWICHTIGE.....	32
3.3 FREIE FETTSÄUREN IM PLASMA.....	34
3.3.1 NORMALGEWICHTIGE	34
3.3.2 ÜBERGEWICHTIGE.....	36
3.4 HDL- UND LDL-CHOLESTERIN IM PLASMA	37
3.4.1 NORMALGEWICHTIGE	38
3.4.2 ÜBERGEWICHTIGE.....	40
<u>4 DISKUSSION.....</u>	43
4.1 PROBANDENCHARAKTERISTIKA	43
4.2 VERBESSERUNG DER INSULINSENSITIVITÄT DURCH INTRANASALES INSULINSPRAY	45
4.2.1 MESSUNG DER INSULINSENSITIVITÄT BEIM MENSCHEN	45
4.2.2 ÄNDERUNG DER INSULINSENSITIVITÄT IN DER KOHORTE DER NORMALGEWICHTIGEN.....	47
4.2.2 EINFLUSSFAKTOR ÜBERGEWICHT	48
4.2.3 EINFLUSSFAKTOR ALTER	50
4.2.4 KURZZEITIGER PLASMAINSULINANSTIEG NACH SPRAYAPPLIKATION.....	50
4.3 WIRKUNG VON INTRANASALEM INSULINSPRAY AUF DIE LIPOLYSE.....	53
4.4 WIRKUNG VON INTRANASALEM INSULINSPRAY AUF HDL-UND LDL-CHOLESTERIN.....	54
4.5 LIMITATIONEN	55
4.6 AUSBLICK.....	55
4.7 ZUSAMMENFASSUNG	56
<u>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	58
<u>7 DANKSAGUNG.....</u>	66
<u>8 ERKLÄRUNG ZUM EIGENANTEIL DER DISSERTATIONSSCHRIFT ..</u>	

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
ANOVA	Varianzanalyse
BMI	Body-Mass-Index
CLIA	Clinical Laboratory Improvement Amendments
CRP	C-reaktives Protein
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
fMRT	Funktionelle Magnetresonanztomographie
GIR	Glukoseinfusionsrate
Hb	Hämoglobin
Hb1Ac	Glykiertes Hämoglobin
HDL	High Density Lipoprotein
HOMA-IR	Homeostasis Model Assessment für Insulinresistenz
IGF-2	Insulin-like growth faktor
IS	Insulinsensitivität
ISI	Insulinsensitivitätsindex
IU	Internationale Units
KG	Körpergewicht
LDL	Low Density Lipoprotein
MANOVA	Multivariate Varianzanalyse
MRT	Magnetresonanztomographie
NaCl	Natriumchlorid
p	p-Wert
SREBP-2	Sterol regulatory element-binding protein-2
TSH	Tyreotropin
U	Units
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1. Diabetes Mellitus Typ 2

Diabetes Mellitus Typ 2 ist eine Stoffwechselerkrankung, die immer mehr Menschen betrifft. Früher auch als Alterszucker bezeichnet, erkranken heutzutage zum Teil schon Jugendliche an Diabetes Typ 2. Als Risikofaktoren gelten vor allem Übergewicht und Bewegungsmangel (1). Dabei kommt es zu sehr unterschiedlichen Ausprägungen des Krankheitsbildes, wobei besonders die mikro- und makroangiopatischen Folgeerkrankungen schwerwiegende Komplikationen darstellen. Die Heterogenität lässt sich durch Umweltfaktoren und genetische Prädisposition erklären (2)(3). Der meist schleichende Beginn ist oft vergesellschaftet mit den als Metabolisches Syndrom zusammengefassten Änderungen der Stoffwechsellage. Dazu gehören eine stammbetonte Adipositas, Insulinresistenz, erhöhter Blutdruck sowie eine Störung im Lipidstoffwechsel (4)

Zwei Faktoren spielen bei der Pathogenese primär eine Rolle. Der erste Faktor ist eine Insulinresistenz der Körperzellen, das heißt die Zellen sprechen schlechter auf Insulin an und benötigen immer größere Mengen für dieselbe Funktion. Dazu kommt eine gestörte Insulinsekretion in den Betazellen des Pankreas. Die Kombination dieser beiden Faktoren führt zu einem Defekt in der Glukose-Homöostase (3). Die eigentlich insulinsensitiven Zielgewebe Fettgewebe, Skelettmuskulatur und Leber reagieren immer schlechter auf die Insulinwirkung, was zu einer Störung der Glukoseaufnahme in die Zellen führt (5)(6). Gleichzeitig wird die hepatische Glukoneogenese unzureichend supprimiert, so dass trotz hohem Blutglukosespiegel weitere Glukose gebildet wird (7).

Goldstandard zur Beurteilung der individuellen Insulinsensitivität bzw. Insulinresistenz ist der hyperinsulinämische euglykämische Glukose Clamp. Bei diesem Test wird die Insulinwirkung auf die Glukoseaufnahme bestimmt. Die Insulindosis bleibt konstant, während die Glukoselaufrate so angepasst wird, dass der Blutglukosespiegel konstant im euglykämischen Bereich bleibt. Das

Verhältnis von erforderlicher Glukose zur konstanten Insulindosis kann zur Bestimmung der individuellen Insulinsensitivität verwendet werden.

2. Insulinwirkung im Gehirn

Während die Peripherie auf das Vorhandensein von Insulin zur Glukoseaufnahme in die Zellen angewiesen ist, verfügt das Gehirn dafür über insulinunabhängige Rezeptoren. Deshalb spielte das Gehirn lange Zeit in der Insulinforschung eine untergeordnete Rolle. Außerdem ging man davon aus, dass Insulin aufgrund seiner Größe die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden könne (8). Trotzdem reagiert das Gehirn, wie immer mehr Studien zeigen, auf eine Änderung im Insulinspiegel (9).

2.1. Wirkung im Mausmodell

In Tierstudien zeigte sich ein Einfluss des Insulinliquorspiegels sowohl auf den Katecholaminstoffwechsel, die hepatische Glukoneogenese, Glykogenbildung im Muskel als auch insgesamt auf die periphere Insulinsensitivität (10)(11)(12)(13). Somit hat ein erhöhter Liquorinsulinspiegel ähnliche Effekte wie eine Insulinerhöhung im Plasma. Der Körper reagiert auf diesen mit einem ausreichenden Energieangebot korrelierenden Insulinanstieg mit einem negativen Feedback auf die Nahrungsaufnahme, sowie die hepatische Gluconeogenese. Diese Anpassung der Homöostase geschieht vor allem über eine erhöhte hepatische Insulinsensitivität (8). Dies ist eine Schlüsselstelle um unter physiologischen Bedingungen einer weiteren Glukosebereitstellung und damit einer Hyperglykämie entgegen zu wirken. Wird dieser zentrale Insulinrezeptor gezielt ausgeschaltet, führte das im knock-out Mausmodell zum einen zu Infertilität und über eine gesteigerte Nahrungsaufnahme zu einer verminderten peripheren Insulinsensitivität (14). Die zentral gesteuerte Anpassungsreaktion auf die Glukosehomöostase und die Ganzkörper Insulinsensitivität fehlt somit.

1.2.2 Wirkung beim Menschen

Über die Lokalisation und Wirkung von Insulinrezeptoren im Gehirn beim Menschen ist noch wenig bekannt. Bei Gesunden zeigen sich in Magnetenzephalographieaufnahmen des Gehirns Aktivitätsunterschiede, die abhängig vom zentralen Insulinspiegel sind. Diese insulinabhängigen Unterschiede treten insbesondere im zerebralen Kortex und Hypothalamus auf, also Regionen, die unter Anderem für die Energiehomöostase wichtig sind (15). Diese Reaktion korreliert negativ mit Alter, Gewicht und dem Plasmaspiegel an gesättigten freien Fettsäuren (15)(16)(17). Eine Möglichkeit zur Änderung des zentralen Insulinspiegels stellt die Applikation von intranasalem Insulin dar. Über einen extrazellulären Transport entlang der Hirnnervenfasern des Nervus Trigemini und Olfactorius gelangt das Insulin so in den Liquor ohne größere Einflüsse auf den Plasmainsulinspiegel (6). So können zentrale Insulinspiegel erreicht werden, die über venöse Applikation starke systemische Nebenwirkungen hervorrufen würden. Ein weiterer Vorteil der intranasalen Applikation ist das Umgehen der Blut-Hirn-Schranke, da auch auf dieser Ebene Pathologien vorliegen können. Das Ausmaß des Insulintransports über die Blut-Hirn-Schranke korreliert mit der Insulinsensitivität, sodass es bei Insulinresistenz zu einem verminderten Transport und somit zu einer reduzierten Liquorkonzentration von Insulin kommt (18).

Zusätzlich zur Regulation des peripheren Metabolismus haben Insulinrezeptoren und deren Aktivierung auch Auswirkung auf kognitive und verhaltensrelevante Funktionen (19).

Für Gedächtnis und Erinnerung wichtige Hirnareale wie Kortex und Hippocampus zeigen insulinassoziierte Veränderungen im Hinblick auf die neuronale Plastizität und bei Diabetes Mellitus sogar auf die messbare Größe dieser Hirnareale (20)(21). Ähnliche Veränderungen finden sich auch bei Morbus Alzheimer. Beide Erkrankungen gehen mit einer zentralen Insulinresistenz einher und Diabetes Mellitus ist mit einer erhöhten Inzidenz von dementiellen Erkrankungen vergesellschaftet (19). Intranasale Insulingabe

konnte bei Gesunden die Gedächtnisleistung verbessern und könnte auch bei diabetesassoziierten Demenzen eine Behandlungsmöglichkeit bieten (22).

Besteht eine zentrale Insulinresistenz, hat dies Auswirkungen auf das Essverhalten und die Reaktion auf Essensreize. Die Reaktion auf Essensbilder korreliert negativ mit dem Insulinliquorspiegel (23), während bei einer zentralen Insulinresistenz im präfrontalen Kortex die Kontrolle über eine übermäßige Nahrungszufuhr reduziert ist (24). Außerdem fehlt eine an die aktuelle Energie-Homöostase angepasste unterschiedliche Reaktion auf hoch- versus niedrigkalorische Essensbilder. Somit kann ein Teufelskreis aus zentraler Insulinresistenz, einem Fehlen der Hemmung übermäßiger hochkalorischer Nahrungsaufnahme und damit eine weitere Verstärkung dieser Insulinresistenz bestehen.

Eine häufige Komorbidität bei Diabetes mellitus stellen Depressionen dar. Das gemeinsame Auftreten lässt sich nicht nur durch die Effekte einer chronischen Krankheit erklären, sondern auch auf die Effekte einer Insulinresistenz und Inflammationsprozessen zurückführen (25). Insulin moduliert im Gehirn das serotonerge System und hat somit einen Einfluss auf einen wichtigen Neurotransmitter der Stimmungsregulation (26). Somit könnte sich eine Normalisierung der zentralen Insulinreaktion auch beim Menschen positiv auf die psychische Gesundheit auswirken (27).

3. Insulinsensitivität des Körpers

3.1. Regulation der Insulinsensitivität

Physiologisch ist eine Anpassung der Insulinsensitivität für einen möglichst stabilen Plasmaglukosespiegel von Vorteil, da besonders das Gehirn auf ausreichend Glukose für den Energiestoffwechsel angewiesen ist.

Regelmäßige sportliche Aktivität führt zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität. Durch eine erhöhte Muskelmasse und erhöhte Glukoseaufnahme und Metabolisierung in den Muskelzellen, wird einer Insulinresistenz entgegengewirkt (28). Zusätzlich kann körperliche Aktivität die

Körperfettmasse und damit den lipotoxischen Effekt minimieren. Freie Fettsäuren und von Fettzellen produzierte Adipocytokine wirken negativ auf die Insulinsensitivität (29). Im Gegensatz zu viszeralem Fettgewebe, erhöht die Aktivierung von braunem Fettgewebe die Insulinsensitivität und hat somit einen antidiabetischen Effekt (30).

3.2. Einfluss des Gehirns auf die Insulinsensitivität

Durch intranasale Insulingabe lässt sich bei Insulinsensitiven die periphere Insulinsensitivität verbessern (31). Besonders im Gebiet des Hypothalamus zeigen sich in fMRT Aufnahmen insulinabhängige Effekte. Dieser Bereich ist eine Hauptregulationsstelle für den Metabolismus des gesamten Körpers (5)(32). Allerdings ist diese Reaktion sehr heterogen und unterliegt auch einem Geschlechterunterschied (33). Zusätzlich zu diesem Unterschied im Ansprechen der Rezeptoren im Gehirn, ist auch der Insulintransport über die Blut-Hirn-Schranke individuell unterschiedlich (18). So kann es zu einem völligen Fehlen einer zentralen Insulinreaktion kommen und damit zu einer zentralen Insulinresistenz. Diese zentrale Insulinresistenz ist assoziiert mit Adipositas (15).

4. Einfluss des Gehirns auf die Lipolyse

Durch unterschiedliche Faktoren kann die Lipolyse beeinflusst werden. In der Peripherie spielen dabei vor allem der Plasmainsulinspiegel und die Konzentration an Stress- und Schilddrüsenhormonen eine Rolle (34). Einen weiteren Regulationsmechanismus stellt der Leptinspiegel dar. Das Gehirn besitzt Rezeptoren für dieses in den Adipozyten gebildete Hormon. Steigt durch eine Zunahme des Körperfettgewebes der Leptinspiegel, kann so über das Gehirn ein negatives Feedback auf die Lipogenese im Fettgewebe gegeben werden(35). Fehlt dieses Feedback durch eine Leptinresistenz im Gehirn, kann dies zu Adipositas führen.

Zusätzlich zur Insulinkonzentration im Plasma spielt auch die Liquorinsulinkonzentration eine eigenständige Rolle bei der Regulierung der Lipid-Homöostase. Nach intranasaler Insulingabe und erhöhter Aktivität der Insulinrezeptoren im Gehirn wurde ein Abfall der freien Fettsäuren im Plasma beobachtet (36). Dies kann auf eine Suppression der Lipolyse bei gleichzeitig erhöhter Lipogenese zurückgeführt werden. Im Mausmodell wurde nach direkter Insulinapplikation in den Hypothalamus eine erhöhte sympathische Aktivierung des viszeralen Fettgewebes, nicht jedoch des subkutanen Fettgewebes gefunden (37). Bei einem Funktionsverlust der zentralen Insulinrezeptoren konnte dieser Effekt nicht beobachtet werden.

Auch die Wirkung von Life-Style-Interventionen beim Menschen wird durch zentrale Insulinsensitivität besonders im Hinblick auf Gewichtsverlust und Körperfettmasse beeinflusst (38).

5. Möglichen Einfluss des Gehirns auf das Cholesterin

Cholesterin stellt eine wichtige Komponente der Zellmembran dar. Es sorgt für die Membranstabilität und den extra- und intrazellulären Transport. Körperzellen werden durch Lipoproteine über das Blut mit Cholesterin versorgt. Dieser Transport funktioniert allerdings nicht über die Blut-Hirn-Schranke, so dass das Gehirn auf eine eigenständige Cholesterinsynthese angewiesen ist (39). Reguliert wird die Synthese insbesondere über das Sterol regulatory element-binding protein-2 (SREBP-2).

Im diabetischen Mausmodell zeigte sich niedrigere SREBP-2 Mengeneine und eine daraus resultierende reduzierte Cholesterinbiosynthese, die sich durch Insulininjektion in das Gehirn normalisieren lies (40)(41).

1.6 Fragestellung

Da ein Knock out des Insulinrezeptors im Tiermodell eine periphere Insulinresistenz bewirkt (14), stellen wir nun die Hypothese auf, dass durch die Erhöhung der intrazerebralen Insulinspiegel durch intranasale Insulingabe mit verstärktem Insulinsignalling im Gehirn bewirkt wird, dass es zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität in den peripheren Geweben kommt.

Goldstandard zur Bestimmung der Insulinsensitivität ist der hyperinsulinämische euglykämische Glukose Clamp. Inwieweit sich die periphere Insulinsensitivität bei jungen und gesunden Männern nach Erhöhung der zerebralen Insulinspiegel durch intranasaler Insulingabe ändert, soll in dieser Arbeit mit einem solchen Clamp Experiment untersucht werden. Bei dieser Methode wird exogenes Insulin und Glukose zugeführt. Da Insulin im Plasma bei Gesunden die Lipolyse hemmt und dies auch für die zentrales Insulin bekannt ist, stellt sich außerdem die Frage, ob und in welchem Ausmaß eine gehemmte Lipolyse durch intranasale Insulingabe weiter supprimiert werden kann.

Viele insulinabhängige Reaktionen im Gehirn sind bei erhöhtem Körpergewicht weniger stark ausgeprägt, das heißt je höher das Körpergewicht ist, desto weniger reagiert das Gehirn auf eine Änderung des Insulinspiegels (15). Wie stark diese Faktoren auf die mögliche Änderung der Insulinsensitivität Einfluss nehmen, lässt sich durch das Untersuchen von sowohl normalgewichtigen, als auch von adipösen Probanden darstellen.

Da eine gestörte Insulinsensitivität in der Pathogenese des Typ 2 Diabetes mellitus eine Hauptrolle spielt und schon vor Manifestation beobachtet werden kann (3), ist die Erforschung der zentralen Steuerungsmechanismen von großer Bedeutung um die multifaktoriellen Genese dieses immer mehr Menschen betreffenden Krankheitsbildes zu verstehen (1).

2 Material und Methoden

2.1 Studienaufbau

Das Studienprotokoll wurde von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Eberhart Karls Universität Tübingen begutachtet und zugelassen. Alle Probanden wurden vor Versuchsdurchführung schriftlich und mündlich über mögliche Risiken, Art der Untersuchungen und Ziele aufgeklärt und haben schriftlich der Teilnahme an der Studie zugestimmt. Diese Zustimmung konnten die Probanden jederzeit zurückziehen.

Die Studie wurde randomisiert, einfach verblindet und placebokontrolliert in der Medizinischen Klinik IV in Tübingen durchgeführt.

2.2 Probanden

2.2.1 Einschlusskriterien und Teilnahmevoraussetzungen

Für die Studie wurden stoffwechselgesunde Männer zwischen 18 und 40 Jahren gesucht. Es wurden zwei Personengruppen gesucht, zum einen normalgewichtige (BMI bis 25), zum anderen übergewichtige/adipöse Probanden (BMI über 30).

Außerdem waren ein normwertiges Routinelabor und ein HbA1c <6,0% Voraussetzung.

Ausschlusskriterien:

- Grunderkrankungen oder Medikamenteneinnahme
- Probanden, bei denen eine Operation in den letzten 3 Monaten stattfand
- Gleichzeitige Teilnahme an anderen Studien
- Hb < 13g/dl
- Minderjährige oder nicht einwilligungsfähige Personen wurden ebenfalls ausgeschlossen

2.2.1 Teilnehmer

Die erste Kohorte bestand aus zehn normalgewichtigen Männern (Durchschnittsalter 26 ± 1 Jahre, Durchschnittsgewicht 77 ± 6 kg, BMI $21,9\pm 1,6$ kg/m²). Diese wurde mit der zweiten Kohorte aus fünf übergewichtigen Männern verglichen (Durchschnittsalter 28 ± 2 Jahre, Durchschnittsgewicht 116 ± 10 kg, BMI $33,2\pm 2,2$ kg/m²).

Um Grunderkrankungen auszuschließen wurden alle Teilnehmer vor der Studie von dem Prüfarzt untersucht. Außerdem wurde ein Routinelabor angefertigt. Dieses beinhaltete:

- Differentialblutbild
- Entzündungsmarker
- Elektrolyte
- Nierenfunktionsparameter
- Cholesterin und Triglyceride
- Transaminasen
- Insulin und C-Peptid
- TSH
- Nüchternnglucose und HbA1c

2.3 Versuchsprotokoll

Jeder Proband nahm an zwei unterschiedlichen Versuchstagen teil. Die Reihenfolge war randomisiert. Zwischen beiden Versuchstagen lag mindestens ein freier Tag. An beiden Tagen unterzogen sich die Probanden einem euglykämischen hyperinsulinämischen Glukose Clamp über 210 Minuten. Einmal wurde zur Minute 90 nasales Insulin appliziert, am jeweils andern Tag erfolgte eine nasale Placebogabe.

2.3.1 Euglykämischer hyperinsulinämischer Glukose Clamp

Der Euglykämische hyperinsulinämische Glukose Clamp bietet die Möglichkeit die Insulinsensitivität und den Insulinsensitivitätsindex (Glukoseinfusionsrate geteilt durch Plasmainsulinspiegel) zu bestimmen. Ziel des euglykämischen Clamp (gr.: eu = normal, gut) ist den Blutglukosespiegel bei einem Wert von 90mg/dl zu halten (engl.: to clamp = einspannen). Dabei wird kontinuierlich Insulin mit einer Laufrate von 0,25mU/min/kg Körpergewicht infundiert und so eine hyperinsulinämische Stoffwechsellage hergestellt.

Die Untersuchungen begannen nach einer nächtlichen Fastenperiode (ab 20Uhr des Vorabends) morgens um 7:15Uhr beim nüchternen Probanden und wurden über den gesamten Verlauf im Liegen durchgeführt. Während dieser Zeit blieben die Probanden nüchtern und es wurde darauf geachtet, dass sie keinen visuellen oder olfaktorischen Essensreizen ausgesetzt waren. Außerdem durften die Probanden während der Versuchszeit nicht schlafen.

Nach der Begrüßung und erneuten Klärung von Fragen und Ausschlusskriterien erhielt jeder Proband zwei venöse Zugänge. Davon dient einer der Infundierung von Glukose (20%) und Insulin (0,25mU/min/kg Körpergewicht) und lag nach Möglichkeit in der Armbeuge. Der andere wurde am kontralateralen Arm zur regelmäßigen Blutentnahme gelegt um Glukose, Insulin, C-Peptid und weitere Laborparameter zu bestimmen. Dieser zweite Zugang wurde in eine Handrückenvene gelegt und die Hand mit einem Heizkissen bis maximal 40°C gewärmt um jederzeit die Abnahme von arterialisierten Venenblut zu ermöglichen.

Nach zwei Basalblutabnahmen (Minute -30 und Minute 0), wurde die Insulininfusion gestartet. In den ersten 7 Minuten wurde die Laufrate der Insulininfusion erhöht um möglichst schnell einen stabilen Plasmaspiegel zu erreichen. Danach blieb die Laufrate während des gesamten Clamps konstant bei 0,25mU/kgKG/min. Um eine Hypoglykämie zu vermeiden und den Blutglukosespiegel im Zielbereich zu halten wurde die Laufrate der 20%igen Glukoselösung variabel angepasst. Dafür wurde während des gesamten Clamps alle fünf Minuten der Blutzucker bestimmt und die Glukoseinfusionsrate manuell an den gemessenen Blutzucker adaptiert .

Bei Minute 90 wurde nasal Insulin oder Placebo verabreicht und davor und danach jeweils die Insulinsensitivität über einen Zeitraum von 30 bzw. 60 Minuten gemittelt.

Weitere Blutentnahmen und Laborwertbestimmungen fanden zu den Minuten 60, 75, 90, 105, 120, 135, 150, 180, 195 und 210 aus dem arterialisierten Zugang der gewärmten Hand statt. Der Clamp wurde nach einer Gesamtzeit von 210 Minuten beendet. Die Probanden wurden weitere 30 Minuten überwacht und erhielten ein Frühstück, sowie ein Mittagessen um eine Hypoglykämie auszuschließen.

Hierbei kam es zu keinerlei Komplikationen bei den Probanden. Auf einen ausreichend hohen Blutzuckerspiegel nach Ende des Clamps wurde geachtet und einer möglichen Hypoglykämie durch eine kohlenhydratreiche Mahlzeit vor Verlassen der Studienräume entgegengewirkt.

2.3.2 Intranasale Insulingabe

Durch die intranasale Insulingabe soll die Insulinkonzentration im Zentralnervensystem erhöht werden. Den Probanden wurde zur Minute 90 eine Insulindosis von 160 IU (2 Hübe a 10 IU in jedes Nasenloch, viermalige Wiederholung mit je 1min Abstand) verabreicht. Der Insulinspiegel im Liquor steigt dabei nach 10min an, erreicht seinen Höhepunkt nach 30min und ist nach 80min wieder normwertig. Dabei ändert sich weder der Plasmainsulinspiegel, noch der Blutglukosewert statistisch signifikant (6). Somit lassen sich Liquorkonzentrationen erreichen, die über eine subkutane oder venöse Gabe starke systemische Nebenwirkungen zur Folge hätten.

Am Placebotag fand derselbe Ablauf mit dem einzigen Unterschied des Placebosprays statt Insulinspray statt. Aufgrund des gleichen Lösungsmittels war ein olfaktorischer Rückschluss auf Art des Sprays weder den Probanden noch der Versuchsleitung möglich.

2.4 Materialien

Insulin	Name: Insuman Rapid Hersteller: Sanofi Pharma Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, Deutschland
Glukoselösung	Name : Glucosteril 20% Hersteller: Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
NaCl-Lösung (zum Spülen)	Name: NaCl-Lösung 0,9% Hersteller: Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Insulin Nasenspray	Name: Insulin Actrapid Hersteller: Novo Nordisk, Copenhagen, Denmark
Placebo Nasenspray	Name: Trägerlösung ohne Insulin

2.5 Blutentnahmen

Das Blut für die Laborbestimmungen und die Bestimmung der Blutglukose wurde weit distal aus dem gewärmten Arm entnommen und somit eine Arterialisierung sichergestellt. Um den Zugang offen zu halten wurde über diesen mit niedriger Laufrate eine NaCl-Lösung infundiert. Vor jeder Blutentnahme wurden deshalb 2ml Blut-Infusions-Gemisch gesondert entnommen und verworfen um eine Verfälschung der Proben zu vermeiden.

Die Blutproben für die Laborbestimmungen wurden sofort auf Eis gelagert und an das Zentrallabor geschickt.

2.6 Messungen

2.6.1 Blutglukosespiegel und HbA1c

Alle fünf Minuten wurde jeweils direkt nach der Entnahme die Plasmaglukosekonzentration bestimmt. Dafür wurde das Gerät YSI 2300 STAT plus (Yellow Springs Instruments, Yellow Springs, USA) mit der Glukose-Oxidase-Methode verwendet.

Der Gehalt an HbA1c wurde aus EDTA-Blut mithilfe einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie bestimmt.

2.6.2 Laborparameter

Aus dem Plasma wurden die Insulin- und C-Peptidspiegel mittels Chemilumineszenz Assays bestimmt (ADVIA-Centaur; Siemens, Germany). Die Messung der freien Fettsäuren, HDL und LDL erfolgte enzymatisch aus dem Plasma. Die Messung des CRP erfolgte mittels Immunturbidimetrie. Das TSH wurde mit der Methode CLIA (Centaur) bestimmt.

2.7 Berechnungen

Body-Mass-Index (BMI):

$$\text{BMI} = \text{Körpergewicht (in kg)} / (\text{Körpergröße (in cm)})^2$$

Insulinsensitivitätsindex:

Für die Berechnung des Insulinsensitivitätsindex im Steady State wurde die mittlere Glukoseinfusionsrate über 30min bzw. 60min bestimmt, die

notwendig war um die Probanden in einer euglykämischen Stoffwechsellage zu halten. Dieses wurde jeweils für die Minuten 60-90, sowie 150-210 durchgeführt. Anschließend wurde der Wert durch die mittlere Plasmainsulinkonzentration in diesen Zeiträumen geteilt.

2.8 Statistische Auswertung

Für alle Berechnungen wurde ein Signifikanzniveau von $\alpha=0,05$ festgelegt. Die Ergebnisse sind, soweit nicht anders angegeben, als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwerts dargestellt. Nicht-normalverteilte Parameter wurden logarithmiert. Für die Auswertung der Daten wurde das Softwarepaket JMP10 (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA) verwendet. Die statistischen Vergleiche zwischen den Gruppen beruhen auf einer Varianzanalyse für Messwiederholungen (MANOVA) mit der unabhängigen Variable Spray-Applikation (Insulin vs. Placebo) und dem within-subject-Faktor Zeitpunkt der Messung.

3 Ergebnisse

3.1 Probandencharakteristika

Vor dem Beginn des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps wurden Probandencharakteristika bestimmt, dargestellt in Tabelle 1. Für den Unterschied zwischen Gruppe „Normalgewichtige“ und „Übergewichtige“ wurde der p-Wert anhand eines t-Tests ermittelt.

Zwei Probanden wurden schon vor Beginn des Clamps von der Studie ausgeschlossen, da bei einem ein Prädiabetes diagnostiziert wurde und der andere am Versuchstag nicht nüchtern erschien.

Tabelle 1: Probandencharakteristika, im Vergleich Normalgewichtige und Übergewichtige

	Normalgewichtige	Übergewichtige	p-Wert
Anzahl	10	5	
Alter (Jahre)	26 ± 1	28 ± 2	0,4
Gewicht (kg)	77 ± 6	116 ± 10	0,0059
Größe (cm)	187 ± 2	185 ± 3	0,6
BMI (kg/m²)	21,9 ± 1,6	33,2 ± 2,2	0,0011
Nüchternblutzucker (mg/dl)	94 ± 2	99 ± 4	0,2
HbA1c (%)	5,1 ± 0,1	5,2 ± 0,2	0,6
Nüchterninsulin (pmol/l)	41,7 ± 10,1	81,0 ± 16,1	0,06
TSH (mU/l)	2,5 ± 0,3	2,2 ± 0,6	0,6
CRP (mg/dl)	0,1 ± 0,1	0,8 ± 0,2	0,0034

Die 10 schlanken und 5 übergewichtigen Probanden unterschieden sich nicht signifikant in Alter ($p=0,4$) und Größe ($p=0,6$). Ein signifikanter Unterschied zeigte sich in Gewicht ($p=0,0059$) und BMI ($p=0,0011$). Das mittlere Gewicht betrug bei den Normalgewichtigen 77kg, bei den Übergewichtigen 116kg. Die Normalgewichtigen lagen mit einem durchschnittlichen BMI von 21,9 im normalen Gewichtsbereich, die Übergewichtigen mit 33,2 im Mittel im Bereich der Adipositas Grad 1.

Die Nüchternblutzuckerwerte ($p=0,2$), HbA1c ($p=0,6$) und TSH ($p=0,6$) zeigten keinen signifikanten Unterschied und lagen bei beiden Gruppen im Normbereich. Keiner der Probanden zeigte hier Werte die auf eine Stoffwechselstörung oder einen manifestierten Diabetes mellitus hinweisen würden. Deskriptiv zeigten die Übergewichtigen sowohl bei der Nüchternblutglukose als auch beim HbA1c höhere Werte als die Normalgewichtigen.

Im Nüchterninsulin lies sich mit einem $p=0,06$ ein marginal signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen feststellen. Hier lagen die Übergewichtigen mit einem Mittelwert von 81pmol/l über den Normalgewichtigen. Diese lagen im Mittel bei 41,7pmol/l.

Ein signifikanten Unterschied ergab sich bei dem Entzündungsmarker hoch-sensitives CRP ($p=0,0034$). Die Normalgewichtigen wiesen ein mittleres CRP von 0,1mg/dl auf, während die Übergewichtigen im Mittel bei 0,8mg/dl lagen.

3.2 Insulinsensitivität im hyperinsulinämen euglykämischen Clamp

Sowohl die Normalgewichtigen als auch die Übergewichtigen wurden dem hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp, jeweils mit Insulinspray und Placebo, unterzogen.

3.2.1 Normalgewichtige

Zuerst wurde die Gruppe der normalgewichtigen, stoffwechselgesunden Probanden mithilfe eines hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210min untersucht. 30 Minuten vor Beginn des Clamps fand eine erste Blutentnahme statt. Geclamt wurde mit einer Insulinlaufrate von 0,25mU/kg KG/min. Zur Minute 90 wurden 160U Insulin bzw. Placebo als intranasales Spray verabreicht. Eine konstante Glukoseinfusionsrate (GIR) bezogen auf das Körpergewicht (mg/kg KG/min) lies sich nach 45 Minuten erreichen (siehe Abb. 1).

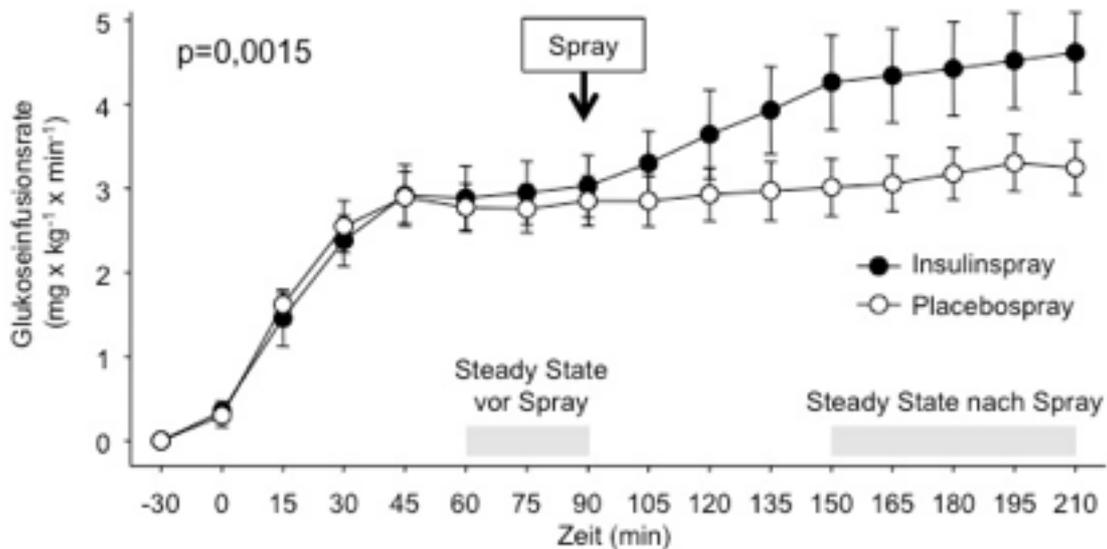


Abb.1: Glukoseinfusionsrate (mg/kg KG/min) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 10 normalgewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA). Abbildung modifiziert aus (44)

Die Glukoseinfusionsrate der Normalgewichtigen im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp, dargestellt in Abbildung 1, stieg nach Start der

Insulininfusion in den ersten Minuten kontinuierlich an. Im ersten Steady State (Minute 60-90) vor Sprayapplikation lag die Glukoseinfusionsrate an beiden Tagen konstant um durchschnittlich $2,75 \pm 0,36$ mg/kg/min. Nach Anpassung der GIR nach Sprayapplikation lies sich ein zweiter Steady State (Minute 150-210) einstellen. Hier lagen die Mittelwerte nach Insulinsprayapplikation bei $4,22 \pm 0,56$ mg/kg/min, nach Placebo bei $3,20 \pm 0,35$ mg/kg/min. Somit war nach der Gabe des Insulinsprays eine signifikant höhere GIR verglichen mit Placebospray notwendig um im euglykämischen Bereich zu bleiben ($p_{\text{MANOVA}}=0,0015$). Da sich die Probanden leicht in Alter und BMI unterschieden, wurde in einer weiteren Varianzanalyse der Unterschied für diese beiden Variablen kontrolliert. Dabei bleibt der Unterschied der GIR zwischen Insulinspray und Placebo statistisch signifikant ($p_{\text{MANOVA}}=0,0045$).

Dieselben statistischen Berechnungen erfolgten für den aus dem Clamp durch Teilung der GIR im Steady State durch das mittlere Plasmainsulin in diesem Zeitraum abgeleiteten Insulinsensitivitätsindex. Die Werte im Steady State nach Sprayapplikation lagen bei Insulingabe bei $151 \pm 9\%$ bei Placebo bei $111 \pm 10\%$ verglichen mit den Ausgangswerten im ersten Steady State vor Spraygabe und unterschieden sich damit signifikant ($p=0,0077$). Aufgrund der leichten Unterschiede von Alter und BMI innerhalb der Kohorte wurde auch der Insulinsensitivitätsindex darauf kontrolliert. Die Signifikanz der Unterschiede des Insulinsensitivitätsindex zwischen Insulinspray und Placebo blieb auch nach Kontrolle für Alter und BMI bestehen ($p=0,0038$).

Um einen möglichen Einfluss von Plasmaglukosespiegel, sowie Insulin- und C-Peptid-Spiegel auf die GIR und auch Änderungen dieser Werte selbst zu bemerken, wurden diese Laborparameter an beiden Tagen zu mehreren Zeitpunkten bestimmt (siehe Abb.2-4). Außerdem ließ sich über den Plasmaglukosespiegel die Euglykämie, über die Plasmainsulinkonzentration die Hyperinsulinämie des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps kontrollieren.

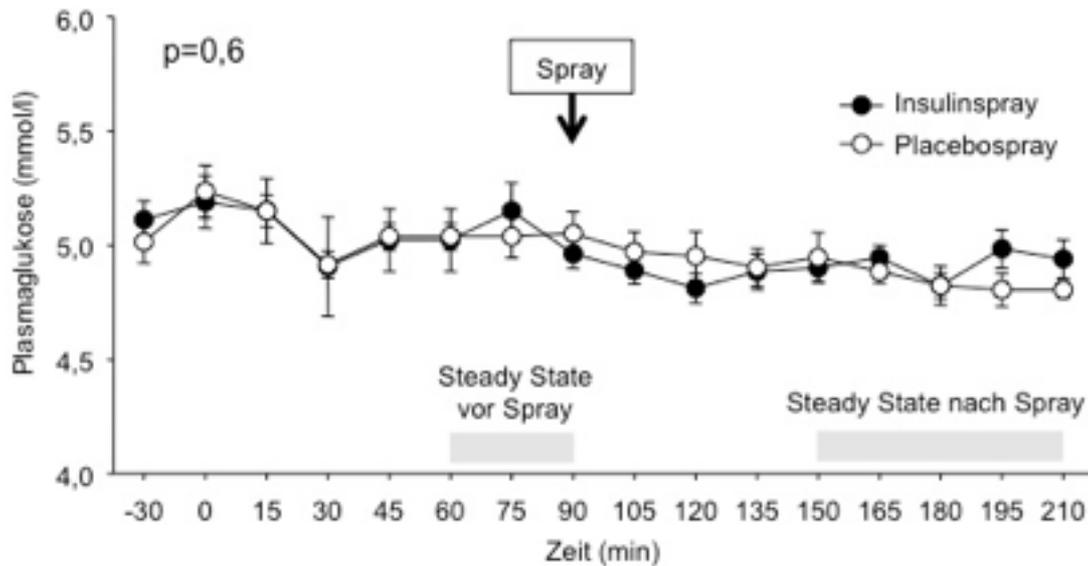


Abb.2: Plasmaglukose (mmol/l) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 10 normalgewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA). Abbildung modifiziert aus (44)

Wie in Abbildung 2 dargestellt, bewegte sich der Plasmaglukosespiegel der Normalgewichtigen während des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps in einem Bereich zwischen 4,5mmol/l und 5,5mmol/l. Die Probanden befanden sich während der gesamten Versuchsdauer in der Euglykämie. Diese änderte sich nach Start des Clamps nicht signifikant. Der Spiegel der Plasmaglukose zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen Insulinspray und Placebo ($p_{\text{MANOVA}}=0,6$) und es zeigte sich auch kein Effekt auf die Sprayapplikation als solche. Der Blutglukosespiegel lag an beiden Tagen im euglykämischen Zielbereich und entspricht damit einem euglykämischen Glukose Clamp.

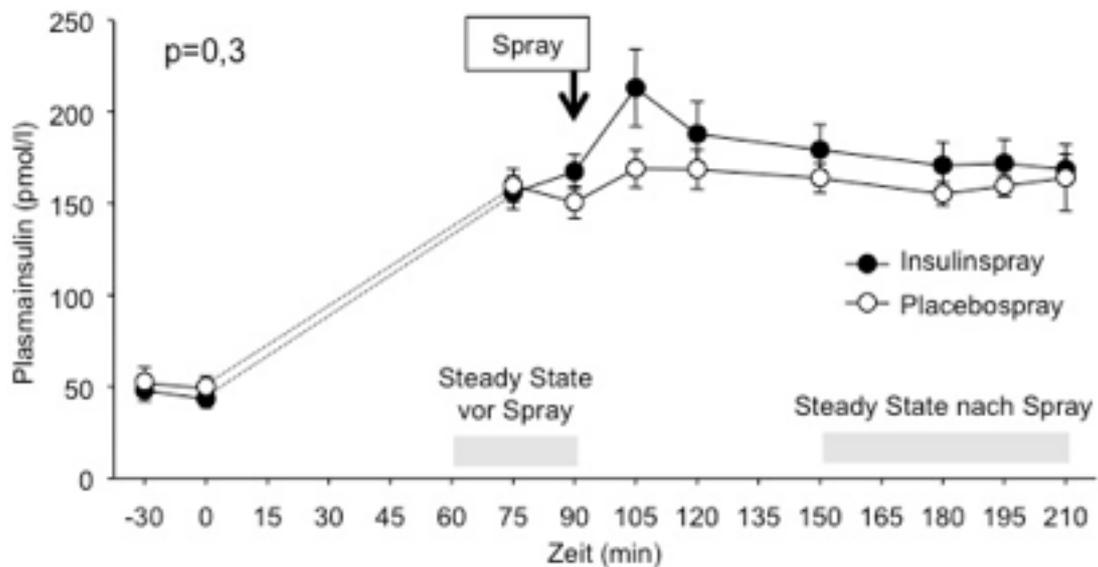


Abb.3: Plasmainsulin (pmol/l) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 10 normalgewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert ± Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA). Abbildung modifiziert aus (44)

Im Verlauf des Clamps wurde, wie in Abbildung 3 zu sehen, bei den Normalgewichtigen eine konstante Hyperinsulinämie erreicht. So stiegen die Mittelwerte des Plasmainsulins von $45,6 \pm 3,6$ pmol/l in der Minute 0 auf $156,8 \pm 6,0$ pmol/l in der Minute 75 und blieben in diesem Bereich für die Dauer des restlichen Clamps. In den ersten 15min nach intranasaler Insulinsprayapplikation zeigte sich eine leichte Erhöhung des Plasmainsulins auf $212,1 \pm 18,9$ pmol/l (versus am Placebotag $168,9 \pm 10,2$), die jedoch nicht statistisch signifikant wurde ($p_{t\text{-test}}=0,07$). Bereits nach weiteren 15min konnte kein Unterschied mehr beobachtet werden ($p_{t\text{-test}}=0,3$). Dieser Effekt trat nach Placebospray nicht auf.

Insgesamt unterschieden sich die Plasmainsulinwerte der Normalgewichtigen im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp jedoch nicht signifikant zwischen Insulinspray und Placebo ($p_{\text{MANOVA}}=0,3$).

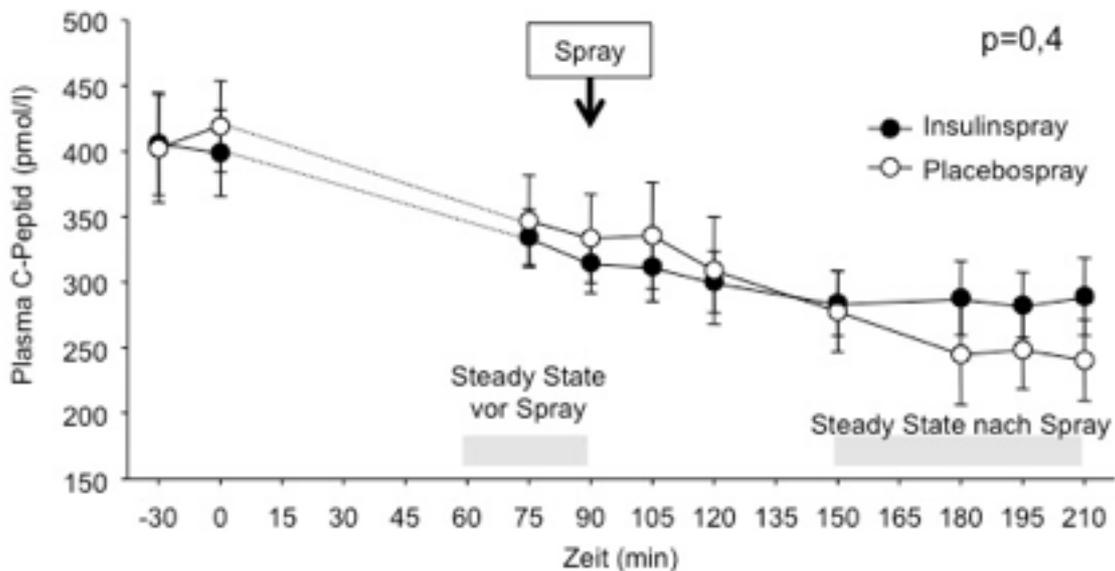


Abb.4: Plasma C-Peptid (pmol/l) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 10 normalgewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA). Abbildung modifiziert aus (44)

Der Plasmaspiegel an C-Peptid der Normalgewichtigen sank, wie in Abbildung 4 zusehen, im Verlauf des Clamps von 399 ± 24 pmol/l zu Beginn auf 260 ± 21 pmol/l in der Minute 210. Dieser kontinuierliche Abfall ändert sich weder durch die Applikation von Insulinspray noch durch Placebospray.

Die kurzfristige Erhöhung des Plasmainsulinspiegels nach Insulinspray Gabe (Minute 105), ging nicht mit einer weiteren Suppression des C-Peptid Spiegels oder einer Änderung der Plasmaglukose einher.

Ein signifikanter Unterschied der C-Peptitkonzentration bei Normalgewichtigen im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps zwischen Insulinspray und Placebo konnte nicht beobachtet werden ($p_{\text{MANOVA}}=0,4$).

3.2.2 Übergewichtige

Um den Einfluss von Körpergewicht und BMI auf die Reaktionen auf intranasales Insulinspray zu untersuchen, wurden eine zweite Kohorte einem hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp unterzogen. Es wurden wieder die Glukoseinfusionsrate, Plasmaglukose, Plasmainsulin und C-Peptid zu mehreren Zeitpunkten bestimmt (Abb. 5-8) um einen Möglichen Einfluss auf dieser Werte auf die Insulinsensitivität zu detektieren und die Werte der beiden Kohorten vergleichen zu können. Wie in der Kohorte der Normalgewichtigen wurde nach 90 Minuten 160U Insulin als Nasenspray oder zur Kontrolle Placebospray appliziert. In dieser Gruppe lag der mittlere BMI bei 33, die Probanden waren ansonsten stoffwechselgesund und unterschieden sich in Größe ($p=0,6$) und Alter ($p=0,4$) nicht signifikant von den Normalgewichtigen.

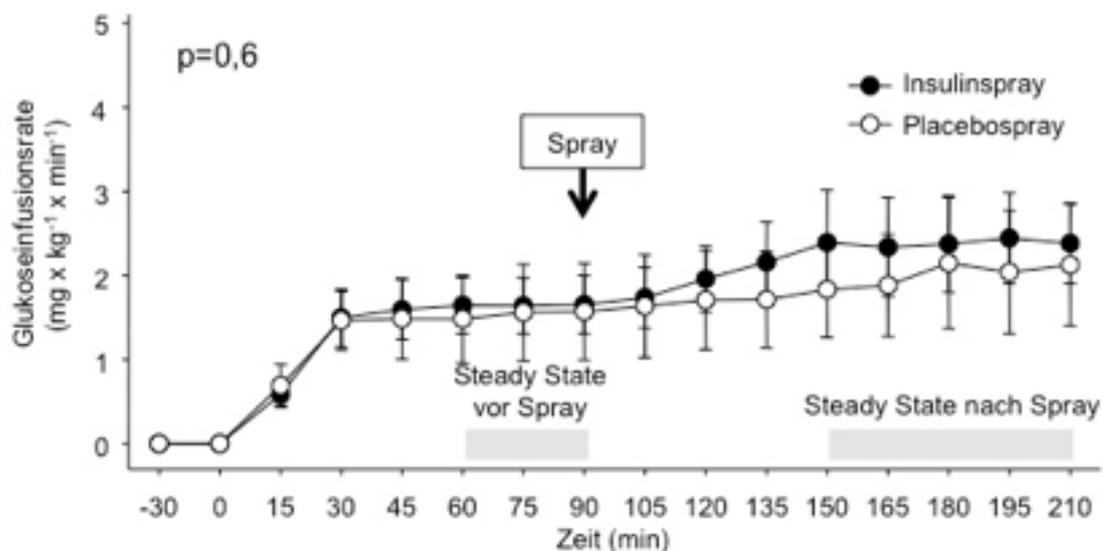


Abb.5: Glukoseinfusionsrate (mg/kg/min) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 5 übergewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA). Abbildung modifiziert aus (44)

Die Glukoseinfusionsrate der Übergewichtigen im Rahmen des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps, dargestellt in Abbildung 5, lag im ersten Steady State (Minute 60-90) im Mittel bei $2,42 \pm 0,42$ mg/kg/min. Diese Laufrate lag deutlich unter der der Normalgewichtigen. Im zweiten Steady State (Minute 150-210) lag der Mittelwert bei $2,16 \pm 0,41$ mg/kg/min. Dabei zeigte sich bei der Glukoseinfusionsrate bei den Übergewichtigen kein signifikanter Unterschied zwischen Insulinspray und Placebo ($p_{\text{MANOVA}}=0,6$) und es zeigte sich keine Reaktion auf die Sprayapplikation selbst. Deskriptiv ließ sich ein leichter Anstieg der GIR im Verlauf des Clamps detektieren. Insgesamt war eine niedrige GIR als bei den Normalgewichtigen notwendig um im euglykämischen Zielbereich zu bleiben.

Im Gegensatz zu den Normalgewichtigen zeigte sich bei den Übergewichtigen im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp kein messbarer Effekt von intranasalem Insulin auf die Glukoseinfusionsrate.

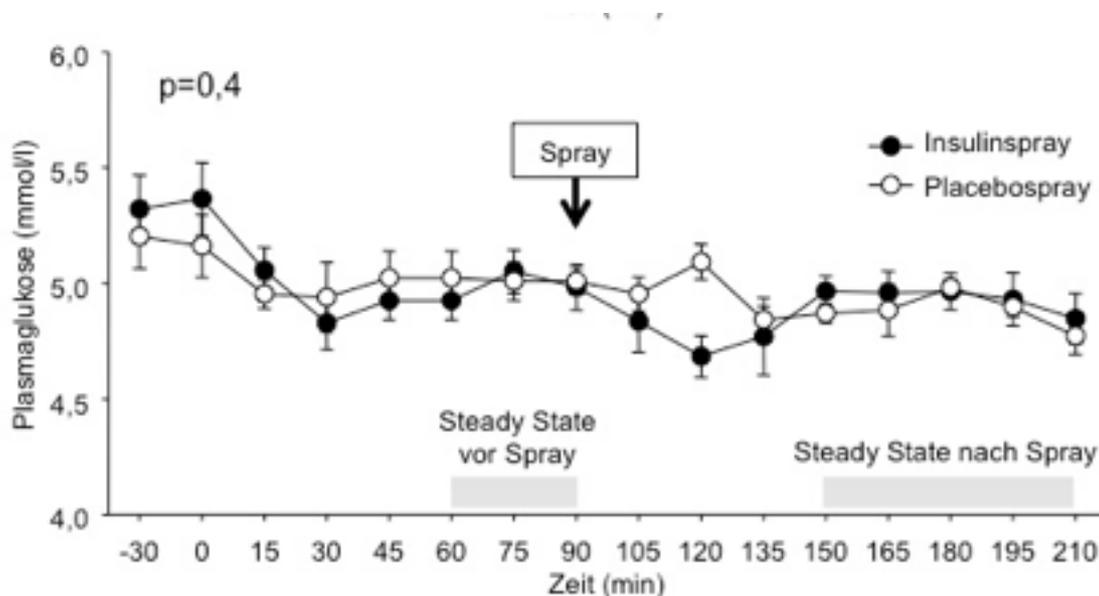


Abb.6: Plasmaglukose (mmol/l) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von $0,25 \text{ mU/kg KG/min}$ und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 5 übergewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung.

Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA).
Abbildung modifiziert aus (44)

Der Plasmaglukosespiegel der Übergewichtigen, zu sehen in Abbildung 6, lag mit Mittelwerten um 5,0mmol/l im Zielbereich des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps und blieb während des Clamps stabil.

Es zeigte sich in der Kohorte der Übergewichtigen kein Unterschied zwischen der Plasmaglukosekonzentration nach Insulinspray oder Placebo ($p_{\text{MANOVA}}=0,4$).

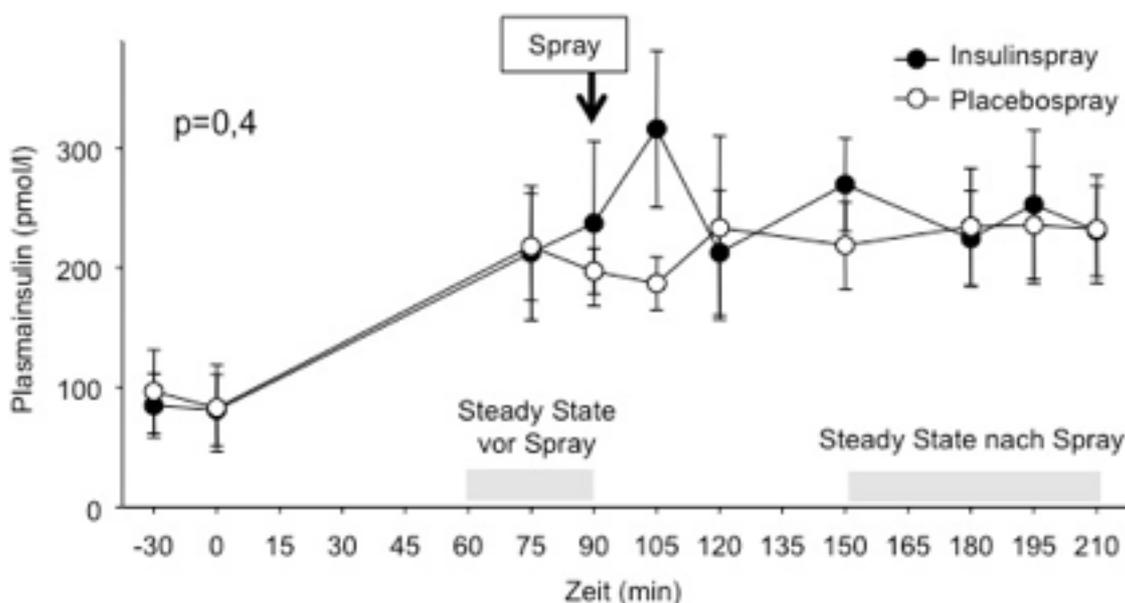


Abb.7: Plasmainsulin (pmol/l) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 5 übergewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA).
Abbildung modifiziert aus (44)

Auch bei den Übergewichtigen wurde im Verlauf des Clamps die Hyperinsulinämie, zu sehen in Abbildung 7, erreicht. Dabei lagen die

Ausgangswerte des Plasmainsulins mit im Mittel $78,4 \pm 19,5 \text{ pmol/l}$ deutlich über denen der Normalgewichtigen ($45,6 \pm 3,6 \text{ pmol/l}$) und stiegen bis zum Ende des Clamps auf $226,4 \pm 29,5 \text{ pmol/l}$ nach Insulinspray und $232,3 \pm 45,1 \text{ pmol/l}$ nach Placebo.

Wie bei den Normalgewichtigen zeigte sich ein kurzer Anstieg des Plasmainsulinspiegels 15min nach Insulinsprayapplikation, der jedoch keinen Einfluss auf die Plasmaglukose hatte. In der nächsten Messung nach weiteren 15min zeigte sich kein Unterschied mehr. Das Placebospray hatte keinen Einfluss auf den Plasmainsulinspiegel.

Insgesamt wurde bei den Übergewichtigen der Unterschied in der Insulinkonzentration zwischen den beiden Tagen nicht signifikant ($p_{\text{MANOVA}}=0,4$).

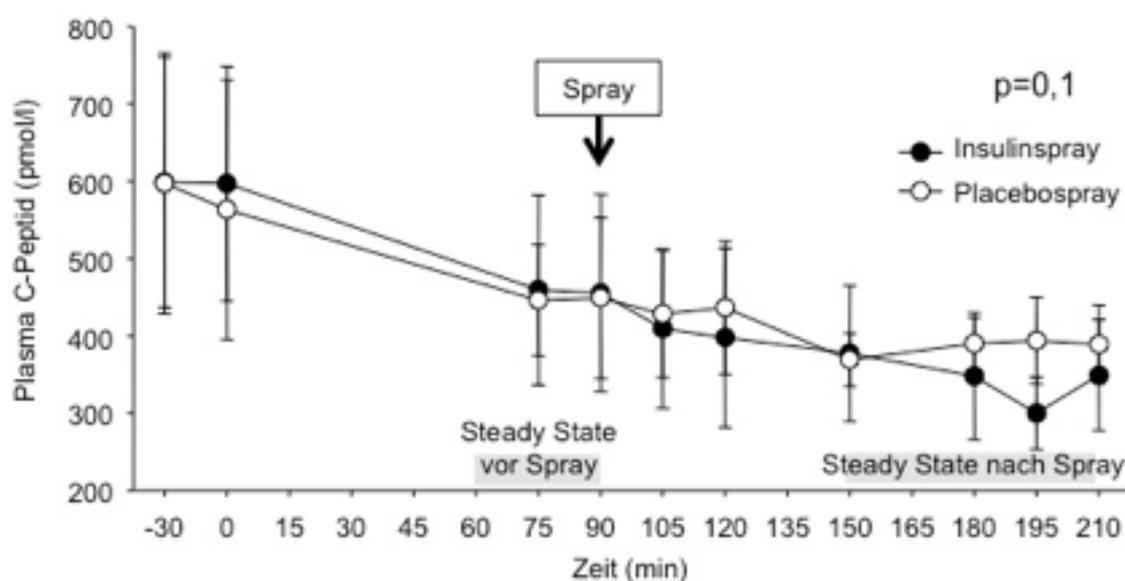


Abb.8: Plasma C-Peptid (pmol/l) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von $0,25 \text{ mU/kg KG/min}$ und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 5 übergewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA). Abbildung modifiziert aus (44)

Der C-Peptid Spiegel im Plasma, dargestellt in Abbildung 8, sank im Verlauf des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps bei den Übergewichtigen von anfangs im Mittel 564 ± 94 pmol/l auf 363 ± 37 pmol/l in der letzten Messung in Minute 210. Sowohl Anfangs- als auch Endwert lagen deutlich über den C-Peptidwerten der normalgewichtigen Kohorte.

Es zeigte sich keine Änderung während des kurzen Anstiegs des Plasmainsulins nach Insulinsprayapplikation, die auf eine weitere Suppression des C-Peptids hindeuten könnte. Ein signifikanter Unterschied der C-Peptid Werte zwischen Insulinsprayapplikation und Placebo bestand in der Kohorte der Übergewichtigen nicht ($p_{\text{MANOVA}}=0,1$).

3.2.3 Vergleich Normalgewichtige versus Übergewichtige

Um den Effekt des intranasalen Insulinsprays auf die Änderung des Insulinsensitivitätsindex von anderen möglichen Faktoren abzugrenzen, wurde jeweils der Unterschied des Insulinsensitivitätsindex vor und nach Sprayapplikation berechnet. Dann wurde der Wert des Placebosprays von dem des Insulinsprays subtrahiert und die Änderung in Prozent berechnet. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede des Insulinsensitivitätsindex zwischen den beiden Kohorten ($p=0,0094$), dargestellt in Abbildung 9, der auch nach Kontrolle für Alter ($p=0,0068$) bestehen blieb. Außerdem lies sich ein marginal signifikanter Unterschied in der Glukoseinfusionsrate feststellen ($p=0,07$).

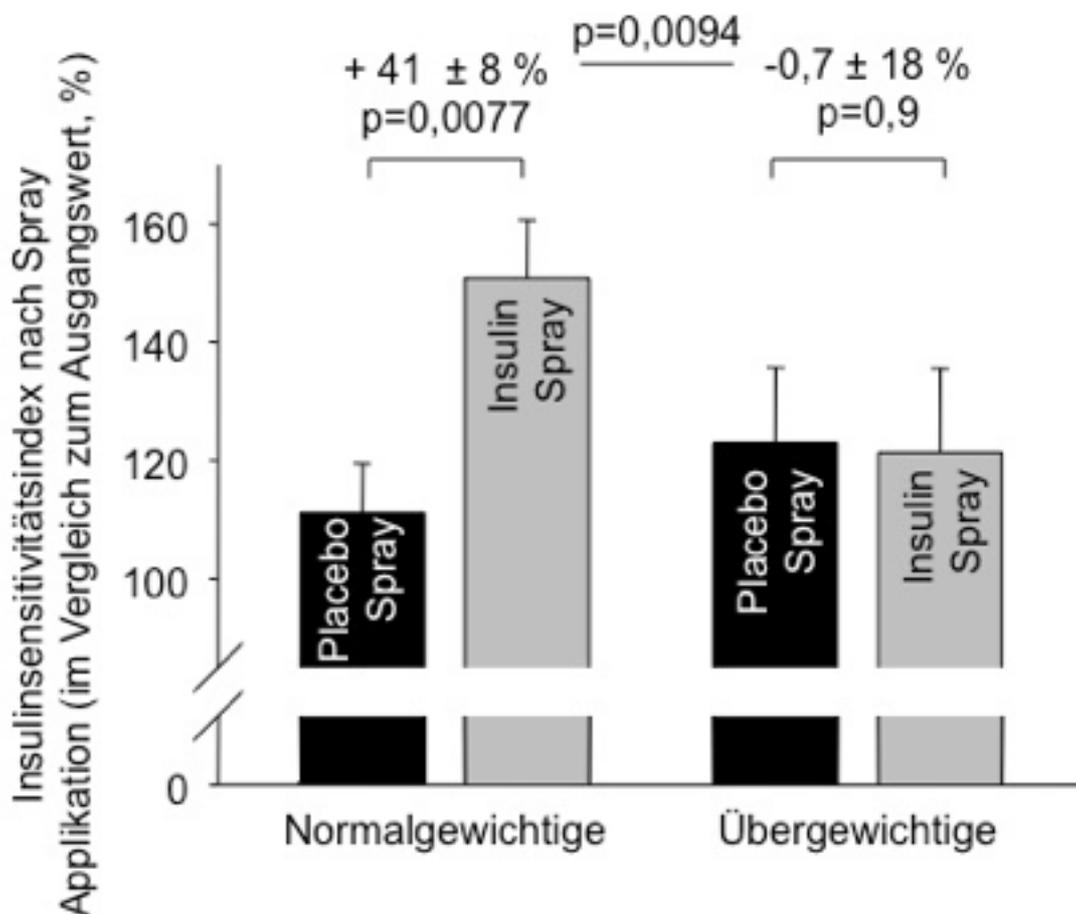


Abb.9: Änderung des Insulinsensitivitätsindex im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min nach Insulinsprayapplikation im Vergleich zum Ausgangswert in Prozent. Verglichen werden außerdem Normalgewichtige versus Übergewichtige. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Unterschiede wurden mittels ungepaartem t-Test auf statistische Signifikanz getestet. Abbildung modifiziert aus (44)

Während es bei den Normalgewichtigen zu einem signifikanten Anstieg des Insulinsensitivitätsindex nach Insulinsprayapplikation verglichen mit Placebospray kam ($p=0,0077$), ergab sich keine solche Änderung bei den Übergewichtigen ($p=0,9$). Allerdings zeigte sich in beiden Kohorten auch nach Placebosprayapplikation im Verlauf des Clamps eine leichte Verbesserung des Insulinsensitivitätsindex im zweiten Steady State verglichen mit den Werten des ersten Steady States.

Es zeigte sich ein Trend für eine negative Korrelation zwischen Insulinsensitivitätsindex und BMI ($p=0,1$) und eine signifikante negative Korrelation für das Alter ($p=0,0080$). Somit zeigten besonders die jungen und schlanken Probanden eine messbare Reaktion auf die intranasale Sprayapplikation. Dieser Effekt wurde durch Alter und höherem BMI abgeschwächt und in der Kohorte der Übergewichtigen zeigte sich keine Reaktion des Insulinsensitivitätsindex auf intranasales Insulin.

Die Glukoseinfusionsrate korrelierte ebenfalls negativ mit dem BMI ($p=0,0348$), allerdings zeigte sich hier keine signifikante Korrelation zum Alter ($p=0,2$).

3.3 Freie Fettsäuren im Plasma

Um den Einfluss von intranasalem Insulin auf die Lipolyse zu untersuchen, wurden sowohl bei den Normalgewichtigen (Abb.10), als auch bei den Übergewichtigen (Abb.11) die freien Fettsäuren im Plasma als Marker für die Lipolyse zu mehreren Zeitpunkten im Verlauf des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps gemessen. Je stärker die Lipolyse supprimiert ist, desto größer ist der erwartete Abfall der freien Fettsäuren im Plasma.

3.3.1 Normalgewichtige

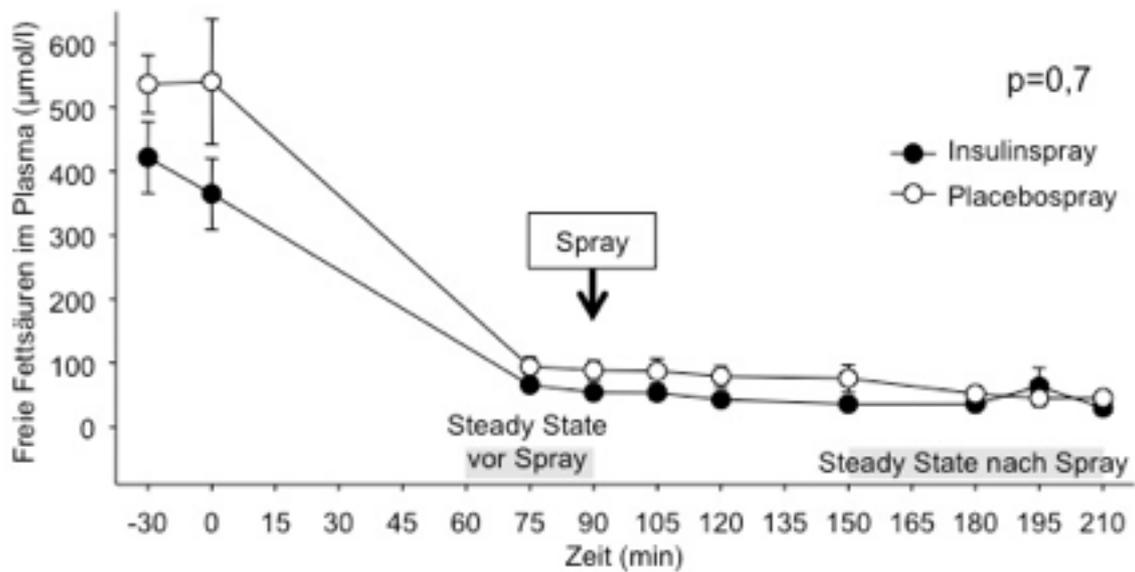


Abb.10: Freie Fettsäuren im Plasma ($\mu\text{mol/l}$) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von $0,25\text{mU/kg KG/min}$ und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 10 normalgewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA).

Da im hyperinsulinämischen Glukose Clamp exogenes Insulin zugeführt wurde und somit der Insulinplasmaspiegel anstieg (vgl. Abb.3), sank der Spiegel an freien Fettsäuren schon in der ersten Phase des Clamps vor Sprayapplikation, dargestellt in Abbildung 10. Vor Beginn des Clamps lag der Plasmaspiegel an freien Fettsäuren im Mittel bei $452,5 \pm 58,8 \mu\text{mol/l}$ und sank bis zum ersten Steady State vor Sprayapplikation auf $70,1 \pm 9,0 \mu\text{mol/l}$ ab. Nach Insulinspray änderten sich diese Werte kaum, es kam zu keinem weiteren Abfall der freien Fettsäuren im Plasma. Dasselbe ließ sich für den Verlauf nach Placebospray beobachten. Auch hier änderten sich die Werte im weiteren Verlauf des Clamps nicht. In der letzten Messung lag der Mittelwert nach Insulinspray bei $29,5 \pm 2,8 \mu\text{mol/l}$, nach Placebospray bei $45,0 \pm 6,8 \mu\text{mol/l}$. Dieser Unterschied wurde nicht signifikant.

Der Gehalt an freien Fettsäuren und damit die Lipolyse ließen sich somit durch Insulinsprayapplikation, verglichen mit Placebo, im Rahmen eines hyperinsulinämischen Glukose Clamps bei normalgewichtigen, gesunden Probanden nicht weiter supprimieren ($p_{\text{MANOVA}}=0,7$).

3.3.2 Übergewichtige

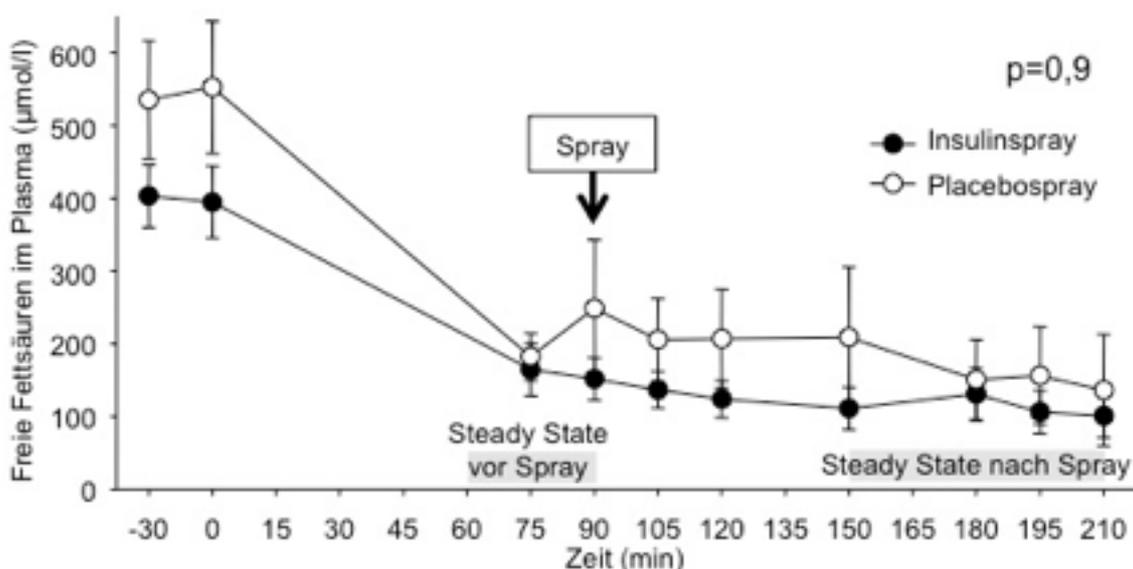


Abb.11: Freie Fettsäuren im Plasma ($\mu\text{mol/l}$) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von $0,25\text{mU/kg KG/min}$ und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 5 übergewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA).

Im hyperinsulinämischen Glukose Clamp wurde auch bei den Übergewichtigen exogenes Insulin zugeführt und somit der Insulinplasmaspiegel angehoben (Abb.7). Daher sank der Spiegel an freien Fettsäuren schon vor Sprayapplikation im ersten Teil des Clamps. Vor Beginn lag der Mittelwert bei $464,6 \pm 53,1 \mu\text{mol/l}$ und sank bis zum ersten Steady State

auf $194,8 \pm 44,8 \mu\text{mol/l}$. Dieser Wert lag höher als der Vergleichswert in der normalgewichtigen Kohorte. Nach Insulinsprayapplikation kam es zu keiner signifikanten Änderung der freien Fettsäuren. Auch nach Placebogabe blieben die freien Fettsäuren auf niedrigem Niveau ohne weiter signifikant abzufallen. In der letzten Messung ergab sich ein Spiegel von $101 \pm 30 \mu\text{mol/l}$ am Insulin-Tag und ein Spiegel von $136 \pm 77 \mu\text{mol/l}$ am Placebotag.

Der Gehalt an freien Fettsäuren und damit die Lipolyse ließen sich durch Insulinsprayapplikation, verglichen mit Placebo, im Rahmen eines hyperinsulinämischen Glukose Clamps bei Übergewichtigen nicht weiter supprimieren ($p_{\text{MANOVA}}=0,9$).

3.4 HDL- und LDL-Cholesterin im Plasma

Um eine mögliche Regulierung des peripheren Cholesterinstoffwechsels durch die Insulinkonzentration im Liquor zu untersuchen, wurde in beiden Kohorten der Gehalt an HDL- und LDL-Cholesterin im Plasma zu mehreren Zeitpunkten bestimmt und jeweils die Werte nach Insulinspray mit denen nach Placebo verglichen (Abb.12-15).

3.4.1 Normalgewichtige

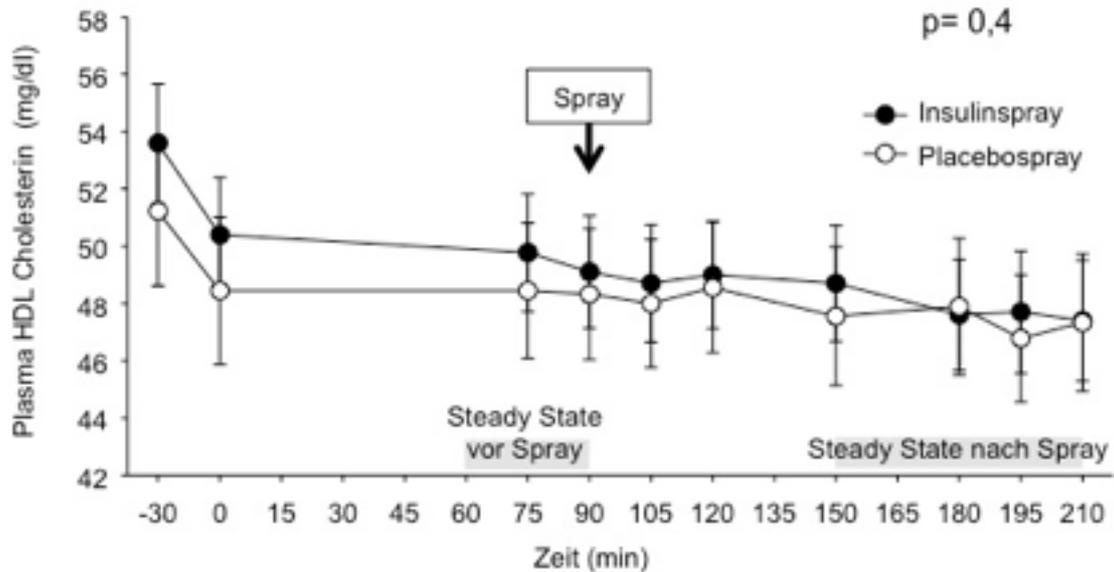


Abb.12: HDL im Plasma (mg/dl) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 10 normalgewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA).

Wie in Abbildung 12 zu sehen, zeigt der Spiegel des HDL im Verlauf des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps bei den Normalgewichtigen keinen signifikanten Unterschied zwischen Insulinspray und Placebo (HDL $p_{\text{MANOVA}}=0,4$). Vor Beginn des Clamps lag der mittlere Plasmaspiegel bei $49,5 \pm 1,6$ mg/dl. Deskriptiv ist ein leichter Abfall im Verlauf des 210-minütigen Clamps an nüchteren Probanden zu erkennen. So lag der letzte Messwert am Tag des Insulinsprays im Mittel bei $47,4 \pm 2,1$ mg/dl, am Tag des Placebosprays bei $47,3 \pm 2,4$ mg/dl.

Es zeigte sich an beiden Tagen keine Reaktion der HDL Konzentrationen auf die Sprayapplikation und damit einen erhöhten Insulinliquorspiegel im

Rahmen eines hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps bei Normalgewichtigen.

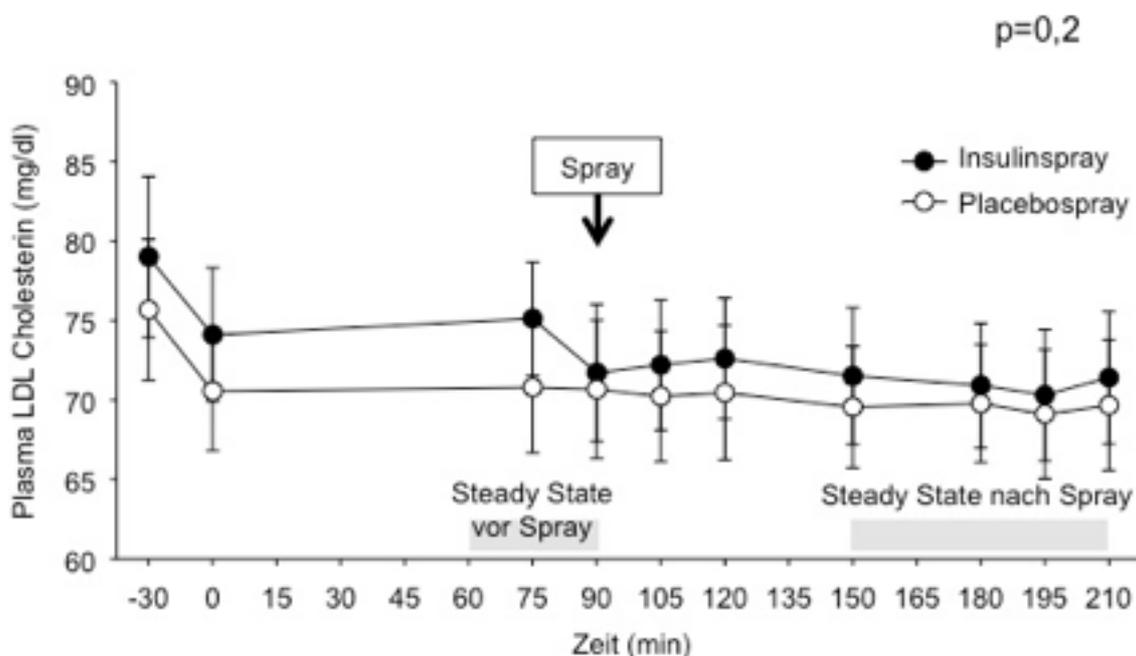


Abb.13: LDL im Plasma (mg/dl) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 10 normalgewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA).

Die gleichen Messungen wurden für das LDL durchgeführt, siehe Abbildung 13. Über einen Zeitraum von 210 Minuten wurde ein hyperinsulinämischer euglykämischer Glukose Clamp bei Normalgewichtigen durchgeführt und die LDL Konzentrationen nach Insulinspray oder Placebo verglichen. Der Ausgangswert lag im Mittel bei $72,4 \pm 2,8$ mg/dl. Es zeigte sich keine messbare Reaktion auf die Sprayapplikation. Der Wert der letzten Messung lag nach Insulinspray bei $71,4 \pm 4,2$ mg/dl, nach Placebo bei $69,7 \pm 4,1$ mg/dl.

Deskriptiv zeigt sich ein leichter Abfall des LDL im Verlauf des Clamps bei den nüchternen Probanden. Ein signifikanter Unterschied der LDL Konzentrationen zwischen Insulinsprayapplikation und Placebo konnte im Rahmen eines hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps bei Normalgewichtigen nicht festgestellt werden (LDL $p_{\text{MANOVA}}=0,2$).

3.4.2 Übergewichtige

Um ein möglichen Unterschied zwischen Normalgewichtigen und Übergewichtigen auf die Insulinsprayapplikation zu detektieren, wurden dieselben Konzentrationsbestimmungen für HDL und LDL in der Kohorte der Übergewichtigen durchgeführt.

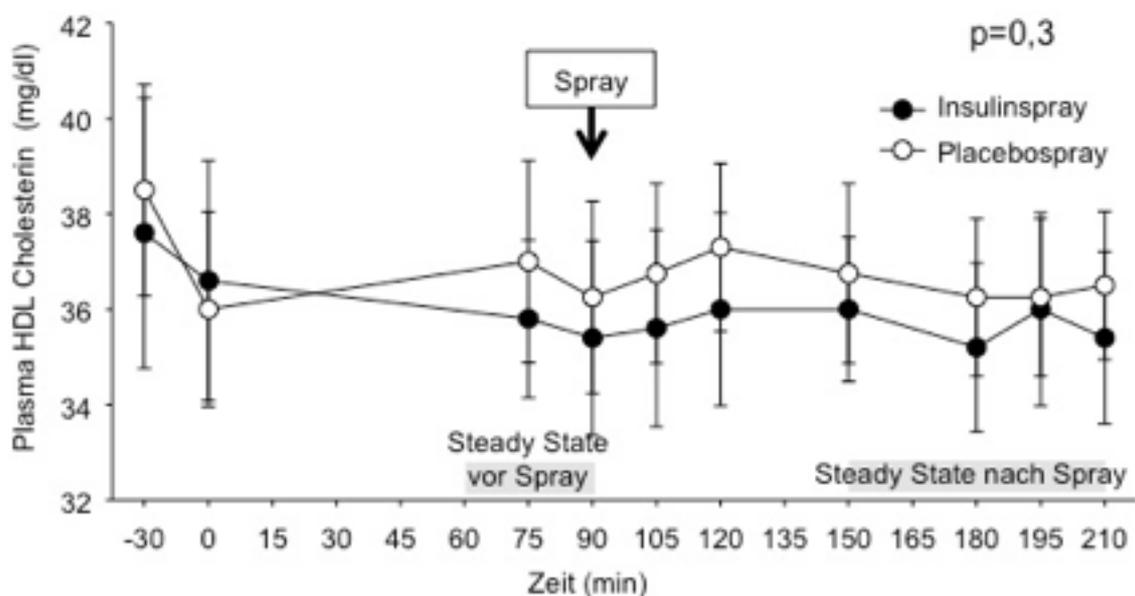


Abb.14: HDL im Plasma (mg/dl) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von 0,25mU/kg KG/min und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 5 übergewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA).

Im Verlauf der hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps über 210 Minuten wurden die HDL Konzentrationen bestimmt, siehe Abbildung 14. Der mittlere Ausgangswert lag bei $36,3 \pm 1,6$ mg/dl und damit deutlich unter dem Wert der Normalgewichtigen ($49,5 \pm 1,6$ mg/dl). Im Verlauf des Clamps zeigte sich keine signifikante Änderung, weder auf die Sprayapplikation, noch auf den Verlauf nach Insulinspray oder Placebo. In der letzten Messung lag der mittlere Wert nach Insulinspray bei $35,4 \pm 1,8$ mg/dl, nach Placebo bei $36,5 \pm 1,6$ mg/dl. Auch diese Werte lagen deutlich unter denen der normalgewichtigen Kohorte.

Damit hat die intranasale Insulinsprayapplikation im Vergleich zu Placebo im Rahmen eines hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps keinen signifikanten Einfluss auf die Konzentration an HDL bei Übergewichtigen (HDL $p_{\text{MANOVA}}=0,3$).

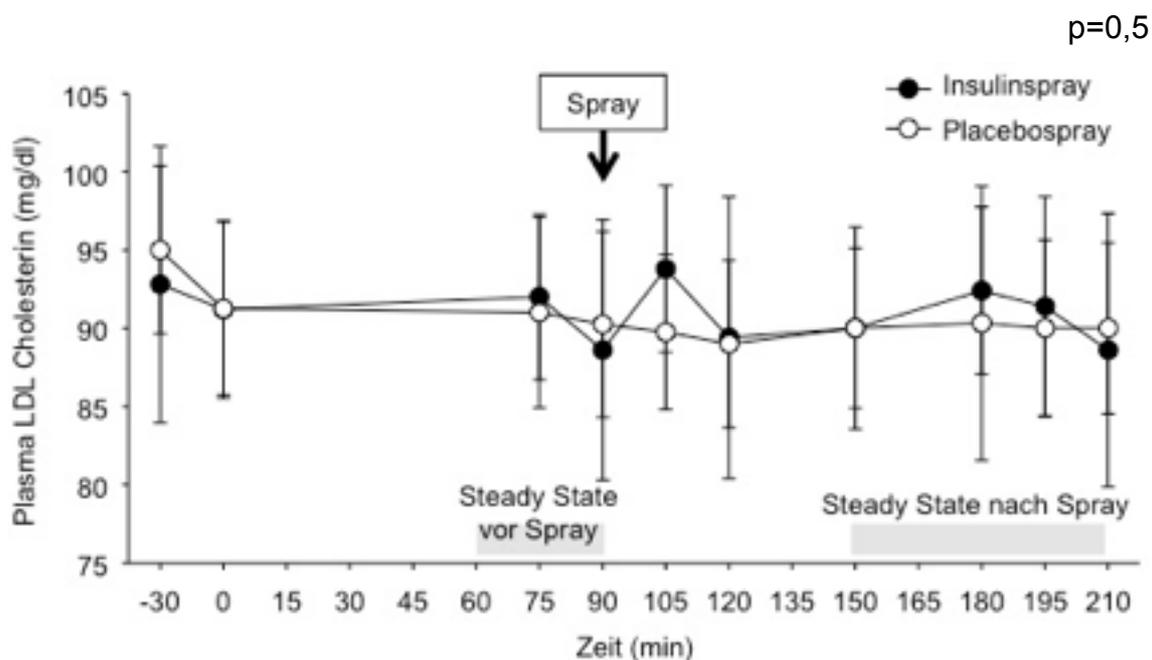


Abb.15: LDL im Plasma (mg/dl) im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp über 210 Minuten bei einer Insulininfusionsrate von $0,25 \text{ mU/kg KG/min}$ und der Gabe von intranasalem Insulinspray (schwarze Kreise) oder Placebospray (weiße Kreise) bei 5 übergewichtigen, gesunden Probanden. Angegeben ist der Mittelwert \pm Standardabweichung. Der p-Wert wurde mithilfe einer Varianzanalyse für Messwiederholungen berechnet (MANOVA).

Parallel zum HDL wurde in der Kohorte der Übergewichtigen auch der Gehalt an LDL im Plasma im Verlauf des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps bestimmt, siehe Abbildung 15. Die mittleren Konzentrationen vor Beginn des Clamps lagen bei $91,2 \pm 3,7$ mg/dl und damit deutlich über den Ausgangswerten der Normalgewichtigen, die hier nur eine Konzentration von 73mg/dl erreichten. Es zeigte sich keine signifikante Änderung des LDL Spiegel im Verlauf des Clamps bei den Übergewichtigen. In der letzten Messung lag der Mittelwert nach Insulinspray bei $88,6 \pm 8,7$ mg/dl, nach Placebo bei $90,0 \pm 5,5$ mg/dl.

Wie bei den Normalgewichtigen zeigte sich auch bei den Übergewichtigen im Rahmen eines hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps kein Einfluss von intranasalem Insulin auf den Plasmagehalt an LDL verglichen mit Placebo ($p_{\text{MANOVA}}=0,5$).

4 Diskussion

Das zentrale Ergebnis der vorgelegten Studie ist, dass durch intranasale Insulingabe und damit verbundener Erhöhung des zerebralen Insulinsignallings sich eine Verbesserung der peripheren Insulinsensitivität zeigt, gemessen mit der Goldstandardmethode des hyperinsulinämisch euglykämischen Clamps. Diese Verbesserung der peripheren Insulinsensitivität ist nur bei schlanken Probanden beobachtbar, nicht bei Übergewichtigen. Somit ist bei Übergewichtigen eine Insulinresistenz des Gehirns zu vermuten. Im Folgenden werden die Ergebnisse und Methoden der Studie vor dem Hintergrund der bestehenden Literatur diskutiert.

4.1 Probandencharakteristika

Ein Ziel der Studie bestand darin, die physiologischen Reaktionen auf intranasales Insulin zu untersuchen. Um mögliche Einflussfaktoren durch probandenspezifische Pathologien zu minimieren, wurden sowohl in der Kohorte der Normalgewichtigen als auch der übergewichtigen Probanden mit chronischen Erkrankungen oder Medikamenteneinnahme ausgeschlossen. Da die Insulinsensitivität auch bei Gesunden im Alter abnimmt (17), wurden möglichst junge Probanden gesucht (Alter < 40 Jahre). Mit einem mittleren Alter von 26 Jahren bei den Normalgewichtigen und 28 Jahren bei den Übergewichtigen, lag unser Probandenkollektiv in diesem Bereich, sodass der Einfluss des Alters möglichst niedrig gehalten werden konnte. Mit einer Spannweite von 19 – 35 Jahren zeigte sich dennoch ein Alterseinfluss.

Den wichtigsten Unterschied der beiden Kohorten stellte der BMI dar. Hier konnte durch eine Bandbreite des BMI und einen deutlichen Unterschied der beiden Kohorten im Körpergewicht eine Trennschärfe erreicht werden, die Aussagen über den Einfluss des BMI auf die Reaktion auf intranasales Insulin zulässt.

Die beiden Kohorten unterschieden sich, wenn auch nicht statistisch signifikant, auch in ihren Nüchternblutzuckerwerten. Dabei könnte der leicht höhere Wert der Übergewichtigen für eine niedrigere Glukosetoleranz und eine verminderte Insulinsensitivität sprechen, die bei Übergewichtigen schon seit

langem bekannt ist und die Entstehung von weiterem Übergewicht durch insgesamt höhere Insulinspiegel und eine damit verbundene Hemmung der Lipolyse negativ beeinflussen (4). Zu dieser Erklärung passen die ebenfalls leicht höheren Nüchterninsulinwerte der Übergewichtigen verglichen mit den Normalgewichtigen. Beide Laborwerte lagen allerdings im Normbereich, sodass keine diagnostizierbare Stoffwechselerkrankung vorlag.

Interessanterweise zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Höhe des Entzündungsmarker CRP. Für Diabetes Typ 2 ist die Entwicklung generalisierter inflammatorischer Prozesse bekannt (Mikroinflammation). Diese Prozesse können außerdem durch Lipotoxizität und Adipositas hervorgerufen werden. Hierbei wird angenommen, dass Makrophagen in weißes Fettgewebe einwandern und dort eine Mikroinflammation hervorrufen. Außerdem wird die Zytokinproduktion und die Produktion akuter Phase Proteine hochreguliert und die Signalwege der Komplementaktivierung und inflammatorischer Prozesse verändert (29)(45). Möglicherweise zeigen sich in dem erhöhten CRP bei den ansonsten gesunden, adipösen Probanden erste Anzeichen für diesen Prozess.

Übergewicht kann auch durch eine Hypothyreose hervorgerufen werden. Eine Störung im hormonellen Regelkreis der Schilddrüse hat Auswirkungen auf den gesamten Metabolismus bis hin zur Entwicklung eines metabolischen Syndroms (46). Aus diesem Grund wurden alle Probanden im Vorfeld auf ein erhöhtes oder erniedrigtes TSH überprüft. Hier zeigten sich keine Auffälligkeiten.

In den weiteren Parametern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede oder Auffälligkeiten, so dass von zwei Kohorten gesprochen werden kann, die sich deutlich in ihrem BMI unterscheiden, ansonsten aber Vergleiche zueinander zulassen. Da jeder Proband mit seinem eigenen Placebowert verglichen wurde und die Reihenfolge der beiden Messungen randomisiert wurde, ist der Unterschied der Insulin- versus Placebogruppe so gering wie möglich gehalten.

4.2 Verbesserung der Insulinsensitivität durch intranasales Insulinspray

In vorherigen Studien zeigte sich bei Gesunden eine Reaktion der peripheren Insulinsensitivität auf intranasales Insulin (42). Nach intranasalem Insulinspray fanden sich niedrigere postprandiale Insulinspiegel als nach Placebo Applikation. Da sich die Plasmaglukose nicht unterschied, kann damit auf eine verbesserte Insulinsensitivität geschlossen werden (42). Eine der verwendeten Methoden ist die Berechnung des HOMA-IR. In die Berechnung gehen die gleichzeitig gemessenen Plasmaglukose- und Plasmainsulinspiegel ein. Der Kehrwert dieses Wertes stellt eine Näherung der Insulinsensitivität dar. Hierbei zeigte sich eine kurzfristige Verschlechterung der peripheren Insulinsensitivität nach intranasalem Insulin gefolgt von einer deutlich länger andauernden Periode einer verbesserten Insulinsensitivität (31). Allerdings wurde in dieser Studie (wie auch in der aktuell vorgelegten Arbeit) eine geringe Absorption des Insulinnasensprays mit einem kurzfristigen Anstieg des Plasmainsulins beobachtet. Da dies möglicherweise einen Einfluss auf die Berechnung des HOMA-IR hat, wählten wir in unsere Studie den hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp als genauere Methode zur Bestimmung der peripheren Insulinsensitivität.

4.2.1 Messung der Insulinsensitivität beim Menschen

Für die Messung der Insulinsensitivität beim Menschen gibt es unterschiedliche Methoden. Goldstandard stellt der hyperinsulinämische euglykämische Glukose Clamp dar. Allerdings ist für dieses Experiment die exogene Zufuhr von Insulin notwendig. Meistens wird hierfür eine Dosis von 1mU/kgKG/min verwendet um mit dieser Methode auch insulinresistente Patienten untersuchen zu können. In dieser Dosierung zeigten sich allerdings im MEG messbare Effekte auf der Hirnaktivität, während es bei niedrigeren Dosierungen zu keiner signifikanten Beeinflussung kam (15). Daher wählten wir in unsere Studie einen Clamp mit einer niedrigeren Insulindosis von $0,25\text{mU/kg/min}$ um eine zentralnervöse Insulinwirkung durch das systemisch applizierte Insulin des Clamp-Versuchs zu minimieren und somit die Möglichkeit der

Modulation durch Insulin Nasenspray zu erhalten. Da unsere Probandenkollektiv stoffwechselgesund war, ließ sich damit bei allen Probanden die erforderliche Hyperinsulinämie erreichen.

Systemisch verabreichtes Insulin kann über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn gelangen und dort die Insulinliquorkonzentration erhöhen (47)(18). Die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke weist starke individuelle Unterschiede auf und erste Studien haben Hinweise darauf geliefert, dass dieser Transport außerdem sättigbar ist (48)(49). Auch dieser Effekt und seine möglichen Konsequenzen lassen sich mit einer niedrigen Insulindosis im Clamp minimieren, wenn auch nicht vollständig ausschließen.

Aus diesen Gründen wurden die Änderungen der Insulinsensitivität placebokontrolliert untersucht. Ein möglicher Effekt des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps selber, ließ sich somit herausfiltern.

Beobachten ließ sich auch in den Placebo Messungen ein Anstieg der Glukoseinfusionsrate und damit der Insulinsensitivität im Verlauf des Clamps. Dabei stellt sich die Frage, ob der Glukose Clamp selbst diese Änderung bewirkt oder zirkadiane Rhythmen diesem Effekt zugrunde liegen. Diese zirkadiane Rhythmen beruhen unter anderem auf Licht und die davon abhängige Melatonin Ausschüttung, die wiederum die Sekretion des Wachstumsfaktors Insulin-like growth faktor 2 (IGF-2) beeinflusst (50)(51).

Einen weiteren Einfluss auf die Insulinsensitivität stellt die Cortisolkonzentration dar. Hohe Cortisolspiegel können sogar zu einem steroidinduzierten Diabetes führen (52). Die Cortisolspiegel ändern sich allerdings nicht unter dem Einfluss von intranasalem Insulin (31) und Cortisol bietet somit keine Erklärung für die unterschiedliche Insulinsensitivität zwischen Placebo- und Insulinapplikation und die daraus resultierende Änderung in der peripheren Insulinsensitivität in unserer Studie.

Die Insulinsensitivität ändert sich außerdem durch Nahrungsaufnahme, Sport und innerhalb des Tagesverlaufs (29)(28)(50). Da sich die Probanden in unserem Studiendesign weder körperlich betätigen, noch eine körperlich anstrengende Anreise zu den Studienräumen (z.B. Fahrradfahren) hinter sich gehabt haben durften, wurde der mögliche Effekt von Sport auf die gemessene

Insulinsensitivität so gering wie möglich gehalten. Auch eine Nahrungsaufnahme blieb bis Ende des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps untersagt. Der Anstieg im Tagesverlauf am Placebotag, zeigte sich sowohl in der Kohorte der Normalgewichtigen, als auch der Übergewichtigen. Dieser Effekt trat auf, obwohl sich bei den Übergewichtigen kein signifikanter Unterschied im prozentualen Anstieg des Insulinsensitivitätsindex nach intranasalem Insulin verglichen mit Placebo ergab. Somit liegt die Vermutung nahe, dass zirkadiane Rhythmen die Ursache für diese Änderungen sind.

4.2.2 Änderung der Insulinsensitivität in der Kohorte der Normalgewichtigen

Sowohl nach Insulinspray als auch nach Placebo zeigte sich im zweiten Steady State ein höherer Insulinsensitivitätsindex als im ersten Steady State. Allerdings stieg die Glukoseinfusionsrate und damit der Insulinsensitivitätsindex nach Insulinspray signifikant höher an als nach Placebo (siehe Abb.1). Ähnliche Ergebnisse lieferte eine Studie, die die postprandialen Insulinspiegel nach intranasalem Insulin oder Placebo verglich. Dabei zeigte sich trotz vergleichbarer Plasmaglukosewerten ein niedriger Insulinspiegel nach Insulinspray verglichen mit Placebo. Somit war weniger Insulin für die selbe Nahrungsmenge notwendig, die Insulinsensitivität also höher (42).

Eine weitere Studie, die mit intranasalem Insulin arbeitete, lieferte, zumindest für die Insulinsensitivität direkt nach Sprayapplikation gegenteilige Ergebnisse (31). Im Gegensatz zu dieser Studie, die die Insulinsensitivität über den HOMA-IR berechnete, zeigten sich in unserer Studie keine Anzeichen einer initialen Insulinresistenz. Die GIR stieg kontinuierlich an und verdoppelte sich bei einigen Probanden sogar nach Insulinsprayapplikation im Verlauf des restlichen Clamps. Damit zeigte sich hinsichtlich der längerfristigen Änderung in beiden Studien eine Verbesserung der Insulinsensitivität. In den zwei Stunden, die unser Clamp nach Sprayapplikation noch andauerte, kam es weder zu einem Abfall des Insulinsensitivitätsindex noch ließ sich ein Rückgang der GIR gegen Ende des Clamps beobachten. Somit kann man die Vermutung anstellen, dass die Insulinsensitivität auch über die zwei gemessenen Stunden

hinaus nach Insulinspray höher bleibt als nach Placebo. Um dies eindeutig zu verifizieren und auch Aussagen über die Dynamik treffen zu können, wäre eine Fortführung des Clamps notwendig. Dies wäre allerdings für die Probanden aufgrund der erforderlichen Nüchternheit während des gesamten Experiments unangenehm und aufwändig.

4.2.2 Einflussfaktor Übergewicht

Im Gegensatz zu den Normalgewichtigen zeigte sich bei den Übergewichtigen kein signifikanter Unterschied im Anstieg der Glukoseinfusionsrate zwischen Insulinspray und Placebo. Der Insulinsensitivitätsindex änderte sich zwar auch im Verlauf des Clamps, jedoch unabhängig von der Art des Spray. Deskriptiv waren die Werte im zweiten Steady State sogar schlechter nach Insulinspray als nach Placebo.

Ein negativer Einfluss des Körpergewichts auf die Insulinsensitivität, ist aus zahlreichen Studien bekannt (15)(48)(53)(54)(55)(56). Zu pathophysiologischen Veränderungen kann es auf unterschiedlichen Ebenen kommen. Der natürliche Weg des Insulins in den Liquor verläuft über die Blut-Hirn-Schranke. Hier kann es, insbesondere bei Übergewichtigen, zu einem reduzierten Transport und somit niedrigeren Insulinliquorspiegel kommen (48). In unserem Clamp-Experiment wurde intranasales Insulin zu Erhöhung des Liquorspiegels verabreicht. Dieses gelangt über extrazellulären Transport entlang der Hirnnervenfasern des Nervus Trigemini und Olfactorius ins Gehirn (6). Somit kann der Unterschied in der Reaktion auf intranasales Insulin in unserem Experiment nicht auf eine Veränderung im Transport über die Blut-Hirn-Schranke beruhen.

Hat das Insulin das Gehirn erreicht, bewirkt es eine Änderung der Aktivität bestimmter Hirnareale, die mit der Regulation des Metabolismus verknüpft sind. Insbesondere der Hypothalamus nimmt hierbei eine entscheidende Rolle ein und es zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Ansprechen auf intranasales Insulin und der Expression von Insulinrezeptoren in eben diesem Areal (53)(44). Funktionieren diese zentralen insulinabhängigen

Funktionsmechanismen allerdings nicht mehr, resultiert daraus eine zentrale Insulinresistenz (53)(57). Dies könnte eine Erklärung für das fehlende Ansprechen unserer übergewichtigen Kohorte auf die intranasale Insulingabe sein.

Zusätzlich zu diesen zentralen Faktoren, können auch periphere Faktoren die Insulinsensitivität bei Übergewicht nachteilig beeinflussen. Unsere Probanden in der übergewichtigen Kohorte zeigten schon vor Beginn des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp, verglichen mit den Normalgewichtigen, höhere Spiegel an freien Fettsäuren. Durch hohe Spiegel an freien Fettsäuren und von Adipozyten gebildeten Adipozytokinen, kann eine periphere Insulinresistenz verstärkt werden (29). Zusätzlich zu dieser peripheren Insulinresistenz, kann es auch, durch die als Lipotoxizität zusammengefassten Mechanismen, zu einer zentralen Insulinresistenz kommen (38)(16)(56). Somit könnte bei den übergewichtigen Probanden durch den hohen Körperfettanteil schon in jungen Jahren eine Insulinresistenz des Gehirns entstehen und dies eine weitere Erklärung für das fehlende Ansprechen auf intranasales Insulin darstellen.

Zusammengefasst lässt sich in unserer Studie eine negative Korrelation von BMI und Reaktion auf intranasales Insulin und damit die zentrale Insulinsensitivität bestätigen. Außerdem korreliert Übergewicht mit einer peripheren Insulinresistenz. Somit besteht die Möglichkeit, dass bei diesem Effekt auch das Hirn als Regulationsstelle eine Rolle spielt und sich eine zentrale Insulinresistenz auf die Stoffwechselprozesse in der Peripherie auswirkt. Diese Änderung in der Regulation der Glukosehomöostase tritt demnach schon zu einem Zeitpunkt auf, an dem die Probanden als stoffwechselgesund gelten und keine diagnostizierbaren Erkrankungen aufweisen. Trotzdem kann eine Insulinresistenz ein erster pathogenetischer Faktor bei der Entstehung eines Diabetes Typ 2 sein und somit eine verminderte zentrale Insulinresistenz möglicherweise ein sehr früher diagnostischer Marker.

4.2.3 Einflussfaktor Alter

Zusätzlich zum BMI hat auch das Alter einen Einfluss auf den Insulintransport über die Blut-Hirn-Schranke. Der Quotient aus Liquor- und Plasmainsulinspiegel sinkt mit zunehmendem Alter, was für einen verminderten Transport spricht (58). Dies kann allerdings keine Erklärung für die negative Korrelation zwischen Alter und Auswirkungen eines erhöhten Insulinliquorspiegels in unserer Studie sein, da wir durch die intranasale Gabe die Blut-Hirn-Schranke umgangen haben.

Einen möglichen Faktor im Gehirn selbst, kann die verminderte Insulinrezeptordichte im Hirn bei zunehmendem Alter darstellen (59). Hier zeigt sich außerdem eine Assoziation mit der neurodegenerativen Veränderung bei Morbus Alzheimer und der Gedächtnisleistung an sich.

Zusätzlich zu diesen zentralnervösen Faktoren, korreliert auch die im HOMA-IR gemessene periphere Insulinresistenz (60) und das Risiko ein metabolisches Syndrom zu entwickeln mit dem Alter (61). So kann von einer altersabhängigen herabgesetzten peripheren Insulinsensitivität ausgegangen werden.

Möglicherweise potenzieren sich auch mehrere altersabhängige Faktoren, die gemeinsam zu einem reduzierten Einfluss von intranasalem Insulin auf die Glukoseinfusionsrate im hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp führen. Interessant ist hierbei, dass in unserer Studie ein Alterseffekt schon bei einem mittleren Probandenalter von 27 Jahren zu beobachten war. Diese Alterserscheinung im Hinblick auf die zentral gesteuerte periphere Insulinsensitivität beginnt also deutlich vor dem vierzigsten Lebensjahr.

4.2.4 kurzzeitiger Plasmainsulinanstieg nach Sprayapplikation

In der ersten Plasmainsulinbestimmung nach Insulinsprayapplikation zeigte sich kurzfristig ein erhöhter Insulinspiegel. Insulin hat im Plasma eine sehr kurze Halbwertszeit (6), sodass diese messbare Erhöhung in der nächsten Plasmainsulinbestimmung nach weiteren 15 Minuten nicht mehr signifikant war.

Für eine nur geringfügige Absorption des intranasalen Insulins in die Blutbahn spricht, dass es während dieses Zeitraums es zu keiner Änderung der Plasmaglukose kam. Außerdem zeigte sich keine weitere Suppression des C-Peptids. Die C-Peptid Konzentration korreliert mit dem endogen gebildeten Insulin. Würde das exogene Insulin des Nasensprays die endogene Insulinproduktion supprimieren, wäre gleichzeitig ein Abfall des C-Peptid Spiegel messbar. Dies war nicht der Fall. Somit ist es unwahrscheinlich, aber nicht vollkommen auszuschließen (62), dass die später gemessene Änderung der Insulinsensitivität auf diese kurzfristige und ausschließliche Erhöhung des Plasmainsulin beruht.

Ein kurzzeitiger Anstieg des Plasmainsulins, wie wir ihn festgestellt haben, ist als „Spillover“ aus anderen Studien bekannt (31)(63)(64)(65). Dieser stellt ein Schwierigkeit für die Messung der Insulinsensitivität direkt nach Sprayapplikation dar. In einer Studie, die die Insulinsensitivität vor und nach intranasalem Insulinspray über den HOMA-IR berechnete, zeigte sich eine reduzierte Insulinsensitivität in den ersten Minuten nach Sprayapplikation, die sich im weiteren zeitlichen Verlauf über die Ausgangswerte hinaus verbesserte. Im Gegensatz dazu zeigte sich in unserer Studie kein kurzfristiger Abfall der Glukoseinfusionsrate, der für eine reduzierte Insulinsensitivität in den ersten Minuten sprechen könnte. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse könnte eine Absorption des intranasalen Insulins in den Blutkreislauf sein. Während das Plasmainsulin einen großen Störeffekt auf den berechneten HOMA-IR hat (63), wurde in unserer Studie die Insulinsensitivität mit einem hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp direkt gemessen. Durch eine Berechnung des Insulinsensitivitätsindex wurde außerdem der Plasmainsulinspiegel mit berücksichtigt.

Eine Möglichkeit für eine intranasale Insulinabsorption zu kontrollieren, stellte die Gabe eines intravenösen Insulinbolus in Höhe des „Spillover“ bei Placebospraygabe dar, der auch nach Placebo zu einem kurzfristig erhöhten Plasmainsulinspiegel führt. Diese Methode wurde bis jetzt nur in Studien angewandt, die, im Gegensatz zur erforderlichen Hyperinsulinämie in unserem hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp, ohne kontinuierliche

intravenöse Insulingabe arbeiteten (64)(65). Hier ergaben sich gegensätzliche Ergebnisse. In der ersten Studie zeigte sich bei nüchternen Probanden keine blutzuckersenkende Wirkung durch die intranasale Gabe von Insulin Aspart, die über eine intravenöse Applikation hinausgeht (64). Die zweite Studie allerdings lieferte Ergebnisse, die auf eine Suppression der endogenen Insulinproduktion hindeuten, die nach intranasaler Applikation stärker ausgeprägt ist als nach der intravenösen Insulinapplikation, die zu gleichen Insulinplasmaspiegeln führt (65). Verwendet wurde dafür das Insulinanalogon Lispro im Rahmen eines pancreatischen Clamps.

Fraglich ist, inwieweit sich die Ergebnisse dieser beiden Studien auf unsere Studie übertragen lassen. In unserem Studiendesign befinden sich die Probanden zum Zeitpunkt der intranasalen Insulinapplikation in einer konstanten leichten Hyperinsulinämie. Somit ähneln die Plasmainsulinwerte einem physiologischen postprandialen Zustand und damit dem Zeitpunkt zu dem ein Einfluss von Insulinwirkung im Gehirn auf den Metabolismus denkbar wäre. Für den hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp wurde Humaninsulin verwendet, was einen weiteren Unterschied zu den beschriebenen Studien darstellt. Trotzdem wäre es interessant in einer weiteren Studie unser Studienprotokoll durch eine „Spillover“ Kontrolle zu ergänzen.

Die wichtigsten Argumente, welche gegen einen Einfluss des „Spillover“ Insulins auf unsere Ergebnisse sprechen, bleiben die fehlende Änderung der C-Peptid und der zeitliche Abstand der kurzfristigen Plasmainsulinerhöhung zum gemessenen Insulinsensitivitätsindex. Bei einer relevanten Menge an zusätzlichem Insulin würde die endogene Produktion vollständig gehemmt werden und somit das C-Peptid als Marker für die Produktion abfallen. Außerdem ist die Insulinerhöhung im Plasma ein nur kurzfristiger messbarer Effekt, der auftritt lange bevor es zu einer über Stunden messbaren Verbesserung der Insulinsensitivität kommt.

4.3 Wirkung von intranasalem Insulinspray auf die Lipolyse

Unter physiologischen Bedingungen wird die systemische Lipolyse durch Insulin supprimiert. So können bei ausreichender Energiebereitstellung durch Glukose die körpereigenen Fettreserven geschützt werden.

Primär ist hierfür die Insulinkonzentration im Plasma verantwortlich. Allerdings kann auch die Liquorinsulinkonzentration die Regulierung der Lipid-Homöostase beeinflussen. Bei nüchternen Probanden und damit niedrigen systemischen Insulinspiegeln, ließ sich durch intranasaler Insulingabe und einer daraus resultierenden erhöhter Aktivität der Insulinrezeptoren im Gehirn ein Abfall der freien Fettsäuren im Plasma beobachtet (36). Ob diese Suppression der Lipolyse bei gleichzeitig erhöhter Lipogenese auch unter hyperinsulinämischen Clamp-Bedingungen stattfindet, haben wir in dieser Studie untersucht.

Trotz der niedrig gewählten Insulininfusionsrate, konnten wir keinen Abfall der freien Fettsäuren nach intranasaler Insulingabe verglichen mit Placebo finden. Es kam zu keiner weiteren Suppression der Lipolyse durch die Kombination aus systemisch- und intranasalapplizierten Insulin. Hierbei unterschieden sich Normalgewichtige und Übergewichtige nicht. Allerdings war der Abfall der freien Fettsäuren bei den Normalgewichtigen deutlicher ausgeprägt als bei den Übergewichtigen. Somit könnte bei einem Clamp mit einer Insulinlauftrate von 0,25mU/kgKG/min die Lipolyse bei Normalgewichtigen stärker als bei Übergewichtigen supprimiert werden und damit BMI-abhängig sein ohne dass eine weitere Suppression durch 160IU intranasales Insulin möglich ist.

Dies spricht für eine Insulinwirkung direkt an den Adipozyten, die bei den Normalgewichtigen ausgeprägter ist, da die Adipozyten insulinsensitiver sind und somit auf Insulin stärker mit einer Supprimierung der Lipolyse reagieren. Dies ist ein Prozess, der in der Peripherie unabhängig vom Gehirn abläuft und auf diesem Weg die Lipolyse soweit hemmt, dass eine zentraler Effekt durch intranasales Insulin nicht mehr signifikant wird.

4.4 Wirkung von intranasalem Insulinspray auf HDL- und LDL-Cholesterin

Übergewicht und Insulinresistenz haben einen Einfluss auf den Plasmagehalt an Triglyceriden, HDL und LDL und ihr Verhältnis zueinander (66)(67). Außerdem kann ein verminderter HDL Plasmaspiegel eine Insulinresistenz begünstigen und so eine Rolle in der Pathogenese des Diabetes Mellitus Typ 2 spielen (68). Ist dieser manifestiert, zeigen sich typische Muster einer Dyslipidämie mit erhöhten Triglyceriden, erniedrigtem HDL und einem geringeren Umsatz des LDL (69). Bei jungen gesunden Männern zeigte sich außerdem ein Einfluss der Insulinsensitivität auf wichtige Enzyme der Lipoproteinbiosynthese (70).

Aus diesem Grund haben wir in unserer Studie im Verlauf des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp die Plasmaspiegel an HDL und LDL zu mehreren Zeitpunkten bestimmt. Obwohl sich die Insulinsensitivität der beiden Kohorten deutlich unterschied und die Übergewichtigen keine messbare Reaktion auf intranasales Insulin zeigten, ergab sich in Hinblick auf HDL und LDL Konzentration kein Unterschied zwischen diesen Gruppen. In beiden Kohorten änderte sich der Gehalt der Lipoproteine HDL und LDL im Verlauf des Clamps nicht signifikant, obwohl die Insulinsensitivitäten einen Unterschied zwischen den Kohorten zeigte. Da sich auch keine Änderung durch den Start der Insulininfusion zu Beginn ergab, kann der Clamp an sich und die damit verbundene Hyperinsulinämie nicht ursächlich sein. Allerdings besteht die Möglichkeit, dass die Wirkung des intranasalen Insulins einen Langzeiteffekt auf HDL und LDL hat, auch wenn sich in unserer Studie keine direkte Auswirkung beobachten ließ. Anzunehmen ist hier, dass eine Änderung der hepatischen Enzymmenge und Aktivität einige Zeit dauert und auch die hepatische Insulinsensitivität und Gluconeogenese auf längere Sicht beeinflusst ist (40). Dafür spricht, dass sich in länger angelegten Studien unter der Wirkung von intranasalem Insulin längerfristige Ergebnisse in Bezug auf unterschiedliche gemessene Parameter zeigen und dies möglicherweise auch für HDL und LDL zutrifft (71).

Die Auswirkung von Übergewicht auf den Gehalt an HDL und LDL ließ sich an unseren Probanden bestätigen. So zeigten sie, im Vergleich zu den

Normalgewichtigen, niedrigere HDL- und höhere LDL-Konzentrationen und damit eine kardiovaskulär ungünstigere Konstellation, die auch bei einer Dyslipidämie im Rahmen eines Metabolischen Syndroms oder Diabetes Mellitus Typ 2 zu finden ist (72)(73). Allerdings lagen auch bei den Übergewichtigen die Laborwerte im Referenzbereich und der Unterschied zeigte sich nur im Vergleich zu den Normalgewichtigen.

4.5 Limitationen

Da in unsere Studie ausschließlich Männer untersucht wurden, wäre es notwendig in einer weiteren Studie auch die Wirkung von intranasalem Insulin bei Frauen mithilfe eines hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamp zu untersuchen; insbesondere, da sich bei der Gabe von intranasalem Insulin über mehrere Wochen deutliche Unterschiede zwischen Männern und Frauen gezeigt haben (71). Ob diese geschlechtsspezifische Reaktion auch bei einmaliger intranasaler Insulingabe messbar ist und worauf sie beruht, ist bisher ungeklärt.

Außerdem wäre es interessant Probanden im Alter von über 40 Jahren zu untersuchen um einen genaueren Einblick in die Entwicklung der zentralen Insulinsensitivität im Alterungsprozess zu erlangen.

Um mögliche Therapieoptionen bei Diabetes mellitus Typ 2 zu untersuchen und zu entwickeln, könnte man in die Studie Patienten mit einem manifestierten Diabetes oder anderen Stoffwechselerkrankungen einschließen.

4.6 Ausblick

Unsere Studie lieferte Evidenz dafür, dass bei schlanken Menschen die periphere Insulinsensitivität durch Insulinwirkung im Gehirn reguliert wird. Ob diese Änderung auf eine schnellere Aufnahme der Glukose in Fett- und Muskelgewebe oder auf eine reduzierte Glukosebereitstellung der Leber beruht, stellt eine noch nicht vollständig erforschte Frage dar. Auch im Hinblick auf die

Signalvermittlung zwischen Hirn und den peripheren metabolischen Auswirkungen bestehen offene Forschungsfragen.

Die Relevanz der Erforschung der zentralen Insulinwirkung ergibt sich aus der steigenden Inzidenz der Störungen in der Glukose- und Insulinhomöostase. In unserer übergewichtigen Kohorte zeigten sich, trotz klinischer Gesundheit, Anzeichen einer zentralen Insulinresistenz und ein fehlendes Ansprechen auf intranasales Insulin. Finden sich allerdings in Zukunft Möglichkeiten diese zentrale Insulinresistenz zu umgehen, könnte durch intranasale Insulinapplikation die Insulinsensitivität in der Peripherie erhöht werden und damit einer pathologischen Insulinresistenz und erhöhten Plasmainsulinwerten entgegengewirkt werden. Dies würde eine bedeutende Entwicklung in der Behandlung von Typ 2 Diabetes mellitus und den damit verbundenen Folgeerkrankungen darstellen.

4.7 Zusammenfassung

Aus Tierexperimenten ist ein Einfluss des von zentralnervösem Insulin und der Insulin-Rezeptordichte auf den peripheren Metabolismus bekannt. Die Insulinwirkung im Gehirn führt im Tiermodell zu einer Verbesserung der Insulinsensitivität, insbesondere in den metabolisch wichtigen Geweben wie Skelettmuskulatur, Fettgewebe und der Leber. In neueren Studien zeigte sich, dass auch beim Menschen diese zentralnervöse Insulinwirkung den peripheren Metabolismus reguliert kann. Welchen Einfluss die Insulinwirkung im menschlichen Gehirn sowohl auf den Glukosemetabolismus als auch auf die freien Fettsäuren und den Cholesterinmetabolismus darstellt, wurde in dieser Arbeit untersucht. Außerdem wurde nach Faktoren gesucht, die diese zentralnervöse Reaktion auf Insulin beeinflussen.

Die peripheren Insulinsensitivität wurde mit der Goldstandard-Methode bestimmt. Dafür wurden bei zwei Kohorten, bestehend aus normalgewichtigen bzw. übergewichtigen gesunden Männern an zwei Tagen ein hyperinsulinämischer euglykämischer Glukose Clamp über 210 Minuten durchgeführt. Die Insulininfusions-Rate betrug 0,25mU/kgKG/min. Die

Probanden erhielten in randomisierter Reihenfolge an einem Tag intranasales Insulinspray, am anderen Tag ein Placebospray mit denselben olfaktorischen Eigenschaften.

Die Normalgewichtigen benötigten nach Insulinspray eine höhere Glukoseinfusionsrate als nach Placebo um den Blutzucker stabil zu halten ($p=0,0015$). Im Gegensatz dazu war bei Übergewichtigen kein solcher Effekt von Insulinspray auf die Glukoseinfusionsrate messbar ($p=0,6$). Während des hyperinsulinämischen euglykämischen Glukose Clamps wurde durch das systemisch infundierte exogene Insulin die systemische Lipolyse gehemmt. Die freien Fettsäuren fielen daher ab. Weder bei den Normalgewichtigen noch bei den Übergewichtigen konnten die freien Fettsäuren durch die intranasale Insulinapplikation noch weiter supprimiert werden (Normalgewichtige: $p=0,7$; Übergewichtige $p=0,9$). Auch auf die Plasmaspiegel an HDL und LDL zeigte sich in beiden Kohorten kein Einfluss des intranasalen Insulins verglichen mit Placebo ($p>0,2$).

Zusammenfassend lässt sich eine Verbesserung der peripheren Insulinsensitivität durch intranasale Insulinapplikation beobachten. Diese korreliert negativ mit Alter und Body-Mass-Index und konnte ausschließlich bei normalgewichtigen, nicht jedoch bei übergewichtigen Männern festgestellt werden.

Übergewicht könnte also ein Faktor sein, der mit zerebraler Insulinresistenz assoziiert ist.

6 Literaturverzeichnis

1. Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature*. 13. Dezember 2001;414(6865):782–7.
2. DeFronzo RA. From the Triumvirate to the Ominous Octet: A New Paradigm for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. *Diabetes*. 4. Januar 2009;58(4):773–95.
3. Lorenzo C, Wagenknecht LE, D’Agostino RB, Rewers MJ, Karter AJ, Haffner SM. Insulin Resistance, β -Cell Dysfunction, and Conversion to Type 2 Diabetes in a Multiethnic Population. *Diabetes Care*. Januar 2010;33(1):67–72.
4. Groop L, Forsblom C, Lehtovirta M. Characterization of the prediabetic state. *Am J Hypertens*. September 1997;10(9 Pt 2):172S–180S.
5. Ketterer C, Tschritter O, Preissl H, Heni M, Häring H-U, Fritsche A. Insulin sensitivity of the human brain. *Diabetes Res Clin Pract*. August 2011;93 Suppl 1:47–51.
6. Born J, Lange T, Kern W, McGregor GP, Bickel U, Fehm HL. Sniffing neuropeptides: a transnasal approach to the human brain. *Nat Neurosci*. Juni 2002;5(6):514–6.
7. Rojas JM, Schwartz MW. Control of hepatic glucose metabolism by islet and brain. *Diabetes Obes Metab*. September 2014;16 Suppl 1:33–40.
8. Schwartz MW, Porte D Jr. Diabetes, obesity, and the brain. *Science*. 21. Januar 2005;307(5708):375–9.
9. Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW. Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature*. 21. September 2006;443(7109):289–95.
10. Peinado JM, Myers RD. Norepinephrine release from PVN and lateral hypothalamus during perfusion with 2-DG or insulin in the sated and fasted rat. *Pharmacol Biochem Behav*. August 1987;27(4):715–21.
11. Obici S, Zhang BB, Karkanias G, Rossetti L. Hypothalamic insulin signaling is required for inhibition of glucose production. *Nat Med*. Dezember 2002;8(12):1376–82.

12. Perrin C, Knauf C, Burcelin R. Intracerebroventricular infusion of glucose, insulin, and the adenosine monophosphate-activated kinase activator, 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-beta-D-ribofuranoside, controls muscle glycogen synthesis. *Endocrinology*. September 2004;145(9):4025–33.
13. Figlewicz DP, Brot MD, McCall AL, Szot P. Diabetes causes differential changes in CNS noradrenergic and dopaminergic neurons in the rat: a molecular study. *Brain Res*. 14. Oktober 1996;736(1–2):54–60.
14. Brüning JC, Gautam D, Burks DJ, Gillette J, Schubert M, Orban PC, u. a. Role of brain insulin receptor in control of body weight and reproduction. *Science*. 22. September 2000;289(5487):2122–5.
15. Tschritter O, Preissl H, Hennige AM, Stumvoll M, Porubská K, Frost R, u. a. The cerebrocortical response to hyperinsulinemia is reduced in overweight humans: A magnetoencephalographic study. *Proc Natl Acad Sci*. 31. Juli 2006;103(32):12103–8.
16. Tschritter O, Preissl H, Hennige AM, Sartorius T, Grichisch Y, Stefan N, u. a. The insulin effect on cerebrocortical theta activity is associated with serum concentrations of saturated nonesterified Fatty acids. *J Clin Endocrinol Metab*. November 2009;94(11):4600–7.
17. Tschritter O, Hennige AM, Preissl H, Grichisch Y, Kirchhoff K, Kantartzis K, u. a. Insulin effects on beta and theta activity in the human brain are differentially affected by ageing. *Diabetologia*. Januar 2009;52(1):169–71.
18. Heni M, Schöpfer P, Peter A, Sartorius T, Fritsche A, Synofzik M, u. a. Evidence for altered transport of insulin across the blood-brain barrier in insulin-resistant humans. *Acta Diabetol*. 27. Dezember 2013;
19. Hallschmid M, Schultes B. Central nervous insulin resistance: a promising target in the treatment of metabolic and cognitive disorders? *Diabetologia*. November 2009;52(11):2264–9.
20. Zhao W-Q, Chen H, Quon MJ, Alkon DL. Insulin and the insulin receptor in experimental models of learning and memory. *Eur J Pharmacol*. 19. April 2004;490(1–3):71–81.
21. den Heijer T, Vermeer SE, van Dijk EJ, Prins ND, Koudstaal PJ, Hofman A, u. a. Type 2 diabetes and atrophy of medial temporal lobe structures

on brain MRI. *Diabetologia*. Dezember 2003;46(12):1604–10.

22. Benedict C, Hallschmid M, Hatke A, Schultes B, Fehm HL, Born J, u. a. Intranasal insulin improves memory in humans. *Psychoneuroendocrinology*. November 2004;29(10):1326–34.

23. Guthoff M, Grichisch Y, Canova C, Tschritter O, Veit R, Hallschmid M, u. a. Insulin modulates food-related activity in the central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab*. Februar 2010;95(2):748–55.

24. Heni M, Kullmann S, Ketterer C, Guthoff M, Bayer M, Staiger H, u. a. Differential effect of glucose ingestion on the neural processing of food stimuli in lean and overweight adults. *Hum Brain Mapp*. 10. Januar 2013;918–28.

25. Stuart MJ, Baune BT. Depression and type 2 diabetes: inflammatory mechanisms of a psychoneuroendocrine co-morbidity. *Neurosci Biobehav Rev*. Januar 2012;36(1):658–76.

26. Mann JJ. Role of the serotonergic system in the pathogenesis of major depression and suicidal behavior. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol*. August 1999;21(2 Suppl):99S–105S.

27. Gupta D, Kurhe Y, Radhakrishnan M. Antidepressant effects of insulin in streptozotocin induced diabetic mice: Modulation of brain serotonin system. *Physiol Behav*. 22. April 2014;129:73–8.

28. Hawley JA, Lessard SJ. Exercise training-induced improvements in insulin action. *Acta Physiol Oxf Engl*. Januar 2008;192(1):127–35.

29. DeFronzo RA. Insulin resistance, lipotoxicity, type 2 diabetes and atherosclerosis: the missing links. The Claude Bernard Lecture 2009. *Diabetologia*. Juli 2010;53(7):1270–87.

30. Chondronikola M, Volpi E, Børsheim E, Porter C, Annamalai P, Enerbäck S, u. a. Brown adipose tissue improves whole-body glucose homeostasis and insulin sensitivity in humans. *Diabetes*. Dezember 2014;63(12):4089–99.

31. Heni M, Kullmann S, Ketterer C, Guthoff M, Linder K, Wagner R, u. a. Nasal insulin changes peripheral insulin sensitivity simultaneously with altered activity in homeostatic and reward-related human brain regions.

Diabetologia. 21. März 2012;55(6):1773–82.

32. Kullmann S, Frank S, Heni M, Ketterer C, Veit R, Häring H-U, u. a. Intranasal Insulin Modulates Intrinsic Reward and Prefrontal Circuitry of the Human Brain in Lean Women. *Neuroendocrinology*. 25. August 2012;

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

34. Wajchenberg BL. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. *Endocr Rev*. Dezember 2000;21(6):697–738.

35. Buettner C, Muse ED, Cheng A, Chen L, Scherer T, Poci A, u. a. Leptin controls adipose tissue lipogenesis via central, STAT3-independent mechanisms. *Nat Med*. Juni 2008;14(6):667–75.

36. Iwen KA, Scherer T, Heni M, Sayk F, Wellnitz T, Machleidt F, u. a. Intranasal insulin suppresses systemic but not subcutaneous lipolysis in healthy humans. *J Clin Endocrinol Metab*. Februar 2014;99(2):E246-251.

37. Scherer T, O'Hare J, Diggs-Andrews K, Schweiger M, Cheng B, Lindtner C, u. a. Brain insulin controls adipose tissue lipolysis and lipogenesis. *Cell Metab*. 2. Februar 2011;13(2):183–94.

38. Tschritter O, Preissl H, Hennige AM, Sartorius T, Stingl KT, Heni M, u. a. High cerebral insulin sensitivity is associated with loss of body fat during lifestyle intervention. *Diabetologia*. Januar 2012;55(1):175–82.

39. Pfrieger FW, Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res*. Oktober 2011;50(4):357–71.

40. Kleinridders A, Ferris HA, Cai W, Kahn CR. Insulin Action in Brain Regulates Systemic Metabolism and Brain Function. *Diabetes*. 7. Januar 2014;63(7):2232–43.

41. Suzuki R, Lee K, Jing E, Biddinger SB, McDonald JG, Montine TJ, u. a. Diabetes and insulin in regulation of brain cholesterol metabolism. *Cell Metab*. 1. Dezember 2010;12(6):567–79.

42. Benedict C, Brede S, Schiöth HB, Lehnert H, Schultes B, Born J, u. a. Intranasal insulin enhances postprandial thermogenesis and lowers

postprandial serum insulin levels in healthy men. *Diabetes*. Januar 2011;60(1): 114–8.

43. Haefliger TWV. Glucose Tolerance, Insulin Sensitivity, and the Homeostasis Model Assessment Method. *Diabetes Care*. 1. April 1998;21(4): 673–673.

44. Heni M, Wagner R, Kullmann S, Veit R, Mat Husin H, Linder K, u. a. Central insulin administration improves whole-body insulin sensitivity via hypothalamus and parasympathetic outputs in men. *Diabetes*. Dezember 2014;63(12):4083–8.

45. Wellen KE, Hotamisligil GS. Obesity-induced inflammatory changes in adipose tissue. *J Clin Invest*. Dezember 2003;112(12):1785–8.

46. Iwen KA, Schröder E, Brabant G. Thyroid hormones and the metabolic syndrome. *Eur Thyroid J*. Juni 2013;2(2):83–92.

47. Wallum BJ, Taborsky GJ, Porte D, Figlewicz DP, Jacobson L, Beard JC, u. a. Cerebrospinal fluid insulin levels increase during intravenous insulin infusions in man. *J Clin Endocrinol Metab*. Januar 1987;64(1):190–4.

48. Kern W, Benedict C, Schultes B, Plohr F, Moser A, Born J, u. a. Low cerebrospinal fluid insulin levels in obese humans. *Diabetologia*. November 2006;49(11):2790–2.

49. Banks WA. The source of cerebral insulin. *Eur J Pharmacol*. 19. April 2004;490(1–3):5–12.

50. Brouwer A, van Raalte DH, Diamant M, Rutters F, van Someren EJW, Snoek FJ, u. a. Light therapy for better mood and insulin sensitivity in patients with major depression and type 2 diabetes: a randomised, double-blind, parallel-arm trial. *BMC Psychiatry*. 2015;15:169.

51. Sharma S, Singh H, Ahmad N, Mishra P, Tiwari A. The role of melatonin in diabetes: therapeutic implications. *Arch Endocrinol Metab*. 28. August 2015;

52. van Raalte DH, Diamant M. Steroid diabetes: from mechanism to treatment? *Neth J Med*. Februar 2014;72(2):62–72.

53. Kullmann S, Heni M, Veit R, Scheffler K, Machann J, Häring H-U, u. a. Selective insulin resistance in homeostatic and cognitive control brain

areas in overweight and obese adults. *Diabetes Care*. Juni 2015;38(6):1044–50.

54. Flint A, Gregersen NT, Gluud LL, Møller BK, Raben A, Tetens I, u. a. Associations between postprandial insulin and blood glucose responses, appetite sensations and energy intake in normal weight and overweight individuals: a meta-analysis of test meal studies. *Br J Nutr*. Juli 2007;98(1):17–25.

55. Tuulari JJ, Karlsson HK, Hirvonen J, Hannukainen JC, Bucci M, Helmiö M, u. a. Weight loss after bariatric surgery reverses insulin-induced increases in brain glucose metabolism of the morbidly obese. *Diabetes*. August 2013;62(8):2747–51.

56. Stefan N, Wahl HG, Fritsche A, Häring H, Stumvoll M. Effect of the pattern of elevated free fatty acids on insulin sensitivity and insulin secretion in healthy humans. *Horm Metab Res Horm Stoffwechselforschung Horm Métabolisme*. Juli 2001;33(7):432–8.

57. 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* 2005. Februar 2008;32(2):275–82.

58. Sartorius T, Peter A, Heni M, Maetzler W, Fritsche A, Häring H-U, u. a. The brain response to peripheral insulin declines with age: a contribution of the blood-brain barrier? *PloS One*. 2015;10(5):e0126804.

59. Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, u. a. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm Vienna Austria* 1996. 1998;105(4–5):423–38.

60. Oya J, Nakagami T, Yamamoto Y, Fukushima S, Takeda M, Endo Y, u. a. Effects of age on insulin resistance and secretion in subjects without diabetes. *Intern Med Tokyo Jpn*. 2014;53(9):941–7.

61. Bonomini F, Rodella LF, Rezzani R. Metabolic syndrome, aging and involvement of oxidative stress. *Aging Dis*. März 2015;6(2):109–20.

62. Edgerton DS, Cherrington AD. Is Brain Insulin Action Relevant to the Control of Plasma Glucose in Humans? *Diabetes*. 3. Januar 2015;64(3):

696–9.

63. Nolan JJ, Færch K. Estimating insulin sensitivity and beta cell function: perspectives from the modern pandemics of obesity and type 2 diabetes. *Diabetologia*. November 2012;55(11):2863–7.

64. Ott V, Lehnert H, Staub J, Wönne K, Born J, Hallschmid M. Central nervous insulin administration does not potentiate the acute glucoregulatory impact of concurrent mild hyperinsulinemia. *Diabetes*. März 2015;64(3):760–5.

65. Dash S, Xiao C, Morgantini C, Koulajian K, Lewis GF. Intranasal Insulin Suppresses Endogenous Glucose Production in Humans Compared With Placebo in the Presence of Similar Venous Insulin Concentrations. *Diabetes*. 3. Januar 2015;64(3):766–74.

66. Goff DC, D’Agostino RB, Haffner SM, Otvos JD. Insulin resistance and adiposity influence lipoprotein size and subclass concentrations. Results from the Insulin Resistance Atherosclerosis Study. *Metabolism*. Februar 2005;54(2):264–70.

67. Bardini G, Rotella CM, Giannini S. Dyslipidemia and diabetes: reciprocal impact of impaired lipid metabolism and Beta-cell dysfunction on micro- and macrovascular complications. *Rev Diabet Stud RDS*. Summer-Fall 2012;9(2–3):82–93.

68. de Vries R, Borggreve SE, Dullaart RPF. Role of lipases, lecithin:cholesterol acyltransferase and cholesteryl ester transfer protein in abnormal high density lipoprotein metabolism in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Clin Lab*. 2003;49(11–12):601–13.

69. Vergès B. Pathophysiology of diabetic dyslipidaemia: where are we? *Diabetologia*. Mai 2015;58(5):886–99.

70. Riemens SC, Van Tol A, Stulp BK, Dullaart RP. Influence of insulin sensitivity and the Taq1B cholesteryl ester transfer protein gene polymorphism on plasma lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer protein activities and their response to hyperinsulinemia in non-diabetic men. *J Lipid Res*. August 1999;40(8):1467–74.

71. Hallschmid M, Benedict C, Schultes B, Fehm H-L, Born J, Kern W.

Intranasal insulin reduces body fat in men but not in women. *Diabetes*. November 2004;53(11):3024–9.

72. Borggreve SE, De Vries R, Dullaart RPF. Alterations in high-density lipoprotein metabolism and reverse cholesterol transport in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus: role of lipolytic enzymes, lecithin:cholesterol acyltransferase and lipid transfer proteins. *Eur J Clin Invest*. Dezember 2003;33(12):1051–69.

73. Taskinen M-R, Borén J. New insights into the pathophysiology of dyslipidemia in type 2 diabetes. *Atherosclerosis*. April 2015;239(2):483–95.

7 Danksagung

Als erstes danken möchte ich Prof. Häring. Besonders dankbar bin ich weiterhin meinem Betreuer Herrn Dr. med. Martin Heni und meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Andreas Fritsche für die hervorragende Betreuung und Unterstützung während meiner gesamten Doktorarbeit. Herrn Dr. med. Robert Wagner danke ich ganz herzlich für die vielen gemeinsamen Clamp Tage und die Unterstützung bei technischen Fragen.

Maike Borutta, Dr. Anja Böhm, Anna Bury, Anja Dessecker, Corinna Heni, und vor allem Andreas Vosseler danke ich für die technische Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und der Probandenbetreuung. Ohne ihre hervorragende Mithilfe und Unterstützung wäre diese Studie nicht möglich gewesen.

Ich bin unglaublich dankbar für die freundliche Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft des ganzen Teams und die immer wieder neuen Denkanstöße, die mein Interesse an wissenschaftlichem Arbeiten noch weiter bestärkt haben.

Für die Arbeit mit Statistik und Zahlen ein herzliches Dankeschön an meine Schwester und Iljana Schuler!

Nicht zuletzt gilt mein Dank allen Studienteilnehmern, die durch ihre bereitwillige und geduldige Teilnahme diese Studie und unsere Ergebnisse möglich gemacht haben.

8 Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde in der Medizinischen Klinik Tübingen, Abteilung IV unter Betreuung von Prof. Andreas Fritsche durchgeführt.

Die Probandenrekrutierung erfolgte eigenständig durch mich. Die Clampversuche wurden von mir in Zusammenarbeit mit Dr. Martin Heni und Dr. Robert Wagner durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Anleitung von Dr. Martin Heni durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den