

Aus der Medizinischen Klinik I  
der Universität zu Lübeck  
Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert

---

## Metabolisches Lernen

Wird die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien  
durch glutamaterge Mechanismen vermittelt?

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von  
Juliane Strube  
aus Alsfeld

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hendrik Lehnert

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Jürgen Sperner

Tag der mündlichen Prüfung: 16.8.2013

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 16.8.2013

Promotionskommission der Sektion Medizin

# INHALTSVERZEICHNIS

	Abkürzungsverzeichnis . . . . .	V
	Sonderzeichen . . . . .	VII
1	EINLEITUNG	1
1.1	Hypoglykämie . . . . .	1
1.1.1	Definition und Ursachen . . . . .	1
1.1.2	Symptome und Hormonelle Gegenregulation . . . . .	2
1.1.3	Mechanismen der Adaptation . . . . .	3
1.2	Synaptische Plastizität . . . . .	4
1.2.1	Synaptische Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD)	4
1.2.2	Glutamatrezeptor-Blockade . . . . .	5
1.3	Ziele und Fragestellung . . . . .	6
2	PROBANDEN UND METHODEN	8
2.1	Probanden . . . . .	8
2.2	Studiendesign und Dosierungsschema . . . . .	9
2.3	Versuchsablauf . . . . .	9
2.4	Analytische Methoden . . . . .	12
2.5	Statistische Auswertungen . . . . .	13

3	ERGEBNISSE	14
3.1	Blutglukose, Glukoseinfusionsraten, Insulin und C-Peptid . . . . .	14
3.2	Gegenregulatorische Hormone . . . . .	20
3.3	Herzfrequenz und Blutdruck . . . . .	26
3.4	Memantin-Konzentrationen . . . . .	29
4	DISKUSSION	30
4.1	Induktion der Adaptation . . . . .	30
4.2	Einfluss von glutamatergen Mechanismen auf die Adaptation . . . . .	31
4.3	Mögliche alternative Mechanismen der Adaptation . . . . .	32
4.4	Ausblick . . . . .	33
5	ZUSAMMENFASSUNG	35
6	LITERATURVERZEICHNIS	37
7	ANHANG	43
7.1	Studienprotokoll . . . . .	43
7.2	Votum der Ethik-Kommission . . . . .	49
8	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	51
9	TABELLENVERZEICHNIS	52
10	DANKSAGUNG	53
11	LEBENS LAUF	54

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ACTH	adrenokortikotropes Hormon
AMPA	a-Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic-Säure
ANOVA	Analysis Of Variance
aS	analytische Sensitivität
BMI	Body Mass Index
BZ	Blutzucker
bzw.	beziehungsweise
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ion
C-Peptid	Connecting-Peptid
dl	Deziliter
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GH	Somatotropin
GLUT	Glukosetransporter
HHN-Achse	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren-Achse
Hypo	Hypoglykämie
kcal	Kilokalorie
kg	Kilogramm
LDP	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
m	Meter
MEM	Memantin
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
min	Minuten
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mU	Milliunit
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat

$\mu\text{g}$	Mikrogramm
ng	Nanogramm
PBO	Placebo
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
U	Unit
UKSH	Universitätsklinikum Schleswig-Holstein
VK	Variationskoeffizient
VMH	Ventromedialer Hypothalamus
z.B.	zum Beispiel

## SONDERZEICHEN

$\alpha$  alpha

$\beta$  beta

$\gamma$  gamma

$\delta$  delta

$>$  größer als

$<$  kleiner als

$\pm$  plus/minus

$^\circ$  Grad

x mal

# KAPITEL 1

## EINLEITUNG

### 1.1 HYPOGLYKÄMIE

#### 1.1.1 DEFINITION UND URSACHEN

Von einer Hypoglykämie spricht man im Allgemeinen, wenn die Glukosekonzentration unter einen Wert von 50 mg/dl im kapillären Vollblut fällt. Klinisch lässt sich eine Hypoglykämie durch folgende Trias charakterisieren:

- Blutglukosekonzentration unter 50 mg/dl
- hypoglykämische Symptome
- Besserung der Symptome durch Glukosegabe

In der Praxis spricht man außerdem von einer Unterzuckerung, wenn unabhängig von dem Blutzuckerwert klinische Symptome wie Schwitzen, Zittern, Hunger, Konzentrationsdefizit, Schwindel und Schwächegefühl auftreten. Das kann, vor allem bei unzureichend eingestellten Patienten mit Diabetes mellitus, auch bei deutlich höheren Blutglukosekonzentrationen der Fall sein.

Hypoglykämien lassen sich nach dem klinischen Schweregrad einteilen. Während einer leichten Hypoglykämie ist der Patient noch in der Lage, sich selbst zu versorgen. Eine schwere Hypoglykämie ist dadurch definiert, dass der Patient die Hilfe anderer benötigt, um die Unterzuckerung zu therapieren.

Die Hauptursache von Hypoglykämien ist die Überdosierung von Insulin bzw. von hypoglykämiefördernden Medikamenten wie Sulfonylharnstoffen oder Gliniden im Rahmen einer Therapie des Diabetes mellitus. Das Auftreten von Hypoglykämien

stellt dabei die gefährlichste Komplikation dar, welche die Einstellung des Blutglukoseniveaus entscheidend einschränkt [7, 11]. Weitere Ursachen sind körperliche Belastung, Alkoholkonsum, inadäquate Kohlenhydratzufuhr und gastrointestinale Funktionsstörungen im Rahmen einer Infektion. Bei Menschen ohne Diabetes mellitus treten Hypoglykämien deutlich seltener auf. Inadäquate Kohlenhydratzufuhr bei übermäßiger körperlicher Betätigung kann hier die Ursache sein. Auch seltene Erkrankungen wie Insulinome oder eine Nebennierenrinden-Insuffizienz (Morbus Addison) gehen mit Hypoglykämien einher.

#### 1.1.2 SYMPTOME UND HORMONELLE GEGENREGULATION

In klinischen Experimenten lässt sich beobachten, dass bei einer stufenweisen Senkung der Plasmaglukosekonzentration neuroendokrine, subjektive und neurokognitive Reaktionen auftreten [41]. Die klassischen gegenregulatorischen Hormone Adrenalin, Glukagon, Cortisol und Wachstumshormon unterdrücken die endogene Insulinsekretion. Die Sekretion der Hormone unterliegt dabei einer gewissen Reihenfolge: Fällt die Blutglukosekonzentration auf etwa 60 mg/dl, wird zunächst Adrenalin (69 mg/dl) und Glukagon (68 mg/dl) freigesetzt. Darauf folgt die Sekretion von Wachstumshormon bei einer Blutglukosekonzentration von etwa 66 mg/dl. Zuletzt beginnt ab Blutglukosekonzentrationen von etwa 58 mg/dl die Freisetzung von Cortisol [47]. Zu Beginn einer Hypoglykämie, bei Plasmaglukosekonzentrationen von 50-60 mg/dl, reagiert der Mensch zunächst mit so genannten autonomen Symptomen, wie z.B. Schwitzen, Zittern oder Herzklopfen. Anschließend treten neuroglykopenen Symptomen, wie z.B. Konzentrationsstörungen, verschwommenes Sehen und Schwindel, auf [9]. Bei Plasmaglukosewerten unter 50 mg/dl kommt es zu neurokognitiven Störungen, die schließlich in Bewusstlosigkeit und Krampfanfälle münden können.

Wiederholte Hypoglykämien führen zu einer Abschwächung aller Komponenten der Hypoglykämie-Gegenregulation, ein Vorgang, der als Adaptation bezeichnet wird. Neuroendokrine, subjektive und neurokognitive Reaktionen, und damit auch die Warnsymptome für den Patienten, treten erst bei niedrigeren Plasmaglukosewerten auf [26]. Vorausgehende Hypoglykämien induzieren eine Hypoglykämie-Gegenregulations- und Wahrnehmungsstörung, die im weiteren Verlauf das Risiko für das Auftreten erneuter schwererer Hypoglykämien erhöht. Das führt zu einem Circulus vitiosus

[21]. Folglich prädisponieren Hypoglykämien durch die von ihnen hervorgerufene Abschwächung der Gegenregulation bzw. der Warnsymptome zum Erleiden weiterer Hypoglykämien [10, 13].

Die Adaptation der Hypoglykämie-Gegenregulation an wiederholt induzierte Hypoglykämien tritt auch bei gesunden Personen auf [24]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass vorausgegangene Hypoglykämien auf neurokognitiver Ebene die Beeinträchtigung der Kurzzeitgedächtnisleistung und der sensorischen Reizverarbeitungsprozesse durch eine erneute Hypoglykämie signifikant abschwächen [12].

### 1.1.3 MECHANISMEN DER ADAPTATION

Obwohl die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien intensiv untersucht wurde, sind die zugrunde liegenden pathophysiologischen Mechanismen noch immer nicht geklärt. In den letzten Jahren wurden verschiedene Ansätze verfolgt: Eine Hypothese war, dass erhöhte Konzentrationen systemischer Mediatoren (z.B. Cortisol) zu einer verminderten sympathoadrenalen Antwort auf eine anschließende Hypoglykämie führen [12]. Als weiterer möglicher Mechanismus wurde der verstärkte Glukosetransport über die Blut-Hirn-Schranke durch Hochregulation der Expression von GLUT-1 und GLUT-3 Glukosetransportern diskutiert, wodurch die Hypoglykämie-Gegenregulation in Bereiche niedrigerer systemischer Blutglukosekonzentrationen verschoben wird [24]. Ebenfalls diskutiert wurde ein veränderter zerebraler Glukosemetabolismus nach kürzlich vorausgegangenen Hypoglykämien. Thema aktueller Forschung ist die Modulation des Glukose-Sensing im Gehirn, wobei die hormonelle Gegenregulation und Hypoglykämie-Wahrnehmung bei Patienten mithilfe von Aktivatoren der Natrium-Glukose-Transporter und des Enzyms Glukokinase beeinflusst werden soll [1, 39]. Trotz dieser intensiven Forschungstätigkeit konnte der Mechanismus der Adaptation noch immer nicht ausreichend erklärt werden. Angesichts der Komplexität der neuroendokrinen Gegenregulation ist es wahrscheinlich, dass es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt, welches erfordert, verschiedenste Faktoren in Betracht zu ziehen. Aus psychologischer Sicht zeigt die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien Merkmale, die an einen klassischen zentralnervösen Lernprozess erinnern. So induziert die wiederholte Exposition auf einen Stimulus (Hypoglykämie) eine Abnahme in der Reaktion (gegenregulatorische Antwort), die durch Ausschalten des Stimulus wieder

aufgehoben werden kann [27]. Dieses Prinzip des metabolischen Lernens führte uns zu der Hypothese, dass die Adaptation an wiederholte Hypoglykämie auf einem Lernvorgang beruht, der durch Blockade von Glutamatrezeptoren aufgehoben werden kann (siehe Kapitel 1.2.3).

## 1.2 SYNAPTISCHE PLASTIZITÄT

Lernen beschreibt eine mehr oder weniger dauerhafte Verhaltensänderung aufgrund vorausgegangener Erfahrungen. Die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien wird hier als metabolischer Lernvorgang aufgefasst, bei dem vorausgegangene Hypoglykämien zu einer verminderten gegenregulatorischen Antwort auf nachfolgende Hypoglykämien führen. Grundlage des Lernens ist die Enkodierung neuer Information in neuronalen Netzwerken, über die die Verhaltensänderung vermittelt wird. Die dauerhafte Einspeicherung des Gelernten ist an nachfolgende Prozesse der Konsolidierung gebunden [20].

### 1.2.1 SYNAPTISCHE LANGZEITPOTENZIERUNG (LTP) UND LANGZEITDEPRESSION (LTD)

Auf neuronaler Ebene führt Lernen zu einer Induktion plastischer Veränderungen in neuronalen Netzwerken, die in eine längerfristige Veränderung der Aktivitätsmuster in diesen neuronalen Netzwerken mündet [38]. Die synaptische Langzeitpotenzierung (LTP), die die Effektivität der Erregungsübertragung an beteiligten Synapsen stärkt, stellt bei der Enkodierung neuer Informationen den zugrunde liegenden Schlüsselprozess dar [36]. Gleichzeitig kommt es an anderen Synapsen zu Langzeitdepression (LTD). LTP und LTD sind mit glutamaterger synaptischer Erregungsausbreitung assoziiert und können vor allem in limbischen Strukturen wie dem Hippokampus und der Amygdala, in den Basalganglien und dem Neocortex nachgewiesen werden [3, 8, 36]. Voraussetzung für die Induktion von LTP ist die verstärkte präsynaptische Freisetzung von Glutamat, das postsynaptisch an ionotrope NMDA (N-Methyl-D-Aspartat)-Rezeptoren und AMPA ( $\alpha$ -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isloxazolepropionic-Säure)-Rezeptoren bindet. Glutamat bewirkt an den NMDA-Rezeptoren eine Aufhebung der durch  $Mg^{2+}$  realisierten Blockade der postsynaptischen Signaltransduktion, was postsynaptisch zu einem verstärkten  $Ca^{2+}$ -Einstrom führt. Daraufhin kommt es über mehrere Teilschritte zu einer vermehrten Freisetzung und Integration von AMPA-Rezeptoren in die postsynaptische Membran und damit zu einer dauerhaft erhöhten Erregbarkeit der

postsynaptischen Membran durch Glutamat [37].

### 1.2.2 GLUTAMATREZEPTOR-BLOCKADE

Durch die Blockade von Glutamat-Rezeptoren vor dem Lernen kann die effektive Enkodierung neuer Informationen unterdrückt werden, was für subanästhetische Dosierungen von Ketamin beim Menschen gezeigt wurde [28]. Im Tierexperiment konnte nachgewiesen werden, dass durch die Gabe vergleichbarer Dosen von NMDA-Rezeptor-Blockern beim Tier Kurzzeitgedächtnisprozesse gehemmt werden, sowohl in vivo als auch in vitro [35, 52]. Wird der NMDA-Rezeptorblocker nach dem Lernen gegeben, ist entweder kein Einfluss auf die Gedächtnisbildung vorhanden, oder der Einfluss ist abgeschwächt. Dies unterstreicht die Schlüsselrolle der Glutamatrezeptoren dieses Typs für die Enkodierung. Im Gegensatz zu NMDA-Rezeptor-Blockern lassen sich nach der Gabe von AMPA-Rezeptorenblockern vor dem Lernen keine einheitlich hemmenden Effekte auf Enkodierungsprozesse bzw. die Induktion von LTP nachweisen [4]. Dagegen schwächen AMPA-Rezeptorenblocker die Aufrechterhaltung von LTP und verschlechtern wahrscheinlich dadurch die Konsolidierung von Gedächtnisinhalten. Über die NMDA- und AMPA-Rezeptoren beeinflusst das zentralnervöse glutamaterge System auch stark die Regulation der Hormonsysteme, die an der Hypoglykämie-Gegenregulation beteiligt sind [44]. Dass Glutamat die Freisetzung von Cortisol und Katecholaminen steigert, konnte im Tierexperiment gezeigt werden [32]. Werden NMDA-Rezeptoren stimuliert, führt das zu einer verstärkten Freisetzung von ACTH, Cortisol und Katecholaminen [31, 51]. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass während einer Hypoglykämie die extrazelluläre Glutamatkonzentration im Hippokampus stark ansteigt [46]. Diese zentralnervöse Glutamatfreisetzung vermittelt dabei die gegenregulatorische Antwort der Hypothalamus-Hypophysen-Nebennieren (HHN)-Achse [5]. Die Blockade der glutamatergen Neurotransmission durch Gabe eines NMDA-Rezeptorblockers führte tierexperimentell zu einer deutlichen Abschwächung der ACTH/Corticosteron-Antwort auf die Hypoglykämie [42]. Anders als beim Tier führte die Vorbehandlung beim Menschen mit dem NMDA-Rezeptorenblocker Memantin weder zu einer verstärkten noch zu einer abgeschwächten Gegenregulation während einer Hypoglykämie [43]. Unklar ist, ob der Unterschied zwischen den Befunden aus Tier- und Humanexperimenten auf die unterschiedlichen NMDA-Rezeptorblocker, die

in diesen Studien verwendet wurden, oder auf Speziesunterschiede zurückzuführen ist. Im Gegensatz zum Nager gibt es beim Menschen beispielsweise Hinweise darauf, dass moderate Hypoglykämien mit einer verminderten Glutamatfreisetzung assoziiert sind [2].

### 1.3 ZIELE UND FRAGESTELLUNG

Treten wiederholt Hypoglykämien auf, so adaptiert die Gegenregulation auf hormoneller, symptomatischer und kognitiver Ebene. Besonders für die hormonellen Komponenten (adrenerg/noradrenerg und ACTH/Cortisol-Antwort) ist diese Adaptation gezeigt worden. Die Hypothese dieser Arbeit ist, dass die Adaptation einen einfachen, elementaren metabolischen Lernprozess abbildet, was bedeutet, dass die Adaptation primär über zentralnervöse glutamaterge Mechanismen vermittelt wird. Das Ziel dieser Arbeit besteht darin, diesen Lernprozess zu charakterisieren und insbesondere seine Vermittlung durch das glutamaterge Neurotransmittersystem nachzuweisen. Die Fragestellung hat große klinische Relevanz, da die Adaptation der Hypoglykämie-Gegenregulation Ursache für eine gestörte Wahrnehmung von Hypoglykämien bei Patienten mit Diabetes mellitus ist, was die Behandlung dieser Patienten erschwert. Der Nachweis eines glutamaterg vermittelten Lernprozesses könnte neue Wege eröffnen, Hypoglykämie-Wahrnehmungsstörungen bei diesen Patienten lerntheoretisch-basiert zu behandeln.

Zum Nachweis der Hypothese, dass die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien glutamaterg vermittelt wird, werden gesunde Probanden während der Hypoglykämie-Clamp-Versuche und während der drei vorangehenden Tage mit Memantin (bzw. mit Placebo) behandelt. Memantin ist ein Amantadin-Derivat und NMDA-Rezeptor-Antagonist. Es wird in der Behandlung der Alzheimer-Demenz und in der frühen Therapie des Morbus Parkinson eingesetzt. Durch die Einnahme von Memantin besteht eine kontinuierliche NMDA-Rezeptorblockade während der ersten Hypoglykämie und auch während folgender Hypoglykämien.

Für die Placebobedingung erwarten wir eine Replikation vorausgehender Befunde, die zeigen, dass die endokrine Gegenregulation bei wiederholter Hypoglykämie adaptiert. Die kontinuierliche Unterbrechung der glutamatvermittelten Signaltransduktion sollte dagegen zu einer Blockade des metabolischen Lernprozesses führen. Das heißt

die endokrine Antwort (ACTH, Cortisol, Noradrenalin, Adrenalin, GH) sollte bei der wiederholten (dritten) Hypoglykämie genauso stark ausfallen wie bei der ersten Hypoglykämie.

## KAPITEL 2

### PROBANDEN UND METHODEN

#### 2.1 PROBANDEN

Sechzehn gesunde junge Männer wurden zweimal an jeweils zwei aufeinander folgenden Tagen untersucht. Die Testpersonen wurden durch Aushänge auf dem Lübecker Campus des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein rekrutiert. Bei den Probanden handelte es sich um Männer im Alter von 18 bis 32 Jahren (Durchschnittsalter  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM):  $24 \pm 1,0$  Jahre) mit einem Body-Mass-Index zwischen 20,2 und 26,3 kg/m<sup>2</sup> (Durchschnittswert  $\pm$  SEM:  $23,1 \pm 0,53$  kg/m<sup>2</sup>). In einer Voruntersuchung wurde eine Anamnese erhoben, eine klinische Untersuchung durchgeführt und Blut für die Bestimmung von einem kleinen Blutbild, Nierenretentionswerten, Leberparametern, Blutfettwerten, Schilddrüsenwerten, Blutzucker und Elektrolyten abgenommen. Probanden mit akuten oder chronischen Erkrankungen (Diabetes mellitus, Bluthochdruck, usw.) oder mit Nikotin-, Alkohol-, oder Drogenabusus sowie Testpersonen, die regelmäßig Medikamente einnahmen, im Schichtdienst arbeiteten, oder Leistungssport betrieben, wurden von den Versuchen ausgeschlossen. Vier Wochen vor und während der Versuche nahmen die Probanden nicht an anderen Studien teil und spendeten kein Blut. Alle Testpersonen wurden ausführlich über den Ablauf und das Ziel der Versuche aufgeklärt, nahmen freiwillig daran teil und erklärten sich schriftlich mit der Teilnahme einverstanden. Vor Durchführung der Versuche wurde die Studie durch die Ethikkommission der Universität Lübeck geprüft und genehmigt (siehe Anhang). Jeder Proband erhielt für die Teilnahme an der Studie

eine Aufwandsentschädigung von 300 €.

### 2.2 STUDIENDESIGN UND DOSIERUNGSSCHEMA

Jeder Proband nahm an zwei Versuchseinheiten im Abstand von mindestens vier Wochen teil, eine Einheit nach Einnahme von dem Glutamatrezeptor-Antagonisten Memantin (Dosierung und Verkapselung durch die Apotheke des UKSH, pro Kapsel 7,5 mg Memantinhydrochlorid) und eine unter Placebo-Bedingungen (Kapseln gleicher Form, Größe und Farbe, Hilfsstoffe Mannitol/hochdispertes Siliciumdioxid). In jeder Versuchseinheit wurden die Probanden dreimal nach dem hypoglykämischen Clamp-Verfahren unterzuckert, zweimal an Tag 1 und ein drittes Mal an Tag 2 (Tabelle 2.1).

Um an den Versuchstagen einen stabilen pharmakologischen Wirkspiegel zu erreichen, wurden die Probanden an den drei Tagen vor jeder Versuchseinheit um 17:00 Uhr für die Einnahme von 7,5 mg des Glutamatrezeptor-Antagonisten Memantin ins Labor bestellt. Eine weitere 7,5 mg Kapsel Memantin wurde den Probanden zur Einnahme am nächsten Morgen um 9:00 Uhr zu Hause mitgegeben, sodass sie ab dem zweiten vorausgehenden Tag bis einschließlich dem ersten Versuchstag eine tägliche Dosis von 15 mg Memantin einnahmen. Dieses Einnahmeschema wurde während der Versuchstage beibehalten. In der anderen Versuchseinheit wurden Placebo-Kapseln derselben Größe und Farbe nach dem gleichen Schema eingenommen. Die Studie wurde doppelblind und balanciert im Crossover-Design durchgeführt. Der experimentelle Teil der Studie fand von April bis Oktober 2008 im Schlaflabor der klinisch-experimentellen Forschungseinrichtung des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, statt.

### 2.3 VERSUCHSABLAUF

Die Testpersonen wurden angewiesen, an den Abenden vor den Versuchstagen ab 22 Uhr keine Nahrung mehr zu sich zu nehmen und spätestens um 23 Uhr zu Bett zu gehen. An den Versuchstagen 1 und 2 wurden die Probanden um 8:45 Uhr ins Versuchslabor bestellt. Die Experimente fanden dort in einem schallgeschützten Raum statt, wo die Probanden in Oberkörperhochlage (ca. 60°) auf einem Bett lagen. Zu Beginn wurde der Testperson eine periphere Venenverweilkanüle (Braunüle, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) in eine periphere Vene des einen Unterarmes gelegt und eine

Aufsättigungsphase		Interventionsphase			
Tag -3 bis Tag -1		Tag 1		Tag 2	
9:00	7,5 mg MEM/PBO	9:00	7,5 mg MEM/PBO	9:00	7,5 mg MEM/PBO
		9:45	1. Hypoglykämie	9:45	3. Hypoglykämie
		13:00	2. Hypoglykämie		
17:00	7,5 mg MEM/PBO	17:00	7,5 mg MEM/PBO		
4 Wochen Auswaschphase					
Tag -3 bis Tag -1		Tag 1		Tag 2	
9:00	7,5 mg PBO/MEM	9:00	7,5 mg PBO/MEM	9:00	7,5 mg PBO/MEM
		9:45	1. Hypoglykämie	9:45	3. Hypoglykämie
		13:00	2. Hypoglykämie		
17:00	7,5 mg PBO/MEM	17:00	7,5 mg PBO/MEM		

Tabelle 2.1 Schematische Darstellung des Studiendesigns. Jeder Proband nimmt im Abstand von 4 Wochen an der Memantin- und Placebo-Bedingung teil. Pro Versuchseinheit nimmt der Proband 3 Tage vor den Hypoglykämie-Clamp-Versuchen und währenddessen Memantin oder Placebo ein. In jeder Versuchseinheit wurden die Probanden dreimal nach dem hypoglykämischen Clamp-Verfahren unterzuckert, zweimal am Tag 1 und ein drittes Mal an Tag 2. MEM: Memantin, PBO: Placebo

weitere wurde in einer peripheren Vene des kontralateralen Armes platziert. Die Kanüle zur Blutentnahme wurde über eine 210 cm lange Druckleitung mit einem Hahnbank-Set im Nebenraum verbunden, an das Ringer-Lösung zum Spülen angeschlossen war. An die andere Kanüle wurde über einen Dreiwegehahn Humaninsulin (Sanofi-Aventis GmbH, Frankfurt a.M., Deutschland) und 20%ige Glukose-Lösung (DeltaSelect GmbH, Dreieich, Deutschland), die sich ebenfalls im Nachbarzimmer befanden, angeschlossen. Das Insulin wurde durch einen Perfusor (Perfusor compact, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) kontrolliert. Die Glukose-Lösung wurde bei Bedarf über einen Infusomaten (Infusomat fmS, Software IFME, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) dosiert. Auf diese Weise konnten die Blutproben entnommen und der Blutzucker gesteuert werden, ohne den Probanden zu stören bzw. dessen Aufmerksamkeit auf das Prozedere zu lenken.

Die ersten 60 Minuten vor Beginn des hypoglykämischen Clampversuchs bildeten die so genannte Baseline-Phase. Um 9:45 Uhr erhielten die Probanden zunächst einen Insulinbolus von 10 mU/kg Körpergewicht Humaninsulin gefolgt von einer konstanten Infusionsrate von 1,5 mU/kg/min Insulin. Alle 5 Minuten wurden die Blutzuckerkonzentrationen mittels HemoCue (HemoCue, Ängelholm, Schweden) kontrolliert. Gleichzeitig wurde die Glukoselösung infundiert, die in unterschiedlicher Geschwindigkeit lief, um den Ziel-Blutzuckerwert von 2,4 mmol/l während des hypoglykämischen Plateaus zu erreichen. Dieses Plateau wurde 45 Minuten nach Beginn der Insulininfusion (um 10:30 Uhr) erreicht und 40 Minuten (bis 11:10 Uhr) aufrechterhalten. Anschließend wurde die Insulininfusion gestoppt und die Blutzuckerwerte wurden innerhalb von 30 Minuten durch die Glukoseinfusion auf ein euglykämisches Niveau gebracht. Im Anschluss erhielten die Testpersonen ein standardisiertes, leichtes Frühstück (513 kcal).

In 30-minütigen Abständen vor und nach dem Hypoglykämie-Plateau, sowie alle 10 Minuten während des Plateaus wurden Blutproben entnommen, um die Konzentration von Insulin, C-Peptid und insulinantagonistischen Hormonen (ACTH, Cortisol, Katecholamine, Somatotropin (GH) und Glukagon) zu bestimmen. Die Blutproben wurden zentrifugiert und sowohl Serum als auch Plasma wurden bis zur Bestimmung bei -72°C konserviert. Während jeder Blutentnahme wurden Blutdruck und Herzfrequenz mithilfe des Dinamap (Dinamap Vital Daten Monitor 8100, Critikon) am zur

Blutentnahme kontralateralen Arm gemessen.

An Versuchstag 1 wurde um 13:00 Uhr nach einer 60-minütigen Pause ein weiterer hypoglykämischer Clampversuch nach dem gleichen zeitlichen Ablauf durchgeführt. Dieser Clampversuch diente der Gewöhnung an die Hypoglykämie, dem metabolischen Lernen. Um 15:00 Uhr wurden die Blutglukosewerte wieder normalisiert und die Probanden bekamen ein Mittagessen. An Versuchstag 2 fand der dritte hypoglykämische Clampversuch analog zum ersten statt.

Sowohl während der Baseline- als auch während der Hypoglykämiephasen wurden Symptomfragebögen beantwortet und kognitive Tests durchgeführt (Stroop-Test, Word-list), welche Gegenstand der Doktorarbeit von Michaela Duysen sind.

#### 2.4 ANALYTISCHE METHODEN

Die Serumkonzentrationen von Insulin, C-Peptid, Cortisol und GH wurden mit den kommerziell erhältlichen Immunoassays (Immulite, DPC, Los Angeles, USA) bestimmt. Die intra- und inter-assay Variationskoeffizienten (VK) und analytischen Sensitivitäten (aS) betragen dabei: Insulin: VK  $< 5,6\%$  und  $< 7,4\%$ , aS  $2\ \mu\text{IU/ml}$ ; C-Peptid:  $< 2,4\%$  und  $< 4,9\%$ , aS  $0,02\ \text{nmol/l}$ ; Kortisol:  $< 5,8\%$  und  $< 6,3\%$ , aS  $5,518\ \text{nmol/l}$ ; GH: VK  $< 4,7\%$  und  $< 6,7\%$ , aS  $0,01\ \text{ng/ml}$ . Die Plasmaspiegel von ACTH und Glukagon wurden ebenfalls mit Immunoassays bestimmt (ACTH: Immulite, DPC, Los Angeles, USA; Glukagon: Adaltis, Casalecchio di Reno, Italien). Die intra- und inter-assay-Koeffizienten und Sensitivitäten waren dabei wie folgt: ACTH  $< 6,1\%$  und  $< 9,4\%$ , aS  $0,4404\ \text{pmol/l}$ ; Glukagon  $< 9,6\%$  und  $< 9,1\%$ , aS  $14,5\ \text{nmol/l}$ . Die Plasmakonzentrationen von Adrenalin und Noradrenalin wurden mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographen mit elektrochemischem Detektor (Recipe Chemicals + Instruments, München, Deutschland) bestimmt. Für Adrenalin betragen die intra- und inter-assay VK  $< 7,7\%$  und  $< 4,3\%$ , die aS  $5\ \text{ng/l}$ . Für Noradrenalin betragen die intra- und inter-assay VK  $< 6,8\%$  und  $< 5,4\%$ , die aS  $5\ \text{ng/l}$ .

Die Serumkonzentrationen von Memantin wurden gaschromatographisch bestimmt. Der normale Referenzbereich lag bei dieser Bestimmungsmethode bei  $5\text{-}95\ \mu\text{g/l}$  Memantin im Serum bei einer täglichen Einnahme von  $5\text{-}30\ \text{mg}$  Memantin (LADR, Geesthacht, Germany).

## 2.5 STATISTISCHE AUSWERTUNGEN

Die erhobenen Daten werden als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes dargestellt. Die Daten wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA) mit den Faktoren „Zeit“ (Zeitpunkte der Datenerhebung), „Bedingung“ (Vergleich von der Memantin- und der Placebo-Bedingung) und „Hypo“ (Vergleich von Hypo 1 und Hypo 3 innerhalb einer Bedingung) ausgewertet. Die Freiheitsgrade wurden mithilfe der Greenhouse-Geisser-Prozedur korrigiert. Für den paarweisen Vergleich wurde der Zwei-Stichproben Test (t-test) angewendet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant betrachtet.

## KAPITEL 3

### ERGEBNISSE

#### 3.1 BLUTGLUKOSE, GLUKOSEINFUSIONS RATEN, INSULIN UND C-PEPTID

Während der Hypoglykämie-Clamp-Versuche wurden die Blutzucker-Konzentrationen im Vollblut kontinuierlich mittels HemoCue® gemessen. Pro Clamp-Versuch wurden 24 Messungen durchgeführt (Abbildung 3.1). Die Blutzuckerkonzentrationen waren während aller Clamp-Versuche sowohl innerhalb einer Bedingung, als auch zwischen den beiden Bedingungen (Memantin und Placebo) vergleichbar ( $p > 0,3$  für die einzelnen Vergleiche). Im Mittel lag das Hypoglykämie-Plateau aller drei Clamp-Versuche in der Memantin-Bedingung bei  $1,90 \pm 0,07$  mmol/l und in der Placebo-Bedingung bei  $1,97 \pm 0,08$  mmol/l ( $p > 0,34$ ).

Zusätzlich bestimmten wir mit jeder Hormon-Blutentnahme eine Plasma-Blutglukosekonzentration (Abbildung 3.2), die die Ergebnisse der HemoCue® Messung gut widerspiegelten (Glukosemessungen im Vollblut sind im allgemeinen um den Faktor 1.1 höher als im Plasma). Die mittlere Plasma-Blutglukosekonzentration während des Hypoglykämie-Plateaus betrug  $2,28 \pm 0,06$  mmol/l in der Memantin-Bedingung und  $2,28 \pm 0,07$  mmol/l in der Placebo-Bedingung. Die Werte der ersten und dritten Clamp-Versuche waren gut vergleichbar sowohl innerhalb einer Bedingung, als auch zwischen der Memantin- und der Placebo-Bedingung ( $p > 0,51$  für alle Vergleiche).

Die Glukoseinfusionsraten (Abbildung 3.3) nahmen während der Hypoglykämie zu, unterschieden sich aber nicht während der Clamp-Versuche in einer Bedingung oder zwischen den beiden Bedingungen ( $p > 0,3$  für die entsprechenden Vergleiche).

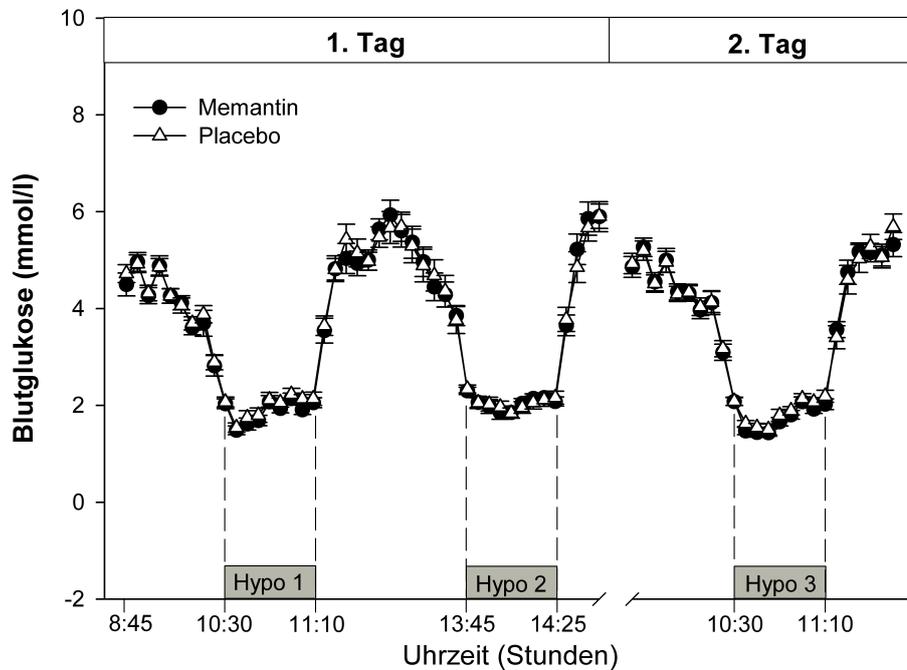


Abbildung 3.1 Mittlere Blutglukosekonzentrationen mittels HemoCue® gemessen ( $\pm$  Standardfehler) während der hypoglykämischen Clamp-Versuche für die Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Nach einer 60-minütigen Baseline-Phase wurde die Insulininfusion um 9:45 Uhr mit einem Bolus von 10 mU/kg Körpergewicht Humaninsulin gestartet, gefolgt von einer konstanten Infusionsrate von 1,5 mU/kg/min für die nächsten 90 Minuten. Das erste Hypoglykämie-Plateau wurde nach 45 Minuten Insulininfusion (um 10:30 Uhr) erreicht und für weitere 40 Minuten (bis 11:10 Uhr) aufrechterhalten. Anschließend wurde die Insulininfusion gestoppt und die Blutglukosekonzentrationen erreichten innerhalb der folgenden 30 Minuten euglykämische Werte. Um 13 Uhr begann der nächste Clamp-Versuch mit einem Hypoglykämie-Plateau von 40 Minuten (von 13:45 Uhr bis 14:25 Uhr). Am nächsten Tag wurde ein dritter Clamp-Versuch nach dem gleichen Ablauf wie der erste Versuch durchgeführt. Die Hypoglykämie-Plateaus sind durch graue Kästen gekennzeichnet. Die Gruppengröße ( $n$ ) beträgt jeweils 16 Personen.

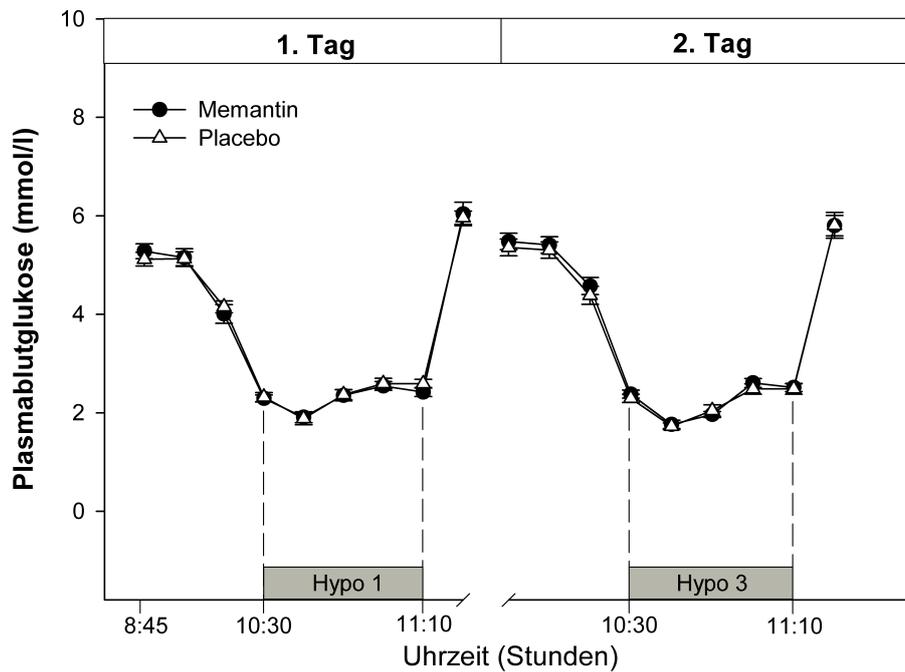


Abbildung 3.2 Mittlere Plasma­glukosekonzentrationen ( $\pm$  Standardfehler) während der hypoglykämischen Clamp-Versuche für die Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Gezeigt sind die 40-minütigen Plateaus der ersten Hypoglykämie am 1. Tag und der dritten Hypoglykämie am 2. Tag.

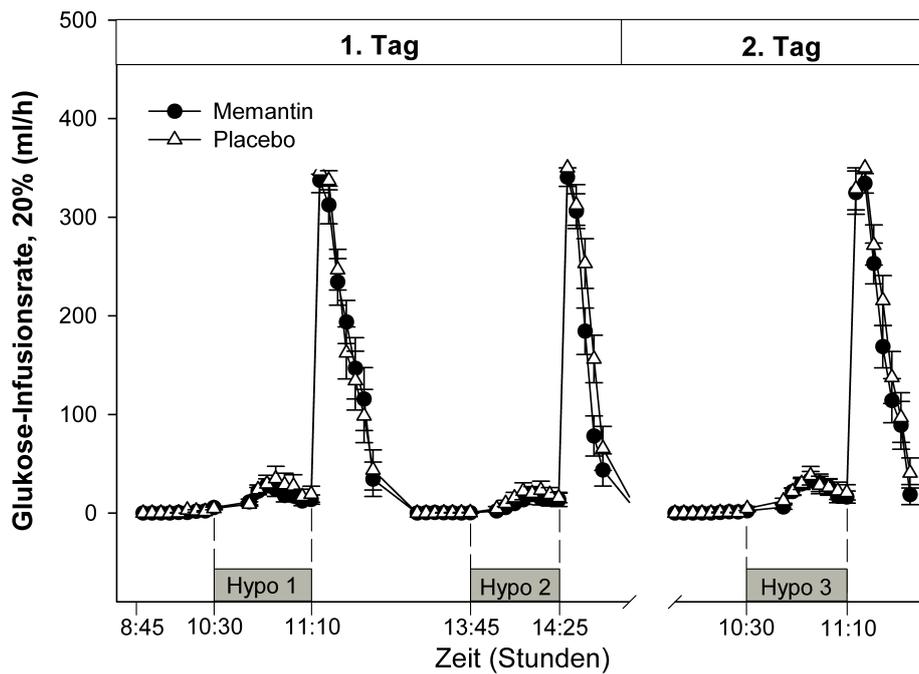


Abbildung 3.3 Mittlere Glukoseinfusionsraten ( $\pm$  Standardfehler) während der hypoglykämischen Clamp-Versuche für die Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Im Anschluss an jedes 40-minütige Hypoglykämieplateau wurde die 20%-Glukoseinfusion zunächst mit 350 ml/h, später kontinuierlich abnehmend infundiert, bis auch ohne Glukoseinfusion stabile euglykämische Blutzuckerkonzentrationen vorlagen.

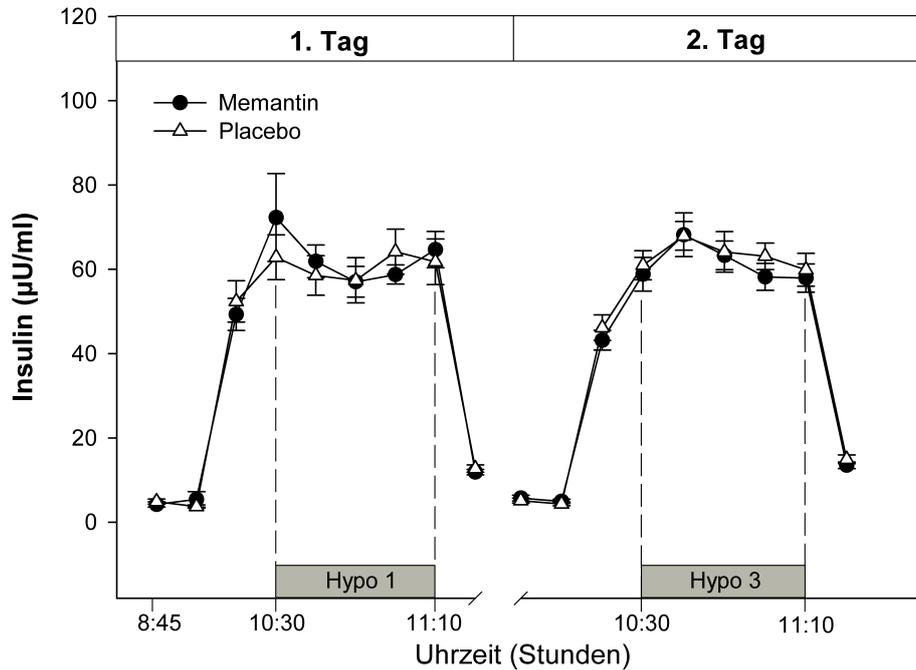


Abbildung 3.4 Mittlere Plasmainsulinkonzentrationen ( $\pm$  Standardfehler) während der hypoglykämischen Clamp-Versuche für die Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Infolge der Insulininfusion steigt während der Clamp-Versuche die Plasmainsulinkonzentration an bis das Hypoglykämieplateau (je um 10:30 Uhr) erreicht ist. Nach dem 40-minütigen Plateau (je um 11:10 Uhr) wird die Insulininfusion beendet.

Zu Beginn des hypoglykämischen, hyperinsulinämischen Clamps stiegen die Insulinkonzentrationen (Abbildung 3.4) infolge der Insulingabe, wie erwartet, stark an ( $p < 0,001$  für den Faktor „Zeit“). Die Werte waren vergleichbar zwischen den Clamp-Versuchen und den Bedingungen ( $p > 0,4$ ).

Die C-Peptid-Konzentrationen (Abbildung 3.5) nahmen analog zum Insulin während der Hypoglykämie ab ( $p < 0,001$ ). Dabei war kein Unterschied zwischen der ersten und dritten Hypoglykämie und zwischen den Bedingungen messbar ( $p > 0,40$ ).

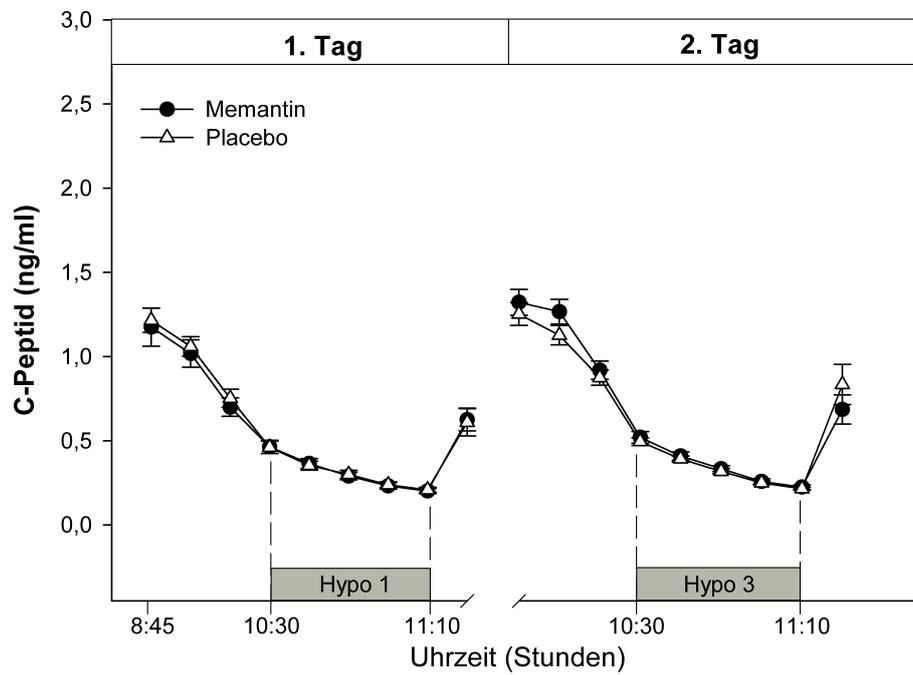


Abbildung 3.5 Mittlere C-Peptid-Konzentrationen ( $\pm$  Standardfehler) während der hypoglykämischen Clamp-Versuche für die Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Gezeigt ist eine kontinuierliche Abnahme der C-Peptid-Konzentrationen bis zum Ende der Hypoglykämieplateaus, d.h. bis zum Ende der Insulininfusion.

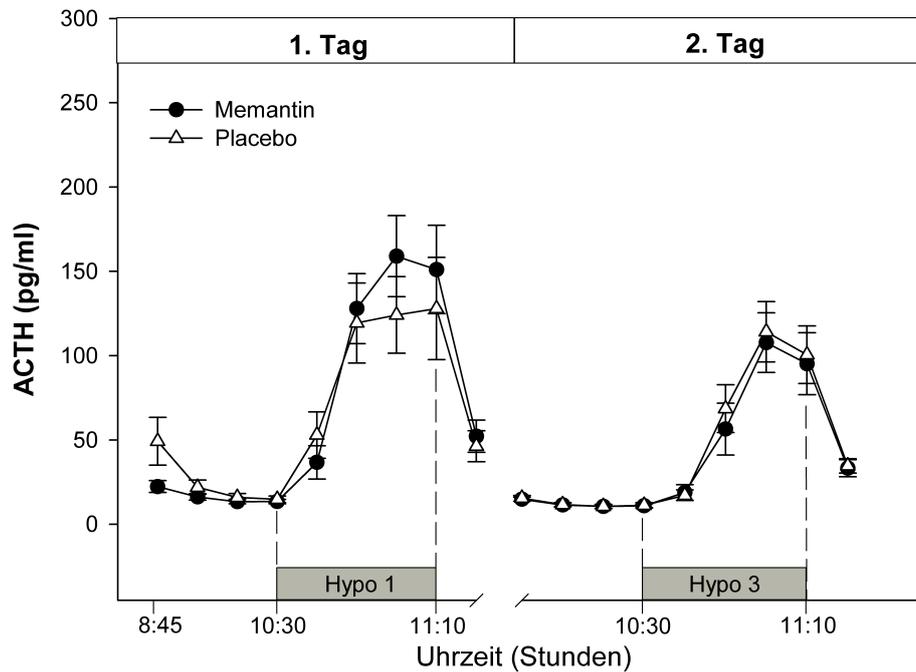


Abbildung 3.6 Mittlere Konzentrationen des adrenokortikotropen Hormons ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Dargestellt ist die gegenregulatorische Antwort von ACTH auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie zur gleichen Zeit des 2. Tages.

### 3.2 GEGENREGULATORISCHE HORMONE

Die Konzentrationen des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) (Abbildung 3.6) stiegen sowohl als Reaktion auf die erste als auch auf die dritte Hypoglykämie an ( $p < 0,001$  für den Faktor „Zeit“). Der gegenregulatorische Anstieg als Antwort auf die dritte Hypoglykämie war im Vergleich zur ersten niedriger, was eine deutliche Adaptation in der Memantin- und der Placebo-Bedingung zeigt ( $p < 0,003$  für den Faktor „Hypo“). Es gab keinen Unterschied in der Adaptation zwischen den beiden Bedingungen ( $p > 0,4$  für den Faktor „Bedingung x Hypo“).

Auch die Cortisolkonzentrationen (Abbildung 3.7) nahmen als Antwort auf die erste und dritte Hypoglykämie zu ( $p < 0,001$ ). Ähnlich wie bei der ACTH-Reaktion war die gegenregulatorische Antwort von Cortisol auf die dritte verglichen mit der Antwort auf die erste Hypoglykämie geringer. Dies zeigt auch hier eine eindeutige Adaptation

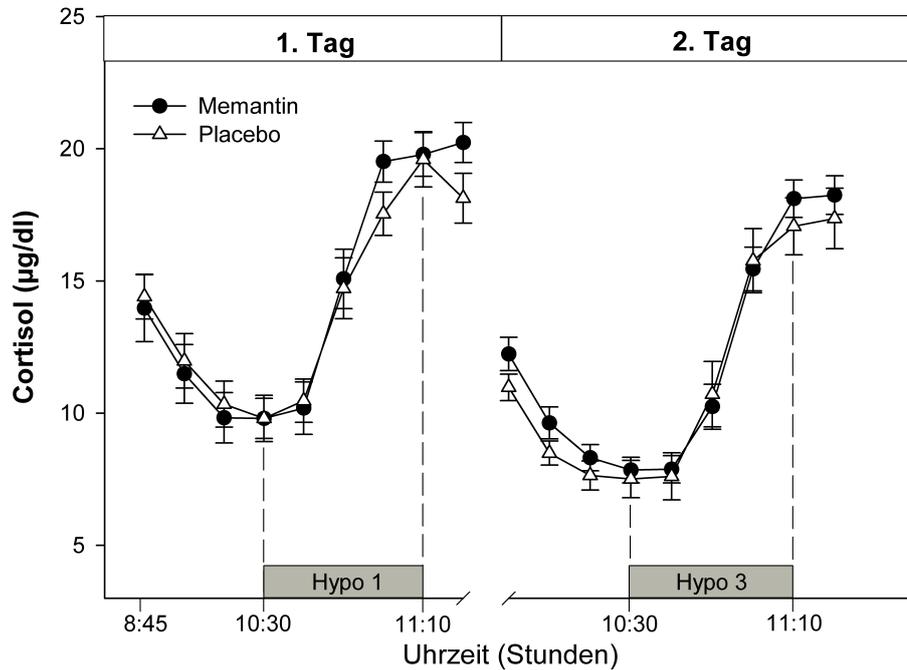


Abbildung 3.7 Mittlere Cortisolkonzentrationen ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Dargestellt ist die gegenregulatorische Antwort von Cortisol auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie zur gleichen Zeit des 2. Tages.

in beiden Bedingungen ( $p < 0,003$ ), wobei es ebenfalls keinen Unterschied zwischen der Adaptation in der Memantin- und Placebo-Bedingung gab ( $p > 0,4$ ).

Die AdrenalinKonzentrationen (Abbildung 3.8) stiegen ebenfalls als Reaktion auf die Hypoglykämie an ( $p < 0,001$ ). Auch hier war der Anstieg geringer während der dritten Hypoglykämie im Vergleich zur ersten ( $p < 0,008$ ) ohne Unterschied zwischen den Bedingungen ( $p > 0,17$ ).

Nach dem gleichen Muster ließ sich die Gegenregulation von Noradrenalin beobachten (Abbildung 3.9). Die NoradrenalinKonzentrationen stiegen als Reaktion auf die Hypoglykämie an ( $p < 0,001$ ), wobei der Anstieg während der dritten Hypoglykämie schwächer war als während der ersten ( $p < 0,008$ ), ohne dass es einen Unterschied zwischen den Bedingungen gab ( $p > 0,17$ ).

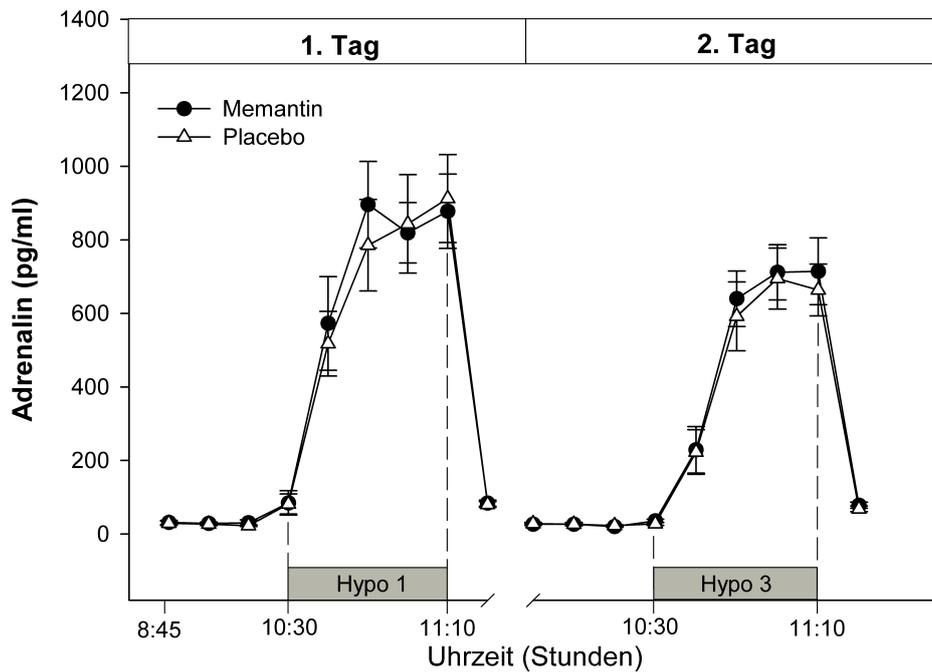


Abbildung 3.8 Mittlere Adrenalinkonzentrationen ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Die gegenregulatorische Antwort von Adrenalin auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie am 2. Tag zur gleichen Zeit ist dargestellt.

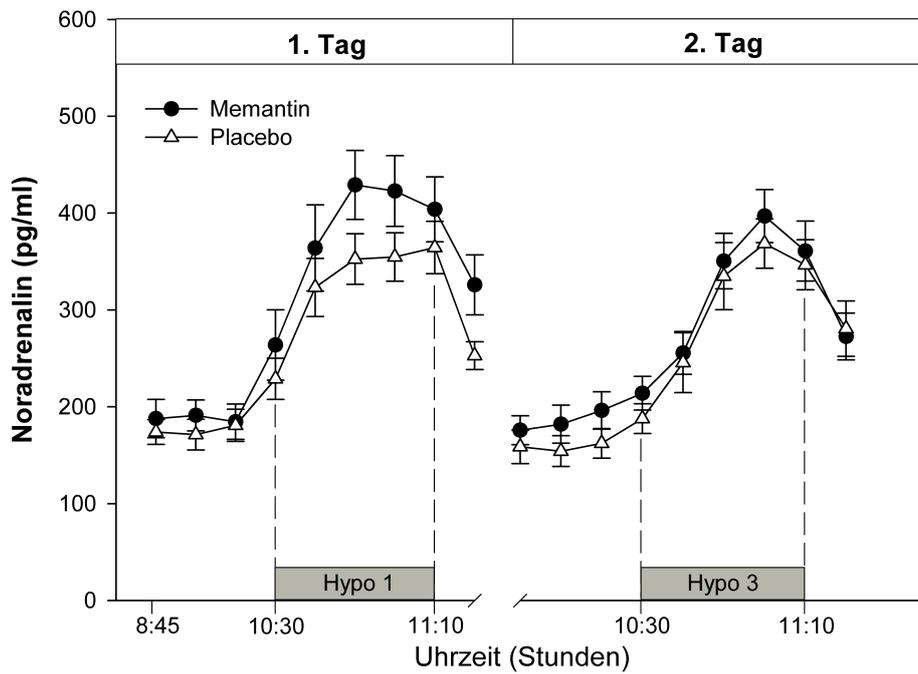


Abbildung 3.9 Mittlere Noradrenalin-Konzentrationen ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Die gegenregulatorische Antwort von Noradrenalin auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie am 2. Tag zur gleichen Zeit ist dargestellt.

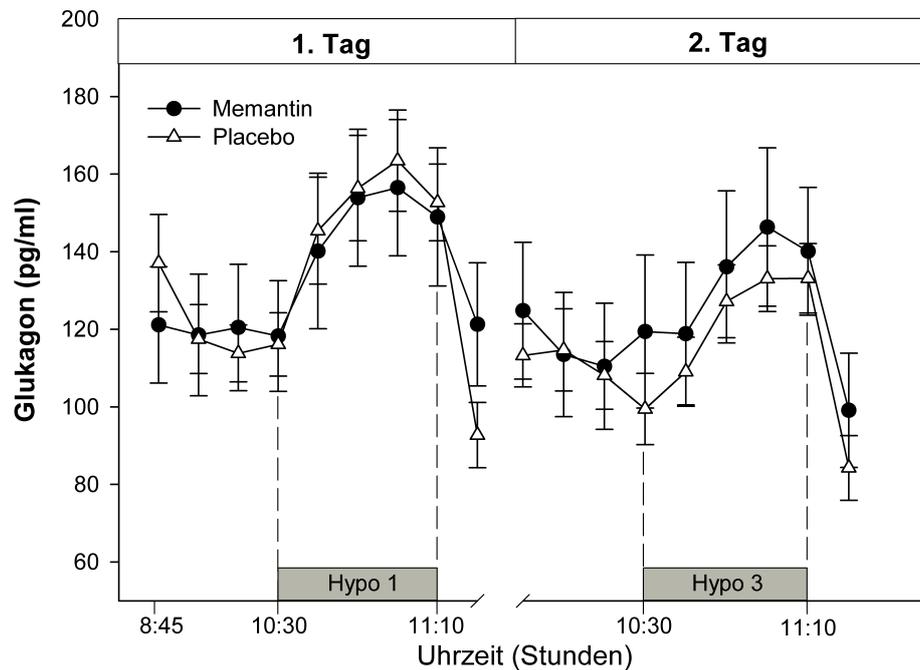


Abbildung 3.10 Mittlere Glukagonkonzentrationen ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Die gegenregulatorische Antwort von Glukagon auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie am 2. Tag zur gleichen Zeit ist dargestellt.

Bei den Glukagonkonzentrationen (Abbildung 3.10) ließ sich gleichfalls eine schwächere Zunahme der Gegenregulation an Tag 2 beobachten ( $p < 0,008$ ). Unterschiede zwischen den Bedingungen lagen nicht vor ( $p > 0,24$ ).

Die Konzentrationen von Somatotropin (GH) (Abbildung 3.11) zeigten analog zu den anderen Hormonen einen geringeren Anstieg in der dritten Hypoglykämie im Vergleich zur ersten ( $p < 0,005$ ). Zwischen der Memantin- und der Placebo-Bedingung ließ sich dabei aber kein Unterschied nachweisen ( $p > 0,24$ ).

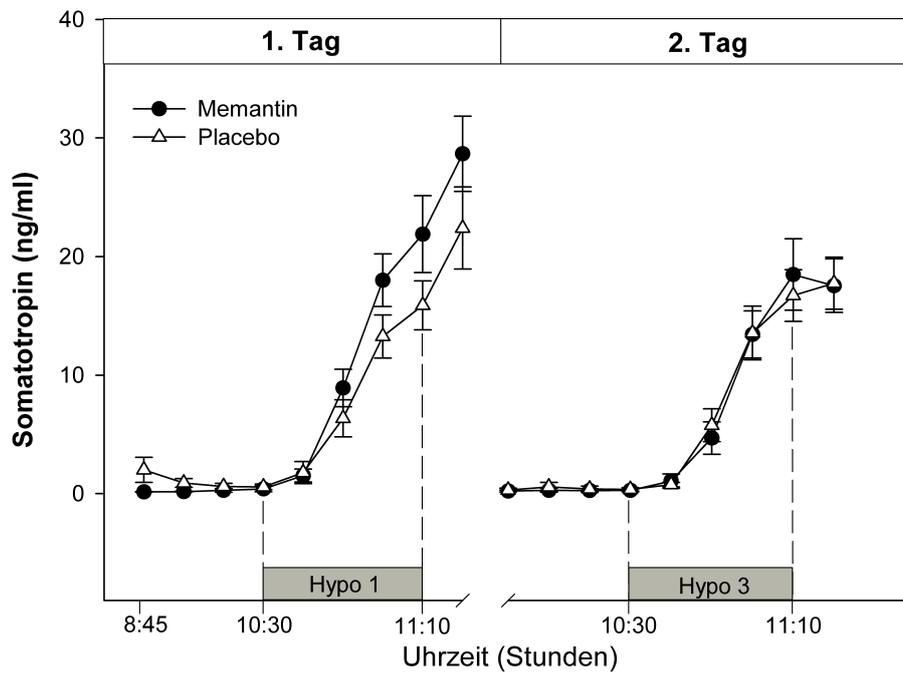


Abbildung 3.11 Mittlere Wachstumshormonkonzentrationen ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Die gegenregulatorische Antwort des Wachstumshormons auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie am 2. Tag zur gleichen Zeit ist dargestellt.

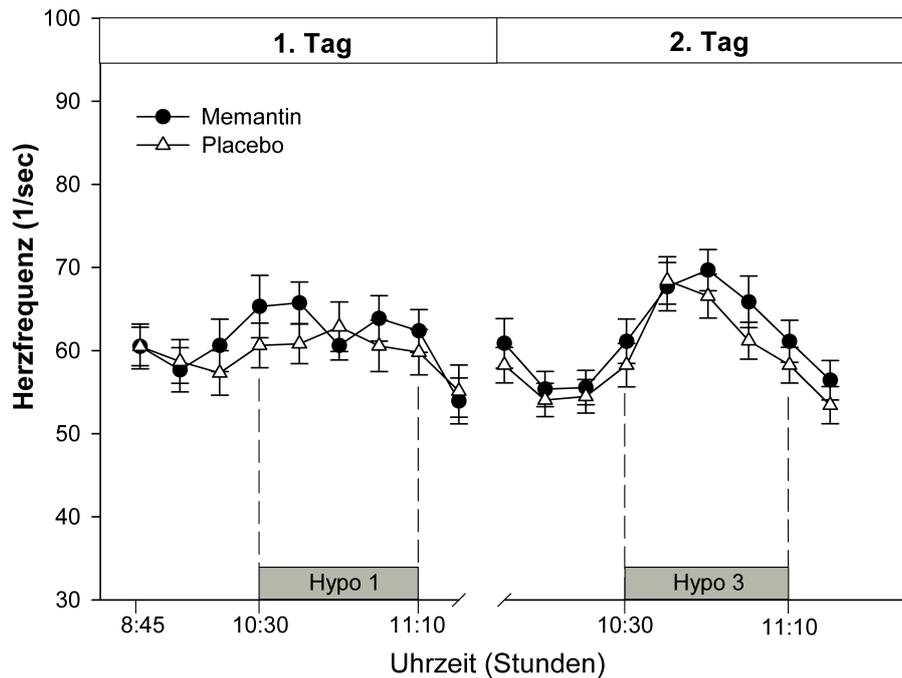


Abbildung 3.12 Mittlere Herzfrequenz ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Die gegenregulatorische Antwort der Herzfrequenz auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie am 2. Tag zur gleichen Zeit ist dargestellt.

### 3.3 HERZFREQUENZ UND BLUTDRUCK

Die Herzfrequenz (Abbildung 3.12) stieg während der Hypoglykämien in beiden Bedingungen an ( $p < 0,001$ ), jedoch ohne Unterschied an den beiden Versuchstagen ( $p > 0,97$ ). Zwischen den beiden Bedingungen konnte kein Unterschied im Verlauf nachgewiesen werden ( $p > 0,68$ ).

Die systolischen Blutdruckwerte (Abbildung 3.13) stiegen als Antwort auf die Hypoglykämien an ( $p < 0,001$ ), jedoch zeigte sich keine Adaptation ( $p > 0,37$ ) und auch kein Unterschied zwischen den beiden Bedingungen ( $p > 0,76$ ).

Die diastolischen Werte (Abbildung 3.14) zeigten an beiden Tagen eine kontinuierlichen Abnahme im Laufe des Versuches ( $p < 0,001$ ). Es ließen sich weder zwischen den Hypoglykämien ( $p > 0,76$ ), noch zwischen den Bedingungen ( $p > 0,37$ ) Unterschiede feststellen.

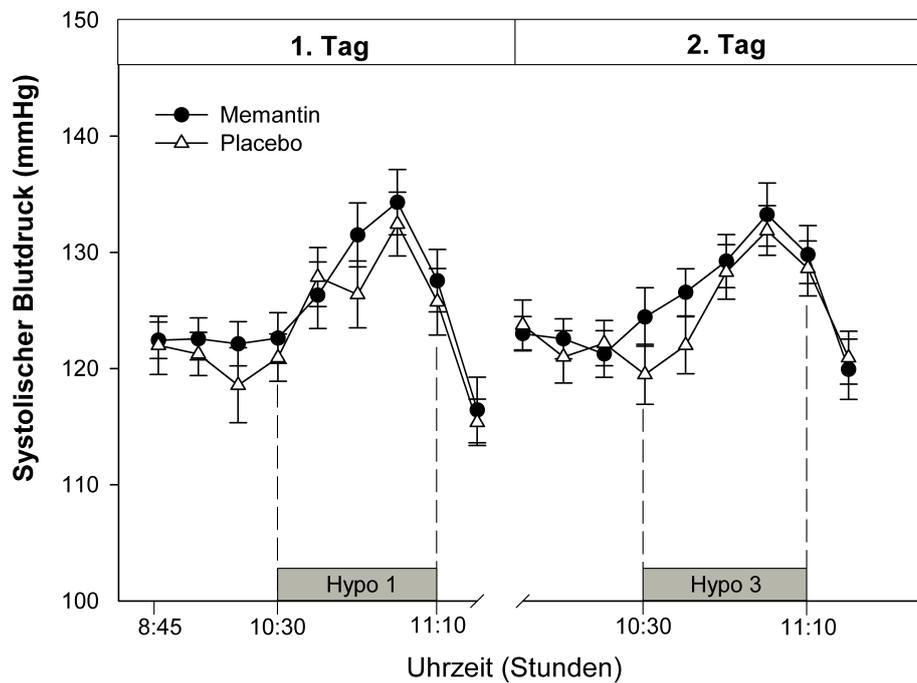


Abbildung 3.13 Mittlerer systolischer Blutdruck ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Die gegenregulatorische Antwort des systolischen Blutdrucks auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie am 2. Tag zur gleichen Zeit ist dargestellt.

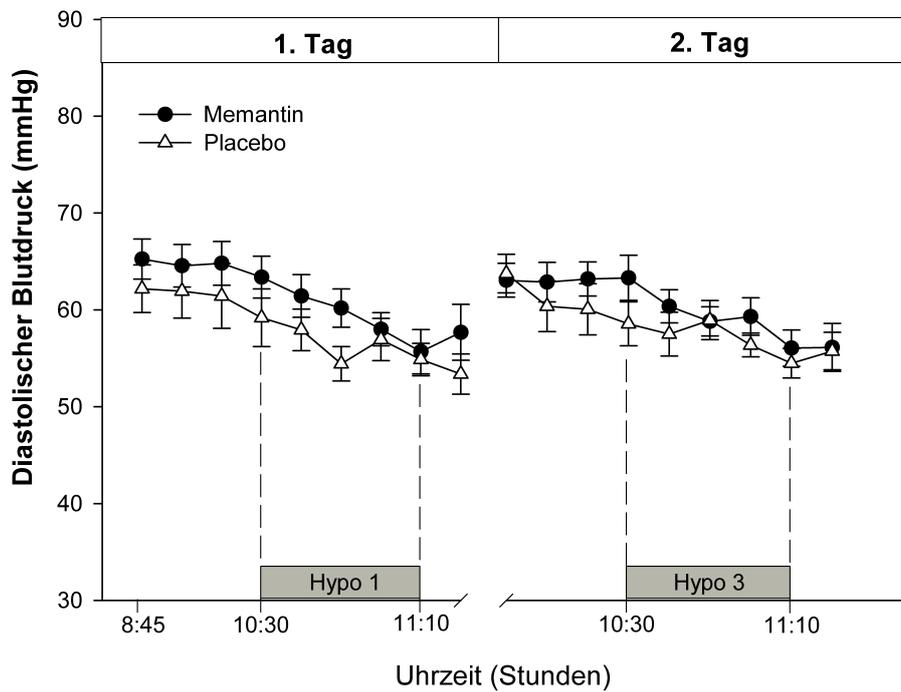


Abbildung 3.14 Mittlere diastolischer Blutdruck ( $\pm$  Standardfehler) während der Memantin- (schwarze Kreise) und Placebo-Bedingung (weiße Dreiecke). Die gegenregulatorische Antwort des diastolischen Blutdrucks auf die erste Hypoglykämie am 1. Tag und auf die dritte Hypoglykämie am 2. Tag zur gleichen Zeit ist dargestellt.

3.4 MEMANTIN-KONZENTRATIONEN

Die Memantin-Einnahme wurde drei Tage vor dem ersten Hypoglykämie-Clamp-Versuch begonnen, um sicherzustellen, dass an den Versuchstagen eine konstante Serumkonzentration gegeben ist. Um dies analytisch nachzuweisen, wurden die Serum-Memantin-Konzentrationen am Beginn des ersten Versuchstages bestimmt: Die Werte lagen bei  $18,38 \pm 1,24 \mu\text{g/l}$  und damit im normalen Bereich, entsprechend dem Laborstandard von  $5 - 95 \mu\text{g/l}$  bei einer täglichen Einnahme von  $5 - 30 \text{ mg}$  [33].

## KAPITEL 4

### DISKUSSION

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien einen metabolischen Lernprozess darstellt, der durch plastische Prozesse an glutamatergen Synapsen des zentralen Nervensystems vermittelt wird. Dafür wurde die hormonelle Antwort auf wiederholte Hypoglykämie-Clamp-Versuche unter Einfluss des Glutamatrezeptorblockers Memantin bzw. Placebo miteinander verglichen.

#### 4.1 INDUKTION DER ADAPTATION

Eine Hypoglykämie lässt sich durch Insulin verlässlich induzieren. Die Adaptation der hormonellen Antwort bei wiederholten Hypoglykämien lässt sich bei Patienten mit Diabetes mellitus beobachten [14, 15]. Sie konnte aber auch experimentell bei gesunden Menschen zuverlässig induziert werden, wofür Probanden zwei- bis dreimal auf Werte der Plasmaglukose zwischen 2,5 und 3,0 mmol/l unterzuckert wurden [16, 18, 25, 30, 49, 50].

Auch in unserer Studie konnten wir die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien sehr gut induzieren. Die Induktion von wiederholten Hypoglykämien bei gesunden Männern führte zu einer typischen Abschwächung der gegenregulatorischen neuroendokrinen Antwort. ACTH, Cortisol, Adrenalin, Noradrenalin, Glukagon und Somatotropin zeigten die charakteristische Gewöhnung als Antwort auf den dritten Hypoglykämie-Clamp-Versuch, verglichen mit der ersten Hypoglykämie. Im Vergleich zu den vorherigen Studien scheint in unserer Studie die Adaptation aller gemessener gegenregulatorischer Hormone noch zuverlässiger zu sein. Grund dafür sind

wahrscheinlich einerseits die tiefen Plasmaglukosekonzentrationen von 2,3 mmol/l, die wir während der Hypoglykämie-Plateaus induzierten. Zum anderen konnte das Durchführen von drei Hypoglykämie-Clamp-Versuchen den Vorgang der Adaptation verstärken. Damit konnten wir die Hypothese untermauern, dass die Abschwächung der gegenregulatorischen Antwort bei wiederholten Hypoglykämien von der Tiefe der vorausgegangenen Hypoglykämie abhängt [18]. Durch dieses zuverlässige Induzieren der Adaptation sollte unser Versuchsaufbau in der Lage sein, empfindlich auf jeden hemmenden Einfluss des NMDA-Rezeptorblockers zu reagieren.

#### 4.2 EINFLUSS VON GLUTAMATERGEN MECHANISMEN AUF DIE ADAPTATION

Die Grundidee dieser Arbeit ist, dass die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien einen einfachen, elementaren metabolischen Lernprozess abbildet, wobei die Adaptation primär über zentralnervöse glutamaterge Mechanismen vermittelt wird. Klassische Lernprozesse werden auf neuronaler Ebene über synaptische Langzeitpotenzierung (LTP) und -depression (LTD) vermittelt [38]. Für die Induktion von LTP ist die präsynaptische Freisetzung von Glutamat nötig, das postsynaptisch an NMDA- und AMPA-Rezeptoren bindet. Dadurch wird die Blockade der postsynaptischen Signaltransduktion aufgehoben und es kommt durch eine verstärkte Freisetzung und Integration von AMPA-Rezeptoren zu einer dauerhaft erhöhten Erregbarkeit der postsynaptischen Membran durch Glutamat [37]. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade von Glutamat-Rezeptoren vor dem Lernen die effektive Enkodierung neuer Informationen unterdrücken kann [28]. Wenn die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien einen klassischen Lernprozess, der über NMDA-Rezeptoren vermittelt wird, darstellt, sollte durch Blockade dieser Rezeptoren die Gewöhnung unterdrückt werden. In unserer Studie konnte die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien nicht durch eine Blockade der NMDA-Rezeptoren verhindert werden. Die hormonelle gegenregulatorische Antwort war nach der dritten Hypoglykämie im Vergleich zur ersten Hypoglykämie in beiden Bedingungen (Memantin und Placebo) abgeschwächt. Der NMDA-Rezeptorblocker führte nicht zu dem erwarteten Ausbleiben der Gewöhnung. Dass Memantin diese Adaptation nicht beeinflusst, kann nicht an insuffizienten Konzentrationen des NMDA-Rezeptorblockers im Blut liegen, da diese sich im erwarteten Bereich befanden. Basierend auf einer Liquor/Serum-Ratio von 0,52 [33] kann

die Memantin-Konzentration im Liquor auf ca. 9,56 µg/l geschätzt werden. Liegt Memantin in dieser Konzentration im Liquor vor, interagiert es spezifisch mit der Phenylzyklidin-Bindungsstelle des zentralnervösen NMDA-Rezeptors [34]. In unserem Versuchsaufbau führten wir zusätzlich den Gedächtnistest „Wordlist“ durch, der Gegenstand der Doktorarbeit von Michaela Duysen ist. Während der ersten Hypoglykämie war die Wordlist-Erinnerung unter Memantin signifikant schlechter als während der ersten Hypoglykämie unter Placebo ( $p = 0,024$ ). Das spricht stark für das Durchdringen von Memantin in das zentralnervöse Nervensystem und für die Wirksamkeit der verabreichten Dosis auf zentralnervöse Lernprozesse. Dazu passt die Tatsache, dass das Objekterkennungsgedächtnis nach einer einzigen Dosis von 30 mg Memantin bei gesunden Menschen gemindert ist [45]. Neue Daten aus Tierversuchen zeigen außerdem, dass Memantin-Dosen im therapeutischen Bereich (1 µmol in Ratten entspricht etwa 20 mg/dl im Menschen) zu einer Blockade von NMDA-Rezeptoren im Hippokampus führen [48]. Diese Entdeckung passt zu der Tatsache, dass Memantin die Lernleistung und Konsolidierung von Lösungsprozessen in gesunden Ratten vermindert [19].

Diese Datenlage sowie unsere Ergebnisse lassen also darauf schließen, dass die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien keinen NMDA-vermittelten Lernvorgang darstellt.

#### 4.3 MÖGLICHE ALTERNATIVE MECHANISMEN DER ADAPTATION

Der Einfluss von glutamatergen plastischen Mechanismen auf die Adaptation an die Gegenregulation nach wiederholten Hypoglykämien wird durch unsere Daten nicht bestätigt. Offen bleibt die Frage, ob diese Adaptation einen Lernprozess darstellt, der über glutamaterge Mechanismen vermittelt wird. Auch wenn unsere Ergebnisse nicht für eine Beteiligung des NMDA-Rezeptors sprechen, kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Adaptation auf plastischen Prozessen beruht, die durch AMPA-, Kainat- oder metabotrope Glutamatrezeptoren vermittelt werden. Immer mehr Studien lassen vermuten, dass die Adaptation nicht durch einen einzigen Mechanismus erklärt werden kann, sondern es sich um ein multifaktorielles Geschehen handelt.

Neuste Studien weisen darauf hin, dass die Glukose-Wahrnehmung im Gehirn (Glucose-Sensing) beim Initiieren der Hypoglykämie-Gegenregulation eine wichtige Rolle

spielt. Man geht davon aus, dass es im zentralen Nervensystem Glukose-Sensoren gibt, die sinkende Blutzuckerkonzentrationen wahrnehmen und efferente Bahnen aktivieren, was zum Auslösen der gegenregulatorische Antwort führt [39]. Viel deutet darauf hin, dass dieser Prozess im ventromedialen Hypothalamus (VMH) lokalisiert ist. Tierexperimentell konnte gezeigt werden, dass wiederholte Hypoglykämien zu einem Anstieg der inhibitorischen  $\gamma$ -Aminobuttersäure(GABA)-Konzentration im VMH führen, was eine verminderte Ausschüttung von gegenregulatorischen Hormonen zur Folge hat [6]. Neuste Studien am Menschen belegen, dass eine Aktivierung von inhibitorischen GABAA-Rezeptoren bei wiederholten Hypoglykämien zu einer verminderten gegenregulatorischen Antwort führt [29]. Neben GABA als Modulator der Glukose-Sensoren werden auch Neuropeptide wie z.B. systemische Glukokortikoide [17], Corticotropin Releasing Hormon (CRH) [22] oder Urocortin 3 [40] diskutiert.

#### 4.4 AUSBLICK

Bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 1 liegt die jährliche Prävalenz schwerer Hypoglykämien bei 30-40 %; durchschnittlich erleidet jeder Typ 1 Diabetiker 1,0 bis 1,7 Episoden schwerer Hypoglykämie pro Jahr [23]. Leichtere symptomatische Hypoglykämien sind weitaus häufiger. Ein Typ 1 Diabetiker erfährt im Durchschnitt etwa zwei Episoden symptomatischer Hypoglykämien pro Woche, was sich in den letzten 20 Jahren nicht wesentlich geändert hat [23]. Hypoglykämien sind unter Patienten mit Diabetes mellitus ebenso stark gefürchtet wie die Entwicklung einer Augenlichtbedrohenden Retinopathie oder eine Nephropathie im Endstadium [39]. Diese Daten zeigen, dass Hypoglykämien in der Klinik ein sehr häufiges Problem in der Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus darstellen. Nicht nur für Ärzte und Patienten sind wiederholte Hypoglykämien eine Herausforderung, sondern durch die mit häufigen Hypoglykämien verbundenen hohen Kosten auch für das Gesundheitssystem.

Obwohl Patientenschulung und eine Hypoglykämie-vermeidende Therapie die effektivsten Wege sind um eine Adaptation an wiederholte Hypoglykämien zu verhindern, ist ein tieferes Verständnis der Mechanismen der mangelnden Gegenregulation entscheidend. Ergänzende therapeutische Optionen sind für diese ernstzunehmende Nebenwirkung in der Behandlung des Diabetes mellitus daher dringend notwendig und unterstreichen die Wichtigkeit der weiteren Forschung auf diesem Gebiet. Um

dem multifaktoriellen Hintergrund gerecht zu werden, wären zukünftig auch kombinierte Studien denkbar, beispielsweise sowohl auf Rezeptorebene, als auch unter Einbeziehung von Fachgebieten wie der Psychologie.

## KAPITEL 5

### ZUSAMMENFASSUNG

Wiederholte Hypoglykämien führen zu einer Adaptation der gegenregulatorischen Antwort auf hormoneller und symptomatischer Ebene. Diese Adaptation stellt ein ernstzunehmendes Problem in der Behandlung von Patienten mit Diabetes mellitus dar. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind allerdings noch unklar. Basierend auf Ergebnissen aus Tierexperimenten stellten wir die Hypothese auf, dass diese Adaptation einen klassischen Lernprozess darstellt, der zentralnervös vermittelt wird und durch eine Blockade des glutamatergen N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Rezeptors verhindert werden kann.

In einer balanciert durchgeführten, doppel-verblindeten Studie, nahmen sechzehn gesunde junge Männer an zwei Versuchsbedingungen teil. In der einen Bedingung wurde den Teilnehmern der NMDA-Rezeptor-Antagonist Memantin (15 mg/Tag) oral verabreicht, in der anderen Placebo. In jeder Bedingung durchliefen die Teilnehmer drei standardisierte Hypoglykämie-Clampverfahren mit Blutglukosekonzentrationen von 2,3 mmol/l für 40 Minuten, zwei davon am ersten Tag und der dritte am darauffolgenden Tag. Wir untersuchten die Blutkonzentrationen der gegenregulatorischen Hormone (Cortisol, ACTH, Adrenalin, Noradrenalin, Wachstumshormon, Glukagon) sowie Herzfrequenz und Blutdruck.

Mit diesem Versuchsansatz konnten wir während der dritten Hypoglykämie eine stabile Gewöhnung der gegenregulatorischen Antwort aller Hormone induzieren ( $p < 0,05$ ). Allerdings veränderte die NMDA-Rezeptorblockade durch Memantin diese gegenregulatorische Adaptation nicht ( $p > 0,17$ , für alle Vergleiche).

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Studie konnte die Adaptation der hormonellen gegenregulatorischen Antwort auf wiederholte Hypoglykämien nicht durch eine NMDA-Rezeptorblockade verhindert werden. Unsere Ergebnisse unterstützen daher nicht die Annahme, dass die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien auf NMDA-Rezeptor vermittelte plastische Prozesse der Langzeitpotenzierung oder -depression beruht. Weitere Forschungstätigkeit ist dringend notwendig, um die zugrunde liegenden Mechanismen aufzudecken mit dem Ziel, verbesserte therapeutische Maßnahmen für diese ernstzunehmende Nebenwirkung der Insulintherapie zu entwickeln.

## KAPITEL 6

### LITERATURVERZEICHNIS

- [1] AMIEL, S. A.: Hypoglycemia: from the laboratory to the clinic. In: *Diabetes care* 32 (2009), Nr. 8, S. 1364–1371
- [2] BISCHOF, M. G. ; BREHM, A. ; BERNROIDER, E. ; KRŠŠÁK, M. ; MLYNÁRIK, V. ; KREBS, M. ; RODEN, M.: Cerebral glutamate metabolism during hypoglycaemia in healthy and type 1 diabetic humans. In: *European journal of clinical investigation* 36 (2006), Nr. 3, S. 164–169
- [3] BLISS, T. V. P. ; LØMO, T.: Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. In: *The Journal of physiology* 232 (1973), Nr. 2, S. 331–356
- [4] BONINI, J. S. ; RODRIGUES, L. ; KERR, D. S. ; BEVILAQUA, L. R. M. ; CAMMAROTA, M. ; IZQUIERDO, I.: AMPA/kainate and group-I metabotropic receptor antagonists infused into different brain areas impair memory formation of inhibitory avoidance in rats. In: *Behavioural pharmacology* 14 (2003), Nr. 2, S. 161
- [5] BRANN, D. W.: Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. In: *Neuroendocrinology* 61 (1995), Nr. 3, S. 213–225
- [6] CHAN, O. ; CHENG, H. ; HERZOG, R. ; CZYZYK, D. ; ZHU, W. ; WANG, A. ; MCCRIMMON, R. J. ; SEASHORE, M. R. ; SHERWIN, R. S.: Increased GABAergic tone in the ventromedial hypothalamus contributes to suppression of counterregulatory responses after antecedent hypoglycemia. In: *Diabetes* 57 (2008), Nr. 5, S. 1363–1370
- [7] CONTROL, The D. ; GROUP, Complications Trial R.: Hypoglycemia in the Diabetes

- Control and Complications Trial. In: *Diabetes* 46 (1997), S. 271–286
- [8] COOKE, S. F. ; BLISS, T. V. P.: Plasticity in the human central nervous system. In: *Brain* 129 (2006), Nr. 7, S. 1659
- [9] COX, D. J. ; GONDER-FREDERICK, L. ; ANTOUN, B. ; CRYER, P. E. ; CLARKE, W. L.: Perceived symptoms in the recognition of hypoglycemia. In: *Diabetes Care* 16 (1993), Nr. 2, S. 519
- [10] CRYER, P. E.: Hypoglycemia unawareness in IDDM. In: *Diabetes care* 16 (1993), S. 40
- [11] CRYER, P. E.: Hypoglycemia is the limiting factor in the management of diabetes. In: *Diabetes/metabolism research and reviews* 15 (1999), Nr. 1, S. 42–46
- [12] CRYER, P. E.: Mechanisms of hypoglycemia-associated autonomic failure and its component syndromes in diabetes. In: *Diabetes* 54 (2005), Nr. 12, S. 3592–3601
- [13] CRYER, P. E.: Mechanisms of sympathoadrenal failure and hypoglycemia in diabetes. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (2006), Nr. 6, S. 1470
- [14] DAGOGO-JACK, S. E. ; CRAFT, S. ; CRYER, P. E.: Hypoglycemia-associated autonomic failure in insulin-dependent diabetes mellitus. Recent antecedent hypoglycemia reduces autonomic responses to, symptoms of, and defense against subsequent hypoglycemia. In: *Journal of Clinical Investigation* 91 (1993), Nr. 3, S. 819
- [15] DAVIS, M. R. ; MELLMAN, M. ; SHAMOON, H.: Further defects in counterregulatory responses induced by recurrent hypoglycemia in IDDM. In: *Diabetes* 41 (1992), Nr. 10, S. 1335
- [16] DAVIS, M. R. ; SHAMOON, H.: Counterregulatory adaptation to recurrent hypoglycemia in normal humans. In: *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 73 (1991), Nr. 5, S. 995
- [17] DAVIS, S. N. ; SHAVERS, C. ; COSTA, F. ; MOSQUEDA-GARCIA, R.: Role of cortisol in the pathogenesis of deficient counterregulation after antecedent hypoglycemia in normal humans. In: *Journal of Clinical Investigation* 98 (1996), S. 680–691
- [18] DAVIS, S. N. ; SHAVERS, C. ; DAVIS, B. ; COSTA, F.: Prevention of an increase in plasma cortisol during hypoglycemia preserves subsequent counterregulatory responses. In: *Journal of Clinical Investigation* 100 (1997), Nr. 2, S. 429
- [19] DIX, S. ; GILMOUR, G. ; POTTS, S. ; SMITH, J. W. ; TRICKLEBANK, M.: A within-subject

- cognitive battery in the rat: differential effects of NMDA receptor antagonists. In: *Psychopharmacology* 212 (2010), Nr. 2, S. 227–242
- [20] DUDAI, Y.: The neurobiology of consolidations, or, how stable is the engram? In: *Annu. Rev. Psychol.* 55 (2004), S. 51–86
- [21] FANELLI, C. G. ; EPIFANO, L. ; RAMBOTTI, A. M. ; PAMPANELLI, S. ; VINCENZO, A. D. ; MODARELLI, F. ; LEPORE, M. ; ANNIBALE, B. ; CIOFETTA, M. ; BOTTINI, P.: Meticulous prevention of hypoglycemia normalizes the glycemic thresholds and magnitude of most of neuroendocrine responses to, symptoms of, and cognitive function during hypoglycemia in intensively treated patients with short-term IDDM. In: *Diabetes* 42 (1993), Nr. 11, S. 1683
- [22] FLANAGAN, D. E. ; KESHAVARZ, T. ; EVANS, M. L. ; FLANAGAN, S. ; FAN, X. ; JACOB, R. J. ; SHERWIN, R. S.: Role of corticotropin-releasing hormone in the impairment of counterregulatory responses to hypoglycemia. In: *Diabetes* 52 (2003), S. 605–613
- [23] FRIER, B. M.: The incidence and impact of hypoglycemia in type 1 and type 2 diabetes. In: *International Diabetes Monitor* 21 (2009), S. 210–218
- [24] GALAN, B. E. D. ; SCHOUWENBERG, B. J. ; TACK, C. J. ; SMITS, P.: Pathophysiology and management of recurrent hypoglycaemia and hypoglycaemia unawareness in diabetes. In: *Neth J Med* 64 (2006), Nr. 8, S. 269–279
- [25] GEORGE, E. ; HARRIS, N. ; BEDFORD, C. ; MACDONALD, I. A. ; HARDISTY, C. A. ; HELLER, S. R.: Prolonged but partial impairment of the hypoglycaemic physiological response following short-term hypoglycaemia in normal subjects. In: *Diabetologia* 38 (1995), Nr. 10, S. 1183–1190
- [26] GERICH, J. E. ; MOKAN, M. ; VENEMAN, T. ; KORYTIKOWSKI, M. ; MITRAKOU, A.: Hypoglycemia unawareness. In: *Endocrine reviews* 12 (1991), Nr. 4, S. 356–371
- [27] GRISSOM, N. ; BHATNAGAR, S.: Habituation to repeated stress: get used to it. In: *Neurobiology of learning and memory* 92 (2009), Nr. 2, S. 215–224
- [28] GRUNWALD, T. ; BECK, H. ; LEHNERTZ, K. ; BLÜMCKE, I. ; PEZER, N. ; KURTHEN, M. ; FERNÁNDEZ, G. ; ROOST, D. V. ; HEINZE, H. J. ; KUTAS, M.: Evidence relating human verbal memory to hippocampal N-methyl-D-aspartate receptors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (1999), Nr. 21, S. 12085
- [29] HEDRINGTON, M. S. ; FARMERIE, S. ; ERTL, A. C. ; WANG, Z. ; TATE, D. B. ; DAVIS, S. N.:

- Effects of antecedent GABAA activation with alprazolam on counterregulatory responses to hypoglycemia in healthy humans. In: *Diabetes* 59 (2010), Nr. 4, S. 1074–1081
- [30] HELLER, S. R. ; CRYER, P. E.: Reduced neuroendocrine and symptomatic responses to subsequent hypoglycemia after 1 episode of hypoglycemia in nondiabetic humans. In: *Diabetes* 40 (1991), Nr. 2, S. 223
- [31] JEŽOVÁ, D. ; OLIVER, C. ; JURČOVIČOVÁ, J.: Stimulation of adrenocorticotropin but not prolactin and catecholamine release by N-methyl-aspartic acid. In: *Neuroendocrinology* 54 (1991), Nr. 5, S. 488–492
- [32] JEŽOVÁ, D. ; TOKAREV, D. ; RUSNAK, M.: Endogenous excitatory amino acids are involved in stress-induced adrenocorticotropin and catecholamine release. In: *Neuroendocrinology* 62 (1995), Nr. 4, S. 326–332
- [33] KORNHUBER, J. ; QUACK, G.: Cerebrospinal fluid and serum concentrations of the N-methyl-aspartate (NMDA) receptor antagonist memantine in man. In: *Neuroscience letters* 195 (1995), Nr. 2, S. 137–139
- [34] KORNHUBER, J. ; WELLER, M. ; SCHOPPMAYER, K. ; RIEDERER, P. J.: Amantadine and memantine are NMDA receptor antagonists with neuroprotective properties. In: *Journal of neural transmission. Supplementum* 43 (1994), S. 91
- [35] LIMA, M. N. M. de ; LARANJA, D. C. ; BROMBERG, E. ; ROESLER, R. ; SCHRODER, N.: Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. In: *Behavioural brain research* 156 (2005), Nr. 1, S. 139–143
- [36] LØMO, T.: The discovery of long-term potentiation. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 358 (2003), Nr. 1432, S. 617–620
- [37] MALENKA, R. C.: The long-term potential of LTP. In: *Nature Reviews Neuroscience* 4 (2003), Nr. 11, S. 923–925
- [38] MARTIN, S. J. ; GRIMWOOD, P. D. ; MORRIS, R. G. M.: Synaptic plasticity and memory: an evaluation of the hypothesis. In: *Annual review of neuroscience* 23 (2000), Nr. 1, S. 649–711

- [39] McCrIMMON, R. J. ; SHERWIN, R. S.: Hypoglycemia in type 1 diabetes. In: *Diabetes* 59 (2010), Nr. 10, S. 2333–2339
- [40] McCrIMMON, R. J. ; SONG, Z. ; CHEN, H. ; McNAY, E. C. ; WEIKART-YECKEL, C. ; FAN, X. ; ROUTH, V. H. ; SHERWIN, R. S.: Corticotrophin-releasing factor receptors within the ventromedial hypothalamus regulate hypoglycemia-induced hormonal counterregulation. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (2006), S. 1723–1730
- [41] MITRAKOU, A. ; RYAN, C. ; VENEMAN, T. ; MOKAN, M. ; JENSSEN, T. ; KISS, I. ; DURRANT, J. ; CRYER, P. ; GERICH, J.: Hierarchy of glycemic thresholds for counterregulatory hormone secretion, symptoms, and cerebral dysfunction. In: *American Journal of Physiology-Endocrinology And Metabolism* 260 (1991), Nr. 1, S. E67–E74
- [42] MOLINA, P. E. ; ABUMRAD, N. N.: Contribution of excitatory amino acids to hypoglycemic counter-regulation. In: *Brain research* 899 (2001), Nr. 1-2, S. 201–208
- [43] PAIS, I. ; HUBOLD, C. ; HALLSCHMID, M. ; LETTERER, S. ; OLTMANN, K. ; SCHULTES, B. ; BORN, J. ; PETERS, A.: Blocking NMDA receptor signaling does not decrease hormonal counterregulation to hypoglycemia in humans. In: *Psychoneuroendocrinology* 33 (2008), Nr. 8, S. 1069–1076
- [44] POL, A. N. van den ; WUARIN, J. P. ; DUDEK, F. E.: Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. In: *Science* 250 (1990), Nr. 4985, S. 1276
- [45] RAMMSAYER, T. H.: Effects of pharmacologically induced changes in NMDA-receptor activity on long-term memory in humans. In: *Learning & Memory* 8 (2001), Nr. 1, S. 20–25
- [46] SANDBERG, M. ; BUTCHER, S. P. ; HAGBERG, H.: Extracellular Overflow of Neuroactive Amino Acids During Severe Insulin-Induced Hypoglycemia: In Vivo Dialysis of the Rat Hippocampus. In: *Journal of neurochemistry* 47 (1986), Nr. 1, S. 178–184
- [47] SCHWARTZ, N. S. ; CLUTTER, W. E. ; SHAH, S. D. ; CRYER, P. E.: Glycemic thresholds for activation of glucose counterregulatory systems are higher than the threshold for symptoms. In: *Journal of Clinical Investigation* 79 (1987), Nr. 3, S. 777
- [48] SZEGEDI, V. ; JUHÁSZ, G. ; PARSONS, C. G. ; BUDAI, D.: In vivo evidence for functional NMDA receptor blockade by memantine in rat hippocampal neurons. In: *Journal of Neural Transmission* 117 (2010), Nr. 10, S. 1189–1194

- [49] VENEMAN, T. ; MITRAKOU, A. ; MOKAN, M. ; CRYER, P. E. ; GERICH, J.: Induction of hypoglycemia unawareness by asymptomatic nocturnal hypoglycemia. In: *Diabetes* 42 (1993), Nr. 9, S. 1233–1237
- [50] WIDOM, B. ; SIMONSON, D. C.: Intermittent hypoglycemia impairs glucose counter-regulation. In: *Diabetes* 41 (1992), Nr. 12, S. 1597
- [51] ZELENA, D. ; MERGL, Z. ; MAKARA, G. B.: Glutamate agonists activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis through hypothalamic paraventricular nucleus but not through vasopressinergic neurons. In: *Brain research* 1031 (2005), Nr. 2, S. 185–193
- [52] ZHANG, D. X. ; LEVY, W. B.: Ketamine blocks the induction of LTP at the lateral entorhinal cortex-dentate gyrus synapses. In: *Brain research* 593 (1992), Nr. 1, S. 124–127

## KAPITEL 7

### ANHANG

#### 7.1 STUDIENPROTOKOLL

Mithilfe der folgenden Tabelle wurden Blutzuckerkonzentrationen, Glukoseinfusionsraten, Blutdruck und Herzfrequenz während der Versuchstage dokumentiert.

7.1. STUDIENPROTOKOLL

BZ Auftragsnummer 1-9 =

Met. Lern.

Proband ID:

Versuchsprotokoll

Bedingung: B

Tag: 1

Datum:

13,5 \* 50 \* kgKG / 1000 = IE /50ml NaCl 0,9%

Zeit	min	BZ mg/dl	Glucose 20% ml/h	BE	RR sys	RR dia	HF	Bemerkung
08:45	-60							SRS, MDBF 1/Labor/Braunülen/TBL
09:15	-30			1				Stroop 1/ Wordlist 1
09:40	-5							SRS, MDBF 2
09:45	0			2				Insulinbolus 22,5ml/h 2min dann 6.7ml/h .....IE Altinsulin/50ml Nacl 0.9%
09:50	5							
09:55	10							
10:00	15							
10:05	20			3				
10:10	25							
10:15	30							
10:20	35							
10:25	40							
10:30	45			4				SRS, MDBF 3
10:35	50							
10:40	55			5				
10:45	60							
10:50	65			6				Stroop 2 Wordlist 2
10:55	70							
11:00	75			7				SRS, MDBF 4
11:05	80							
11:10	85			8				BE/ Insulin ende/ G20%↑

## 7.1. STUDIENPROTOKOLL

Zeit	min	BZ mg/dl	Glucose 20% ml/h	BE	RR sys	RR dia	HF	Bemerkung
11:15	90							
11:20	95							
11:25	100							
11:30	105							
11:35	110							
11:40	115			9				BE wenn BZ stabilisiert ca.90mg/dl / nach BE Snack
11:45	120							
11:50	125							
11:55	130							
12:00	135							Pause Proband ruhige Beschäftigung
13:00	140							Insulinbolus 22.5ml/h 2min dann 6.7ml/h
13:05	145							
13:10	150							
13:15	155							
13:20	160							
13:25	165							
13:30	170							
13:35	175							
13:40	180							
13:45	185							Ziel Hypo 40mg/dl
13:50	190							

## 7.1. STUDIENPROTOKOLL

Zeit	min	BZ mg/dl	Glucose 20% ml/h	BE	RR sys	RR dia	HF	Bemerkung
13:55	195							
14:00	200							
14:05	205							
14:10	210							
14:15	215							
14:20	220							
14:25	225							Insulin ende/ G20%↑
14:30	230							Mittagessen
14:35	235							
14:40	240							
14:45	245							
14:50	250							
14:55	255							BZ stabil/ TBL 17:00/ Strassenverkehr/ ab 22:00 nüchtern/ ab 23:00 schlafen
15:00	260							

Wordlist 1 Track Nr. 9+10

Anzahl	neutral
Anzahl	essensbezogen
Anzahl	emotional

Wordlist 2 Track Nr. 11+12

Anzahl	neutral
Anzahl	essensbezogen
Anzahl	emotional

Stroop 1 Version 1

Anzahl	schwarz/weiß
Anzahl	XXXXX
Anzahl	farbige Wörter

Stroop 2 Version 2

Anzahl	schwarz/weiß
Anzahl	XXXXX
Anzahl	farbige Wörter

7.1. STUDIENPROTOKOLL

BZ Auftragsnummer 10-18 =

Met. Lern.

Proband ID:

Versuchsprotokoll

Bedingung: B

Tag: 2

Datum:

13,5 \* 50 \* kgKG / 1000 = IE /50ml NaCL 0,9%

Zeit	min	BZ mg/dl	Glucose 20% ml/h	BE	RR sys	RR dia	HF	Bemerkung
08:45	-60							SRS, MDBF 5/Labor/Braunülen/TBL
09:15	-30			10				Stroop 3 / Wordlist 3
09:40	-5							SRS, MDBF 6
09:45	0			11				Insulinbolus 22,5ml/h 2min dann 6.7ml/h .....IE Altinsulin/50ml Nacl 0.9%
09:50	5							
09:55	10							
10:00	15							
10:05	20			12				
10:10	25							
10:15	30							
10:20	35							
10:25	40							
10:30	45			13				SRS, MDBF 7
10:35	50							
10:40	55			14				
10:45	60							
10:50	65			15				Stroop 4 Wordlist 4
10:55	70							
11:00	75			16				SRS, MDBF 8
11:05	80							
11:10	85			17				BE/ Insulin ende/ G20%↑

## 7.1. STUDIENPROTOKOLL

Zeit	min	BZ mg/dl	Glucose 20% ml/h	BE	RR sys	RR dia	HF	Bemerkung
11:15	90							
11:20	95							
11:25	100							
11:30	105							
11:35	110							
11:40	115			18				BE wenn BZ stabilisiert ca.90mg/dl / nach BE Snack
11:45	120							

Wordlist 3 Track Nr. 13+14

Anzahl	neutral
Anzahl	essensbezogen
Anzahl	emotional

Wordlist 4 Track Nr. 15+16

Anzahl	neutral
Anzahl	essensbezogen
Anzahl	emotional

Stroop 3 Version 3

Anzahl	schwarz/weiß
Anzahl	XXXXX
Anzahl	farbige Wörter

Stroop 4 Version 4

Anzahl	schwarz/weiß
Anzahl	XXXXX
Anzahl	farbige Wörter

7.2 VOTUM DER ETHIK-KOMMISSION

Es folgt das Votum der Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck in der Sitzung vom 22. Mai 2007 zu der Arbeit über den Einfluß von Glutamatrezeptoren auf die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien (Aktenzeichen 07-068).



# Universität zu Lübeck

Medizinische Fakultät - Der Vorsitzende der Ethikkommission

Dekanat der Medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck  
Ratzeburger Allee 160, D-23538 Lübeck

Frau  
Dr. med. Pais  
Medizinische Klinik I

im Hause

Bearbeiter: Frau Erdmann  
Telefon: (0451) 500- 4639  
Fax: (0451) 500- 3026  
email: erdmann@zuv.uni-luebeck.de

Datum: 31.05.07.2007

Aktenzeichen:

( immer angeben ! ) 07-068

nachrichtlich:

Herrn Prof. Schunkert  
Komm. Direktor der Medizinischen Klinik I

**Sitzung der Ethik-Kommission am 22. Mai 2007**

**Antragsteller: Frau Dr. Pais / Herr Prof. Schunkert**

**Titel: Der Einfluß von Glutamatrezeptoren auf die Adaptation an wiederholte Hypoglykämien**

Sehr geehrte Frau Dr. Pais,

der Antrag wurde unter berufsethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und berufsrechtlichen Gesichtspunkten geprüft.

Die Kommission hat nach der Berücksichtigung folgender **Hinweise** keine Bedenken: Eine Risikoversicherung der Probanden wird empfohlen. Die Aufklärung ist laienverständlicher zu formulieren. Die Kommission stellt fest, dass es sich hier um einen Provokationstest handelt; also nicht um eine Arzneimittelstudie.

Bei Änderung des Studiendesigns sollte der Antrag erneut vorgelegt werden. Über alle schwerwiegenden oder unerwarteten und unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten, muß die Kommission umgehend benachrichtigt werden.

Nach Abschluß des Projektes bitte ich um Übersendung eines knappen Schlussberichtes (unter Angabe unseres Aktenzeichens), aus dem der Erfolg/Misserfolg der Studie sowie Angaben darüber, ob die Studie abgebrochen oder geändert bzw. ob Regressansprüche geltend gemacht wurden, ersichtlich sind.

Die ärztliche und juristische Verantwortung des Leiters der klinischen Studie und der an der Studie teilnehmenden Ärzte bleibt entsprechend der Beratungsfunktion der Ethikkommission durch unsere Stellungnahme unberührt.

Mit freundlichem Gruß und den besten Wünschen für den weiteren Verlauf Ihrer Forschung bin ich

Ihr

Prof. Dr. med. Dr. phil. H. Raspe  
Vorsitzender

anwesende Kommissionsmitglieder:

Prof. Dr. Dr. H.-H. Raspe  
(Sozialmedizin, Vorsitzender der EK)  
 Prof. Dr. Schweiger  
(Psychiatrie)  
 Prof. Dr. Dendorfer  
(Pharmakologie)

Frau H. Müller  
(Pflege)  
Prof. Wessel  
(Kinderchirurgie, Stellv. Vorsitzender der EK)  
Herr Dr. Fieber  
(Richter am Amtsgericht Ahrensburg)  
Prof. Schwinger  
(Humangenetik)

Herr Prof. Dr. Klein  
(Medizinische Klinik I)  
 Frau Prof. Dr. M. Schrader  
(Plastische Chirurgie)  
 Herr Dr. Schultz  
(Pädiatrie)  
Herr D. Stojan  
(Präsident des Amtsgerichtes Lübeck)

## KAPITEL 8

### ABBILDUNGSVERZEICHNIS

3.1	Mittlere Blutglukosekonzentration mittels HemoCue® gemessen . . . . .	15
3.2	Mittlere Plasmaglukosekonzentrationen . . . . .	16
3.3	Mittlere Glukoseinfusionsraten . . . . .	17
3.4	Mittlere Plasmainsulinkonzentrationen . . . . .	18
3.5	Mittlere C-Peptid-Konzentrationen . . . . .	19
3.6	Mittlere Konzentrationen des adrenokortikotropen Hormons . . . . .	20
3.7	Mittlere Cortisolkonzentrationen . . . . .	21
3.8	Mittlere Adrenalinkonzentrationen . . . . .	22
3.9	Mittlere Noradrenalinkonzentrationen . . . . .	23
3.10	Mittlere Glukagonkonzentrationen . . . . .	24
3.11	Mittlere Wachstumshormonkonzentrationen . . . . .	25
3.12	Mittlere Herzfrequenz . . . . .	26
3.13	Mittlerer systolischer Blutdruck . . . . .	27
3.14	Mittlerer diastolischer Blutdruck . . . . .	28

## KAPITEL 9

### TABELLENVERZEICHNIS

2.1 Schematische Darstellung des Studiendesigns . . . . .	10
---	----

## KAPITEL 10

### DANKSAGUNG

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Hendrik Lehnert für die Vergabe des Dissertationsthemas und für die Bereitstellung aller erforderlichen Mittel und Räumlichkeiten.

Mein Dank gilt der Universität zu Lübeck für die Bereitstellung des Promotionsstipendiums.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dr. Johanna Klement für die exzellente Betreuung der Studie, die Unterstützung während der Durchführung der Experimente und für die kompetente Hilfestellung bei der statistischen Auswertung und graphischen Darstellung der erhobenen Daten.

Ganz herzlich danken möchte ich auch Kai-Uwe Duysen für die Einführung in die Clamp-Technik und die sachkundige Zusammenarbeit in Versuchsvorbereitung und -durchführung.

Mein spezieller Dank gilt Christoph Stockhusen und Jonatan Strube, die mich bei der Formatierung der Arbeit exzellent unterstützten.

Kirstin Nordhausen und Michaela Duysen danke ich für die Hilfe bei den Experimenten. Mein Dank gilt ebenfalls Jutta Schwanbom und Heidi Ruf für die Bestimmung der Hormonkonzentrationen.

Nicht zuletzt danke ich meiner Familie, die mir den Rücken stärkt und jederzeit ein offenes Ohr für mich hat.

Diese Arbeit wurde unterstützt durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG).

## KAPITEL 11

### LEBENS LAUF



- Persönliche Daten* Juliane Strube  
geboren am 25. 08. 1985 in Alsfeld
- Ausbildung* 1992–1996 Grundschule in Altwildungen  
1996–2005 Gustav-Stresemann-Gymnasium in Bad Wildungen  
mit Abschluss Abitur  
2005–2011 Studium der Humanmedizin an der  
Universität zu Lübeck, Erste Ärztliche Prüfung 2007,  
Zweite Ärztliche Prüfung 2011
- Promotion* Beginn 2008, unterstützt durch das Promotionsstipendium  
„Exzellenzmedizin“ der Universität zu Lübeck  
(P10-2008 Strube)  
Publikation: J Klement, I Pais, J Strube, H Lehnert, A Peters, M  
Hallschmid, J Born: NMDA receptor blockade by memantine  
does not prevent adaptation to recurrent hypoglycaemia in  
healthy men. Diabetes Obes Metab. 2012 Oct 16. doi:  
10.1111/dom.12027. [Epub ahead of print]
- Berufstätigkeit* seit 2012 Assistenzärztin am Universitätsklinikum Freiburg,  
Abteilung Radiologie