

**Diplomarbeit**

**Subkutane Bolusgabe mit Insulinpumpe bei  
Patienten mit Typ 1 Diabetes  
Auswirkung der Boluslänge auf die Pharmakokinetik von  
schnell wirksamem Insulin**

eingereicht von

**Barbara Lehki**

Geb.Dat.: 08.12.1986

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktor der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt an der

**Klinische Abteilung für Endokrinologie und Stoffwechsel**

Erstbetreuer: **Dipl.-Ing. Dr.techn. Werner Regittnig**

Zweitbetreuer: **Univ.-Prof. Dr.med.univ. Thomas Pieber**

Graz, den 16. Januar 2014

Barbara Lehki

## **Eidesstattliche Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, den 16. Januar 2014

Barbara Lehki

## Vorwort und Danksagungen

Aus Gründen der besseren Lesbarkeit werden entweder eine geschlechtsneutrale Formulierung oder das generische Maskulinum verwendet. Der Autor distanziert sich hiermit ausdrücklich von Diskriminierungen jeglicher Art.

**Danksagung:** An dieser Stelle möchte ich mich bei all jenen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Vor allem bedanken möchte ich mich bei Herrn Dipl.-Ing. Dr. techn. Werner Regitnig, für die Bereitstellung des Themas, sowie für die jederzeit kompetente, freundliche, gewissenhafte und geduldige Betreuung, Unterstützung, Mitarbeit und Hilfestellung. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. univ. Thomas Pieber und dem gesamten Team des ZMFs möchte ich für die freundliche Unterstützung meinen Dank aussprechen.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Medizinischen Universität Graz und all ihren Mitarbeitern, für eine hervorragende Ausbildung und Betreuung während des Studiums.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie bedanken, die mich im meinem Leben, Studium und in der Entstehungszeit dieser Arbeit, immer begleitet haben und hoffentlich weiterhin begleiten werden. Ein herzliches Dankeschön möchte ich auch meinen Freunden Felix Deutsch, Lisa Aldrian und Karin Unterleitner für die emotionale Unterstützung und fachlichen Anregungen aussprechen.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern Đuro und Ana Lehki, sowie meinen Schwestern Ivana und Anemari, die mir das Studium ermöglicht haben und mir immer in allen Höhen und Tiefen eine große Stütze waren und bei meinen Entscheidungen bedingungslos Beiseite standen.

Nicht zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meinem Freund Christopher Schreiber für seine liebevolle und inspirierende Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit bedanken.

## Kurzfassung

Um die Essens-bezogene Insulinsekretion zu imitieren, kann eine Insulinpumpe Insulin mit einer höheren Rate (Bolus) über eine relativ kurze Zeitspanne (Boluslänge) abgeben. Die derzeit am Markt befindlichen Insulinpumpenmodelle unterscheiden sich jedoch sehr stark hinsichtlich der gewählten Boluslängen (z.B., Insulinpumpe der Firma Animas: 2 Sekunden für eine Insulineinheit; Insulinpumpe der Firma Medtronic: 40 Sekunden für eine Einheit). An der Medizinischen Universität Graz wurde deshalb in einer Studie der Einfluss der Boluslänge auf die subkutane Absorption von schnell wirksamem Insulin untersucht. Hierfür wurden bei 20 Typ 1 Diabetikern jeweils zwei Camp-Experimente durchgeführt und dabei in randomisierter Abfolge ein subkutaner Insulinbolus (15 Einheiten des Insulin Lispro) über eine Boluslänge von 30 Sekunden (kurzer Bolus mit *Animas IR2020* Pumpe) oder einer über eine Boluslänge von 10 Minuten (langer Bolus mit *Medtronic Minimed Paradigm 512* Pumpe) abgegeben.

Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, im Rahmen dieser Studie die pharmakokinetische Analyse durchzuführen. Zunächst wurde eine ELISA-Methode für die Messung der Blutplasmakonzentration des in der Studie verabreichten Insulin-Lispro etabliert und validiert. Die Insulinkonzentrationen wurden dann für 880 während der Camp-Experimente abgenommenen Plasmaproben mittels dieser ELISA-Methode bestimmt. In der anschließenden Datenanalyse wurden die gemessenen Insulinkonzentrationsverläufe graphisch dargestellt und pharmakokinetische Parameter abgeleitet und statistisch verglichen. Der statistische Vergleich zeigte, dass bei jenen pharmakokinetischen Parametern, die den Insulinkonzentrationsverlauf während der ersten 60 Minuten nach der Bolusgabe erfassen, die Unterschiede zwischen den mittleren Parameterwerten für den kurzen Bolus und denen für den langen Bolus signifikant waren. Daraus kann geschlossen werden, dass die Boluslänge eine substantielle, klinisch relevante Auswirkung auf die subkutane Absorption von schnell wirksamen Insulin hat. Um eine einheitlich hohe Qualität bei der Diabetestherapie mit Insulinpumpe zu erreichen, wird daher empfohlen, die Boluslängen der Pumpen auf 1-5 Sekunden pro Insulineinheit zu standardisieren.

Gefördert durch das EU-Project „Artificial Pancreas at Home (AP@home)“, Projektnummer 47138, [www.apathome.eu](http://www.apathome.eu).

## Abstract

In order to mimic meal-related insulin secretion, insulin pumps can deliver insulin at a high rate (bolus) over a relatively short period of time (bolus duration). Insulin pumps currently available on the market differ significantly when it comes to bolus duration (e.g. insulin pumps manufactured by *Animas* deliver 1 insulin unit over 2 seconds; pumps manufactured by *Medtronic* deliver 1 unit over 40 seconds). Therefore, a study was conducted at the Medical University of Graz in order to investigate the influence of the bolus duration on the subcutaneous absorption of rapid-acting insulin. For this purpose, each of twenty type 1 diabetes patients was studied on 2 occasions using the euglycemic clamp procedure. These subjects were given, in random order, a subcutaneous insulin bolus (15 units of insulin-Lispro) with a bolus duration of 30 seconds (short bolus delivered with an *Animas IR2020* pump) or with a bolus duration of 10 minutes (long bolus delivered with a *Medtronic Minimed Paradigm 512* pump).

The goal of this thesis was to conduct a pharmacokinetic analysis in the context of this study. First, a suitable ELISA approach for measuring blood plasma levels of the insulin-Lispro administered during the study was established and validated. Insulin levels of 880 plasma samples drawn during the clamp experiments were determined with this ELISA method. In the subsequent data analysis, the time courses of the measured insulin concentrations were graphically presented. Furthermore, from the observed insulin concentration time courses, pharmacokinetic parameters were derived and statistically compared. This comparison showed that, in the case of pharmacokinetic parameters which characterize the first 60 minutes of the insulin concentration profiles, the mean parameter values obtained for the short bolus duration were significantly different from those derived for the long bolus duration. Based on these results, it can be concluded that the bolus duration has a clinically relevant influence on the subcutaneous absorption of fast-acting insulin. In order to ensure a consistently high quality in the treatment of patients with insulin pumps, it is recommended to standardize the bolus duration in insulin pumps to values of 1-5 seconds for the delivery of 1 insulin unit.

This study was sponsored by EU-Project "Artificial Pancreas at Home (AP@home)", Project Number 47138, [www.apathome.eu](http://www.apathome.eu).

# Inhaltsverzeichnis

<b>VORWORT UND DANKSAGUNGEN</b> .....	<b>II</b>
<b>KURZFASSUNG</b> .....	<b>III</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IV</b>
<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>V</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABBILDUNGSVERZEICHNIS</b> .....	<b>XI</b>
<b>TABELLENVERZEICHNIS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 Diabetes mellitus .....	1
1.2 Ziel der Insulinsubstitution bei Typ 1-Diabetes .....	2
1.2.1 Insulin- und Glukosekonzentrationsverläufe bei Gesunden.....	2
1.2.2 Insulinsekretion bei Gesunden.....	3
1.2.3 Transport des sezernierten Insulins von den $\beta$ -Zellen zu den Zielorganen ...	4
1.3 Zufuhr des Insulins bei Typ 1-Diabetes .....	6
1.3.1 Verabreichungsmethoden von Insulin .....	6
1.3.1.1 Multiple tägliche subkutane Insulininjektionen .....	6
1.3.1.2 Kontinuierliche subkutane Insulininfusion (Insulinpumpentherapie) .....	8
1.3.2 Verwendete Insulinarten.....	9
1.3.2.1 Essens-bezogene Insuline .....	9
1.3.2.2 Fasten-bezogene Insuline .....	11
1.4 Notwendige Verbesserungen der Insulintherapie beim Typ 1-Diabetes .....	14
1.4.1 Die Gründe für die Unzulänglichkeit der heutigen Therapieformen für Typ 1-Diabetes.....	14
1.4.2 Folgeschäden durch die Unzulänglichkeiten der Therapie des Typ 1-Diabetes	17
1.5 Methoden zur Bestimmung der Insulinabsorption .....	18
1.5.1 Messung der Radioaktivitätsabnahme am Injektionsort.....	18
1.5.2 Messung der Insulinkonzentration im Blut (Pharmakokinetik) .....	18
1.5.3 Messung der Wirkung des Insulins auf die Blutglukose (Pharmakodynamik)	19
1.5.4 Glukose-Clamp zur Bestimmung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Insulins .....	20
1.6 Methoden zur Messung der Insulinkonzentration .....	21
1.6.1 RIA (Radioimmunoassay) .....	21
1.6.2 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	22
1.7 Entwicklungsansätze zur Verbesserung der Therapie .....	24
1.7.1 Modifikation des Insulinmoleküls (Insulinpräparate) .....	24

1.7.2	Neue Methoden der Verabreichung des Insulins.....	25
1.7.2.1	Alternative Orte der Applikation.....	25
1.7.2.2	Modifizierte subkutane Verabreichungsformen.....	27
1.8	Insulingabe mit Insulinkanüle und Insulinpumpe – Benutzung unterschiedlicher Boluslängen.....	30
1.9	Ziel der Diplomarbeit.....	32
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>33</b>
2.1	Studienprotokoll.....	33
2.1.1	Ablauf der klinischen Studie.....	33
2.1.2	Einschlussuntersuchung.....	34
2.1.3	Erste Clampvisite.....	36
2.1.4	Zweite Clampvisite.....	37
2.1.5	Nachuntersuchung.....	37
2.2	Messung der Plasmakonzentrationen des humanen und schnell wirksamen Insulins.....	38
2.2.1	Validierung der Messung der Humaninsulin- und Insulin-Lispro-Konzentration.....	38
2.2.1.1	Prüfung auf Kreuzreaktivitäten.....	38
2.2.1.2	Test des Einflusses wiederholter Gefrier-Auftauzyklen auf die Plasmainsulin Bestimmung.....	41
2.2.1.3	Intra-Assay-Variabilität.....	41
2.2.2	Messung der Konzentrationen in den Plasmaproben.....	41
2.2.3	Durchführung der ELISA-Messung.....	42
2.2.3.1	ELISA-Kit Bestandteile.....	42
2.2.3.2	Ablauf der Messung.....	43
2.3	Datenanalyse.....	46
2.3.1	Erstellung der Kalibrationskurven.....	46
2.3.2	Berechnung der Gesamt-, Human- und Lispro-Insulinkonzentration einer Probe.....	47
2.3.3	Berechnung und grafische Darstellung der mittleren Plasmakonzentrationsverläufe des Gesamt-, Human- und Lispro-Insulins.....	48
2.3.4	Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter.....	48
2.3.5	Statistischer Vergleich der pharmakokinetischen Parameter.....	50
<b>3</b>	<b>RESULTATE.....</b>	<b>51</b>
3.1	Ergebnisse zur Validierung der Insulin-Lispro-Messmethode mit ELISA.....	51
3.1.1	Sensitivität, Selektivität und Variabilität der beiden ELISAs.....	51
3.1.2	Einfluss wiederholter Gefrier-Auftauzyklen auf die Insulinmessung.....	54
3.2	Studienergebnisse.....	55
3.2.1	Biometrische Daten der Studienteilnehmer.....	55
3.2.2	Zeitverläufe der Gesamt-, Human-, und Lispro-Insulinkonzentration.....	56
3.2.2.1	Mittlere Zeitverläufe der Insulinkonzentration nach der Bolusgabe mit dem kurzen Bolus.....	57
3.2.2.2	Mittlere Zeitverläufe der Insulinkonzentration nach der Bolusgabe mit dem langen Bolus.....	58
3.2.2.3	Mittlere Insulin-Lispro-Konzentrationsverläufe nach Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer.....	59
3.2.3	Vergleich der pharmakokinetischen Parameter.....	60

<b>4</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>63</b>
4.1	Validierung der Insulinmessmethode .....	63
4.1.1	Einfluss von wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen auf die Insulinkonzentration .....	64
4.2	Kinetik der Insulinkonzentrationen im Plasma während der Glucose-Clamp- Untersuchung.....	65
4.2.1	Kinetik des Humaninsulins.....	65
4.2.2	Kinetik des Gesamtinsulins .....	67
4.2.3	Kinetik des insulin-Lispro .....	68
4.2.4	Klinische Relevanz der langsameren Insulinabsorption bei der Bolusgabe mit langer Bolusdauer.....	69
4.2.5	Ursachen für die langsamere Insulinabsorption nach Bolusgabe mit langer Bolusdauer .....	71
4.2.6	Schlussfolgerungen.....	73
<b>5</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>75</b>
	<b>ANHANG.....</b>	<b>84</b>

## Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ABS	Absorption
AP	Artificial pancreas
ATP	Adenosintriphosphat
AUC	Area under the curve
BMI	Body-Mass-Index
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Konzentration
Ca	Kalzium
ca.	circa
Cl	Chlor
CSII	Continuous subcutaneous insulin infusion
CV	coefficient of variation
Da	Dalton
d.h.	das heißt
EKG	Elektrokardiogramm
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
et al.	et alii
g	Gramm
GIR	Glukoseinfusionsrate
g/l	Gramm/Liter
GLUT2	Glukosetransporter 2
H	Wasserstoff
h	Stunde
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HSA	Human-Serum-Insulin
I	Iod
IE	Insulineinheit
IE/kg	Insulineinheit/Kilogramm
INS	Insulin
i.v.	intravenös
K	Kalium
Kap.	Kapitel

kg/m <sup>2</sup>	Kilogramm/Quadratmeter
MAO	Monoamino-Oxidase
max	Maximum
Mg	Magnesium
mg	Milligramm
mg/dl	Milligramm/Deziliter
min	Minute
min*pmol/l	Minute * Pikomol/Liter
ml	Milliliter
ml/min/g	Milliliter/Minute/Gramm
mmol/l	Millimol/Liter
MW	Mittelwert
Na	Natrium
nm	Nanometer
nmol/l	Nanomol/Liter
NO	Stickstoffmonoxid
NPH	Neutral protamine Hagedorn
O	Sauerstoff
OGTT	Oraler Glukosetoleranztest
pmol/l	Picomol/Liter
PP	Pankreatisches Polypeptid
RIA	Radioimmunoassay
rpm	Revolutions per minute
S	Schwefel
s.c.	subkutan
sec.	Sekunde
SE	standard error
sog.	sogenannt
STABW	Standardabweichung
T	Zeit
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TI	Technosphere Insulin
TMB	Tetramethylbenzidin
U	Unit
U/l	Unit/Liter
vs.	versus

z.B.	Zum Beispiel
ZMF	Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung
α	Alfa
β	Beta
γ	Gamma
μl	Mikroliter
μU/μl	Mirkounits/Mikroliter
@	at
>	größer
<	kleiner

# Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tages-Insulin- und Glukosekonzentrations- Verläufe im Blut von gesunden Menschen [4].</i>	2
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung der <math>\beta</math>-Zelle und der Insulinsekretion als Antwort auf einen hohen Blutglukosespiegel [2].</i>	3
<i>Abbildung 3: Schematische Darstellung des Pankreas mit den Langerhans-Inseln und den fenestrierten Kapillaren.</i>	5
<i>Abbildung 4: Insulinsubstitution mit dem Insulinpen und schematische Darstellung der Wirkung mit dieser Form der Therapie verabreichten Insuline.</i>	7
<i>Abbildung 5: Insulinpumpe und Insulininfusionsprofil.</i>	9
<i>Abbildung 6: Proteinstrukturveränderung von Humaninsulin [4].</i>	13
<i>Abbildung 7: Insulinwirkungsprofile [6].</i>	13
<i>Abbildung 8: Schematische Darstellung des Injizieren des Insulins ins subkutane Fettgewebe mit kontinuierlichen Kapillaren.</i>	16
<i>Abbildung 9: Methoden-Prinzipien der Messung der Insulinkonzentration im Blut [nach 31]. A: Prinzip des Radioimmunoassays. B: Prinzip des ELISAs.</i>	23
<i>Abbildung 10.</i>	29
<i>Abbildung 11: Insulinpumpenaufbau.</i>	30
<i>Abbildung 12: Studienprotokoll.</i>	35
<i>Abbildung 13: Ablauf der Insulinmessung.</i>	44
<i>Abbildung 14: Ablauf der Insulinmessung.</i>	45
<i>Abbildung 15: Erstellung einer Kalibrationskurve.</i>	47
<i>Abbildung 16: Messung der Insulin-Standards mit dem Iso-Insulin-ELISA.</i>	52
<i>Abbildung 17: Messung der Insulin-Standards mit dem Insulin-ELISA.</i>	53
<i>Abbildung 18: Einfluss von Gefrier-Auftauzyklen auf die Insulinmessung.</i>	54
<i>Abbildung 19: Mittlerer Zeitverlauf des Gesamtinsulins (große Quadrate) und des Humaninsulins (kleine Quadrate) nach der Bolusgabe mit kurzem Bolus.</i>	57
<i>Abbildung 20: Mittlerer Zeitverlauf des Gesamtinsulins (große Quadrate) und Humaninsulins (kleine Quadrate) nach der Bolusgabe mit langem Bolus.</i>	58
<i>Abbildung 21: Mittlerer Zeitverlauf des Insulin-Lispro nach dessen Bolusgabe mit kurzer (volle Quadrate) und langer (offene Quadrate) Bolusdauer.</i>	59
<i>Abbildung 22: Modell der Insulin- und Wasserausbreitung im Gewebe nach Bolusgabe mit kurzer (A) und langer (B) Boluslänge [nach 77].</i>	73

<i>Abbildung 23: Subject 1</i> .....	84
<i>Abbildung 24: Subject 3</i> .....	84
<i>Abbildung 25: Subject 4</i> .....	85
<i>Abbildung 26: Subject 5</i> .....	85
<i>Abbildung 27: Subject 6</i> .....	86
<i>Abbildung 28: Subject 7</i> .....	86
<i>Abbildung 29: Subject 8</i> .....	87
<i>Abbildung 30: Subject 9</i> .....	87
<i>Abbildung 31: Subject 10</i> .....	88
<i>Abbildung 32: Subject 11</i> .....	88
<i>Abbildung 33: Subject 12</i> .....	89
<i>Abbildung 34: Subject 13</i> .....	89
<i>Abbildung 35: Subject 15</i> .....	90
<i>Abbildung 36: Subject 16</i> .....	90
<i>Abbildung 37: Subject 17</i> .....	91
<i>Abbildung 38: Subject 18</i> .....	91
<i>Abbildung 39: Subject 19</i> .....	92
<i>Abbildung 40: Subject 20</i> .....	92
<i>Abbildung 41: Subject 21</i> .....	93
<i>Abbildung 42: Subject 22</i> .....	93

# Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Insulin-Lispro Standards</i> .....	39
<i>Tabelle 2: Humaninsulin Standards</i> .....	40
<i>Tabelle 3: Biometrische Daten der Probanden</i> .....	55
<i>Tabelle 4: Pharmakokinetische Parameterwerte für die Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer</i> .....	61
<i>Tabelle 5: Pharmakokinetische Parameterwerte für die Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer</i> .....	62
<i>Tabelle 6: Pharmakokinetische Parameter <math>C_{INSmax}</math>, <math>T_{CINSmax}</math>, <math>T_{CINSmax10\%}</math>, <math>T_{CINSmax50\%}</math></i> .....	94
<i>Tabelle 7: Pharmakokinetische Parameter <math>C_{INST30min}</math>, <math>C_{INST60min}</math>, <math>C_{INST120min}</math></i> .....	95
<i>Tabelle 8: Pharmakokinetische Parameter <math>AUC_{INSTotal}</math>, <math>AUC_{INS\ 0-tcinsmax}</math>, <math>T_{AUC-INSTotal10\%}</math>, <math>T_{AUC-INSTotal50\%}</math></i> .....	96
<i>Tabelle 9: Pharmakokinetische Parameter <math>AUC_{INS\ 0-30min}</math>, <math>AUC_{INS\ 0-60min}</math>, <math>AUC_{INS\ 0-120min}</math></i> .....	97

# 1 Einleitung

## 1.1 *Diabetes mellitus*

Diabetes mellitus ist eine chronische Stoffwechselerkrankung, die durch verminderte Insulinbildung als Folge der Zerstörung von  $\beta$ -Zellen des Pankreas (Typ 1) oder aufgrund einer Insulinresistenz (Typ 2) entsteht [1,2].

Die Inzidenz und Prävalenz der beiden Diabetesformen steigt derzeit weltweit [1,2]. Beim Typ 1-Diabetes erhöht sich die Inzidenz um 2-5% pro Jahr [1], wobei die Prävalenz beim Typ 2-Diabetes in Österreich 6% beträgt [61]. Weiters ist zu beobachten, dass die Altersgruppe der Erstmanifestation von Typ 1-Diabetes immer jünger wird und gegenwärtig bei durchschnittlich 5 Jahren liegt [1].

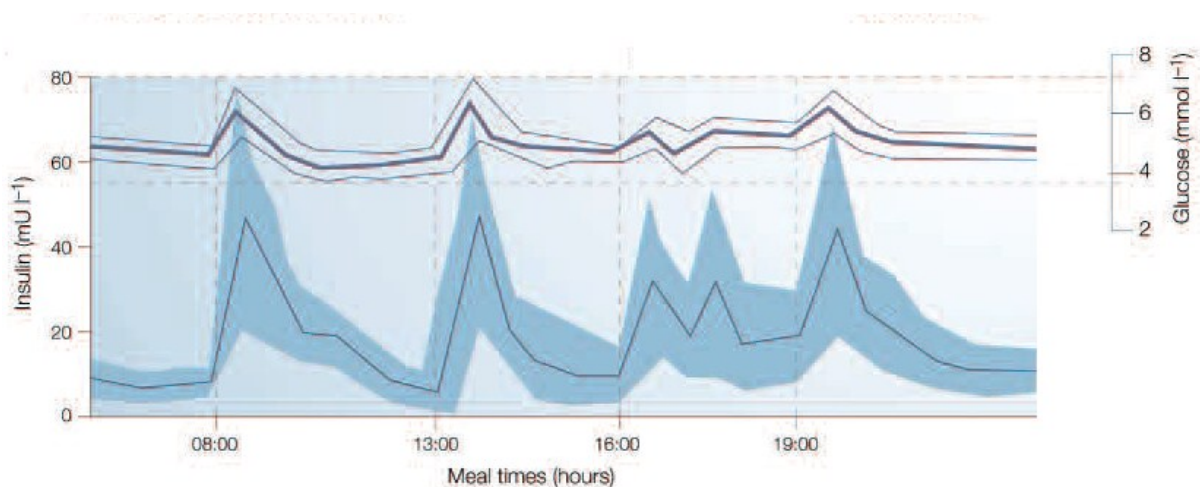
Durch verminderte Insulinbildung und Insulinresistenz entstehen hohe Blutzuckerwerte (Hyperglykämien), die zur lebensbedrohlichen Ketoazidose (Coma diabeticum) führen können. Um dies zu vermeiden, müssen Typ 1-Diabetiker Insulin von außen zuführen. Auch Typ 2-Diabetiker müssen Insulin zuführen, wenn mit oralen Antidiabetika, Diät und durch Steigerung der körperlichen Aktivität eine Normalisierung des Blutzuckerspiegels (Normoglykämie) nicht erreicht werden kann [2].

## 1.2 Ziel der Insulinsubstitution bei Typ 1-Diabetes

Das angestrebte Ziel der Insulintherapie beim Typ 1-Diabetes ist die Nachahmung der physiologischen Insulinsekretion von Gesunden um Normoglykämie oder eine normnahe Blutzuckereinstellung zu erreichen [2,5,6].

### 1.2.1 Insulin- und Glukosekonzentrationsverläufe bei Gesunden

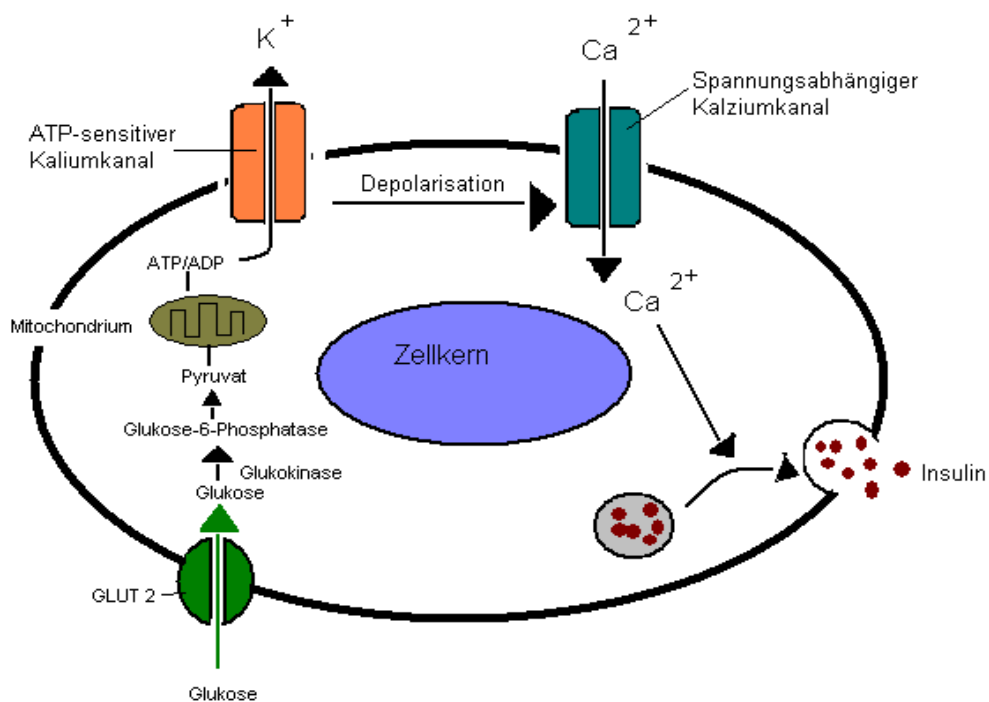
Der Insulinkonzentrationsverlauf bei Gesunden wird durch Fasten-bezogene und Essens-bezogene Insulinsekretion bewirkt. Die Fasten-bezogene, auch als basale Insulinsekretion bezeichnet, ist nieder-rätig und hat die Aufgabe, den Blutzuckerspiegel (Glukosekonzentration) zwischen den Mahlzeiten und nachts zu regulieren. Mit der Nahrungsaufnahme steigt der Blutzuckerspiegel und damit wird die Essens-bezogene Insulinsekretion angeregt (Abb.1). Sie ist höherrätig und erniedrigt die Blutglukosekonzentration nach der aufgenommenen Mahlzeit auf einen normalen Wert (um 100 mg/dl) [4-6].



**Abbildung 1: Schematische Darstellung der Tages-Insulin- und Glukosekonzentrations- Verläufe im Blut von gesunden Menschen [4].**

### 1.2.2 Insulinsekretion bei Gesunden

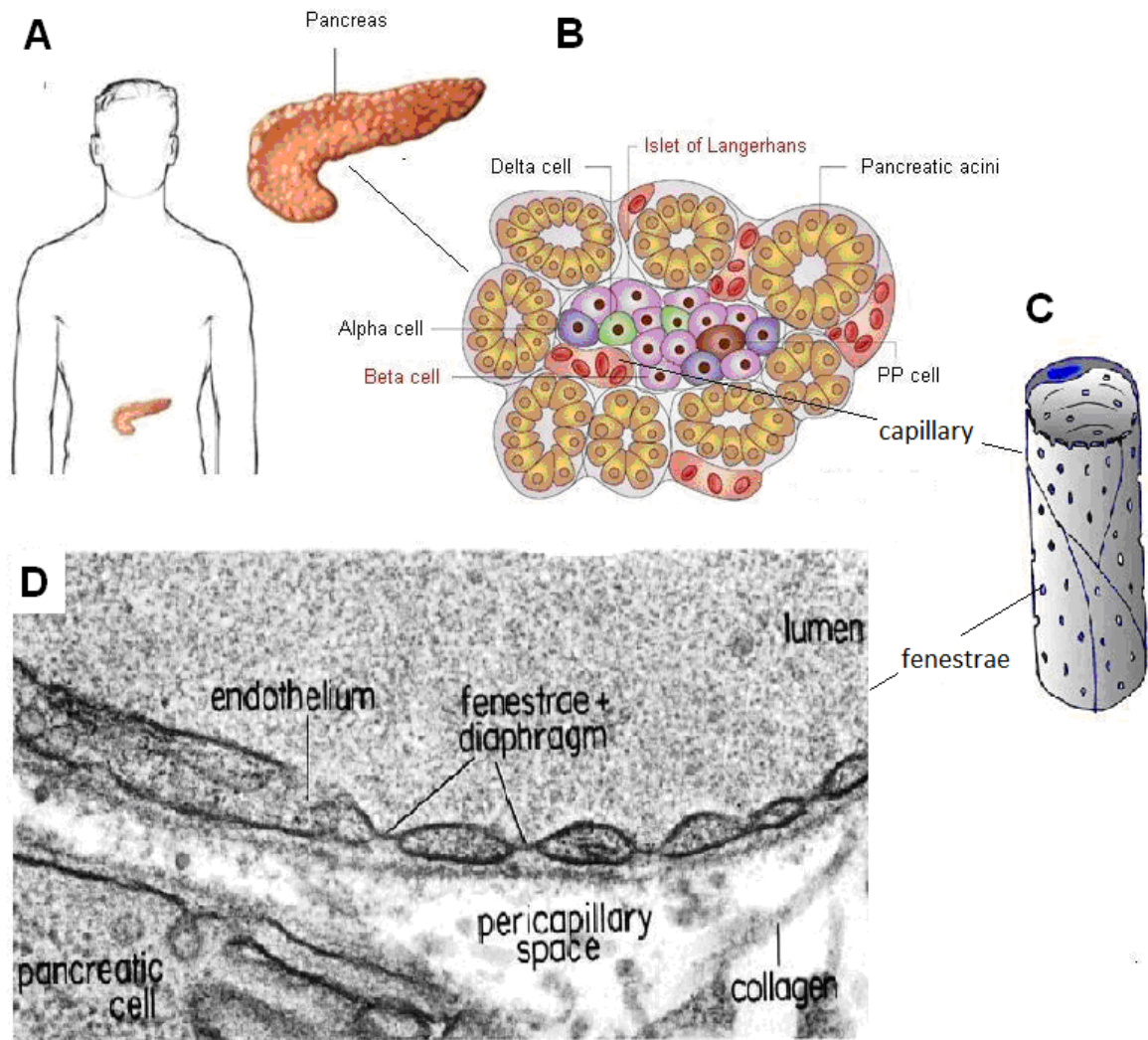
Beim gesunden Menschen wird die Insulinsekretion aus den  $\beta$ -Zellen durch die jeweils vorherrschende Glukosekonzentration im Blut bestimmt; je höher die Blutglukosekonzentration, desto mehr Insulin wird ausgeschüttet. Die Glukose gelangt über GLUT2-Glukosetransporter in die  $\beta$ -Zellen der Langerhans'schen Inseln (Abb.2). Daraufhin folgt die Phosphorylierung der Glukose durch die Glukokinase. Der weitere Abbau der Glukose resultiert aus der Bildung von ATP (Adenosinriphosphat), das Kaliumkanäle hemmt und somit zur Depolarisation und zur Eröffnung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle führt. Hierdurch strömt das Kalzium in die Zelle ein, wodurch die Insulinsekretion aus den Vesikeln durch Exozytose aktiviert wird [2,55].



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der  $\beta$ -Zelle und der Insulinsekretion als Antwort auf einen hohen Blutglukosespiegel [2].**

### **1.2.3 Transport des sezernierten Insulins von den $\beta$ -Zellen zu den Zielorganen**

Insulin hat die Aufgabe, die zu hohe Glukosekonzentration zu senken und diese auf einem normalen Wert (um 100 mg/dl) zu halten [2]. Aufgrund dessen ist es von großer Bedeutung, Insulin nach der Sekretion aus der  $\beta$ -Zelle schnell zu seinem Wirkort (Leber, Muskulatur, Fettgewebe) zu bringen [55]. Der Transport des Insulins wird durch zahlreiche Kapillaren bewerkstelligt (Abb.3), die sich innerhalb und rund um die Langerhans'schen Inseln befinden [8,56]. Um die Diffusion des Insulins durch die Kapillarwand zu erleichtern, befinden sich hier im Endothel große Poren bzw. Lücken (Fenestrae, fenestriertes Endothel) [7,56]. Dadurch können größere Moleküle wie beispielsweise Insulin (5800 Da) leichter und schneller diffundieren [7,22]. Solche fenestrierte Endothelien kommen außerdem in den Nierenglomeruli, im Dünndarm sowie im Knochenmark vor [7]. Die Durchblutung der Langerhans'schen Inseln spielt beim Transport des Insulins ebenfalls eine große Rolle. Langerhans'sche Inseln nehmen bei einem Gesamtanteil von lediglich 1% des Parenchyms eine Durchblutung von ungefähr 5-15% von der des gesamten Pankreas ein; sie beträgt 6 ml/min/g [8]. Sie wird von mehreren Faktoren beeinflusst, sowohl von Nerven- und endokrinen System als auch von endothelialen Mediatoren, wie NO (Stickstoffmonoxid) [8,56]. Da die venösen Blutgefäße des Pankreas in der Pfortader münden, wird ein hoher Anteil des sezernierten Insulins (bis zu 50%) in der ersten Leberpassage abgebaut [15, 48].



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des Pankreas mit den Langerhans-Inseln und den fenestrierten Kapillaren.**

**A:** Das Pankreas liegt quer im Oberbauch [9]. **B:** Das Pankreas stellt sowohl eine exokrine als auch eine endokrine Drüse dar. Azini gehören zum exokrinen Anteil. Im endokrinen Anteil, welcher als Inselorgan bezeichnet wird, befinden sich die Langerhans'schen Inseln. In letzteren befinden sich folgende Zellen: Insulin produzierende  $\beta$ -Zellen, Glukagon produzierende  $\alpha$ -Zellen, Somatostatin produzierende  $\gamma$ -Zellen und PP-Zellen, welche das pankreatische Polypeptid produzieren [10]. **C:** Fenestrierte Kapillare [11]. **D:** mikroskopisches Bild einer fenestrierten Kapillarwand [12].

## **1.3 Zufuhr des Insulins bei Typ 1-Diabetes**

### **1.3.1 Verabreichungsmethoden von Insulin**

Um die endogene Insulinsekretion zu imitieren, führen sich Diabetiker exogenes Insulin entweder mithilfe multipler täglicher subkutaner Injektionen oder mit einer Insulinpumpe zu.

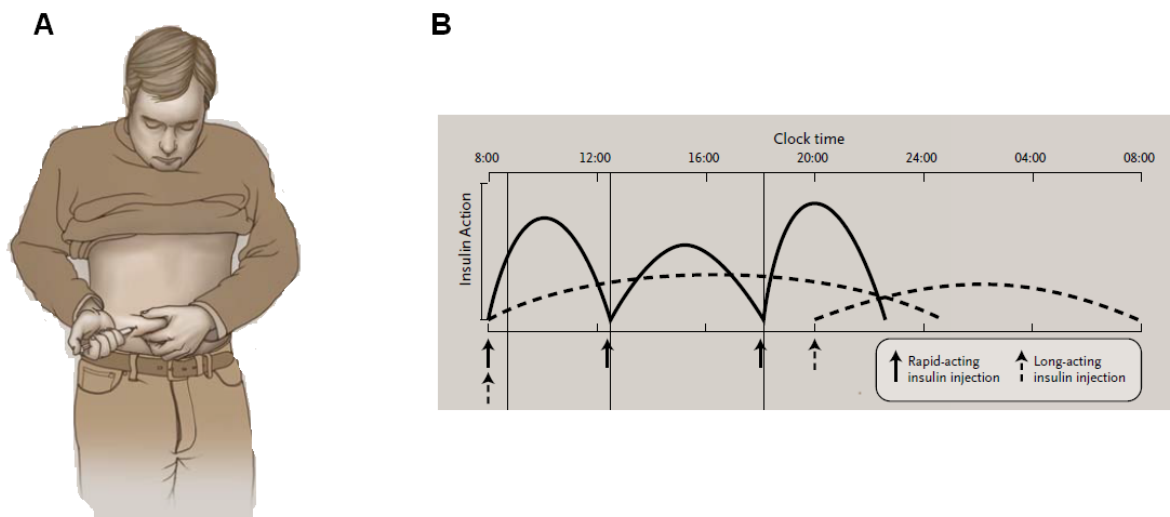
#### **1.3.1.1 Multiple tägliche subkutane Insulininjektionen**

Die gebräuchlichste Methode stellt heute die subkutane Insulininjektion dar [16]. Bei diesem Verfahren werden diverse Insulinarten mehrmals täglich verwendet [2,4,6,13]. Vor Mahlzeiten wird ein kurz- oder schnellwirksames Insulin (Humaninsulin, Insulin Lispro, Insulin Aspart) verabreicht, um die Essens-bezogene Insulinsekretion nachzuahmen (Abb.4). Am Morgen und am Abend folgt die Injektion eines lang wirksamen Insulins (NPH oder neutral protamine Hagedorn - Insulin, Insulin Glargine, Insulin Detemir), um die Fasten-bezogene Sekretion zu imitieren [1,2,4-6,13-15].

Die subkutane Insulininjektion mit Injektionsspritze ist mit vielen Nachteilen verbunden, wie beispielsweise Unbequemlichkeit, aufwändige Vorbereitung der Spritze und soziale Aspekte, da eine Spritze immer mit einer Krankheit assoziiert wird. Um diese Nachteile zu bewältigen, wurde im Jahr 1985 ein Insulinpen (Abb.4) entwickelt [17]. Ein Insulinpen besteht aus einem Insulinreservoir und einer Nadel. Die erforderliche Insulindosis kann genauer eingestellt werden und andererseits ist die Verabreichung für den Patienten weniger schmerzhaft. Das Insulinresevoir bzw. die Patronen sind einfach zu tauschen und es ist einfacher, tagsüber mehrere Patronen bei sich zu tragen [16,17].

Die Blutglukoseselbstmessungen sollten von Typ 1-Diabetikern mehrmals täglich (2-5 Mal) erfolgen, um Hypo- und Hyperglykämien zu vermeiden [6]. Zur Messung der Blutglukose wird in der Fingerkuppe eingestochen, ein Blutropfen (2-10 µl) entnommen und mit einem Messgerät der Blutglukosewert innerhalb von 5-15 Sekunden bestimmt [1]. Vor dem Einspritzen eines Essens-bezogenen Insulins wird zunächst die Dosis, bezogen auf den Blutzuckerwert vor der Mahlzeit, die geplante

Menge der Mahlzeit und jeweilige körperliche Aktivität, berechnet [2]. Hierbei kann die Größe und Zusammensetzung der Mahlzeit falsch geschätzt bzw. errechnet und somit eine falsche Insulindosis verabreicht werden, was zu Glukoseentgleisungen (Hypo- und Hyperglykämie) führen kann [18]. Die Tatsache, dass Insulin ungleichmäßig absorbiert wird und die Wirkung variabel ist, führt ebenso zur Glukoseentgleisungen und benötigt deswegen ebenfalls die häufigen Blutglukosemessungen [18]. Darüber hinaus kann sich die Wirkung des morgens eingespritzten Essens-bezogenen Insulins mit jener des abends injizierten Fasten-bezogenen Insulins bzw. lang wirksamen Insulins überschneiden was wiederum zu Hypoglykämien führen kann [5].



**Abbildung 4: Insulinsubstitution mit dem Insulinpen und schematische Darstellung der Wirkung mit dieser Form der Therapie verabreichten Insuline.**

**A:** Illustration der Insulininjektion in das Fettgewebe mittels eines Insulinpens **B:** Zeitlicher Ablauf der Insulinverabreichung und Insulinwirkung. Schnellwirksame Insuline werden immer vor dem Essen injiziert. Langwirksame Insuline werden 1-2 täglich (morgens und abends) injiziert [18].

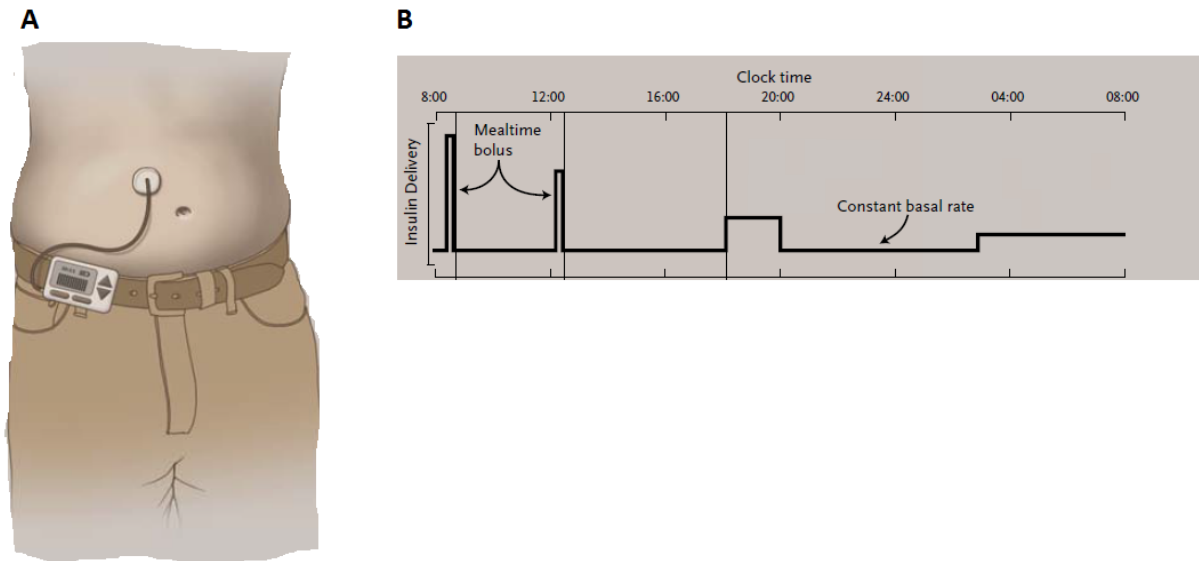
### **1.3.1.2 Kontinuierliche subkutane Insulininfusion (Insulinpumpentherapie)**

Eine weitere Methode zur Substitution des Insulins ist die Insulinpumpentherapie (Continuous Subcutaneous Insulin Infusion; CSII). Die Insulinpumpentherapie wurde 1977 in die Therapie des Typ 1-Diabetes eingeführt [19]. Die damals produzierten Pumpen waren schwer, groß und stellten nur für schwer einstellbare Typ 1-Diabetiker eine angemessene Therapieindikation dar [19]. Die heutzutage verwendeten Pumpen sind klein, einfach zu bedienen und bieten dem Patienten mehr Flexibilität im alltäglichen Leben [16,19].

Eine moderne Insulinpumpe besteht aus einem Insulinreservoir für ungefähr 200-300 Insulineinheiten (IE) [18], einen Schlauchsystem und einer Kanüle, die im subkutanen Gewebe liegt und dort Insulin ins Gewebe abgibt (Abb.5A und 11) [17-19]. Die Kanüle muss ca. alle 2-3 Tage zur Vermeidung von Lipohypertrophie und Infektionen gewechselt werden und an einer anderen Körperstelle wieder eingestochen werden [18].

Bei der Insulinpumpentherapie wird ein kurzwirksames, meistens aber ein schnellwirksames Insulin eingesetzt [19]. Hierbei wird das Insulin einerseits als Bolus, der die essensbezogene Insulinsekretion imitiert und andererseits über eine Basalrate, die die Fasten-bezogene Insulinsekretion imitiert, abgegeben [17-20]. Der Bolus ist höherrätig und wird über wenige Minuten kurz vor der Essensaufnahme abgegeben (Abb.5B). Die Bolusdosis wird vom Patienten selbst bestimmt und basiert auf der Menge der Kohlenhydrate in der Mahlzeit und auf der gemessenen Blutglukosekonzentration [18,20]. Die Basalrate hingegen ist niederrätig und wird kontinuierlich abgegeben, wodurch Insulin gleichmäßiger resorbiert wird (Abb.5B) [19]. Sie kann individuell mit verschiedenen Profilmöglichkeiten sowie durch ihre Absenkung und Abhebung den physiologischen und auch täglichen Bedürfnissen angepasst werden [19,20].

Die regelmäßigen, vom Patienten selbst durchgeführten Blutglukosekontrollen (vor und nach dem Essen, vor und nach körperlicher Aktivität und vor dem Schlafen) sind bei dieser Therapieform ebenso erforderlich [20].



**Abbildung 5: Insulinpumpe und Insulininfusionsprofil.**

**A:** Insulinpumpe mit Schlauch und der subkutan getragenen Infusionskanüle. **B:** Von Patienten abgestimmter Bolus vor den Mahlzeiten und die kontinuierliche Basalrate [18].

### 1.3.2 Verwendete Insulinarten

Wie bereits erwähnt, applizieren Typ 1-Diabetiker verschiedene Arten von Insulin, um ihren Blutzuckerspiegel zu senken bzw. im Normbereich zu halten. Im Jahre 1921 wurde das erste therapeutisch verwendbare tierische Insulin isoliert und ein Jahr später erstmals klinisch verwendet [4,5,16]. Tierische Insuline waren zunächst mit vielen Verunreinigungen und mit allergischen Reaktionen verbunden. Aufgrund dessen wurde im Jahr 1980 das erste Humaninsulin hergestellt [4,5,6].

#### 1.3.2.1 Essens-bezogene Insuline

Um die Essens-bezogene endogene Insulinsekretion nachzuahmen, werden heutzutage kurzwirksame und schnellwirksame Insuline verwendet.

#### KURZWIRKSAMES INSULIN (HUMANINSULIN)

Humaninsulin hat die gleiche Struktur und Aminosäuresequenz wie das von der Bauchspeicheldrüse sezernierte Insulin (Abb.6). Es besteht aus einer  $\alpha$ -Kette und  $\beta$ -Kette, die aus insgesamt 51 Aminosäuren bestehen und miteinander durch Disulfidbrücken verbunden sind [2,4]. Zur Anwendung kommt es als Essens-bezogenes Insulin per Insulinspritze oder als Pumpeninsulin. Der Wirkungseintritt sowie Wirkungsmaximum treten nach der subkutanen Injektion im Vergleich zu endogenem Insulin um 30-60 Minuten [6] bzw. 2-3 Stunden [6] zeitverzögert ein, die

Wirkdauer beträgt ca. 6-10 Stunden (Abb.7). Um die Hyperglykämie nach dem Essen zu vermeiden, sollte daher das Humaninsulin mindestens 30 Minuten vor der Mahlzeit gespritzt werden (Spritz-Ess-Abstand) [5,15]. Dies ist dadurch bedingt, dass das Humaninsulin nach subkutaner Gabe im Form eines Hexamers (großes Molekül) vorliegt und zunächst in seine Dimere und Monomere dissoziieren muss, um als Monomer (kleines Molekül) in die Kapillaren zu diffundieren und um dann über den Blutstrom zu den Organen und Zielzellen transportiert zu werden, wo es letztendlich seine Wirkung entfalten kann [15]. Eines der am häufigsten verwendeten Humaninsuline ist Actrapid®, ein von der Firma Novo Nordisk hergestelltes Humaninsulin.

### SCHNELLWIRKSAME INSULINE

Die schnell wirksamen Insuline werden ebenso wie Humaninsulin als Essensbezogene-Insuline mit Insulinspritze und als Pumpeninsuline bei der Therapie des Typ 1-Diabetes eingesetzt [6,13,15]. Sie werden durch gentechnologische Verfahren hergestellt, wobei die Aminosäuresequenz des Humaninsulins geändert wird [13,15]. Dadurch dissoziieren diese schneller vom Hexamer zum Dimer und danach zum Monomer, wodurch sie leichter und schneller durch die Poren in der Kapillarwand treten können und dadurch schneller absorbiert werden [4-6,13-15]. Die Folge ist ein im Vergleich zu Humaninsulin rascherer Wirkeintritt und eine kürzere Wirkdauer, allerdings wirkt es im Vergleich zu dem endogen sezernierten Insulin immer noch langsamer [6,14,15]. Bei der Anwendung dieses schnellwirksames Insulins kann daher der Spritz-Ess-Abstand auf wenige Minuten reduziert werden oder sogar entfallen, was einen wesentlichen klinischen Vorteil gegenüber den subkutan injizierten Humaninsulin darstellt [5,14,15]. Die derzeit am häufigsten verwendeten schnell wirksamen Insulinanaloge sind Insulin-Lispro und Insulin-Aspart [4-6,13-15].

#### *Insulin-Lispro (Humalog®)*

Das erste entwickelte schnellwirksame Insulin war Insulin-Lispro der Firma Eli Lilly [15]. Hier wurde die Aminosäuresequenz des Humaninsulins so geändert, dass die Aminosäuren Prolin und Lysin ihre Positionen (Position B28 und B29) in der  $\beta$ -Kette getauscht haben (Abb.6) [4,6,13-15]. Dies bewirkt eine schnellere Dissoziation zu Monomeren und dadurch eine schnellere Absorption und einen rascheren

Wirkungseintritt [4-6,13-15]. Die Wirkung des Insulin-Lispro setzt nach 5-15 Minuten ein, ihr Maximum erreicht es nach 30-90 Minuten und die Wirkung hält 4-6 Stunden an (Abb.7) [6]. Dies ist etwa doppelt so schnell wie Humaninsulin, aber noch immer langsamer als beim endogen produzierten Insulin [4-6,13-15].

#### *Insulin Aspart (Novo Rapid®)*

Ein weiteres schnellwirksames Insulin wird von der Firma Novo Nordisk hergestellt [15]. Hier wurde in der  $\beta$ -Kette des Humaninsulins die Aminosäure Prolin auf der Position B28 mit Aminosäure Asparagin ersetzt (Abb.6) [4,6,13-15]. Genauso wie beim Insulin-Lispro bewirkt diese Aminosäuresequenzänderung eine schnellere Absorption des Insulins; beide Insuline haben dadurch eine vergleichbare Pharmakodynamik und Pharmakokinetik (Abb.7) [4-6,13-15].

### **1.3.2.2 Fasten-bezogene Insuline**

Die lang wirksamen Insuline werden bei der Therapie mit Insulinspritze oder Pen verwendet, um die Fasten-bezogene Insulinsekretion nachzuahmen [4].

#### LANGWIRKSAME INSULINE

Bei der Entwicklung von lang wirksamen Insulinen wurde versucht, die Wirkungsdauer zu verlängern, um die täglichen Injektionen zu reduzieren. Dies gelang, indem die Proteinstruktur des Humaninsulins verändert wurde oder indem dem Humaninsulin Zusatzstoffe (Zink/Protamin) beigemischt wurden [5,6].

#### *NPH (neutral protamin Hagedorn)-Insulin*

Die NPH-Insulinformulierung wurde im Jahr 1946 entwickelt. Hierbei wurde zu Humaninsulin Zink und Protamin beigefügt, um die Wirkung zu verlangsamen [5]. Die Wirkung tritt 2-4 Stunden nach der subkutanen Injektion ein und das Wirkungsmaximum wird nach 4-10 Stunden erreicht, was deutlich langsamer als beim Humaninsulin ist [6,13]. Die Wirkungsdauer des NPH-Insulins beträgt 12-18 Stunden (Abb.7). Um eine Wirkungsdauer über 24 Stunden zu erreichen, müssen die Patienten dieses Insulin durchschnittlich zwei Mal täglich injizieren [6,13].

Um die Wirkung noch weiter zu verlangsamen, wurden Insulinanaloga durch Modifikation der Proteinstruktur des Humaninsulins hergestellt. Die am häufigsten verwendeten lang wirksamen Insulinanaloga ist das von der Firma Novo Nordisk hergestellte Insulin-Detemir und das von der Firma Sanofi-Aventis hergestellte Insulin-Glargin.

#### *Insulin-Glargin (Lantus®)*

Das erste langwirksame Insulinanalogon wurde im Jahr 2001 von der Firma Sanofi-Aventis hergestellt [6], indem in der  $\beta$ -Kette des Humaninsulins 2 Aminosäuren Arginin substituiert wurden und in der  $\alpha$ -Kette die Aminosäure Asparagin auf der Position A21 mit Aminosäure Glycin ausgetauscht wurde (Abb.6) [4,6,13]. Hierdurch wurde eine verstärkte Hexamerbildung erreicht, so dass die Resorption verlangsamt wird. Im Gegensatz zu dem NPH-Insulin hat Insulin-Glargin kein klar definiertes Maximum der Wirkung, sondern es wird gleichmäßiger absorbiert und die Wirkung hält für 20-24 Stunden an (Abb.7), sodass es nur einmal täglich injiziert werden muss [5,6,13].

#### *Insulin-Detemir (Levemir®)*

Dieses Insulinanalogon wird von der Firma Novo Nordisk hergestellt, in dem freie Fettsäuren an das Humaninsulinmolekül gekoppelt werden (Abb.6), wodurch die Bindung an Albuminmoleküle ermöglicht und somit die Wirkung verzögert wird [4]. Die Wirkungsdauer beträgt, gleich wie beim Insulin-Glargin, etwa 24 Stunden (Abb.7), wodurch sich Patienten dieses Insulin nur einmal täglich injizieren müssen.

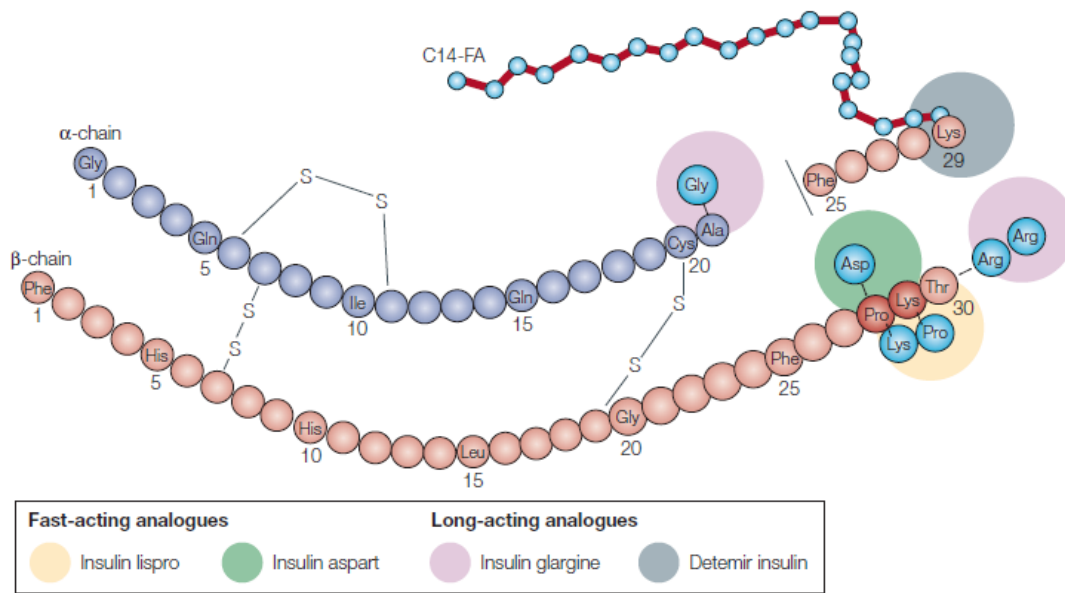


Abbildung 6: Proteinstrukturveränderung von Humaninsulin [4].

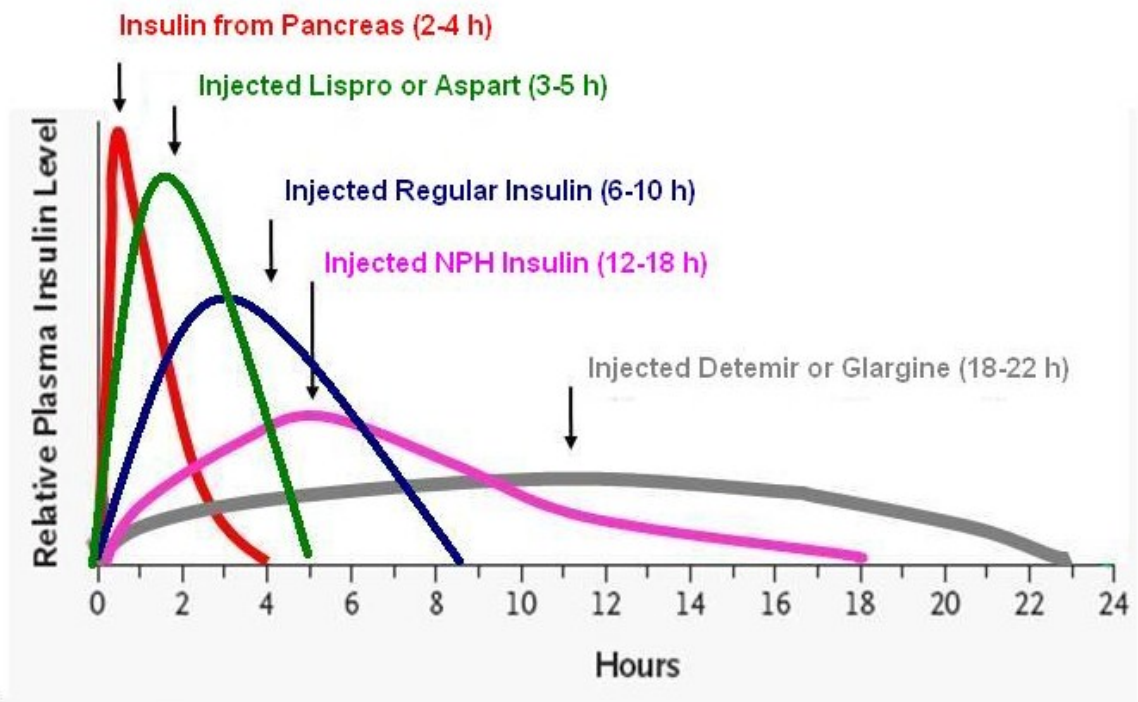


Abbildung 7: Insulinwirkungsprofile [6].

## **1.4 Notwendige Verbesserungen der Insulintherapie beim Typ 1-Diabetes**

Mit den bisherigen Formen der Therapie ist es noch nicht möglich, eine stabile Blutzuckereinstellung (ca.100 mg/dl) über einen längeren Zeitraum zu erzielen, daher sind Verbesserungen notwendig.

### **1.4.1 Die Gründe für die Unzulänglichkeit der heutigen Therapieformen für Typ 1-Diabetes**

Zu erheblichen Schwierigkeiten bei der optimalen Blutzuckereinstellung zählen:

1. zu selten durchgeführte Blutglukosemessungen
2. falsche Abschätzung des Kohlenhydratgehalts der Mahlzeit und somit zu hohe oder zu niedrige Insulindosisabstimmung
3. zu langsame Insulinabsorption im Fettgewebe

Die regelmäßigen Blutzuckermessungen in der Therapie mit Insulin sind Grundvoraussetzung, um eine Normoglykämie zu erreichen und diese über einen längeren Tageszeitraum zu behalten [1,20]. Die Blutzuckermessungen aus dem von der Fingerkuppe abgenommenen Blutropfen können aus praktischen Gründen nicht oft genug durchgeführt werden [57]. Dies hat eine nicht rechtzeitig erkennbare Hyperglykämie nach der Mahlzeit zur Folge und damit eine nicht rechtzeitige Verabreichung der Insulinkorrekturdosis [20], womit länger bestehende Hyperglykämien entstehen und sich dadurch Spätfolgen entwickeln können. Zudem werden auch die relativ häufigen, besonders nachts auftretenden Hypoglykämien nicht rechtzeitig erkannt, um diese durch Kohlenhydrataufnahme abwenden zu können [20,57]. Die Folgen von Hypoglykämien sind Verwirrtheit, Müdigkeit und Bewusstlosigkeit; schwere Hypoglykämie können auch zum Tod führen [42].

Bevor die Patienten eine Mahlzeit zu sich nehmen, müssen sie den Kohlenhydratgehalt der Mahlzeit zunächst abschätzen, um die richtige Insulindosis verabreichen zu können [1,15,20]. Dies stellt nicht selten eine Schwierigkeit für die Patienten dar, da der Gehalt an Kohlenhydraten in der Mahlzeit falsch eingeschätzt wird, wodurch zu hohe oder zu niedrige Insulindosen verabreicht werden und es in Folge zu Hypoglykämien bzw. Hyperglykämien kommen kann [15].

Die Insuline werden ins subkutane Fettgewebe injiziert. Deren Absorption vom Fettgewebe wird von mehreren Faktoren beeinflusst. Die wichtigsten Faktoren hierbei sind:

1. die Struktur der Kapillaren im Fettgewebe
2. die Durchblutung des Fettgewebes
3. die Verteilung des Insulins im Fettgewebe, sowie
4. die Insulinkonzentration.

Die Zellen des Fettgewebes (Adipozyten) sind von der interstitiellen Flüssigkeit und einem relativ dichten Kapillarnetz umgeben [25]. Eine Barriere für die Absorption, bzw. Diffusion des injizierten Insulins von der interstitiellen Flüssigkeit in das Kapillarblut stellt hier die Kapillarwand dar [22,24]. Anders als im Pankreas weist das Endothel der Kapillarwände im Fettgewebe nur kleine Poren auf (kontinuierliches Endothel). Diese Poren liegen an den Verbindungsstellen der Endothelzellen (Interzellularfugen; Abb.8) [7]. Durch derart kleine Poren (2-5 nm im Durchmesser) können nur kleine Moleküle leicht diffundieren, wobei die Diffusion größerer Moleküle, wie Insulin, eingeschränkt ist [7]. Da das injizierte Insulin in der interstitiellen Flüssigkeit des Fettgewebes hauptsächlich als Hexamer vorliegt, muss das Insulin zunächst in seine Dimere und Monomere dissoziieren, um dann leichter durch die Poren der Kapillaren diffundieren zu können. Der Zerfallsprozess in Dimere und Monomere dauert jedoch relativ lange. Dadurch geht die Absorption des Insulins im Fettgewebe generell langsam von statten [24].

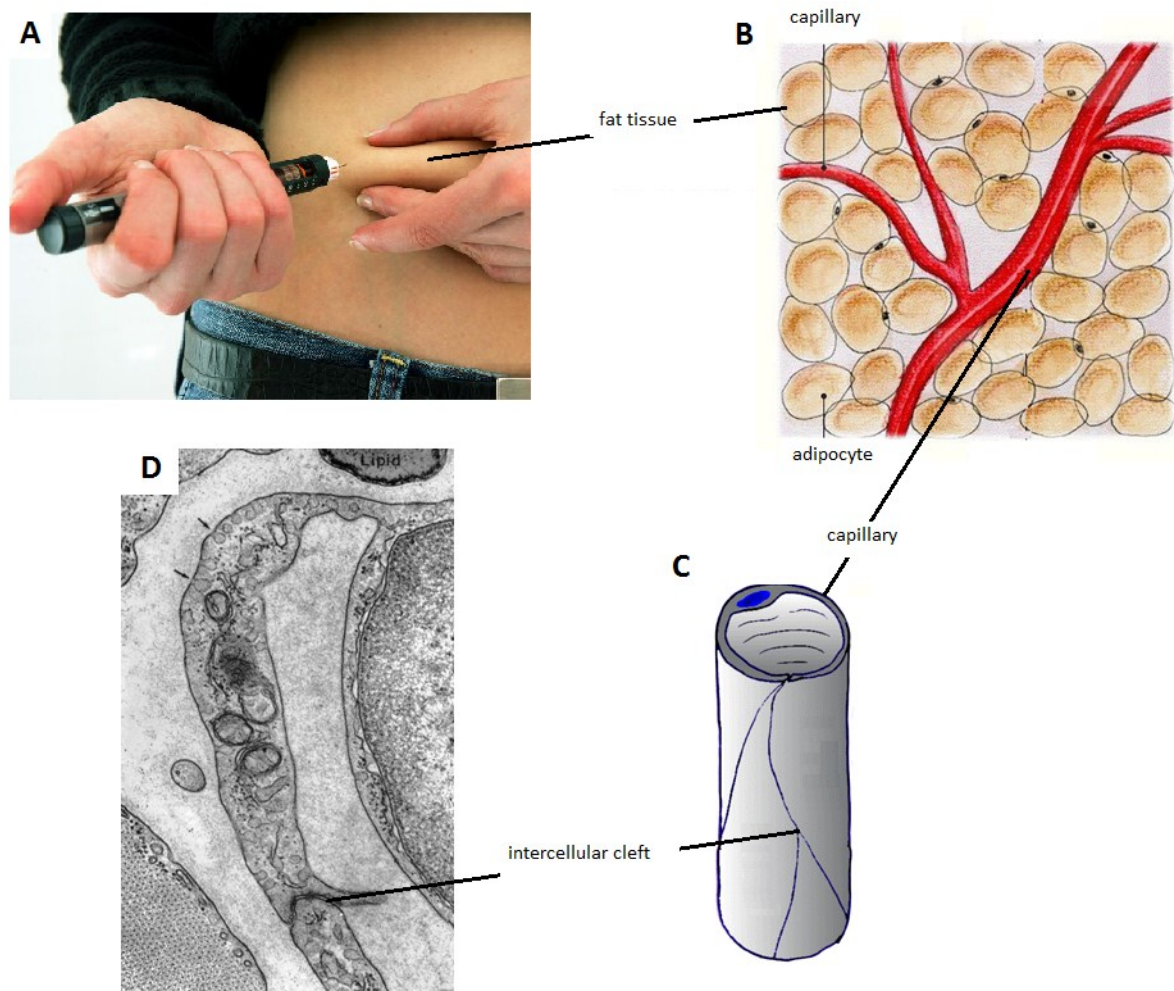
Ein zusätzlicher beeinflussender Faktor der Insulinabsorption ist die Durchblutung des Fettgewebes [21,23]. Diese beträgt 0,25-0,30 ml/min/g [26] und ist somit erheblich niedriger als die in den Langerhans'schen Inseln des Pankreas (6 ml/min/g [8]). Erhöht sich die Durchblutung im Fettgewebe, werden mehr Kapillaren pro Zeiteinheit von Blut durchströmt (Rekrutierung von Kapillaren). Dadurch wird die Diffusionsdistanz für das Insulin zu den durchbluteten Kapillaren kleiner und die Absorptionsrate steigt [22-24]. Die Durchblutung kann durch mehrere lokal beeinflussende Faktoren vergrößert (Wärme, Massage der Injektionsstelle) bzw. gesenkt (Kälte) werden [22,23].

Die Verteilung des Insulins im Fettgewebe spielt bei der Absorption des Insulins ebenso eine große Rolle. Je besser, d.h. großflächiger sich das Insulin im

Fettgewebe verteilt, desto schneller wird es absorbiert, da sich bei besserer Verteilung mehr Kapillaren in der Umgebung des Insulins befinden.

Ein zusätzlicher Einflussfaktor ist die Konzentration des Insulins. Je höher die Konzentration des Insulins in der Insulinlösung ist, desto größer ist die Anzahl der nach der Injektion gebildeten Hexamere. Eine hohe Hexameranzahl verlangsamt die Absorption, da, wie bereits erwähnt, die Hexamere zuerst zu Monomeren dissoziieren müssen, um effektiv durch die Poren der Kapillarwände zu diffundieren [21,22,24].

Anzumerken ist noch, dass die subkutane Absorption des Insulins sowohl unter verschiedenen Patienten als auch bei denselben Patienten von Gabe zu Gabe eine große Variabilität zeigt [22-24].



**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Injizierens des Insulins ins subkutane Fettgewebe mit kontinuierlichen Kapillaren.**

**A:** Insulin wird mittels Pen ins Fettgewebe injiziert [26]. **B:** Mikroskopisches Bild des Fettgewebes mit Adipozyten und Kapillaren [27]. **C:** Kontinuierliche Kapillare mit Interzellularfugen [11]. **D:** Mikroskopisches Bild der Kapillaren [62].

### **1.4.2 Folgeschäden durch die Unzulänglichkeiten der Therapie des Typ 1-Diabetes**

Zu den **akuten** Komplikationen des Typ 1-Diabetes wird unter anderem eine lebensbedrohliche diabetische Ketoazidose (Coma diabetikum) gezählt, die als Folge des Insulinmangels bzw. der Hyperglykämie entsteht [1,3]. Eine weitere, häufig auftretende Komplikation bei Typ 1-Diabetes stellt die schon erwähnte Hypoglykämie dar. Ein Typ 1-Diabetiker erleidet durchschnittlich zweimal wöchentlich eine leichte und mindestens einmal jährlich eine schwere Hypoglykämie, bei welcher man auf Fremdhilfe angewiesen ist [2]. Häufig auftretende Hypoglykämien bei Jugendlichen mit sehr frühem Krankheitsbeginn können zu kognitiven Schädigungen führen [1].

Aufgrund länger bestehender Hyperglykämien können sich **chronische** Folgeerscheinungen entwickeln, die unter anderem durch entstehende Retinopathien, Nephropathien, Neuropathien, koronare Herzkrankheiten und auch durch periphere arterielle Verschlusskrankheiten eine negative Beeinflussung auf Morbidität und Mortalität des Patienten ausüben können [1,2,3].

Zudem wird das Gesundheitssystem sehr stark durch Kosten belastet, die durch die Behandlung der chronischen Folgeerscheinungen hervorgerufen werden. Es wird deshalb angestrebt, bessere Therapiemethoden zu entwickeln, um chronische Folgeerscheinungen bei Typ 1-Diabetes zu vermeiden oder zumindest lange hinauszuzögern.

## **1.5 Methoden zur Bestimmung der Insulinabsorption**

Die Absorption des Insulins nach einer subkutanen Injektion kann grundsätzlich mit drei verschiedenen Methoden gemessen werden [22-24]:

1. Messung der Radioaktivitätsabnahme am Injektionsort nach Spritzen von radioaktiv markiertem Insulin
2. Messung der Insulinkonzentrationsänderung im Blut nach Injektion des Insulins
3. Messung des Verlaufs der Insulinwirkung auf die Blutglukosekonzentration nach Injektion des Insulins

### **1.5.1 Messung der Radioaktivitätsabnahme am Injektionsort**

Diese Messmethode stellt einen direkten Weg zur Messung der Insulinabsorption vom subkutanen Fettgewebe dar. Subkutan injiziertes Insulin wird mit radioaktivem Jod (z.B.  $^{125}\text{I}$ ) markiert [24]. Eine extern gelegene Gamma-Kamera registriert die beim radioaktiven Zerfall emittierte  $\gamma$ -Strahlung des Jods [21-24]. Folglich wird die Radioaktivitätsabnahme gemessen und die Absorptionsrate über die verbliebene Radioaktivität im subkutanen Gewebe berechnet [24].

Diese Methode basiert auf der Annahme, dass sich das markierte Insulinmolekül genauso wie ein nicht-markiertes verhält, und dass Jodid ausschließlich an Insulin gebunden absorbiert wird, da es andernfalls zu falsch hohen Absorptionswerten kommen kann [21,23,24].

### **1.5.2 Messung der Insulinkonzentration im Blut (Pharmakokinetik)**

Die Insulinabsorption hat das Erscheinen des Insulins im Blut bzw. Blutplasma zur Folge, wo seine Konzentration direkt gemessen werden kann [22-24]. Durch die patienteneigene (endogene) Insulinproduktion kann diese Messmethode beeinflusst werden [22,24]. Bekanntermaßen kann ein endogenes von appliziertem Insulin nicht unterschieden werden [23], wodurch falsch hohe Absorptionswerte entstehen können. Um diese Problematik zu eliminieren, können entweder Patienten selektiert werden, welche keine endogene Produktion mehr haben (C-Peptid negative

Patienten) oder der Versuch unternommen werden, deren Produktion zu unterdrücken. Diese Problematik kann außerdem durch die Benutzung von Insulinanaloga, welche nicht im Organismus produziert werden, umgangen werden. Die verwendeten Insulinanaloga können dann mittels geeigneter Messverfahren vom endogen produzierten Insulin (Humaninsulin) unterschieden und selektiv quantifiziert werden. Der Abbau des absorbierten Insulins im Körper (Insulinclearance) ist ein weiterer Einflussfaktor bei dieser Messmethodik. Hauptorte der Insulinclearance sind die Leber, Niere und Muskeln. Bleibt die Insulinclearance über den Messzeitraum konstant, dann hängt der Verlauf der Insulinkonzentration im Blutplasma in erster Linie von der Insulinabsorption im subkutanen Fettgewebe ab, diese wiederum kann von den in Kap. 1.4.1 genannten Faktoren beeinflusst werden [22].

### **1.5.3 Messung der Wirkung des Insulins auf die Blutglukose (Pharmakodynamik)**

Die Insulinabsorption kann außerdem durch die Messung des metabolischen Effektes (Abfall des Glukosespiegels nach der Insulininjektion) abgeschätzt werden [21-24]. Dabei wird Insulin subkutan verabreicht und zur Vermeidung einer Hypoglykämie nach der Insulininjektion werden oral Kohlenhydrate in Form einer standardisierten Menge reiner Glukose (75 g, oraler Glukosetoleranztest - OGTT) oder in Form von standardisiertem kohlenhydrathaltigem Essen gegeben.

Alternativ wird der Glukosespiegel durch eine variable intravenöse Glukoseinfusion auf normalem Niveau gehalten. Die Anpassung der Glukoseinfusionsrate (GIR) erfolgt durch häufige Glukosemessungen aus arterialisiertem Plasma. Hierbei handelt es sich um einen sog. Glukose-Clamp (siehe Kap.1.6.4.) [21-24].

Der dabei entstehende Verlauf der Glukoseinfusionsrate (GIR) repräsentiert die Insulinwirkung auf den Glukosemetabolismus, was konkret die Fähigkeit des Insulins, die Glukoseaufnahme im Körper zu erhöhen und die körpereigene Glukoseproduktion zu unterdrücken, darstellt [21-24].

#### **1.5.4 Glukose-Clamp zur Bestimmung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik des Insulins**

Die Glukose-Clamp-Technik ist die Methode der Wahl zur Quantifizierung der Kinetik und Dynamik des Insulins im Körper und wurde von DeFronzo et al. im Jahre 1970 entwickelt [28].

Das zu untersuchende Insulin wird hierbei intravenös oder subkutan injiziert. Um die Blutglukosekonzentration nach der Insulinverabreichung konstant zu halten, wird eine intravenöse Glukoseinfusion gestartet. Die jeweilige Rate der Glukoseinfusion wird auf Basis häufig gemessener Plasmaglukosewerte eingestellt. Die Plasmaglukosewerte werden mittels Glukosemessgerätes und vorheriger Zentrifugierung der häufig abgenommenen, venösen Blutproben bestimmt. Um eine Arterialisierung der abgenommenen Blutproben zu erreichen, wird die Hand, an der die Blutproben genommen werden, in eine Hot-Box gelegt. Der beobachtete Verlauf der GIR ermöglicht die Bestimmung der Insulinwirkung auf die Glukoseaufnahme und die Unterdrückung der körpereigenen Glukoseproduktion (Pharmakodynamik) [28,29]. Während des Clamps können zusätzlich Blutproben zur Messung der Insulinkonzentration im Plasma entnommen werden [23].

Wenn der während der Clamp-Studie erhaltene Verlauf der Glukoseinfusionsrate mit dem Verlauf der Plasmainsulinkonzentration verglichen wird, enthält man ein komplettes Absorptionsbild des verabreichten Insulins [28,29].

Die Glukose-Clamp-Technik ist aufgrund der hohen Vergleichbarkeit der Resultate die am häufigsten angewandte Methode und entspricht dem Gold-Standard für die Bestimmung der Insulinabsorption [28].

## **1.6 Methoden zur Messung der Insulinkonzentration**

Die Messung der Insulinkonzentration im Plasma findet mittels Immunoassay-Verfahren statt. Das erste Messverfahren war ein Radioimmunoassay und wurde von Solomon Berson und Rosalyn S. Yalow im Jahre 1959 entwickelt. Dafür wurde den Wissenschaftlern im Jahre 1977 der Nobelpreis für Medizin verliehen [30].

Sie erkannten, dass die mit tierischem Insulin behandelten Patienten Antikörper entwickeln, welche spezifisch an Insulin binden und dadurch die Insulinwirkung verhindern. Diese Insulinantikörper wurden für die Entwicklung des ersten Radioimmunoassay (RIA) benutzt [30].

Yalow und Berson entschlossen sich, diese Technik nicht zu patentieren, wodurch eine schnellere Weiterentwicklung des Immunoassay ermöglicht wurde [30].

### **1.6.1 RIA (Radioimmunoassay)**

Prinzipiell basiert diese Methode auf einer kompetitiven Bindung des nativen Insulins aus der Plasmaprobe und eines radioaktiv-markierten Insulins (z.B.  $^{131}\text{I}$ -Insulin) an einem für Insulin hochspezifischen Antikörpers.

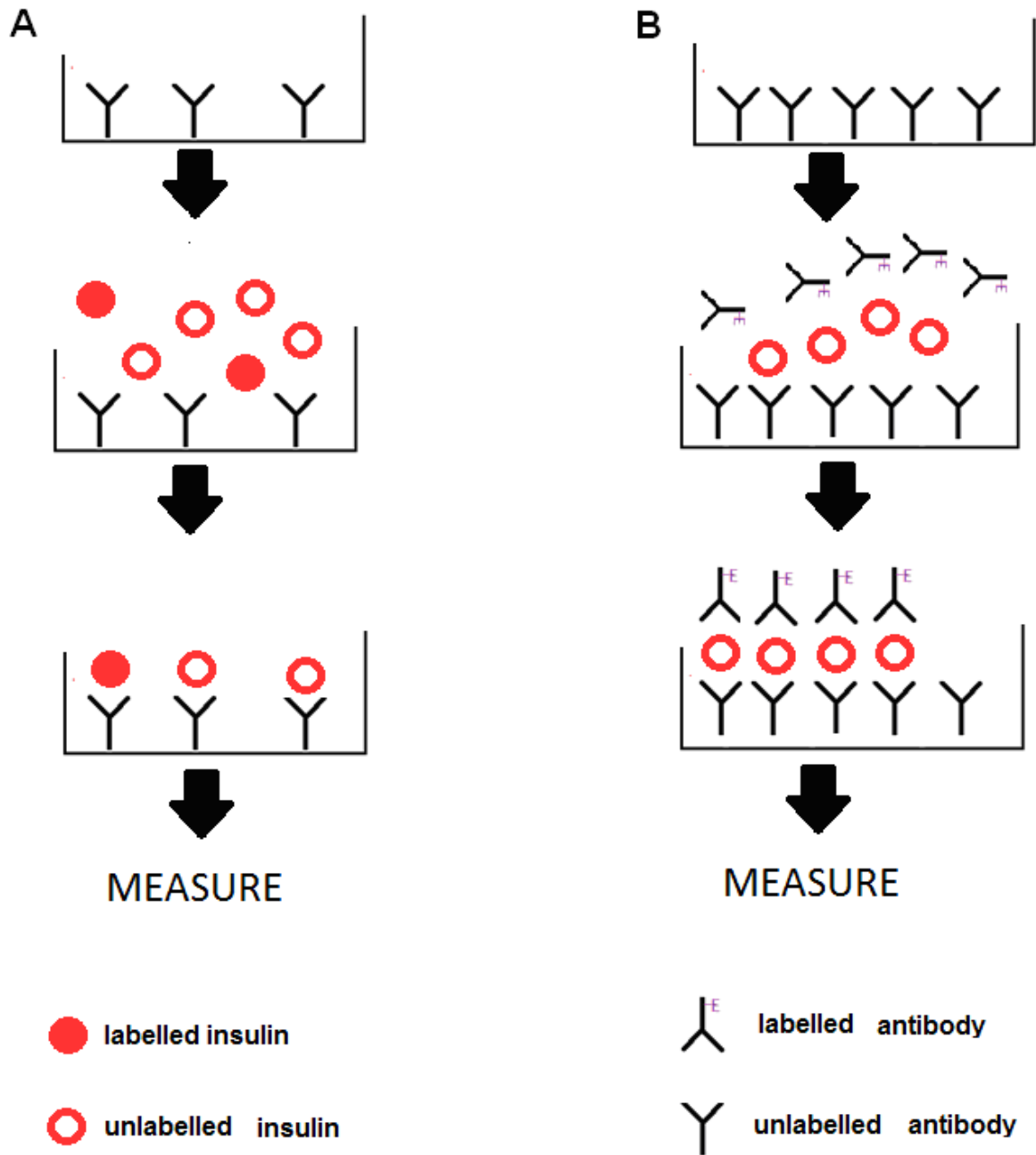
Sowohl die Anzahl der Antikörper als auch die Menge des radioaktiv markierten Insulins sind bekannt und begrenzt.

Für die Messung wird das native Insulin, das radioaktiv-markierte Insulin und die Antikörper zusammengebracht. Während einer Inkubation binden die Insuline an den Antikörpern, wodurch Insulinkomplexe (Antigen-Antikörper-Antigen Komplexe) entstehen (Abb.9A). Danach wird das nicht gebundene Insulin entfernt und die Radioaktivität der Immunokomplexe gemessen. Aus der Radioaktivitätsmessung für Standardproben und Plasmaproben kann dann die Konzentration des nativen Insulins der Plasmaproben bestimmt werden. [30,31,32].

### **1.6.2 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)**

Nicht-radioaktive Immunoassays zur Messung der Insulinkonzentration wurde im Jahr 1972 von Rubenstein et al. entwickelt [30].

Diese sogenannte Enzyme Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) basieren auf einer Sandwich-Technik, bei welcher zwei Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen (hier Insulin) gerichtet sind, wobei sie an unterschiedlichen Stellen des Antigens binden, sodass sie sich gegenseitig nicht behindern. Einer von den zwei Antikörpern ist an den Wänden einer Mikrotiterplatte gebunden. Der andere während der Messung hinzugefügte, ist enzymatisch markiert. Die Konzentration beider Antikörper ist genau definiert und begrenzt. Zur Messung wird das native Insulin der Plasmaproben und der zweite Antikörper in die Wannern der Mikrotiterplatte gegeben. Während einer Inkubation bindet das native Insulin an den Antikörpern, wodurch ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex entsteht (Abb.9B). Danach wird die Platte gewaschen um die nicht-gebundenen, enzymatische-markierten Antikörpern zu entfernen [32]. Um die entstandenen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe messen zu können, wird ein Tetramethylbenzidin-Substrat (TMB) hinzugefügt. Während einer nachfolgenden Inkubation reagiert das Enzym mit dem TMB-Substrat, wodurch eine Färbung der Komplexe entsteht. Somit werden die Komplexe sichtbar gemacht und können spektrometrisch bei 450 nm abgelesen werden. Die gemessenen Werte bzw. Komplexe sind proportional zur Konzentration des nativen Insulins aus der Plasmaprobe. [31].



**Abbildung 9: Methoden-Prinzipien der Messung der Insulinkonzentration im Blut [nach 31]. A: Prinzip des Radioimmunoassays. B: Prinzip des ELISAs.**

## **1.7 Entwicklungsansätze zur Verbesserung der Therapie**

Zur Verbesserung der Lebensqualität und der Stoffwechsellage von Diabetikern sowie zur Verminderung der chronischen Folgeerkrankungen müssen neue Therapien entwickelt werden. Vielversprechend ist hierbei die Entwicklung neuer Insuline und neuer Methoden zur Verabreichung des Insulins.

### **1.7.1 Modifikation des Insulinmoleküls (Insulinpräparate)**

Insulinhersteller versuchen, neue lang- und kurzwirksame Insuline zu entwickeln, welche die endogene Insulinsekretion besser imitieren können.

#### **ULTRA-LANGWIRKSAME INSULINE**

Die Wirkungsdauer heutiger langwirksamer Insuline ist noch immer zu kurz, so dass die Patienten mehrmals täglich ein langwirksames Insulin injizieren müssen. Die Insulinhersteller versuchen deshalb, Insuline zu entwickeln, die über mehrere Tage wirken. Hierbei wird durch gentechnologische Verfahren oder durch Beimengung von Zusatzstoffen (Zink, Protamin) versucht, eine langsamere und gleichmäßigere Absorption zu bewirken.

#### *Insulin-Degludec*

Das Insulin Degludec ist ein neu entwickeltes ultra-langwirksames Insulin. Bei diesem wurde durch ein gentechnologisches Verfahren die Struktur von Humaninsulin derart verändert, dass sich nach der subkutanen Injektion Multi-Hexamere bilden, die langsamer zu Monomeren dissoziieren [16,58]. Die Wirkung von Degludec hält länger als 42 Stunden an [58]. Dieses Medikament ist seit November 2012 von der „Food and Drug Administration“ in USA zugelassen [58]. In Europa erfolgte die Marktzulassung im Januar 2013 [58].

#### **ULTRA-SCHNELLE INSULINE**

Derzeitige schnellwirksame Insuline dissoziieren noch immer zu langsam zu Monomeren, wodurch sie auch zu langsam absorbiert werden und zu langsam ihre

volle Wirkung entfalten. Neue ultraschnelle-Insuline würden die physiologische Insulinsekretion beim Gesunden besser imitieren.

### *Linjeta (VIAject®)*

Linjeta ist ein neues ultra-schnellwirkendes Insulin. Es ist ein neues Präparat eines rekombinanten Humaninsulins, das schneller absorbiert wird als schnell wirksamen Insulinanaloga [16,59]. Die schnellere Absorption wurde durch Beimengung spezieller Zusatzstoffe erreicht [59]. Dieses Medikament ist derzeit noch nicht zugelassen [16,59].

## **1.7.2 Neue Methoden der Verabreichung des Insulins**

Heutzutage wird an diversen alternativen Insulinapplikationswegen geforscht. Bei den derzeit verfügbaren Insulinapplikationsmethoden, wie Insulininjektion mit Insulinpen und Insulininfusion mit Insulinkanüle und Insulinpumpe, ist das Einstechen von Insulinpen und Insulinkanüle in das Fettgewebe mit Schmerzen verbunden. Zudem wird das eingebrachte Insulin zu langsam absorbiert. Aufgrund dessen versucht man Verabreichungsformen zu entwickeln, bei denen das Insulin schneller absorbiert wird, schneller wirkt und die Insulinapplikation schmerzfreier für die Patienten ist.

### **1.7.2.1 Alternative Orte der Applikation**

#### *Intraperitoneale Insulingabe*

Hierbei handelt es sich um ein invasives System der Insulingabe. Hierbei wird unter Vollnarkose über die Bauchwand ein Katheter in den intraperitonealen Raum gelegt. Das an der Bauchwand gelegene Katheterende wird mit einer Insulinpumpe verbunden, die entweder subkutan implantiert (Abb.10A) oder extern getragen wird. Das andere Katheterende reicht bis zur Pfortader, wodurch Insulin schneller als bei einer subkutanen Gabe absorbiert wird und die endogene Insulinsekretion besser nachgeahmt werden kann. Dieser Weg der Insulingabe ist aber mit vielen Komplikationen wie Infektionen, Risiken einer Operation, Katheterverstopfung und Katheterdislokation verbunden [33,34,35]. Diese Art der Insulinzufuhr ist deshalb nur bei relativ wenigen Patienten zur Anwendung gekommen.

### *Orale Insulingabe*

Orale Insulingabe stellt eine attraktive Insulintherapie dar. Hierbei wird das Insulin in Form von Tabletten aufgenommen. Wenn Insulinmoleküle in ungeschützter Form oral aufgenommen werden, werden sie leicht durch körpereigene Verdauungsenzyme in Magen und Dünndarm abgebaut. Eine weitere Schwierigkeit stellt die Absorption des Insulins durch das Darmepithel dar. Es wird versucht, das Insulin durch verschiedene Methoden vor dem Abbau zu schützen. Dies wird beispielsweise mit Einsatz der Nanotechnologie erreicht, wobei die als die Insulinträger benutzten Nano-Teilchen aus natürlich vorkommenden Polymeren bestehen. Solch ein Insulinanalogon ist *IN-105*. Es wird von der Firma Biocon hergestellt. Die Studien der Phase 1 und Phase 2 dieses Insulins waren vielversprechend. Derzeit befindet sich das Insulin in der Phase 3 [16].

### *Bukkale/sublinguale Insulingabe*

Die Mundschleimhaut stellt ebenso einen attraktiven Ort der Insulingabe dar, da sie leicht erreichbar und gut durchblutet ist [4]. Allerdings stellen die permanente Salivation und das relativ dicke und mehrschichtige Plattenepithel der Mundschleimhaut eine Barriere dar [4,16]. *Oralin (Ora-Lyn)* ist eine flüssige Form des Humaninsulins, die als Spray verabreicht wird [4,16]. Die Studien dieses Insulins befinden sich derzeit in der Phase 2 [4,16].

### *Rektale Insulingabe:*

Hierbei wird Insulin in Form von Kapseln rektal eingeführt. Die Insulinabsorption ist allerdings gering und inkonstant. Zudem stößt diese Form der Insulingabe auf geringe Akzeptanz unter den Patienten [4].

### *Intranasale Insulingabe*

Ein weiterer potentieller Ort der Insulingabe ist die Nasenschleimhaut. Die nasale Mukosa ist leicht erreichbar, gut vaskularisiert und hat eine relativ große Absorptionsfläche. Hindernisse wie beispielsweise Enzyme, der mukoziliäre Transport sowie die niedrige Permeabilität der Mukosa stellen lokale Barrieren dar, so dass die Bioverfügbarkeit von Insulin sehr niedrig ist [4].

### *Pulmonale Insulingabe:*

Da die Lunge eine sehr große Resorptionsoberfläche hat, sehr gut durchblutet ist und praktisch keine Abtransportmöglichkeiten (minimaler mukoziliärer Transport) hat, stellt sie einen vorteilhaften Ort der Insulingabe dar [4,16]. Trotzdem ist es schwierig, ausreichende Mengen von Insulin zu den Alveolen zu transportieren [4]. Dieser Transportvorgang hängt von der Partikelgröße ab, da die größeren Partikel des Öfteren in der tracheobronchialen Region verbleiben [4]. Zu den weiteren Faktoren, die den Vorgang beeinflussen, zählen Nikotinkonsum, Asthma und obstruktive Lungenerkrankungen [4]. Diese Insulinprodukte werden entweder in Puderform oder in Form einer Lösungsmittels per Inhalator verabreicht [4]. Mit *Exubera*, einem schnellwirkenden Insulin in Puderform, sowie mit *AIR*-Insulin von der Firma Eli Lilly wurden klinische Studien durchgeführt, die aufgrund fehlender Vorteile bezüglich Pharmakokinetik und Pharmakodynamik im Vergleich mit schnellwirkenden Insulinanaloga unterbrochen wurden [60]. Das einzige inhalative Insulin, das noch in klinischer Entwicklung ist, ist *TI (Technosphere Insulin)* von der Firma MannKind [60].

### **1.7.2.2 Modifizierte subkutane Verabreichungsformen**

#### *Jet-Injektion*

Hierbei handelt es sich um eine nadelfreie Alternative das Insulin subkutan zu verabreichen. Mithilfe eines Jet-Injektors („*Insujet*“) wird Insulin mit einer großen Geschwindigkeit durch die Haut verabreicht, so dass es sich in einem größeren Volumen im Gewebe verteilt (Abb.10B). Da es dabei mit einer höheren Anzahl von Kapillaren in Kontakt kommt, als bei der herkömmlichen Insulininjektion mit Insulinspritze und Insulinpumpe, führt die Insulinverabreichung mit Jet-Injektor zur schnelleren Insulin-Absorption als bei der Verabreichung mit Insulinpumpe und Insulinspritze [36]. Da die derzeitigen Jet-Injektor-Geräte noch groß und unpraktisch sind, wird diese Form der Insulinverabreichung nur von wenigen Patienten genützt.

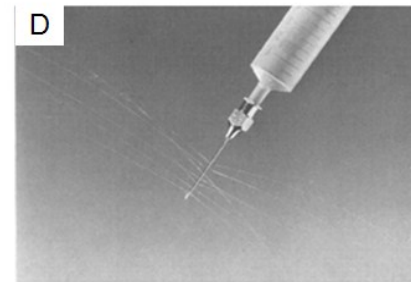
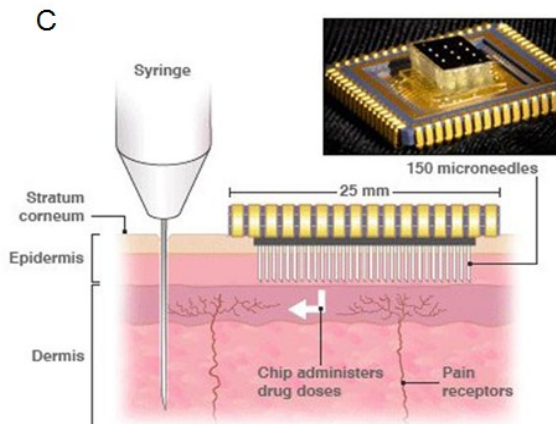
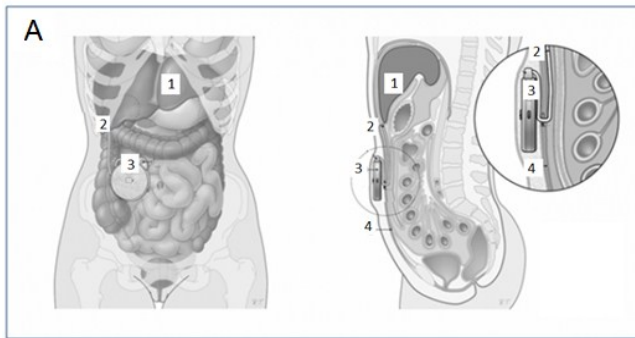
#### *Microneedle*

Die Microneedle ist eine minimal-invasive transdermale Methode [16,37], um Insulin zu verabreichen. Hier sind 200-300 mit Insulin geladene Mikronadeln auf einem Chip angebracht [38]. Dadurch wird der Verteilungsraum des verabreichten

Insulins vergrößert. Die Mikronadeln können die oberste Hautschicht passieren, erreichen aber keine Nerven, so dass die Verabreichung mit dieser Methode schmerzfrei ist (Abb.10C) [16,37]. Das Insulin wird hierbei in der Epidermis abgegeben [16]. Nachteilig ist jedoch die Tatsache, dass die Nadeln durch das dicke Gewebe verstopfen, brechen und knicken können [37]. Diese Microneedles sind derzeit noch nicht zugelassen [16,37,38].

### *Sprinkler Needle*

Die Sprinkler Needle besitzt die Form einer herkömmlichen Nadel zur Insulinapplikation, hat aber mehrere kleine Löcher an der Nadelwand und eine Abdichtung an der Nadelspitze (Abb.10D). Mit der Sprinkler Needle wird das Insulin besser im Gewebe verteilt, so dass es mit einer höheren Anzahl an Kapillaren in Kontakt treten kann, als bei der Verabreichung mit Insulinpen und Insulinspritze. Diesbezügliche Studien haben auch gezeigt, dass zugeführtes Insulin mit Sprinkler Needles schneller absorbiert werden kann, als mit den herkömmlichen Insulinapplikationsmethoden [39]. Derzeit befinden sich noch keine zugelassenen Sprinkler Needles am Markt.

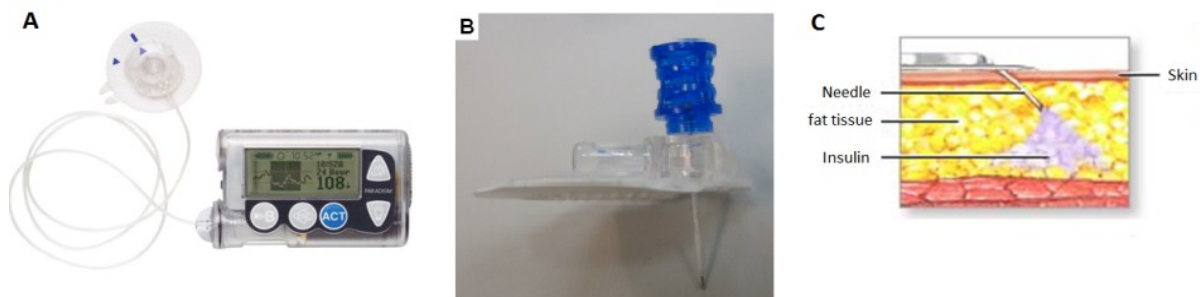


**Abbildung 10**

**A:** Intraperitoneale Insulingabe. 1: Leber, 2: Katheterspitze, 3: Insulinpumpe, 4: Musculus rectus abdominis [63]; **B:** Unterschied der Insulinverteilung im subkutanen Gewebe zwischen den Insulinpen und der Jet Injektion [64]; **C:** Einbringtiefe des Insulins mit Microneedles im Vergleich zu einer konventionellen subkutanen Nadel [65]; **D:** Sprinkler Needle [39].

## 1.8 Insulingabe mit Insulinkanüle und Insulinpumpe – Benutzung unterschiedlicher Boluslängen

Eine häufig verwendete Art der Verabreichung des Insulins ist die mit Insulinpumpe und einer dazu getragenen Insulinkanüle. Hierbei wird das Insulin über einen dünnen Schlauch und einer im subkutanen Fettgewebe liegenden Kanüle in den Körper gepumpt (Abb.11). Die Insulininfusionskanüle wird in das subkutane Fettgewebe mittels einer Nadel eingebracht und muss ungefähr alle drei Tage ausgewechselt werden [18-20].



**Abbildung 11: Insulinpumpenaufbau.**

**A:** Pumpe mit dünnen Verbindungsschlauch und Insulinkanüle (Katheter) [66]. **B:** Insulinkanüle mit Einstech-Nadel. **C:** Querschnitt durch die Haut bei eingesetzter Kanüle [67].

Eine Insulinpumpe bietet die Möglichkeit, das Insulin vor den Mahlzeiten mit höheren Raten (Bolus) und zwischen Mahlzeiten und während der Nacht mit niedrigeren Raten (Basalrate) abzugeben. Der Insulinbolus wird gewöhnlich über eine relativ kurze Zeit (Boluslänge) abgegeben [18-20]. Die Boluslänge hängt dabei von der vom Patienten ausgewählten Bolusmenge und vom Insulinpumpenmodell ab. Beispielsweise gibt die Insulinpumpe der Firma *Animas* 1 IE in 2 Sekunden ab [40]; dies bedeutet, dass diese Pumpe eine typische Bolusmenge von 10-20 IE mit einer Dauer von weniger als einer Minute abgibt. Andere Pumpenmodelle, wie die der Firma *Medtronic-Minimed*, *Insulet* und *Medingo*, geben 1 IE in 40 Sekunden ab [40]. Um eine Bolusmenge von 10-20 IE abzugeben, benötigen diese Pumpenmodelle daher 7-14 Minuten.

In einer von Chisholm et al. [41] durchgeführten Studie wurde Insulin vom Schwein (porcines Insulin) in einer Menge von 10 IE einmal über 5 Minuten und einmal über

30 Minuten subkutan verabreicht. Dabei wurde festgestellt, dass das über 5 Minuten abgegebene Insulin einen viel schnelleren Anstieg der Insulinkonzentration im Blut bewirkte, als das über 30 Minuten abgegebene [41].

Von diesen Ergebnissen ausgehend, ist es denkbar, dass das mit kurzer Boluslänge abgegebene Insulin schneller absorbiert wird, als das mit längerer Boluslänge verabreichte Insulin.

Nach unserem besten Wissen wurden bisher keine Studien durchgeführt, die die Bolusgabe mit heutigen schnell wirksamen Insulinen und mit der bei heutigen Pumpen angewendeten Boluslängen untersucht haben.

Im Rahmen des EU-Projektes *AP@home* wurde deshalb bei Typ 1-Diabetespatienten eine Studie durchgeführt, die die Pharmakodynamik und Pharmakokinetik von schnell wirkendem Insulin nach subkutaner Gabe mit Insulinpumpen unterschiedlicher Boluslängen untersucht hat.

Die vorliegende Diplomarbeit wurde im Rahmen dieses EU-Projektes erstellt und beschäftigt sich mit der Pharmakokinetik von schnell wirksamen Insulinen die in Form eines Bolus unterschiedlicher Boluslängen verabreicht wurden.

## **1.9 Ziel der Diplomarbeit**

Das Ziel der Diplomarbeit war es, die Auswirkung unterschiedlich ausgewählter Boluslängen auf die Pharmakokinetik von subkutan verabreichtem, schnell wirksamen Insulin zu bestimmen.

Hierfür wurden Glukoseclamp-Experimente bei Typ 1-Diabetikern durchgeführt, bei denen nach der Gabe von subkutanem Insulin mit unterschiedlichen Boluslängen, Plasmaproben abgenommen wurden.

Zur Bestimmung der Pharmakokinetik mussten innerhalb dieser Diplomarbeit folgende Arbeiten durchgeführt werden:

**A:** Etablierung der Messmethoden für das subkutan verabreichte, schnellwirksame Insulin-Lispro und das intravenös verabreichte Humaninsulin. Hierbei wurden zwei enzymatische, zweiseitige Immunoassays (ELISAs) angewendet.

**B:** Bestimmung der Konzentrationen dieser beiden Insuline in den während der Glucoseclamp-Untersuchungen bei den Typ 1-Diabetespatienten abgenommenen Plasmaproben.

**C:** Statistische Auswertung und Zusammenfassung der erhaltenen Insulinkonzentrationsdaten und deren graphische Darstellung.

## **2 Material und Methoden**

Um die Auswirkungen unterschiedlicher Boluslängen auf die Pharmakokinetik schnell wirksamen Insulins zu bestimmen, wurden Clamp-Experimente bei 20 Typ 1-Diabetikern durchgeführt. Im Folgenden wird das Protokoll dieser Clamp-Experimente genau beschrieben.

### ***2.1 Studienprotokoll***

#### ***2.1.1 Ablauf der klinischen Studie***

Diese Studie wurde am Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (ZMF) der Medizinischen Universität Graz durchgeführt. Eingeschlossen wurden 20 Personen mit Typ 1-Diabetes, die entweder durch tägliche subkutane Injektionen oder kontinuierliche subkutane Insulininfusionen behandelt wurden. Es handelte sich hierbei um eine monozentrische, randomisierte, kontrollierte Cross-over Studie, die aus einer Einschlussuntersuchung, zwei Clampvisiten (Studienvisiten) und einer Nachuntersuchung bestand.

In der Studie wurden die Pharmokodynamik und Pharmakokinetik des subkutan verabreichten Insulin-Lispro (Eli Lilly Nederland BV, RA Houten, Netherlands) getestet. Dies erfolgte im Rahmen zweier achtstündiger Glukose-Clamp-Untersuchungen, die jeweils an zwei separaten Tagen durchgeführt wurden.

An jedem Studientag erhielt der Teilnehmer einmalig einen Bolus von 15 IE Insulin-Lispro. Diese wurden entweder als schneller Bolus über 30 Sekunden mit einer Animas IR2020 Pumpe (Animas Corp., West Chester, PA, USA) oder als langsamer Bolus über 10 Minuten unter Benutzung einer Medtronic Minimed Paradigm 512 Pumpe (Medtronic Minimed, Northridge, CA, USA) subkutan abgegeben. Die Zuordnung der Reihenfolge der Boluslängen erfolgte randomisiert. Nach der Bolusgabe wurde der Blutzuckerspiegel mit einer variablen Glukoseinfusion konstant im Normbereich gehalten (Glukose-Clamp). Um vor der jeweiligen subkutanen Bolusgabe Normglukosewerte zu erreichen, wurde davor

Humaninsulin intravenös (Actrapid; Novo Nordisk, Bagsvaerd, Denmark) verabreicht (Abb.12).

### **2.1.2 Einschlussuntersuchung**

Eine Einschlussuntersuchung erfolgte, um festzustellen, ob die Probanden für diese Studie geeignet sind. Am Anfang wurde der Ablauf der Studie detailliert erklärt und die Fragen der Studienteilnehmer beantwortet. Das Einverständnis der Probanden erfolgte schriftlich durch dessen Unterschrift. Anschließend wurden die Probanden körperlich untersucht (inklusive Blutdruck-, Herzfrequenz- und Körpertemperaturmessung sowie EKG). Des Weiteren wurde ein Alkoholtest durchgeführt sowie bei gebärfähigen Frauen ein Schwangerschaftstest. Zudem wurde eine Blutabnahme und Harnanalyse durchgeführt, um studienrelevante Blutchemiewerte (C-Peptid, HbA1c, Hepatitis B und C, HIV usw.) zu bestimmen. Nach der Auswertung der Ergebnisse der Einschlussuntersuchung und der Erfüllung der Einschlusskriterien, sowie Abwesenheit der Ausschlusskriterien wurden die Probanden zur Teilnahme an der Studie eingeladen.

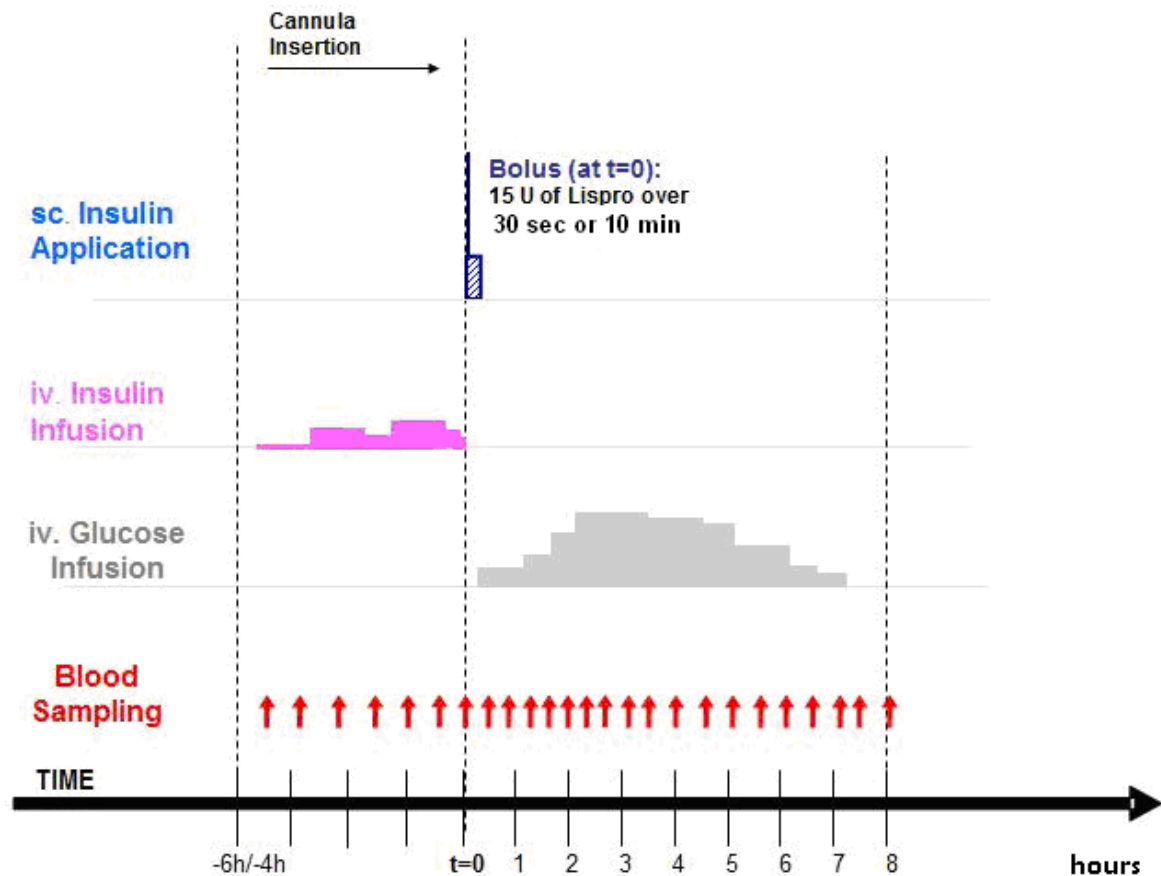
Die Einschlusskriterien waren:

Das Alter der Probanden sollte zwischen 18-60 Jahre sein, wobei beide Geschlechter zugelassen waren. Erforderlich war eine Behandlung mit täglichen subkutanen Injektionen oder eine seit 12 Monaten laufende Insulinpumpentherapie. Die Grenzwerte für den Einschluss waren beim Nüchtern-C-Peptid  $<0.03$  nmol/l, beim HbA1c Wert  $<10\%$  und beim Body Mass Index (BMI) zwischen  $20-30$  kg/m<sup>2</sup>.

Die Ausschlusskriterien waren:

Probanden mit bestehender akuter oder weiterer chronischer Erkrankungen, sowie mit bereits vorhandener Hautveränderung, die eine Insulininjektion verhindern könnte, wurden nicht eingeschlossen. Weiters wurden Patienten, die bereits Insulin-Lispro länger als zwei Wochen verwendet hatten, sowie Schwangere und stillende Frauen, ausgeschlossen. Die Einnahme eines oder mehrerer der folgenden Medikamente stellte ebenso ein Ausschlusskriterium dar: Kortikosteroide, Monoamino-Oxidase-Hemmer (MAO-Hemmer), nicht selektive Beta-Blocker, Wachstumshormone, pflanzliche Produkte, nicht routinemäßig verabreichte Vitamine und Schilddrüsenhormone, die nicht über die letzten 3 Monate in einer stabilen Dosis eingenommen wurden. Probanden mit einer positiven Anamnese von

Alkohol- oder anderem Drogenabusus, Rauchern mit einem Konsum von > fünf Zigaretten pro Tag und Teilnehmern anderer Studien war eine Teilnahme an dieser Studie nicht erlaubt. Zudem wurden Probanden mit positiver Blutungsanamnese und Lipodystrophie ausgeschlossen.



**Abbildung 12: Studienprotokoll.**

Studienprotokoll zur Untersuchung der Pharmakokinetik und Pharmakodynamik von schnell wirksamen Insulin, abgegeben als subkutaner Bolus mit verschiedenen Boluslängen. In der Zeitperiode von -6h/-4h bis 0 Minuten wurde Humaninsulin intravenös infundiert, um Normglukosewerte zu erhalten. Zehn Minuten vor der subkutanen Bolusgabe von Insulin-Lispro wurde die Humaninsulininfusion stufenweise erniedrigt und beim Zeitpunkt 0 Minuten gestoppt. Zum Zeitpunkt 0 Minuten wurde dann Insulin-Lispro als ein subkutaner Bolus von 15 IE Insulin-Lispro entweder als schneller Bolus über 30 Sekunden mit einer Animas Pumpe oder als langsamer Bolus über 10 Minuten unter Benutzung einer Medtronic Minimed Pumpe abgegeben. Nach der Bolusabgabe wurde mit einer intravenösen Glukoseinfusion gestartet, um die Glukose auf dem Wert von 100 mg/dl zu halten. Außerdem wurden alle 3 bis 20 Minuten Blutabnahmen durchgeföhrt, um die Glukose- und Insulinkonzentration zu messen.

Die Probanden durften 24 Stunden vor den beiden Clampvisiten keine schwere körperliche Arbeit betreiben und sollten jeglichen Alkoholkonsum und Unterzuckerungen meiden. Sie sollten am Studientag nüchtern erscheinen, dies

bedeutet keine Nahrungs- oder Getränkeaufnahme außer Wasser später als 22 Uhr des Vorabends der Studienvisite.

Essentiell war zudem, dass ab 43 Stunden vor der Clampvisite keine Injektionen eines lang wirksamen Insulins (Insulin-Glargine, Insulin-Determir), sowie ab 19 Stunden vor der Clampvisite keine Injektionen von NPH-Insulin und zwischen 22 und drei Uhr nachts vor der Clampuntersuchung keine Injektionen von schnell wirksamen oder kurz wirksamen Insulin mehr durchgeführt wurden.

### **2.1.3 Erste Clampvisite**

Am Tag der ersten Clampvisite kamen die Probanden nüchtern um sieben Uhr morgens in das Studienzentrum.

Zu Beginn wurde dem Probanden je eine intravenöse Leitung in jeden Arm gelegt, von denen eine für Blutabnahmen, aus denen die Glukose- und Insulinspiegel gemessen wurden, verwendet wurde. Die zweite Leitung wurde zur Infusion von Humaninsulin, Glukose- und Kochsalzlösung verwendet. Jener Unterarm, in dem die Leitung für die Blutabnahmen lag, wurde, um die Abnahme von arterialisiertem Venenblut während des Versuches zu ermöglichen, in einem Plexiglas-Behälter (sogenannte „Hot-Box“), in dem eine Temperatur von ungefähr 50 °C herrscht, gelagert.

Anschließend wurde die intravenöse Insulininfusion mit Humaninsulin mittels einer Spritzenpumpe (*Perfusor fm; B. Braun, Melsungen, Germany*) gestartet. Die Insulininfusionsrate basierte auf den Plasmaglukosewerten, die in regelmäßigen Abständen gemessen wurden (*Super GL 2; Dr. Müller Gerätebau GmbH, Freital, Germany*). Diese intravenöse Insulininfusion wurde bei zehn Minuten auf 75% und bei fünf Minuten vor  $t=0$  auf 50% der ursprünglichen Infusionsrate gesenkt. Kurz vor der s.c. Bolusgabe von Insulin-Lispro wurde sie jedoch abgeschaltet.

Nachdem sich der Glukosespiegel länger als eine Stunde auf einem stabilen Wert befunden hatte, wurde eine halbe Stunde vor dem s.c. Bolus ein s.c. Infusionsset (*Quick-set; Medtronic Minimed, Northridge, CA, USA*) gesetzt. Beim Zeitpunkt  $t=0$  wurde ein Bolus von 15 IE des Insulin-Lispro mithilfe einer Insulinpumpe über das s.c. Infusionsset in das Unterhautgewebe der Bauchregion verabreicht. Je nach Randomisierung wurde ein langsamer Bolus über zehn Minuten mit einer *Medtronic*

*Minimed Paradigm 512* Pumpe oder ein schneller Bolus über 30 Sekunden mit einer *Animas IR 2020* Pumpe abgegeben (Abb.12).

Um für den Zeitraum der Clamp-Untersuchung den Glukosespiegel konstant auf dem Zielwert zu halten, wurde nach der Bolusgabe, sobald der Blutzuckerwert 5 mg/dl unter den basalen Wert (etwa 100 mg/dl) gesunken war, eine variable Glukoseinfusion (*Glucosteril 10%; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany*) gestartet. Die Glukoseinfusionsrate basierte auf den Blutzuckerwerten, die regelmäßig gemessen wurden.

Die Clamp-Untersuchung dauerte in der Regel 8 Stunden lang, wurde aber vorzeitig beendet, sobald der Blutzuckerspiegel ohne Glukoseinfusion für einen Zeitraum von 30 Minuten konstant über 200 mg/dl lag.

Zwischen der ersten und zweiten Clampvisite lag ein Zeitraum von mindestens sieben Tagen.

#### **2.1.4 Zweite Clampvisite**

Der Ablauf der zweiten Clampvisite war mit dem der ersten identisch. Der Insulinbolus wurde diesmal auf die bisher nicht verwendete Art verabreicht. Das bedeutet, je nach Randomisierung des ersten Durchgangs wurde dem Probanden Insulin-Lispro nun umgekehrt dazu mittels langem oder kurzem Bolus verabreicht.

#### **2.1.5 Nachuntersuchung**

Nach den beiden Clampvisiten kamen die Probanden zu dieser Visite ebenfalls nüchtern. Es wurde der Gesundheitszustand sowie eventuell aufgetretene unerwünschte Wirkungen erfasst. Ebenso wurden eine körperliche Untersuchung, ein EKG, eine Blutabnahme und eine Harnanalyse durchgeführt. Bei gebärfähigen Frauen wurde zusätzlich erneut ein Schwangerschaftstest durchgeführt. Nach dem Abschluss dieser Untersuchung war die Teilnahme an der Studie für die Probanden beendet.

## **2.2 Messung der Plasmakonzentrationen des humanen und schnell wirksamen Insulins**

In den in der Studie gewonnenen Plasmaproben wurden die Konzentrationen des Gesamtinsulins (Insulin Lispro und Humaninsulin) und des Humaninsulins bestimmt. Hierzu wurden zwei zweiseitige, enzymatische Immunoassays der Firma *Mercodia* verwendet.

### **2.2.1 Validierung der Messung der Humaninsulin- und Insulin-Lispro-Konzentration**

Es existiert derzeit kein Immunoassay, der die Insulin-Lispro-Konzentration separat messen könnte. Daher wurde eine Messmethode von Lindström et al. [43], die aus der Bestimmung der Humaninsulinkonzentration und Gesamtinsulinkonzentration bestand, angewandt. Diese Messmethode wurde zunächst validiert. Die Konzentration von Humaninsulin wurde mit einem *Insulin-ELISA-Kit* von *Mercodia AB* (Uppsala, Sweden) und die Gesamt-Insulinkonzentration mit dem *Iso-Insulin-ELISA Kit* von *Mercodia AB* (Uppsala, Sweden) gemessen.

#### **2.2.1.1 Prüfung auf Kreuzreaktivitäten**

In der Veröffentlichung von Lindström et al. [43] wurde gezeigt, dass der *Iso-Insulin-ELISA* das Humaninsulin und das Insulin-Lispro mit der selben Sensitivität misst. Der *Insulin-ELISA* hingegen, ist im hohen Maße selektiv für das Humaninsulin. Auch bei sehr hohen Konzentrationen wurde für Insulin-Lispro keine Kreuzreaktion nachgewiesen [43].

Um die Kreuzreaktivität bei dieser Messmethode nachzuprüfen, wurden, ähnlich wie in der Veröffentlichung von Lindström et al., Insulin-Lispro und Humaninsulin in einer Elomel-Pufferlösung mit 1% Albumin auf die Konzentrationen von 600 pmol/l, 420 pmol/l, 180 pmol/l, 60 pmol/l, 18 pmol/l, und 0 pmol/l verdünnt. Danach wurden diese Standards und zusätzlich die Original-Kit-Standards, jeweils mit dem Iso-Insulin-ELISA-Kit und dem Insulin-ELISA-Kit gemessen. Die Zusammensetzung und Herstellung dieser Standards ist in den nachfolgenden Tabellen (Tab.1 und Tab.2) dargestellt.

**Tabelle 1: Insulin-Lispro Standards**

<b>Ausgangslösungen</b>	<b>Inhaltsstoffe bzw. Herstellung</b>
ELO-MEL-Isoton Infusionslösung (Elomel-Pufferlösung) 500ml	Hersteller: Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland Inhaltsstoffe: Na <sup>+</sup> 140 mmol/l K <sup>+</sup> 5 mmol/l Ca <sup>2+</sup> 2.5 mmol/l Mg <sup>2+</sup> 1.5 mmol/l Cl <sup>-</sup> 108 mmol/l
Albunorm 200 g/l	Hersteller: Octapharma, Wien , Austria Inhaltsstoff: HSA (Human-Serum-Albumin) 20% 5 g HSA (Human-Serum-Albumin) in 500 ml Elomel-Pufferlösung aufgelöst; entspricht 1% HSA-Elomel-Pufferlösung.
Insulin-Lispro-Lösung (Humalog®) 100 U/ml	Hersteller: Eli Lilly, RA Houten, Niederlande
<b>Insulin-Lispro Standards</b>	<b>Art und Weise der Beimengung</b>
Insulin-Lispro-Verdünnung	Im ersten Verdünnungsschritt wurden 50 U (500 µl) von Insulin-Lispro-Lösung in 50 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert, um eine Konzentration von 1000 U/l zu erhalten. Im zweiten Verdünnungsschritt wurden von oben erhaltener Lösung 500 µl in 50 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert und somit eine Konzentration von 10 U/l erreicht.
Insulin-Lispro 600 pmol/l-Standard	Insulin-Lispro wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 100 µl in 10 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.
Insulin-Lispro 420 pmol/l-Standard	Insulin-Lispro wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 70 µl in 10 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.
Insulin-Lispro 180 pmol/l-Standard	Insulin-Lispro wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 30 µl in 10 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.
Insulin-Lispro 60 pmol/l-Standard	Insulin-Lispro wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 10 µl in 10 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.
Insulin-Lispro 18 pmol/l-Standard	Insulin-Lispro wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 15 µl in 50 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.

**Tabelle 2: Humaninsulin Standards**

<b>Ausgangslösungen</b>	<b>Inhaltsstoffe bzw. Herstellung</b>
ELO-MEL-Isoton Infusionslösung (Elomel-Pufferlösung) 500ml	Hersteller: Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland Inhaltsstoffe: Na <sup>+</sup> 140 mmol/l K <sup>+</sup> 5 mmol/l Ca <sup>2+</sup> 2.5 mmol/l Mg <sup>2+</sup> 1.5 mmol/l Cl <sup>-</sup> 108 mmol/l
Albunorm 200 g/l	Hersteller: Octapharma, Wien , Austria Inhaltsstoff: HSA (Human-Serum-Albumin) 20% 5 g HSA (Human-Serum-Albumin) in 500 ml Elomel-Pufferlösung aufgelöst; entspricht 1% HSA-Elomel-Pufferlösung.
Humaninsulin (Actrapid®) 100 U/ml	Hersteller: Novo Nordisk, Bagsvaerd, Dänemark
<b>Humaninsulin-Standards</b>	<b>Art und Weise der Beimengung</b>
Humaninsulin Verdünnung	Im ersten Verdünnungsschritt wurden 50 U (500 µl) von Humaninsulin-Lösung in 50 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert, um eine Konzentration von 1000 U/l zu erhalten. Im zweiten Verdünnungsschritt wurden von oben erhaltener Lösung 500 mU (500 µl) in 50 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert und somit eine Konzentration von 10 U/l erreicht.
Humaninsulin 600 pmol/l-Standard	Humaninsulin wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 100 µl in 10 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.
Humaninsulin 420 pmol/l-Standard	Humaninsulin wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 70 µl in 10 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.
Humaninsulin 180 pmol/l-Standard	Humaninsulin wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 30 µl in 10 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.
Humaninsulin 60 pmol/l-Standard	Humaninsulin wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 10 µl in 10 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.
Humaninsulin 18 pmol/l-Standard	Humaninsulin wurde in zwei Schritten mit Elomel-Pufferlösung auf eine Konzentration von 10 U/l=10 µU/µl verdünnt und davon 15 µl in 50 ml der 1% HSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert.

### **2.2.1.2 Test des Einflusses wiederholter Gefrier-Auftauzyklen auf die Plasmainsulin Bestimmung**

Untersucht wurde inwieweit die häufigen Gefrier-Auftauzyklen die Messungen von Insulin beeinträchtigen könnten und in welchem Maß die Insulinkonzentration gegenüber dieser empfindlich ist. Hierfür wurden die Plasmakonzentrationen von einem Pilotexperiment in vier Messläufen gemessen. Zwischen den Messläufen wurden die Proben jeweils eingefroren und wieder aufgetaut.

### **2.2.1.3 Intra-Assay-Variabilität**

Um die Intra-Assay-Variabilität zu bestimmen, wurde die gleiche Plasmaprobe innerhalb der gleichen Mikrotiterplatte des Assays zwölf Mal gemessen und danach die Variabilität aus den erhaltenen Messwerten dieser Probe errechnet. Die Variabilität wurde mit dem Variationskoeffizienten (coefficient of variation; CV) erfasst und mit folgender Formel berechnet:

$$CV(\text{in } \%) = (\text{STABW}) / \text{MW} \cdot 100,$$

wobei MW den Mittelwert und STABW die Standardabweichung der erhaltenen Messwerte darstellen.

## **2.2.2 Messung der Konzentrationen in den Plasmaproben**

Nach der Validierung der Messmethode wurden die Insulinkonzentrationen in den bei der Studie gewonnenen Plasmaproben gemessen. Die zu messenden Plasmaproben wurden während der beiden Clampvisiten jeweils zur -15., 0, 5., 10., 15., 20., 25., 30., 40., 50., 60., 70., 80., 90., 105., 120., 150., 180., 240., 300., 360. und 480. Minute abgenommen. Pro Proband wurden somit pro Clampvisite 22 Proben abgenommen. Da zwei Clampvisiten durchgeführt wurden, resultieren daraus insgesamt 44 Plasmaproben pro Proband.

Die Plasmaproben wurden einmal mit dem *Insulin-ELISA* und einmal mit *Iso-Insulin-ELISA* vermessen. Dabei wurde eine ELISA-Mikrotiterplatte für die 44 Proben eines Probanden verwendet. Zudem wurde das Plasma der 44 Proben jeweils zweimal auf die ELISA-Mikrotiterplatte pipettiert. Für die Gesamtzahl von 20 Probanden wurden deshalb insgesamt 1760 Gesamtinsulin-Bestimmungen und 1760

Humaninsulin-Bestimmungen durchgeführt und dabei 20 *Iso-Insulin-ELISA-Kits* und 20 *Insulin-ELISA-Kits* verwendet.

Um den bei der Vermessung der Proben erhaltenen Absorptionswerten entsprechende Insulinkonzentrationswerte zuzuordnen, mussten auch Proben bekannter Insulinkonzentration (Standards) auf jede ELISA-Mikrotiterplatte pipettiert und mit gemessen werden. Die hierfür verwendeten Standards hatten eine Konzentration von 0 pmol/l, 18 pmol/l, 60 pmol/l, 180 pmol/l sowie 600 pmol/l. Diese Standards sind ein Bestandteil jedes ELISA-Kits und wurden bei deren Bestellung mitgeliefert.

Um die Gültigkeit der erhaltenen Messwerte weiters abzusichern, wurden zusätzliche Proben bekannter Konzentration (Kontrollen) auf jede ELISA-Mikrotiterplatte pipettiert und mit gemessen. Hierfür wurden die von uns hergestellten Lispro- und Humaninsulin-Standards mit der Konzentration von 420 pmol/l und 18 pmol/l verwendet.

### **2.2.3 Durchführung der ELISA-Messung**

Im Folgenden sind die genauen Arbeitsschritte für die Messung der Insulinkonzentrationen mit den beiden ELISAs beschrieben. Sie laufen für die beiden ELISAs gleich ab. Alle Reagenzien, Standards, Kontrollen und Plasmaproben wurden vor der Durchführung der Messungen auf Raumtemperatur gebracht. Die Messung selbst wurde ebenso bei Raumtemperatur durchgeführt.

#### **2.2.3.1 ELISA-Kit Bestandteile**

Jeder Merckodia *ELISA-Kit* besteht aus einer Mikrotiterplatte, Reagenzien und den Standards (Abb.13A). Auf der Mikrotiterplatte befinden sich 96 Kavitäten (Wells) in denen Anti-Insulin-Antikörper der Maus anhaften. In die Kavitäten werden die Proben und Reagenzien hinein pipettiert. Die Anzahl der Kavitäten reicht für die Messung von 44 Plasmaproben, der Standards und der Kontrollen.

Unter den mitgelieferten Reagenzien befindet sich das Enzym-Konjugat-11x, der Enzym-Konjugat-Puffer, der Wasch-Puffer, das 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine-Substrat (TMB-Substrat), und die Stopp-Lösung (Abb.13A).

Das Enzym-Konjugat-11x ist ein peroxidasekonjugierter monoklonaler Anti-Insulin-Antikörper der Maus. Das Enzym Konjugat-11x muss vor Gebrauch noch vorbereitet werden, indem man das Enzym-Konjugat-11x mit dem Enzym-Konjugat-Puffer mischt und sich so eine Enzyme-Konjugat-Lösung ergibt.

Der Wasch-Puffer wird vor Gebrauch mit 1000 ml destilliertem Wasser gemischt, um die Wasch-Puffer-Lösung zu erhalten.

Das TMB-Substrat und Stopp-Lösung (0.5 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) sind bereits gebrauchsfertig.

### **2.2.3.2 Ablauf der Messung**

Vor Beginn der Messung wurden die Plasmaproben, Kontrollen und Standards auf Raumtemperatur gebracht so wie die Enzym-Konjugat-Lösung und die Wasch-Puffer-Lösung, wie oben beschrieben, vorbereitet. Danach wurden 25 µl von jeder Plasmaprobe beziehungsweise jedem Standard und jeder Kontrolle in eine Kavität der Mikrotiterplatte pipettiert (Abb.13B-C).

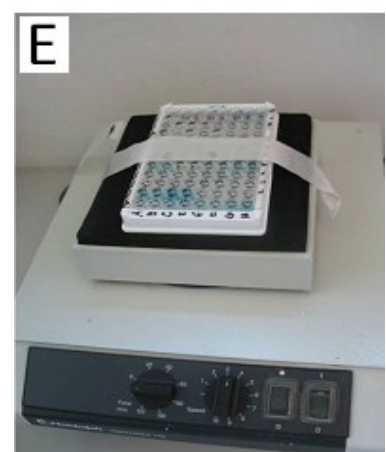
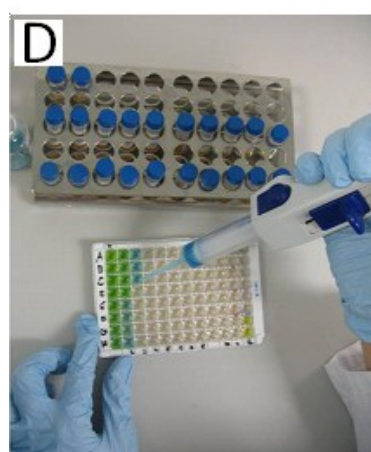
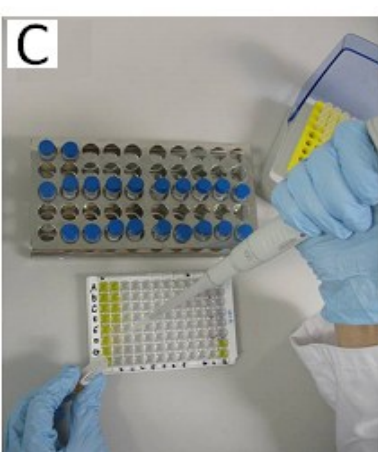
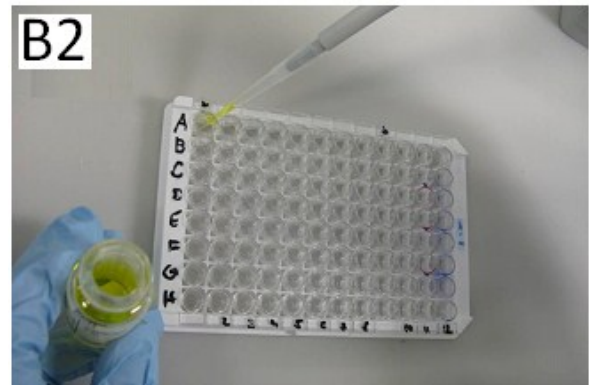
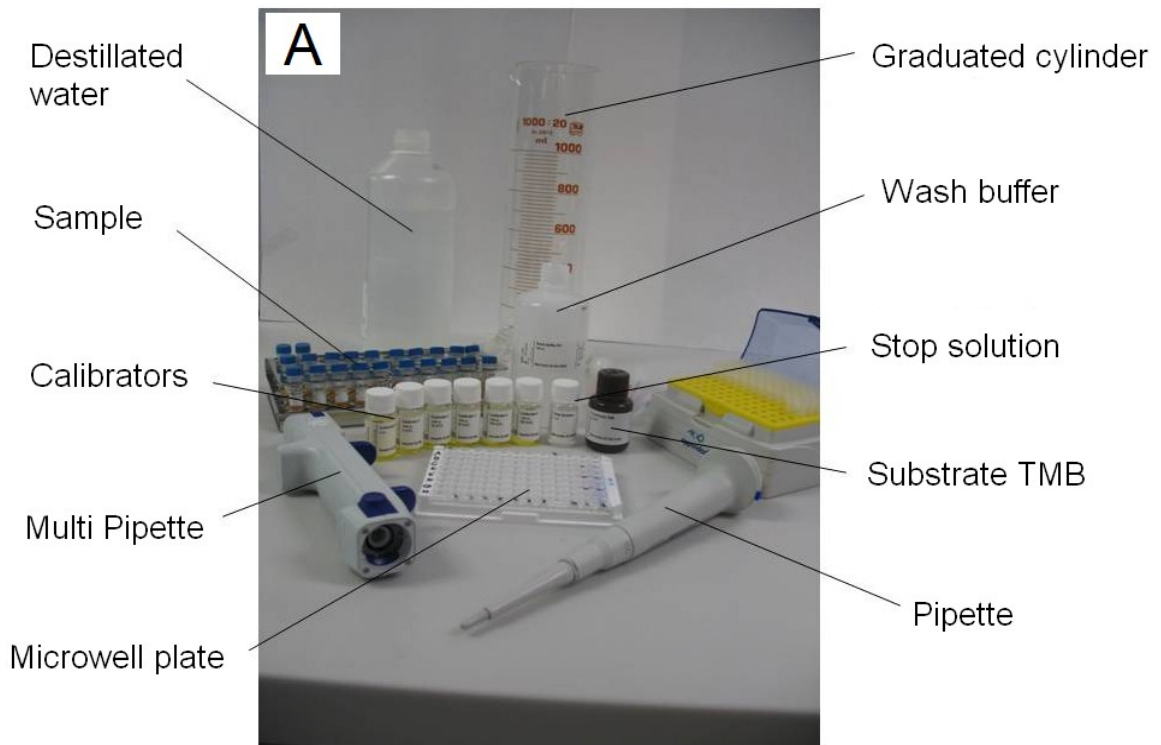
Anschließend wurden in diese Kavitäten Enzym-Konjugat-Lösung in der Menge von 50 µl im Falle des Iso-Insulin-ELISA-Kits und 100 µl im Falle des Insulin-ELISA-Kits dazugegeben (Abb.13D).

Die nachfolgende einstündige Inkubation auf einem Schüttlergerät (700-900 rpm) ermöglichte die Reaktion des Insulins mit den Antikörpern aus dem Konjugat und den Antikörpern, die auf der Mikrotiterplatte gebunden waren, um somit einen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex zu bilden (Abb.13E).

Im nächsten Schritt wurden die Kavitäten manuell fünf Mal mit 350 µl der Wasch-Puffer-Lösung gewaschen. Um überschüssige Flüssigkeit zu entfernen, wurde die Lösung danach verworfen und die Platte mehrmals kräftig gegen saugfähiges Papier geschlagen. Dieser Vorgang sollte ungebundene, enzymatisch-markierte Antikörper eliminieren (Abb.13F).

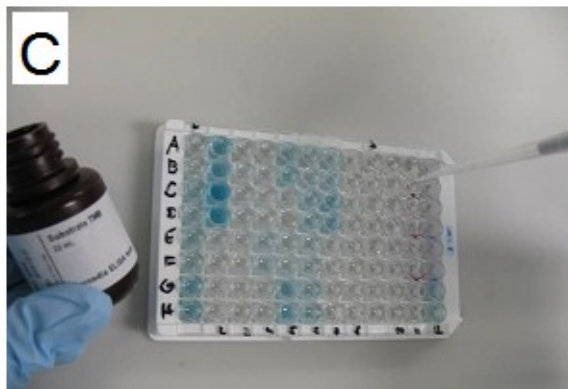
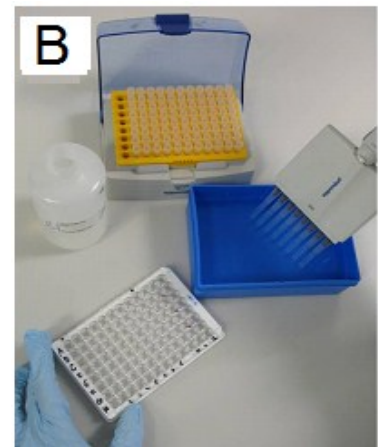
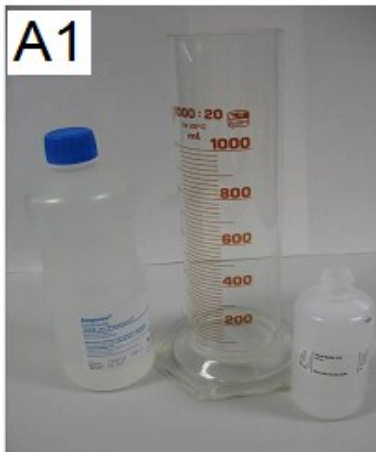
Nach dem Waschvorgang wurden 200 µl des TMB-Substrats beigefügt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert (Abb.13H-I). Während diesem Vorgang wird das Konjugat durch das TMB-Substrat sichtbar gemacht.

Anschließend wurden 50 µl der Stopp-Lösung hinzugefügt, wodurch die oben genannte Reaktion gestoppt wurde (Abb.13J). Schließlich wurde die Absorption mit dem Spektrometer bei 450 nm gemessen und ausgewertet (Abb.13K).



**Abbildung 13: Ablauf der Insulinmessung.**

**A)** Vorbereitung. **B1,B2)** Pipettieren des Kalibrators; **C)** Pipettieren von Proben; **D)** Zugabe vom Enzym-Konjugat-Lösung; **E)** Inkubation auf einem Schüttler.



**Abbildung 14: Ablauf der Insulinmessung.**

**A1,A2)** Vorbereitung der Wasch-Puffer-Lösung; **B)** Manuelles Waschen; **C)** Zugabe des TMB-Substrates; **D)** Inkubation bei Raumtemperatur; **E)** Zugabe der Stopp-Lösung; **F)** Messen der Absorption.

## **2.3 Datenanalyse**

Die Plasmakonzentrationen des Gesamtinsulins und des Humaninsulins wurden aus den für eine Plasmaprobe erhaltenen Absorptionswerten und einer Kalibrationskurve berechnet. Die Kalibrationskurve wurde aus den für die Insulinstandards erhaltenen Absorptionswerten generiert. Um für eine Plasmaprobe die Konzentration des Insulin-Lispro zu erhalten, wurden dann die Konzentration des Humaninsulins in der Plasmaprobe von der des Gesamtinsulins der Plasmaprobe subtrahiert.

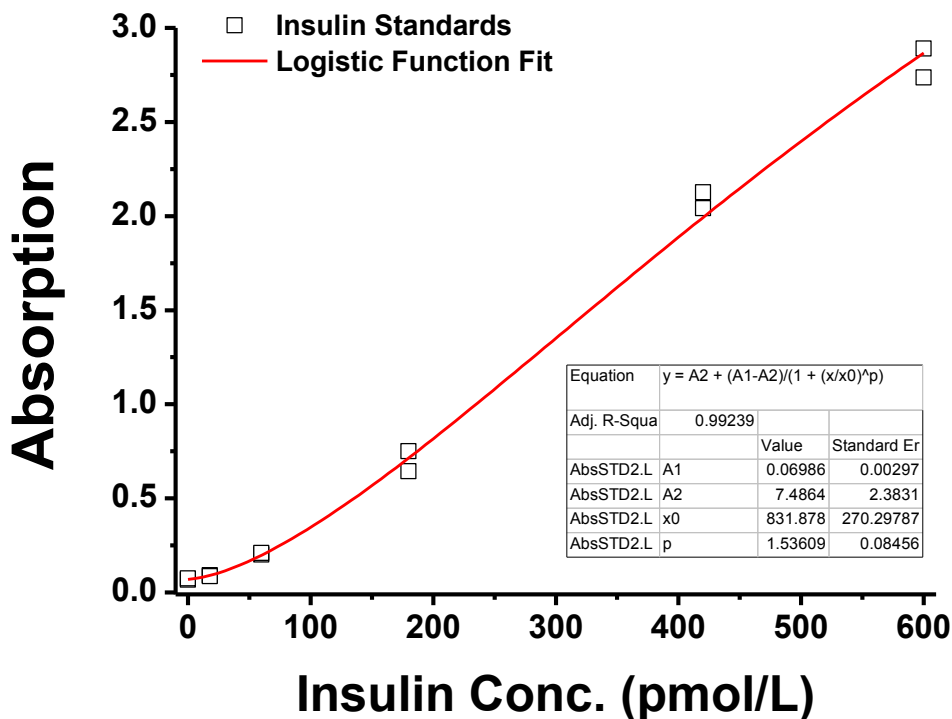
### **2.3.1 Erstellung der Kalibrationskurven**

Um den für die Plasmaproben erhaltenen Absorptionswerten entsprechende Insulinkonzentrationswerte zuzuordnen, wurden auf jeder Mikrotiterplatte auch die Standardproben mitgeführt und aus den für die Standardproben erhaltenen Absorptionswerten eine Kalibrationskurve mittels mathematischer Kurvenanpassung generiert. Für die Kurvenanpassung wurde eine logistische Kurvenfunktion gewählt. Diese setzt die Insulinkonzentration (INS) mit dem Absorptionsgrad (ABS) folgendermaßen in Beziehung:

$$ABS = a_2 + (a_1 - a_2) / (1 + (INS / a_0)^p),$$

wobei  $a_0$ ,  $a_1$ ,  $a_2$  und  $p$  anzupassende Parameter sind.

Die Parameter dieser mathematischen Kurvenfunktion wurden mithilfe eines Softwareprogrammes (Origin-Softwarepaket, *Version 8.0, OriginLab Cop., USA*) so angepasst, dass die für die Insulinstandards erhaltenen Absorptionswerte mit den Kurvenwerten gut übereinstimmen (Abb.14). Für jeden ELISA-Kit wurde auf diese Art und Weise aus den Absorptionswerten der mitgeführten Insulinstandards eine Kalibrationskurve erstellt.



**Abbildung 15: Erstellung einer Kalibrationskurve.**

Hierbei wurden die Parameter einer logistischen Kurvenfunktion so abgeändert, dass die für die Insulinstandards erhaltenen Absorptionswerte (Quadrate) gut mit den Kurvenwerten (Rote Linie) übereinstimmen.

### 2.3.2 Berechnung der Gesamt-, Human- und Lispro-Insulinkonzentration einer Probe

Nach der Erstellung der Kalibrationskurve wurden die für die Plasmaproben erhaltenen Absorptionswerte (ABS) in die Kalibrationskurvenfunktion eingesetzt und die Gesamt- bzw. Human-Insulinkonzentration der Proben errechnet. Für diese Berechnung wurde die obige logistische Kurvenfunktion in folgende Form gebracht:

$$INS = (( (a_1 - a_2) / (ABS - a_2)) - 1)^{(1/p)} * a_0$$

Nach der Berechnung der Gesamt- und Humaninsulinkonzentration einer Probe wurde die Insulin-Lispro-Konzentration der Probe durch Abzug der Humaninsulinkonzentration von der Gesamtinsulinkonzentration errechnet.

### **2.3.3 Berechnung und grafische Darstellung der mittleren Plasmakonzentrationsverläufe des Gesamt-, Human- und Lispro-Insulins**

Die Plasmakonzentration des Gesamt-, Human-, und Lispro-Insulins wurde in der oben beschriebenen Art und Weise für jeden Probenabnahmezeitpunkt einer Clamp-Untersuchung berechnet. Die erhaltenen Verläufe der Gesamt-, Human-, und Lispro-Insulinkonzentrationen wurden dann für jede Clamp-Untersuchung in einem Konzentrations-Zeit-Diagramm graphisch dargestellt.

Weiters wurde für die Clamp-Untersuchungen mit langem Bolus sowie für denen mit kurzem Bolus, die für einen Probenabnahmezeitpunkt erhaltenen Insulinkonzentrationen über die 20 Probanden gemittelt. Neben dem Mittelwert wurde dann auch der Standardfehler des für einen Probenabnahmezeitpunkt erhaltenen Mittelwertes bestimmt. Die erhaltenen mittleren Verläufe der Gesamt-, Human-, und Lispro-Insulinkonzentrationen wurden dann für die Clamp-Untersuchung mit langem Bolus sowie für die mit kurzem Bolus in Konzentrations-Zeit-Diagrammen graphisch dargestellt. Zu den Mittelwerten wurden zusätzlich die Standardfehler in Form von Balken in die Diagramme eingebracht.

### **2.3.4 Bestimmung der pharmakokinetischen Parameter**

Aus dem bei einer Clamp-Untersuchung beobachteten zeitlichen Verlauf der Insulin-Lispro-Konzentration wurden mehrere pharmakokinetische Parameter abgeleitet. Dies waren:

- $C_{INSmax}$ , ist die während der Clamp-Untersuchung beobachtete maximale Insulin-Lispro-Konzentration
- $t_{CINSmax}$ , ist die Zeit bis zum Erreichen der maximalen Insulin-Lispro-Konzentration.
- $t_{CINSmax10\%}$ , ist die Zeit, um 10% der maximalen Insulin-Lispro-Konzentration zu erreichen.
- $t_{CINSmax50\%}$ , ist die Zeit um 50% der maximalen Insulin-Lispro-Konzentration zu erreichen.

Für die Bestimmung von  $t_{C_{INSmax10\%}}$  und  $t_{C_{INSmax50\%}}$  wurden die Insulin-Lispro Konzentrationen für die Zeitpunkte zwischen den Probeabnahmezeitpunkten mittels mathematischer Interpolation berechnet. Den Insulin-Lispro-Konzentrationen  $C_{INSmax10\%}$  ( $=C_{INSmax} \cdot 0,1$ ) und  $C_{INSmax50\%}$  ( $=C_{INSmax} \cdot 0,5$ ) konnten dadurch genaue  $t_{C_{INSmax10\%}}$ -Werte und  $t_{C_{INSmax50\%}}$ -Werte zugeordnet werden.

- $C_{INST30min}$ , ist die beobachtete Insulinkonzentration zum Zeitpunkt 30 Minuten nach der Bolusgabe.
- $C_{INST60min}$ , ist die beobachtete Insulinkonzentration zum Zeitpunkt 60 Minuten nach der Bolusgabe.
- $C_{INST120min}$ , ist die beobachtete Insulinkonzentration zum Zeitpunkt 120 Minuten nach der Bolusgabe.
- $AUC_{INSTotal}$ , ist die Fläche unter der beobachteten Insulin-Lispro-Konzentrations-Zeitkurve. vom Zeitpunkt der Bolusgabe ( $t=0$ ) bis zum Ende der Clamp-Untersuchung ( $t=480$  min).
- $AUC_{INS\ 0-t_{cinsmax}}$ , ist die Fläche unter der Insulin-Lispro-Konzentrations-Zeitkurve vom Zeitpunkt der Bolusgabe ( $t=0$ ) bis zum Zeitpunkt der maximalen beobachteten Insulin-Lispro-Konzentration.
- $t_{AUC-INSTotal10\%}$ , ist die Zeit, bei welcher die Fläche unter der Insulin-Lispro-Konzentrations-Zeitkurve 10% der gesamten Fläche erreicht.
- $t_{AUC-INSTotal50\%}$ , ist die Zeit, bei welcher die Fläche unter der Insulin-Lispro-Konzentrations-Zeitkurve 50% der gesamten erreicht.

Für die Bestimmung von  $t_{AUC-INSmax10\%}$  und  $t_{AUC-INSmax50\%}$  wurden die AUCs für für Zeitspannen von  $t=0$  bis zu den Zeitpunkten zwischen den Probeabnahmezeitpunkten mittels mathematischer Interpolation berechnet. Den Flächen  $AUC_{INSTotal10\%}$  ( $=AUC_{INSTotal} \cdot 0,10$ ) und  $AUC_{INSTotal50\%}$  ( $=AUC_{INSTotal} \cdot 0,50$ ) konnten dadurch genaue  $t_{AUC-INSmax10\%}$ -Werte und  $t_{AUC-INSmax50\%}$ -Werte zugeordnet werden.

- $AUC_{INS0-30min}$ , ist die Fläche unter der Insulin-Lispro-Konzentrations-Zeitkurve von  $t=0$  bis  $t=30$ .

- $AUC_{INS0-60min}$ , ist die Fläche unter der Insulin-Lispro-Konzentrations-Zeitkurve vom Zeitpunkt der Bolusgabe ( $t=0$ ) bis zum Zeitpunkt  $t=60$ .
- $AUC_{INS0-120min}$ , ist die Fläche unter der Insulin-Lispro-Konzentrations-Zeitkurve vom Zeitpunkt der Bolusgabe ( $t=0$ ) bis zum Zeitpunkt  $t=120$ .

Die Flächen unter der Insulin-Lispro-Konzentrations-Zeitkurve wurden unter Anwendung der Trapezregel mithilfe eines Softwareprogrammes (Origin-Softwarepaket) berechnet.

### **2.3.5 Statistischer Vergleich der pharmakokinetischen Parameter**

Die pharmakokinetischen Parameter, die von den Clamp-Untersuchungen mit langem Bolus hergeleitet worden sind, wurden über die 20 Probanden gemittelt. Diese Mittelwertberechnung wurde dann auch für die pharmakokinetischen Parameter, die von den Clamp-Untersuchungen mit kurzem Bolus hergeleitet worden sind, wiederholt. Neben den Mittelwerten wurden zudem die Standardfehler der erhaltenen Mittelwerte bestimmt.

Mittels Anwendung des t-Tests für zwei verbundene Stichproben (Paired Sample t-Test) wurde dann getestet, ob Parameter-Mittelwerte die von Clamp-Untersuchungen mit langem Bolus abgeleitet sind, sich von denen, die von Clamp-Untersuchungen mit kurzem Bolus hergeleitet sind, unterscheiden.

Falls der mittels t-Test errechnete p-Wert kleiner als das angenommene Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  war, wurde die Nullhypothese (Parameter-Mittelwerte sind gleich) abgelehnt und die alternative Hypothese (Parameter-Mittelwerte unterscheiden sich) angenommen.

Die Annahme bei der Anwendung des t-Tests ist, dass die Schätzung der Parameter-Mittelwerte einer Normalverteilung folgt. Da diese Annahme nicht leicht prüfbar ist, wurde zusätzlich ein Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest (Wilcoxon-Signed-Rank-Test) angewandt. Dies ist ein nicht-parametrischer Test, welcher nicht auf der Voraussetzung einer Normalverteilung fußt.

Die graphischen Darstellungen und statistischen Analysen wurden mit dem Origin-Softwarepaket durchgeführt.

## 3 Resultate

### 3.1 Ergebnisse zur Validierung der Insulin-Lispro-Messmethode mit ELISA

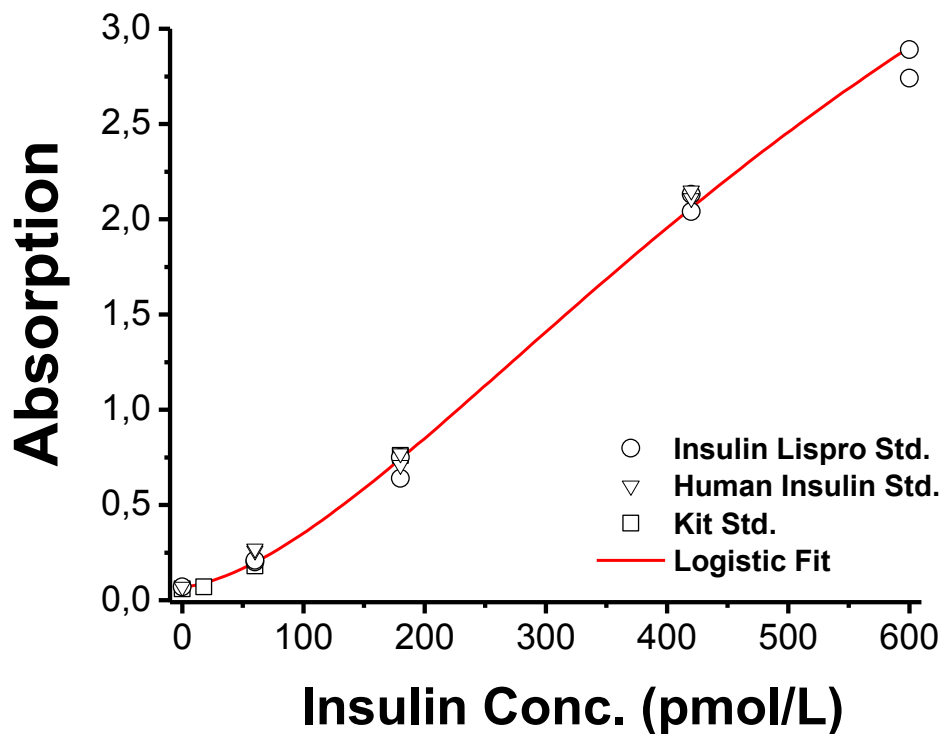
Bei der Etablierung und Validierung der Insulin-Lispro Messung mit den zwei ELISAs war es wichtig zu zeigen, dass der *Iso-Insulin-ELISA-Kit* gleiche Sensitivität für Humaninsulin und Insulin-Lispro aufweist und der *Insulin-ELISA-Kit* selektiv für das Humaninsulin ist und keine Kreuzreaktion mit Insulin-Lispro zeigt. Weiters sollten beide ELISA-Kits eine ähnlich niedrige Messvariabilität aufweisen.

#### 3.1.1 Sensitivität, Selektivität und Variabilität der beiden ELISAs

Die mit dem *Iso-Insulin-ELISA-Kit* durchgeführten Messungen bei den Insulin-Standards (Lispro-, Humaninsulin- und mitgelieferte Kit-Standards) ergaben, dass bei vergleichbarer Konzentration von Insulin-Lispro und Humaninsulin auch vergleichbare Absorptionswerte gemessen wurden (Abb.16). Daraus kann geschlossen werden, dass mit diesem Insulin-ELISA das Insulin-Lispro und das Humaninsulin mit gleicher Sensitivität gemessen werden kann.

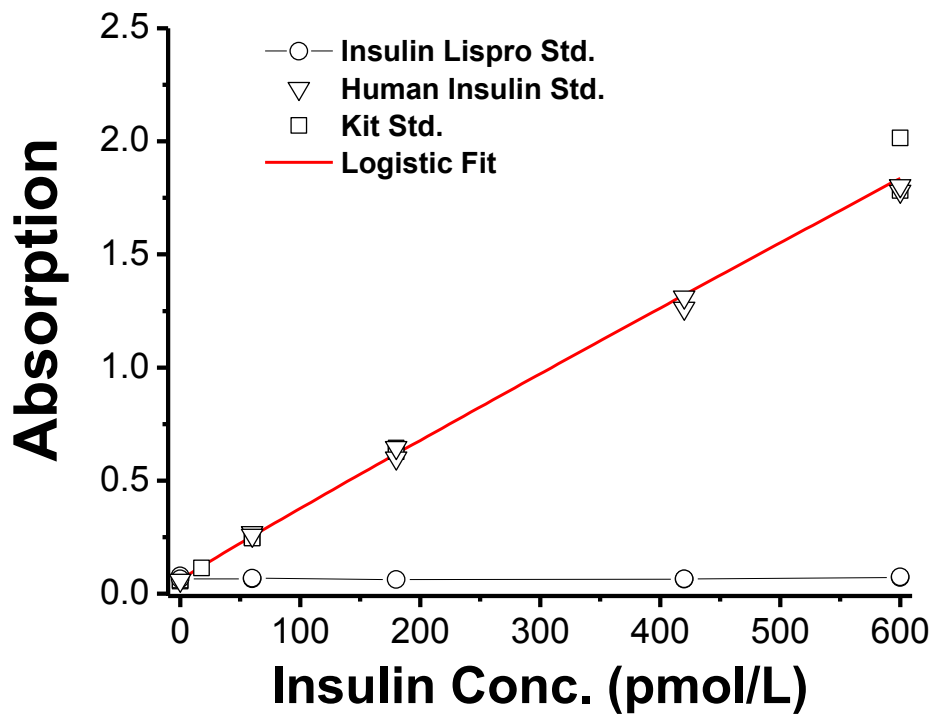
Die Konzentrationsmessungen mit dem *Insulin-ELISA-Kit* bei den Insulin-Lispro-Standards zeigten, dass bei steigenden Insulin-Lispro-Konzentrationen die Absorptionswerte nicht gestiegen sind, sondern auf dem Niveau der Leerprobe blieben. Auch bei sehr hohen Insulin-Lispro-Konzentrationen (600 pmol/l) waren die Absorptionswerte vom Leerproben-Niveau nicht unterscheidbar. Die Konzentrationsmessungen mit dem *Insulin-ELISA-Kit* bei den Humaninsulin-Standards zeigten jedoch, dass bei steigenden Humaninsulin-Konzentrationen auch die Absorptionswerte proportional dazu steigen (Abb.17). Daraus kann geschlossen werden, dass der *Insulin-ELISA-Kit* selektiv für das Humaninsulin ist und keine Kreuzreaktion mit dem Insulin-Lispro zeigt.

Bei wiederholter Konzentrationsmessung bei Plasmaproben wurde ein (CV-Wert von 6,06% für den Iso-Insulin-ELISA-Kit und ein CV-Wert von 3,95% für den Insulin-ELISA-Kit festgestellt.



**Abbildung 16: Messung der Insulin-Standards mit dem Iso-Insulin-ELISA.**

Die Absorptionswerte für die Humaninsulin-Standards (Dreiecke) waren vergleichbar mit den Absorptionswerten der Insulin-Lispro-Standards (Kreise) und mitgelieferten Test-Standards (Quadrate). Der für die Standards erhaltene Absorptionswerte-Verlauf kann mit einer logistischen Kurvenfunktion (rote Linie) gut beschrieben werden.

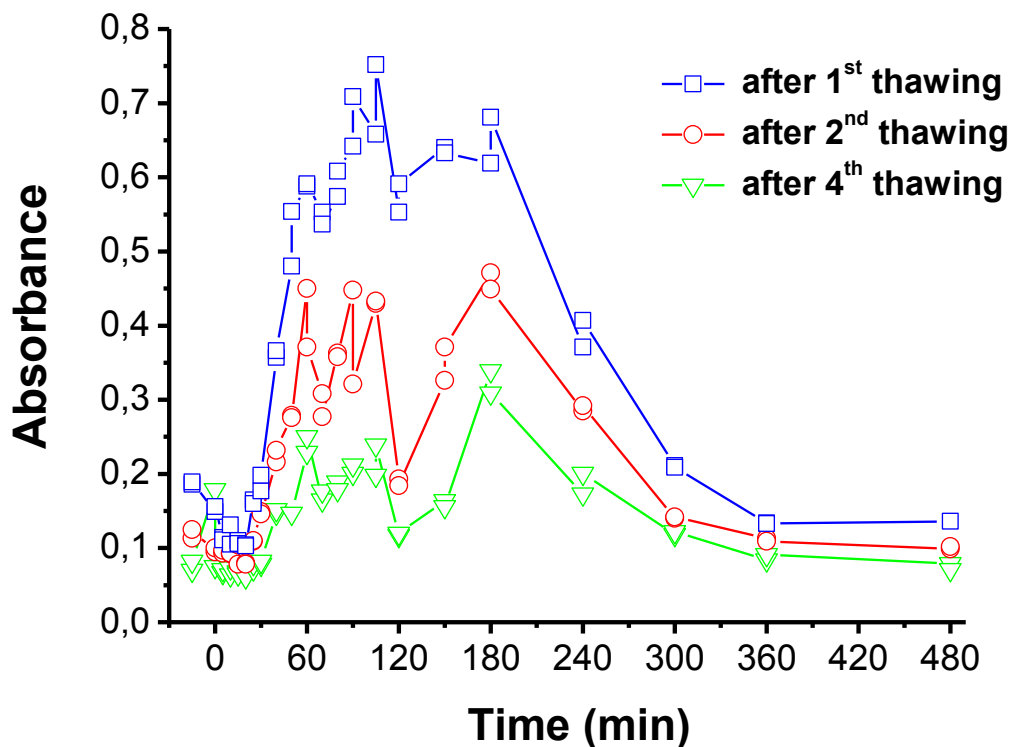


**Abbildung 17: Messung der Insulin-Standards mit dem Insulin-ELISA.**

Die für die Insulin-Lispro-Standards erhaltenen Absorptionswerte (Kreise) blieben trotz steigender Insulinkonzentrationswerte auf Nullniveau. Bei den Humaninsulin-Standards stiegen die Absorptionswerte (Dreiecke) proportional mit den Konzentrationswerten. Zudem waren die Absorptionswerte für die Humaninsulin-Standards vergleichbar mit den der mitgelieferten Test-Standards (Quadrate). Der für die Humaninsulin- und Kit-Standards erhaltene Absorptionswerte-Verlauf kann wiederum mit einer logistischen Kurvenfunktion (rote Linie) beschrieben werden.

### 3.1.2 Einfluss wiederholter Gefrier-Auftauzyklen auf die Insulinmessung

In Abbildung 18 sind Absorptionswerteverläufe gezeigt, die bei Plasmaproben, nach deren wiederholtem Gefrieren und Auftauen, mit dem Iso-Insulin-ELISA-Kit gemessen wurden. Man erkennt, dass nach jedem Gefrier-Auftauzyklus die Absorptionswerte stark abfallen. Vor der Insulinkonzentrationsbestimmung mit den ELISA-Kits sollte deshalb ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Plasmaproben vermieden werden.



**Abbildung 18: Einfluss von Gefrier-Auftauzyklen auf die Insulinmessung.**

Gezeigt werden Absorptionsverläufe, die mit dem Iso-Insulin-ELISA Kit bei Plasmaproben nach deren einmaligen (Quadrate), zweimaligen (Kreise) und viermaligen (Dreiecke) Auftauen, gemessen wurden.

## 3.2 Studienergebnisse

### 3.2.1 Biometrische Daten der Studienteilnehmer

Wie bereits beschrieben wurde, nahmen bei der Studie 20 Probanden bei jeweils zwei Clamp-Untersuchungen, einer Einschluss- und einer Nachuntersuchung teil. Die nachfolgende Tabelle zeigt die biometrischen Daten der Probanden (Tabelle 3). Bei der Studie haben 15 Männer und fünf Frauen teilgenommen; Vier davon wurden mit einer Insulinpumpe und 16 mit multiplen, täglichen, subkutanen Insulininjektionen behandelt. Das Durchschnittsalter der Probanden betrug 41 Jahre. Der Jüngste war 22 Jahre und der Älteste 53 Jahre alt. Der durchschnittliche BMI (Body-Mass-Index) betrug  $24,9 \text{ kg/m}^2$ , wobei der höchste Wert bei  $29,3 \text{ kg/m}^2$  und der niedrigste bei  $20,1 \text{ kg/m}^2$  lag. Weiteres lag der maximale HbA<sub>1c</sub> bei 8,7% und die maximale Diabetes-Dauer bei 39 Jahren. Der minimale HbA<sub>1c</sub> lag bei 5,4% und die minimale Diabetes-Dauer bei 2 Jahren.

**Tabelle 3: Biometrische Daten der Probanden.**

---

Anzahl der Probanden (Frauen/Männer)	20 (5/15)
Alter <sup>#</sup> in Jahren	$41 \pm 2$ (22 – 53)
BMI <sup>#</sup> in $\text{kg/m}^2$	$24,9 \pm 0,6$ (20,1 – 29,3)
HbA <sub>1c</sub> <sup>#</sup> in %	$7,5 \pm 0,2$ (5,4 – 8,7) <sup>‡</sup>
Dauer des Diabetes <sup>#</sup> in Jahren	$20,7 \pm 2,7$ (2 – 39)

---

\* 4 mit Insulinpumpe und 16 mit multiplen täglichen subkutanen Insulininjektionen behandelt

<sup>#</sup>Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung (Bereich)

<sup>‡</sup>Normaler Bereich 4.3 - 5.9 %

### **3.2.2 Zeitverläufe der Gesamt-, Human-, und Lispro-Insulinkonzentration**

Im Anhang der Diplomarbeit sind für jeden Probanden die während der Clamp-Untersuchungen beobachteten Plasmakonzentrationsverläufe des Gesamt-, Human-, und Lispro-Insulins in jeweils drei Grafen dargestellt (Abb.23-42). In den Grafen am linken Seitenrand sind dabei die Gesamt-, Human-, und Lispro-Insulinkonzentrationsverläufe, die nach Bolusgabe mit kurzer Boluslänge beobachtet worden sind, gezeigt. Weiters sind in den mittleren Grafen die Gesamt-, Human-, und Lispro-Insulinkonzentrationsverläufe, die nach Bolusgabe mit langer Boluslänge beobachtet worden sind, dargestellt. Zudem sind in den Grafen am rechten Seitenrand die Lispro-Insulinkonzentrationsverläufe von der Clamp-Untersuchung mit kurzem Bolus denen von der Clamp-Untersuchung mit langem Bolus gegenübergestellt.

### 3.2.2.1 Mittlere Zeitverläufe der Insulinkonzentration nach der Bolusgabe mit dem kurzen Bolus

In der Abbildung 19 sind die mittleren, von den Clamp-Untersuchungen mit kurzem Bolus stammenden Gesamt-, und Humaninsulinkonzentrationsverläufe dargestellt. Zu den mittleren Verläufen sind zusätzlich die Standardfehler der Mittelwerte in Form von Balken dargestellt.

Man erkennt, dass es ungefähr 60 Minuten dauerte, bis nach der Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer, die maximale Gesamtinsulinkonzentration erreicht worden ist. Weiters ist ersichtlich, dass nach dem Stoppen der intravenösen Humaninsulininfusion beim Zeitpunkt  $t=0$ , die Plasmakonzentration des Humaninsulins relativ langsam gesunken ist.

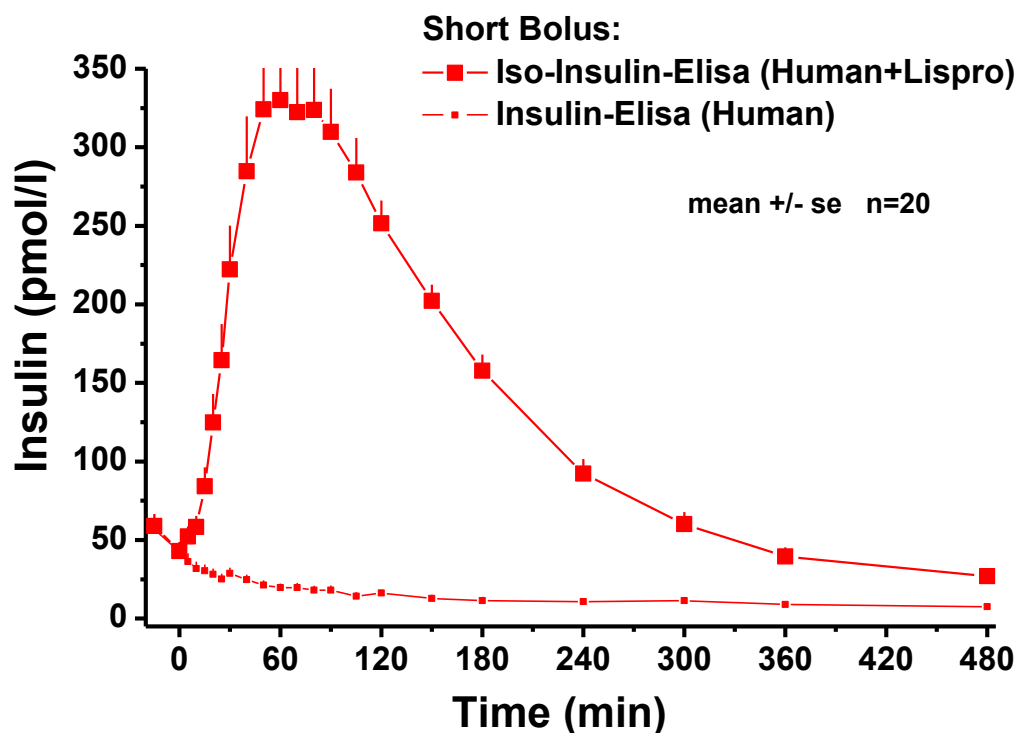


Abbildung 19: Mittlerer Zeitverlauf des Gesamtinsulins (große Quadrate) und des Humaninsulins (kleine Quadrate) nach der Bolusgabe mit kurzem Bolus.

### 3.2.2.2 Mittlere Zeitverläufe der Insulinkonzentration nach der Bolusgabe mit dem langen Bolus

In der Abbildung 20 sind die mittleren, von den Clamp-Untersuchungen mit langem Bolus stammenden Gesamt-, und Humaninsulinkonzentrationsverläufe dargestellt. Die Standardfehler der Mittelwerte sind ebenfalls in Form von Balken gezeigt. Man erkennt, dass es ungefähr 75 Minuten dauerte, bis nach der Bolusgabe mit langer Bolusdauer, die maximale Gesamtinsulinkonzentration erreicht worden ist. Weiters ist ersichtlich, dass auch hier nach Stoppen der intravenösen Humaninsulininfusion beim Zeitpunkt  $t=0$ , die Plasmakonzentration des Humaninsulins relativ langsam gesunken ist.

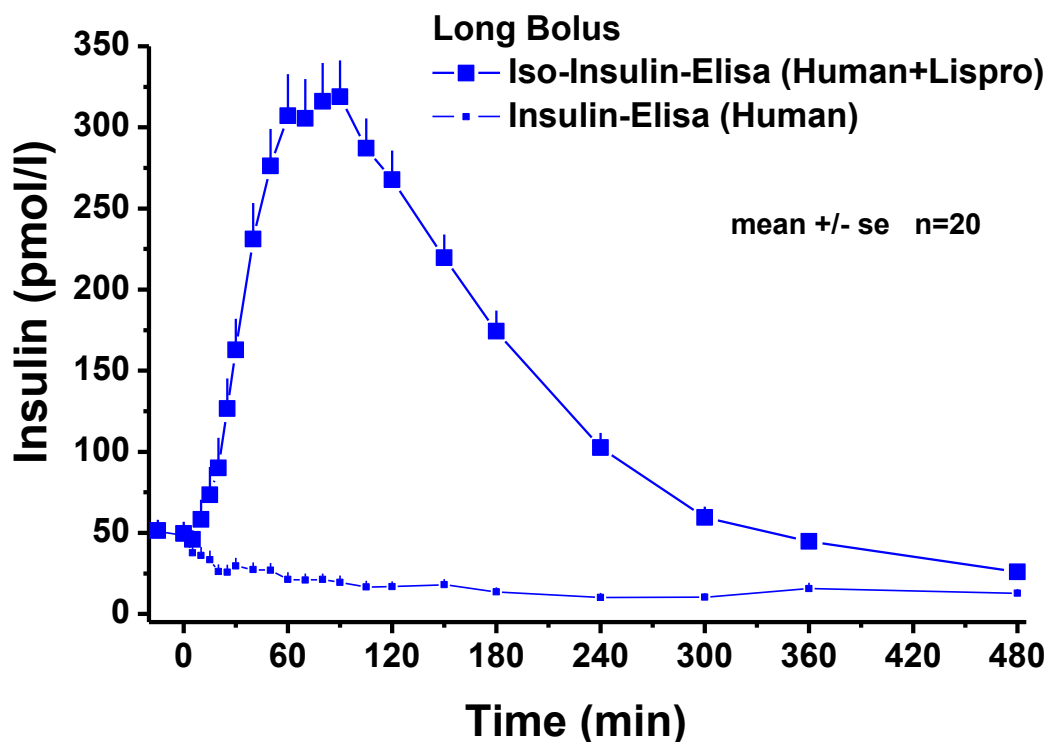


Abbildung 20: Mittlerer Zeitverlauf des Gesamtinsulins (große Quadrate) und Humaninsulins (kleine Quadrate) nach der Bolusgabe mit langem Bolus.

### 3.2.2.3 Mittlere Insulin-Lispro-Konzentrationsverläufe nach Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer

In der Abbildung 21 sind die mittleren Konzentrationsverläufe des Insulin-Lispro für dessen Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer dargestellt. Die Konzentrationsverläufe sind durch Subtraktion der einzelnen Plasmakonzentrationsverläufe des Humaninsulins von denen des Gesamtinsulins und darauffolgender Mittelung berechnet worden. Man erkennt, dass bei der Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer die maximale Plasmakonzentration des Insulin-Lispro schneller erreicht worden ist, als bei der Bolusgabe mit der langen Bolusdauer.

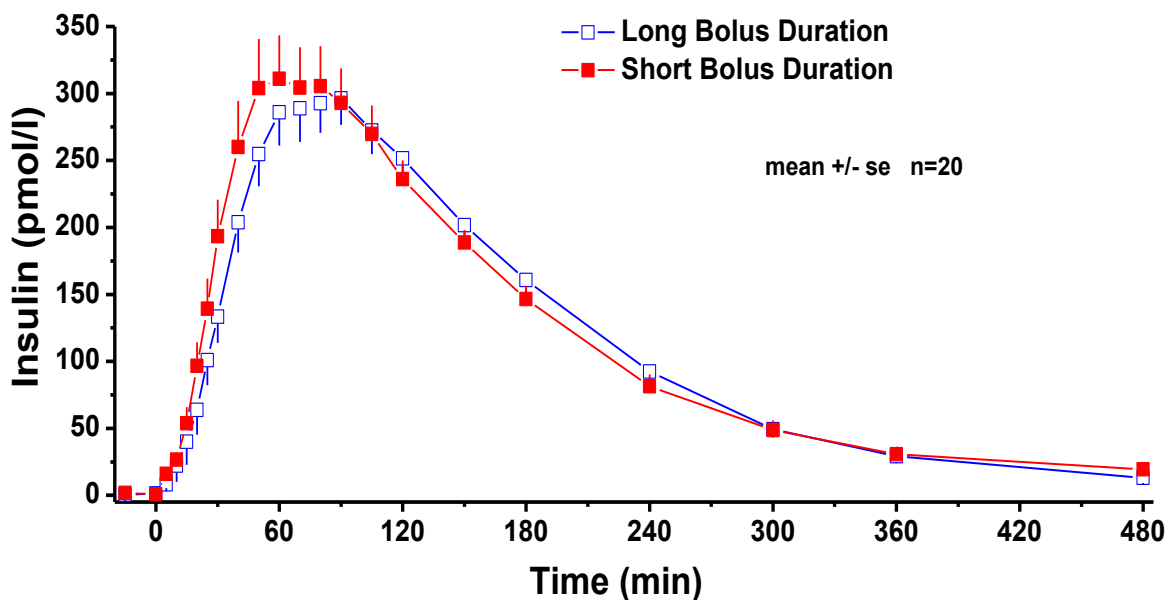


Abbildung 21: Mittlerer Zeitverlauf des Insulin-Lispro nach dessen Bolusgabe mit kurzer (volle Quadrate) und langer (offene Quadrate) Bolusdauer.

### **3.2.3 Vergleich der pharmakokinetischen Parameter**

Im Anhang der Diplomarbeit sind die von den Insulin-Lispro-Konzentrationsverläufen abgeleiteten, pharmakokinetischen Parameter für jeden Probanden und jede Bolusgabeart tabellarisch aufgelistet (Tabellen 6-9).

Die für den jeweiligen Parameter erhaltenen Werte wurden über die 20 Probanden gemittelt. In den Tabellen 4 und 5 sind die für den jeweiligen pharmakokinetischen Parameter berechneten Mittelwerte (Mean), Standardfehler (SE), Mediane und Quartilen (25<sup>th</sup>&75<sup>th</sup>percentile) aufgelistet. In den Tabellen 4 und 5 sind auch die p-Werte angegeben, die beim statistischen Vergleich der für die Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer erhaltenen mittleren Parameterwerte errechnet wurden. Dieser statistische Vergleich wurde mit dem parametrischen Paired-Sample-t-Test und dem nicht-parametrischen Wilcoxon-Signed-Rank-Test durchgeführt.

In Tabelle 4 und 5 ist ersichtlich, dass bei jenen pharmakokinetischen Parametern, die den Insulin-Lispro-Konzentrationsverlauf während der ersten 60 Minuten nach der Bolusgabe erfassen, die Unterschiede zwischen den mittleren Parameterwerten für die Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer und denen für die Bolusgabe mit langer Bolusdauer signifikant waren.

So waren bei den Parametern  $T_{CINSmax10\%}$ ,  $T_{CINSmax50\%}$ ,  $C_{INST30min}$ ,  $AUC_{INS\ 0-tcinsmax}$ ,  $AUC_{INS\ 0-30min}$  und  $AUC_{INS\ 0-60min}$  die für die Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer erhaltenen, mittleren Parameterwerte signifikant unterschiedlich zu denen für die Bolusgabe mit langer Bolusdauer erhaltenen, mittleren Parameterwerten.

Bei jenen pharmakokinetischen Parametern, die den gesamten oder einen größeren Teil des Insulin-Lispro-Konzentrationsverlaufes erfassen (z.B.:  $AUC_{INS\ 0-240min}$ ,  $AUC_{INS\ total}$ ), waren jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen den für die beiden Bolusgabearten erhaltenen, mittleren Parameterwerten detektierbar (Tab.4-5).

Generell waren die mit dem Paired-Sample-t-Test hergeleiteten p-Werte vergleichbar mit denen, die mit dem Wilcoxon-Signed-Rank-Test berechnet wurden.

**Tabelle 4: Pharmakokinetische Parameterwerte für die Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer**

VARIABLE	Short Bolus	Long Bolus	T-Test	Short Bolus	Long Bolus	Wilcoxon Test
	Mean (SE)	Mean (SE)	P value	Median (25 <sup>th</sup> & 75 <sup>th</sup> percentile)	Median (25 <sup>th</sup> & 75 <sup>th</sup> percentile)	P value
T <sub>CINSmax10%</sub> (min)	13,3 (1,6)	18,1 (1,5)	0,003	13,0 (8,5;16,8)	18,0 (15,0;21,0)	0,003
T <sub>CINSmax50%</sub> (min)	30,3 (2,1)	34,8 (2,2)	0,046	28,5 (25,6;36,3)	36,3 (29,1;40,0)	0,011
T <sub>CINSmax</sub> (min)	75,0 (5,2)	86,0 (5,8)	0,099	75,0 (52,5;90,0)	90,0 (71,3;93,8)	0,171
C <sub>INSmax</sub> (pmol/l)	345 (33)	333(23)	0,518	281(229;492)	322 (251;391)	0,729
C <sub>INSt30min</sub> (pmol/l)	193 (27)	133 (19)	0,011	154 (92;315)	105 (73;172)	0,004
C <sub>INSt60min</sub> (pmol/l)	311 (32)	286 (25)	0,230	250 (205;441)	261 (208;342)	0,189
C <sub>INSt120min</sub> (pmol/l)	236 (14)	252 (17)	0,255	205 (189;285)	251 (185;301)	0,216
C <sub>INSt240min</sub> (pmol/l)	81 (9)	92 (8)	0,084	79 (42;119)	91 (58;117)	0,123
C <sub>INSt300min</sub> (pmol/l)	49 (7)	49 (6)	0,914	45 (23;81)	48 (30;65)	0,956
C <sub>INSt360min</sub> (pmol/l)	31 (5)	29 (5)	0,770	30 (14;52)	27 (14-42)	0,898
C <sub>INSt480min</sub> (pmol/l)	19 (4)	13 (4)	0,169	23 (3;35)	11 (0;25)	0,083

**Tabelle 5: Pharmakokinetische Parameterwerte für die Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer**

VARIABLE	Short Bolus	Long Bolus	T-Test	Short Bolus	Long Bolus	Wilcoxon Test
	Mean (SE)	Mean (SE)	P value	Median (25 <sup>th</sup> & 75 <sup>th</sup> percentile)	Median (25 <sup>th</sup> & 75 <sup>th</sup> percentile)	P value
AUC <sub>INS 0-30min</sub> (min*pmol/l)	2145 (356)	1511 (371)	0,090	1742 (1123; 3120)	1117 (681; 1476)	0,0215
AUC <sub>INS 0-60min</sub> (min*pmol/l)	10307 (1291)	8192 (865)	0,027	8250 (5373; 16491)	7238 (5180; 9755)	0,027
AUC <sub>INS 0-120min</sub> (min*pmol/l)	27456 (2614)	25119 (1766)	0,153	23472 (18202; 37347)	24755 (19830; 30479)	0,143
AUC <sub>INS 0-180min</sub> (min*pmol/l)	38858 (2906)	37356 (2209)	0,353	35118 (29082;50592)	36322 (31160;45193)	0,430
AUC <sub>INS 0-240min</sub> (min*pmol/l)	45696 (2910)	44952 (2309)	0,638	42864 (37447;58395)	45172 (36714;53039)	0,812
AUC <sub>INS total</sub> (min*pmol/l)	55072 (3200)	54186 (2476)	0,604	54242 (41653; 66172)	54668 (42496; 64292)	0,956
AUC <sub>INS 0-tcinsmax</sub> (min*pmol/l)	13204 (1200)	15712 (1200)	0,041	11341 (9476; 14940)	15625 (11684; 18417)	0,02664
T <sub>AUC INS total 10%</sub> (min)	48,3 (2,8)	52,4 (2,8)	0,110	46,5 (36,3; 57,5)	53,3 (45,4; 60,8)	0,130
T <sub>AUC INS total 50%</sub> (min)	126,5 (7,3)	131,3 (6,8)	0,443	120,0 (102,5; 160,3)	130,3 (101,3; 151,3)	0,447

## 4 Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit war, die Bestimmung der Pharmakokinetik eines *mit unterschiedlichen Boluslängen* subkutan verabreichten schnell wirksamen Insulins (Insulin-Lispro).

Zur Erfassung der Pharmakokinetik wurden die Insulinkonzentrationen in den Plasmaproben, die während einer Glukose-Clamp-Untersuchungen abgenommen wurden, mit einer zuvor etablierten Messmethode bestimmt. Die mit dieser Methode erhaltenen Insulinkonzentrationen wurden statistisch ausgewertet und zusammengefasst.

### 4.1 Validierung der Insulinmessmethode

Auf Grund des Fehlens eines direkten Tests zur Insulin-Lispro-Messung wurde hier die Kombination zweier verschiedener ELISA-Kits verwendet. Diese Methode musste zunächst etabliert und validiert werden.

Die Wahl des ELISA-Kits fiel auf das Iso-Insulin-ELISA-Kit und Insulin-ELISA-Kit der Firma Mercodia. Nach den Angaben des Herstellers misst das erste die Gesamtinsulinkonzentration bzw. weist Kreuzreaktionen sowohl mit Humaninsulin als auch Insulinanaloga auf, wobei das zweite Kit nur Humaninsulin misst. Um die Selektivität und Sensitivität der beiden ELISA-Kits zu überprüfen, wurden Humaninsulin- und Insulin-Lispro-Standards mit verschiedenen Konzentrationen hergestellt und mit beiden Kits gemessen.

Aus den dabei erhaltenen Ergebnissen (Abb.16 und Abb.17) lässt sich schließen, dass das Insulin-ELISA-Kit selektiv für Humaninsulin ist und auch bei Anwesenheit von Insulin-Lispro in sehr hoher Konzentration (z.B. 600 pmol/l) keine Kreuzreaktion mit diesem Insulin aufweist. Das Iso-Insulin-ELISA-Kit wies hingegen für Humaninsulin und Insulin-Lispro eine gleich hohe Sensitivität auf, sodass bei vergleichbaren Humaninsulin- und Insulin-Lispro-Konzentrationen gleich hohe Absorptionswerte für Humaninsulin und Insulin-Lispro gefunden wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Berechnung der Insulin-Lispro-Konzentrationen durch Subtraktion der mit Insulin-

ELISA-Kit gemessenen Konzentrationswerte von denen, die mit Iso-Insulin-ELISA-Kit gemessen werden, gültig ist.

In der Studie von Lindström et al. [43], in der die hier verwendete Insulin-Messmethode das erste Mal beschrieben wurde, wurde eine vergleichbare Selektivität und Sensitivität der Iso-Insulin-ELISA- und Insulin-ELISA-Kits bezüglich des Humaninsulins und des Insulin-Lispro gezeigt.

Um die Höhe der Messvariabilität der beiden ELISA-Kits zu erfassen, wurde der Intra-Assay-Variationskoeffizient (CV) für die beiden ELISA-Kits bestimmt. Hierfür wurde die Messung der Insulinkonzentration in einer Plasmaprobe mit einem ELISA-Kit 12 Mal durchgeführt und der CV-Wert aus dem Mittelwert und Standardabweichung der Messergebnisse berechnet. Für das Iso-Insulin-ELISA-Kit ergab sich hierbei ein CV-Wert von 6,0% und für das Insulin-ELISA-Kit einer von 4,0%.

In Studien von Manley et al. [44], Robbins et al. [45] und Marcovina et al. [46] wurden mehrere ELISA-Kits zur Messung von Insulin hinsichtlich Genauigkeit und Präzision untereinander verglichen. In diesen Studien wurden für die ELISA-Kits Intra-Assay-CV-Werte im Bereich von 2 und 17% bestimmt. Die hier in dieser Arbeit gefundenen CV-Werte liegen vergleichsweise im unteren Wertebereich und zeigen, dass die Bestimmung der Insulinkonzentration mithilfe der beiden ELISA-Kits mit akzeptabler Präzision erfolgte.

#### ***4.1.1 Einfluss von wiederholten Gefrier-Auftau-Zyklen auf die Insulinkonzentration***

Um den Einfluss wiederholter Gefrier-Auftau-Zyklen auf die Insulinmessung zu erfassen, wurden Plasmaproben mehrmals aufgetaut und wieder eingefroren. Nach jedem Auftauen wurden dann mit dem Iso-Insulin-ELISA-Kit die Insulinkonzentration der Plasmaproben bestimmt. Der Vergleich der erhaltenen Insulinkonzentrationsverläufe zeigt (Abb.18), dass jeder Gefrier-Auftauzyklus ein starkes Abfallen der Absorptionswerte bzw. Insulinkonzentrationswerte bewirkt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ein wiederholtes Auftauen und Einfrieren der Plasmaproben vor der eigentlichen Messung des Insulins vermieden. Zudem wurden alle Plasmaproben eines Probanden gleichzeitig aufgetaut und die Messungen des Humaninsulins und Gesamtinsulins am selben Tag, ohne dazwischen die Plasmaproben wieder einzufrieren, durchgeführt.

Diese Vorgehensweise wurde bei den Plasmaproben jedes Probanden strikt eingehalten.

## **4.2 Kinetik der Insulinkonzentrationen im Plasma während der Glucose-Clamp-Untersuchung**

In dieser Arbeit wurden die Plasmakonzentrationen des Humaninsulins mit dem Insulin-ELISA-Kit und die des Gesamtinsulins mit dem Iso-Insulin-ELISA-Kit gemessen. Der Plasmakonzentrationswert des Insulin-Lispro wurde dann durch die Subtraktion der Humaninsulinwerte von den Gesamtinsulinwerten bestimmt.

### **4.2.1 Kinetik des Humaninsulins**

Humaninsulin wurde während der basalen Phase beider Clamp-Untersuchungen (d.h., ab der ~5. Stunde vor der Insulin-Lispro-Bolusgabe) intravenös infundiert. Die Infusionsrate war in der Zeitspanne von der 40. bis zur 10. Minute vor der Bolusgabe stabil. Die Insulininfusionsrate wurde dann zur Minute 10 vor der Bolusgabe auf 75% und zur Minute 5 vor der Bolusgabe auf 50% der ursprünglichen Rate reduziert. Zum Zeitpunkt der Bolusgabe wurde die Humaninsulin-Infusion gestoppt.

In den Abbildungen 19 und 20 sind die während der Clamp-Untersuchungen beobachteten, mittleren Humaninsulin-Konzentrationsverläufe dargestellt. Die erste Messung der Plasmakonzentration des Humaninsulins wurde für die Plasmaprobe durchgeführt, die noch während der konstanten intravenösen Humaninsulin-Infusion abgenommen wurde (d.h., 15 Minuten vor der Bolusgabe). Der bei dieser Plasmaprobe gemessene Konzentrationswert repräsentiert deshalb einen basalen „steady-state“-Wert. Man erkennt, dass während der ersten 30 Minuten nach dem Stoppen der Humaninsulin-Infusion die Plasmakonzentration des Humaninsulins rasch abgefallen ist. Zur Minute 30 nach dem Stoppen der Infusion war die durchschnittliche Humaninsulinkonzentration auf 50% des „steady-state“-Wertes gesunken. Danach erfolgte der Abfall der Plasmakonzentration relativ langsam. Die durchschnittliche Plasmakonzentration des Humaninsulins war am Ende der Clamp-Experimente (d.h.,

480 Minuten nach dem Stoppen der Insulininfusion) auf ~15% des „steady-state“-Wertes gesunken.

In früheren Studien bei denen die Plasmainsulinkonzentration nach dem Stoppen einer intravenösen Insulininfusion gemessen wurde, sind ähnliche Verläufe der Plasmainsulinkonzentration beobachtet worden [68,69].

Es ist bekannt, dass Insulin im Körper hauptsächlich von den Leber- und Nierenzellen abgebaut wird. Die anderen Zellen des Körpers, wie die Insulin-empfindlichen Muskel- und Fettzellen, tragen nur einen relativ geringen Teil zu diesem Abbau bei [70,71]. Es wurde auch gezeigt, dass bei Vorhandensein einer konstanten Plasmainsulinkonzentration ein großer Teil des Insulins sich in den interstitiellen Flüssigkeitsräumen peripherer Geweben, wie in der interstitiellen Flüssigkeit des Muskelgewebes, befindet [68,70,71]. Der Abfall der Plasmainsulinkonzentration nach dem Stoppen einer intravenösen Insulininfusion wird also hauptsächlich von der Höhe der Insulin-Abbauraten der Leber- und Nierenzellen wie auch der Höhe der Austauschraten des Insulins zwischen den interstitiellen Flüssigkeitsräumen und dem Blutplasma abhängen [68,70].

Weiters wurde gezeigt, dass der Plasmakonzentrationsabfall nach dem Stoppen einer intravenösen Insulininfusion am besten mithilfe von 3-Kompartimente-Modellen beschrieben werden kann [68,70,72]. Hierbei ist ein zentrales Kompartiment, das das Blutplasma repräsentiert, im Austausch mit zwei weiteren Flüssigkeits-Kompartimenten. Eines davon ist im schnellen Austausch mit dem Plasma-Kompartiment (Austausch-Halbwertszeiten von 1 – 15 min) und sollte den interstitiellen Flüssigkeitsraum gut durchbluteter Organe, wie den der Leber und Nieren, repräsentieren. Das andere Flüssigkeits-Kompartiment ist im langsamen Austausch mit dem Plasma-Kompartiment (Austausch-Halbwertszeiten von 50 – 130 min) und sollte den interstitiellen Flüssigkeitsraum schlechter durchbluteter Geweben, wie den der Muskel- und Fettgeweben repräsentieren [68]. Die erste Phase des beobachteten bi-phasigen Verlaufes des Plasmainsulinkonzentrations-Abfalles kann daher auf den raschen Abbau des sich im schnellen Kompartiment befindende Insulin zurückgeführt werden. Weiters kann die zweite, langsamere Phase dieses bi-phasigen Verlaufes mit dem relativ langsamen Übergang des Insulins vom peripheren Kompartiment ins Plasma-

Kompartiment und mit dem darauffolgenden Abbau dieses Insulins im schnellen Kompartiment erklärt werden.

Einen weiteren möglichen Einfluss auf den Verlauf des Konzentrationsabfalles nach dem Stoppen der Insulin-Infusion könnten auch eine Bauspeicheldrüsen-Restsekretion der Diabetespatienten und eine Insulinabsorption von subkutanen NPH-Insulin-Restdepots genommen haben. Dies könnte während der langsameren Phase des biphasigen Verlaufes den Konzentrationsabfall verlangsamt bzw. ein frühzeitigeres Erreichen des Nullniveaus verhindert haben (Abb.19-20).

#### **4.2.2 Kinetik des Gesamtinsulins**

Bei Betrachtung der mittleren Verläufe der Gesamtinsulinkonzentration und Humaninsulinkonzentration während der Clamp-Untersuchungen mit den langen und kurzen Bolus (Abb.19-20) ist erkennbar, dass die beiden Konzentrationsverläufe bis zum Zeitpunkt der Insulin-Lispro-Bolusgabe ( $t = 0$  min) überlappend waren. Dies lässt sich auf das ausschließliche Vorhandensein des Humaninsulins bis zum Zeitpunkt der Insulin-Lispro-Bolusgabe zurückführen.

Nach der subkutanen Bolusgabe des Insulin-Lispro ist jedoch ein schneller Anstieg der Gesamtinsulinkonzentration beobachtbar. Bei Vergleich der Abbildungen 19 und 20 erkennt man, dass bei der Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer die maximale Gesamtinsulinkonzentration nach ungefähr 60 Minuten und, bei der Bolusgabe mit langer Bolusdauer, diese erst nach 75 Minuten erreicht worden ist. Da die mittleren Humaninsulin-Konzentrationsverläufe bei den beiden Bolusgabearten vergleichbar waren (Abb.19-20), deuten diese unterschiedlichen Zeiten für das Erreichen der maximalen Gesamtinsulinkonzentration bereits darauf hin, dass die Absorption des Insulin-Lispro nach der Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer schneller von statten ging als im Falle der Bolusgabe mit langer Bolusdauer

### **4.2.3 Kinetik des insulin-Lispro**

Die mittleren Insulin-Lispro-Konzentrationsverläufe, die durch Differenzbildung zwischen den einzelnen Gesamtinsulin- und Humaninsulinkonzentrationsverläufen und durch darauf folgender Mittelung über die 20 Probanden errechnet worden sind, werden in Abbildung 21 für die beiden Bolusgabearten gezeigt. Man erkennt, dass – vergleichbar mit den Gesamtinsulin-Konzentrationsverläufen (Abb.19-20) - bei der Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer die maximale Insulin-Lispro-Konzentration schneller erreicht worden ist als bei der Bolusgabe mit langer Bolusdauer. Um die kinetischen Unterschiede zwischen den beiden Insulin-Lispro-Konzentrationsverläufen zu quantifizieren, wurden für jeden beobachteten Insulin-Lispro-Konzentrationsverlauf pharmakokinetische Parameter abgeleitet. Die Einzelwerte dieser Parameter sind im Appendix in den Tabellen 6-9 aufgelistet. Die Durchschnittswerte der Parameter sind in den Tabellen 4 und 5 zusammengefasst. Man erkennt, dass bei jenen pharmakokinetischen Parametern, die den Insulin-Lispro-Konzentrationsverlauf während der ersten 60 Minuten nach der Bolusgabe erfassen, die Unterschiede zwischen den mittleren Parameterwerten für die Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer und denen für die Bolusgabe mit langer Bolusdauer signifikant waren. Dies weist darauf hin, dass die Absorption des Insulin-Lispro nach der Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer schneller von statten ging als bei der Bolusgabe mit langer Bolusdauer.

Die Medianwerte bzw. Mittelwerte der Parameter, die die Zeitspannen bis zum Erreichen der maximalen Insulin-Lispro-Konzentration erfassen ( $t_{CINSmax10\%}$ ,  $t_{CINSmax50\%}$ ,  $t_{CINSmax}$ ), zeigen eine durchschnittliche zeitliche Differenz zwischen dem Anwachsen der Insulin-Lispro-Konzentration nach Bolusgabe mit kurzem Bolus und dem nach Bolusgabe mit langem Bolus von 5 - 15 Minuten (Tabelle 4). Wie wirken sich diese zeitlichen Unterschiede beim Anwachsen der Plasmainsulinkonzentration nach der Bolusgabe auf die Wirkungskinetik des Insulins aus (Pharmakodynamik)?

#### **4.2.4 Klinische Relevanz der langsameren Insulinabsorption bei der Bolusgabe mit langer Bolusdauer**

Die Analyse der beobachteten GIR-Verläufe ergab, dass das Anwachsen der Insulinwirkung bei der Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer viel schneller erfolgt als bei der Bolusgabe mit langer Bolusdauer [73,77]. Die Medianwerte bzw. Mittelwerte der Parameter, die die Zeitspannen bis zum Erreichen der maximalen Insulinwirkung erfassen ( $t_{GIRstart}$ ,  $t_{GIRmax10\%}$ ,  $t_{GIRmax50\%}$ ,  $t_{GIRmax}$ ), zeigten eine zeitliche Differenz zwischen dem Insulinwirkungsanstieg nach Bolusgabe mit kurzem Bolus und dem nach Bolusgabe mit langem Bolus von 13 - 30 Minuten. Zum Beispiel führte der kurze Bolus, im Vergleich zum langen Bolus, zu einem um 13 Minuten früheren Einsetzen der Insulinwirkung ( $t_{GIRstart}$ :  $21,0 \pm 2,5$  vs.  $34,3 \pm 2,7$  min;  $p < 0,002$ ). Weiters war die Zeit zum Erreichen von 50% der maximalen Insulinwirkung beim kurzen Bolus um 17,5 Minuten kürzer als beim langen Bolus ( $t_{GIRmax50\%}$ :  $49,9 \pm 3,5$  min vs.  $67,4 \pm 8,4$  min;  $p < 0,012$ ). Zudem trat die maximale Insulinwirkung beim kurzen Bolus um 27 min früher als beim langen Bolus auf ( $t_{GIRmax}$ :  $98 \pm 11$  min vs.  $125 \pm 16$  min;  $p < 0,005$ ).

Da die Analyse der Pharmakodynamik nicht Gegenstand dieser Diplomarbeit war, werden hier nur die wichtigsten pharmakodynamischen Parameterergebnisse erwähnt. Die gesamten pharmakodynamischen Resultate dieser Studie sind bzw. werden in anderen Veröffentlichungen detaillierter beschrieben [73,77].

In früheren Studien wurde gezeigt, dass bei subkutaner Injektion mittels Pen oder Spritze, schnell wirksame Insuline (Lispro, Aspart, Glulisine) eine viel schnellere Pharmakokinetik und Pharmakodynamik aufweisen als Humaninsulin [74,75]. Zum Beispiel wurde bei einer Studie, bei der die Absorptionskinetiken von subkutan injiziertem Insulin-Lispro, Insulin-Glulisine und Humaninsulin (0,2 IE/kg) verglichen worden sind, für das Humaninsulin ein  $t_{GIRmax}$ -Wert bestimmt, der um durchschnittliche 67% größer als der für Insulin-Lispro und Insulin-Glulisine war (161 vs. 94 vs. 98 min). In einer weiteren Studie, bei der die subkutane Absorption von Insulin-Aspart und Humaninsulin (0,2 IE/kg) verglichen worden ist, wurde für das Humaninsulin ein  $t_{GIRmax}$ -Wert bestimmt, der um ungefähr 50% größer als der für Insulin-Aspart war (156 vs. 104 min). Aus diesen sehr guten subkutanen Absorptionseigenschaften ergibt sich der wesentliche Vorteil, dass die drei Insulin-Analoga kurz vor der Einnahme einer Mahlzeit

verabreicht werden können. Das Humaninsulin sollte jedoch ungefähr 30 Minuten vor einer Mahlzeit injiziert werden, um nach der Mahlzeit eine mit den drei Insulin-Analoga vergleichbare Kontrolle der Glukose zu erreichen [76].

Ein Vergleich der pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Ergebnisse der jetzigen Studie mit denen der früheren Insulin-Analoga-Studien zeigt, dass nach Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer, die Absorptionseigenschaften von schnell wirksamen Insulin ähnlich sind wie die von schnell wirksamen Insulin nach der Gabe mit konventionellem Insulin-Pen oder Insulinspritze. In der jetzigen Studie ist beispielsweise der mittlere  $t_{GIRmax}$ -Wert, der für die Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer bestimmt worden ist (98 min), sehr gut vergleichbar mit den mittleren  $t_{GIRmax}$ -Werten, die für die Insulinanaloga nach subkutaner Gabe mit Insulin-Pen oder Insulinspritze gefunden worden sind (Lispro: 94 min; Glulisine: 98 min; Aspart: 104 min) [74,75]. Der für die Bolusgabe mit langer Bolusdauer bestimmte  $t_{GIRmax}$ -Wert (125 min) ist jedoch um ungefähr 30% größer als die für die drei Insulinanaloga gefundenen Werte.

Daraus lässt sich schließen, dass bei der Bolusgabe von schnell wirksamen Insulinen mit langer Bolusdauer die subkutane Absorption wesentlich verlangsamt wird und die Formen der erhaltenen Plasmakonzentrationsverläufe und Wirkungskinetiken sich denen von subkutan injiziertem Humaninsulin annähern. Um die sehr vorteilhaften subkutanen Absorptionseigenschaften von schnell wirksamen Insulinen bei der Verabreichung mit Insulinpumpen zu bewahren, sollte daher die Bolusgabe generell mit kurzer Bolusdauer (z.B. 30 Sekunden) durchgeführt werden. Bei Verwendung einer langen Bolusdauer müsste zum Ausgleich ein signifikanter zeitlicher Abstand zwischen Insulin-Bolusgabe und Einnahme eines Mahles eingehalten werden. Dies würde zu einer Einbuße an Flexibilität bei der Diabetestherapie und zu einem Verlust an der mit der Einführung von schnell wirksamen Insulinen gewonnenen Lebensqualität führen.

#### **4.2.5 Ursachen für die langsamere Insulinabsorption nach Bolusgabe mit langer Bolusdauer**

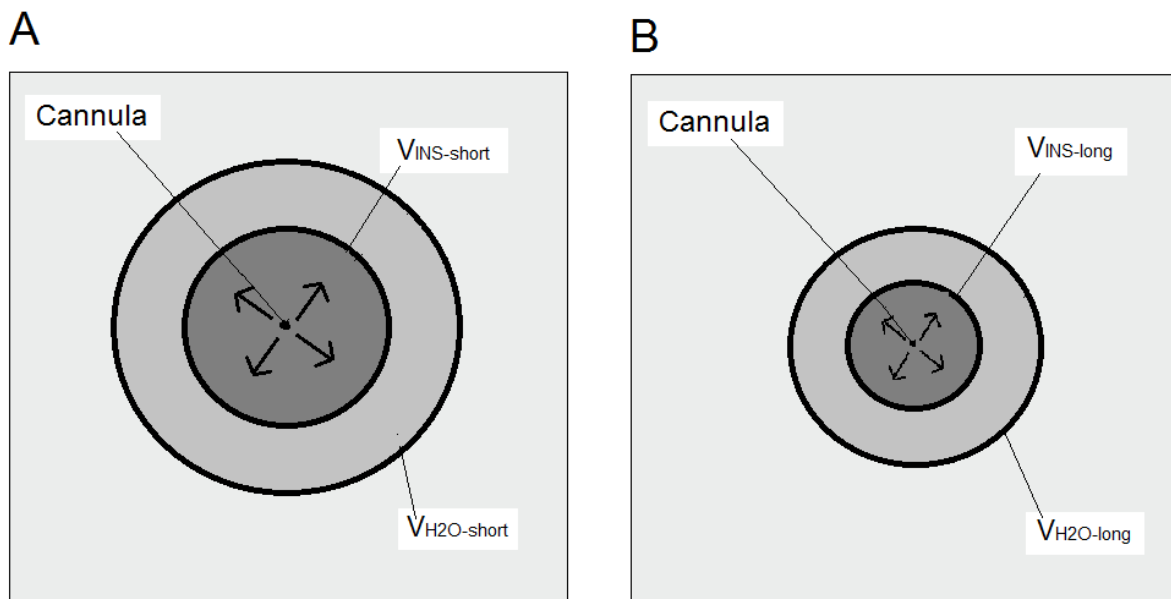
Die hier gemachte Beobachtung, dass bei Bolusgabe von schnell wirksamen Insulin die subkutane Absorption des Insulins von der Bolusdauer signifikant beeinflusst wird, stimmt mit den Ergebnissen zweier früherer Studien überein, bei denen die Auswirkung der Bolusdauer auf die subkutane Absorption von porcinen Insulin untersucht worden ist [41,78]. In einer dieser zwei Studien [41] wurde bei gesunden Probanden ein Bolus von 10 IE einmal über 5 Minuten und einmal über 30 Minuten subkutan verabreicht. In der anderen Studie wurden ~8 IE des porcinen Insulins bei gesunden Probanden einmal als rasche Injektion mit Insulin-Spritze und ein anderes Mal über 17 Minuten als Bolus mittels Insulinpumpe abgegeben [78]. Bei beiden Studien wurde das mit langer Boluslänge abgegebene Insulin langsamer absorbiert, als das mit kürzerer Boluslänge [41,78]. Diese Beobachtungen sind aber in einem scheinbaren Widerspruch zu den Ergebnissen einer Studie von Hildebrandt et al. [54] welche den Einfluss der Injektionsgeschwindigkeit auf die subkutane Absorption von porcinen Insulin bei Typ 1-Diabetikern untersucht haben. In dieser Studie wurde porcines Insulin in der Menge von 10 IE einmal über 30 Sekunden, 3 Sekunden und <1 Sekunde mittels einer Insulin-Spritze ins subkutane Fettgewebe injiziert. Hierbei wurde kein Einfluss der unterschiedlichen Boluslängen auf die subkutane Absorption des porcinen Insulins festgestellt [54].

Die jetzigen und früheren Beobachtungen weisen also darauf hin, dass Variationen der Boluslänge zwischen 30 Sekunden und 30 Minuten die subkutane Insulinabsorption beeinflussen. Variationen der Boluslänge zwischen 0 und 30 Sekunden wirken sich hingegen nicht auf die subkutane Insulinabsorption aus.

Dieser beobachtete Zusammenhang zwischen der Boluslänge und dem Ausmaß der Verlangsamung der subkutanen Insulinabsorption könnte mit den subkutanen Absorptionseigenschaften von Wasser erklärt werden. Wasser ist das in den Insulinformulierungen verwendete Lösungsmittel. In früheren Studien wurde gezeigt, dass die Absorption von subkutan injiziertem Wasser (Molekulargewicht: 18) oder Natrium (Molekulargewicht: 23) sehr schnell im Vergleich zu der Absorption von größeren Molekülen ist (z.B.: Insulin mit einem Molekulargewicht von 6000) [53,79]. So sind innerhalb von 5 Minuten nach erfolgter Injektion ungefähr 70% des injizierten

Wassers in den Blutstrom absorbiert worden [53]. Weiters waren innerhalb von 10 Minuten nach der Injektion ungefähr 50% des injizierten Natriums ins Gefäßsystem aufgenommen worden [79]. Angesichts dieser Absorptionseigenschaften, ist es deshalb sehr wahrscheinlich, dass während der Bolusgabe mit langer Bolusdauer (z.B.: 10 Minuten), die Flüssigkeitsabsorption sehr groß ist, was eine geringere konvektive Flüssigkeitsausbreitung am Infusionsort zur Folge hat (Abb.22B). Da die Kapillarwände zudem eine sehr geringe Permeabilität für Insulin aufweisen (d.h., der Reflexionskoeffizient des subkutanen Gefäßsystems ist für Insulin sehr hoch [80]), werden sich die Insulinmoleküle hauptsächlich in der näheren Umgebung des Infusionsortes anhäufen. Während der Bolusgabe mit kurzer Bolusdauer (z.B.: <1 Minute) ist die Flüssigkeitsabsorption hingegen sehr klein, sodass eine höhere konvektive Flüssigkeitsausbreitung um den Infusionsort verursacht wird, was dann eine größere Volums-Ausbreitung des Insulins im Gewebe um den Infusionsort zur Folge hat (Abb.22A). Durch ein größeres Verteilungsvolumen kommen die Insulinmoleküle jedoch mit einer größeren Anzahl von Kapillaren in Kontakt, wodurch die Absorption der eingebrachten Insulinmoleküle schneller von statten geht.

Die unterschiedlichen Absorptionskinetiken, die nach der Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer beobachtet worden sind, könnten also durch die unterschiedlichen Insulin-Verteilungsvolumina, die nach der Bolusgabe mit kurzer und langer Bolusdauer entstehen, erklärt werden.



**Abbildung 22: Modell der Insulin- und Wasserausbreitung im Gewebe nach Bolusgabe mit kurzer (A) und langer (B) Boluslänge** [nach 77].

Aufgrund der schnellen Absorption des Lösungsmittels (Wasser) vom Gewebe in den Blutstrom und des sehr hohen Reflexionskoeffizienten der subkutanen Gefäße für Insulin, ist das Insulin-Verteilungsvolumen im Gewebe nach Bolusgabe über 30 Sekunden ( $V_{INS-short}$ ; **A**) wesentlich größer als bei Bolusgabe über 10 Minuten ( $V_{INS-long}$ ; **B**). Durch das größere Verteilungsvolumen im Gewebe, kommen mehr Kapillaren mit den Insulinmolekülen in Kontakt, was zu einer erhöhten Insulinabsorption führt. Die dargestellten Unterschiede im Verteilungsvolumen des Lösungsmittels ( $V_{H_2O}$ ) und des Insulins ( $V_{INS}$ ) kann durch die Retardation des Insulins im interstitiellen Raum des Gewebes verursacht werden [80].

#### 4.2.6 Schlussfolgerungen

Von den jetzigen Beobachtungen und den Beobachtungen von früheren Studien kann geschlossen werden, dass bei Bolusgabe mit einer Bolusdauer, die kleiner als 1 Minute ist, die Absorptionseigenschaften von schnell wirksamen Insulinen ähnlich sind wie die von schnell wirksamen Insulinen nach der Gabe mit konventionellem Insulin-Pen oder Insulinspritze. Bei der Bolusgabe von schnell wirksamen Insulinen mit einer Bolusdauer, die mehrere Minuten beträgt, wird hingegen die subkutane Absorption wesentlich verlangsamt, und die erhaltenen Formen der Plasmakonzentrationsverläufe und Wirkungskinetiken nähern sich denen von subkutan injiziertem Humaninsulin an.

Um die sehr vorteilhaften subkutanen Absorptionseigenschaften von schnell wirksamen Insulinen bei der Verabreichung mit Insulinpumpen zu bewahren, sollte daher die

Bolusgabe generell mit Bolusdauern durchgeführt werden, die die Länge von 1 Minute nicht übersteigen.

Insulinpumpen mit kurzer Bolusdauer werden von den Firmen Roche, Nipro und Animas hergestellt. Die Insulinpumpe von der Firma Animas wurde in der jetzigen Studie eingesetzt, und braucht 2 Sekunden um 1 IE abzugeben [40]. Die Insulinpumpen von den Firmen Roche und Nipro geben 1 IE über 5 Sekunden ab [40]. Bei diesen Insulinpumpen wird bei der Abgabe von typischen Bolusmengen von 10-20 IE die empfohlene Bolusdauer von einer Minute nicht wesentlich überschritten.

Insulinpumpen mit relativ langer Bolusdauer werden von den Firmen Insulet, Tandem und Medtronic Minimed hergestellt. Die Insulinpumpe von der Firma Medtronic Minimed wurde in der jetzigen Studie eingesetzt. Sie gibt 1 IE über 40 Sekunden ab [40]. Die Insulinpumpen von den Firmen Insulet und Tandem brauchen 40 Sekunden bzw. 30 Sekunden um 1 IE abzugeben [40]. Bei diesen Insulinpumpen wird jedoch bei der Abgabe von typischen Bolusmengen von 10-20 IE die empfohlene Bolusdauer von einer Minute weit überschritten.

Um die subkutane Absorption von Insulinen nach der Bolusgabe mit Insulinpumpen nicht zu verlangsamen, empfehlen wir daher, die Zeit für die Abgabe von 1 IE bei Insulinpumpen generell auf 1-5 Sekunden zu standardisieren. Durch eine solche Maßnahme würde die subkutane Absorption von Insulinen, die mit Insulinpumpen verabreicht werden, mit kleineren Variationen behaftet sein und vergleichbar mit jener Insulin-Absorption sein, die nach Gabe mit konventionellem Insulin-Pen oder Insulinspritze beobachtbar ist.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Daneman D. Type 1 diabetes. *Lancet*. 2006;367:847-858.
2. Elbelt U, Quinkler M, Strasburger CJ. Diabetes mellitus. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, (Hrsg.). *Harrisons Innere Medizin Band 2*. 17. Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2008:2808-2844.
3. Rinninger F, Greten H. Glukosestoffwechsel. In: Greten H, Rinninger F, Greten T. *Innere Medizin*. 13. Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2010:602-646.
4. Owens DR. New horizons-alternative routes for insulin therapy. *Nat Rev Drug Discov*. 2002 Jul;1(7):529-40.
5. Owens DR, Zinman B, Bolli GB. Insulins today and beyond. *Lancet*. 2001 Sep 1;358(9283):739-46.
6. Hirsch IB. Insulin analogues. *N Engl J Med*. 2005 Jan 13;352(2):174-83.
7. Gaehtgens P, Ehmke H. Das Kreislaufsystem. In: Klinker R, Pape HC, Silbernagl S. *Physiologie*. 5.Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2005:175-222.
8. Jansson L, Carlsson PO. Graft vascular function after transplantation of pancreatic islets. *Diabetologia*. 2002 Jun;45(6):749-63.
9. NA. Pancreatic Health Center. Verfügbar unter: <http://www.pancreatichealthcenter.com/> [09.04.2013].
10. Bardeesy N, DePinho RA. Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer* 2. 2002 Dec; 897-909. Verfügbar unter: [http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n12/fig\\_tab/nrc949\\_F1.html](http://www.nature.com/nrc/journal/v2/n12/fig_tab/nrc949_F1.html) [26.08.2013].

11. NA. Capillary type. Verfügbar unter:  
<http://www.udel.edu/biology/Wags/histopage/vascularmodelingpage/circsystempage/capillaries/largegifs/capillarytypeslarge.gif> [26.08.2013].
12. Weiss L. Cell and tissue biology: A textbook of histology. 6. Auflage. Baltimore: Urban Schwarzenberg; 1988:381. Verfügbar unter:  
[http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm\\_histology\\_old/lab/lab07\\_micrograph.html](http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm_histology_old/lab/lab07_micrograph.html) [26.08.2013].
13. Gerich JE. Novel Insulin: Expanding Options in Diabetes Management. Am J Med. 2002 Sep;113(4):308-16.
14. Barnett AH, Owens DR. Insulin analogs. Lancet. 1997 Jan 4;349(9044):47-51.
15. Rosak C. Insulin analogs: structure, properties and therapeutic indications. Part 1: rapid-acting insulin analogs. [Article in German]. Internist (Berl). 2001 Nov;42(11):1523-35.
16. Yaturu S. Insulin therapies: Current and future trends at dawn. World J Diabetes. 2013 Feb 15;4(1):1-7.
17. Selam JL. Evolution of Diabetes Insulin Delivery Devices. J Diabetes Sci Technol. 2010 May 1;4(3):505-13.
18. Pickup JC. Insulin-pump therapy for type 1 diabetes mellitus. N Engl J Med. 2012 Apr 26;366(17):1616-24.
19. Klinkert C, Quester W. Insulin pump treatment in type 1 diabetes mellitus. [Article in German]. Dtsch Med Wochenschr. 2004 May 14;129(20):1149-54.
20. Jeandidier N, Riveline JP, Tubiana-Rufi N, Vambergue A, Catargi B, Melki V, Charpentier G, Guerci B. Treatment of diabetes mellitus using an external insulin pump in clinical practice. Diabetes Metab. 2008 Sep;34(4 Pt 2):425-38.
21. Binder C, Lauritzen T, Faber O, Pramming S. Insulin pharmacokinetics. Diabetes Care. 1984 Mar-Apr;7(2):188-99.

22. Linde B. The Pharmacokinetics of Insulin. In: Pickup J, Gareth W. Textbook of Diabetes. London: Blackwell Scientific Pub; 1991: 371-383.
23. Guerci B, Sauvanet JP. Subcutaneous insulin: pharmacokinetic variability and glycemic variability. Diabetes Metab. 2005 Sep;31(4 Pt 2):4S7-4S24.
24. Hildebrandt P. Subcutaneous absorption of insulin in insulin-dependent diabetic patients. Influence of species, physico-chemical properties of insulin and physiological factors. Dan Med Bull. 1991 Aug;38(4):337-46.
25. Rossel S, Belfrange E. Blood circulation in adipose tissue. Physiol Rev. 1979 Oct;59(4):1078-1104.
26. Bäcker U. Warum gibt es immer mehr Zuckerkrankte? Allgäuer Zeitung. 2013 Sept. Verfügbar unter: [http://www.allgaeuer-anzeigeblatt.de/index.shtml?aa\\_lokales&press=0000015817](http://www.allgaeuer-anzeigeblatt.de/index.shtml?aa_lokales&press=0000015817) [01.09.2013].
27. NA. Fettgewebe. Der Mensch-Der Körper. Verfügbar unter: <http://www.der-mensch.net/gewebe/fettgewebe/> [02.09.2013]
28. Brehm A, Roden M. Glucose Clamp Techniques. In: Roden M, Ed. Clinical Diabetes Research: Methods and Techniques. New York: John Wiley & Sons, Ltd. 2007:43-76.
29. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. Am J Physiol. 1979 Sep;237(3):E214-23.
30. Wu AH. A selected history and future of immunoassay development and applications in clinical chemistry. Clin Chim Acta. 2006 Jul 23;369(2):119-24.
31. Darwish IA. Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances. Int J Biomed Sci. 2006 Sep;2(3):217-35.
32. Berson SA, Yalow RS. General principles of radioimmunoassay. 1968. Clin Chim Acta. 2006 Jul 23;369(2):125-43. Epub 2006 Jun 16.

33. Renard E. Insulin delivery route for the artificial pancreas: subcutaneous, intraperitoneal, or intravenous? Pros and cons. *J Diabetes Sci Technol*. 2008 Jul;2(4):735-8.
34. Pitt HA, Saudek CD, Zacur HA. Long-term intraperitoneal insulin delivery. *Ann Surg*. 1992 Oct;216(4):483-91; discussion 491-2.
35. van Dijk PR, Logtenberg SJ, Groenier KH, Haveman JW, Kleefstra N, Bilo HJ. Complications of continuous intraperitoneal insulin infusion with an implantable pump. *World J Diabetes*. 2012 Aug 15;3(8):142-8.
36. Engwerda EE, Abbink EJ, Tack CJ, de Galan BE. Improved pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of rapid-acting insulin using needle-free jet injection technology. *Diabetes Care*. 2011 Aug;34(8):1804-8.
37. Khanna P, Strom JA, Malone JI, Bhansali S. Microneedle-based automated therapy for diabetes mellitus. *J Diabetes Sci Technol*. 2008 Nov;2(6):1122-9.
38. Ito Y, Nakahigashi T, Yoshimoto N, Ueda Y, Hamasaki N, Takada K. Transdermal insulin application system with dissolving microneedles. *Diabetes Technol Ther*. 2012 Oct;14(10):891-9.
39. Edsberg B, Herly D, Hildebrandt P, Kühl C. Insulin bolus given by sprinkler needle: effect on absorption and glycaemic response to a meal. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1987 May 30;294(6584):1373-6.
40. NA. Insulin Pumps. Diabetes Health. Verfügbar unter: <http://diabeteshealth.com/media/pdfs/PRG0113/InsulinPumps.pdf>. [02.08.2013]
41. Chisholm DJ, Kraegen EW, Zelenka GS. Programming of insulin delivery with meals during subcutaneous insulin infusion. *Diabetes Care*. 1981 Mar-Apr;4(2):265-8.
42. Elbelt U, Quinkler M, Strasburger CJ. Hypoglykämie. In: Dietel M, Suttorp N, Zeitz M, (Hrsg.). *Harrisons Innere Medizin Band 2*. 17. Auflage. Berlin: ABW Wissenschaftsverlag; 2008:2845-2851.

43. Lindström T, Hedman CA, Arnqvist HJ. Use of a novel double-antibody technique to describe the pharmacokinetics of rapid-acting insulin analogs. *Diabetes Care*. 2002 Jun;25(6):1049-54.
44. Manley SE, Stratton IM, Clark PM, Luzio SD. Comparison of 11 human insulin assays: implications for clinical investigation and research. *Clin Chem*. 2007 May;53(5):922-32.
45. Robbins DC, Andersen L, Bowsher R, Chance R, Dinesen B, Frank B, Gingerich R, Goldstein D, Widemeyer HM, Haffner S, Hales CN, Jarett L, Polonsky K, Porte D, Skyler J, Webb G, Gallagher K. Report of the American Diabetes Association's Task Force on standardization of the insulin assay. *Diabetes*. 1996 Feb;45(2):242-56.
46. Marcovina S, Bowsher RR, Miller WG, Staten M, Myers G, Caudill SP, Campbell SE, Steffes MW; Insulin Standardization Workgroup. Standardization of insulin immunoassays: report of the American Diabetes Association Workgroup. *Clin Chem*. 2007 Apr;53(4):711-6.
47. Toutain PL, Bousquet-Mélou A. Plasma terminal half-life. *J Vet Pharmacol Ther*. 2004 Dec;27(6):427-39.
48. Valera Mora ME, Scarfone A, Calvani M, Greco AV, Mingrone G. Insulin clearance in obesity. *J Am Coll Nutr*. 2003 Dec;22(6):487-93.
49. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG. Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev*. 1998 Oct;19(5):608-24.
50. Thorsteinsson B. Kinetic models for insulin disappearance from plasma in man. *Dan Med Bull*. 1990 Apr;37(2):143-53.
51. Home PD. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rapid-acting insulin analogues and their clinical consequences. *Diabetes Obes Metab*. 2012 Sep;14(9):780-8.

52. Muchmore DB, Vaughn DE. Review of the mechanism of action and clinical efficacy of recombinant human hyaluronidase coadministration with current prandial insulin formulations. *J Diabetes Sci Technol*. 2010 Mar 1;4(2):419-28.
53. Secher-Hansen E. Studies on the subcutaneous absorption in mice. VII. Absorption of  $^3\text{H}_2\text{O}$  and  $^{14}\text{C}$ -sucrose from non-buffered solutions at different pH values. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*. 1970;28(2):97-101.
54. Hildebrandt P, Sestoft L, Nielsen SL. The absorption of subcutaneously injected short-acting soluble insulin: influence of injection technique and concentration. *Diabetes Care*. 1983 Sep-Oct;6(5):459-62.
55. Voigt K. Endokrines System. In: Klinke R, Pape HC, Silbernagl S. *Physiologie*. 5. Auflage. Stuttgart New York: Georg Thieme Verlag; 2005:509-560.
56. Jansson L. The regulation of pancreatic islet blood flow. *Diabetes Metab Rev*. 1994 Dec;10(4):407-16.
57. Boland E, Monsod T, Delucia M, Brand CA, Fernando S, Tamborlane WV. Limitations of conventional methods of self-monitoring of blood glucose: lesson learned from 3 days of continuous glucose sensing in pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2001 Nov; 24(11):1888-62.
58. Zinman B. Newer insulin analogs: advances in basal insulin replacement. *Diabetes Obes Metab*. 2013 Mar; 15 Suppl 1:6-10.
59. Heinemann L, Nosek L, Flacke F, Albus K, Krasner A, Pichotta P, Heise T, Steiner S. U-100, pH-Neutral formulation of VIAject: faster onset of action than insulin lispro in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Obes Metab*. 2012 Mar; 14(3):222-7.
60. Heinemann L. New ways of insulin delivery. *Int Clin Pract Suppl*. 2011 Feb; (170):31-46.
61. Clodi M. Diabetes mellitus Typ2: ÖGD-Therapieleitlinien 2012: Was ist neu? Die Fachzeitschrift der österreichischen Gesellschaft für Innere Medizin: Universum Innere Medizin. Sonderbeilage. 2013 Mai; 10-11.

62. Fawcett DW. The cell: An atlas of fine structure. Philadelphia: WB Saunders; 1966:403. Verfügbar unter: [http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm\\_histology\\_old/lab/lab07\\_micrograph.html](http://www.columbia.edu/itc/hs/medical/sbpm_histology_old/lab/lab07_micrograph.html) [02.09.2013].
63. van Dijk P. Intraperitoneal Insulin. Diapedia The living Textbook of Diabetes. 2013 May. Verfügbar unter: <http://www.diapedia.org/type-1-diabetes-mellitus/intraperitoneal-insulin> [02.09.2013].
64. NA. Gestational Diabetes During Pregnancy. Typefree Diabetes. Verfügbar unter: <http://www.typefreediabetes.com/Articles.asp?ID=150> [02.09.2013].
65. Sircus M. Principles and Practice of Transdermal Medicine. National Health Federation. 2008 Jul. Verfügbar unter: <http://www.thenhf.com/article.php?id=579> [02.09.2013].
66. Stendhal C. Mini Med Diabetes Pump Information. eHOW. Verfügbar unter: [http://www.google.de/imgres?start=145&hl=hr&biw=1366&bih=569&tbnid=YNgBIPLNpzc1tM:&imgrefurl=http://www.ehow.com/facts\\_5201082\\_minimized-diabetes-pump-information.html&docid=5Depx4TR7AMkIM&imgurl=http://img.ehowcdn.com/og-image-tag/ehow/images/a04/un/5q/minimed-diabetes-pump-information-800x800.jpg&w=180&h=180&ei=KO4jUqfFloXMsgaGqIGoAQ&zoom=1&iact=hc&vpx=289&vpy=320&dur=843&hovh=144&hovw=144&tx=88&ty=124&page=6&tbnh=144&tbnw=144&ndsp=31&ved=1t:429,r:53,s:100,i:163](http://www.google.de/imgres?start=145&hl=hr&biw=1366&bih=569&tbnid=YNgBIPLNpzc1tM:&imgrefurl=http://www.ehow.com/facts_5201082_minimized-diabetes-pump-information.html&docid=5Depx4TR7AMkIM&imgurl=http://img.ehowcdn.com/og-image-tag/ehow/images/a04/un/5q/minimed-diabetes-pump-information-800x800.jpg&w=180&h=180&ei=KO4jUqfFloXMsgaGqIGoAQ&zoom=1&iact=hc&vpx=289&vpy=320&dur=843&hovh=144&hovw=144&tx=88&ty=124&page=6&tbnh=144&tbnw=144&ndsp=31&ved=1t:429,r:53,s:100,i:163). [02.09.2013].
67. Shippel J. Insulin Pumps Equal Flexibility and Accuracy for People with Diabetes. Diabetes Pharmacist. 2013 Mar. Verfügbar unter: <http://www.diabetespharmacist.com/tags/diabetes/> [15.04.2013]
68. Shervin RS, Kramer KJ, Tobin JD, Insel PA, Liljenquist JE, Berman M, Andres R. A model of the kinetics of insulin in man. J Clin Invest. 1974 May; 53(5):1481-92.
69. Chisholm DJ, Kraegen EW, Hewett MJ, Furler S. Low subcutaneous degradation and slow absorption of insulin in insulin-dependent diabetic patients during

- continuous subcutaneous insulin infusion at basal rate. *Diabetologia*. 1984 Aug; 27(2):238-41.
70. Turnheim K, Waldhäusl WK. Essentials of insulin pharmacokinetics. *Wien Klin Wochenschr*. 1988 Feb 5; 100(3):65-72.
71. Mosekilde E, Jensen KS, Binder C, Pramming S, Thorsteinsson B. Modeling absorption kinetics of subcutaneous injected soluble insulin. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1989 Feb; 17(1):67-87.
72. Silvers A, Swenson RS, Farquhar JW, Reaven GM. Derivation of a three compartment model describing disappearance of plasma insulin-131-I in man. *J Clin Invest*. 1969 Aug; 48(8):1461-9.
73. Regittnig W, Urschitz M, Lehki B, Mader J, Ehrmann M, Kojzar H, Ellmerer M, Pieber TR. Absorption Kinetics of Insulin Following Subcutaneous Bolus Administration with Different Bolus Durations. *Diabetes*. 2013 July; 62(1): A247.
74. Becker RHA, Frick AD. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of insulin glulisine. *Clin Pharmacokinetic* 2008; 47:7-20
75. Heinemann L, Weyer C, Rauhaus M, Heinrichs S, Heise T. Variability of the metabolic effect of soluble insulin and rapid-acting insulin analog insulin aspart. *Diabetes Care* 1998; 21:9110-1914
76. Home PD. The pharmacokinetics and pharmacodynamics of rapid-acting insulin analogues and their clinical consequences. *Diabetes Obes Metab* 2012; 14:780-788
77. Regittnig W, Urschitz M, Lehki B, Mader J, Ehrmann M, Kojzar H, Ellmerer M, Pieber TR. Insulin Bolus Delivery in Type 1 Diabetic Patients: Effect of Bolus Delivery Speed on Insulin Absorption from Subcutaneous Tissue. (Manuskript submitted)
78. Home PD, Pickup JC, Keen H, Alberti KG, Parson JA, Binder C. Continuous subcutaneous insulin infusion: Comparison of plasma insulin profiles after infusion or bolus injection of the mealtime dose. *Metabolism* 1981;30:439-442

79. Forbes GB, Deisher RW, Perley AM, Hartmann AF: Effect of hyaluronidase on the subcutaneous absorption of electrolytes in humans. *Science* 1950;111:177-179.
80. Michel CC. Transport of macromolecules through microvascular walls. *Cardiovasc Res* 1996;32:644-653

# Anhang

Abbildung 23: Subject 1

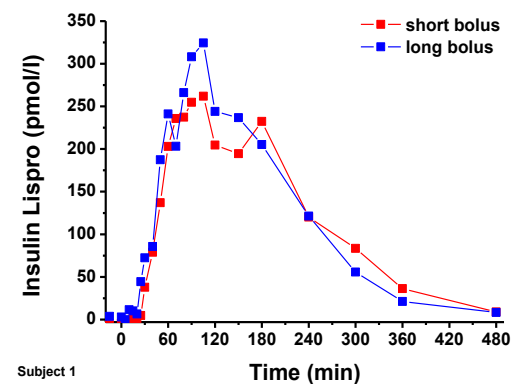
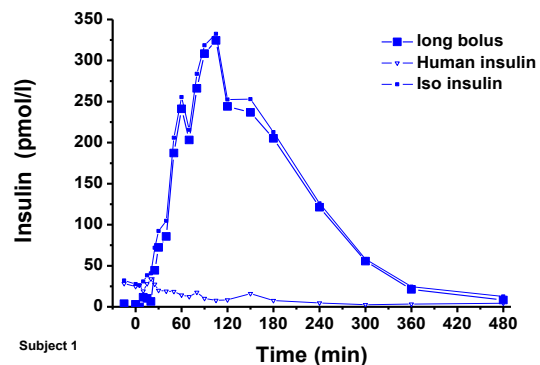
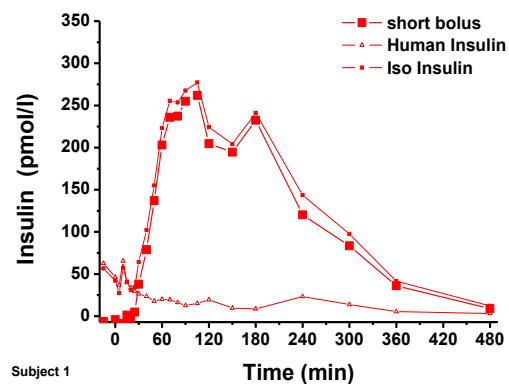


Abbildung 24: Subject 3

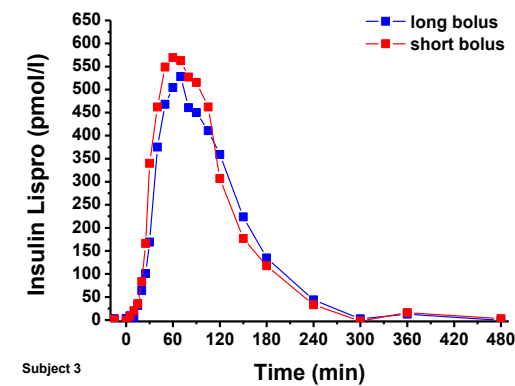
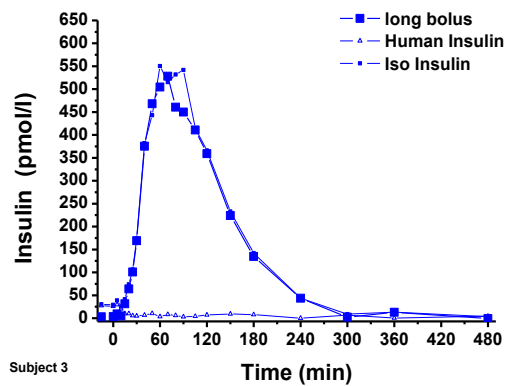
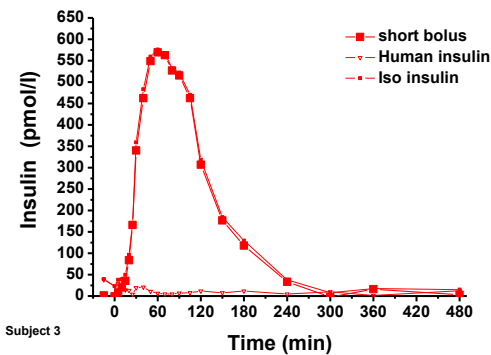
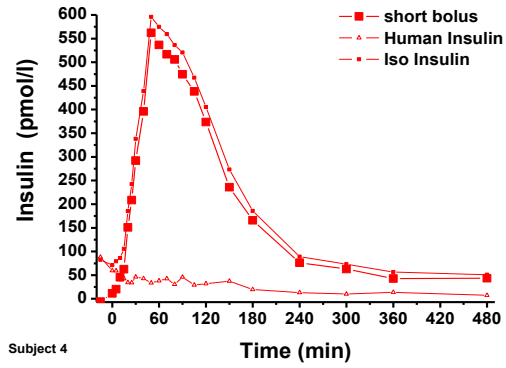
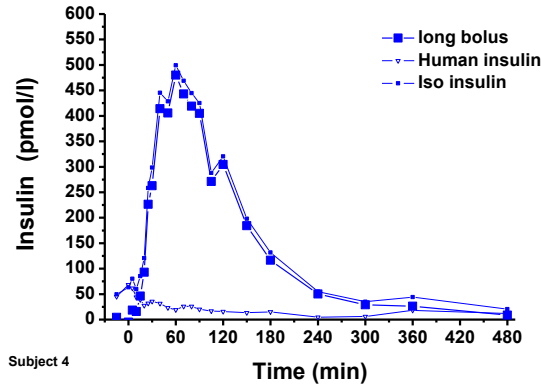


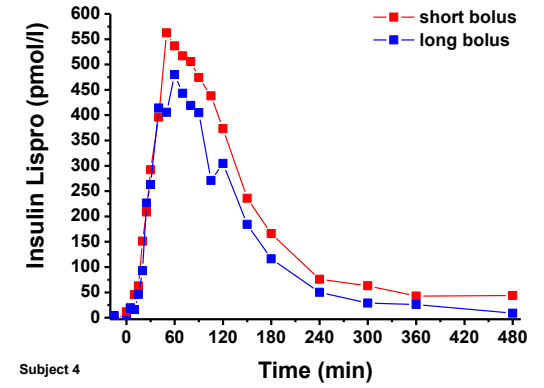
Abbildung 25: Subject 4



Subject 4

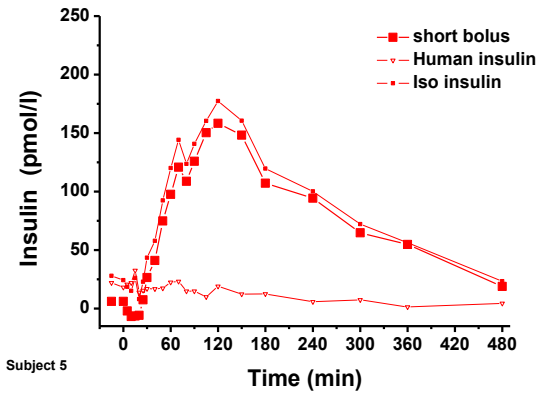


Subject 4

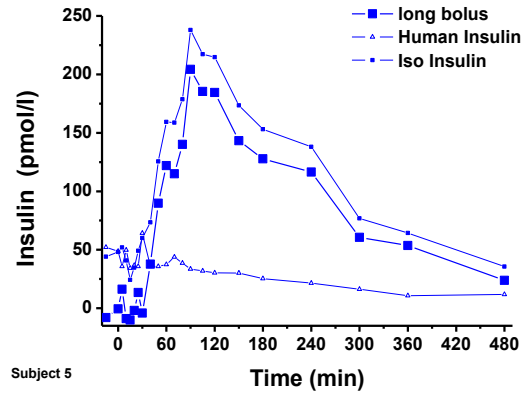


Subject 4

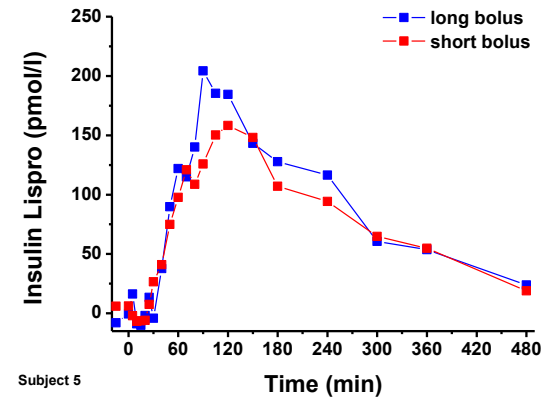
Abbildung 26: Subject 5



Subject 5



Subject 5



Subject 5

Abbildung 27: Subject 6

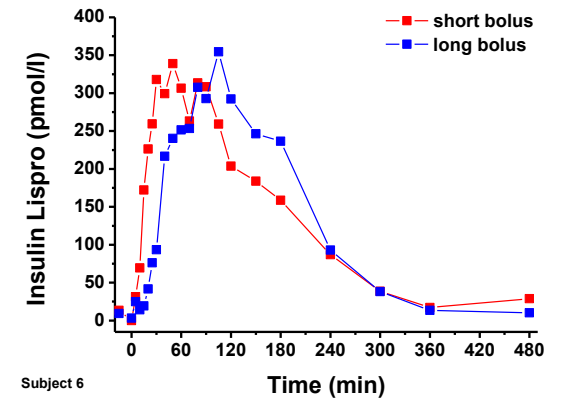
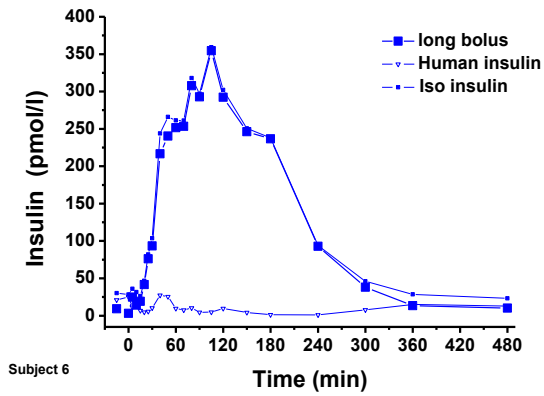
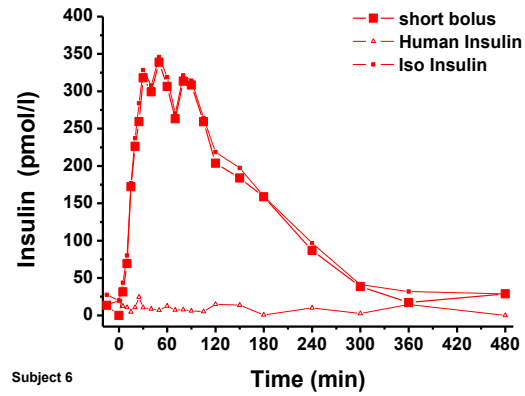


Abbildung 28: Subject 7

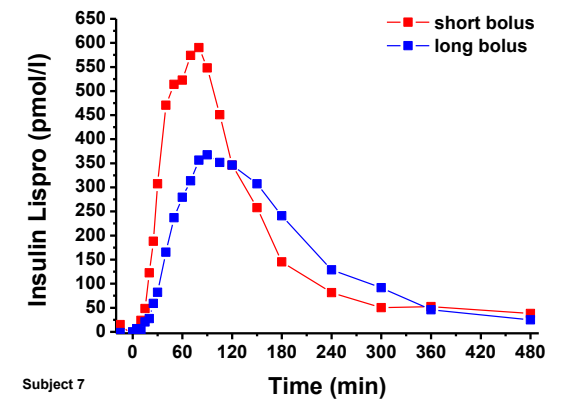
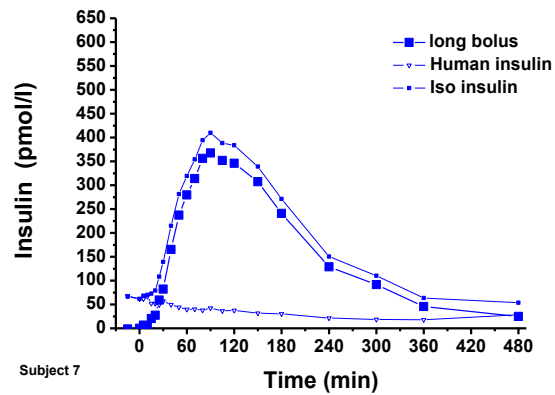
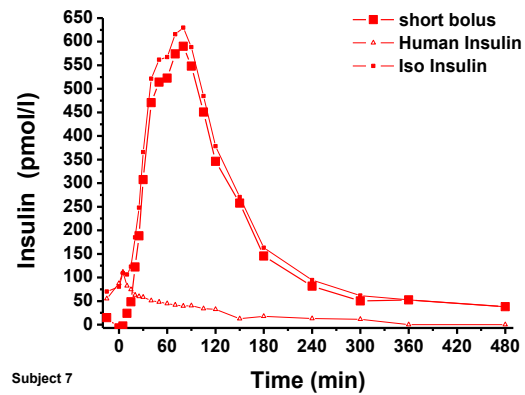


Abbildung 29: Subject 8

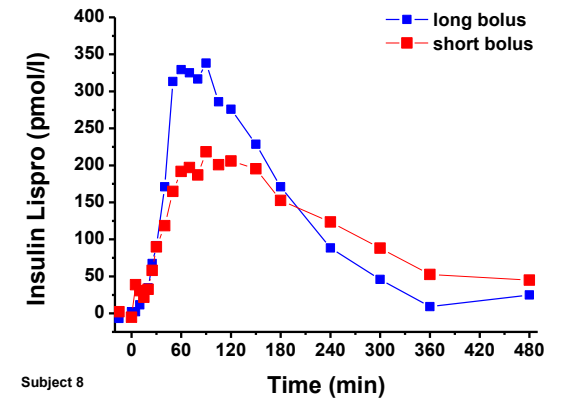
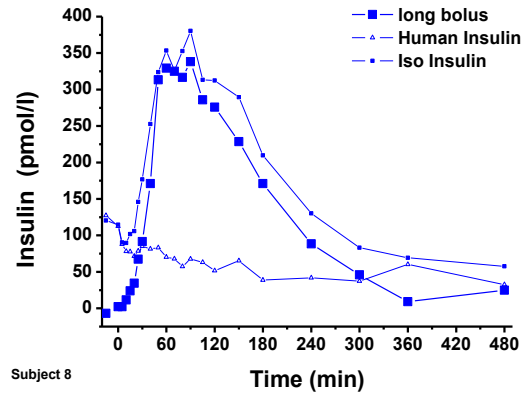
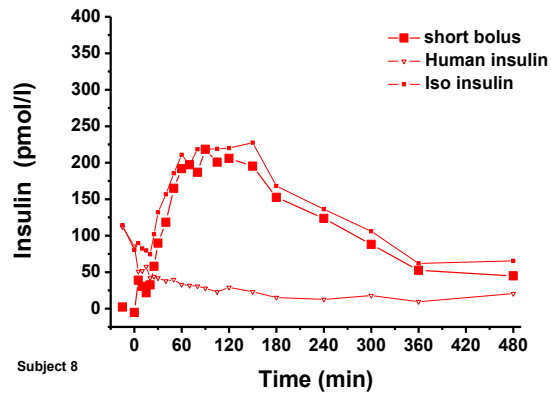


Abbildung 30: Subject 9

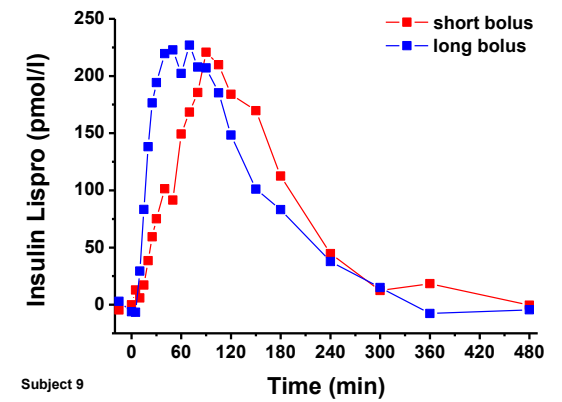
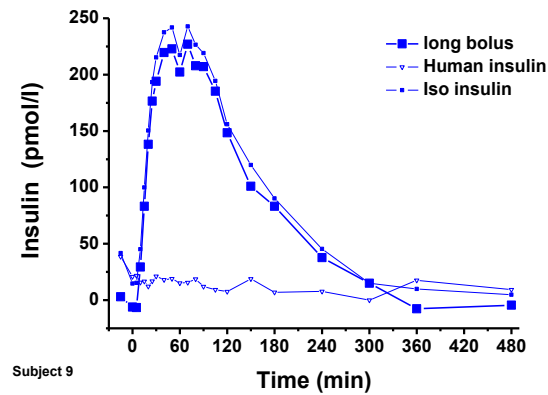
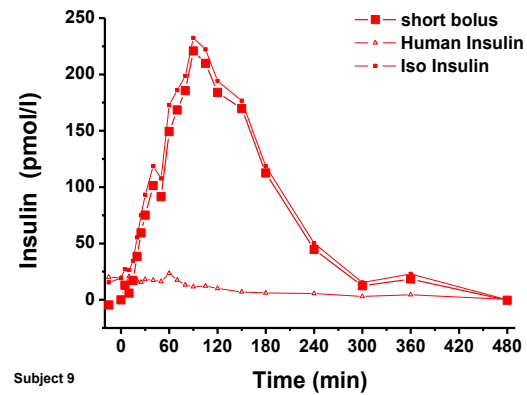


Abbildung 31: Subject 10

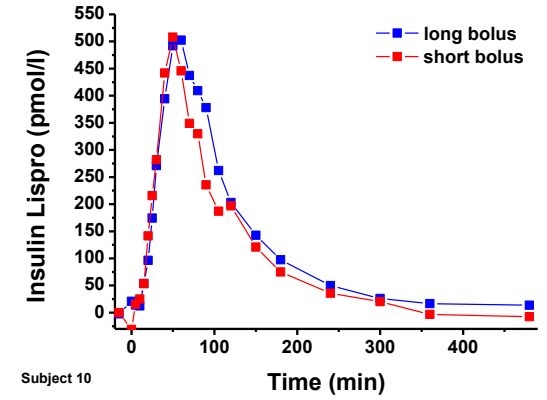
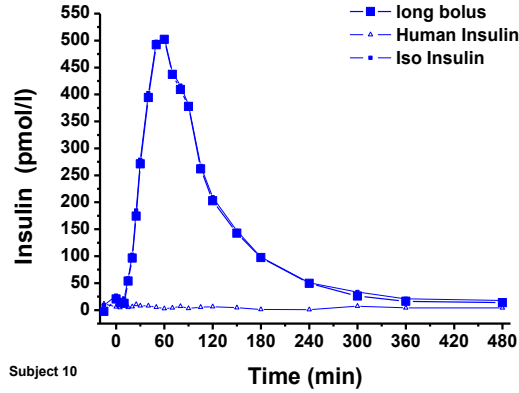
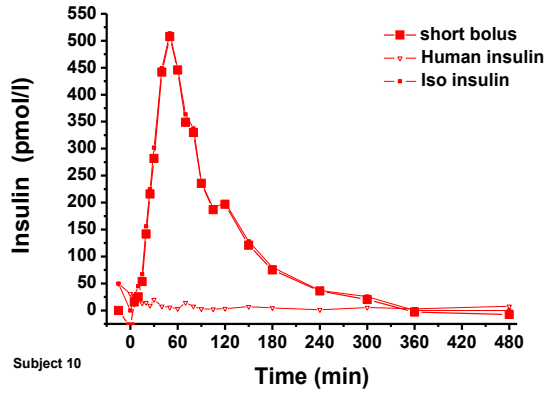


Abbildung 32: Subject 11

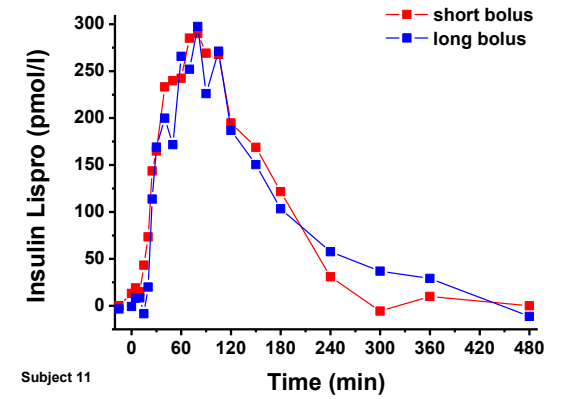
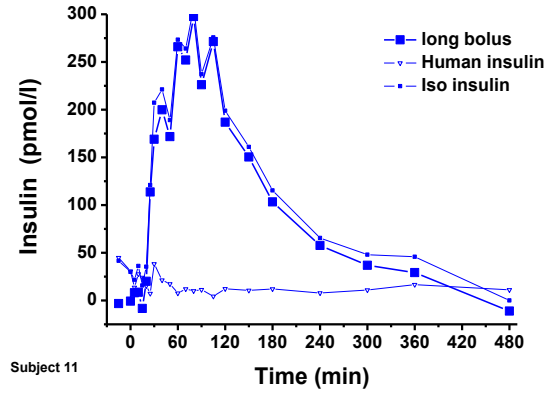
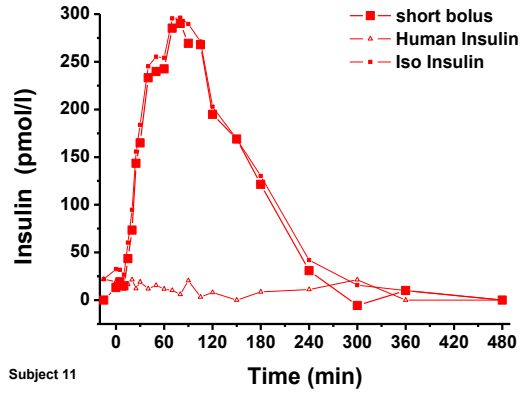


Abbildung 33: Subject 12

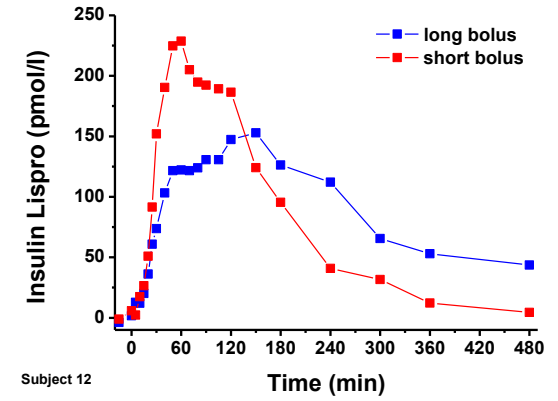
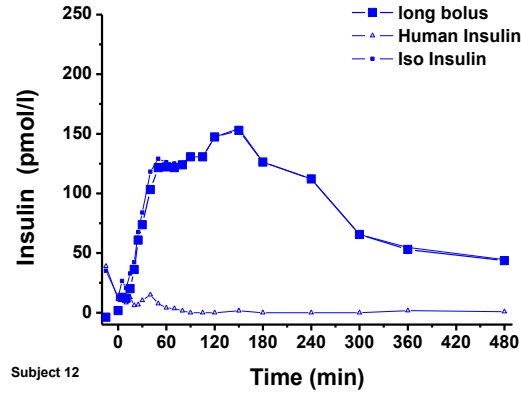
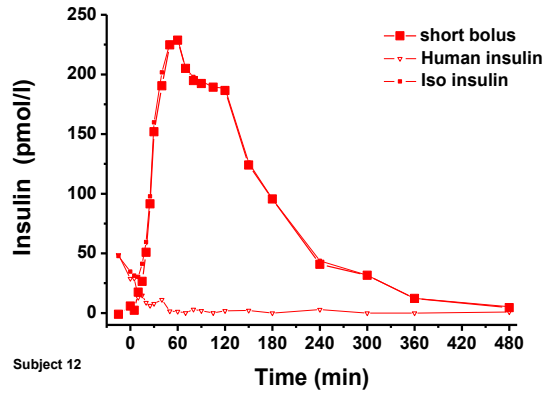


Abbildung 34: Subject 13

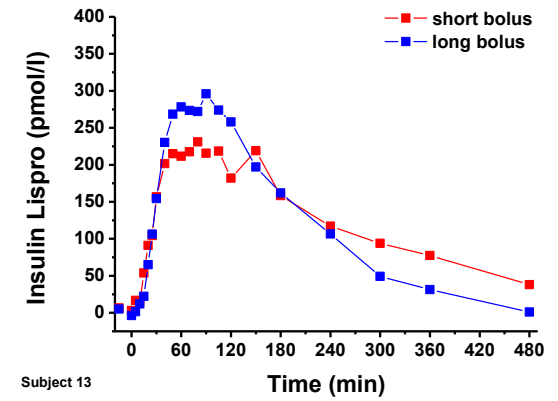
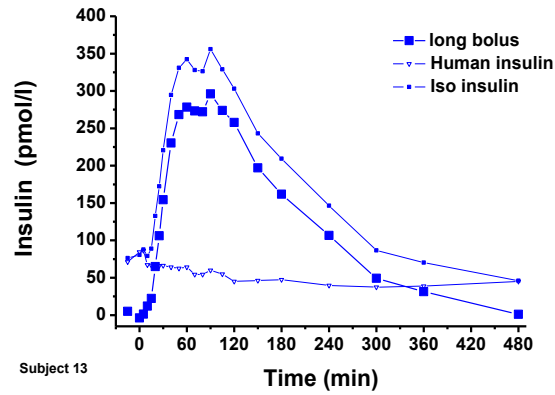
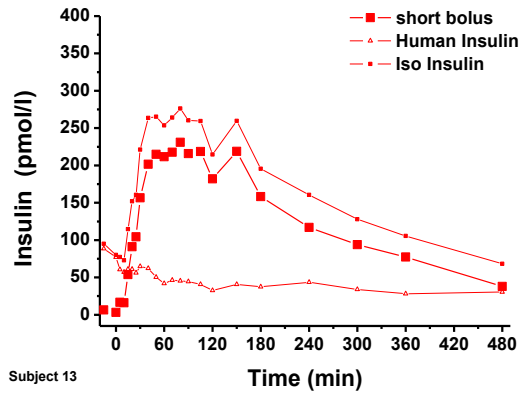


Abbildung 35: Subject 15

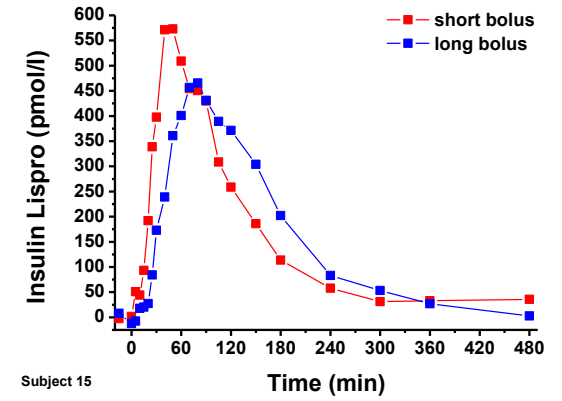
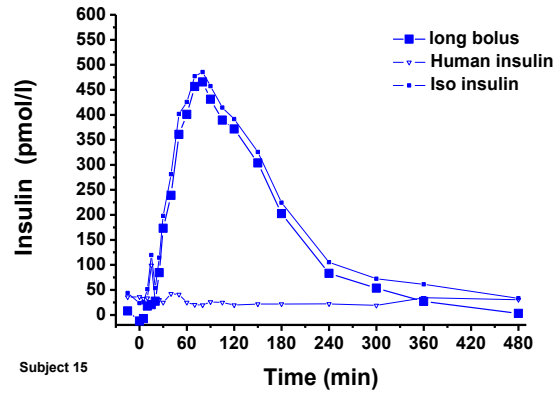
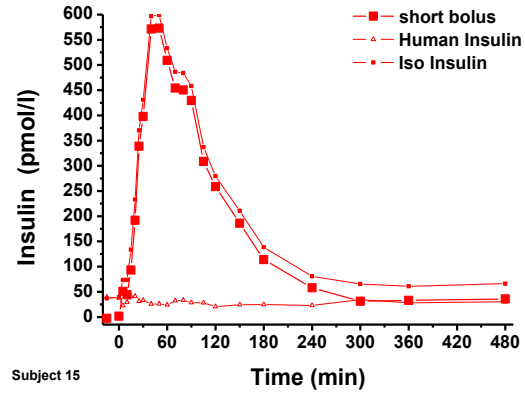


Abbildung 36: Subject 16

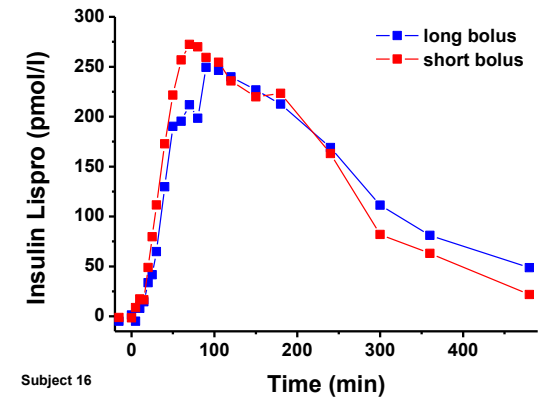
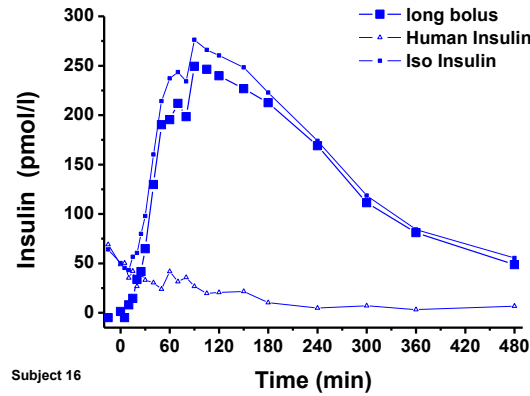
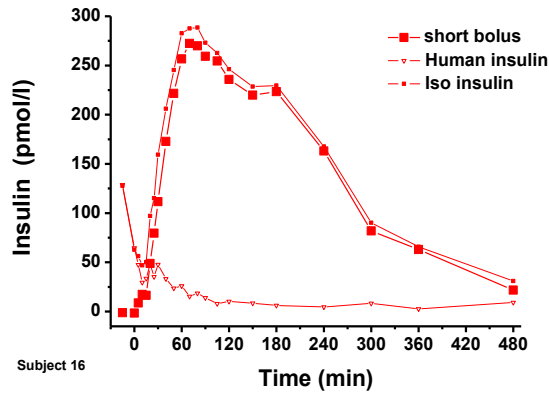


Abbildung 37: Subject 17

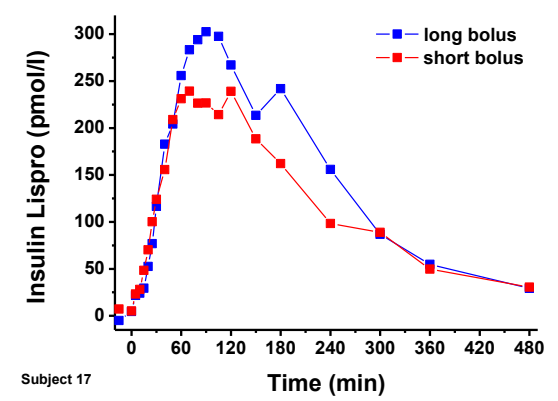
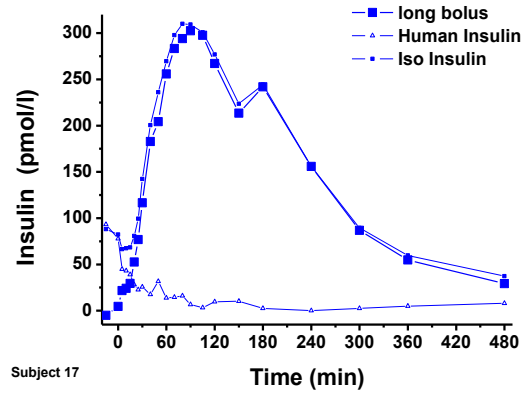
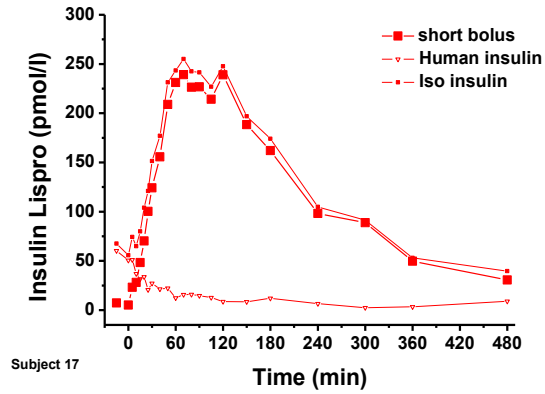


Abbildung 38: Subject 18

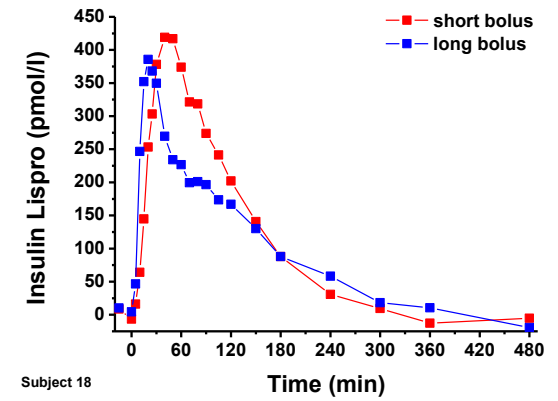
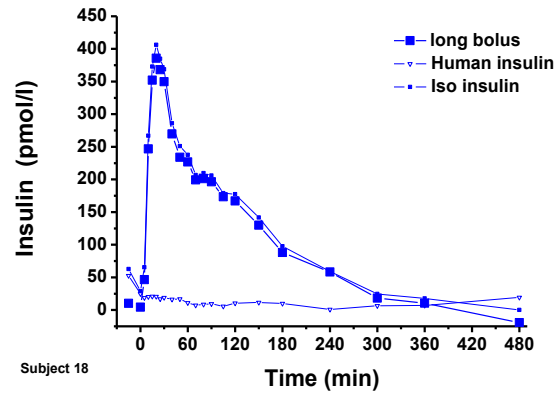
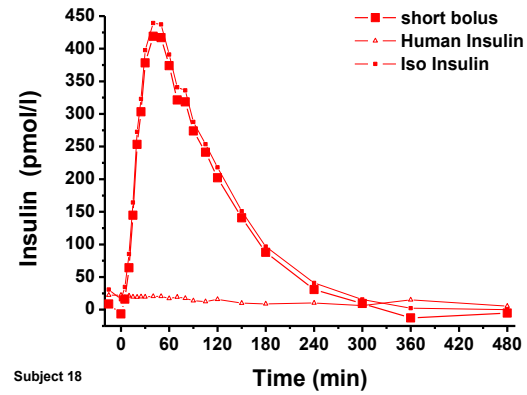


Abbildung 39: Subject 19

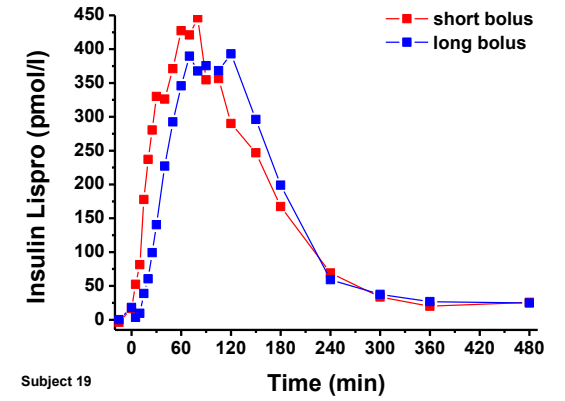
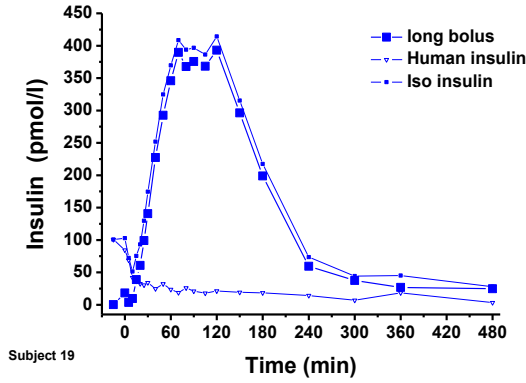
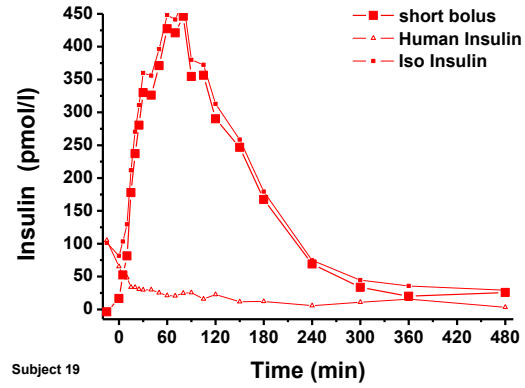


Abbildung 40: Subject 20

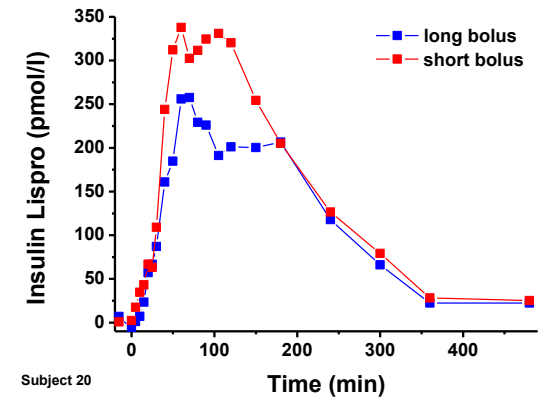
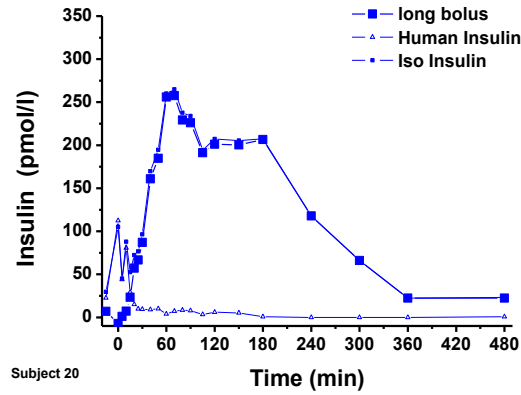
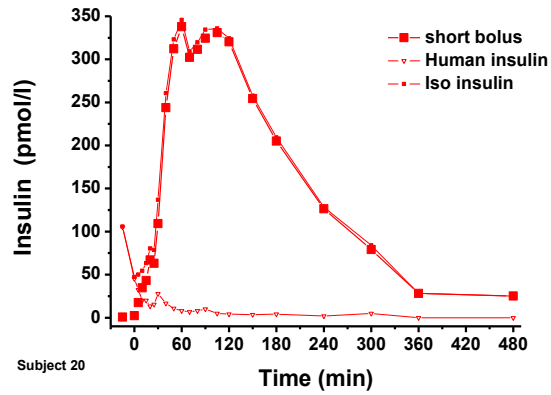


Abbildung 41: Subject 21

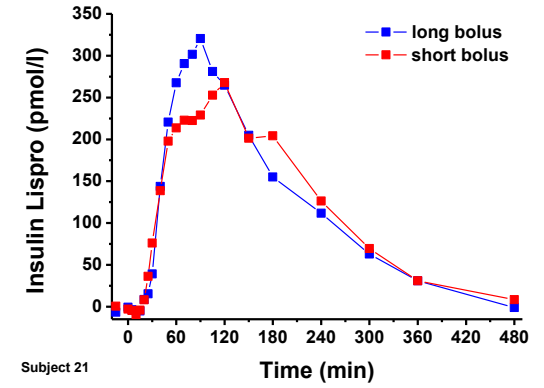
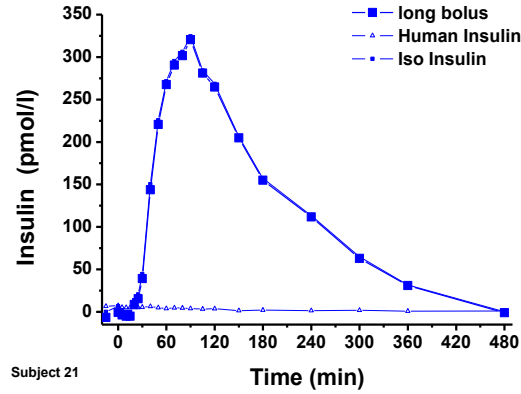
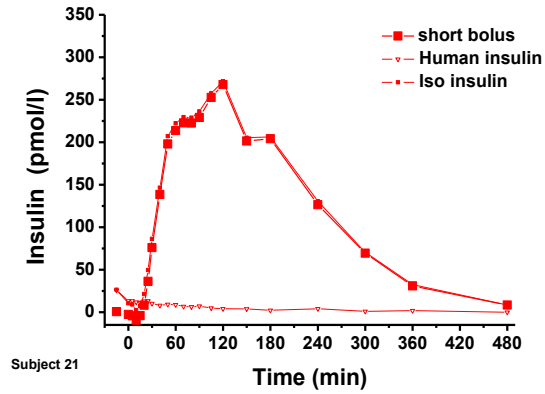
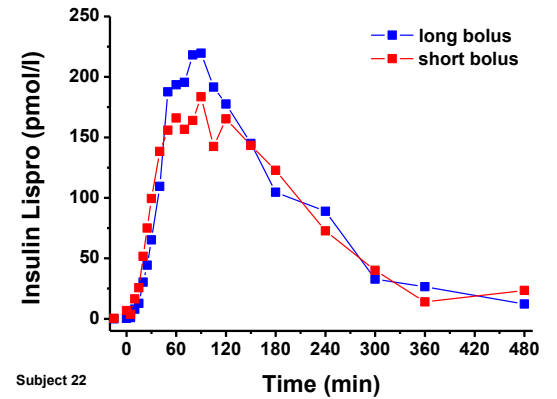
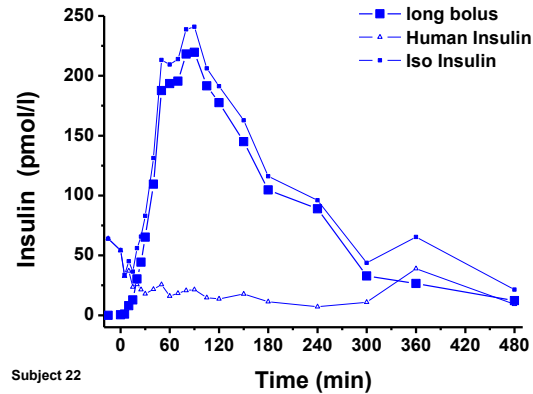
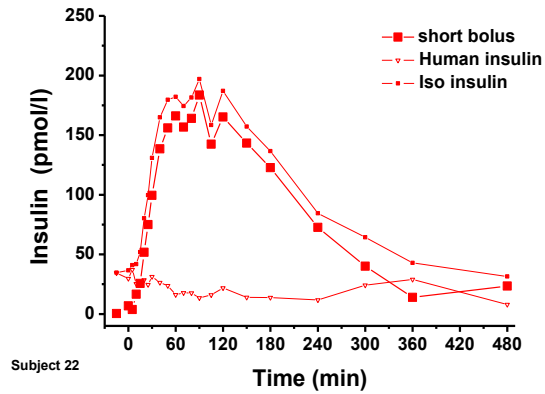


Abbildung 42: Subject 22



**Tabelle 6: Pharmakokinetische Parameter  $C_{INSmax}$ ,  $T_{CINSmax}$ ,  $T_{CINSmax10\%}$ ,  $T_{CINSmax50\%}$**

Subject No.	$C_{INSmax}$ (pmol/l)		$T_{CINSmax}$ (min)		$T_{CINSmax10\%}$ (min)		$T_{CINSmax50\%}$ (min)	
	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus
1	262	324	105	105	28	23	49	48
3	569	528	60	75	17	18	28	35
4	562	480	50	60	13	15	29	27
5	158	204	120	90	27	36	52	54
6	339	355	50	105	5	19	15	37
7	590	367	80	90	16	21	29	43
8	218	338	95	95	3	20	37	40
9	221	227	90	70	16	9	38	18
10	508	502	50	60	14	15	28	29
11	290	298	80	80	13	21	25,5	28
12	229	153	60	150	13	12	27	31
13	231	296	80	90	11	16	26	29,5
15	573	466	50	80	11	22	23	39
16	272	249	70	90	17	18	34	39
17	239	303	70	90	6	15	29	35
18	419	386	40	20	8	4	18	9
19	446	393	80	120	4	15	19	36,5
20	338	258	60	70	10	15	34	36
21	268	320	120	90	23	29	39	42
22	166	220	90	90	10	18	27	40
Group Mean (pmol/l)	345	333	75,0	86,0	13,3	18,1	30,3	34,8
SE (pmol/l)	33	23	5,2	5,8	1,6	1,5	2,1	2,2
Median (pmol/l)	281	322	75,0	90,0	13,0	18,0	28,5	36,3
(25 <sup>th</sup> & 75 <sup>th</sup> percentile) (pmol/l)	229;492	251;391	52,5;90,0	71,3;93,8	8,5;16,8	15,0;21,0	25,6;36,3	29,1;40,0

**Tabelle 7: Pharmakokinetische Parameter  $C_{INST30min}$ ,  $C_{INST60min}$ ,  $C_{INST120min}$** 

Subject No.	$C_{INST30min}$ (pmol/l)		$C_{INST60min}$ (pmol/l)		$C_{INST120min}$ (pmol/l)	
	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus
1	38	72	203	24	205	244
3	340	169	569	504	307	359
4	292	263	537	480	373	304
5	26	-4	98	122	158	185
6	318	93	306	251	204	292
7	307	82	523	280	346	346
8	90	92	192	329	206	276
9	75	194	149	202	184	148
10	282	271	446	502	197	203
11	165	169	242	266	195	187
12	152	74	229	122	187	147
13	157	154	212	278	182	258
15	398	173	509	401	259	372
16	112	65	257	195	236	240
17	124	117	231	256	239	267
18	378	350	374	227	202	167
19	330	141	427	346	290	393
20	109	87	338	256	320	201
21	76	39	214	268	268	265
22	99	65	166	193	165	178
Group Mean (pmol/l)	193	133	311	286	236	252
SE (pmol/l)	27	19	32	25	14	17
Median (pmol/l)	154	105	250	261	205	251
(25 <sup>th</sup> & 75 <sup>th</sup> percentile)(pmol/l)	92;315	73;172	205;441	208;342	189;285	185;301

**Tabelle 8: Pharmakokinetische Parameter  $AUC_{INStotal}$ ,  $AUC_{INS\ 0-tcinsmax}$ ,  $T_{AUC-INStotal10\%}$ ,  $T_{AUC-INStotal50\%}$**

Subject No.	$AUC_{INStotal}$ (min*pmol/l)		$AUC_{INS\ 0-tcinsmax}$ (min*pmol/l)		$T_{AUC-INStotal10\%}$ (min)		$T_{AUC-INStotal50\%}$ (min)	
	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus
1	53261	54330	14271	17035	69	62,5	164	144
3	65169	62220	17074	21005	40	45	88,5	97
4	80107	59957	11434	14551	43	40	107,5	97
5	36941	41561	9594	6078	76	78	183	180
6	57192	57565	10867	20603	34	53,5	111	132
7	81470	71278	27954	16558	43,5	62	104	146
8	53400	55604	12332	19284	60	53	168	125
9	33456	32831	9299	11125	56	34	127	95
10	45509	54901	11249	15215	35	39,5	78	88,5
11	40368	41916	14200	12357	41	46,5	102	114
12	35706	42416	7392	16390	43	61	113	185
13	59010	54434	12207	16886	51	49	164	128,5
15	69158	69798	15163	18878	35	52	91	119
16	64312	65833	9561	11460	58	67,5	163	182,5
17	54812	66908	9447	15625	53	58,5	151	159
18	47240	42735	8821	15625	30	21	80	87
19	67325	64982	24348	31555	35	52	105	122,5
20	66506	52206	9203	8715	52	56,5	136	153
21	53671	53137	19312	14186	61	60	152	135
22	36831	39114	10354	11112	49,5	55	141	135,5
Group Mean (pmol/l)	55072	54186	13204	15712	48,3	52,4	126,5	131,3
SE (pmol/l)	3200	2476	1200	1200	2,8	2,8	7,3	6,8
Median (pmol/l)	54242	54668	11341	15625	46,5	53,3	120,0	130,3
(25 <sup>th</sup> & 75 <sup>th</sup> percentile) (pmol/l)	41653; 66172	42496; 64292	9476; 14940	11684; 18417	36,3; 57,5	45,4; 60,8	102,5; 160,3	101,3; 151,3

**Tabelle 9: Pharmakokinetische Parameter  $AUC_{INS\ 0-30min}$ ,  $AUC_{INS\ 0-60min}$ ,  $AUC_{INS\ 0-120min}$**

Subject No.	$AUC_{INS\ 0-30min}$ (pmol/l)		$AUC_{INS\ 0-60min}$ (pmol/l)		$AUC_{INS\ 0-120min}$ (pmol/l)	
	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus	Short Bolus	Long Bolus
1	10	551	3374	4850	17877	21298
3	2415	1483	17074	13284	46497	40174
4	3199	2643	16928	14551	45143	36986
5	14	32	1794	1896	9687	11861
6	4589	1122	14094	7416	30664	25454
7	2652	788	16649	6622	47111	27186
8	1121	933	5363	7881	17449	26532
9	857	2573	3908	8979	15485	20818
10	2884	2483	16016	15215	32256	36365
11	1918	1130	8684	7020	24494	22142
12	1337	899	7392	4125	19176	11887
13	1810	1411	7816	8561	20703	25149
15	4594	1113	20574	9979	44109	35224
16	1131	630	6915	5132	22449	18825
17	1674	1327	7095	7060	20749	24362
18	4836	7881	16954	15800	33781	27249
19	5013	1455	15771	9083	38535	31555
20	1407	976	9203	6147	28454	19500
21	316	147	5129	5324	19402	22853
22	1129	646	5401	4910	15106	16964
Group Mean (pmol/l)	2145	1511	10307	8192	27456	25119
SE (pmol/l)	356	371	1291	865	2614	1766
Median (pmol/l)	1742	1117	8250	7238	23472	24755
(25 <sup>th</sup> & 75 <sup>th</sup> percentile) (pmol/l)	1123; 3120	681; 1476	5373; 16491	5180; 9755	18202; 37347	19830; 30479

