

Dina Tutkur

Kombination des Glucose-Clamps und der Offenen Mikroperfusions-Technik zur Bestimmung der Verteilungs- und Wirkungskinetik von Insulinen

Diplomarbeit



Institut für Medizintechnik
Technische Universität Graz

&

Institut "HEALTH"
Joanneum Research-
Forschungs-GmbH



Betreuer:

Dipl.-Ing. Christian Höfferer

Begutachter:

Univ.-Prof.i.R. Dipl.-Ing. Dr.techn.

Paul Wach

Graz, Januar 2012

Za mamu, tatu i Hanu.

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst, andere als die angegebenen Quellen/Hilfsmittel nicht benutzt, und die den benutzten Quellen wörtlich und inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am
.....
(Unterschrift)

Kurzfassung

"Kombination des Glucose-Clamps und der Offenen Mikroperfusions-Technik zur Bestimmung der Verteilungs- und Wirkungskinetik von Insulinen"

In der medizinischen Forschung wird die Offene Mikroperfusion (OFM) zur Untersuchung von Stoffkonzentrationen in den interstitiellen Gewebsflüssigkeiten und der Glucose-Clamp zur Untersuchung der Plasmainsulinkinetik und der Kinetik der Insulinwirkung auf den Glucosestoffwechsel verwendet. Es besteht ein hohes Interesse interstitielle Insulinkonzentrationen zusätzlich während des Glucose-Clamps zu bestimmen und diese, gemeinsam mit der Plasmainsulinkinetik und der Insulinwirkungskinetik, für eine verbesserte Charakterisierung von neu entwickelten Insulinen zu verwenden. Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, die OFM mit dem Glucose-Clamp bei Ratten zu vereinen. Um dies zu erreichen, wurde durch spezielles Betreiben der OFM-Katheter und besondere Gestaltung des Glucose Clamps die beiden Untersuchungsmethoden aufeinander abgestimmt und die gleichzeitige Anwendbarkeit in Form von Experimenten bei fettleibigen Ratten erfolgreich getestet. Der vereinte Einsatz dieser beiden Untersuchungsmethoden könnte in Zukunft die Charakterisierung von neuen Insulinen wesentlich verbessern.

Schlüsselwörter: Insulin, Interstitielle Flüssigkeit, Glucose-Clamp, Offene Mikroperfusion, Fettleibige Ratten

Abstract

"Combining Glucose Clamp and Open Flow Microperfusion Techniques for the Assessment of Distribution and Action Kinetics of Insulins"

In medical research, the open flow microperfusion technique (OFM technique) is applied to determine substrate concentrations in interstitial tissue fluids while the glucose clamp technique is used to investigate plasma insulin kinetics and kinetics of insulin action on glucose metabolism. To improve the characterization of newly developed insulins, there is a great interest to determine interstitial insulin concentrations in addition to plasma insulin and insulin action kinetics during glucose clamps. Therefore, the goal of this diploma thesis was to combine OFM and glucose clamp techniques in rats. To achieve this, a special protocol for operation of the OFM-Catheter and conductance of the glucose clamp was developed. Applying this protocol, the feasibility of the simultaneous use of both techniques was shown in an obese rat model. The combined application of OFM and glucose clamp technique in metabolic studies could considerably enhance the characterization of newly developed insulins.

Key Words: Insulin, Interstitial Fluid, Glucose Clamp, Open-Flow Microperfusion, Obese Rat Model

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einführung	9
1.1 <i>Insuline für die Therapie von Diabetes</i>	9
1.2 <i>Notwendigkeit einer Verbesserung der Diabetestherapie</i>	12
1.3 <i>Entwicklung verbesserter Insuline</i>	12
1.4 <i>Der Glucose-Clamp: Methode der Wahl zur in vivo</i> <i>Charakterisierung von Insulin</i>	13
1.5 <i>Offene Mikroperfusionstechnik zur Untersuchung interstitieller Substanzen</i>	14
1.6 <i>Ziel der Diplomarbeit: Kombination von Glucose-Clamp und Offener</i> <i>Mikroperfusionstechnik bei Ratten</i>	16
2. Methoden und Materialien	18
2.1 <i>In vitro Experimente zur Bestimmung der Insulin- und Inulin-Adsorption</i> <i>im Mikroperfusionssystem</i>	18
2.2 <i>Glucose-Clamp mit gleichzeitiger Anwendung der Offenen Mikroperfu-</i> <i>sionstechnik bei Ratten</i>	19
2.2.1 <i>Versuchstiere</i>	19
2.2.2 <i>Narkotisieren und Katheterisieren der Versuchstiere</i>	19
2.2.3 <i>Glucoseclamp und ISF-Probennahmen</i>	21
2.2.4 <i>Verwendete Messverfahren zur Probenanalyse</i>	23
2.3 <i>Datenanalyse</i>	24
2.3.1 <i>Analyse der in vitro Ergebnisse</i>	24
2.3.2 <i>Analyse der Ergebnisse der Glucoseclamps</i>	25

3. Resultate	27
3.1. <i>In vitro</i> Versuchsergebnisse	27
3.2. <i>Ergebnisse der Glucoseclamps</i>	28
3.2.1 Katheterisieren der Versuchstiere	28
3.2.2 Glucoseclamp und ISF-Probennahmen	28
3.2.3 Insulinkonzentrationsverläufe im Plasma- und ISF-Proben	34
3.2.4 Zusammenhänge zwischen GIR- und Insulinkonzentrationsverläufen	36
3.2.5 Schätzung der absoluten Insulinkonzentrationen im ISF	41
4. Diskussion	44
4.1 <i>Wahl des Rattenmodells</i>	44
4.2 <i>Betreiben der OFM-Katheter während des Glucose-Clamps</i>	44
4.3 <i>Narkotisierung und Katheterisierung der Ratten</i>	46
4.4 <i>Zeitverläufe der Glucoseinfusionsrate, Glucosekonzentration und Insulinkonzentrationen während der Glucose-Clamps</i>	48
4.5 <i>Schätzung absoluter interstitieller Insulinkonzentrationen</i>	50
4.6 <i>Schlussfolgerungen</i>	51
5. Referenzen	52

Abkürzungen

abs. ISF-Konzentration	absolute interstitielle Konzentration
ADS	Adsorption
Alpha LISA	Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay
d	Schnittpunkt der Regressionsgeraden auf der y- Achse
GIR	Glucoseinfusiosrate
GLUT	Glucosetransporter
IN _{AUS}	Inulinkonzentration im Katheterausfluss
IN _{IN}	Inulinkonzentration im Katheterperfusat (Kathetereingang)
ISF	Interstitielle Flüssigkeit
ISFI _{ABS}	Aboslute ISF Insulinkonzentration
ISFI _{REL}	Relative ISF Insulinkonzentration
k	Steigerung der Regressionsgeraden
LOCI	Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay
MW	Mittelwert
OFM	Offene Mikroperfusion
r ²	Bestimmtheitsmaß
REC	Recovery (Wiederfindungsrate)
REF	Referenzkonzentration
rel. ISF-Konzentration	relative interstitielle Konzentration
RSA	Ratten Serum Albumin
SD	Standardabweichung
SD-Ratten	Sprague Dawley Rattenstamm
SE	Standardfehler
WF	Wiederfindungsrate

1. Einführung

1.1 Insuline für die Therapie von Diabetes

Diabetes ist durch den Verlust der körpereigenen Insulinproduktion (Type 1 Diabetes) oder durch eine abnormale Insulinsekretion und Insulinwirkung (Type 2 Diabetes) gekennzeichnet [1, 2]. Um Zustände hoher Blutglucosekonzentration (Hyperglykämie) und deren akut lebensbedrohliche (Ketoazidosis) wie auch chronische Folgeerscheinungen (z.B.: Blindheit, Amputation, Nierenversagen) zu vermeiden, müssen Patienten mit Type 1 Diabetes Insulin von außen zuführen. Auch Patienten mit Type 2 Diabetes müssen Insulin zuführen, wenn eine Erniedrigung des Blutzuckerspiegels nicht mit Diät und durch Gabe von oralen Antidiabetika erzielt werden kann [2]. Insulin wird von einem Großteil der Typ 1 Diabetiker mehrmals am Tag mittels einer Injektionsnadel in das unter der Haut befindliche Fettgewebe (subkutane Insulininjektion) eingebracht [1]. Das Ziel der Insulinsubstitution mit Insulinspritze ist die Insulinsekretion eines gesunden Menschen nachzuahmen (Abb.1-3; [1, 3-5]).

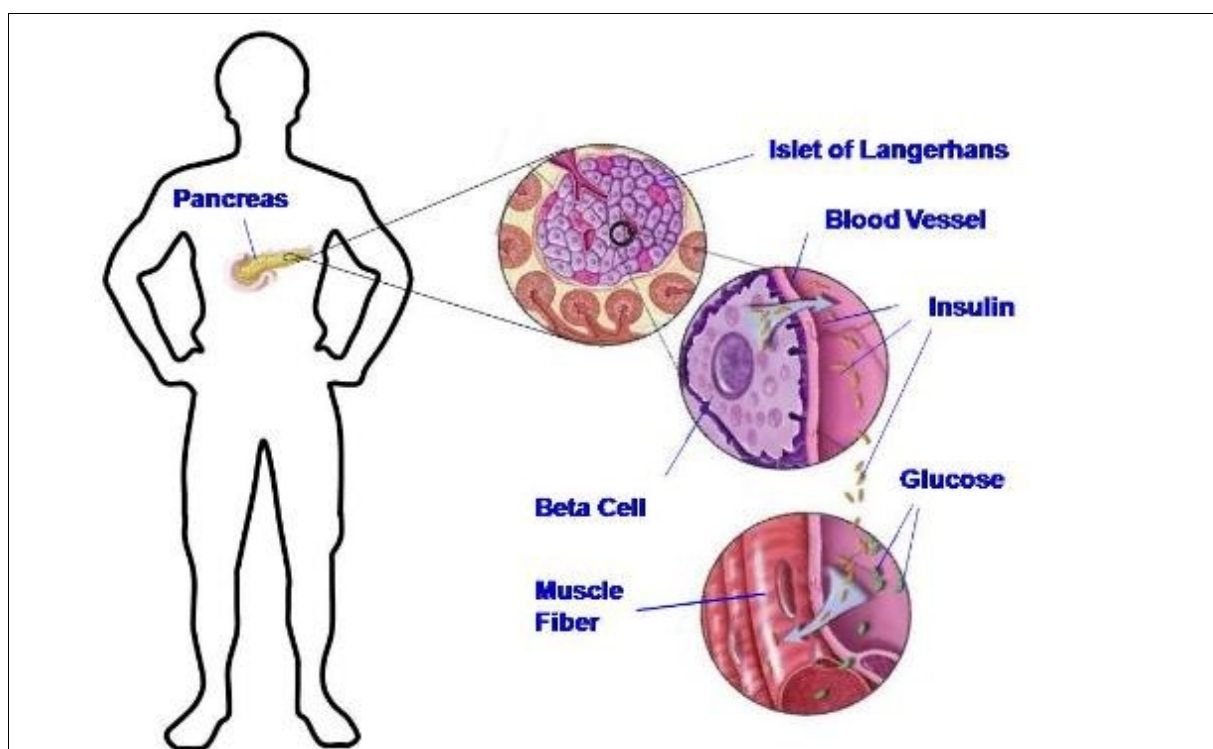


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Insulinsekretion und des Insulintransportes zu den Zielorganen. Das in den Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildete Insulin ist ein Protein, das aus 51 Aminosäuren besteht (6000 Da). Bei gesunden Menschen wird, abhängig von der Blutzuckerkonzentration, das Insulin in den Blutfluss ausgeschüttet und über das Gefäßsystem im Körper verteilt. Abhängig von der jeweiligen Insulinkonzentration in der Umgebung der Zielzellen (z.B., Muskel- und Fettzellen) wird dann Glucose von diesen Zellen aufgenommen. Dadurch kann die Glucosekonzentration im Blut dauernd auf einen relativ konstanten Wert von ~100 mg/dl gehalten werden [1, 3].

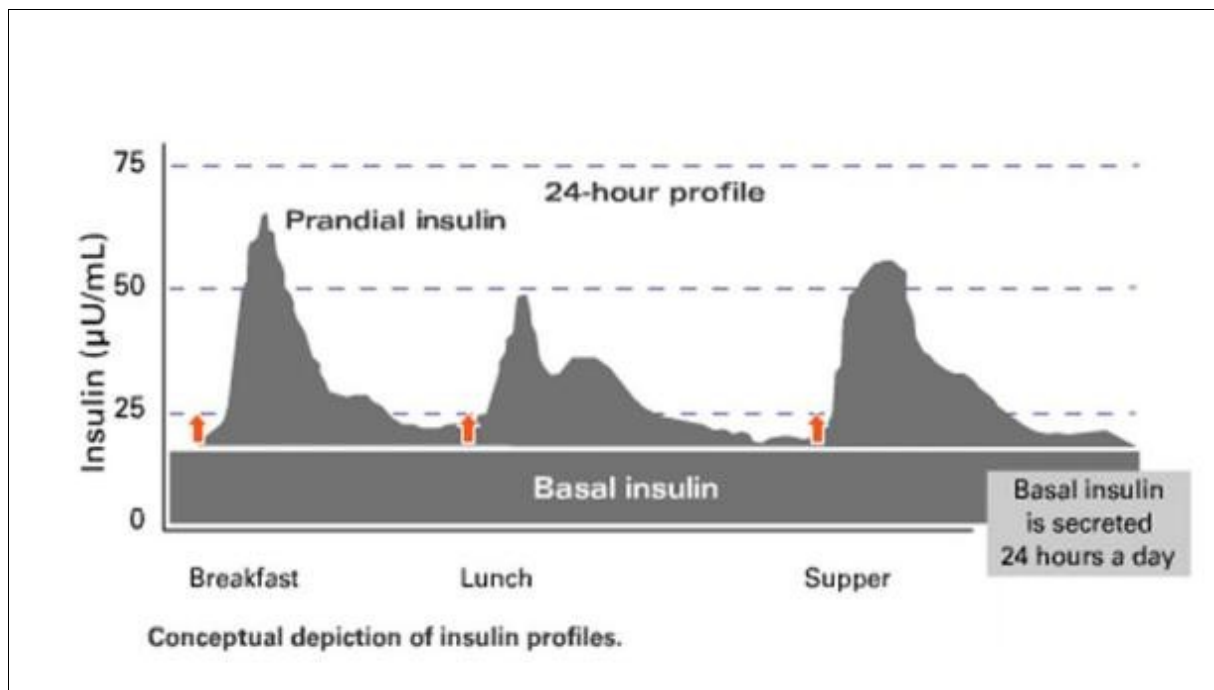


Abbildung 2: Schematische Darstellung der durchschnittlicher Tages-Insulinkonzentrationsverlauf im Blut von gesunden Menschen. Der Insulinkonzentrationsverlauf im Blut eines gesunden Menschen wird durch eine Fasten-bezogene und eine Essens-bezogene Insulinsekretionskomponente hervorgerufen [1, 3-5].

Bei einem gesunden Menschen kann die Insulinsekretion prinzipiell in eine Fasten-bezogene und eine Essens-bezogene Sekretion unterteilt werden [1, 3-5]. Die Fasten-bezogene Insulinsekretion verläuft kontinuierlich und ist durch eine niedrige Sekretionsrate gekennzeichnet (Basale Insulinsekretion). Die Essens-bezogene Insulinsekretion ist hingegen höherrätig und ist dem Kohlenhydratgehalt der zu sich genommenen Mahlzeit so angepasst, dass die Blutzuckerkonzentration während und nach dem Essen sich nicht wesentlich von der im Fasten-Zustand unterscheidet (~ 100 mg/dl). Um die Insulinsekretion gesunder Menschen nachzuahmen, verwenden Typ 1 Diabetiker für ihre Therapie zwei unterschiedliche Insulinarten: das langwirksame und das schnellwirksame Insulin (Abb. 3; [1, 3-5]). Das langwirksame Insulin (Basales Insulin) wird jeweils morgens und abends gespritzt, um das Fasten-bezogene Insulin zu substituieren. Das schnellwirksame Insulin wird jeweils vor einer Mahlzeit injiziert, wobei die gespritzte Insulinmenge vom Kohlenhydratgehalt der Mahlzeit und der vorherrschenden Blutglucosekonzentration abhängt (Abb. 3)

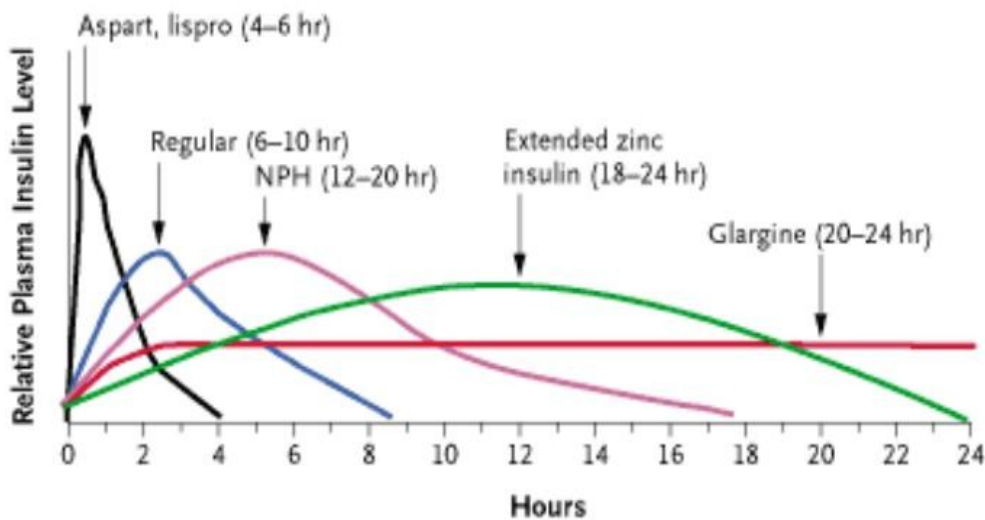
A**B****C**

Abbildung 3: Insulinsubstitution mit Insulinspritze bei Typ 1 Diabetes. **A)** Schnell- und langwirksame Insuline werden mehrmals am Tag mittels einer Injektionsnadel in das unter der Haut befindliche Fettgewebe (subkutane Insulininjektionen) eingebracht. **B)** Vor den Insulininjektionen wird aus den Fingerkuppen ein Blutropfen entnommen und darin mithilfe eines Glucosemessgerätes die Blutglucosekonzentration bestimmt. Die gespritzte Insulinmenge wird dann dem erhaltenen Blutglucosewert und dem Kohlenhydratgehalt der aufzunehmenden Mahlzeit angepaßt. **C)** Die zur Zeit von Typ 1 Diabetikern verwendeten schnellwirksamen Insuline [1, 3-5] sind das reguläre Insulin (Humaninsulin) oder die in der Proteinstruktur veränderten Insuline - die sog. schnellwirksamen Insulin Analoga (z.B. : Insulin Lispro, Insulin Aspart). Wird reguläres Insulin subkutan verabreicht, ist dessen Erscheinen im Blut viel langsamer als das Insulin, das von der Bauchspeicheldrüse (Beta-Zellen) des gesunden Menschen sezerniert wird. Spritzt man hingegen ein schnellwirksames Insulin Analogon, ist die Absorption vom Injektionsort schneller als die des regulären Insulins, jedoch langsamer als das von der Bauchspeicheldrüse eines gesunden Menschen sezernierten Insulins. Die zur Zeit verwendeten langwirksamen Insuline sind Insulin-Formulierungen bei denen einerseits Zusatzstoffe zu dem regulären Insulin beigemischt (z.B. Zink und/oder Protamin) oder die Proteinstruktur des regulären Insulins verändert wurde – sog. langwirksame Insulin Analoga (z.B. Glargine). Injiziert man eine Insulin-Formulierung mit Zink- und Protaminzusätzen (sog. NPH Insuline), so taucht das Wirkungsmaximum 4 bis 6 Stunden nach der Verabreichung auf. Die gesamte Wirkungsdauer liegt zwischen 16 und 18 Stunden. Injiziert man dagegen das langwirksame Insulin Analogon Glargine, liegt die Wirkungsdauer bei mehr als 24 Stunden. Die Wirkungsdauer dieses Insulins ist daher wesentlich länger als die des NPH Insulins [1, 3-5].

1.2 Notwendigkeit einer Verbesserung der Diabetestherapie

Eine große Schwierigkeit bei der Insulinsubstitution ist die Abstimmung der Insulindosis auf die vorherrschende Blutzuckerkonzentration und auf den Kohlehydratgehalt des zu sich genommenen Mahles [1]. Weiters ist das Absorptionsverhalten der verwendeten Insuline von Injektion zu Injektion sehr unterschiedlich, so dass Insulinwirkungsprofile entstehen, die sehr variabel sind und dadurch eine stabile Blutzuckereinstellung verhindern [3-5]. Zudem kann die herkömmliche Art der Blutglucosemessung mittels Glucometer und Blutentnahme durch Stechen der Fingerkuppen (Abb. 3B) und die darauffolgende Insulininjektion (Abb. 3A), aus praktischen Gründen, nicht häufig genug durchgeführt werden, um Zustände zu hoher oder zu niedriger Glucosekonzentrationen rechtzeitig zu erkennen und zu korrigieren [1, 6]. Diese und andere Schwierigkeiten bei der bisherigen Form der Therapie machen es deshalb nahezu unmöglich normoglykämische Zustände über einen längeren Tageszeitraum zu erzielen. Die bisherige Form der Therapie bei Typ 1 Diabetes kann deshalb in den meisten Fällen die Entwicklung der oben genannten Spät komplikationen nicht verhindern [1, 7].

1.3 Entwicklung verbesserter Insuline

Für die Verbesserung der Diabetestherapie werden neue Insuline entwickelt, die verbesserte Absorptions- und Wirkeigenschaften besitzen (Abb. 3). Bei der Entwicklung langwirksamer Insuline wird versucht deren Wirkungsdauer zu erhöhen, um dadurch die Anzahl der basalen Insulin-Injektionen zu erniedrigen. Weiters möchte man eine konstante Absorption des Insulins vom Injektionsort erreichen, sodass flache Insulinwirkungsprofile entstehen, die eine stabile Blutzuckereinstellung erlauben [3-5].

Bei der Entwicklung schnellwirksamer Insuline möchte man hingegen eine schnelle Absorption vom Injektionsort erlangen, sodass nach möglichst kurzer Zeit eine stabile Blutzuckereinstellung (~100 mg/dl) erreicht wird und die Variation der Absorption des Insulins im Blut zwischen einer Injektion und einer nachfolgenden Injektion minimiert wird [3-5].

1.4 Der Glucose-Clamp: Methode der Wahl zur in vivo Charakterisierung von Insulin

Zur Quantifizierung der Kinetik und Dynamik von Insulinen im Körper wird seit den 1970er-Jahren die Glucose-Clamp-Technik [8, 9] eingesetzt. Bei dieser Technik wird das zu untersuchende Insulin intravenös oder subkutan in den Körper eingebracht. Zur Kompensation der Insulinwirkung auf die Glucosekonzentration im Blut wird parallel dazu eine intravenöse Glucoseinfusion gestartet und die Infusionsrate so abgeändert, dass die Glucosekonzentration im Blut auf einen konstanten Wert gehalten („clamped“) werden kann. Damit es während der Glucoseinfusion nur zu geringen Konzentrationsabweichungen vom Blutglucose-Zielwert („Klemmwert“) kommt, muss alle 5-10 Minuten arterielles Blut abgenommen, die Glucosekonzentration vor Ort rasch darin gemessen, und, abhängig von der Differenz zwischen gemessenen Glucosewert und Klemmwert, die Glucoseinfusionsrate abgeändert werden.

Der während des Glucose-Clamps erhaltene Verlauf der Glucoseinfusionsrate (GIR) repräsentiert die Fähigkeit des Insulins die Glucoseaufnahme im Körper zu erhöhen und die körpereigene Glucoseproduktion zu unterdrücken [8, 9]. Der erhaltene GIR-Verlauf wird dann gewöhnlich mit dem beobachteten Verlauf der Plasma-Insulinkonzentration verglichen bzw. normiert und daraus Indizes, die die Wirkungskinetik bzw. Sensitivität des Insulins widerspiegeln, abgeleitet. Da die Glucoseaufnahme von der interstitiellen Insulinkonzentration abhängig ist und nicht von der Insulinkonzentration im Blutplasma (Abb. 4; [10, 11]), existiert bei Insulinherstellern ein hohes Interesse, die interstitielle Insulinkonzentrationen während des Glucose-Clamps zu bestimmen und diese, gemeinsam mit der Plasma-Insulinkonzentration und GIR, für eine bessere Charakterisierung der entwickelten Insuline zu verwenden.

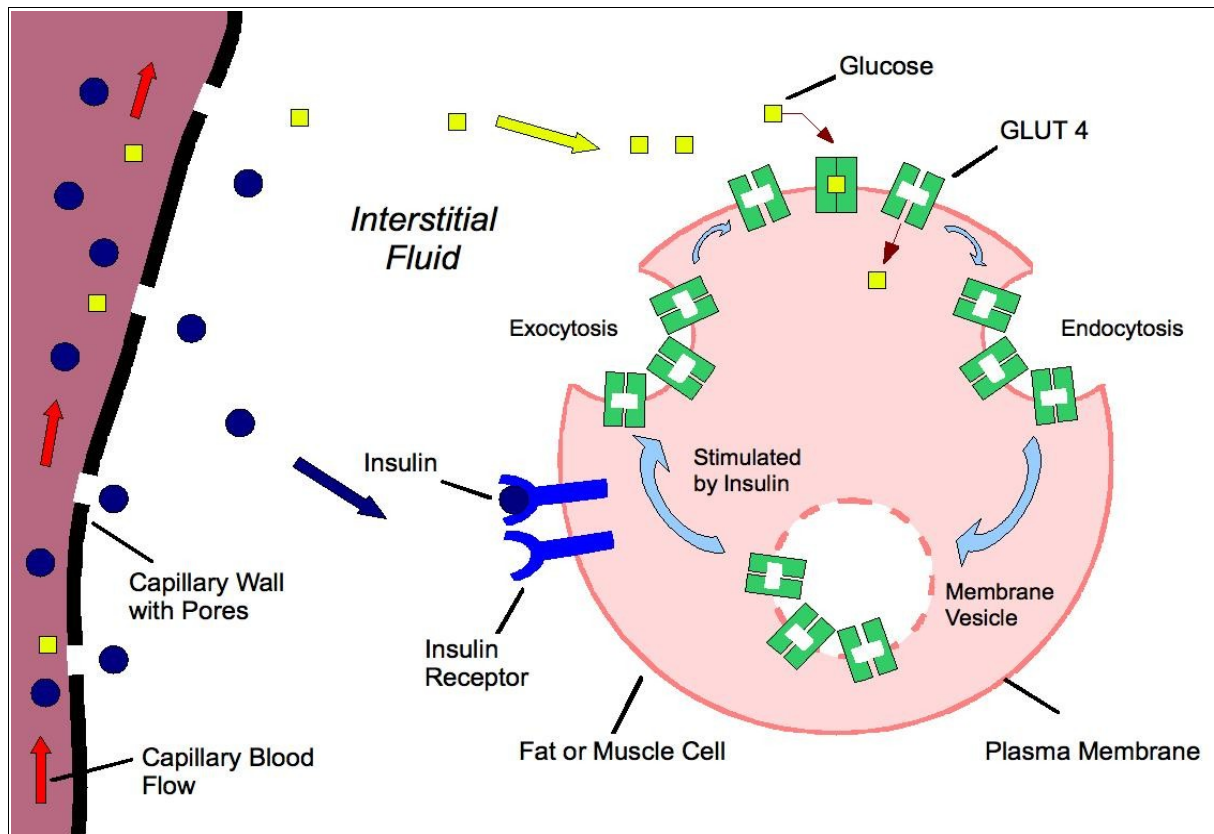


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Insulinkinetik und der Insulinwirkung auf die Glucoseaufnahme von Fett- und Muskelzellen. Bei gesunden Menschen wird Insulin in den Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse gebildet und, abhängig von der Blutglucosekonzentration, in den Blutfluss ausgeschüttet und über das Gefäßsystem im Körper verteilt. Durch Poren in den Kapillarwänden gelangt Insulin (wie auch Glucose) in die interstitielle Flüssigkeit (ISF) und dockt dort an Insulinrezeptoren an, die sich an der Oberfläche der Fett- oder Muskelzellen befinden. Nach dem Andocken werden Glucosetransporter des Typs 4 (GLUT-4) von Membranvesikeln im Zellinneren an die Oberfläche gebracht und dort in die Plasmamembran eingebaut, wo sie dann der Glucose eine erleichterte Diffusion in das Zellinnere ermöglichen und dadurch eine rasche Erniedrigung der Glucosekonzentration in ISF und Blut bewirken. Die von den Zellen aufgenommene Glucose wird entweder in Energie umgewandelt (Glykolyse) oder in Form von Glykogen gespeichert. Nimmt die Insulinkonzentration im ISF wieder ab, werden die Glucosetransporter mittels Endocytose von der Zelloberfläche wieder ins Zellinnere gebracht [10, 11].

1.5 Offene Mikroperfusionstechnik zur Untersuchung interstitieller Substanzen

Die Offene Mikroperfusionstechnik (OFM-Technik) wird zur Bestimmung von Substanzenkonzentrationen in der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) herangezogen [12-15]. Bei dieser Technik wird ein sehr dünnes (Außendurchmesser: 0,32 mm), über die Länge von 1,5 cm perforiertes Schlauchstück (OFM-Katheter) mithilfe einer dünnen Setznadel (Außendurchmesser: 0,5 mm) in die Haut oder in das subkutane Gewebe implantiert, und an beiden Enden mit Schläuchen, die in eine Peristaltikpumpe eingelegt sind, verbunden. Das Schlauchsystem wird danach

konstant mit einer isomolaren Flüssigkeit (Perfusat) durchspült (Abb . 5). Wenn das Perfusat den perforierten Teil des Systems erreicht, tauschen sich interstitielle Substanzen des untersuchten Gewebes mit dem Perfusat aus. Ausgangsseitig wird dann das mit interstitiellen Substanzen angereicherte Rückperfusat (Perfusat + ISF) in einer Glaskapillare fraktioniert gesammelt. Da der OFM-Katheter makroskopische Perforationen für den Substanzenaustausch verwendet, kann diese Technik auch zur Probennahme von sehr großen Molekülen, wie Insulin und Albumin [12, 14], herangezogen werden.

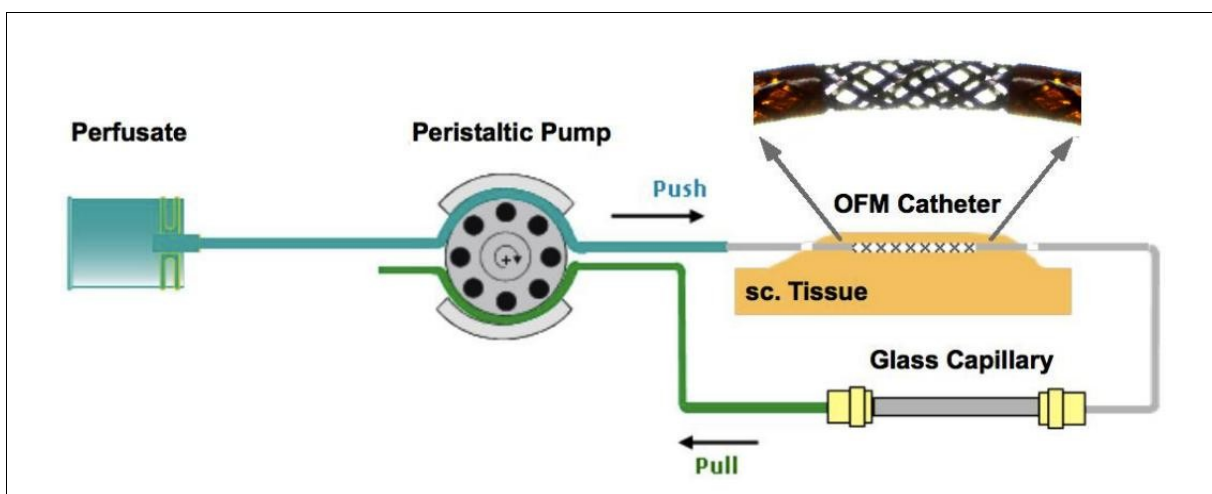


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Mikroperfusionssystems. Nach dem Setzen des perforierten OFM-Katheters in das Gewebe, wird mittels einer Peristaltikpumpe der OFM-Katheter mit einer isomolaren Flüssigkeit (Perfusat) kontinuierlich durchspült. Während des Durchspülens kommt es über die Katheter-Perforationen zu einem Substanzenaustausch zwischen Perfusat und dem ISF des umliegenden Gewebes. Am Ausgang des Katheters wird dann die mit interstitiellen Substanzen angereicherte Flüssigkeit in Glaskapillaren gesammelt.

Wird der OFMskatheter mit einem Perfusat durchspült, so ist die Effizienz des Substanz-austausches zwischen ISF und Perfusat von Faktoren wie Kathetergeometrie, Gewebsbeschaffenheit in der Katheterumgebung und der gewählten Durchflussrate des Perfusates abhängig. Ist die Effizienz des Austausches ("Recovery") einer Substanz bekannt, kann von dieser Substanz-Recovery und der im Ausfluss des Katheters gemessenen Substanzkonzentration die "absolute" interstitielle Konzentration dieser Substanz berechnet werden. Für die Bestimmung einer Substanz-Recovery können verschiedene Methoden herangezogen werden [16-18]. Eine Methode ist die sog. "Interne Referenz-Technik". Bei dieser Technik wird dem Perfusat eine Referenzsubstanz (interne Referenz) beigemischt. Diese Referenzsubstanz sollte der zu untersuchenden interstitiellen Substanz chemisch und

physikalisch sehr ähnlich sein und im Gewebe des Körpers, in dem der Katheter gelegt wird, aber nicht vorkommen. Über die Bestimmung der Differenz zwischen Perfusat- und Katheterausfluss-Konzentration der internen Referenz kann dann die Recovery der zu untersuchenden Substanz geschätzt werden. Die Annahme die bei dieser Berechnung getroffen wird, ist, dass die Effizienz des Referenzsubstanz-Austausches zwischen Perfusat und ISF ("Reverse Recovery der internen Referenz") gleich der Effizienz des Austausches der untersuchenden Substanz zwischen ISF und Perfusat ("Recovery der interstitiellen Substanz") ist [16-18].

1.6 Ziel der Diplomarbeit: Kombination von Glucose-Clamp und Offenen Mikroperfusionstechnik bei Ratten

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, die Kombination des Glucose-Clamps und der OFM-Technik bei Ratten für eine verbesserte Bestimmung der Wirkungskinetik von Insulinen zu realisieren. Dabei mussten folgende Anforderungen erfüllt werden:

1. Es sollten die OFM-Katheter in das subkutane Fettgewebe der Ratte platziert werden, was die Auswahl eines Rattenmodells mit erhöhter subkutaner Fettschichtdicke notwendig machte.
2. Die Anästhesiemethode musste so gewählt werden, dass während der Zeit des Katheterisierens (~1 Stunde) als auch während der Dauer des darauf folgenden Glucoseclamps (~7 Stunden) die Ratte betäubt gehalten werden konnte.
3. Das Studienprotokoll sollte so ausgelegt werden, dass die Insulinkonzentration in den gesammelten ISF- und Blutproben mit der zur Verfügung stehenden Insulinmessmethode (Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay; LOCI) bestimmbar war. Hierzu mussten die intravenöse Insulininfusionsrate, die Perfusatflussrate bei den OFM-Kathetern, und die Volumina der am Ausgang der OFM-Katheter gesammelten Proben, und damit die zeitliche Auflösung der Insulinkonzentrationsverläufe im ISF, aufeinander abgestimmt werden.

4. Weiters musste jene intravenöse Insulininfusionsrate bestimmt werden, ab der eine maximale Insulinwirkung auf die Gesamtkörper-Glucoseaufnahme der anästhesierten Ratten (max. Glucoseinfusionsrate) erreicht wird. Dies erforderte die Durchführung von Glucoseclamps mit unterschiedlichen Insulininfusionsraten (2 Gruppen von Ratten mit einer niedrigen und einer höheren Insulininfusionsrate). Um reichhaltigere Vergleichsmöglichkeiten mit den in der Literatur veröffentlichten Clampstudien vorzufinden, wurden für die Insulininfusionen ein Standard-Humaninsulin (Actrapid) angewandt.
5. Die Zusammenhänge zwischen den beobachteten zeitlichen Verläufen der Glucoseinfusionsrate und der Plasma- und ISF-Insulinkonzentrationen sollten durch Anwendung von Regressions- und Korrelationsanalyse-Verfahren erfasst und die erhaltenen Ergebnisse mit den in der Literatur veröffentlichten Clamp-Studienergebnissen verglichen werden.
6. Da die im Ausfluss der OFM-Katheter gemessenen Insulinkonzentrationen nur proportionale Abbilder der tatsächlichen ISF-Konzentrationen sind, sollten die absoluten ISF-Insulinkonzentrationen von den Katheter-Ausflusskonzentrationen unter Anwendung der internen Referenz-Technik geschätzt werden. Als interne Referenzsubstanz wurde hierbei Inulin herangezogen.
7. Da Proteine wie Insulin dazu neigen an Plastik- und Glasoberflächen anzuhaften (Adsorption; [19-21]), wurde bei separaten in vitro Experimenten das Adsorptionsverhalten von Insulin im OFM-System im Vergleich zur Referenzsubstanz Inulin bestimmt.

2. Methoden und Materialien

2.1 *In vitro* Experimente zur Bestimmung der Insulin- und Inulin-Adsorption im Mikroperfusionssystem

Um festzustellen, welcher Anteil des vom OFM-Katheter aus dem ISF entnommene Insulin im Kathetersystem kleben bleibt, wurde der Katheter-Perfusatflüssigkeit (Tabelle 1) Humaninsulin (100 U/ml= 600 nmol/ml; Actrapid, Novo Nordisk, Dänemark) in Konzentrationen beigemischt, die den ISF-Insulinkonzentrationen ähneln (100 und 800 pmol/l). Zwei mit den insulinhaltigen Flüssigkeiten gefüllte Glasbehälter wurden dann in ein temperaturgeregeltes Wasserbad (Julabo Labortechnik GmbH, Deutschland) gestellt. Danach wurden in die Glasbehälter jeweils 3 OFM-Katheter (Joanneum Research Forschungs-GmbH, Österreich) gelegt und die OFM-Katheter mit Peristaltikpumpe (OFM-Pumpe, MPP01; Joanneum Research Forschungs-GmbH, Österreich) verbunden. Mit Hilfe der Peristaltik-Pumpe wurden dann die Flüssigkeiten mit einer Flussrate von 1,1 µl/min durch die Katheter in die Sammelgefäße (50 µl-Glaskapillare Minicaps End to end; Hirschmann Laborgeräte, Deutschland) geleitet. Diese Sammelgefäße wurden jeweils über 45 min gefüllt und danach mit neuen ersetzt. Für Referenzmessungen wurden am Anfang (0 min) und am Ende (360 min) des Versuches Flüssigkeitsproben direkt aus den Glasbehältern entnommen. Während des Versuches wurden die Flüssigkeiten ständig mittels eines Magnetrührers (Variomag Telesystem Mehrstellenrührer; HPLabortechnik AG, Deutschland) durchmischt. Der zeitliche Ablauf des 6-stündigen Versuches ist in einer von mir am Institut für Medizintechnik verfassten Projektarbeit im Detail beschrieben [22].

Tabelle 1: Zusammensetzung und Herstellung der Perfusatflüssigkeit

Na ⁺ , (140 mmol/l) K ⁺ (5 mmol/l) Ca ²⁺ (2,5 mmol/l) Mg ²⁺ (1,5 mmol/l) Cl ⁻ (108 mmol/l)	Elomel-Pufferlösung (Fresenius Kabi Austria GmbH, Österreich)
Albumin (1%)	200 mg RSA (Ratten-Serum-Albumin; Sigma Aldrich, Österreich) in 20 ml Elomel-Pufferlösung aufgelöst; entspricht 1% RSA-Elomel-Pufferlösung
Inulin (120 mg/dl)	96 µl der 25%igen Inulinlösung (Inutest-Injektionslösung, 25 g/100ml; Fresenius Pharma Austria GmbH, Österreich) wurde in 20 ml der 1% RSA-Elomel-Pufferlösung pipettiert

2.2 Glucose-Clamp mit gleichzeitiger Anwendung der Mikroperfusions-technik bei Ratten

2.2.1 Versuchstiere

Für die in vivo Experimente wurden 14 Sprague Dawley (SD) Ratten mit Diät-induzierbarer Fettleibigkeit (*SD-Ratte; Janvier Laboratories, Frankreich*) als Modell gewählt. Die Ratten wurden 4 Wochen vor den eigentlichen Versuchen angeliefert und mit einer speziellen Diät (*23% Fett, 38% Kohlenhydrate; ssniff Spezialdiäten GmbH, Deutschland*) gefüttert. Die Haltung der Tiere erfolgte in einem Hell-Dunkel-Zyklus von jeweils 12 Stunden. Wasser und Futter standen dabei *ad libitum* zur Verfügung. Am Versuchstag wogen die Ratten zwischen 500 und 700g. Das in dieser Diplomarbeit beschriebene Studienprotokoll wurde von der Tierversuchskommission im Bundesministerium für Wissenschaft und Forschung bewilligt (Bewilligungsnummer: BMWF-66.010/0097-II/3b/2010).

2.2.2 Narkotisieren und Katheterisieren der Versuchstiere

Am Morgen des Versuchstages, nach einem 12-stündigen Fasten, wurde die Ratte narkotisiert. Für die Einleitung der Narkose wurde die Ratte in eine Induktionskammer (*Rothacher Medical GmbH, Schweiz*) gelegt. In diese Induktionskammer wurde dann mit einem Anästhesiegerät (*Combi-vet®-Anästhesiegerät; Rothacher Medical GmbH*) Sauerstoff zusammen mit einem Narkosegas (*Isofluran; Abbott Laboratories, UK*) eingebracht und mithilfe einer passiven Gasabsaugung kontinuierlich abgeleitet. Die Sauerstoff-Durchflussrate betrug 1,5 l/min und die Isoflurankonzentration lag bei 4 Vol%. Nach dem Eintreten der Narkose wurde die Ratte aus der Induktionskammer entnommen, am Rücken liegend auf einer Kleintier-Heizmatte (*TSE-Systems GmbH, Deutschland*) positioniert und an eine Narkosemaske (*Rothacher Medical GmbH*) angeschlossen. Für die Aufrechterhaltung der Anästhesie während des Katheterisierens und des darauffolgenden Glucoseclamps wurde einerseits eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Fentanyl (0,005 mg/kg), Midazolam (2 mg/kg) und Medetomidin (0,15 mg/kg) verabreicht und andererseits die Narkosemaske mit Sauerstoff und Isofluran (1,5 l/min mit 1,5 - 2,0 Vol% Isofluran) kontinuierlich durchströmt.

Nach einer Rasur des rechten Hinterteiles und vorderen Halsbereiches wurde ein Halsschnitt gemacht und die rechte Vena Jugularis freipräpariert. Danach wurde ein Katheterschlauch (*Tygon Microbore Tubing, Aussendurchmesser: 0,76 mm, Innendurchmesser: 0,25 mm; Saint-Gobain PPL Corp., USA*) in diese eingeführt und mit Nähten fixiert. Darauf folgend wurde die linke Arteria Karotis freipräpariert, vom N. vagus separiert, und ebenfalls ein Katheterschlauch (*Tygon Microbore Tubing, Saint Gobain PPL Corp., USA*) eingeführt und mit Nähten fixiert. Danach wurde der Halsschnitt mit Nähten geschlossen. Das Katheterisieren von Karotisarterie und Jugularisvene wurde nach der von Hughey et al. beschriebenen Methode [23] durchgeführt. Während der Experimente wurde der venöse Katheter für die Glucose- und Insulininfusion und der arterielle Katheter für die Blutabnahmen verwendet (Abb.5).

Nach dem Legen des venösen und arteriellen Katheters, wurden 3 OFM-Katheter (*Joanneum Research Forschungs-GmbH, Österreich*) in das subkutane Fettgewebe im Hüftbereich der Ratte platziert (Abb.6) und mit Katheterschlauch (*Schlauchset SCS001; Joanneum Research Forschungs-GmbH, Österreich*), Sammelgefäß (*50 µl-Glaskapillare Minicaps End to end*) und einer Peristaltik-Pumpe (*OFM-Pumpe, MPP01*) verbunden. Danach wurde mit Hilfe der OFM-Pumpe die OFM-Katheter kontinuierlich mit Perfusatflüssigkeit durchspült (1,1 µl/min). Als Perfusat wurde eine 1% RSA-Elomel-Pufferlösung verwendet (siehe Tabelle 1).

Zur Überprüfung der Körpertemperatur während des Versuches wurde ein Rektalthermometer (*TSE-Systems GmbH, Deutschland*) verwendet, das direkt mit einem Temperaturkontrollgerät verbunden war. Über das Temperaturkontrollgerät konnte die Temperatur der Heizmatte entsprechend angepasst werden.

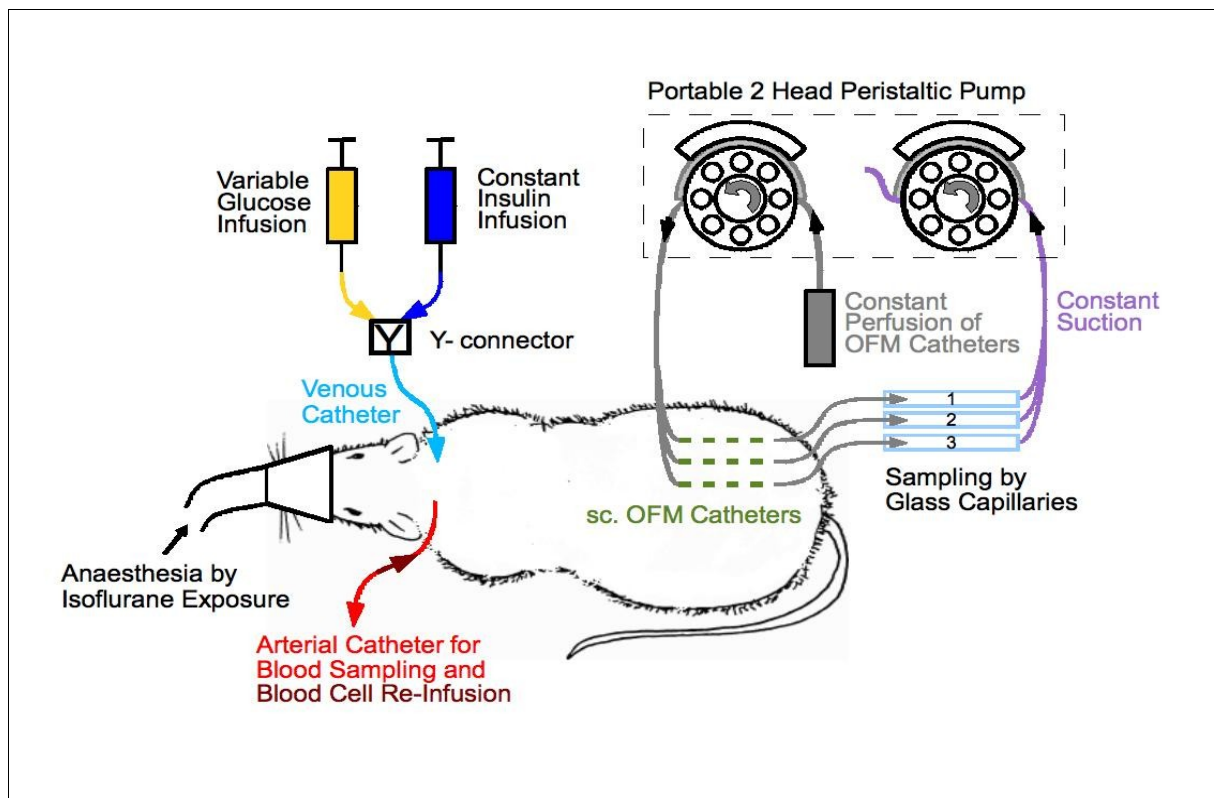


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Anordnung des arteriellen und venösen Katheters (Karotisarterie, Jugularisvene), der OFM-Katheter, des Anästhesie-Mundstückes, sowie der Pumpen zum Perfundieren der OFM-Katheter und zum intravenösen Infundieren von Glucose und Insulin.

2.2.3 Glucoseclamp und ISF-Probennahmen

Nach einem Perfundieren der OFM-Katheter von 15-30 min, wurde während einer basalen Phase von 45 min eine Blutprobe und eine OFM-Katheterausflussprobe genommen. Der genaue zeitliche Ablauf des in vivo Experimentes ist in der Abb. 7 dargestellt. Nach der basalen Phase, zum Zeitpunkt 0 min, wurde eine konstante intravenöse Insulininfusion begonnen und über 6 Stunden beibehalten. Die Zusammensetzung der Insulininfusion ist in der Tabelle 2 beschrieben. In einer Gruppe von Ratten wurde die Höhe der Insulininfusion mit 42 pmol/kg/min (Low Insulin Group) und in der anderen Gruppe mit 84 pmol/kg/min (High Insulin Group) gewählt.

Tabelle 2: Herstellung der intravenösen Insulininfusionslösung

Inhaltsstoffe	Art und Weise der Beimengung
Di-Na-Phosphat (5 mmol/l)	177,5 mg Di-Na-Phosphat (MW: 142 g) abgewogen und in ein 250ml Gefäß zur Pufferlösungsherstellung gegeben
NaCl (140 mmol/l)	2 g NaCl (MW: 58,44 g) abgewogen und in das 250 ml Gefäß gegeben
Aqua Bidest	Gefäß wurde mit Aqua Bidest bis zur 250 ml Markierung gefüllt
30 ppm Tween-20	mehrere Tropfen zur pH-Einstellung beigemischt (pH 7,4)
Low Insulin Group: Human Insulin (1,25 nmol/ml)	20 ml der hergestellten Pufferlösung genommen und 42 µl des Human Insulin (100 U/ml= 600 nmol/ml; Actrapid, Novo Nordisk) in die Pufferlösung pipettiert
High Insulin Group: Human Insulin (2,25 nmol/ml)	20 ml der hergestellten Pufferlösung genommen und 84 µl des Human Insulin (100 U/ml= 600 nmol/ml; Actrapid, Novo Nordisk) in die Pufferlösung pipettiert

Nach dem Beginn der Insulininfusion, wurden in 10 min-Abständen Blutproben für Plasmaglukosebestimmungen genommen und, abhängig von den erhaltenen Glukosekonzentrationen, Glukose (33% Glukose; *Mayrhofer Pharmazeutika GmbH, Österreich*) über den Jugulariskatheter ins Blut infundiert. Durch die laufende Anpassung dieser Glukoseinfusion wurde die Plasmaglukosekonzentration auf einen Zielwert von 8 mmol/l (144 mg/dl) gebracht und dort gehalten („clamped“). Während des Versuches wurden alle 45 min die OFM-Glaskapillaren gewechselt, die jeweiligen Inhalte der Kapillaren in kleine Plastikgefäße (*Novo Nordisk, Dänemark*) pipettiert und bis zur Probenanalyse eingefroren. Für Vergleichszwecke wurden jeweils fünf der sequentiell abgenommenen 10-minütigen Plasmaproben zu einer einzigen Probe zusammengefasst und bis zur Probenanalyse eingefroren.

Für die Insulininfusion und Glukoseinfusion über den Jugulariskatheter wurden zwei Spritzenpumpen (*Aladdin; World Precision Instruments Germany GmbH, Deutschland*) verwendet. Die beiden Infusionen wurden vor dem Erreichen des Jugulariskatheters mit einem Y-Verbinder (*60 Degree Y-Connector; Small Parts, USA*) zusammengeführt (Abb. 6).

Um die Durchgängigkeit des Karotiskatheters während des Versuches aufrecht zu

erhalten, wurde dieser Katheter nach jeder Blutprobennahme mit einer Kochsalzlösung (9 g/l NaCl; Fresenius Kabi Austria GmbH, Österreich), der Heparin in einer Konzentration von 10 I.E./ml beigefügt wurde (Heparin Immuno 1000 I.E./ml; Ebewe Pharma GmbH, Österreich), gespült. Weiters wurden die von den Blutproben stammenden, abzentrifugierten Blutzellen (Plasmareste und Blutzellen von ~5 Proben) in heparinierter Kochsalzlösung suspendiert und über den Karotiskatheter in 45 min-Intervallen re-infundiert, um bei der Ratte eine Anämie zu vermeiden. Am Ende des Experimentes wurden die in Narkose befindlichen Versuchstiere durch eine intraperitoneal verabreichte Überdosis Thiopental getötet.

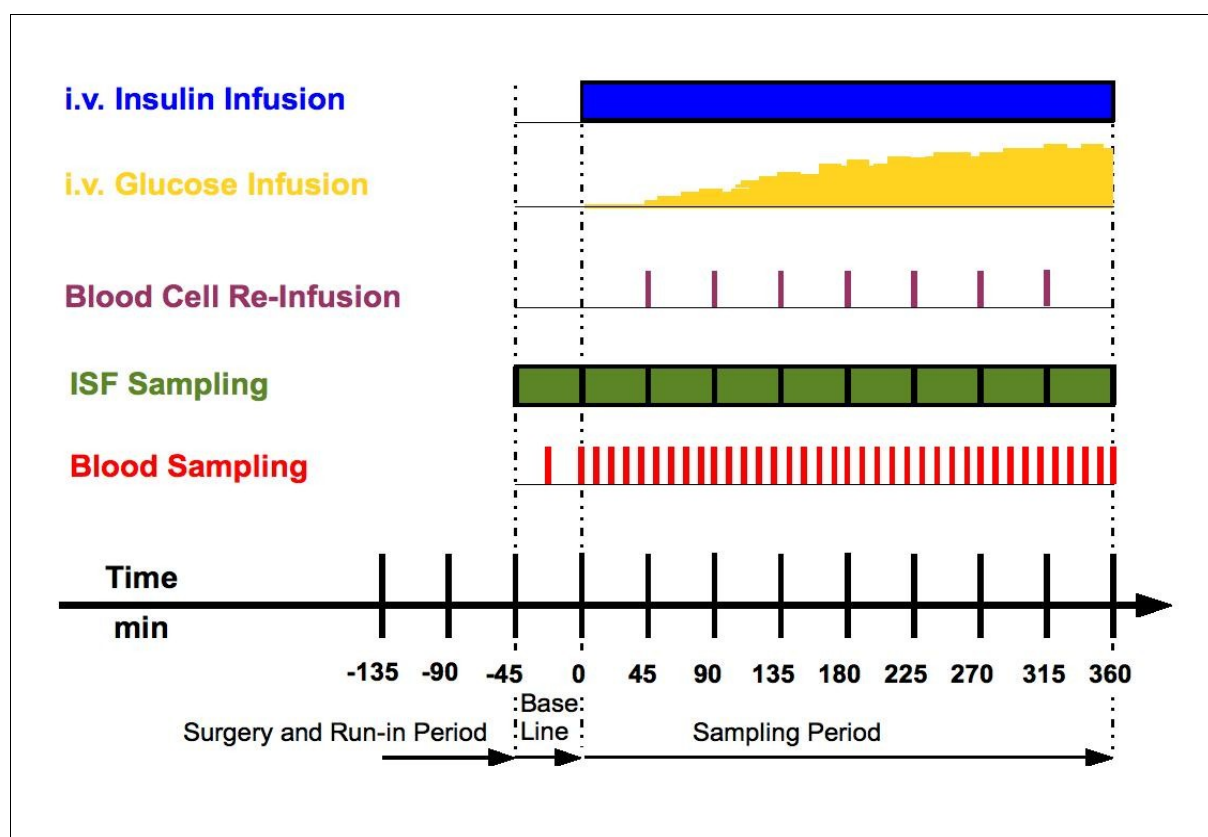


Abbildung 7: Darstellung des zeitlichen Ablaufes des Versuches .

2.2.4 Verwendete Messverfahren zur Probenanalyse

Die Glucosekonzentrationsbestimmung in den entnommenen Plasmaproben wurde vor Ort mittels zweier Glucoseanalytoren (*Super GL2; Dr. Müller Gerätebau GmbH, Deutschland*) durchgeführt. Die Messung der Insulinkonzentration in den Plasmaproben und OFM-Katheterausflussproben wurde mit dem Luminescence Oxygen Channeling Immunoassay (LOCI) (*AlphaLISA; Novo Nordisk, Dänemark*)

durchgeführt. Die Inulinkonzentrationen in den Perfusatproben und OFM-Katheterausflussproben wurden photometrisch mit einem adaptierten, enzymatischen Kit (*Glucoquant; Roche Diagnostic, Deutschland*) und unter Verwendung eines Standard-Laboranalysators (*Cobas Mira; Hoffmann-La Roche, Schweiz*) gemessen.

2.3 Datenanalyse

2.3.1 Analyse der in vitro Ergebnisse

Die prozentuelle Wiederfindung (WF) für Insulin und Inulin wurde für den jeweiligen Versuchszeitpunkt t aus den Insulin- und Inulinkonzentrationen in den mit den OFM-Kathetern gesammelten Proben und den korrespondierenden Insulin- und Inulinkonzentrationen in den Glasbehälterproben mit folgender Formel berechnet:

$$WF(t_i) = C(t_i) / REF(t_i) * 100\% , \text{ wobei}$$

$C(t_i)$die Insulin- oder Inulinkonzentration in den OFM-Katheterausflüssen zum jeweiligen Versuchszeitpunkt t und,

$REF(t_i)$die Insulin- oder Inulinkonzentration im Glasbehälter zum jeweiligen Versuchszeitpunkt t ist.

Die prozentuelle Adsorption (ADS) wurde aus der Wiederfindung wie folgt berechnet:

$$ADS(t_i) = 100\% - WF(t_i)$$

Aus den erhaltenen Wiederfindungswerten für Insulin und Inulin wurden Mittelwerte (MW), Standardfehler (SE) und Standardabweichungen (SD) für beide Perfusatgruppen und jeden Probennahmezeitpunkt berechnet. Mit Hilfe des „One way Repeated Measure ANOVA“ -Tests und des „Friedman ANOVA“ -Tests wurde anschließend untersucht, ob die erhaltenen Wiederfindungswerte sich über die Dauer des in vitro Versuches geändert haben. Weiters wurde mit Hilfe des parametrischen Student-T Tests untersucht, ob die durchschnittlichen Adsorptions- bzw. Wiederfindungswerte für Insulin und Inulin sich von 0% bzw. 100% unterscheiden.

2.3.2 Analyse der Ergebnisse der Glucoseclamps

Die Ergebnisse der in vivo Experimente wurden mittels deskriptiver Statistik (Mittelwert, Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwertes) zusammengefasst. Mit Hilfe des Student-T Tests wurde untersucht, ob die bei den zwei Rattengruppen beobachteten mittleren GIR- bzw. Glucosekonzentrations-Werte voneinander verschieden sind. Weiters wurde mit diesem Test untersucht, ob sich die für die jeweilige Rattengruppe erhaltenen Plasma- und ISF-Insulinkonzentrationen voneinander unterscheiden.

Um die Zusammenhänge zwischen den beobachteten zeitlichen Verläufen der Glucoseinfusionsrate und der Plasma- und ISF-Insulinkonzentrationen zu erfassen wurde eine lineare Regressionsanalyse durchgeführt. Bei dieser Analyse wurden die für jede Ratte beobachteten GIR-Werte gegen die zeitlich korrespondierenden Plasmainsulinwerte bzw. ISF-Insulinwerte in einem Graphen aufgetragen, und durch die erhaltenen Punkte eine Gerade gelegt. Die lineare Regression liefert drei wichtige Parameter:

kist die Steigung der durch die Datenpunkte gelegten Gerade

dist der Schnittpunkt der Geraden auf der y-Achse

r^2ist das Bestimmtheitsmaß und gibt an, wie genau die Gerade den jeweiligen Datenpunkten entspricht. (r^2 kann zwischen 0 und 1 liegen, je näher der Wert bei 1 liegt desto „linearer“ der Zusammenhang)

Aus den Werten von Steigung und Schnittpunkt kann man die Werte der Geraden die durch die Datenpunkte gelegt wurde wie folgt berechnen:

$$y = k \cdot x + d, \text{ wobei}$$

y der GIR (in mg/kg/min) und x der Insulinkonzentration (in pmol/l) entspricht.

Die absolute ISF-Insulinkonzentrationen ($ISFI_{ABS}$) wurden für den jeweiligen Versuchszeitpunkt t aus den in den OFM-Katheterausflussproben gemessenen Insulinkonzentrationen und der Katheter-Recovery für Insulin mit folgender Formel berechnet [13, 15]:

$$ISFI_{ABS}(t) = ISFI_{REL}(t) / REC(t), \text{ wobei}$$

$ISFI_{REL}(t)$die Insulinkonzentration in den OFM-Katheterausflüssen zum jeweiligen Versuchszeitpunkt t und,

REC(t).....die OFM-Katheter-Recovery für Insulin zum jeweiligen Versuchszeitpunkt t ist.

Die Katheter-Recovery für Insulin wurde für den jeweiligen Versuchszeitpunkt t aus den im Perfusat und Katheterausflüssen gemessenen Inulinkonzentrationen mit folgender Formel berechnet [16-18]:

$$REC(t) = (IN_{IN}(t) - IN_{AUS}(t)) / IN_{IN}(t), \text{ wobei}$$

$IN_{AUS}(t)$die Inulinkonzentration in den OFM-Katheterausflüssen zum jeweiligen Versuchszeitpunkt t und,

$IN_{IN}(t)$die Inulinkonzentration in den OFM-Katheterperfusaten zum jeweiligen Versuchszeitpunkt t ist.

Die graphischen Darstellungen und statistischen Analysen wurden mit dem Origin-Softwarepaket (*Version 8.0, OriginLab Cop., USA*) durchgeführt.

3. Resultate

3.1. In vitro Versuchsergebnisse

Bei den in vitro Experimenten wurde das Adsorptionsverhalten von Insulin und Inulin im Kathetersystem untersucht. Auswertungen ergaben, dass die erhaltenen Wiederfindungswerte für Insulin und Inulin sich über die Dauer des in vitro Versuches (6 Stunden) nicht änderten (siehe auch [22]). Weiters waren die Insulin- und Inulinwiederfindungswerte für die Katheter in den beiden Glasbehältern nicht unterschiedlich. In Abbildung 8 sind die mittleren, über die Dauer des Versuches beobachteten Wiederfindungswerte für Inulin- und Insulin dargestellt. Für Insulin lag dieser Wert bei 94,1% und für Inulin bei 102,6%.

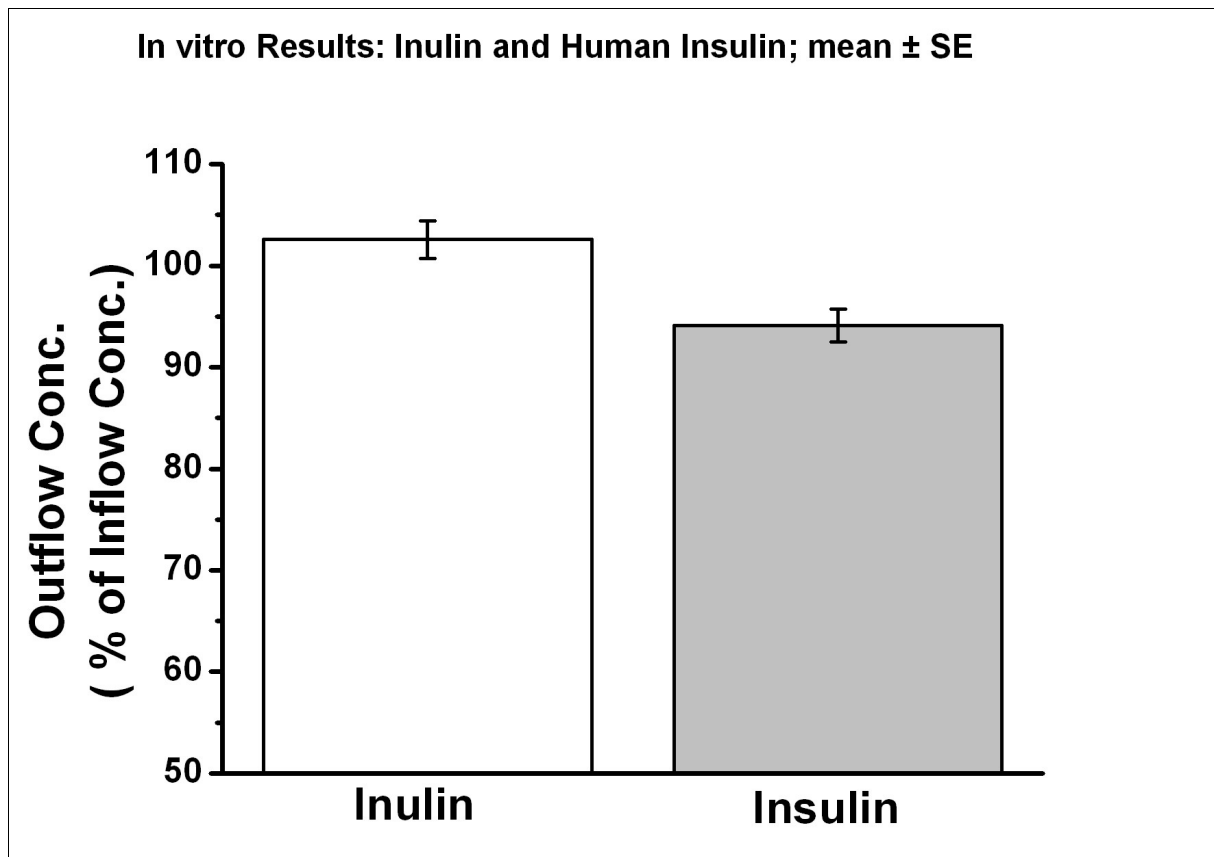


Abbildung 8: Mittlere Inulin- und Insulinkonzentration im Katheterausfluss in Prozent der Referenzkonzentrationen (Inflow Concentration bzw. Glasbehälterkonzentration)

Die Anwendung des parametrischen Student-T Tests ergab, dass der Wiederfindungswert für Insulin signifikant kleiner als 100% war ($p < 0,001$), was bedeutet, dass durchschnittlich 5,9% des entnommenen Insulins im Kathetersystem adsorbiert. Der Wiederfindungswert für Inulin war hingegen nicht unterschiedlich von 100%, was bedeutet, dass die Adsorption für diese Substanz vernachlässigbar klein ist. In Tabelle 3 sind die durchschnittlichen Adsorptionswerte für Insulin und Inulin gemeinsam mit den Student-T Testergebnissen angegeben.

Tabelle 3: Mittlere prozentuelle Inulin- und Insulinadsorption im Kathetersystem

Substanz	Mean (\pm SE; \pm SD)	p-Wert Student-T Hypothese = 0%
Insulin	5,9% (\pm 1,6%; \pm 7,8%)	p<0,001
Inulin	-2,6% (\pm 1,8%; \pm 9,0%)	p=0,91

3.2. Ergebnisse der Glucoseclamps

3.2.1 Katheterisieren der Versuchstiere

Mit der gewählten Technik der Jugularis- und Karotis-Katheterisierung [23] konnte über die gesamte Dauer der Glucoseclamps (~7 Stunden) die Infusion von Glucose und Insulin als auch die Blutprobenabnahmen problemlos durchgeführt werden. Abbildung 9 zeigt die Positionierung von Katheterschläuchen in die Jugularis und Karotis der Ratte.

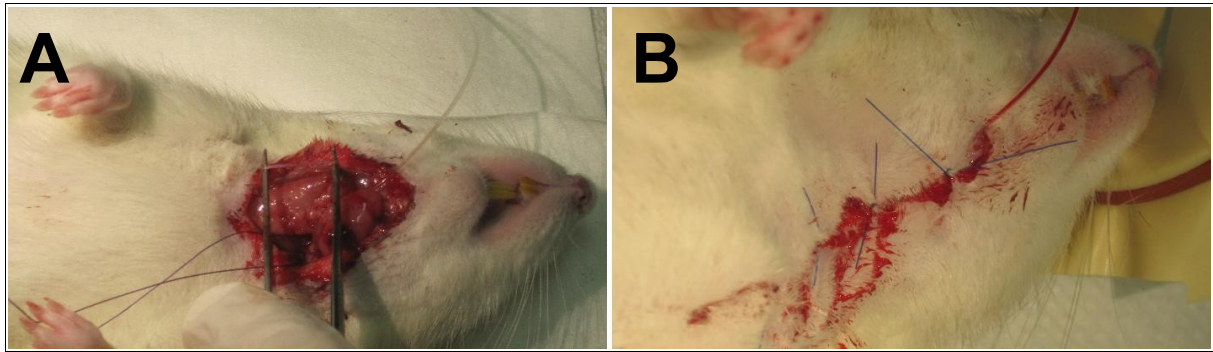


Abbildung 9: Legen eines arteriellen und venösen Katheters bei einer Sprague-Dawley Ratte. **A)** Nach dem Freipräparieren der Jugularisvene und Karotisarterie wurde in diese jeweils ein Katheterschlauch eingeführt und mit Nähten fixiert. **B)** Nach einer Durchgängigkeitsprüfung der Katheter wurde die Schnittwunde am Hals mit mehreren Nähten geschlossen.

Abbildung 10 zeigt das Setzen eines OFM-Katheters in das subkutane Fettgewebe im Hüftbereich der Ratte. Dieser Bereich wurde deshalb ausgesucht, da dort die Fettschichtdicke der Ratten generell am größten war. Während der Glucoseclamps konnte mit den so gesetzten OFM-Kathetern problemlos ISF-Proben gesammelt werden. Nach dem Euthanasieren der Ratte am Ende der Experimente wurde die Positionierung der OFM-Katheter im subkutanen Fettgewebe untersucht. Die Austauschflächen der Katheter waren vollständig im subkutanen Fettgewebe platziert (Abb.11).

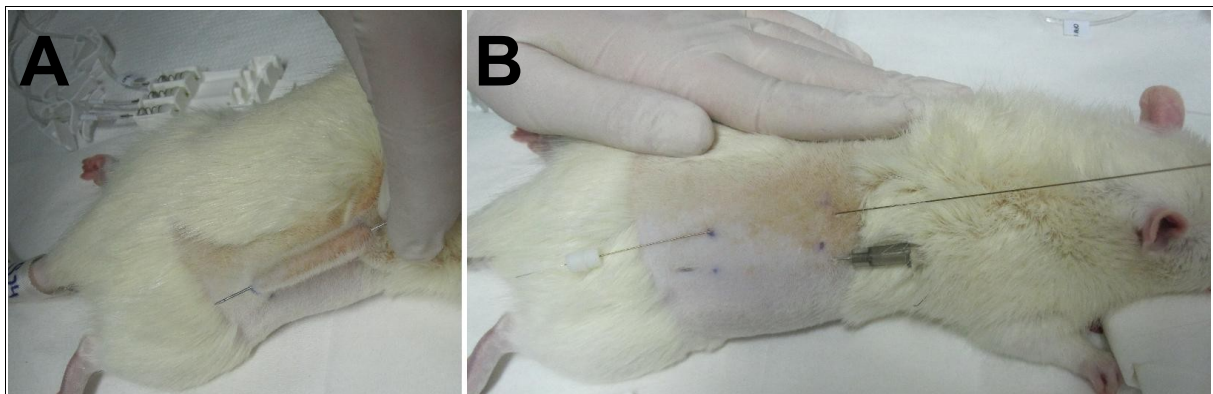


Abbildung 10: Setzen eines OFM Katheters ins subkutane Fettgewebe einer Sprague- Dawley Ratte. **A)** Nach dem Rasieren der Implantationsstelle am Rücken, wird die dortige Haut mit einer Hohlnadel über eine Länge von ~4 cm untertunnelt. **B)** Danach wird ins Lumen der Hohlnadel der OFM-Katheter eingeführt und die Hohlnadel vorsichtig entzogen, sodass der perforierte Teil des OFM-Katheters im Gewebe zu liegen kommt.

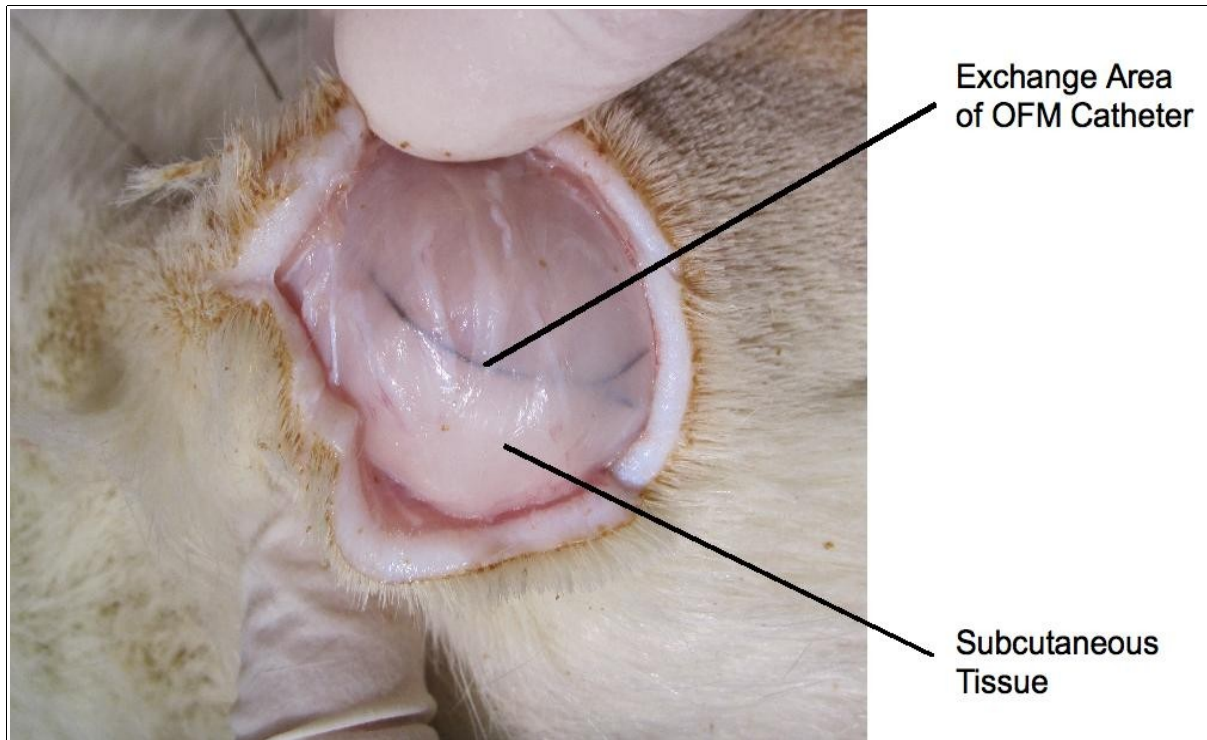


Abbildung 11: Kontrolle der Positionierung des OFM Katheters ins subkutane Gewebe einer Sprague- Dawley Ratte.

3.2.2 Glucoseclamp und ISF-Probennahmen

Die Glucoseclamps wurden bei 14 Sprague-Dawley Ratten durchgeführt. Am Versuchstag wogen die Ratten durchschnittlich 580 ± 90 g. Die Ratten wurden nach dem Zufallsprinzip in eine Gruppe mit hoher und eine mit niedriger Insulininfusion eingeteilt (Low Insulin Group und High Insulin Group). In Abbildung 12 wird der Versuchsaufbau sowie die Blut- und ISF-Probennahme als auch die Probenverarbeitung gezeigt.

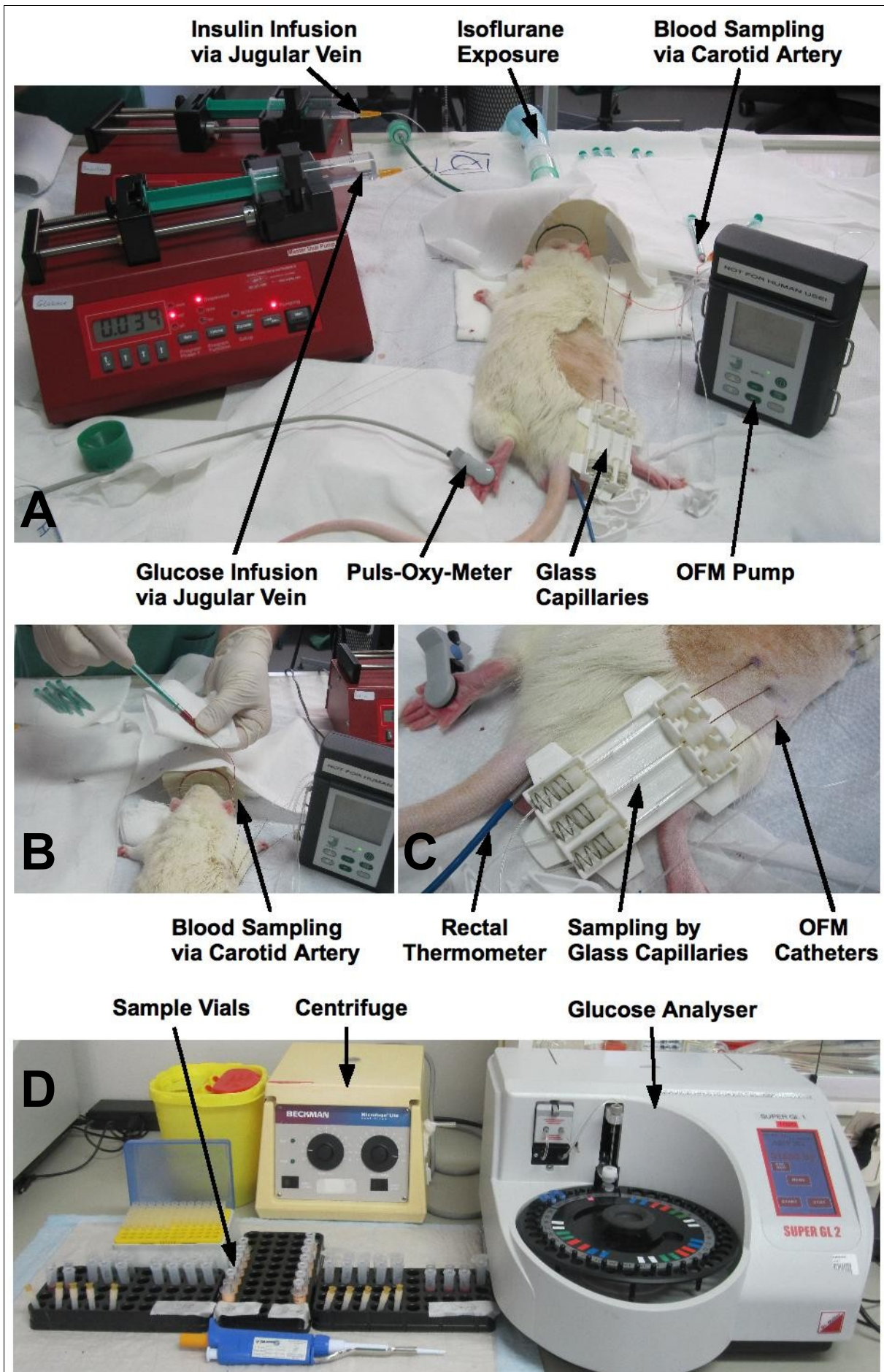


Abbildung 12: Anordnung von Katheter, Pumpen, Anästhesie-Mundstück, Rektalthermometer und Pulsoximeter (A) sowie Blutprobennahme (B) und ISF-Probennahme (C) als auch Probenanalyse und Probenverarbeitung (D) während der Experimente bei Sprague Dawley-Ratten.

Im Fastenzustand, kurz vor dem Start der intravenösen Insulininfusion, lag der durchschnittliche Plasmaglucosewert der Ratten bei $13,9 \pm 0,9$ mmol/l. Nach dem Start der Insulininfusion, fiel die Plasmaglucose innerhalb von 45 min auf den Zielwert von ~ 8 mmol/l (Abb.13 und 14). Durch eine variable intravenöse Glucoseinfusion konnte dieser Plasmaglucosewert bis zum Ende des Versuches beibehalten werden. Nach ungefähr 3,5 Stunden der intravenösen Insulininfusion wurde bei der Glucoseinfusionsrate (GIR) ein Steady-State erreicht (Abb.13 und 14).

Die erhaltenen GIR-Werte während des Stead-States war bei der Gruppe mit niedriger Insulininfusionsrate gleich hoch wie bei der Gruppe mit hoher Insulininfusionsrate ($19,9 \pm 1,0$ vs. $21,0 \pm 1,0$; $P= 0,49$). Weiters wurde während der GIR-Stead-State-Phase die Plasmaglucose bei der Gruppe mit niedriger Insulininfusion auf dem selben Niveau geklemmt wie bei der Gruppe mit hoher Insulininfusion ($8,18 \pm 0,19$ vs. $8,19 \pm 0,20$; $P= 0,99$). Daraus kann geschlossen werden, dass die gewählte Insulininfusion mit niedriger Rate bei den Ratten schon eine maximale Glucoseaufnahme bewirkt hatte.

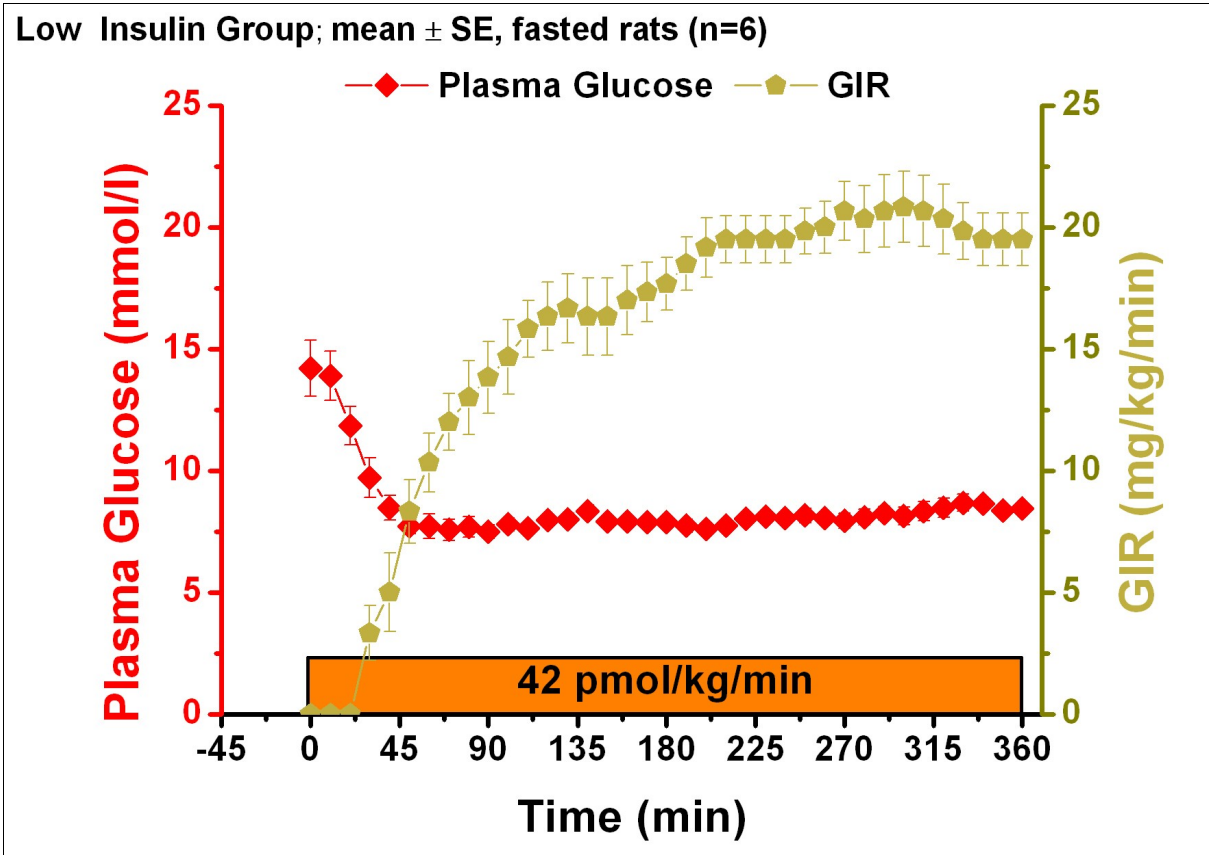


Abbildung 13: Mittlere Zeitverläufe der Plasmaglukosekonzentration und der GIR während des Glucoseclamps bei den Sprague-Dawley Ratten (n=6) mit niedriger Insulininfusionsrate (42 pmol/kg/min).

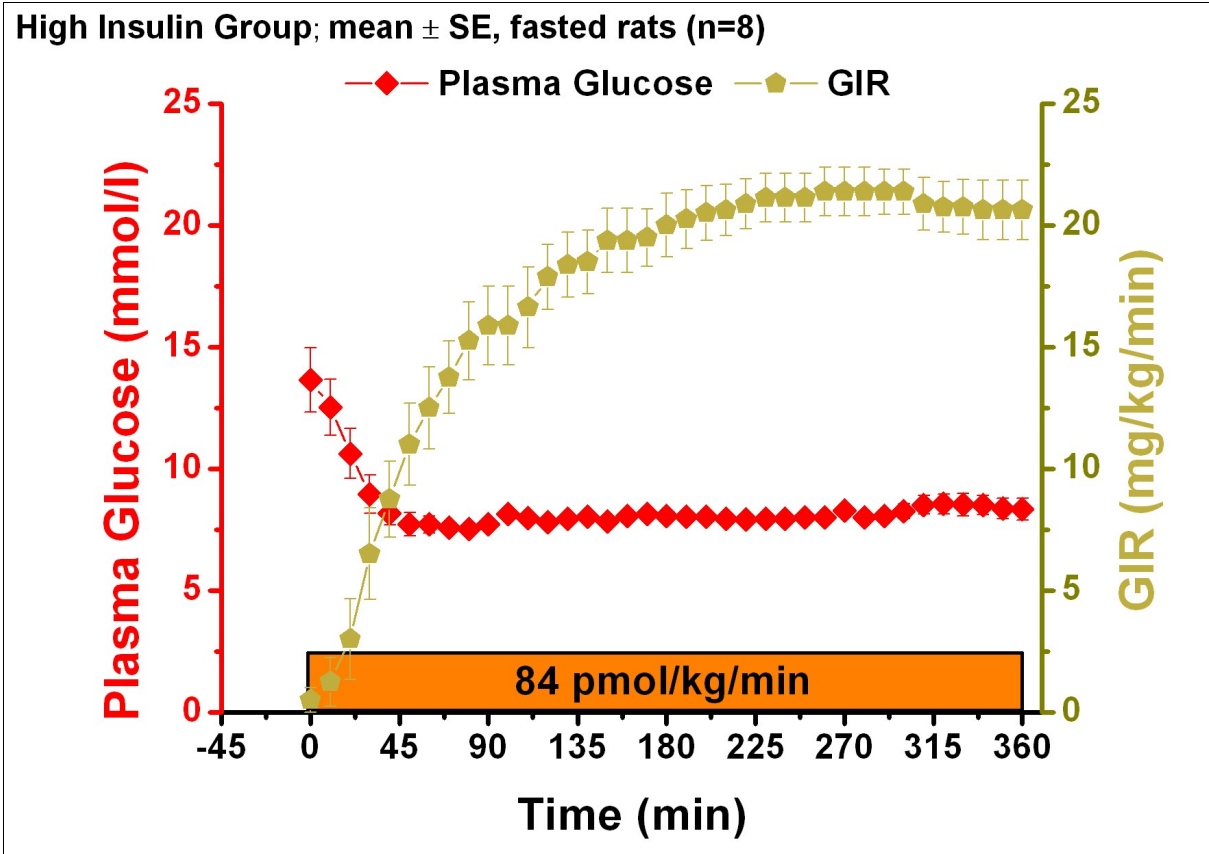


Abbildung 14: Mittlere Zeitverläufe der Plasmaglukosekonzentration und der GIR während des Glucoseclamps bei den Sprague-Dawley Ratten (n=8) mit hoher Insulininfusionsrate (84 pmol/kg/min).

3.2.3 Insulinkonzentrationsverläufe im Plasma- und ISF-Proben

In den Abbildungen 15 und 16 sind die gemessenen Insulinkonzentrationsverläufe im Plasma und der ISF während des Glucoseclamps bei niedriger und hoher Insulininfusion dargestellt. Man erkennt, dass im Plasma der Anstieg der Insulinkonzentration schneller war als der im ISF. So hatte z.B. eine Stunde nach dem Beginn der Insulininfusion die Plasmainsulinkonzentration ein Steady-State-Niveau eingenommen, wohin gegen zu diesem Zeitpunkt die ISF-Insulinkonzentration erst ungefähr 50% ihrer Steady-State-Konzentration erreicht hatte (Abb. 15 und 16). Die Insulinkonzentration im ISF hatte ungefähr 3,5 Stunden nach dem Beginn der Insulininfusion ein Steady-State-Niveau eingenommen. Die Steady-State Plasmainsulinkonzentrationen lagen bei der Gruppe mit niedriger (42 pmol/kg/min) und hoher (84 pmol/kg/min) Insulininfusion bei 4435 ± 346 pmol/l bzw. 8906 ± 1026 pmol/l. Die (rel.) Steady-State Insulinkonzentrationen im ISF lagen bei der Gruppe mit niedriger und hoher Insulininfusion bei 292 ± 33 pmol/l bzw. 663 ± 41 pmol/l. Eine Verdoppelung der intravenösen Insulininfusionsrate bewirkte demnach eine Verdoppelung der Steady-State Insulinkonzentration im Plasma wie auch in der ISF.

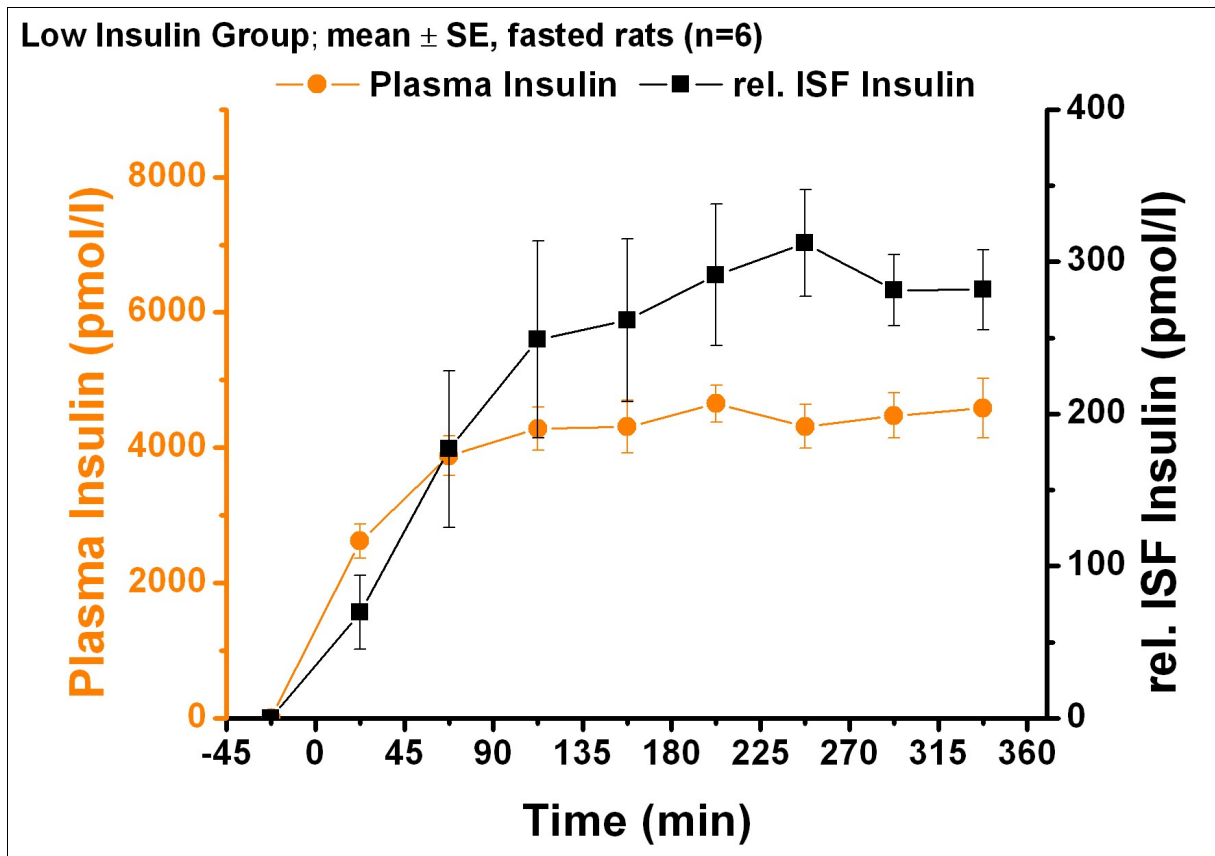


Abbildung 15: Mittlere Zeitverläufe der Plasmainsulinkonzentration und der (rel.) ISF-Insulinkonzentration während des Glucoseclamps bei den Sprague-Dawley Ratten (n=6) mit niedriger Insulininfusionsrate (42 pmol/kg/min).

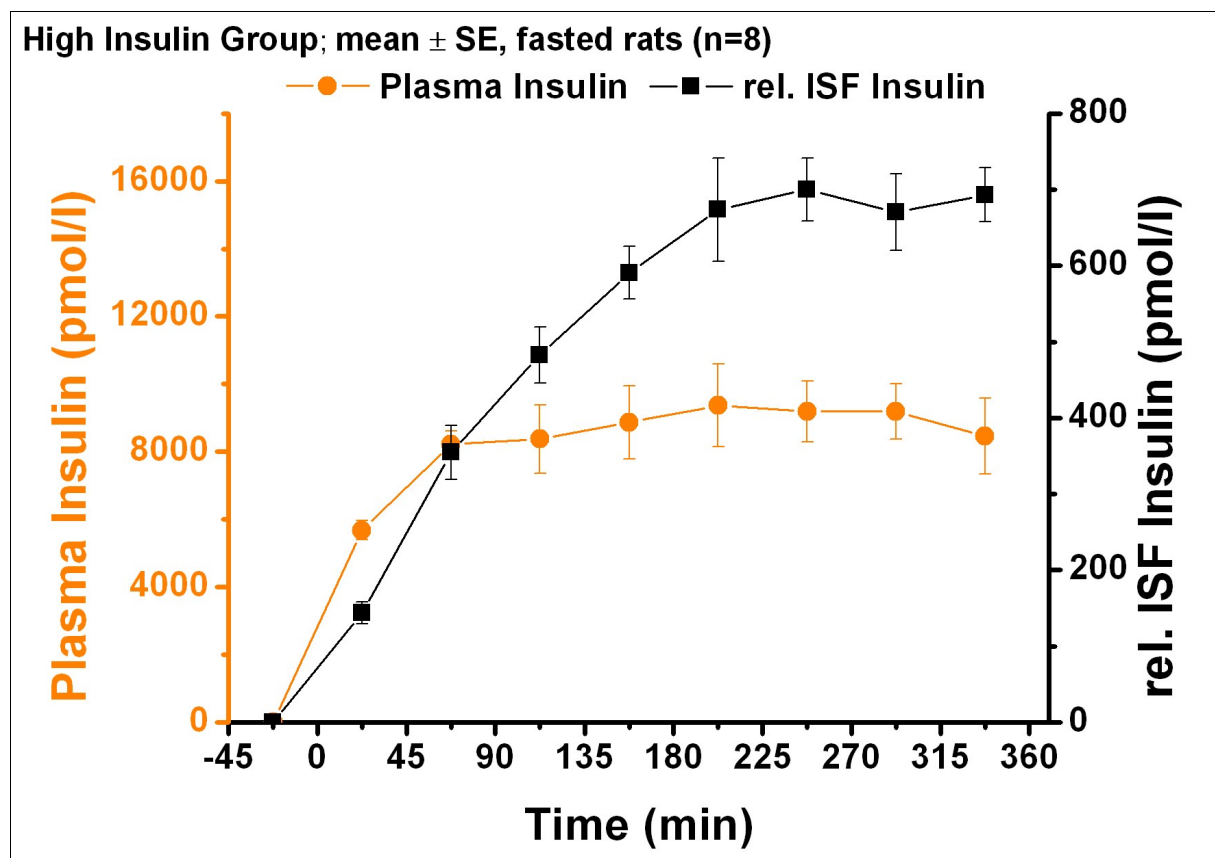


Abbildung 16: Mittlere Zeitverläufe der Plasmainsulinkonzentration und der (rel.) ISF-Insulinkonzentration während des Glucoseclamps bei den Sprague-Dawley Ratten (n=8) mit hoher Insulininfusionsrate (84 pmol/kg/min).

3.2.4 Zusammenhänge zwischen GIR-Konzentrationsverläufe und Insulinkonzentrationsverläufen

In den Abbildung 17-20 wurden die Insulinkonzentrationsverläufe mit den Verläufen der GIR verglichen. Es ist ersichtlich, dass bei beiden Insulininfusionsgruppen der zeitliche Verlauf der GIR dem Insulinkonzentrationsverlauf im ISF ähnlicher ist (Abb.18 und 20) als dem Insulinkonzentrationsverlauf im Plasma (Abb. 17 und 19). So war bei der Gruppe mit niedriger und hoher Insulininfusion die Zeit zum Erreichen der Steady-State GIR-Werte gleich lang wie die Zeit zum Erreichen der Steady-State-Werte für die ISF-Insulinkonzentration. Bei beiden Insulininfusionsgruppen wurde das Steady-State für die Plasmainsulinkonzentration weitaus früher erreicht als das Steady-State für die GIR. Die Ergebnisse der Regressionsanalyse der GIR- und Insulinwerte bestätigte diese Beobachtung. Für die Glucoseclamps mit niedriger als auch mit hoher Insulininfusion war der mit der linearen Regression der GIR- und ISF-Insulinwerte abgeleitete Bestimmungswert (r^2) höher als der mit der linearen Regression der GIR- und Plasmainsulinwerte erhaltene (niedrige Insulininfusion: 0,37 vs. 0,26; hohe Insulininfusion: 0,63 vs. 0,27). In den Abbildungen 21-24 sind die jeweiligen Regressionen graphisch dargestellt.

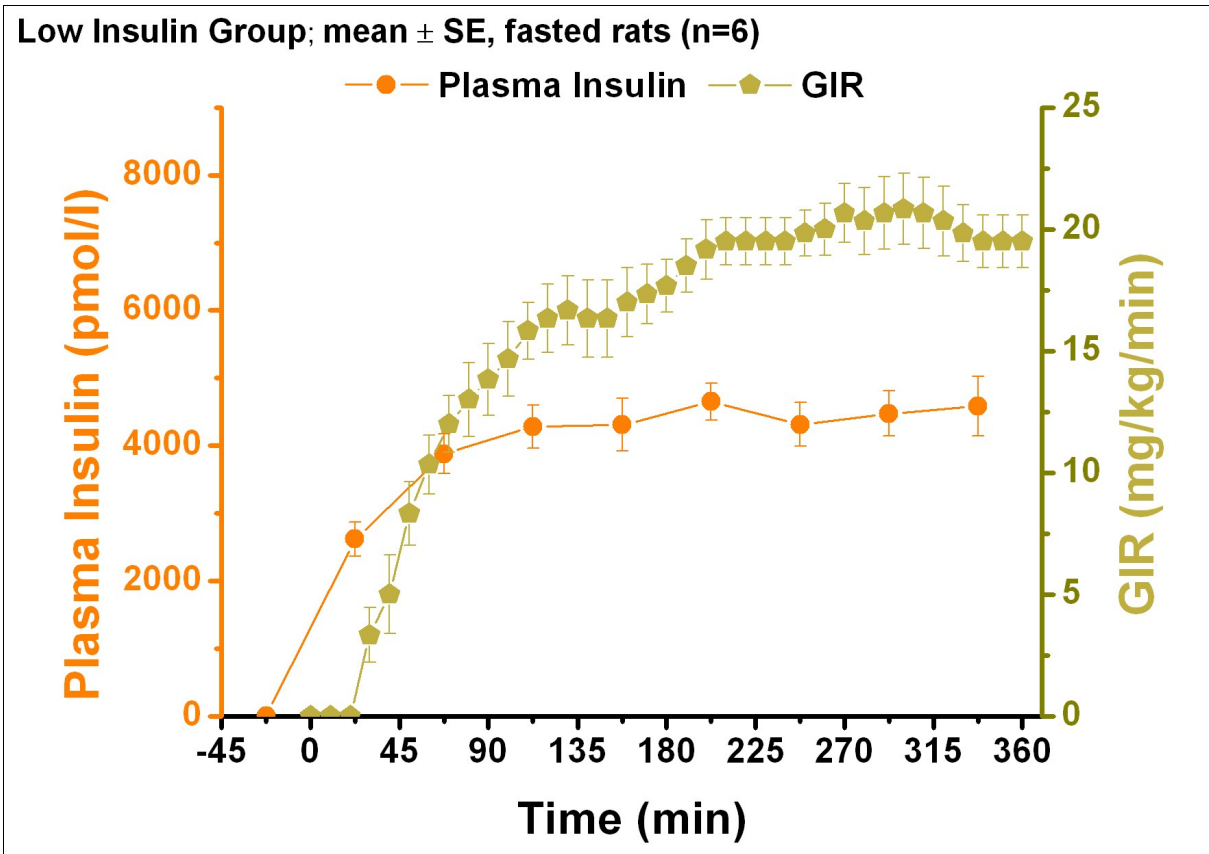


Abbildung 17: Mittlere Zeitverläufe der Plasmainsulinkonzentration und der GIR während des Glucoseclamps bei den Sprague-Dawley Ratten (n=6) mit niedriger Insulininfusionsrate (42 pmol/kg/min).

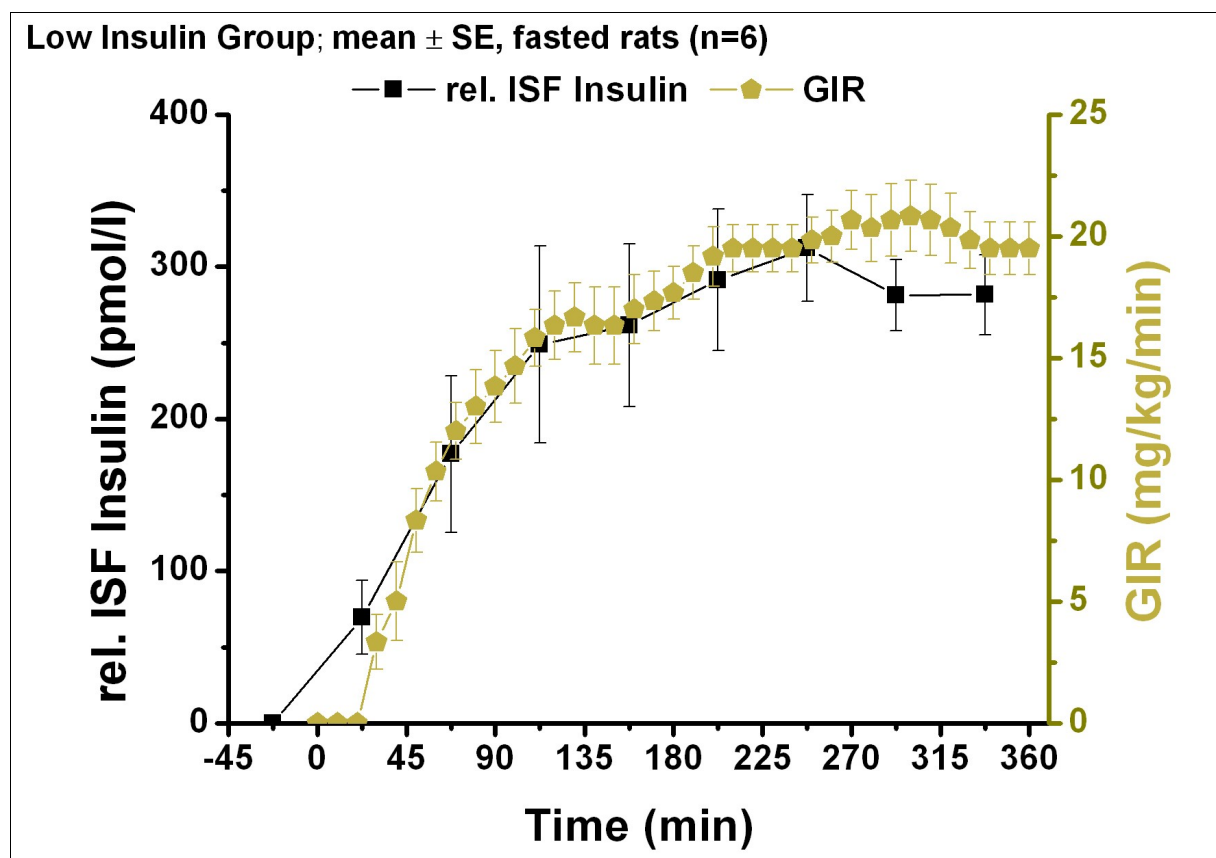


Abbildung 18: Mittlere Zeitverläufe der (rel.) ISF-Insulinkonzentration und der GIR während des Glucoseclamps bei den Sprague-Dawley Ratten (n=6) mit niedriger Insulininfusionsrate (42 pmol/kg/min).

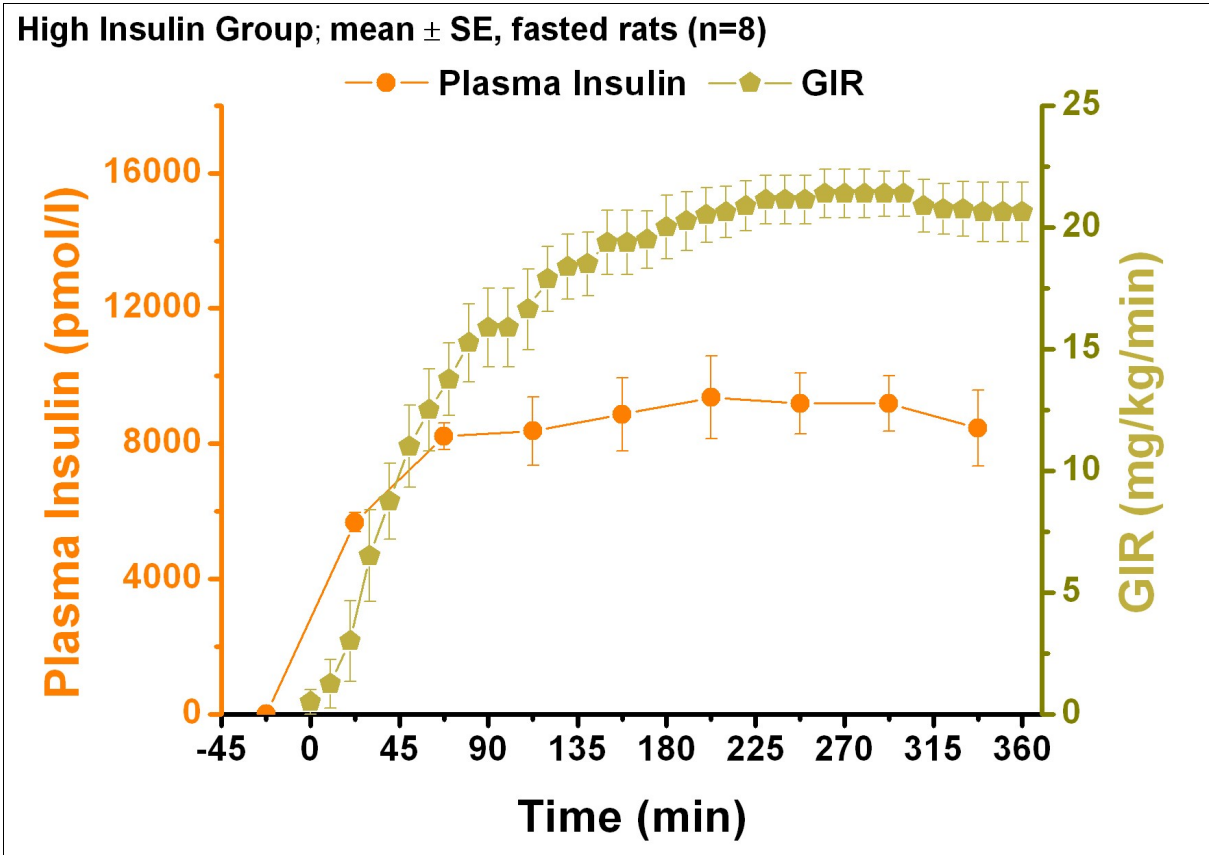


Abbildung 19: Mittlere Zeitverläufe der Plasmainsulinkonzentration und der GIR während des Glucoseclamps bei den Sprague-Dawley Ratten (n=8) mit hoher Insulininfusionsrate (84 pmol/kg/min).

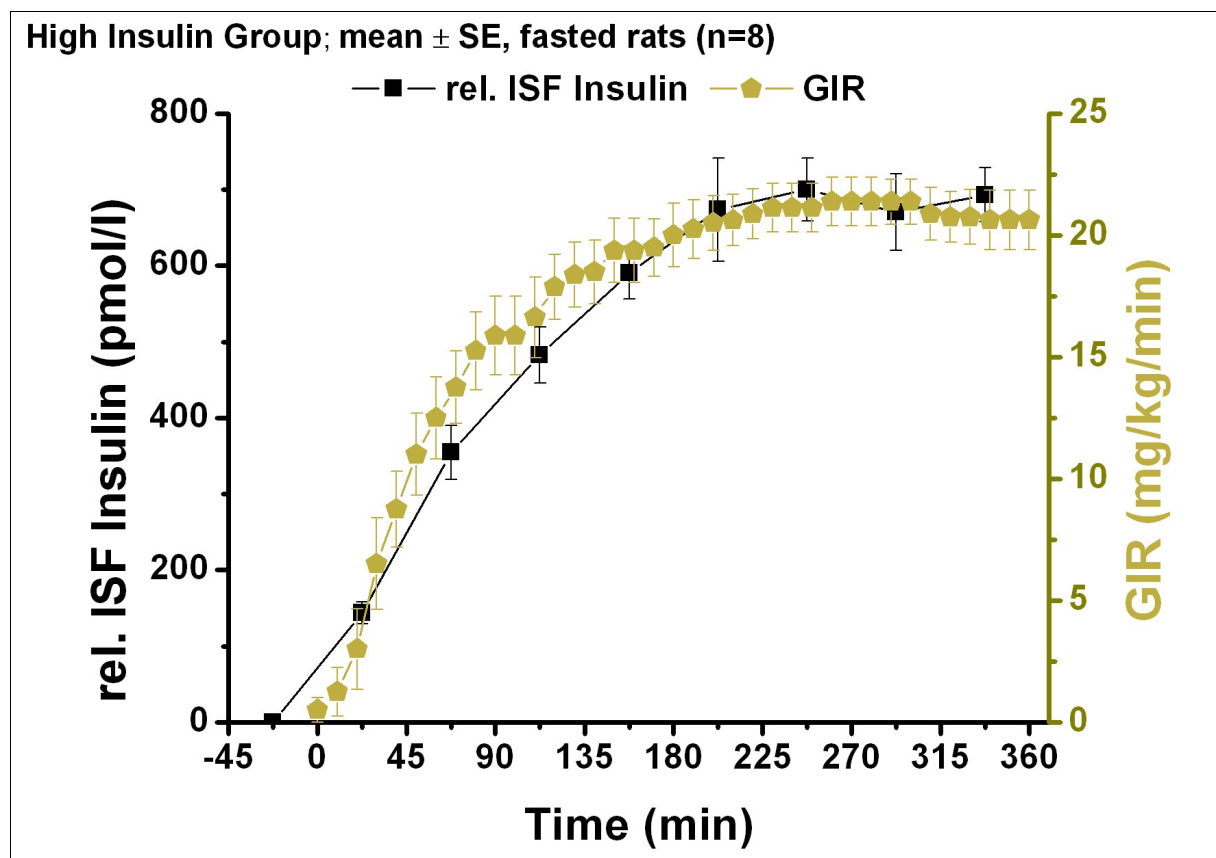


Abbildung 20: Mittlere Zeitverläufe der (rel.) ISF-Insulinkonzentration und der GIR während des Glucoseclamps bei den Sprague-Dawley Ratten (n=8) mit hoher Insulininfusionsrate (84 pmol/kg/min).

Low Insulin Group: Correlation between GIR & Plasma Insulin

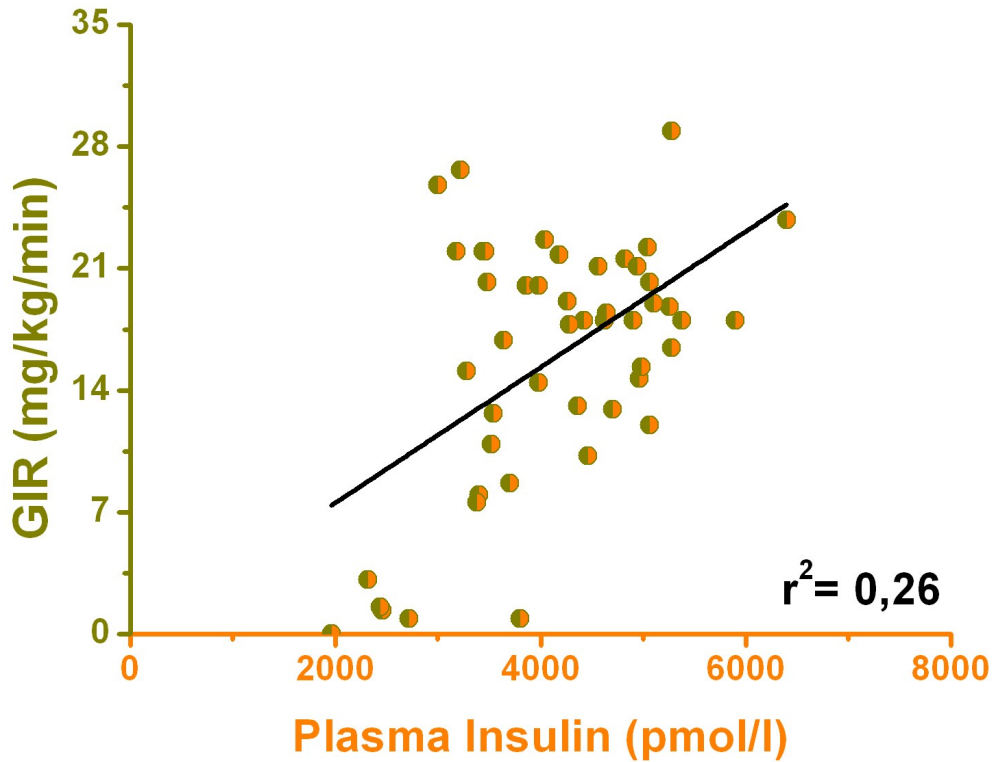


Abbildung 21: Regressionsanalyse der von der Gruppe (n=6) mit niedriger Insulininfusion erhaltenen GIR- und Plasmainsulinwerte. Es wurden 48 Datenpunkte (8 pro Ratte) analysiert.

Low Insulin Group: Correlation between GIR & rel. ISF Insulin

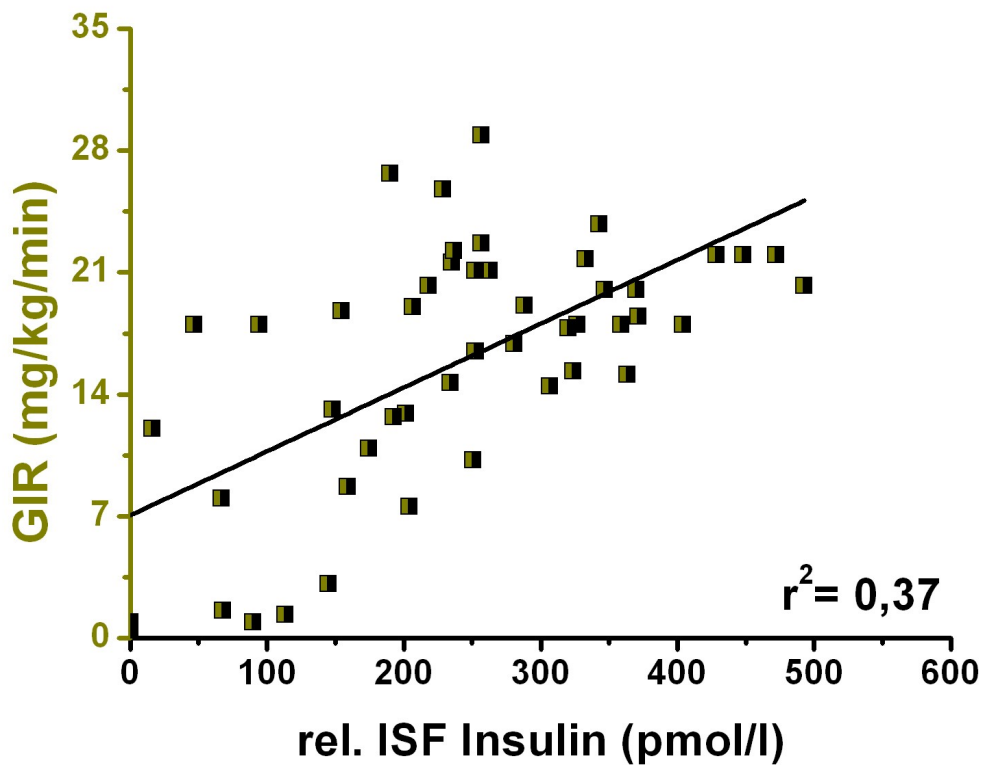


Abbildung 22: Regressionsanalyse der von der Gruppe (n=6) mit niedriger Insulininfusion erhaltenen GIR- und ISF-Insulinwerte. Es wurden 48 Datenpunkte (8 pro Ratte) analysiert.

High Insulin Group: Correlation between GIR & Plasma Insulin

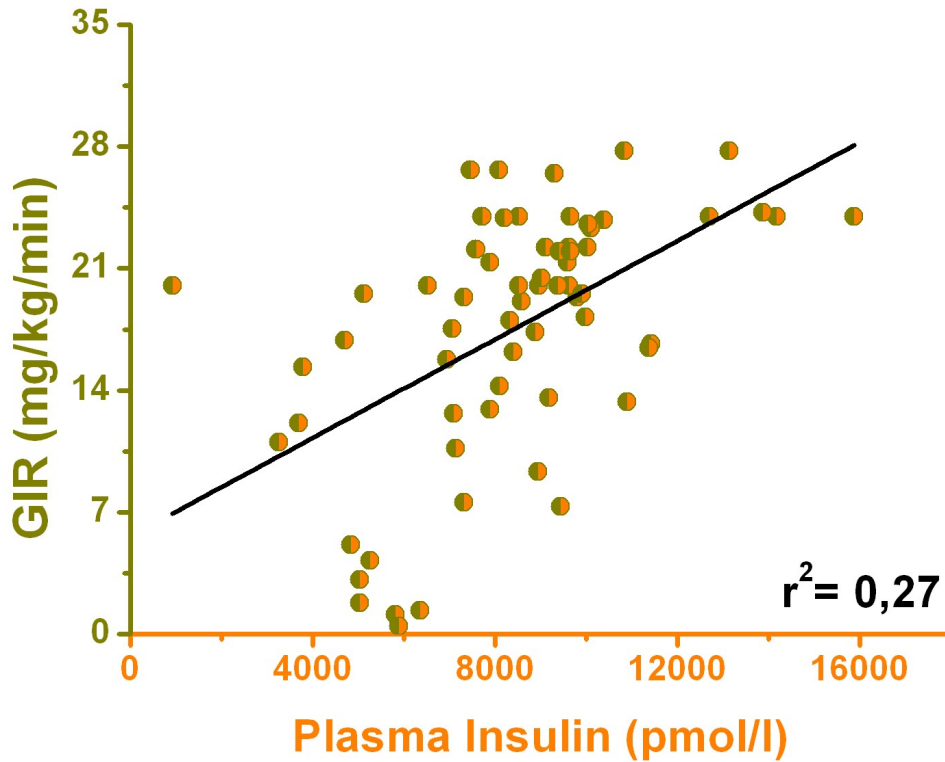


Abbildung 23: Regressionsanalyse der von der Gruppe (n=8) mit hoher Insulininfusion erhaltenen GIR- und Plasmainsulinwerte. Es wurden 64 Datenpunkte (8 pro Ratte) analysiert.

High Insulin Group: Correlation between GIR & rel. ISF Insulin

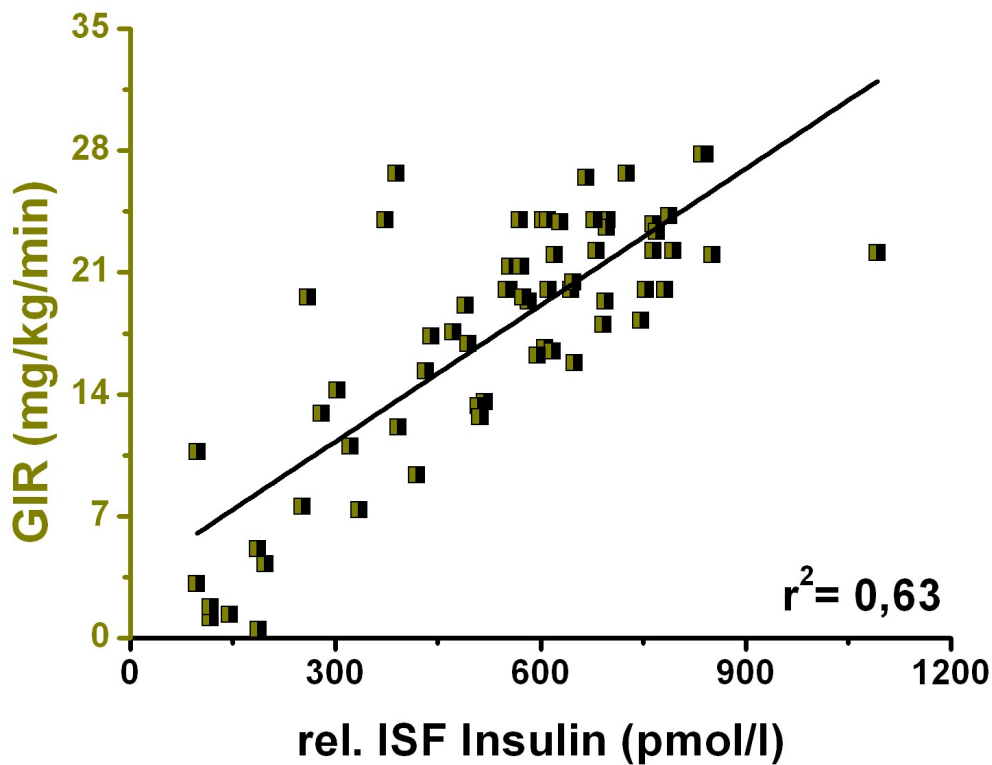


Abbildung 24: Regressionsanalyse der von der Gruppe (n=8) mit hoher Insulininfusion erhaltenen GIR- und ISF-Insulinwerte. Es wurden 64 Datenpunkte (8 pro Ratte) analysiert.

3.2.5 Schätzung der absoluten Insulinkonzentrationen im ISF

Zur Bestimmung der Insulin-Recovery in den am Ausgang der OFM-Katheter gesammelten ISF-Proben wurde die Inulinkonzentration in den ISF-Proben und den Perfusaten (Kathetereingangskonzentration) gemessen. Aus der Differenz der Inulinkonzentration im Katheterausgang und -eingang wurde dann die Reverse-Recovery von Inulin berechnet. Durch eine relativ hohe Varianz bei der Inulinmessung wurden nur 4 Ratten pro Gruppe für die Bestimmung der Reverse-Recovery und der absoluten ISF-Insulinkonzentration herangezogen. Die erhaltenen durchschnittlichen Reverse-Recovery-Werte für die zwei Gruppen sind in der Abbildung 25 dargestellt. Sie lagen für die Gruppe mit niedriger Insulininfusion bei $10,8 \pm 1,5\%$ und für die Gruppe mit hoher Insulininfusion bei $11,3 \pm 2,8\%$. Unter der Annahme, dass die Inulin Reverse-Recovery der Insulin-Recovery gleicht, wurde aus den Recovery- und Insulinkonzentrationswerten am Katheterausgang die absolute ISF-Insulinkonzentrationen geschätzt. In den Abbildungen 26 und 27 sind die errechneten mittleren absoluten ISF-Insulinkonzentrationen und mittleren Plasmakonzentrationen für die Gruppen mit niedriger und hoher Insulininfusion dargestellt. Bei der Gruppe mit niedriger Insulininfusion waren während der Steady-State-Phase die absoluten ISF-Konzentrationen durchschnittlich $54,6 \pm 9,6\%$ der Plasmakonzentrationen (2346 ± 257 pmol/l vs. 4496 ± 423 pmol/l; $p= 0,036$). Bei der Gruppe mit hoher Insulininfusion waren während der Steady-State-Phase die absoluten ISF-Konzentrationen durchschnittlich $78,6 \pm 17,2\%$ der Plasmakonzentrationen (7850 ± 2051 pmol/l vs. 9887 ± 1303 pmol/l). Die beiden Gruppenmittelwerte waren jedoch statistisch nicht signifikant voneinander verschieden ($p= 0,28$). In den Abbildungen 26 und 27 sind weiters die mittleren absoluten ISF-Konzentrationsverläufe unter Berücksichtigung der geschätzten Katheteradsorption für Insulin ($\sim 6\%$) dargestellt.

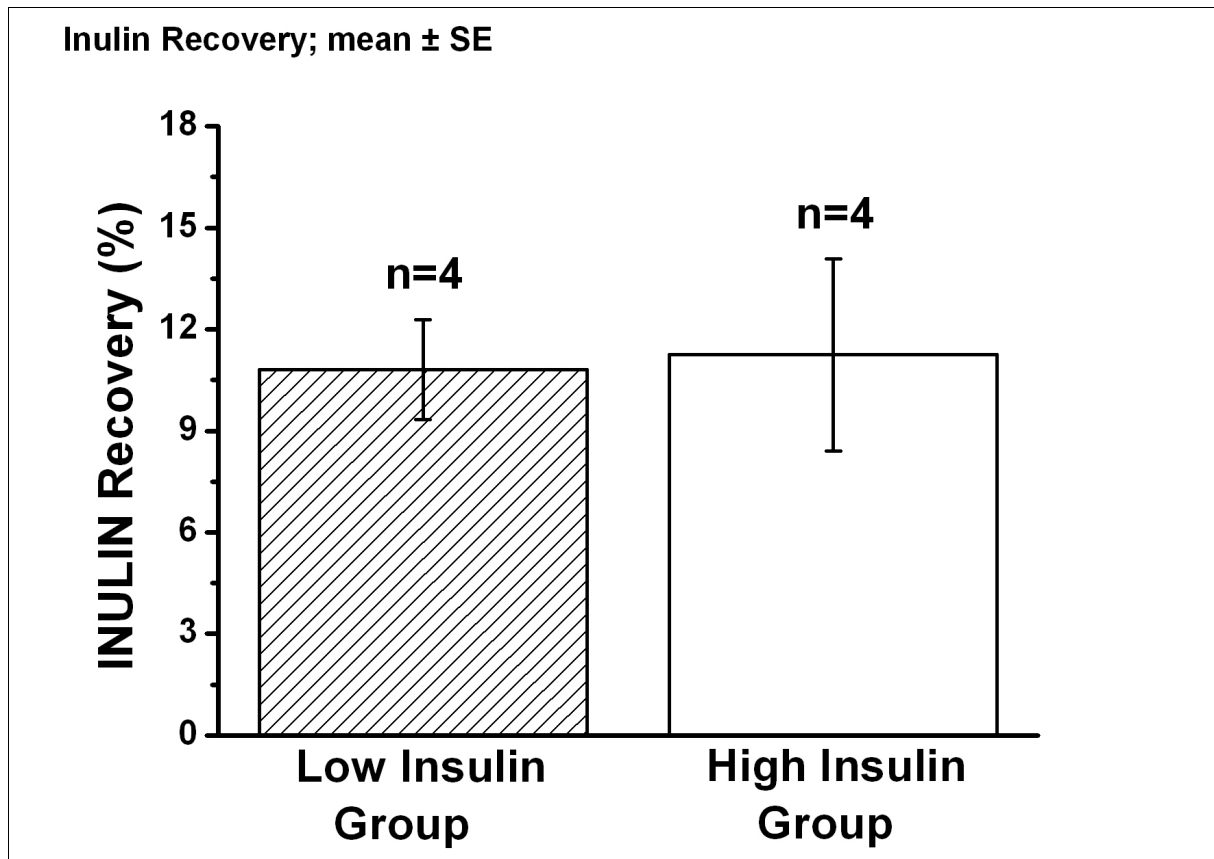


Abbildung 25: Mittlere Inulin-Reverse-Recovery während der Glucoseclamps mit niedriger (n=4) und hoher (n=4) Insulininfusion.

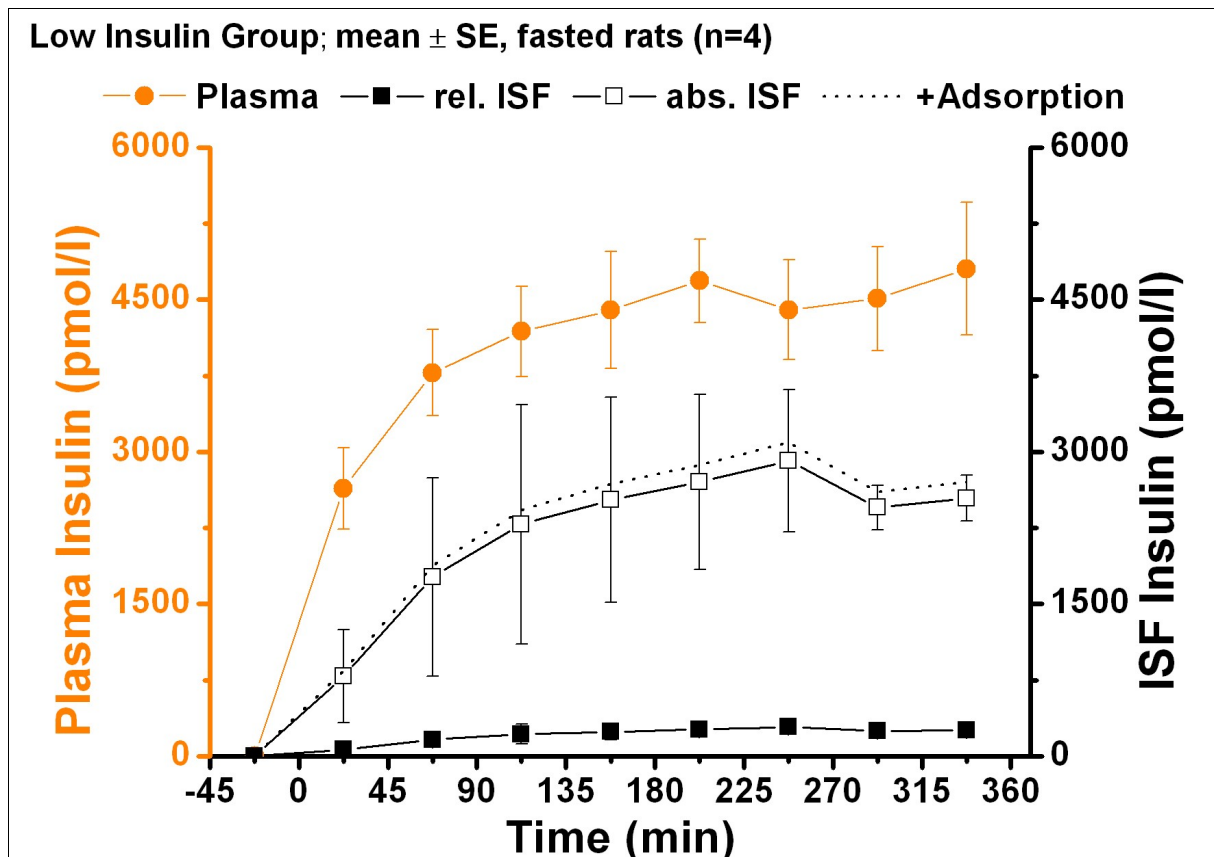


Abbildung 26: Mittlere Zeitverläufe der Plasmainsulinkonzentration sowie der relativen und absoluten ISF-Insulinkonzentration als auch der absoluten ISF-Insulinkonzentration unter Berücksichtigung der Katheteradsorption während des Glucoseclamps bei Sprague-Dawley Ratten (n=4) mit niedriger Insulininfusionsrate (42 pmol/kg/min).

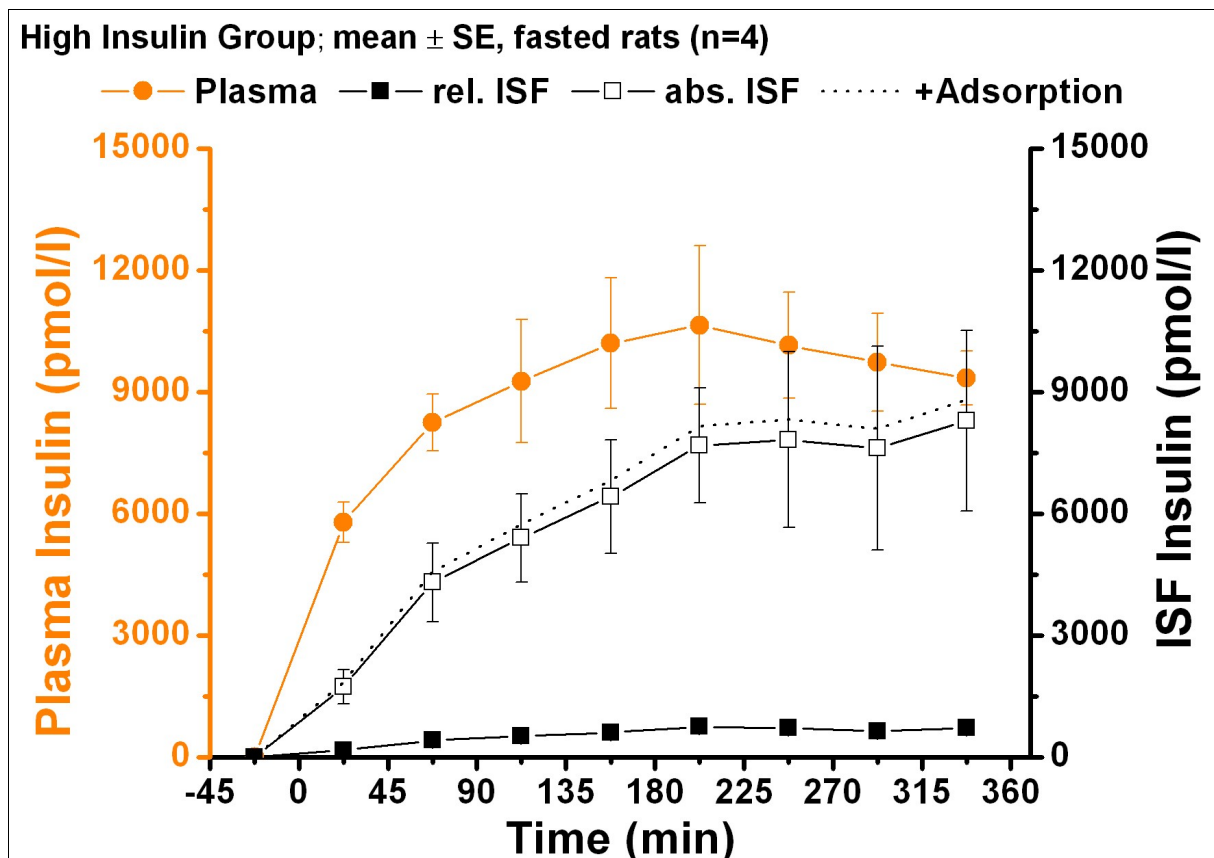


Abbildung 27: Mittlere Zeitverläufe der Plasmainsulinkonzentration sowie der relativen und absoluten ISF-Insulinkonzentration als auch der absoluten ISF-Insulinkonzentration unter Berücksichtigung der Katheteradsorption während des Glucoseclamps bei Sprague-Dawley Ratten (n=4) mit hoher Insulininfusionsrate (84 pmol/kg/min).

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, die OFM-Technik mit dem Glucose-Clamp bei Ratten, für eine verbesserte Charakterisierung von Insulinen, zu vereinen. Um dies zu erreichen, haben wir durch spezielles Betreiben der OFM-Katheter und besondere Gestaltung des Glucose Clamps die beiden Untersuchungsmethoden aufeinander abgestimmt und die gleichzeitige Anwendbarkeit in Form von Experimenten bei fettleibigen Ratten getestet.

4.1 Wahl des Rattenmodells

Um der Anforderung der interstitiellen Probennahme vom subkutanen Fettgewebe Genüge zu leisten, wurden für die Versuche ein Rattenmodell mit Diät-induzierbarer Fettleibigkeit ausgesucht. Tiere dieses Rattenstammes wurden 4 Wochen vor den eigentlichen Versuchen vom Labortieranbieter Janvier geliefert. Die Tiere wurden dann mit spezieller fettreicher Nahrung 4 Wochen lang gefüttert. Nach dieser Art der Fütterung wiesen die Ratten eine erhöhte subkutane Fettschichtdicke auf, was dann am Versuchstag das vollständige Implantieren der Austauschfläche der OFM-Katheter im subkutanen Fettgewebe erlaubte. Am Ende jedes Experimentes wurde post mortem die Katheter-Implantationsstellen der Ratte untersucht (Abb. 11) und die richtige Positionierung der Katheter im Fettgewebe kontrolliert. Für die Durchführung der Versuche wären prinzipiell auch andere Rattenmodelle mit erhöhter subkutaner Fettschichtdicke in Frage gekommen (z.B.: SHROB-, ZDF- und Zucker-Ratten [24]). In der Beschaffung sind diese Rattenmodelle jedoch vergleichsweise sehr teuer, sodass die Wahl auf das Rattenmodell mit Diät-induzierbarer Fettleibigkeit gefallen ist.

4.2 Betreiben der OFM-Katheter während des Glucose-Clamps

Für die interstitielle Probennahme vom subkutanen Fettgewebe wurden die OFM-Katheter mit einer Perfusatflüssigkeit kontinuierlich durchströmt. Die Wahl der Höhe der verwendeten Durchflussrate (1,1 $\mu\text{l}/\text{min}$) wurde unter Berücksichtigung dreier

wesentlicher Gesichtspunkte getroffen: Erstens sollte die Durchflussrate möglichst klein sein, um eine hohe Austauscheffizienz der Stoffe zwischen ISF und Perfusat (hohe Recovery) zu erreichen. Andererseits sollte die Durchflussrate möglichst hoch sein, damit das Volumen jeder am Katheterausgang kontinuierlich gesammelten Probe für die Messung des Insulins ($\sim 30\mu\text{l}$) und Inulins ($\sim 10\mu\text{l}$) ausreichend groß ist. Weiters sollte die Zeitspanne, über denen die einzelnen Proben kontinuierlich gesammelt werden, möglichst klein sein, sodass die zeitliche Auflösung bei der Messung der Insulinkonzentrationsverläufe möglichst hoch ist. Die Ergebnisse unserer Versuche zeigten, dass mit der gewählten Durchflussrate von $1,1\ \mu\text{l}/\text{min}$ und der Probennahme-Länge von jeweils 45 min das Volumen und die Austauscheffizienz ausreichend hoch waren (Abb. 25) um sowohl die Insulin- und Inulinkonzentration zu messen als auch eine akzeptable zeitliche Auflösung bei der Bestimmung der Insulinkonzentrationsverläufe zu erreichen (Abb. 15 und 16).

Für die Versuche wurde eine Perfusatlösung angewandt, die der ISF hinsichtlich der Elektrolytkonzentrationen, der Osmolarität, des pH-Wertes, sowie der Albuminkonzentration ähnelte (Tabelle 1). Bei früheren Studien bei denen die OFM-Technik eingesetzt wurde, wurden Perfusatlösungen mit ähnlicher Zusammensetzung angewandt [12, 25, 26]. Dem hier verwendeten Perfusat wurde darüber hinaus noch Inulin in einer Konzentration von 120 mg/dl beigemischt, um während der Versuche die Katheteraustauschrate für das Insulin zu bestimmen und daraus die absolute interstitielle Insulinkonzentration zu errechnen (interne Referenz-Technik, [16-18]). Das beigemischte Inulin ist ein Polysaccharid mit einer Molekülgröße die dem des Insulins sehr ähnlich ist (Inulin: 5000 Da; Insulin: 5900 Da; [25]). Inulin hat deshalb ähnliche Diffusions- und kapilläre Permeabilitätseigenschaften wie das Insulin. Inulin wird im Körper nicht produziert. Wenn es aber von außen in den Körper eingebracht wird, wird es im Fettgewebe oder Muskelgewebe von den dortigen Zellen nicht aufgenommen und verstoffwechselt [25, 26]. Inulin eignet sich deshalb sehr gut als interne Referenzsubstanz für das Insulin. Aufnahme und Ausscheidung des Inulins erfolgt hauptsächlich über die Nieren des Körpers.

Albumin wurde in einer Konzentration von 1% (10 g/l) dem Perfusat beigemischt, was ungefähr der Albuminkonzentration im ISF von Fett- und Muskelgewebe entspricht [14]. Aus der Literatur ist bekannt, dass eine solche Beimischung von Albumin zu Insulininfusaten die Adsorptionsverluste vom Insulin an den Oberflächen von Behältern, Schläuchen und Kathetern stark vermindert [27-30]. Ohne Beimischung

von Albumin wurden Adsorptionsverluste bis zu 80% beschrieben [28-30]. Darüber hinaus wurden auch große Schwankungen bei den Adsorptionsverlusten an den Behältern, Schläuchen und Kathetern während der Infusionszeit des Insulins berichtet [29, 30]. Für die Adsorption von Insulin an den Oberflächen von Behältern, Schläuchen und Kathetern sind vorwiegend hydrophobe Effekte und elektrostatische Kräfte verantwortlich [19-21]. Bei der vorliegenden Diplomarbeit (Abb. 8) und der früheren von mir verfassten Projektarbeit [22] konnte gezeigt werden, dass am Ausgang des OFM-Systems die mittlere Wiederfindungswerte für Inulin und verschiedenen, kleinmolekularen Substanzen über eine 6-stündige Perfusionszeit konstant bei 100% lag, was bedeutet, dass diese Substanzen am Kathetersystem nicht kleben bleiben. Die Insulin-Wiederfindung am Systemausgang war über den Versuchszeitraum ebenfalls konstant, jedoch lag der mittlere Wiederfindungswert bei 94%. Dies bedeutet, dass während der Perfusion ständig ~6% des eingeleiteten Insulins sich an die Insulinbindungsstellen des Kathetersystems anlagert und dass es in diesem Zeitraum zu keiner Sättigung der vorhandenen Insulinbindungsstellen kommt. Der Test der Adsorption wurde mit zwei unterschiedlichen Perfusat-Insulinkonzentrationen durchgeführt (100 pmol/l und 798 pmol/l). Die Adsorptionswerte für die hohe und niedrige Insulinkonzentration lagen in dem vergleichbaren Bereich von 6%. Dies bedeutet, dass im Falle einer Konzentrationsänderung am Eingang des Systems diese Änderung am Systemausgang proportional wiedergegeben werden kann. Die relativ kleinen Adsorptionsverluste von 6% wurden später bei der Berechnung der absoluten interstitiellen Insulinkonzentration berücksichtigt.

4.3 Narkotisierung und Katheterisierung der Ratten

Am Morgen des Versuchstages wurde vor dem Implantieren der OFM-Katheter auch ein Blutabnahmekatheter in die Karotisarterie und ein Infusionskatheter in die Jugularisvene der Ratte gesetzt. Während der gesamten Dauer des Katheterisierens und des darauffolgenden Glucose-Clamps wurde die Ratte unter Narkose gehalten. Dies wurde einerseits durch eine intraperitoneale Injektion eines Analgetikums und andererseits durch das Anlegen einer Narkosemaske, welche mit Sauerstoff und Isofluran kontinuierlich durchströmt wurde, erreicht (Abb. 6 und 12). Die Tiefe der Narkose wurde während des Experimentes durch die Anpassung des

Mischungsverhältnisses zwischen Sauerstoff und Isofluran laufend geregelt. Mit dem Einsatz dieser Anästhesiemethode konnte während der Dauer des Versuchs sowohl das Setzen der Katheter als auch die arteriellen Blutabnahmen und intravenösen Infusionen unter schmerzfreien Bedingungen durchgeführt werden.

Für das Katheterisieren von Karotisarterie und Jugularisvene wurde die von Hughey et al. beschriebene Methode angewandt [23]. Diese Methode erlaubt auch die Katheter über einen längeren Zeitraum in den Gefäßen zu belassen, sodass die Katheter dann im Wachzustand der Ratte betrieben werden können (Chronisches Katheterisieren). Beispielsweise werden bei einer häufigen Anwendung dieser Methode die Karotis- und Jugulariskatheter eine Woche vor dem eigentlichen Experiment unter Kurz-Narkose gesetzt und die Katheteranschlüsse im Nackenbereich herausgeführt und dort für die Ratte unzugänglich fixiert. Am Tag des Experimentes wird die Ratte in einen Käfig gegeben und an die Katheteranschlüsse flexible Schläuche für die Blutprobennahme und das Infundieren von Glucose und Insulin angesteckt. Unter diesen Umständen kann dann der Glucose-Clamp im wachen Zustand der Ratte durchgeführt und der Metabolismus ohne Einflussnahme der Anästhesiemethode untersucht werden. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass bei der Anwendung der Isofluran-Anästhesie die Blutglucosekonzentration im gefütterten Zustand der Ratte signifikant höher ist als bei gefütterten Ratten ohne Isofluran-Anästhesie [31]. Bei gefasteten Ratten war jedoch kein Einfluss der Isofluran-Anästhesie auf die Blutglucosekonzentration bemerkbar [31].

Eine Durchführung der hier beschriebenen Experimente im Wachzustand der Ratte ist bis jetzt nicht möglich, da ein chronisches Katheterisieren der Ratte mit OFM-Kathetern noch nicht etabliert wurde. Eine Anästhesie-freie Durchführung der Experimente wäre aber denkbar, wenn eine Woche vor den Experimenten die OFM-Katheter gemeinsam mit den Karotis- und Jugulariskathetern gesetzt und danach über den OFM-Katheter-Setzort eine spezielle Ratten-Jacke [32] gestreift werden würde. Dadurch könnten die OFM-Katheter bis zum Zeitpunkt der Glucose-Clamps für die Ratte unzugänglich gemacht werden. Etablierung einer solchen chronischen Katheterisierung für OFM-Katheter ist in Planung.

4.4 Zeitverläufe der Glucoseinfusionsrate, Glucosekonzentration und Insulinkonzentrationen während der Glucose-Clamps

Ungefähr 45 min nach dem Beginn der intravenösen Insulininfusion war die Plasmaglukosekonzentration auf den Klemmwert von 8 mmol/l gesunken, und mithilfe der variablen intravenösen Glucoseinfusion konnte die Plasmaglukose bis zum Ende des Clamps auf diesem Wert gehalten werden (Abb. 13 und 14). Steady-State Insulin-Konzentrationswerte im Plasma wurden bei beiden Insulininfusionsgruppen ungefähr 60 min nach Beginn der Insulininfusion erreicht. In der ISF des Fettgewebes hingegen wurden die Steady-State Insulinwerte bei beiden Gruppen erst 210 min nach Infusionsbeginn eingenommen (Abb. 15 und 16). Ähnliche zeitliche Differenzen zwischen den Insulinkonzentrationsverläufen im Plasma und ISF wurden auch in Studien bei Hunden und Menschen beobachtet [33-43]. Als Grund für das langsamere Erreichen des Steady-State-Niveaus im ISF im Vergleich zum dem im Plasma wurde der relativ langsame Transport der Insulinmoleküle vom Plasma über die Kapillarwände in die interstitielle Flüssigkeit angeführt [33-43]. Für wasserlösliche Moleküle stellen die Interzellularspalten der Kapillarwände den Hauptpassageweg zwischen Plasma und ISF dar [44]. Bei Kapillaren des Fett- und Muskelgewebes weisen diese Interzellularspalten einen durchschnittlichen Porenradius von 5 nm auf. Bei kleinen Molekülen wie Glucose (Molekülradius: 0,36 nm) ist die Diffusion durch diese Poren nicht eingeschränkt. Bei größeren Molekülen wie Insulin oder Inulin (Molekülradius: 1,5 nm) kommt es jedoch zu einer deutlichen Reduktion des effektiven Diffusionskoeffizienten im Vergleich zu dem Koeffizienten für freie Diffusion in Wasser [44]. Die hier beobachteten zeitlichen Differenzen zwischen den Insulinkonzentrationsverläufen im Plasma und ISF des Fettgewebes könnten deshalb mit einem eingeschränkten Transport der Insulinmoleküle vom Plasma über die Kapillarwände in die interstitielle Flüssigkeit erklärt werden.

Die Steady-State Niveaus der GIR wurden bei beiden Insulininfusionsgruppen zu ähnlichen Zeiten erreicht wie das Steady-State Niveau bei der interstitiellen Insulinkonzentration (nach ~210 min; Abb. 17-20). Eine Regressionsanalyse der zeitlichen Verläufe der GIR und Insulinkonzentrationen ergab auch, dass bei beiden Insulininfusionsgruppen die zeitliche Übereinstimmung zwischen den Verläufen der GIR und der ISF-Insulinkonzentration höher ist als zwischen den Verläufen der GIR und Plasmainsulinkonzentration (Abb. 21-24). Frühere Studien bei Hunden und

Menschen zeigten ebenfalls, dass Insulinverläufe im ISF besser mit den GIR-Verläufen (bzw. Glucoseaufnahme-Verläufen) korrelieren als die Insulinverläufe im Plasma [33, 34, 37]. Diese Beobachtungen können damit erklärt werden, dass das Andocken der interstitiellen Insulinmoleküle an die Insulinrezeptoren der Fett- und Muskelzellen, das Einbauen der Glucosetransporter in die Zellmembrane als auch die darauffolgende verstärkte Glucoseaufnahme der Zellen (Abb. 4) sehr viel schneller ablaufen als der Transport der Insulinmoleküle vom Plasma in die interstitielle Flüssigkeit [33-37].

Bei der Gruppe mit hoher Insulininfusionsrate wurden trotz Verdoppelung der Plasma- und ISF-Insulinkonzentrationen gleich hohe Steady-State GIR-Werte beobachtet wie bei der Gruppe mit niedriger Insulininfusionsrate (Abb. 13 und 14). Da bei beiden Insulininfusionsgruppen die Blutglucose auf vergleichbare Niveaus geklemmt wurde, kann daraus geschlossen werden, dass beide Insulininfusionsraten die Glucoseaufnahme der Zellen in eine Sättigung getrieben haben. Frühere Studien haben gezeigt, dass die Glucoseaufnahme der Fett- und Muskelzellen durch Steigerung der Insulinkonzentration stetig erhöht werden kann. Wird aber eine bestimmte Insulinkonzentration erreicht, kann trotz weiterer Insulinkonzentrationserhöhung die Glucoseaufnahme der Zellen nicht mehr weiter gesteigert werden. Das bei den Insulin-empfindlichen Zellen beobachtete Sättigungsverhalten der Glucoseaufnahme kann auf der molekularen Ebene damit erklärt werden, dass ab einer bestimmten Insulinkonzentration alle Insulinrezeptoren der Zellen mit Insulinmolekülen belegt und alle Glucosetransporter an die Zelloberflächen gebracht worden sind. Dadurch kann die Glucoseaufnahme der Zellen nicht mehr weiter gesteigert werden (Abb. 4). Generell können die experimentell festgestellten Zusammenhänge zwischen Insulinkonzentration und Glucoseaufnahme (Dose-Response Curves) mit einer Michaelis-Menten Kinetik beschrieben werden [45]. Da mit den Ergebnissen der jetzigen Clamps nur abgeleitet werden kann, dass die maximal wirksame Insulininfusionsrate gleich oder kleiner ist als die verwendete niedrige Insulininfusionsrate, sind weitere Glucose-Clamps in Planung, bei denen mehrere Insulininfusionsraten angewandt werden sollen, die kleiner sind als die bei den jetzigen Glucose-Clamps verwendeten. Von diesen Ergebnissen soll dann eine vollständige Dose-Response-Kurve abgeleitet werden.

4.5 Schätzung absoluter interstitieller Insulinkonzentrationen

Der Einsatz der internen Referenz-Technik mit Inulin als Referenz-Substanz erlaubte während der Glucose-Clamps die Austauscheffizienz (Recovery) für Insulin zu bestimmen (Abb. 25). Ausgehend von den Recovery-Werten und den in den ISF-Proben beobachteten Insulinkonzentrationen, konnten dann die absoluten Insulinkonzentrationen in der interstitiellen Flüssigkeit des Fettgewebes berechnet werden (Abb. 26 und 27). Die berechneten Steady-State ISF-Insulinkonzentrationen waren bei den Gruppen mit niedriger und hoher Insulininfusion um durchschnittlich 44% bzw. 21% niedriger als die beobachteten Steady-State Plasmainsulinkonzentrationen. Frühere Studien beim Menschen und Hunden haben ebenfalls gezeigt, dass die interstitielle Insulinkonzentration im Fett- und Muskelgewebe signifikant niedriger ist, als die Insulinkonzentration im Plasma [33-43]. Das Auftreten eines Konzentrationsgradienten zwischen Plasma und ISF wurde hauptsächlich mit dem Vorhandensein eines eingeschränkten Insulin-Transportes vom Plasma über die Kapillarwände ins ISF und mit der Degradation des Insulins in den Zellen begründet. Die Degradation des Insulins erfolgt im Zellinneren nachdem das Insulinmolekül an den Insulinrezeptor angedockt hat und der gesamte Insulin-Rezeptor-Komplex internalisiert wurde. Nach der Degradation kehrt dann alleinig der Rezeptor an die Zelloberfläche zurück [46].

In den früheren Studien sind unterschiedliche Insulin-Konzentrationsgradienten zwischen Plasma und ISF beobachtet worden. So berichten einige Studien von einem relativ hohen (z.B.: 50-80%; [12, 35, 36, 37, 39, 40-42]) und andere wiederum von einem relativ kleinen Konzentrationsgradienten zwischen Plasma und ISF (z.B.: 20-40%; [33, 35, 36]). Ein möglicher Grund für die unterschiedlichen Konzentrationsgradienten wurde eine mögliche Abhängigkeit des Konzentrationsgradienten von der Plasma-Insulinkonzentration genannt [35, 36]. So wurde in der Anwesenheit von hohen Plasmainsulinkonzentrationen ein tendenziell kleinerer Konzentrationsgradient beobachtet als in der Anwesenheit niedriger Plasmainsulinkonzentrationen. Eine Abhängigkeit des Konzentrationsgradienten von den vorherrschenden Plasmainsulinkonzentrationen wurde damit erklärt, dass ab einer bestimmten interstitiellen Insulinkonzentration alle Insulinrezeptoren der Zellen mit Insulinmolekülen belegt sind und dadurch die Insulin-Degradation der Zellen ein Maximum erreicht. Liegt die Insulinkonzentration nun weit über derjenigen Insulinkonzentration die eine vollständige Belegung der Insulinrezeptoren bewirkt, so

kann mittels mathematischer Modelle (Kompartimentmodelle) gezeigt werden, dass der Insulin-Konzentrationsgradient zwischen Plasma und ISF prozentuell kleiner wird [35]. Eine Tendenz zu kleineren Insulin-Konzentrationsgradienten bei höheren Plasma-Insulinkonzentrationen wurde auch bei unseren Glucose-Clamps mit hoher und niedriger Insulininfusionsrate beobachtet (Abb. 26 und 27). Für eine weitere Bestätigung dieser Beobachtungen sind zusätzliche Glucose-Clamps mit mehreren Insulininfusionsraten und mit einer höheren Anzahl von Ratten pro Insulininfusionsrate geplant. Um bei diesen Experimenten eine präzisere Bestimmung der Insulin-Recovery zu erreichen, wird derzeit an einer Verbesserung der Insulinmessmethode gearbeitet.

4.6 Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Diplomarbeit wurde die OFM-Technik und die Glucose-Clamp-Technik zur Bestimmung der Verteilungs- und Wirkungskinetik von Insulinen miteinander vereint. Die gleichzeitige Anwendbarkeit dieser beiden Untersuchungsmethoden wurde in Form von Experimenten bei fettleibigen Ratten gezeigt. Der gleichzeitige Einsatz dieser beiden Untersuchungsmethoden könnte in Zukunft die Charakterisierung von neuen Insulinen wesentlich verbessern.

5. Referenzen

1. Daneman D: Type 1 diabetes. *Lancet* 367:847-858, 2006
2. Moller DE: New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414:821-827, 2001
3. Hirsch IB: Insulin analogues. *N Engl J Med* 352:174-183, 2005
4. Owens DR, Zinman B, Bolli GB: Insulins today and beyond. *Lancet* 358:739–46, 2001
5. Owens, DR: New horizons-alternative routes for insulin therapy. *Nat Rev Drug Discov* 1:529-540, 2002
6. Gough, DA, K Kreutz-Delgado, and TM Bremer: Frequency characterization of blood glucose dynamics. *Ann Biomed Eng* 31:91-97, 2003
7. Soedamah-Muthu, S.S. et al.: All-cause mortality rates in patients with type 1 diabetes mellitus compared with non-diabetic population from the UK general practice research database, 1992-1999. *Diabetologia* 49:660-666, 2006
8. DeFronzo RA, Tobin JD, Andres R: Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol* 237:E214-223. 1979
9. Brehm A, Roden M: Glucose Clamp Techniques. In *Clinical Diabetes Research: Methods and Techniques*. Roden M, Ed. New York, John Wiley & Sons, Ltd, 2007, p. 43-76
10. Watson RT, Kanzaki M, Pessin JE: Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. *Endocr Rev* 25:177-204, 2004
11. Shepherd PR, Kahn BB: Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. *N Engl J Med* 341:248-57, 1999
12. Bodenlenz M, Schaupp LA, Druml T, Sommer R, Wutte A, Schaller HC, Sinner F, Wach P, Pieber TR: Measurement of interstitial insulin in human adipose and muscle tissue under moderate hyperinsulinemia by means of direct interstitial acces. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 289:E296-300, 2005
13. Regittnig W, Ellmerer M, Fauler G, Sendlhofer G, Trajanoski Z, Leis HJ, Schaupp L, Wach P, Pieber TR: Assessment of transcapillary glucose

- exchange in human skeletal muscle and adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 285:E241-245, 2003
14. Ellmerer M, Schaupp L, Brunner GA, Sendlhofer G, Wutte A, Wach P, Pieber TR: Measurement of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-flow microperfusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E352-E356, 2000
 15. Schaupp L, Ellmerer M, Brunner GA, Wutte A, Sendlhofer G, Trajanoski Z, Skrabal F, Pieber TR, Wach P: Direct access to interstitial fluid in adipose tissue in humans by use of open-flow microperfusion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276:E401-408, 1999
 16. Kehr J: A survey on quantitative microdialysis: theoretical models and practical implications. *J Neurosc Meth* 48:251-261, 1993
 17. Lönnroth P and Strindberg L: Validation of the "internal reference technique" for calibrating microdialysis in situ. *Acta Physiol. Scand* 153: 357-380, 1995
 18. Stenken JA: Methods and issues in microdialysis calibration. *Anal. Chim Acta* 379: 337-358, 1999
 19. Norde W, Lyklema J: Why proteins prefer interfaces. *J Biomater Sci Polym Ed* 2:183-202, 1991
 20. Hlady V, Buijs J: Protein adsorption on solid surfaces. *Curr Opin Biotechnol* 7:72-77, 1996
 21. Nakanishi K, Sakiyama T, Imamura K: On the adsorption of proteins on solid surfaces, a common but very complicated phenomenon. *J Biosci Bioeng* 91:233-244, 2001
 22. Tutkur D: Bestimmung der Adsorption von Insulin in einem Mikroperfusionssystem zur interstitiellen Probennahme. *Projektarbeit am Institut für Medizintechnik, TU Graz*, 2011
 23. Hughey CC, Hittel DS, Johnsen VL, Shearer J: Hyperinsulinemic-Euglycemic Clamp in the Conscious Rat. *J. Vis. Exp.* 48, 2011
 24. Janvier Laboratories, www.janvier-europe.com
 25. Weinhandl H, Pachler C, Mader JK, Ikeoka D, Mautner A, Falk A, Suppan M, Pieber TR, Ellmerer M: Physiological hyperinsulinemia has no detectable effect on access of macromolecules to insulin-sensitive tissues in healthy

- humans. *Diabetes* 56:2213-7, 2007
26. Pachler C, Ikeoka D, Plank J, Weinhandl H, Suppan M, Mader JK, Bodenlenz M, Regittnig W, Mangge H, Pieber TR, Ellmerer M: Subcutaneous adipose tissue exerts proinflammatory cytokines after minimal trauma in humans. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 293:E690-696, 2007
 27. Petty C, Cunningham NL: Insulin adsorption by glass infusion bottles, polyvinylchloride infusion containers, and intravenous tubing. *Anesthesiology* 40:400-404, 1974
 28. Kraegen EW, Lazarus L, Meler H, Campbell L, Chia YO: Carrier solutions for low-level intravenous insulin infusion. *Br Med J* 3:464-466, 1975
 29. Hewson M, Nawadra V, Oliver J, Odgers C, Plummer J, Simmer K: Insulin infusions in the neonatal unit: delivery variation due to adsorption. *J Paediatr Child Health* 36:216-20, 2000
 30. Weber SS, Wood WA, Jackson EA: Availability of insulin from parenteral nutrient solutions. *Am J Hosp Pharm* 4:353-357, 1977
 31. Grondin JM, Engle SK, Jakubowski JA: Acute hyperglycemia induced by ketamine/xylazine anesthesia in rats: Mechanisms and implications for preclinical models. *Exp Biol Med* 230:777-784, 2005
 32. Koschwanez HE, Klitzman B, Reichert MW: Percutaneous Window Chamber Method for Chronic Intravital Microscopy of Sensor-Tissue Interactions. *J Diabetes Sci Technol* 2:977-983, 2008
 33. Yang YJ, Hope ID, Ader M, Bergman RN: Insulin transport across capillaries is rate limiting for insulin action in dogs. *J Clin Invest* 84:1620-1628, 1989
 34. Poulin RA, Steil GM, Moore DM, Ader M, Bergman RN: Dynamics of glucose production and uptake are more closely related to insulin in hindlimb lymph than in thoracic duct lymph. *Diabetes* 43:180-190, 1994
 35. Steil GM, Ader M, Moore DM, Rebrin K, Bergman RN: Transendothelial insulin transport is not saturable in vivo. No evidence for a receptor-mediated process. *J Clin Invest* 97:1497-503, 1996
 36. Jansson PA, Fowelin JP, von Schenck HP, Smith UP, Lönnroth PN: Measurement by microdialysis of the insulin concentration in subcutaneous interstitial fluid. Importance of the endothelial barrier for insulin. *Diabetes*

42:1469-73, 1993

37. Castillo C, Bogardus C, Bergman R, Thuillez P, Lillioja S: Interstitial insulin concentrations determine glucose uptake rates but not insulin resistance in lean and obese men. *J Clin Invest* 93:10–16, 1994
38. Gudbjörnsdóttir S, Sjöstrand M, Strindberg L, Wahren J, Lönnroth P: Direct measurements of the permeability surface area for insulin and glucose in human skeletal muscle. *J Clin Endocrinol Metab* 88:4559 – 4564, 2003
39. Herkner H, Klein N, Joukhadar C, Lackner E, Langenberger H, Frossard M, Bieglmayer C, Wagner O, Roden M, Muller M: Transcapillary insulin transfer in human skeletal muscle. *Eur J Clin Invest* 33:141–146, 2003
40. Sjöstrand M, Gudbjörnsdóttir S, Holmang A, Lonn L, Strindberg L, Lönnroth P: Delayed transcapillary transport of insulin to muscle interstitial fluid in obese subjects. *Diabetes* 51:2742–2748, 2002
41. Sjöstrand M, Holmang A, Lönnroth P: Measurement of interstitial insulin in human muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 276:E151–E154, 1999
42. Sjöstrand M, Holmang A, Strindberg L, Lönnroth P: Estimations of muscle interstitial insulin, glucose, and lactate in type 2 diabetic subjects. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 279:E1097–E1103, 2000
43. Rasio EA, Hampers CL, Soeldner JS, Cahill GF Jr: Diffusion of glucose, insulin, inulin, and Evans blue protein into thoracic duct lymph of man. *J Clin Invest* 46:903–910, 1967
44. Schmidt RF, Thevs G, Lang F: *Physiologie des Menschen*. Springer-Verlag Berlin und Heidelberg GmbH & Co. K; 28. Auflage, 2000
45. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: *Biochemistry, 5th edition*. New York, WH Freeman, 2002
46. Duckworth WC, Bennett RG, Hamel FG: Insulin degradation: progress and potential. *Endocr Rev* 19:608-624, 1998