

**Mathias Tschaikner**

**In vitro und in vivo Untersuchungen zur  
Realisierung der Zusammenlegung von  
subkutaner Insulingabe und Glukosemessung  
für eine Verbesserung der Therapie von  
Typ 1 Diabetes**

Diplomarbeit



Institut für Medizintechnik

Technische Universität Graz

Kronesgasse 5, A - 8010 Graz

Vorstand: Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Rudolf Stollberger

Betreuer:

Dipl.-Ing. Dr. techn. Werner Regittnig

Begutachter:

Ao.Univ.-Prof. Dipl.-Ing. Dr. techn. Hermann Scharfetter

Graz, Dezember 2012

## 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

In vitro und in vivo Untersuchungen zur Realisierung der Zusammenlegung von subkutaner Insulingabe und Glukosemessung für eine Verbesserung der Therapie von Typ 1 Diabetes

Um die Diabetestherapie mit kontinuierlicher Glukosemessung und automatisierter Insulinabgabe (künstliche Bauchspeicheldrüse) zu vereinfachen und zu verbessern, ist es wünschenswert, die Glukosemessung und die Insulingabe zusammenzulegen und an der selben Gewebestelle durchzuführen (Single-Port-Form der künstlichen Bauchspeicheldrüse). Das Ziel dieser Diplomarbeit war es daher, Glukosesensor und Insulininfusionskanüle so zu kombinieren, dass sie gemeinsam durch eine einzelne Einstichstelle in das Fettgewebe eingebracht und dort parallel betrieben werden können. Dazu wurden mehrere Prototypen gebaut, die sich in der Kombinationsart von Kanüle und Sensor unterschieden. Unter Anwendung mehrerer Beurteilungskriterien wurde dann der geeignetste Prototyp ausgewählt und in einer in vivo Studie an Ratten, sowie bei Studien an gesunden Probanden und Typ 1 Diabetikern getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Insulinabgabe über den Prototyp gleich gut bewerkstelligt werden kann wie über eine herkömmliche Infusionskanüle. Weiters hat sich gezeigt, dass nach Einführung gewisser Maßnahmen beim Betreiben des Prototyps, die Genauigkeit der Glukosemessung mit dem Prototyp vergleichbar mit der Messgenauigkeit parallel eingesetzter Kontroll-Sensoren ist. Aus dieser Diplomarbeit kann daher geschlossen werden, dass herkömmliche Glukosesensoren und Insulinabgabegeräte in einer Single-Port-Form kombiniert und zur Realisierung einer künstlichen Bauchspeicheldrüse für eine Vereinfachung und Verbesserung der Therapie von Typ 1 Diabetes verwendet werden können.

**Schlüsselwörter:** Typ 1 Diabetes, Single-Port Artificial Pancreas, Kontinuierlicher Glukosesensor, Insulininfusionskanüle, Insulinpumpentherapie

Gefördert durch das EU-Projekt “Artificial Pancreas at Home (AP@home)”, Projektnummer 247138, [www.apathome.eu](http://www.apathome.eu).

## ABSTRACT

In vitro and in vivo trials on the realisation of the combination of subcutaneous insulin administration and glucose sensing to improve the treatment of type 1 diabetes

To simplify and improve the treatment of type 1 diabetes with continuous glucose sensing and automated insulin delivery (artificial pancreas) it would be desirable to perform glucose sensing and insulin delivery at the same adipose tissue site. Therefore, the aim of this diploma thesis was to combine a conventional glucose sensor and insulin infusion cannula in a way that the two can be simultaneously placed into the subcutaneous tissue through a single insertion and operated there in parallel (single-port concept). To achieve this, several single-port prototypes with different sensor/cannula configurations were assembled and evaluated with respect to several criteria. The most appropriate prototype was then tested in vivo on rats as well as on healthy volunteers and type 1 diabetic patients. The results of this studies show that the insulin administration via the prototype works the same as the insulin administration via a conventional cannula. Furthermore, the studies demonstrate that, following modifications in the operation of the prototype, the quality of glucose sensing with the prototype is comparable to that of simultaneously applied control sensors. Therefore, results of this diploma thesis suggest that conventional glucose sensing and insulin infusion devices can be combined into a single-port arrangement and used for continuous glucose sensing and simultaneous insulin delivery at a single tissue site. Such a single-port arrangement may provide the basis for the development of an artificial pancreas.

**Key Words:** Type 1 Diabetes, Single-Port Artificial Pancreas, Continuous Glucose Sensor, Insulin Infusion Cannula, Insulin Pump Therapy

Supported by the EU-Project “Artificial Pancreas at Home (AP@home)”, Project number 247138, [www.apathome.eu](http://www.apathome.eu).



## DANKSAGUNG

*Ein großes Dankeschön geht an: Werner, Herbert, Maria, Kate, Phillip, Stefan, Hermann, Paul, Daniel, Ruth, Gerhard, Diana, Julia, Peter, Dina, Werner, Seli, Vallerie, Lukas, Martina, Sabine, Miro, Michael, Jamala, Martina, Harald, Janka, Ludwig, Amra, Lotti, Clemens, Thomas, Waltraud, Alex, Felix, Simon, Kathi, Steffan, Steffan, Bernhard, Simon, David, Mich, Flo, Benne, Ulla, Martin, Herbert, Rene, Nik, Mario, Simon, Angi, Dita, Hanna, Diva, Lisa, Jens, Maria, Aurelia, Ilve, Thesy, Joe, Eva, Adam, Pumuckl, Dominik, Tom, Mimmi, Franz, Irmgard, Julia, Ilze, Oldis, Alie, Ingo, Katarina, Andi, Hermann, Andrea, Antares, Barbara, Carly, Christian, Christoph, Laura, Elke, Flo, Christian, Georg, Jiro, Lisa, Karin, Manuel, Marina, Martin, Micha, Najra, Halli, Andreas, Nico, Simon Nienna, Olivia, Patrik, Schlifka, Sevi, Sigi, Sigrid, Tobi, Paul, Roland, James, Veronika, Viktoria, Cristina, Daniela, Matthias, Martina, Günter, Elisabeth, Jürgen, Siegfried, Peter, Anni, Uwe, Karin, Felix, Tobias, Christian, Robert, Barbara, Julian, Georg, Anna, Andreas, Michael, Astrid, Josef und Norbert für Unterstützung, Unterhaltung, und Verpflegung.*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung und Aufgabenstellung</b> .....	<b>10</b>
1.1. Derzeitige Therapieformen bei der Diabetesbehandlung.....	10
1.1.1. Subkutane Insulininjektion.....	12
1.1.2. Insulinpumpentherapie .....	13
1.1.3. Unzulänglichkeiten der heutigen Therapieformen für Typ 1 Diabetes.....	15
1.2. Neue Methoden zur Therapie von Typ 1 Diabetes .....	16
1.2.1. Kontinuierlich messende Glukosesensoren.....	16
1.2.1.1. Am Markt erhältliche kontinuierlich messende Glukosesensoren.....	16
1.2.1.2. Der kontinuierlich messende Glukosesensor der Firma Dexcom.....	17
1.2.1.3. Setzen von kontinuierlich messenden Glukosesensoren und Insulininfusionskanülen .....	19
1.2.3. Künstliche Bauchspeicheldrüse.....	20
1.2.3.1. Prinzipieller Aufbau einer künstlichen Bauchspeicheldrüse.....	20
1.2.3.2. Verbesserung der künstlichen Bauchspeicheldrüse: Zusammenlegung der Glukosemessung mit der Insulingabe .....	21
1.3. Ziel der Diplomarbeit: Entwickeln und Testen von Prototypen für die zusammengelegte Glukosebestimmung und Insulingabe .....	23
<b>2. Methoden</b> .....	<b>24</b>
2.1. Realisierungskonzepte für das Verbinden von Infusionskanüle und KmG .....	24
2.2. Entwicklung der Prototypen erster Generation .....	25
2.2.1. Prototypen nach dem Singleport Konzept A (Sensor an Kanülenwand) .....	25
2.2.1.1. Realisierung des Konzeptes A mit einem Dexcom Sensor.....	26
2.2.1.2. Realisierung des Konzeptes A mit einem Medtronic Sensor.....	27
2.2.2. Prototypen nach dem Singleport Konzept B (Sensor ragt über das Kanülenende hinaus).....	27
2.2.2.1. Realisierung des Konzeptes B mit einem Dexcom Sensor .....	28
2.2.3. Prototypen nach dem Singleport Konzept C (Sensor im Inneren der Kanüle) .....	29
2.2.3.1. Realisierung des Konzeptes C mit einem Abbott Sensor in der Kanülerspitze .....	29
2.2.3.2. Realisierung des Konzeptes C mit einem Abbott Sensor und einer gelochten Kanüle .....	30
2.2.3.3. Prototyp mit einem Dexcom Sensor in einer gelochten Kanüle nach Konzept C .....	31
2.3. Wahl des am besten geeigneten Sensors und des am besten zu realisierenden Single- Port-Konzeptes .....	32
2.3.1. Sensor Genauigkeit .....	33
2.3.2. Langzeitstabilität und Linearität bei Kontakt von Glukosesensoren mit Insulinflüssigkeiten .....	33
2.3.3. Sensor Verfügbarkeit.....	35
2.3.4. Bereitschaft des Sensorherstellers zu einer Kooperation .....	35
2.3.5. Kompatibilität von Sensorsetzmethod und Kanülensetzmethod .....	35
2.3.6. Kompatibilität von Sensorbetrieb und Insulinpumpenbetrieb .....	36
2.3.7. Möglichkeit zur Kalibrierung der Sensoren mithilfe der Insulinflüssigkeit .....	36
2.4. Betreiben eines KmG's mit Potentiostat .....	36
2.5. In vitro Versuche .....	39
2.5.1. Aufbau der in vitro Versuche .....	39
2.5.2. Protokolle der in vitro Versuche .....	40
2.5.2.1. Versuch: Langzeiteinfluss der Insulinflüssigkeiten auf Sensoren.....	40

2.5.2.2. Versuch: Sensorlinearität in Insulinflüssigkeiten.....	41
2.5.2.3. Versuch: Einfluss wechselnder Konservierungsmittelkonzentrationen auf die Sensorfunktion .....	41
2.6. Versuche an Ratten.....	42
2.6.1. Protokoll der Versuche an Ratten.....	43
2.6.1.1. Art der Versuchstiere .....	43
2.6.1.2. Narkose der Versuchstiere .....	44
2.6.1.3. Zugänge zum Blutkreislauf der Versuchstiere .....	44
2.6.1.4. Setzen der Prototypen und des Kontroll-Sensors bei Ratten.....	45
2.6.1.5. Insulin Infusion, Blutglukosebestimmung und Sensorbetrieb bei Ratten .....	47
2.7. Studie an gesunden Probanden.....	48
2.7.1. Protokoll zur Studie an gesunden Probanden.....	49
2.7.1.1. Voruntersuchung und Aufklärung der gesunden Probanden .....	49
2.7.1.2. Zugänge zum Blutkreislauf der gesunden Probanden (Glucose-Clamp).....	50
2.7.1.3. Setzen der Prototypen und des Kontroll-Sensors bei gesunden Probanden....	51
2.7.1.4. Insulin Infusion und Sensorbetrieb bei gesunden Probanden .....	52
2.8. Studie bei Probanden mit Typ 1 Diabetes .....	53
2.8.1. Protokoll zur Studie an Probanden mit Typ 1 Diabetes .....	54
2.8.1.1. Voruntersuchung und Aufklärung der Probanden mit Typ 1 Diabetes.....	54
2.8.1.2. Zugänge zum Blutkreislauf der Probanden mit Diabetes Typ 1 .....	55
2.8.1.3. Setzen der Prototypen und der Kontroll-Sensoren bei Probanden mit Typ 1 Diabetes .....	55
2.8.1.4. Insulininfusion und Sensorbetrieb bei Probanden mit Typ 1 Diabetes.....	56
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>58</b>
3.1. Auswahl des am besten zu realisierenden Singleport-Konzeptes .....	58
3.1.1. Genauigkeit der zur Realisierung verwendeten Sensoren.....	58
3.1.2. Stabilität und Linearität der Sensoren in Insulinflüssigkeiten .....	58
3.1.3. Verfügbarkeit der Sensoren für die Realisierung der Single-Port-Konzepte.....	61
3.1.4. Interesse des Sensorherstellers an einer Kooperation .....	61
3.1.5. Kompatibilität von Sensorsetzmethode und Kanülensetzmethode .....	62
3.1.6. Kompatibilität von Sensorbetrieb und Insulinpumpenbetrieb .....	63
3.1.7. Möglichkeit der Kalibrierung der Sensoren mithilfe der Insulinflüssigkeit .....	63
3.1.8. Entscheidungsfindung bei der Wahl des Sensorsystems und Single-Port-Konzeptes .....	64
3.2. Realisierung von Prototypen der 2. Generation .....	65
3.2.1. Der Prototyp der 2. Generation nach Singleportkonzept B.....	65
3.2.1.1. Zusammenbau des Prototyps der zweiten Generation nach Singleportkonzept B .....	66
3.2.1.2. Setzen des Prototyps der zweiten Generation nach Singleportkonzept B.....	67
3.2.2. Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept C: .....	69
3.2.2.1. Zusammenbau des Prototyps der zweiten Generation nach Singleportkonzept C:.....	69
3.2.2.2. Setzen des Prototyps nach Singleportkonzept C:.....	70
3.3. Ergebnisse der Versuche an Ratten .....	71
3.3.1. Ergebnisse der Versuche an Ratten mit dem Prototyp nach Singleportkonzept C	72
3.3.1.1. Versuch an Ratte #6: laufendes Infundieren von Insulin .....	72
3.3.1.2. Versuch an Ratte #7: laufendes Ansaugen von ISF .....	72
3.3.2. Ergebnisse der Versuche an Ratten mit dem Prototyp nach Singleportkonzept B	73
3.3.2.1. Versuch an Ratte #9: Feststellung der Funktionstauglichkeit des Prototyp nach Singleportkonzept B .....	73

3.3.2.2. Versuch an Ratte #5: Störung im Sensorsignal hervorgerufen durch einen Insulinbolus .....	74
3.4. Ergebnisse der In Vivo Versuche an gesunden Probanden.....	75
3.4.1. Funktion des Prototyps bei basalen Insulininfusionsraten .....	75
3.4.1.1. Basale Insulininfusion und Glukosemessung mit dem Prototypen bei Proband #3.....	76
3.4.1.2. Basale Insulininfusion und Glukosemessung mit dem Prototypen bei Proband #7: Vergleich des Prototyps mit einem Kontroll-Sensor .....	76
3.4.2. Funktion des Prototyps bei Abgabe eines Insulinbolus .....	77
3.4.2.1. Proband #4, #5: Auswirkung von Insulinboli auf das Sensorsignal eines mit Transmitter betriebenen Prototyps .....	78
3.4.2.2. Proband #9, #10: Auswirkung eines über einen längeren Zeitraum abgegebenen Insulinbolus (extended Bolus) auf das Sensorsignal eines Prototyps ....	78
3.4.2.3. Proband #14: Wirkung von sequentiell abgegebener Boli auf das Sensorsignal eines Prototyps .....	80
3.5. Ergebnisse der In Vivo Versuche an Probanden mit Type 1 Diabetes .....	80
3.5.1. Konditionierung des Sensors des Prototyps am Versuchsanfang mit Insulin.....	81
3.5.2. Optimierung der Position des Prototyp-Sensors in der Infusionskanüle.....	82
3.5.3. Versuche mit Prototyp-Konditionierung und optimierter Prototyp-Sensor-Positionierung (Probanden #19, #21, #24, #25, #26, #27, #29 und #30).....	83
3.5.4. Mittelung der Messergebnisse der Versuche bei Probanden mit Typ1 Diabetes...	85
3.5.5. Absolute Relative Differenz.....	86
3.5.6. Bland & Altman Analyse .....	87
3.5.7. Clark Error Grid Analyse .....	88
<b>4. Diskussion .....</b>	<b>90</b>
4.1. Wahl des Single-Port-Konzepts und des KMG´s.....	90
4.2. Der Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept B .....	91
4.2.1 Problemlose Insulininfusion mit dem Prototyp.....	91
4.2.2. Keine Auswirkungen der basalen Insulininfusion auf die Glukosemessung .....	92
4.2.3. Wirkung von Insulinboli auf die Glukosemessung des Prototyps .....	92
4.3. Mögliche Ursachen für die Wirkung von Insulinboli auf die Glukosemessung der Prototypen .....	93
4.3.1. Mögliche Einflüsse von infundierter Insulinflüssigkeit auf die Gewebsumgebung des Glukosesensors .....	93
4.3.1.1. Mögliche Verdünnung der interstitiellen Flüssigkeit durch die Insulinflüssigkeit .....	93
4.3.1.2. Mögliche Wirkung des Insulins auf die Glukoseaufnahme der Zellen am Ort der Insulininfusion.....	94
4.3.2. Mögliche Wirkung der Insulinflüssigkeit auf den Sensor selbst.....	95
4.3.2.1. Möglicher Einfluss der Flüssigkeitsleitfähigkeit auf den Messstrom eines KMG´s.....	96
4.3.2.2. Möglicher Einfluss der Adsorption von Proteinen an der Membran eines KMG´s.....	96
4.3.2.3. Möglicher Einfluss osmotischer Kräfte an der Membran eines KMG´s.....	97
4.4. Getroffene Maßnahmen zur Verbesserung der Sensorperformance des Prototyps.....	98
4.4.1. Konditionieren der Glukosesensoren mit Insulinflüssigkeit vor den Kalibrierungen .....	98
4.4.2. Schonendere Abgabe der Insulinflüssigkeit im „extended Bolus“-Modus.....	99
4.4.3. Optimierte Positionierung des Sensors in der Kanüle des Prototyps .....	99
4.5. Vergleich der Genauigkeit der Prototypen mit den Kontroll-Sensoren. ....	100

4.5.1. Vergleich anhand der berechneten ARD Werte .....	100
4.5.2. Vergleich anhand der Bland & Altman Analyseergebnisse.....	101
4.5.3. Vergleich anhand der Error Grid Analyseergebnisse.....	101
4.6. Schlussfolgerungen .....	102
4.6.1. Erreichen der Ziele der Diplomarbeit.....	102
4.6.2. Weitere geplante Versuche.....	102
4.6.3. Kooperation mit der Firma Dexcom .....	103
<b>5. Referenzen.....</b>	<b>104</b>

## Abkürzungen

Abb.....	Abbildung
ARD.....	Absolute Relative Differenz
ATP.....	Adenosintriphosphat
B.....	Bolus
B&A.....	Bland and Altman
CSII.....	Continuous Subcutaneous Insulin Infusion
EB.....	Extended Bolus
G3.....	Generation 3
G4.....	Generation 4
GLUT.....	Glukosetransporter
ISF.....	Interstitielle Flüssigkeit
IU.....	Insulin Units
KmG.....	Kontinuierlich messender Glukosesensor
OGTT.....	Oraler-Glukose-Toleranz-Test
SEM.....	Standard Error of the Mean
Tab.....	Tabelle
U.....	Unit

# 1. Einleitung und Aufgabenstellung

## 1.1. Derzeitige Therapieformen bei der Diabetesbehandlung

Diabetes zeichnet sich durch den Verlust der körpereigenen Insulinproduktion (Diabetes Typ 1) oder durch eine gestörte Insulinsekretion und Insulinwirkung (Diabetes Typ 2) aus [1, 2]. Im Körper eines gesunden Menschen wird Insulin in den  $\beta$ -Zellen (Abb. 1A) der Bauchspeicheldrüse (Pankreas) gebildet. Die Menge an freigesetztem Insulin wird dabei hauptsächlich durch die Glukosekonzentration der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) der Bauchspeicheldrüse geregelt.

Über den GLUT2-Glukosetransporter, in der Zellwand der  $\beta$ -Zelle, gelangt Glukose in das Zellinnere. Anschließend läuft in der Zelle ein Glukosestoffwechsel ab, der die Ionenkanalaktivität der Zelle so verändert, dass Insulin freigesetzt wird. Die Glukose wird durch Glykolyse verstoffwechselt, dadurch entsteht Adenosintriphosphat (ATP), welches die ATP-sensitiven Kaliumkanäle der Zelle hemmt. Durch den verminderten Kaliumausstrom kommt es zu einer Depolarisation der Zelle und die spannungsabhängigen Kalziumkanäle der Zellwand öffnen sich, sodass  $Ca^{2+}$  einströmen kann. Dieses  $Ca^{2+}$  ist der entscheidende Reiz für die Verschmelzung von im Zytoplasma der  $\beta$ -Zelle vorkommenden insulinhaltigen Vesikeln, mit der Zellmembran. Eine  $\beta$ -Zelle schüttet daher abhängig von der Glukosekonzentration mehr oder weniger Insulin aus [3, 4].

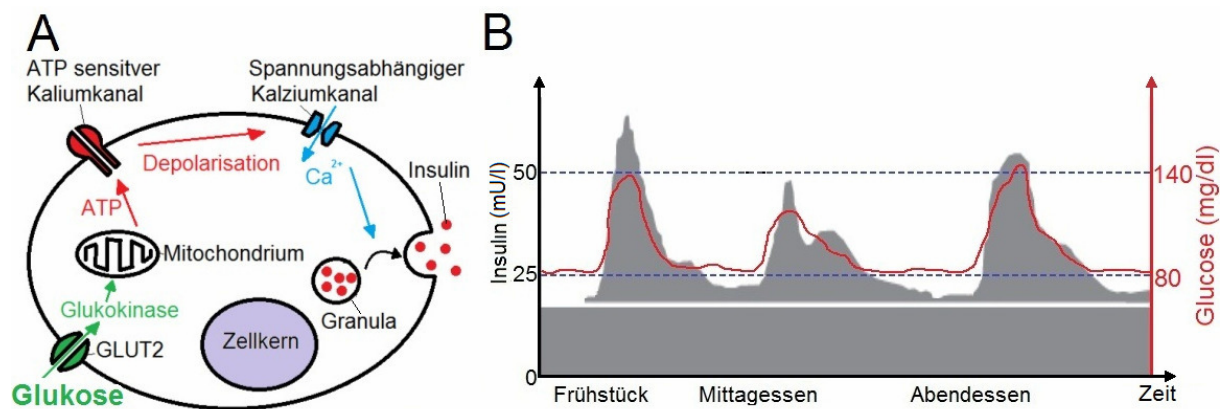
Wird Nahrung aufgenommen, steigt der Blutzucker. Bei gesunden Menschen führt dies zu einer erhöhten Ausschüttung von Insulin. Insulin wirkt auf mehrere Arten auf den Blutzuckerspiegel. Zum einen wird in Fett- und Muskelzellen durch das Einbauen des GLUT4 Carrier-Proteins in die Zellmembran die Permeabilität für Glukose gesteigert, was zu einer erhöhten Aufnahme und Verarbeitung von Glukose führt. Zum anderen hemmt Insulin den Glykogenabbau und die Glukoneogenese (Bildung von Glukose aus Lactat) in der Leber. Diese beiden Mechanismen bewirken ein Sinken des Blutzuckerspiegels. Im gleichen Maß wie der Blutzuckerspiegel wieder auf seinen normalen Wert zurückgeht, sinkt auch die Insulinsekretion in der Bauchspeicheldrüse auf ein normales basales Niveau ab (Abb. 1B).

Typ 1 Diabetiker haben nur eingeschränkte oder keine Insulinproduktion. Bei Nahrungsaufnahme wird der Blutzuckerspiegel daher nicht mehr oder nur ungenügend durch eine erhöhte Insulinausschüttung zurückgeregelt. Die Zellen können aufgrund der durch den Insulinmangel hervorgerufenen fehlenden GLUT4 Carrier-Proteinen keine Glukose mehr aufnehmen. Dadurch steigt die Blutzuckerkonzentration, was auch mit einem erhöhten

Harndrang einhergeht, da der Körper nicht mehr die gesamte Glukose über die Nieren resorbieren kann. Im Weiteren versucht der Körper den Energiemangel, der in den Zellen durch die fehlende Glukoseaufnahme entsteht, durch Abbau von Eiweißen und Fett auszugleichen. Bei diesem Abbau entstehen vermehrt Ketonkörper die den pH-Wert des Blutes senken und zu einer Übersäuerung führen. Eine Zeit lang kann der Körper dieser Übersäuerung noch mit vermehrter Harnausscheidung und Ausatmen von  $CO_2$  (Kußmaul-Atmung) entgegenwirken.

Gelingt dies nicht mehr ausreichend, kommt es zu einer schweren Ketoazidose, die mit Müdigkeit, Durstgefühl, Erbrechen und Ohnmacht einhergeht. Unbehandelt führt diese Ketoazidose zum Tod des Diabetikers.

Aus diesem Grund müssen Typ 1 Diabetiker von außen Insulin zuführen. Auch Typ2 Diabetiker müssen sich mehrmals am Tag Insulin zuführen, wenn sie, trotz einer entsprechenden Diät und Einnahme von oralen Antidiabetika eine Senkung des Blutzuckerspiegels nicht mehr erreichen können [5].



**Abb. 1:  $\beta$ -Zelle und Insulinsekretion eines gesunden Menschen:** A) Die  $\beta$ -Zellen befinden sich in den Langerhansschen Inseln der Bauchspeicheldrüse und sind dort von gut durchblutetem Gewebe umgeben. Über den GLUT2-Glukosetransporter wird Glukose ins Zellinnere aufgenommen. Dort wird sie mithilfe von Glukokinase und Mitochondrien zu ATP umgewandelt. Dieses ATP hemmt die ATP sensitiven Kaliumkanäle. Aufgrund des verminderten Kaliumausstromes depolarisiert die Zelle, was zum Öffnen der spannungsabhängigen Kalziumkanäle führt. Das einströmende Kalzium bringt insulinhaltige Vesikel dazu mit der Zellmembran zu verschmelzen und ihr Insulin in das umliegende Gewebe auszuschütten [nach 4]. B) Bei einem gesunden Menschen steigt die Insulinsekretion mit der Glukosekonzentration der ISF. Zusätzlich zum basalen Insulinbedarf von ca. 1 U/h kommt es nach Mahlzeiten zu einem erhöhten Insulinbedarf der durch eine erhöhte Insulinausschüttung der  $\beta$ -Zellen kompensiert wird. So wird der Blutzuckerspiegel, wieder auf ein normales Niveau um 80mg/dl zurückgeregelt.

### 1.1.1. Subkutane Insulininjektion

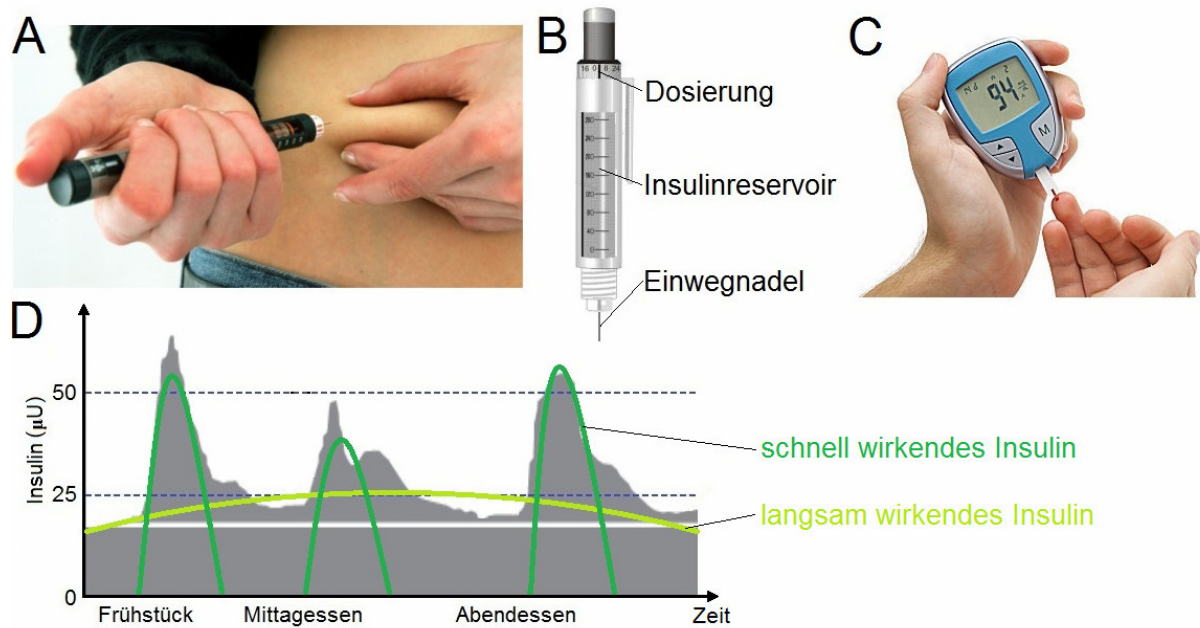
Die gängigste Therapie bei Typ1 Diabetes ist derzeit das Zuführen von Insulin durch eine subkutane Insulininjektion. Um die Insulinsekretion eines gesunden Menschen (Abb. 1B) nachzuahmen wird dabei Insulin mehrmals am Tag mittels einer Injektionsnadel in das unter der Haut liegende Fettgewebe gespritzt [1, 6] (Abb. 2A).

Dabei kommen zwei unterschiedlich wirkende Insuline zum Einsatz. Der basale Insulinbedarf wird mit langsam wirkendem Insulin abgedeckt. Dieses Insulin wird ein bis zweimal am Tag gespritzt. Es wird so langsam vom Körper aufgenommen, dass seine Wirkung je nach Diabetiker 12 bis 24 Stunden lang anhält. Um den schnellen Blutzuckerspiegelanstieg nach Mahlzeiten auszugleichen, wird zusätzlich vor den Mahlzeiten schnell wirkendes Insulin gespritzt, das in seiner Dosierung an den Nährwert der Mahlzeit (gemessen in Broteinheiten), an die spezifische Insulinsensitivität des Diabetikers, und an die vorherrschende Glukosekonzentration im Blut des Diabetikers angepasst wird (Abb. 2D).

Als Injektionsnadel werden häufig so genannte Insulin-Pens (Abb. 2B) eingesetzt, bei denen die gewünschte Insulinmenge vor der Injektion eingestellt werden kann.

Um den Blutzucker im normalglykämischen Bereich (70-120 mg/dl) zu halten und Abweichungen entweder mit Insulingabe oder Nahrungsaufnahme zu korrigieren, führen Diabetiker regelmäßig Blutzuckermessungen durch (in der Regel vier- bis fünfmal täglich). Bei diesen Messungen wird durch einen Stich in die Fingerkuppe ein Tropfen Blut entnommen und auf einen Messstreifen gegeben, welcher vor der Blutentnahme in ein handliches Glukosemessgerät gesteckt wurde. Das Glukosemessgerät ermittelt die Glukosekonzentration des Bluttröpfens und zeigt den Wert auf einem Display an (Abb. 2C).





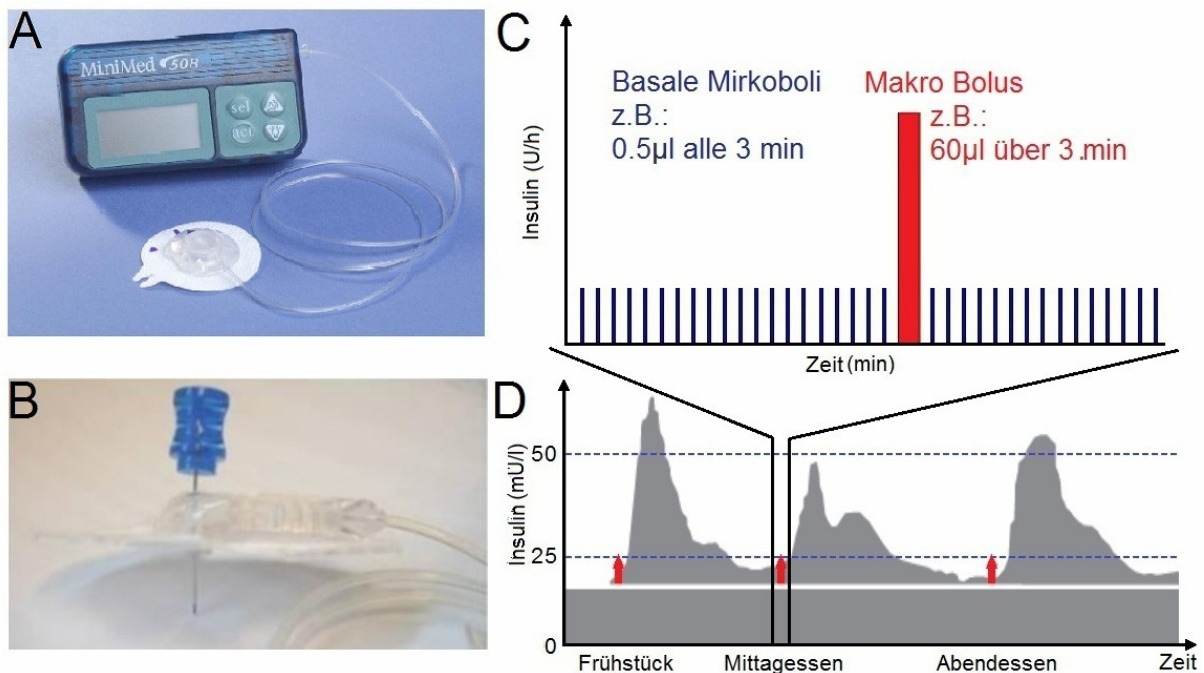
**Abb. 2: Subkutane Insulininjektion und Bestimmung des Blutzuckerwertes in einem Blutropfen:** **A)** Um dem Körper das fehlende Insulin zuzuführen, müssen sich Typ1 Diabetiker mehrmals am Tag Insulin durch eine subkutane Injektion verabreichen. **B)** Die dafür vorgesehenen Insulin-Pens verfügen über eine Dosiervorrichtung, mit der die jeweils gewünschte Insulinmenge eingestellt werden kann. **C)** Um die nötige Insulinmenge zu bestimmen, wird in der Regel vier- bis fünfmal täglich durch einen Stich in die Fingerkuppe ein Blutropfen entnommen. Die Glukosekonzentration in diesem Blutropfen wird dann mithilfe eines Messstreifens und eines zugehörigen Glukosemessgerätes bestimmt. **D)** Die Insulinsekretion eines gesunden Menschen (grau) wird durch zwei unterschiedlich wirkende Insuline nachgeahmt. Das langsam wirkende Insulin (hellgrün) wird dazu verwendet, um den basalen Insulinbedarf abzudecken. Es wird ein- bis zweimal am Tag gespritzt und wirkt bis zu 24 Stunden lang. Das schnell wirkende Insulin (dunkelgrün) wird vor den Mahlzeiten injiziert und wird in seiner Dosierung an die Mahlzeit und den vorherrschenden Glukosespiegel im Blut angepasst.

### 1.1.2. Insulinpumpentherapie

Eine modernere Therapieform für Typ1 Diabetiker ist die Insulinpumpentherapie (Continuous Subcutaneous Insulin Infusion, CSII). Diese Therapie gilt zurzeit als die effektivste Behandlung von Typ1 Diabetes [7]. Dabei wird schnell wirkendes Insulin von einer Insulinpumpe (Abb. 3A) über einen Schlauch durch eine subkutan getragene Verweilkanüle (Insulininfusionskanüle) kontinuierlich in das Fettgewebe abgegeben.

Die Insulininfusionskanüle (Abb. 3B) wird mithilfe einer Nadel durch die Haut in das Fettgewebe eingestochen und kann dort dann bis zu drei Tage verwendet werden. Danach muss sie entnommen und eine neue Kanüle an einem anderen Ort in das Fettgewebe eingestochen werden. Um die natürliche Insulinsekretion (Abb. 1B) nachzubilden, verfügt die Insulinpumpe über ein Tagesprofil, das an den basalen Insulinbedarf des Diabetikers

angepasst werden kann. Zusätzlich muss der Diabetiker vor jeder Mahlzeit, über seine Insulinpumpe einen Insulinbolus abgeben, der wiederum an den Nährwert der Mahlzeit, an die Insulinsensitivität des Diabetikers und den vorherrschenden Blutglukosespiegel des Diabetikers angepasst ist (Abb. 3D). Die basale Insulininfusion wird von den meisten Insulinpumpen in Form von kleinen Mikroboli abgegeben (Abb. 3C). Diese Mikroboli liegen zeitlich so auseinander (bis zu mehrere Minuten), dass sich durch ihre Summe die eingestellte Insulininfusionsrate (in Insulineinheiten pro Stunde IU/h) ergibt. Für die Abgabe von einem Insulinbolus schaltet die Pumpe über einen gewissen Zeitraum (einige Sekunden bis zu einige Minuten) auf eine höhere Insulininfusionsrate um und gibt die gesamte Menge Insulin als einzelnen Makrobolus ab (Abb. 3C). Auch bei dieser Therapieform wird das Überprüfen des Blutzuckerspiegels durch eine Bestimmung der Glukosekonzentration in einem Blutropfen (Abb. 2C) durchgeführt.



**Abb. 3: Insulinpumpe und Insulininfusionsprofil:** **A)** Mithilfe einer Insulinpumpe wird bei der CSII Therapie schnell wirkendes Insulin von einer Insulinpumpe über einen Schlauch durch eine subkutan getragene Insulininfusionskanüle in das Fettgewebe des Diabetikers infundiert. **B)** Die Insulininfusionskanüle wird mithilfe einer Nadel gesetzt und kann bis zu 3 Tage lang getragen werden bevor sie ersetzt werden muss. **C)** Das basale Insulin wird üblicherweise in der Form von zeitlich diskreten Mikroboli abgegeben. Diese Mikroboli können einige Minuten auseinander liegen. Ihre Summe ergibt die gewünschte basale Insulininfusionsrate, die üblicherweise im Bereich von 0 bis 2 Insulineinheiten pro Stunde liegt. Wird vor einer Mahlzeit mit der Insulinpumpe ein Insulin-Bolus abgegeben, so wird in der Insulinpumpe für eine gewisse Zeit die Insulininfusionsrate erhöht und die ganze Menge Insulin wird als kontinuierlichen Makrobolus abgegeben. **D)** Insulinpumpen infundieren Insulin in geringen basalen Raten zwischen den Mahlzeiten und in der Nacht. Vor den Mahlzeiten muss sich der Diabetiker eine an die Mahlzeit angepasste, größere Menge Insulin als Bolus verabreichen.

### 1.1.3. Unzulänglichkeiten der heutigen Therapieformen für Typ 1 Diabetes

- A:** Das bei der subkutanen Insulininjektion eingesetzte langsam wirkende Insulin wird von den Diabetikern noch immer zu schnell aufgenommen (Wirkung hält maximal 24h lang an) [8]. Für eine verbesserte Blutzuckerregelung wäre es wünschenswert, Insuline zu entwickeln, deren Wirkungszeitraum sich über mehrere Tage erstreckt. Dadurch könnte dem Diabetiker das tägliche Injizieren dieser Insuline erspart werden.
- B:** Die schnell wirkenden Insuline hingegen wirken für ihren Verwendungszweck noch zu langsam (Maximalwirkung nach ca. 1-2 Stunden) [8] um dem rasant steigenden Insulinbedarf nach Einnahme einer zuckerhaltigen Mahlzeit schnell genug zu folgen. Dies liegt daran, dass die Insuline normalerweise in schlecht durchblutetes Fettgewebe injiziert werden und nicht, wie in das Pankreas, in sehr gut durchblutetem, mit fenestrierten (gefensterten) Kapillaren versehenem, Gewebe freigesetzt werden [9].
- C:** Eine weitere Unzulänglichkeit ist, dass die Überprüfung des Blutzuckerspiegels durch eine Bestimmung der Glukosekonzentration in einem Blutropfen (Abb. 2C) aus praktischen Gründen nicht oft genug durchgeführt wird, um rechtzeitig Zustände hoher bzw. niedriger Blutzuckerkonzentrationen zu erkennen und durch Insulinverabreichung bzw. Kohlehydrataufnahme zu korrigieren. Die Folge davon ist, dass relativ häufig Unterzuckerungen (Hypoglykämien) mit einhergehender lebensbedrohlicher Unterversorgung des Gehirns mit Nährstoffen auftreten können [1, 10]. Da sich die Blutzuckerwerte während einer beträchtlichen Zeit des Tages nicht im normalglykämischen Bereich von 70mg/dl bis 120mg/d befinden, können Langzeitfolgen, wie z.B. schlechte Durchblutung peripherer Gefäße, Absterben von Nervenenden, Blindheit oder Nierenversagen, von den meisten Typ1 Diabetikern langfristig nicht vermieden werden [11].

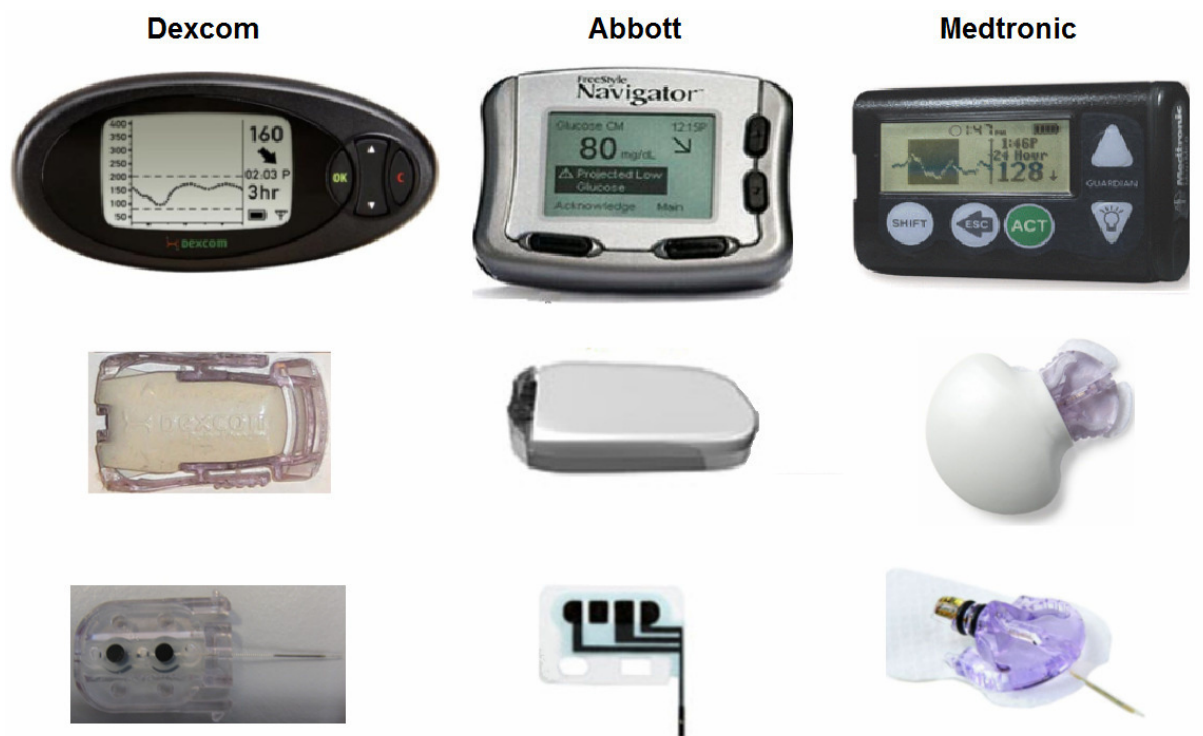
Die Nachteile die Diabetiker gegenüber gesunden Menschen haben, manifestieren sich in einer schlechteren Lebensqualität und einer um 7 Jahre verkürzten Lebenserwartung [1]. Es treten auch erhöhte Kosten für das Gesundheitswesen auf, da für die Behandlung von den kaum vermeidbaren Folgeerkrankungen oft teure langfristige Therapien notwendig sind [1].

## 1.2. Neue Methoden zur Therapie von Typ 1 Diabetes

### 1.2.1. Kontinuierlich messende Glukosesensoren

#### 1.2.1.1. Am Markt erhältliche kontinuierlich messende Glukosesensoren

Zur weiteren Verbesserung der Therapie von Diabetes, wurden in den letzten Jahren von einigen Firmen kontinuierlich messende Glukosesensoren (KmGs) auf den Markt gebracht (Abb. 4) [12]. Diese KmG-Systeme bestehen aus einem Sensor, der durch die Haut eingestochen und in das Fettgewebe eingebracht wird. Dort misst der Sensor die Zuckerkonzentration der interstitiellen Flüssigkeit (ISF) [13], welche grundsätzlich mit dem Zuckerwert im Blut korreliert. Jeder Sensor wird mit einem Transmitter betrieben, der die gemessenen Glukosewerte an einen Empfänger sendet, wo sie gespeichert und zur Anzeige gebracht werden. Die Sensoren können bis zu sieben Tage getragen werden. Danach wird der Sensor entfernt und ein neuer Sensor wird an einer anderen Gewebsstelle eingestochen.



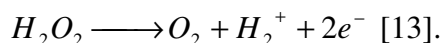
**Abb. 4: Am Markt erhältliche KmG-Systeme:** Die am Markt erhältlichen KmG-Systeme von Dexcom, Abbott und Medtronic bestehen jeweils aus einem Sensor (Unten), einem Transmitter (Mitte) und einem Empfänger (Oben). Der Sensor wird durch die Haut in das Fettgewebe gestochen und misst die Zuckerkonzentration der ISF, welche mit der Blutzuckerkonzentration korreliert. Der Transmitter versorgt den Sensor mit Spannung und sendet die gemessenen Glukosewerte zum Empfänger, wo sie angezeigt und gespeichert werden.

### 1.2.1.2. Der kontinuierlich messende Glukosesensor der Firma Dexcom

Die am Markt erhältlichen KmG Systeme verwenden elektrochemische Sensoren, die auf der proportionalen Umsetzung der Glucosemoleküle in messbare Ladungsträger mittels des Glukose Oxidase Enzyms basieren. Das Prinzip dieser Sensoren wird hier anhand des Dexcom KmG-Systems (Seven Plus continuous glucose monitoring system, Dexcom, USA) genauer beschrieben.

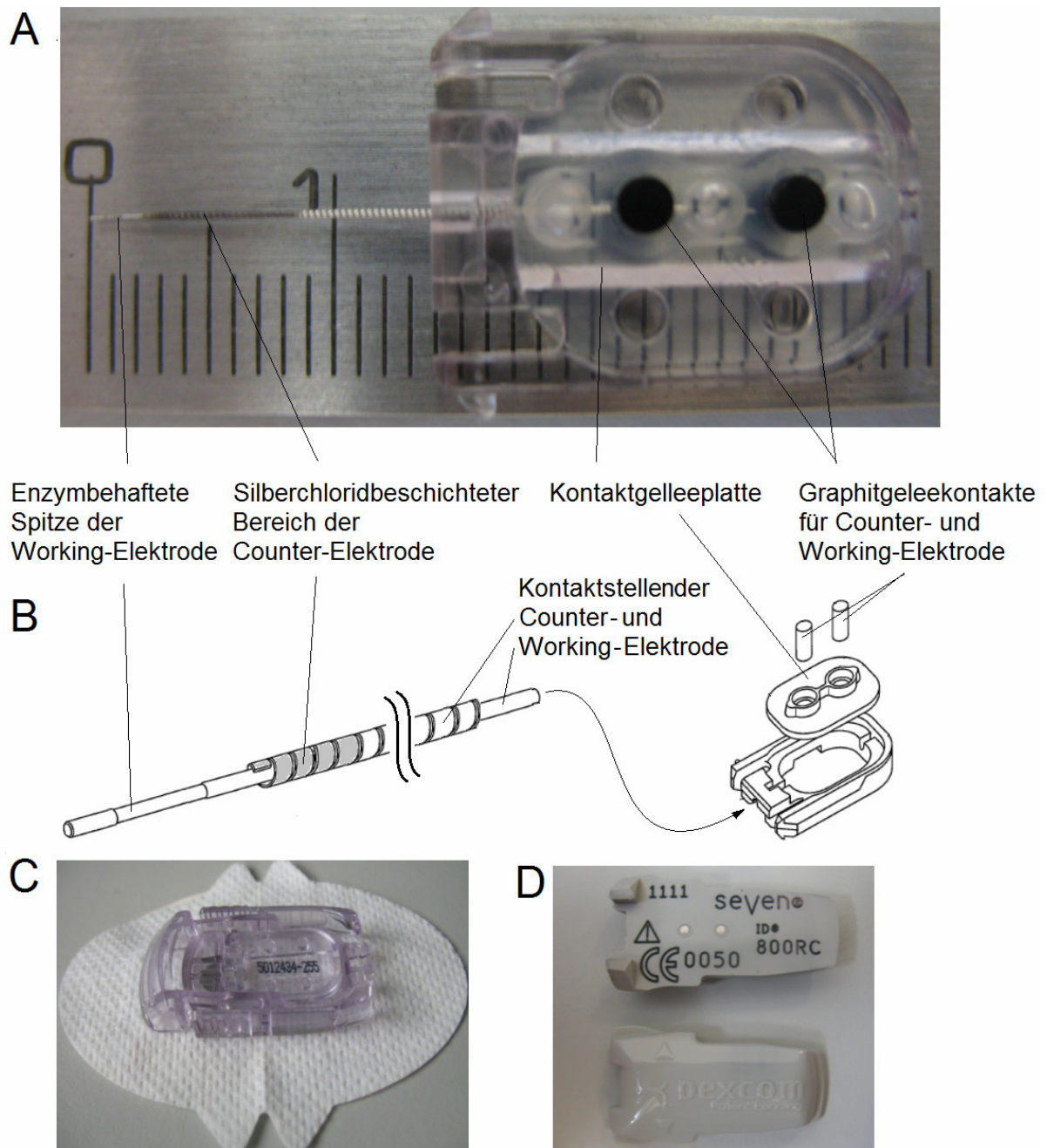
Dieser Zweielektrodensensor besteht aus einer Working-Elektrode an deren Spitze sich Glukose-Oxidase Enzyme befinden. Die Enzyme sind in einer dort angebrachten semipermeablen Membran eingeschlossen und fixiert. Die Membran ist für die Glukose-Oxidase Enzyme undurchlässig, aber für kleinere Moleküle, wie Glukose und Sauerstoff, durchlässig. Um die Working-Elektrode herum ist, nach dem glukoseoxidase-beschichteten Bereich beginnend, die Counter-Elektrode gewickelt. Die ersten 7mm der Counter-Elektrode, sind mit Silberchlorid beschichtet. Beide Elektroden sind voneinander durch eine Isolationsschicht getrennt. Kontaktiert werden die Elektroden über eine Kontaktgeleeplatte in die für jede Elektrode ein elastischer Graphitgeleezylinder eingepasst ist (Abb. 5A und 5B). Die Kontaktgeleeplatte befindet sich in der Sensorhalterung (Abb. 5C) und wird mithilfe des Transmitters (Abb. 5D) so kontaktiert, dass je ein Graphitgeleezylinder einen Kontakt am Transmitter berührt. Kommt der Sensor nun in Kontakt mit Glukose, läuft am Enzym folgende Reaktion ab:  $glucose + O_2 \xrightarrow{glucose\ oxidase} gluconic\ acid + H_2O_2$

Der Transmitter hält die Spannung zwischen Working- und Counter-Elektrode auf einem konstanten Wert, wodurch das entstandene Wasserstoffperoxyd ( $H_2O_2$ ) aufgespaltet wird:



Der Transmitter zeichnet nun den resultierenden Strom dieser Reaktionen auf und sendet die Daten an den Empfänger (Abb. 4). Durch eine Referenzmessung (Bestimmung der Glukosekonzentration in einem Bluttröpfchen) kann der Sensor kalibriert und der gemessene Strom in eine Glukosekonzentration umgerechnet werden.



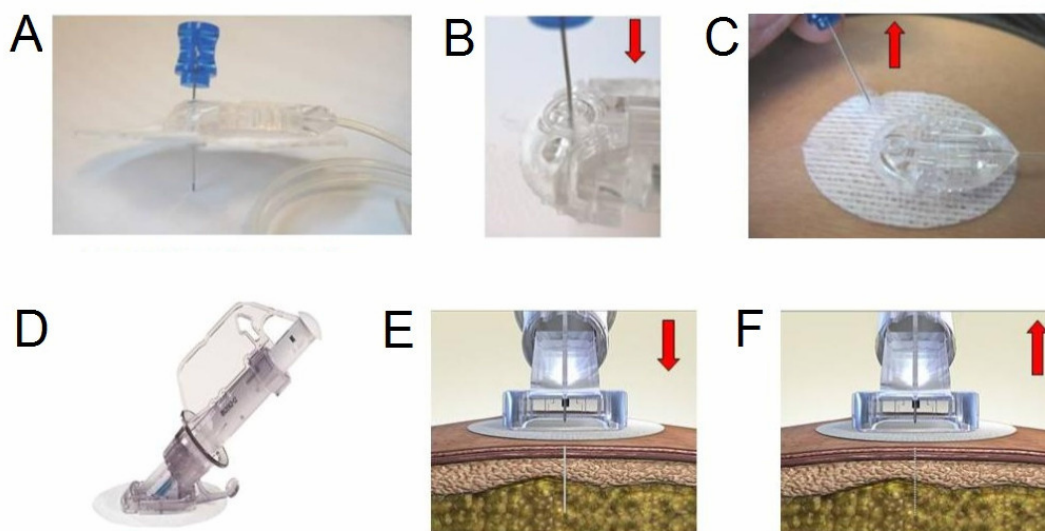


**Abb. 5: Dexcom KmG Seven Plus System:** A) Der Zweielektrodensensor besteht aus einer Working-Elektrode an deren Spitze eine Enzymschicht in einer semipermeablen Membran eingebettet ist. Anschließend an den Enzym-belegten Bereich, ist um die Working-Elektrode eine mit Silberchlorid beschichtete Counter-Elektrode gewickelt. Beide Elektroden werden innerhalb einer Kontaktgelleeplatte über elastische Graphitgeleezylinder kontaktiert. B) In dieser schematischen Darstellung des Sensors ist die, um die Working-Elektrode gewickelte, Counter-Elektrode dargestellt. Der Sensor ist so in der Kontaktplatte positioniert, dass die Kontaktstellen der Elektroden jeweils von einem Graphitgeleezylinder umschlossen werden. [nach 24] C) Die Anordnung aus Sensor und Kontaktplatte befindet sich in einer Sensorhalterung die auf den Körper des Patienten aufgeklebt wird. D) Ein Transmitter, der in die Sensorhalterung eingepasst ist, drückt seine Kontakte auf die schwarzen Graphitgeleezylinder und hält die Spannung zwischen Working- und Counter-Elektrode auf einem konstanten Wert. Durch die Aufspaltung der Glukose an den Glukoseoxidase-Enzymen und durch die vom Transmitter angelegte Spannung, entsteht ein Strom, der der Glukosekonzentration proportional ist und aufgezeichnet wird.

### 1.2.1.3. Setzen von kontinuierlich messenden Glukosesensoren und Insulininfusionskanülen

Zum Setzen einer Insulininfusionskanüle wird eine Nadel verwendet, die über ein selbstverschließendes Septum in das Innere der Kanüle eingebracht ist (Abb. 6A). Die Nadel wird zusammen mit der sie umschließenden Infusionskanüle in den Körper eingestochen (Abb. 6B). Die Kanülenhalterung wird darauf folgend mit einem Pflaster an der Haut festgeklebt. Nach dem Einstechen wird dann die Setznadel zurückgezogen, sodass nur die Infusionskanüle im Körper verbleibt (Abb. 6C). Die Infusionskanüle kann nun über einen flexiblen Schlauch mit einer Insulinpumpe verbunden werden.

Die Methoden zum Setzen einer Insulininfusionskanüle ähnelt den Methoden, die zum Setzen von KmGs angewandt werden. Beim Setzen des KmGs der Firma Dexcom (Abb. 6D) wird auch eine Nadel verwendet, die nach dem Setzen zurückgezogen wird. Der Unterschied besteht darin, dass sich hier das zu setzende Objekt (der Sensor) im Inneren der Nadel befindet. Die Nadel wird durch die Haut ins Fettgewebe eingestochen (Abb. 6E). Danach wird die Sensorhalterung festgeklebt und die Nadel zurückgezogen (Abb. 6F). So verbleibt der Glukosesensor im Fettgewebe und ist der ISF ausgesetzt. Die Elektroden des Sensors werden anschließend an der Sensorhalterung kontaktiert, wodurch der Sensor betrieben werden kann.



**Abb. 6: Setzen von Insulininfusionskanüle und Glukosesensor:** A) Um eine Insulininfusionskanüle zu setzen wird eine Metallnadel verwendet, die über ein selbstverschließendes Septum in das Lumen der Kanüle eingebracht ist. B) Die Nadel wird zusammen mit der Kanüle eingestochen und danach entfernt C). Danach verbleibt nur die Kanüle im Körper. D) Zum Setzen eines KmG (im Bild ein Dexcom seven Plus) wird ebenfalls eine Metallnadel verwendet. Im Inneren der Nadel befindet sich der Sensor. E) Die Nadel wird mitsamt dem Sensor durch die Haut in das Fettgewebe gestochen. F) Nach dem Einstechen wird die Nadel wieder zurückgezogen und nur der Sensor verbleibt im Fettgewebe.

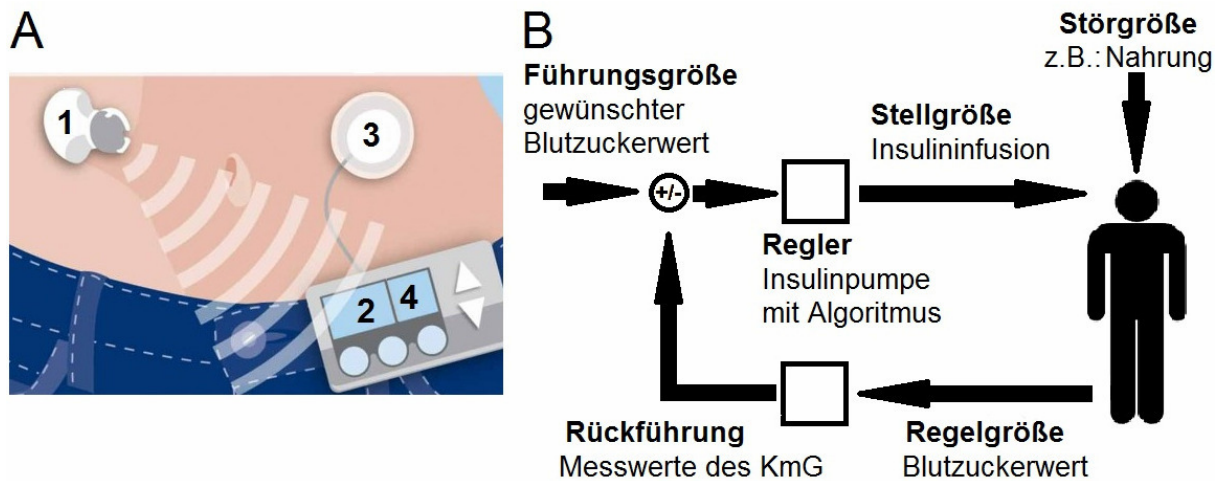
### 1.2.3. Künstliche Bauchspeicheldrüse

#### *1.2.3.1. Prinzipieller Aufbau einer künstlichen Bauchspeicheldrüse*

Zur Verbesserung der Blutzuckereinstellung bei Typ1 Diabetikern wurden und werden verschiedene Systeme entwickelt, die auf unterschiedliche Art und Weise die Blutzuckerkonzentration ermitteln, dann basierend auf den ermittelten Blutzuckerkonzentrationswerte die Insulingabemenge berechnen, und letztlich mit einem Insulinabgabegerät das Insulin in der berechneten Menge applizieren. Systeme bei welchen diese drei Therapieschritte automatisiert ablaufen, werden künstliche Bauchspeicheldrüse (Artificial Pancreas; AP) genannt [14]. Eine künstliche Bauchspeicheldrüse besteht demnach aus 3 prinzipiellen Teilen: einer Glukosemesseinheit, einer Insulinabgabeeinheit und einem Kontroll-Algorithmus zur Berechnung der Insulinabgabemenge [15]. In den letzten Jahren ist, gemeinsam mit der Weiterentwicklung und Markteinführung von KmGs, das Interesse an der Realisierung von AP-Systemen stark gestiegen. Zurzeit beschäftigen sich viele Firmen und universitäre Forschungsgruppen verstärkt mit der Weiterentwicklung von solchen AP-Systemen. Im Jahre 2010 startete auch ein EU-finanziertes Projekt namens „Artificial Pancreas at Home“ (AP@Home) mit dem Ziel ein AP-System zu entwickeln, welches von Diabetikern auch schon im Alltag angewandt werden kann. An diesem EU-Projekt nimmt auch die Medizinische Universität Graz gemeinsam mit 5 Europäischen Unternehmen und 6 weiteren Europäischen Universitäten teil (siehe <http://www.apathome.eu>).

Bei dem System, das im Zuge des AP@Home Projektes entwickelt wird, soll ein KmG als Glukosemesseinheit und eine Insulinpumpe mit Insulininfusionskanüle als Insulinabgabeeinheit verwendet werden. Weiters soll der Algorithmus in der Kontrolleinheit der Insulinpumpe implementiert werden (Abb. 7A). Die Glukosewerte, die der KmG ermittelt, werden an den Algorithmus gesendet, der daraus die benötigte Insulininfusionsrate errechnet und diese an der Pumpe einstellt. Die Pumpe liefert über die Insulininfusionskanüle dann das benötigte Insulin in das Fettgewebe des Diabetikers. Es entsteht ein Regelkreis, mit dem Algorithmus und der Insulinpumpe als Regler, der Insulininfusionsrate als Stellgröße, dem Körper des Diabetikers als Regelstrecke und den vom KmG aufgezeichneten Werten als Regelgröße (Abb. 7B). Ein großer Nachteil bei diesem System ist aber, dass der KmG und die Insulininfusionskanüle separiert vorliegen und dadurch getrennt an zwei verschiedenen Gewebsorten eingestochen werden müssen (Dual-Port Technik).





**Abb. 7: Prinzipieller Aufbau einer künstliche Bauchspeicheldrüse:** A) Ein KmG (1) ermittelt kontinuierlich die Zuckerkonzentration in der interstitiellen Flüssigkeit und sendet die gemessenen Werte an die Kontrolleinheit der Insulinpumpe. Der dort implementierte Algorithmus (2) errechnet aus den Glukosekonzentrationswerten die nötige Insulininfusionsrate, die an der Insulinpumpe (4) eingestellt und über die Insulininfusionskanülen (3) abgegeben wird. Der Nachteil bei dieser Art der Kopplung von Sensor und Pumpe ist der, dass zwei Hauteinstichstellen, eine für den Sensor, die andere für die Insulininfusionskanüle, notwendig sind (Dual Port Technik). B) Regelkreis der künstlichen Bauchspeicheldrüse. Die Führungsgröße ist dabei ein normoglykämischer Blutzuckerwert (80-120mg/dl). Der Algorithmus und die Insulinpumpe stellen den Regler dar; Die Insulininfusionsrate ist die Stellgröße und der Blutzuckerspiegel des Diabetikers ist die Regelgröße. Sie wird indirekt vom KmG gemessen. Die Zuckerkonzentration im ISF, die der KmG aufzeichnet, wird als Rückführung verwendet.

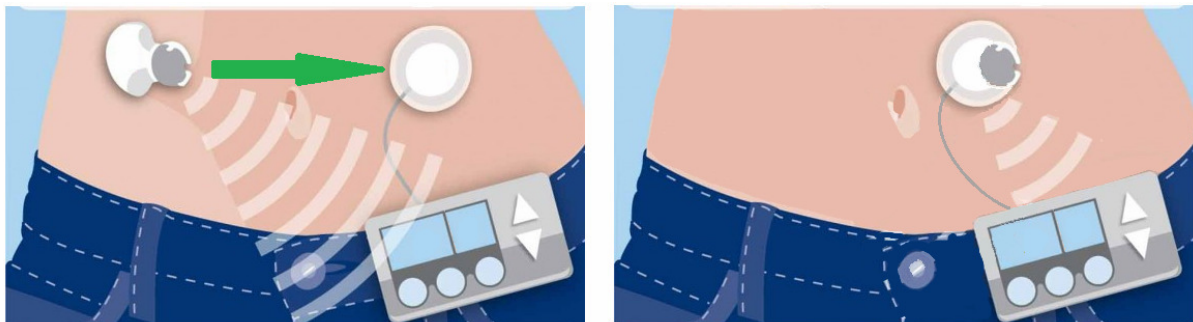
### 1.2.3.2. Verbesserung der künstlichen Bauchspeicheldrüse: Zusammenlegung der Glukosemessung mit der Insulingabe

Um die möglichen Nachteile eines Dual-Port-Systems zu vermeiden, wird innerhalb des AP@Home-Projektes auch ein Single-Port-System entwickelt (Abb. 8). Bei dieser Entwicklung soll die Insulingabe und die Glukosemessung am selben Ort vereint werden.

Ein Medizinprodukt basierend auf einer Single-Port-Technik würde den Komfort bei der Diabetesbehandlung wesentlich verbessern, da das Gerät eine wesentlich kleinere Bauform aufweisen, und ein gemeinsames, gleichzeitiges Einstechen der Sensor- und Infusionskanülen- Komponente ermöglichen würde.

Durch diese Vereinigung würde nicht nur das Infektionsrisiko sinken (Übergang von zwei Einstichstellen zu einer) sondern auch der Tragekomfort des Systems für den Diabetiker steigen, da dieser nicht mehr zwei verschiedene Geräte an unterschiedlichen Stellen des Körpers tragen müsste. Es könnte daher zu einer steigenden Akzeptanz der Therapiemethode und somit zu einem besseren Ergebnis bei der Diabetesbehandlung kommen.

Um die prinzipielle Realisierbarkeit des Singleportkonzeptes zu testen, wurden an der Medizinischen Universität Graz mehrere Human-Studien durchgeführt. Diese Studien an gesunden Probanden und Typ1 Diabetikern zeigen, dass ein stabiles Verhältnis zwischen der Blutglukosekonzentration und Glukosekonzentration in Gewebsflüssigkeit am Ort der Insulininfusion besteht [16, 17]. Bei diesen Studien wurden über spezielle Gewebskatheter (Mikrodialysekatheter und Mikroperfusionskatheter) Insulin an einen Ort im Fettgewebe eingebracht und gleichzeitig Gewebsflüssigkeit von diesem Ort entnommen. Die Gewebsflüssigkeit wurde später mit Labormessgeräten auf ihren Glukosegehalt untersucht. Es hat sich herausgestellt, dass die Glukosewerte der vom Ort der Insulingabe entnommenen Gewebsflüssigkeit, mit dem Blutzuckerspiegel sehr gut korrelieren.



**Abb. 8: Übergang vom Dualportkonzept zum Singleportkonzept:** Der KmG wird mit der Insulininfusionskanüle verbunden und gleichzeitig mit ihr an einer Stelle in das Fettgewebe eingestochen. Eine derartige Single-Port-Anordnung wird nur durch einen Stich in den Körper eingebracht und könnte dadurch eine wesentlich kleinere Bauform des Systems ermöglichen.. Es ist damit zu rechnen, dass der daraus resultierende Tragekomfort und das erniedrigte Infektionsrisiko sich positiv auf die Diabetestherapie auswirken.

### 1.3. Ziel der Diplomarbeit: Entwickeln und Testen von Prototypen für die zusammengelegte Glukosebestimmung und Insulingabe

Im Rahmen dieser, unter dem EU-Projekt „AP@Home“ laufenden Diplomarbeit wurde an einer Verwirklichung des Single-Port-Konzeptes für eine künstliche Bauchspeicheldrüse gearbeitet. Hierbei standen folgende Ziele im Vordergrund:

- A:** Es sollten unterschiedliche Möglichkeiten zur Kombination von Glukosesensor und Insulininfusionskanüle getestet werden. Hierfür sollten mehrere Prototypen gebaut werden, die sich in Bauart und Funktionsprinzip wesentlich voneinander unterscheiden (Prototypen der ersten Generation).
- B:** Von den erstellten unterschiedlichen Prototypen sollte dann, durch Anwendung objektiver Kriterien, der am besten zu realisierende Prototyp ausgewählt werden. Der ausgewählte Prototyp sollte dann im Design und Funktion weiter verbessert werden (Prototyp der zweiten Generation). In vitro Versuche und in vivo Versuche an Ratten sollten dann darüber Aufschluss geben, ob der erstellte Single-Port-Prototyp der zweiten Generation bei einer Humanstudie eingesetzt werden kann.
- C:** Unter der Voraussetzung positiv verlaufender Tierversuche und in vitro Versuche, sollte der geschaffene Single-Port-Prototyp bei einer Studie an gesunden Probanden und einer Studie an Probanden mit Typ 1 Diabetes angewandt werden.

## **2. Methoden**

### **2.1. Realisierungskonzepte für das Verbinden von Infusionskanüle und KmG**

Für den Single-Port-Ansatz muss ein KmG gleichzeitig und am gleichen Ort mit einer Insulininfusionskanüle eingebracht werden. Zudem muss der KmG in Kontakt mit der ISF kommen. Für die Kombination von KmG und Insulininfusionskanüle waren deshalb drei prinzipielle Anordnungen denkbar:

#### **1.) Single-Port-Konzept A**

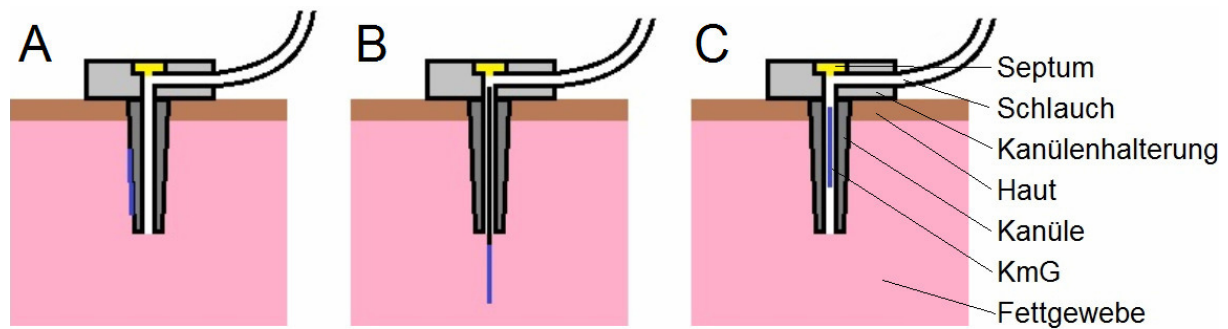
Bei dem Konzept A wird der KmG an der Außenwand der Insulininfusionskanüle (Abb. 9A) angeordnet. Die Setznadel befindet sich im Inneren der Insulininfusionskanüle und bringt KmG und Kanüle gleichzeitig in den Körper ein. Insulin, das von der Insulinpumpe in den Körper des Patienten gepumpt wird, kommt dabei nicht direkt mit dem Sensor in Kontakt.

#### **2.) Single-Port-Konzept B**

Bei dem Konzept B befindet sich der KmG in der Insulininfusionskanüle, der Glukoseempfindliche Teil des KmG's ragt jedoch über das Kanülenende hinaus (Abb. 9B). Der Glukose-sensitive Bereich des KmG's kommt also im Gewebe zu liegen. Auch bei dieser Anordnung kommt der Sensor daher nur indirekt mit Insulinflüssigkeit in Kontakt.

#### **3.) Single-Port-Konzept C**

Bei dem Konzept C befindet sich der gesamte KmG im Inneren der Insulininfusionskanüle (Abb. 9C). Während der Infusion von Insulin kommt der Glukose-sensitive Bereich des Sensors nicht in Kontakt mit der ISF des Gewebes. Zur Glukosebestimmung mit dieser Anordnung muss deshalb die Pumprichtung der Insulinpumpe umgedreht werden, sodass kurzzeitig ISF zum Sensor gesaugt wird. Nach einer Glukosebestimmung muss die Pumpe wieder auf den normalen Insulininfusionsmodus umgeschaltet werden. Es muss daher eine bidirektionale Pumpe bei dem Betreiben von Prototypen nach diesem Single-Port-Konzept eingesetzt werden. Um ISF leichter zum Sensor zu saugen, kann die Insulininfusionskanüle auch mit mehreren Perforationen an der Kanülenwand versehen werden.



**Abb. 9: Drei Möglichkeiten zur Platzierung eines KmGs an einer Insulininfusionskanüle:** **A)** Der KmG (jeweils in Blau dargestellt) befindet sich an der Kanülenwand. **B)** Der KmG befindet sich im Lumen der Insulininfusionskanüle, sein Glukose sensibler Bereich ragt jedoch über sie hinaus. **C)** Der sensitive Bereich des KmGs befindet sich im Lumen der Kanüle, für eine Glukosebestimmung wird die Pumprichtung umgedreht und ISF zum Sensor gesaugt. Nach einer Messung kann dann wieder auf den normalen Insulininfusionsbetrieb umgestellt werden.

## 2.2. Entwicklung der Prototypen erster Generation

Die drei im Handel erhältlichen Sensorsysteme (Abb. 4) wurden in unterschiedlichen Kombinationen mit verschiedenen Insulininfusionskanülen verbunden. Für jedes der Singleportkonzepte (Abb. 9) wurde mindestens ein Prototyp gebaut. Die Prototypen unterschieden sich stark in der für sie vorgesehenen Setzmethode und in ihrer mechanischen Stabilität. Auch in der Art wie der Sensor kontaktiert wird haben sie unterschiedliche Vor- und Nachteile. Da es sich bei diesen Prototypen um die erste Generation handelt, wurde nicht versucht für jede Kombination eine perfekte Handhabbarkeit zu erreichen. Es sollte lediglich eine möglichst große Anzahl an unterschiedlichen Sensor- Kanülenkombinationen geschaffen und mittels in vitro und in vivo Experimenten miteinander verglichen werden.

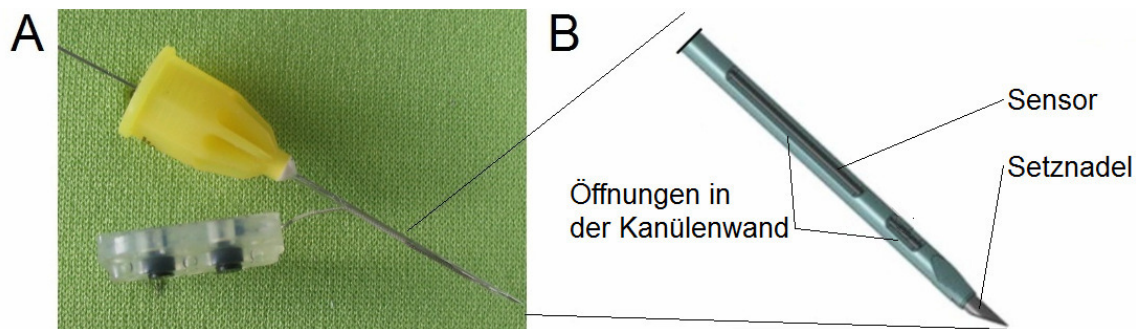
### 2.2.1. Prototypen nach dem Singleport Konzept A (Sensor an Kanülenwand)

Bei diesem Single-Port-Konzept soll der Glukosesensor an der Außenwand der Insulininfusionskanüle befestigt werden (Abb. 9A). Für den Bau von Prototypen nach diesem Konzept konnten die Sensoren von Dexcom und Medtronic herangezogen werden. Der Sensor der Firma Abbott (Abb. 4) konnte nicht verwendet werden, weil er eine geringe Länge und eine zu breite Bauart aufweist, was ihn ungeeignet zum Anbringen an der Außenwand einer Kanüle macht.

### 2.2.1.1. Realisierung des Konzeptes A mit einem Dexcom Sensor

Für diesen Prototypen wurde eine zweikanalige Kanüle (2-lumige Musterkanüle, PA 62284A, Raumedic, GER) mit einem Innendurchmesser von jeweils 0,3mm verwendet. In das Lumen eines Kanals wurde eine Setznadel eingeführt. Nach dem Setzen des Prototyps und dem Entfernen der Nadel dient dieser Kanal als Weg für die Insulininfusion. In das Lumen des zweiten Kanals wurde der Dexcomsensor eingeführt (Abb. 10A). Um den sensitiven Bereich des Sensors der ISF auszusetzen, wurde die Kanülenwand dieses Kanals an den Stellen an denen der enzymbehaftete Teil der Working-Elektrode und der mit Silberchlorid beschichtete Teil der Counter-Elektrode positioniert ist, entfernt (Abb. 10B).

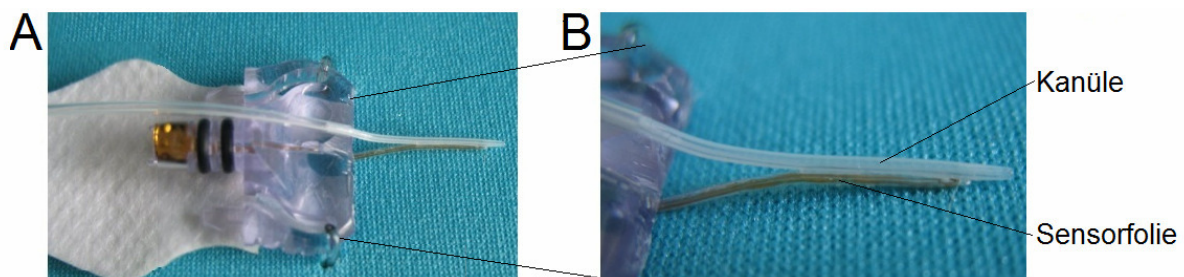
Dieser Prototyp kann mithilfe seiner Setznadel ins Gewebe gestochen werden, dabei wird der Sensor durch die Kanülenwand und der abgeflachten Spitze der Kanüle vor mechanischer Beanspruchung geschützt. Wird die Setznadel zurückgezogen, kann die Kanüle mit einer Insulinpumpe verbunden werden, und Insulin kann infundiert werden. Ein Nachteil an diesem Prototyp ist der hohe Manipulationsgrad der nötig ist, um an der zweikanaligen Kanüle die nötigen Öffnungen für die sensitiven Stellen des Sensors anzubringen. Für diesen Prototyp der ersten Generation wurde auch noch keine mechanisch stabile Möglichkeit zur Sensorkontaktierung entwickelt.



**Abb. 10: Prototyp der ersten Generation mit einem Dexcom Sensor nach dem Singleportkonzept A:** A) Für diesen Prototyp wurde eine zweikanalige Kanüle verwendet. Ein Lumen dieser Kanüle beinhaltet den Dexcom Sensor, das andere Lumen die Setznadel. Nach dem Setzen wird aus diesem Lumen die Setznadel entzogen und für die Insulininfusion verwendet. **B)** Um den sensitiven Bereich des Sensors der ISF auszusetzen, wurde die Kanülenwand, an den Stellen an denen die sensitiven Bereiche der Working- und Counter-Elektrode des Sensors positioniert sind, gelocht.

### 2.2.1.2. Realisierung des Konzeptes A mit einem Medtronic Sensor

Der Medtronic Sensor (Abb. 4) besteht aus einer goldenen bioreaktiven Sensorfolie, die zur mechanischen Stabilisierung auf einem kleinen Kunststoffstab aufgebracht ist. Diese Sensorfolie wurde mit einem Skalpell vorsichtig abgenommen und dann auf die Außenwand einer Verweilkanüle (0,7mm x 19mm, Insyte-W, Becton Dickinson, USA) geklebt (Abb. 11A). Als Kleber wurde ein UV-härtender Superkleber (Vitalit 7515, Elosol LTD, CH) verwendet. Der Vorteil bei diesem Prototypen (Abb. 11A) ist, dass der Sensor, nachdem der Prototyp gesetzt und die Setznadel entfernt worden ist, bequem über seine originale Anschlussstelle mit einem Transmitter kontaktiert und betrieben werden kann. Nachteile beim Verwenden dieser Bauteile sind die geringe mechanische Stabilität der Sensorfolie (Abb. 11B) und der große Aufwand für das Ablösen der Sensorfolie vom Kunststoffstab des Medtronic-Sensorsystems.



**Abb. 11: Prototyp der ersten Generation mit einem Medtronic Sensor nach dem Singleportkonzept A: A)** Für diesen Prototyp wurde die Sensorfolie eines Medtronic-Sensors von ihrem Kunststoffträger entfernt und auf eine Verweilkanüle aufgeklebt. Als Kleber wurde UV-härtender Superkleber verwendet **B)** In der Detailansicht erkennt man die Sensorfolie und die Infusionskanüle. Ein Problem bei diesem Prototyp ist die fehlende mechanische Stabilität der Sensorfolie.

### 2.2.2. Prototypen nach dem Singleport Konzept B (Sensor ragt über das Kanülenende hinaus)

Da bei dieser Art der Kombination von Sensor und Kanüle der sensitive Teil des Sensors über das Ende der Infusionskanüle hinausragen soll (Abb. 9B), kommen für diesen Prototyp nur Sensoren langer Bauart in Frage. Aufgrund der ungünstigen Geometrie, eignet sich der Abbottsensor in keiner Weise für die Verwirklichung dieses Single-Port-Konzeptes. Auch der Sensor von Medtronic hat eine zu kurze Bauart, um den sensitiven Bereich des Sensors außerhalb der Kanüle zu positionieren. Der einzige Sensor der für diese Realisierung eine geeignete Geometrie aufweist, ist der Sensor von Dexcom (Abb. 4).

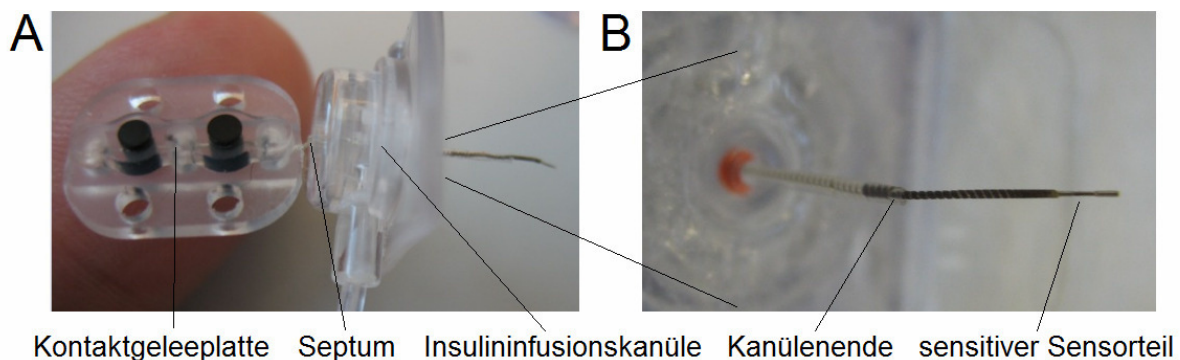


### 2.2.2.1. Realisierung des Konzeptes B mit einem Dexcom Sensor

Für die Realisierung des Prototyps nach dem Single-Port-Konzept B mit einem Dexcom Sensor (Abb. 12A), wurde zuerst eine genauere Untersuchung der am Markt erhältlichen Insulininfusionskanülen durchgeführt. Die Untersuchung ergab, dass die Setznadel des Dexcom Sensors in eine Insulininfusionskanüle des Typs SOF-SET MICRO QR (6mm) der Firma, Medtronic MiniMed passt. Da darüber hinaus der Außendurchmesser der Sensor-Setznadel sehr präzise mit dem minimalen Innendurchmesser der konisch verlaufenden Infusionskanülen Spitze übereinstimmt, kann die Setznadel der Kanüle aus dem selbstabdichtenden Septum des Kanülenehäuses herausgenommen und durch die Setznadel des Dexcom Sensors ersetzt werden.

Kanüle und Sensor können nun gleichzeitig durch die Haut in das Fettgewebe eingebracht werden. Wird nach dem Setzen die Setznadel des Sensors zurückgezogen, verbleibt der Dexcom Sensor so in der Kanüle, dass sein sensitiver Bereich deutlich über das Kanülenende hinaus ragt (Abb. 12B).

Der Vorteil bei diesem Prototyp besteht daher darin, dass wenige vorbereitende Handlungen nötig sind, um den Prototypen zu assemblieren und dann die Kanüle und den Sensor gleichzeitig in das Gewebe einzubringen.



**Abb. 12: Prototyp der ersten Generation mit einem Dexcom Sensor nach dem Singleportkonzept B: A)** Die Setznadel einer Insulininfusionskanüle kann herausgenommen und durch die Setznadel des Dexcom Sensors ersetzt werden. Damit kann Sensor und Kanüle gleichzeitig in das Fettgewebe eingebracht werden. Wird die Sensor Setznadel anschließend entfernt, verbleibt der Sensor in der Kanüle und kann über seine Kontaktgeleplatte an einen Transmitter angeschlossen werden. **B)** Der sensitive Teil des Sensors (Working-Elektrode mit Enzymbeschichtung und die mit Silberchlorid beschichtete Counter-Elektrode) wird bei dieser Anordnung außerhalb der Kanüle positioniert.



### 2.2.3. Prototypen nach dem Singleport Konzept C (Sensor im Inneren der Kanüle)

Der Sensor wird hier im Inneren einer Kanüle platziert (Abb. 9C) und ist daher nicht direkt der ISF ausgesetzt. Um ISF in die Kanüle zum Sensor zu bringen, muss bei einer angeschlossenen Pumpe, die Möglichkeit vorhanden sein, vom normalen Insulininfusionsbetrieb auf einen Ansaugbetrieb umzuschalten. Der Sensor kann dann prinzipiell in der Nähe der Kanülenspitze oder in der Kanülenhalterung, welche die Kanüle und den Schlauch der Insulinpumpe verbindet, angebracht werden.

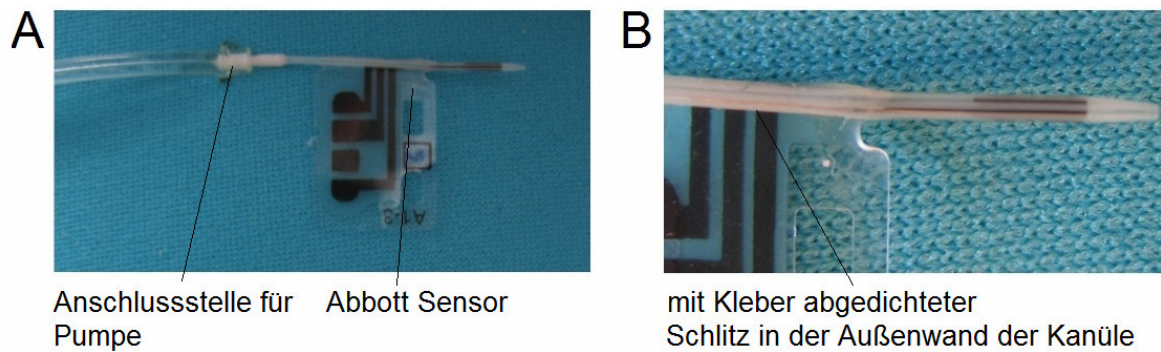
Für die Realisierung dieses Konzeptes wurden die Sensorsysteme von Abbott und Dexcom herangezogen.

#### *2.2.3.1. Realisierung des Konzeptes C mit einem Abbott Sensor in der Kanülenspitze*

Eine Verweilkanüle (0.9mm x 25mm, Insyte-W, Becton Dickinson, USA) wurde längsseitig ca. 2cm lang aufgeschnitten. Durch diesen Schlitz wurde ein Abbott Sensor in das Lumen der Kanüle eingebracht (Abb. 13A). Anschließend wurde der Schlitz in der Außenwand mit UV-härtendem Superkleber abgedichtet, um Flüssigkeitsaustritt an dieser Stelle zu verhindern (Abb. 13B).

Die Stelle, an der die Infusionskanüle normalerweise mit einer Spritze kontaktiert wird, wurde abgenommen und der darunter liegende Teil so beschnitten, dass auf ihm ein Schlauch für die Verbindung zu einer Pumpe aufgesteckt werden konnte. Ist der Prototyp gesetzt, kann mit der Pumpe nun entweder Insulin infundiert oder ISF aus dem Fettgewebe zum Sensor gesaugt werden.

Der Abbottsensor kann in dieser Anordnung sehr einfach mit dem originalen Abbott-Transmitter (Abb. 4) verbunden und betrieben werden. Nachteilig an diesem Prototyp ist, dass es noch keine Möglichkeit gibt, die Kanüle und den Sensor mithilfe einer Setznadel in das Fettgewebe einzubringen. Zum Setzen muss daher mit einer Nadel vorab ein Loch durch die Haut gestochen werden. Durch dieses Loch kann dann die Kanüle des Prototyps mitsamt dem Sensor eingeführt werden.



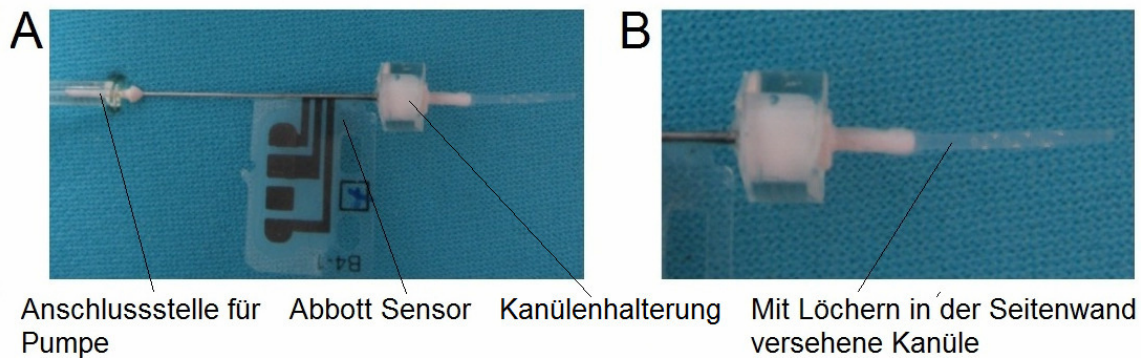
**Abb. 13: Prototyp der ersten Generation nach dem Singleportkonzept C mit einem Abbott Sensor in der Kanülenspitze:** **A)** Ein Abbott Sensor wurde über einen seitlich angebrachten Schlitz in der Kanülenwand in das Kanülenlumen eingebracht. Der Prototyp kann dann über eine vorab geschaffene Hautperforation in das Fettgewebe eingebracht und an eine bi-direktionale Pumpe angeschlossen werden. Mithilfe der Pumpe kann dann abwechselnd ISF angesaugt und Insulin infundiert werden. **B)** Um Flüssigkeitsaustritt zu verhindern, wurde der Schlitz, über den der Abbott Sensor in die Kanüle eingebracht wurde, mit Superkleber abgedichtet.

#### 2.2.3.2. Realisierung des Konzeptes C mit einem Abbott Sensor und einer gelochten Kanüle

Für diesen Prototyp wurde ein Abbott Sensor in das Innere der Kanülenhalterung einer Verweilkanüle (0.7mm x 19mm, Neoflon, Becton Dickinson, USA) eingebracht (Abb. 14A). Neben dem Sensor wurde zusätzlich eine Nadel platziert, an deren einem Ende der Schlauch einer Pumpe angeschlossen werden kann. Da sich hierbei der Glukose-sensitive Teil des Sensors in der Kanülenhalterung befindet, muß dieser Prototyp auch mit einer bi-direktionalen Pumpe betrieben werden.

Um im Ansaugmodus die ISF schnell zum Sensor zu bringen, wurde die Verweilkanüle mit zusätzlichen Löchern in der Kanülenwand versehen (Abb. 14B). Zum Setzen dieses Prototyps kann die Insulininfusionskanüle mit ihrer Setznadel in das Fettgewebe eingestochen werden. Nach dem Entfernen der Setznadel müssen dann der Sensor und die Nadel für den Anschluss an die Pumpe in die Kanülenhalterung eingebracht werden.

Nachteile an diesem Prototyp ist der hohe Aufwand für die Abänderungen an der Verweilkanüle.



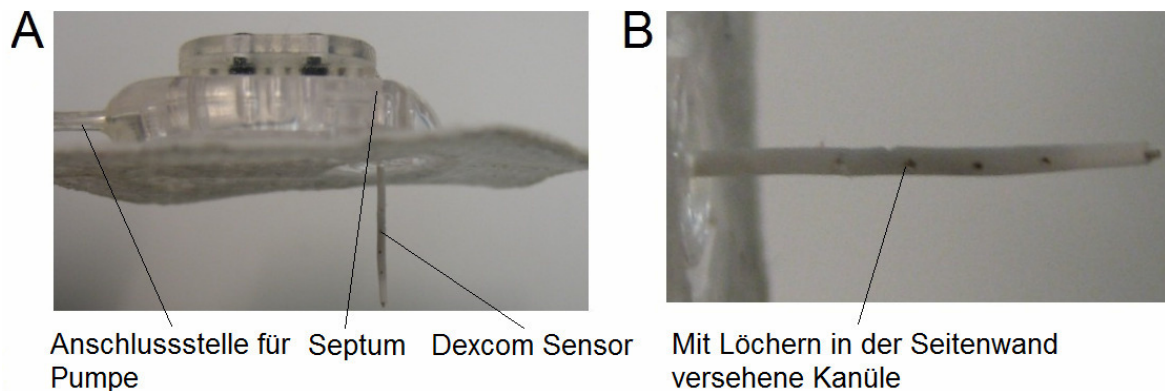
**Abb. 14: Prototyp der ersten Generation nach dem Singleportkonzept C und einem Abbott-Sensor in der Kanülenhalterung:** **A)** Bei dieser Prototypenanordnung befindet sich ein Abbott Sensor im Inneren der Halterung einer Verweilkanüle. Eine bi-direktionale Pumpe wird über eine ebenfalls in die Kanülenhalterung platzierte Nadel mit dem Prototyp verbunden. Um Insulin zu infundieren oder ISF zum Sensor zu bringen, muss die Pumpe vom Infusionsbetrieb auf einen Saugbetrieb umgeschaltet werden. **B)** Zusätzliche Löcher in der Außenwand der Kanüle erleichtern das Befördern der ISF vom Gewebe zu dem in der Kanülenhalterung positionierten Sensor.

#### 2.2.3.3. Prototyp mit einem Dexcom Sensor in einer gelochten Kanüle nach Konzept C

Für diesen Prototyp wurde ein Dexcomsensor durch das Septum in das Lumen einer Insulininfusionskanüle (10mm, Accu-Chek FlexLink, Roche AG, CH) eingebracht (Abb. 15A). Die Insulininfusionskanüle kann über ihre Anschlussstelle mit einer bi-direktionalen Pumpe verbunden werden. So kann Insulin am Sensor vorbei infundiert oder ISF zum Sensor befördert werden.

Mit einem Laser wurden zusätzliche Löcher in die Seitenwand der Kanüle geschnitten (Abb. 15B), um die ISF leichter und schneller zum Sensor zu befördern. Dadurch kann die Zeit in der die Pumpe auf den Ansaugbetrieb umgeschaltet werden muss, kurz gehalten werden.

Nachteilig dabei ist allerdings wiederum, der höhere Manipulationsgrad, der zum Assemblieren dieses Prototyps notwendig ist.



**Abb. 15: Prototyp der ersten Generation nach dem Singleportkonzept C mit einem Dexcom Sensor in einer gelochten Kanüle:** A) Für diesen Prototyp wurde ein Dexcomsensor durch das Septum einer Insulininfusionskanüle in das Kanülen-Lumen eingebracht. Die Kanüle wird dann mit einer Pumpe verbunden, die sowohl zum Infundieren des Insulins als auch zum Befördern des ISF zum Sensor verwendet werden kann. B) Um im Ansaugbetrieb die Beförderung der ISF zum sensitiven Bereich des Sensors zu erleichtern, wurde die Insulininfusionskanüle mit zusätzlichen Löchern an der Kanülenwand versehen.

### 2.3. Wahl des am besten geeigneten Sensors und des am besten zu realisierenden Single-Port-Konzeptes

Da aus Kosten- und Zeitgründen nicht jede dieser Prototypenkonfigurationen bis zur Anwendung am Menschen weiterentwickelt und mittels Humanstudien evaluiert werden konnte, wurden die geschaffenen Prototypen der ersten Generation vorab miteinander verglichen und bewertet.

Um den am besten geeigneten Sensor und die am besten geeignete Konfiguration von Sensor und Kanüle herauszufinden, wurden folgende Bewertungskriterien herangezogen: Sensor-Genauigkeit, Sensor-Stabilität und Sensor-Linearität in Insulinflüssigkeit, Sensor Verfügbarkeit, Kooperationsbereitschaft des Sensorherstellers, Kompatibilität von Sensorsetzmethode und Kanülensetzmethode, Kompatibilität von Sensorbetrieb und Insulinpumpenbetrieb, und die Möglichkeit zur Kalibrierung der Sensoren mithilfe von Insulinflüssigkeit.

Diese Kriterien sollten Aufschluss darüber geben, welcher Sensor in welcher Kombination mit der Insulininfusionskanüle zu favorisieren ist.

### 2.3.1. Sensor Genauigkeit

Für den Einsatz von KmG's in einer künstlichen Bauchspeicheldrüse ist die Genauigkeit des Sensors von entscheidender Bedeutung. Daher ist es auch für das Single-Port-Projekt wünschenswert den genauesten, am Markt verfügbaren Sensor einzusetzen. Diesbezüglich wurde eine Literaturrecherche durchgeführt, welche die am Markt erhältlichen Sensorsysteme der Firmen Dexcom, Abbott und Medtronic (Abb. 4) in Bezug auf ihre Genauigkeit beurteilt. Bei dieser Literaturrecherche wurde besonders Wert darauf gelegt, dass jede herangezogene Studie [18, 19, 20] zumindest zwei der Sensorsysteme miteinander vergleicht.

### 2.3.2. Langzeitstabilität und Linearität bei Kontakt von Glukosesensoren mit Insulinflüssigkeiten

Wird ein Glukosesensor zusammen mit einer Insulininfusionskanüle in Form einer Single-Port-Anordnung in das Fettgewebe eines Menschen gesetzt, kommt der Glukosesensor unweigerlich mit Insulinflüssigkeit in Kontakt sobald Insulin mithilfe der Insulinpumpe infundiert wird. Bei Single-Port-Konzept C (Abb. 9C) passiert dies, weil Insulinflüssigkeit direkt am Sensor vorbei gepumpt wird. Bei Single-Port-Konzept A und B (Abb. 9A, 9B) hingegen wird das Insulin zum Ort im Fettgewebe infundiert an dem auch der Sensor positioniert ist.

Bei der Therapie von Typ 1 Diabetes mit Insulinpumpen werden hauptsächlich schnell wirksame Insuline wie Insulin Aspart (Novo Nordisk, DEN) und Insulin Lispro (Eli Lilly, USA) verwendet. Diese Insulinflüssigkeiten enthalten nicht nur die Insulinproteine, sondern auch verschiedene, für die Haltbarkeit nötige Zusatzstoffe. Zum Beispiel enthält das schnellwirksame Insulin Lispro m-Cresol, Glycerol, Natriummonohydrogen-phosphat, Wasser, Zinkoxid, und Salzsäure [21] und das Insulin Aspart Phenol, m-Cresol, Glycerol, Natriummonohydrogenphosphat-Dihydrat, Wasser, Zinkoxid, und Salzsäure [22].

Von diesen Inhaltstoffen könnten speziell m-Cresol und Phenol problematische Auswirkungen auf den Sensor haben, da diese Konservierungsmittel in ihrem Aufbau dem Acetaminophen sehr ähnlich sind und es bekannt ist, dass bei elektrochemischen Sensoren Acetaminophen mit der zu messenden Glukose interferieren kann [13, 23].

Weiters hat Insulin einen anderen Leitwert und eine andere Sauerstoffsättigung als die interstitielle Flüssigkeit des Fettgewebes.

Die möglichen Einflüsse dieser Insulinflüssigkeiten auf die Stabilität und die Linearität der Sensoren von Dexcom, Abbott und Medtronic mussten daher getestet werden.

Hier sei erwähnt, dass diese Untersuchungen im Rahmen dieser Diplomarbeit nur für den Sensor von Dexcom durchgeführt wurden. Die Untersuchungen der Sensoren von Medtronic und Abbott waren schon im Vorfeld durchgeführt worden. Die Vorgehensweise und die Ergebnisse werden aber der Vollständigkeit halber in dieser Diplomarbeit gezeigt und diskutiert.

Für jeden Sensortyp wurden drei unterschiedliche *in vitro* Tests durchgeführt, bei denen der jeweilige Sensortyp in einem mit unterschiedlichen Insulinflüssigkeiten durchspülten Schlauch positioniert war und mit einem Potentiostat betrieben wurde (Abb. 16).

Das Betreiben der Sensoren mit Potentiostat wird ausführlich im Methoden-Abschnitt 2.4 erklärt. Die Versuchsanordnung und die Protokolle der *in vitro* Versuche werden im Methoden-Abschnitt 2.5 genauer beschrieben. An dieser Stelle wird nur kurz auf den Zweck jedes Versuches eingegangen:

Um den Langzeiteinfluss der Insulinflüssigkeiten auf die Sensoren zu untersuchen, wurden die Sensoren über 12 Stunden lang Insulinflüssigkeiten, denen eine bestimmte Menge Glukose beigemischt worden war, ausgesetzt (Abb. 19).

Der Einfluss der Insulinflüssigkeiten auf die Sensorlinearität wurde untersucht, indem Insulinflüssigkeit mit unterschiedlichen Glukosemengen dem Sensor sequentiell präsentiert wurde (Abb. 20).

Um weiters den Einfluss wechselnder Konservierungsmittelkonzentrationen auf die Sensorfunktion zu bestimmen, wurden die Sensoren solchen Insulinflüssigkeiten ausgesetzt, deren Phenol- und m-Cresolgehalt erhöht worden war (Abb. 21).



**Abb. 16: In vitro Untersuchungen zur Funktion der Sensoren in Insulinflüssigkeiten:** In vitro Tests der Sensoren von Dexcom (links), Abbott (mitte) und Medtronic (rechts). Die Sensoren befanden sich in Schläuchen die mit den jeweiligen Insulinflüssigkeiten durchspült wurden.

### 2.3.3. Sensor Verfügbarkeit

Für die Erstellung der Prototypen erster Generation wurden die Sensorsysteme der Firmen Dexcom, Abbott und Medtronic verwendet (Abb. 4). Es ist offensichtlich, dass die zukünftige Verfügbarkeit des ausgewählten Sensors von entscheidender Bedeutung für eine erfolgreiche Systementwicklung und einen eventuellen Markteintritt ist.

Auch Änderungen an der Sensorgeometrie oder der Sensorsetzweise, wie sie vorkommen können, wenn eine Herstellerfirma eine neue Sensorgeneration einführt, würden sich negativ auf die Entwicklungsarbeiten eines Single-Port-Systems auswirken.

### 2.3.4. Bereitschaft des Sensorherstellers zu einer Kooperation

Damit das Single-Port-Konzept einer künstlichen Bauschspeicheldrüse schlussendlich bis zu einem einsetzbaren Medizinprodukt gebracht werden kann, ist es wünschenswert in enger Kooperation mit den Sensorherstellern zu arbeiten. Durch die Bereitschaft der Sensorhersteller technische Unterstützung zu leisten und bei der Zertifizierung mitzuarbeiten, könnte die Produktentwicklung deutlich beschleunigt werden.

### 2.3.5. Kompatibilität von Sensorsetzmethode und Kanülensetzmethode

Die Benutzerfreundlichkeit bei der Anwendung eines Single-Port-Systems kann gesteigert werden, indem man den Glukosesensor gleichzeitig mit der Insulininfusionskanüle in das Fettgewebe einbringen kann.

Um das zu realisieren, wäre es günstig, wenn die Art und Weise des Setzens der für ein Single-Port-System eingesetzten Infusionskanüle (Abb. 6B, 6C) mit der des eingesetzten Glukosesensors (Abb. 6E, 6F) kompatibel ist. Ein weiteres Kriterium für die Wahl des Prototyps war daher, ob Kanüle und Sensor gleichzeitig durch Verwendung eines Setzapparates in das Fettgewebe eingestochen werden können

### 2.3.6. Kompatibilität von Sensorbetrieb und Insulinpumpenbetrieb

Es ist weiters wünschenswert, dass der Betrieb des Glukosesensors in einer Single-Port-Anordnung mit den Betriebsarten einer Insulinpumpe (Abb. 3) kompatibel ist. Ist dies nicht der Fall, wären größere Änderungen an der Betriebsart von Sensor oder der Insulinpumpe nötig. Dadurch würden aber auch größere Kosten in der Entwicklung und Herstellung des Single-Port-Systems entstehen.

### 2.3.7. Möglichkeit zur Kalibrierung der Sensoren mithilfe der Insulinflüssigkeit

Prinzipiell muss jeder KmG, der sich in der ISF befindet und die Glukosekonzentration anzeigen soll, kalibriert werden. Derzeit wird dazu die Glukosekonzentration in einem aus dem Finger des Patienten entnommenen Blutropfen mithilfe eines Messstreifens bestimmt (Abb. 2C). Anschließend wird der erhaltene Blutglukosewert dem Sensorstrom mithilfe einer Ein- oder Zweipunkt-Kalibrierung zugewiesen.

Würde man den über die Prototypen infundierten Insulinflüssigkeiten eine genau bestimmte Menge Glukose hinzufügen, könnte der Sensor des Prototyps auf diese Glukosekonzentration kalibriert werden und die aufwendigere Kalibrierung mithilfe der Glukosekonzentrationsbestimmung in einem Blutropfen würde entfallen.

## 2.4. Betreiben eines KmG's mit Potentiostat

In einigen Fällen war das Betreiben der Sensoren mit den Original Transmitter und Empfängersystemen (Abb. 4) nicht möglich, weil diese Empfänger bei schnellen Änderungen im Sensorsignal einen unphysiologischen Zustand vermuten und aus Sicherheitsgründen die Anzeige und die Speicherung der gemessenen Glukosewerte unterbrechen.

Da aber manchmal gerade diese Daten von Interesse waren, wurde der Sensor in diesen Fällen mithilfe eines an einen Laptop angeschlossenen Potentiostat betrieben (Abb. 17A).

Anwendung fand dabei der PalmSens Potentiostat (PalmSens Handheld Potentiostat / Galvanostat, Palm Instruments BV, Holland) (Abb. 17C) und sein kleiner Bruder, der Em-Stat Potentiostat (Em-Stat Interface for Electrochemical Sensors, Palm Instruments BV, Holland) (Abb. 17D).



Um die Sensoren jedes Sensorsystems (Abb. 4) anstatt mit ihrem Transmitter, mit einem Potentiostaten betreiben zu können, wurden Kontaktstücke gebaut, die der Form des jeweiligen Sensorgehäuses angepasst waren. Diese Kontaktstücke wurden dann mithilfe eines geschirmten Kabels mit dem Potentiostat verbunden (Abb. 17B).

Für den Dexcom Sensor wurde der Potentiostat so eingestellt, dass er die Spannung zwischen Working- und Counter-Elektrode auf 600mV hält und den resultierenden Strom aufzeichnet.

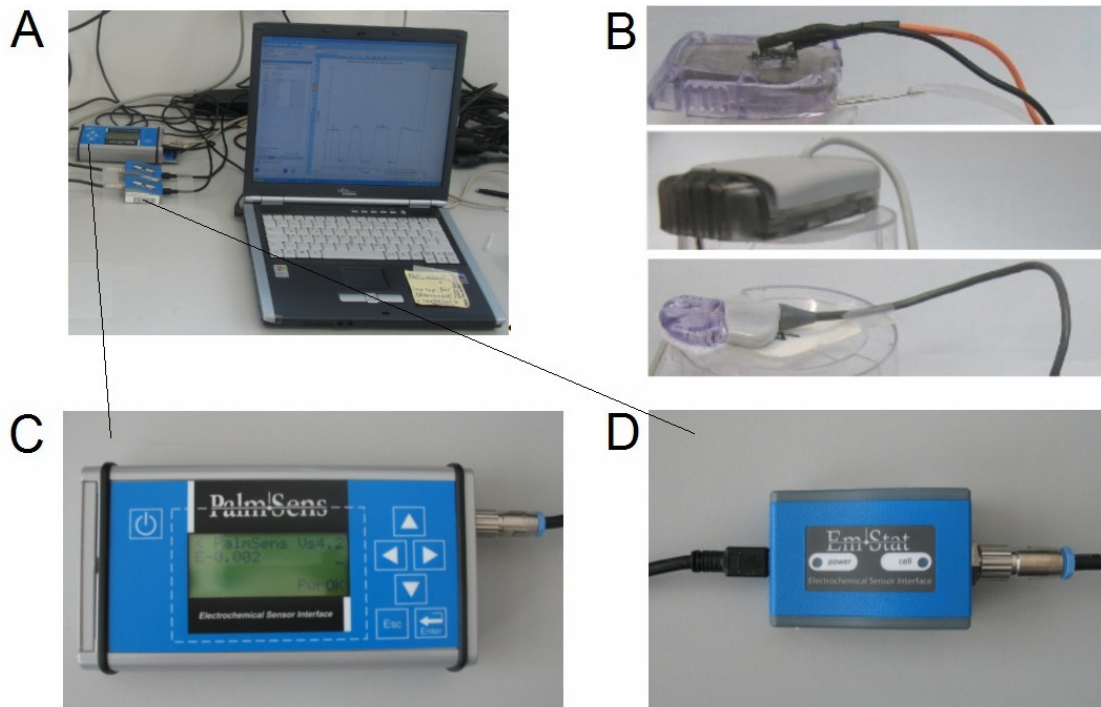
Die 600mV wurden gewählt, weil der Dexcomsensor bei dieser Spannung seine höchste Sensitivität und Stabilität aufweist [24]. Eine Spannung in dieser Höhe wurde auch an den Kontakten des Dexcom Transmitters gemessen.

Für den Abbott Sensor wurde die Spannung des Potentiostaten auf 0V gehalten und der Medtronic Sensor wurde mit 400mV betrieben.

Die Abtastrate des Potentiostaten wurde so eingestellt, dass jede Sekunde einen Wert aufzeichnet wurde. Mit der maximalen Speicherkapazität (64000 Datenpunkte) ergab das eine mögliche Testdauer von 17,8 Stunden, welche für die angewandten Testprotokolle vollkommen ausreichend war.

Prinzipiell wurden die Potentiostaten über ein USB-Kabel mit einem Laptop verbunden, der mithilfe einer Software der Firma Palm Instruments (PSTrace, Palm Instruments BV, Holland) das Speichern und die Online-Anzeige der Messwerte erlaubte. Für den PalmSens Potentiostat (Abb. 17C) gab es noch die zusätzliche Möglichkeit, die Daten via BlueTooth zum Laptop zu übertragen. Außerdem verfügte dieser Potentiostat über eine Batterie, was das zeitweilige Betreiben der Sensoren auch ohne Netz erlaubte.

Bei der Durchführung von Humanversuchen verschaffte die BlueTooth-Datenübertragung und der Batteriebetriebsmodus dem Probanden eine größere Bewegungsfreiheit. Kurzzeitige Toilettenbesuche konnten deshalb ohne Messunterbrechungen durchgeführt werden.



**Abb. 17: Betreiben des Dexcom Sensors mit Potentiostat:** **A)** Ändert sich das Sensor-Signal kurzzeitig sehr schnell, so interpretieren die Original-Empfängereinheiten der Firma Dexcom, Abbott und Medtronic dies als ein unphysiologisches Ereignis und unterbrechen daraufhin das Anzeigen und Speichern dieser Sensorsignale für eine längere Zeit (z.B.  $\frac{1}{2}$  - 2 Stunden). Da bei manchen Testprotokollen sich die Glukosekonzentrationen in den Perfusaten sprunghaft änderten, konnten deshalb die Original-Transmitter- und Empfängereinheiten der Firmen nicht verwendet werden. Für die Durchführung von Tests mit sprunghaften Glukoseänderungen wurden daher die Sensoren mithilfe eines an einem Laptop angeschlossenen Potentiostaten betrieben. **B)** Die an das Sensorgehäuse von Dexcom (oben) Abbott (mitte) und Medtronic (unten) angepassten Kontaktplatten, erlaubten es, die Working- Counter- und Referenz-Elektrode der jeweiligen Sensoren mit dem Potentiostat zu verbinden. **C)** Der PalmSens Potentiostat wurde so eingestellt, dass er die Spannung zwischen Working- und Counter-Elektrode des Dexcom Sensors auf 600mV, des Abbott Sensors auf 0V und des Medtronic Sensors auf 400mV hielt. Der resultierende Sensorstrom wurde über eine Datenleitung oder über eine BlueTooth-Verbindung zu einem Laptop übertragen und dort zur Anzeige gebracht. Der PalmSens Potentiostat kann mit Netzstecker oder im Batteriemodus betrieben werden. **D)** Der Em-Stat Potentiostat ist das kleinere Potentiostat-Modell der Firma Palmsens. Ihm fehlt der Batteriemodus und die Möglichkeit einer BlueTooth-Verbindung.

## 2.5. In vitro Versuche

### 2.5.1. Aufbau der in vitro Versuche

Um KmG's unter verschiedenen Bedingungen testen zu können, wurde ein in vitro Aufbau gewählt, bei dem die Sensoren mit ihrem Transmitter und Empfänger oder aber mit einem Potentiostaten betrieben werden konnten (Abb. 18). Die Sensoren wurden dazu in das Lumen eines PVC-Schlauches (ID 0,51mm, Tygon, USA) eingestochen. Damit während des Durchspülens des Schlauches, mit den jeweiligen zu testenden Lösungen, an den Sensordurchstichstellen keine Flüssigkeit austrat, wurden diese Schlauchstellen mit Superkleber versiegelt. Anschließend wurde der Schlauch mit dem jeweiligen Sensor an eine Peristaltikpumpe (Minipuls 3, Gilson, USA) angeschlossen. Mithilfe dieser Pumpe konnten nun Lösungen aus ihren Behältern durch den Schlauch zum Sensor und weiter in ein Auffanggefäß gepumpt werden. Ein großes Problem bei diesen in vitro Versuchsaufbauten waren Luftblasen, die bei Lösungswechsel unbeabsichtigt in den Schlauch gepumpt wurden und dann, am Sensor angelangt, Störungen im Sensorsignal hervorriefen. Beseitigt wurde dieses Problem damit, dass zum Wechsel der Lösungen kurzzeitig die Pumprichtung der Gilsonpumpe umgedreht wurde, solange bis ein kleiner Tropfen am Ansaugschlauch entstand. Mit der Generierung dieses Tropfens am Schlauchende konnte dann luftblasenfrei von einem Lösungsbehälter auf einen anderen umgestiegen werden.

Um Temperaturschwankungen während länger dauernder in vitro Versuche auszuschließen, konnte während solcher Versuche die komplette Messanordnung in eine Hotbox (Hotbox, Med. Universität Graz, AUT) gegeben werden, in der die Temperatur auf einem gewünschten Wert konstant gehalten werden konnte.



Gilson Pumpe Schlauch Sensoren Waste Em-Stat Palmsens Laptop

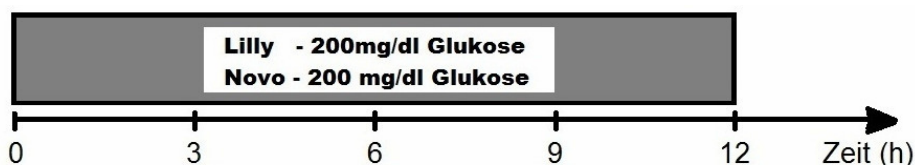
**Abb. 18: Typischer in vitro Aufbau:** Die Sensoren wurden in das Lumen eines Schlauches eingebracht und mit den Potentiostaten (im Bild) oder mit dem jeweiligen Transmitter der Firma Dexcom, Abbott oder Medtronic betrieben. Mithilfe einer Peristaltikpumpe wurde der Schlauch mit den jeweiligen Lösungen durchspült. Bei länger andauernden Versuchen wurde eine Hotbox zum Konstanthalten der Temperatur verwendet.

## 2.5.2. Protokolle der in vitro Versuche

### 2.5.2.1. Versuch: Langzeiteinfluss der Insulinflüssigkeiten auf Sensoren

Um den Langzeiteinfluss der Insulinflüssigkeiten auf Sensoren zu untersuchen, wurden die Sensoren der Firmen Dexcom, Abbott und Medtronic (Abb. 4) über 12 Stunden lang Insulinflüssigkeiten, denen eine Glukosekonzentration von 200mg/dl zugeführt worden war, ausgesetzt (Abb. 19).

Da bei diesen Versuchen keine plötzlichen Schwankungen der Glukosekonzentration vorkommen, konnten zum Betreiben der Sensoren die jeweiligen originalen Transmitter verwendet werden. Wie in Abschnitt 2.5.1. beschrieben, wurde bei diesen Versuchen eine Hotbox verwendet, um eventuelle Temperaturschwankungen zu verhindern.

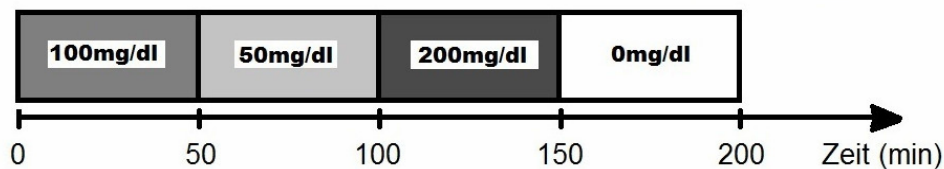


**Abb. 19: Protokoll der Versuche zum Langzeiteinfluss von Insulinflüssigkeiten auf Sensoren:** Um die Langzeitstabilität der Sensoren von Dexcom Abbott und Medtronic in Insulinflüssigkeit zu testen, wurde jeder der Sensoren 12h lang in mit 200mg/dl versehener Insulinflüssigkeit der Firma Novo und Lilly betrieben.

### 2.5.2.2. Versuch: Sensorlinearität in Insulinflüssigkeiten

Der Einfluss der Insulinflüssigkeiten auf die Sensorlinearität wurde untersucht, indem Insulinflüssigkeit mit unterschiedlichen Glukosemengen den Sensoren sequentiell präsentiert wurden. Den schnell wirkenden Insulinflüssigkeiten von Novo und Lilly wurden Glukosekonzentrationen von 100mg/dl, 50mg/dl, 200mg/dl und 0mg/dl beigemischt. Danach wurden die Insulinflüssigkeiten den Sensoren von Dexcom, Abbott und Medtronic nacheinander jeweils 50 Minuten lang präsentiert (Abb. 20).

Aufgrund der hohen und schnellen Änderung der Glukosekonzentration, die beim Übergang von einer Lösung zu einer anderen entstand, mussten die Sensoren, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, mit einem Potentiostaten betrieben werden.

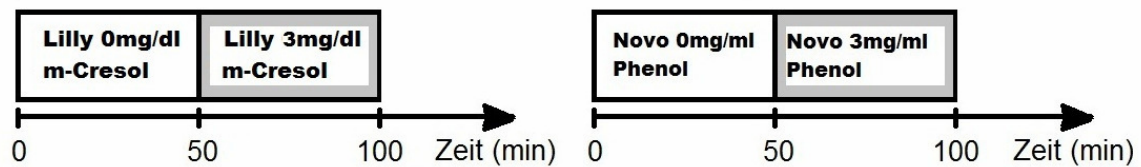


**Abb. 20: Protokoll der Versuche zur Sensorlinearität in Insulinflüssigkeiten:** Für die Untersuchungen der Sensorlinearität in Insulinflüssigkeit wurde den Sensoren Insulinflüssigkeiten mit einer Glukosekonzentration von 100mg/dl, 50 mg/dl 200 mg/dl und 0 mg/dl sequenziell präsentiert.

### 2.5.2.3. Versuch: Einfluss wechselnder Konservierungsmittelkonzentrationen auf die Sensorfunktion

Um den Einfluss wechselnder Konservierungsmittelkonzentrationen auf die Sensorfunktion zu bestimmen, wurden die Sensoren solchen Insulinflüssigkeiten ausgesetzt, deren Phenol- und m-Cresolgehalt erhöht worden war. Die Sensoren wurden dabei 50 Minuten lang der Insulinflüssigkeit der Firma Lilly mit normaler m-Cresol- Konzentration und dann mit einer um 3mg/dl erhöhter m-Cresol- Konzentration ausgesetzt.

Anschließend wurde der Versuch mit Insulinflüssigkeit der Firma Novo, mit normaler Phenol- Konzentration und um 3mg/dl erhöhter Phenol- Konzentration, wiederholt. (Abb. 21). Auch bei diesen Versuchen wurden die Sensoren mit einem Potentiostaten betrieben.



**Abb. 21: Protokoll der Versuche zum Einfluss wechselnder Konservierungsstoffkonzentrationen auf Sensoren :** Um die Auswirkungen einer Konzentrationsänderung, der in den Insulinflüssigkeiten enthaltenen Konservierungsstoffe, auf die Sensoren zu testen, wurden die Sensoren nacheinander in Insulinflüssigkeiten mit unveränderter, um 3mg/dl erhöhter m-Cresolkonzentration (bei Insulin Lilly) und um 3mg/dl erhöhter Phenolkonzentration (bei Insulin Novo) betrieben.

## 2.6. Versuche an Ratten

Ziel dieser Tierversuche war es, herauszufinden, welcher der Singleport- Prototypen die besten Ergebnisse liefert und welcher dann für eine Weiterentwicklung, bis hin zu einer Zertifizierung, ausgesucht werden sollte. Weiters sollte die in vivo Handhabung der Prototypen getestet und die optimale Versuchsanordnung für einen Humanversuch ermittelt werden.

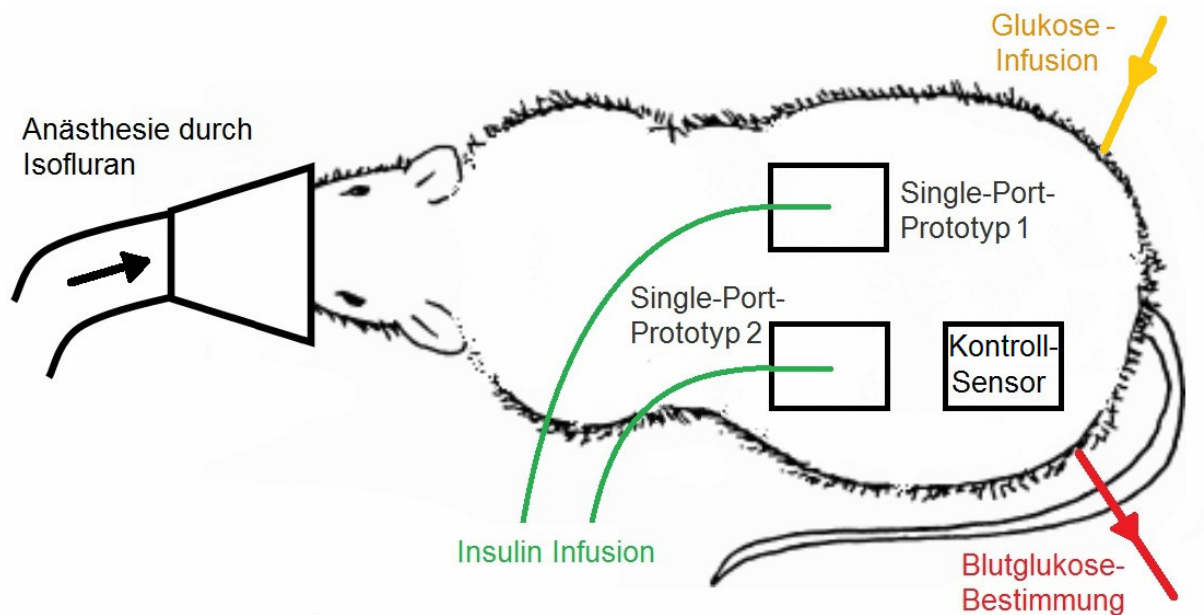
Da alle Prototypen der ersten Generation Modifikationen aufweisen, welche die Sterilität und Biokompatibilität der Infusionskanüle und des Sensors beeinträchtigten, konnten die „in vivo“-Vergleiche der Prototypen nicht direkt beim Menschen gemacht werden. Tierversuche waren deshalb unumgänglich, um die Prototypen auch unter „in vivo“-Bedingungen zu beurteilen und damit mögliche Effekte der, beispielweise, Wundsetzung, Wundheilung und Adsorption von Zellen am Sensor oder an der Infusionskanüle, zu erfassen.

Für diese „in vivo“-Untersuchungen wurden Ratten als Tiermodell herangezogen. Es wurden jeweils zwei Prototypen parallel in das subkutane Fettgewebe der Ratten eingebracht. Über die Insulininfusionskanülen der Prototypen wurden dann Insulinflüssigkeiten mit unterschiedlich großen Raten infundiert. Mithilfe der Sensoren der Prototypen wurde gleichzeitig die Glukosekonzentration in der ISF gemessen. Um die Messergebnisse der Prototypen mit dem Blutglukosespiegel der Ratte vergleichen zu können, war es nötig, während des Versuches, laufend Blutproben zu entnehmen und darin die Glukosekonzentration zu bestimmen. Dafür wurde ein Zugang zum Blutkreislauf der Ratte geschaffen. Über einen weiteren Zugang zum Blutkreislauf der Ratte wurde während des Versuches eine Glukoselösung infundiert, um die Wirkung des über die Prototypen abgegebenen Insulins auszugleichen. Dadurch konnte die Blutglukosekonzentration der Ratte geregelt werden.



Das zusätzliche Setzen eines originalen Kontroll-Sensors erlaubte es, die Messwerte der Prototypen nicht nur mit der Blutzuckerkonzentration, sondern auch mit den Messwerten eines unveränderten Sensors zu vergleichen.

Um während des Versuches dem Versuchstier Schmerzen, Stress und Angst zu ersparen, wurde eine Inhalationsanästhesie mit einer Mischung von Isofluran und Sauerstoff durchgeführt. Der gesamte Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 22 dargestellt.



**Abb. 22: Schematischer Aufbau des Tierversuches:** Um die Single-Port-Prototypen zu testen, wurden jeweils zwei Prototypen gleichzeitig mit einem originalen Kontroll-Sensor in das Fettgewebe einer anästhesierten Ratte eingebracht und betrieben. Das durch die Insulininfusion hervorgerufene Sinken des Blutzuckerspiegels wurde durch eine an den gemessenen Blutzuckerwert angepasste Glukoseinfusion ausgeglichen.

## 2.6.1. Protokoll der Versuche an Ratten

### 2.6.1.1. Art der Versuchstiere

Für diese Versuchsreihe war es nötig, ein Tierenmodell mit ausreichender Fettschichtdicke zum Platzieren der Prototypen und Kontroll-Sensoren zu finden. Weiters war es nötig, Tiere mit einer möglichst hohen Insulinresistenz zu haben, da für den Test der Prototypen ähnliche Insulininfusionsraten angewendet werden sollten, wie sie auch bei Diabetikern gewöhnlich appliziert werden (1 bis 4 U/h). Die Wahl fiel auf die Zucker-Ratte. Sie ist durch eine Mutation am Leptin-Rezeptor sowohl fettleibig als auch Insulin-resistent [25] und eignete sich daher am besten für die Versuchsreihe.

### *2.6.1.2. Narkose der Versuchstiere*

Eine Zucker-Ratte, die 12 Stunden gefastet hatte wurde am Morgen des Versuchstages abgewogen und anschließend in eine Induktionskammer (Narkosebox, Rothacher Medical GmbH, CH) gegeben. Um die Narkose des Versuchstieres einzuleiten, wurde die Induktionskammer an ein Anästhesiegerät (Anästhesie Gerät mit TEC 3 Verdampfer, Rothacher Medical GmbH, CH) angeschlossen und Sauerstoff mit 4 Vol% Isofluran mit 1,5 l/min wurde eingeleitet. Nach eingetretener Betäubung wurde die Ratte aus der Induktionskammer entnommen, auf einer Heizmatte positioniert, und an eine Narkosemaske angeschlossen. Während des gesamten Versuchszeitraums wurde dem Versuchstier mittels Narkosemaske und Anästhesiegerät (Abb. 23A) Sauerstoff mit 1 bis 2 Vol% Isofluran zugeführt.

Zur Aufrechterhaltung der Anästhesie wurde dann eine an das Gewicht des Tieres angepasste intraperitoneale Injektion aus einer Mischung von Fentanyl (0,005 mg/kg), Midazolam (2 mg/kg) und Medetomidin (0,15 mg/kg) verabreicht.

Weiters wurde mithilfe eines an die Heizdecke angeschlossenen Rektalthermometers (Abb. 23A) die Körpertemperatur der Ratte gemessen. Durch Abänderung der Heizdeckentemperatur wurde so die Körpertemperatur kontrolliert und geregelt.

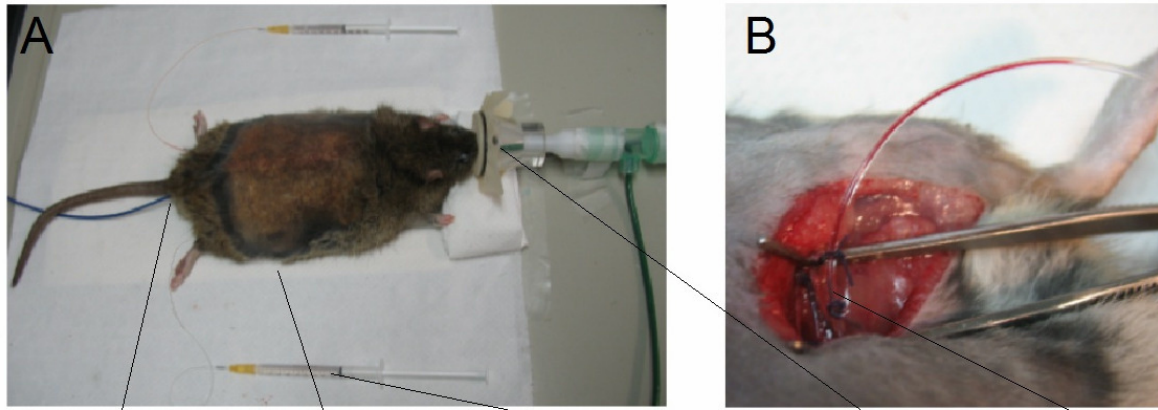
Das Austrocknen der Augenhornhaut wurde mit Augengel (Vidisic Augengel, Dr. Mann Pharma, GER) verhindert. Vor Beginn des Legens der arteriellen Katheter wurde als zusätzliche Analgesie 5mg/kg Caprofen (Rimanly, USA) in den Nackenbereich der Ratte injiziert.

### *2.6.1.3. Zugänge zum Blutkreislauf der Versuchstiere*

Für die Schaffung der Blutzugänge wurde jeweils eine Verweilkanüle in der Femoralarterie des linken und des rechten Beines platziert (Abb. 23B). Mit dieser schonenden Katheterisierung der Ratte konnte ein stabiler Kreislaufzustand über die gesamte Versuchsdauer von 8-10 Stunden beibehalten werden.

Um eine Verstopfung der Zugänge durch koagulierendes Blut zu verhindern, wurden die Zugänge häufig mit Heparin-hältiger Kochsalzlösung gespült. Dazu wurden Spritzen verwendet die an die Schläuche der Zugänge angeschlossen werden konnten (Abb. 23A).





Rektalthermometer Heizdecke mit Heparin gefüllte Spritze Narkosemaske Femoralarterie

**Abb. 23: Narkotisierung und Schaffen der Zugänge zum Blutkreislauf der Ratte:** Während des gesamten Versuchszeitraums wurde die Ratte durch die Zufuhr von Narkosegas mittels einer Narkosemaske im narkotisierten Zustand gehalten. Weiters wurde mithilfe eines Rektalthermometers und einer Heizmatte die Körpertemperatur der Ratte laufend geregelt. **B)** Im narkotisierten Zustand wurden in die Femoralarterien des linken und rechten Beines Verweilkanülen gelegt. Über diese beiden Zugänge konnten dann Blutproben zur Bestimmung der Blutzuckerwerte genommen und die Glukoseinfusion zur Regelung des Blutzuckerspiegels durchgeführt werden. Um zu verhindern, dass sich die Zugänge zum Blutkreislauf der Ratte durch koagulierendes Blut verschließen, wurden die Schläuche häufig mit Heparin-hältiger Kochsalzlösung gespült.

#### 2.6.1.4. Setzen der Prototypen und des Kontroll-Sensors bei Ratten

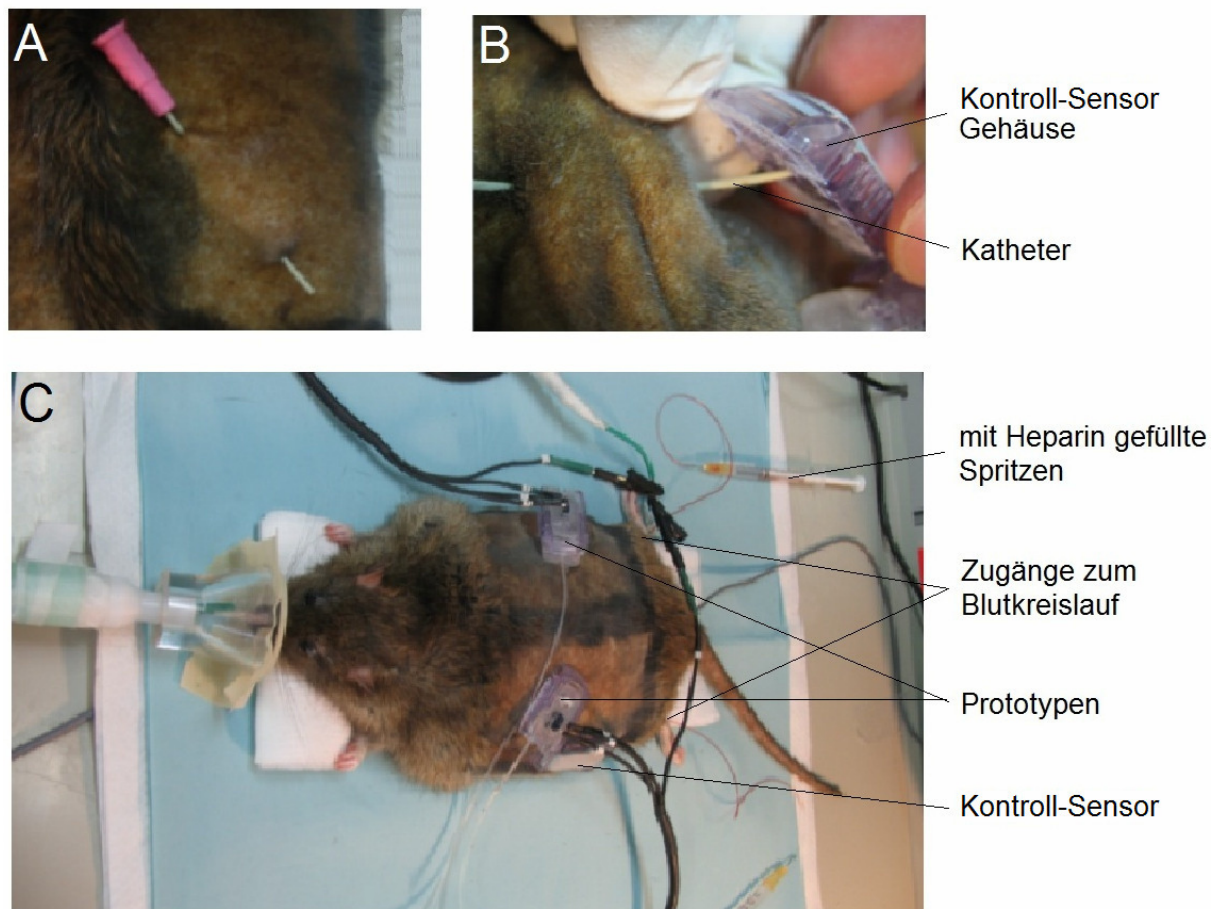
Für das Einbringen der entwickelten Prototypen in das Fettgewebe waren unterschiedliche Setzmethoden vorgesehen. Um bei den Rattenversuchen alle Prototypen unter den gleichen Bedingungen betreiben zu können und keinen Prototyp durch eine eventuell schonendere Setzweise zu bevorzugen, wurde eine Setzmethode entwickelt, mit der alle Prototypen und Kontroll-Sensoren auf die gleiche Weise in dem Fettgewebe des Versuchstieres platziert werden konnten.

Bei der hierfür entwickelten Setzmethode wurde zuerst das Fell der Ratte an den Stellen an denen die Prototypen und Kontroll-Sensor gesetzt werden sollten großflächig rasiert. Danach wurde ein 21-Gauge-Katheter (1,1 x 48mm Katheter, BD Angiocath, USA) in das subkutane Fettgewebe der Ratte eingestochen, dann ca. 4 cm unter der Haut entlang geführt und danach wieder durch die Haut nach außen gestochen. Die Setznadel wurde daraufhin aus dem Katheter gezogen und der konische Teil der Katheterspitze abgeschnitten (Abb. 24A).

Durch das abgeschnittene Ende des Katheters konnten nun Kontroll-Sensoren oder Prototypen in das Katheterlumen eingeführt werden. (Abb. 24B).

Wurde anschließend der Katheter entfernt, verblieb nur der gesetzte Kontroll-Sensor oder der Prototyp im subkutanen Gewebe des Versuchstieres.

Das Gehäuse der Kontroll-Sensoren und der Prototypen wurde danach mit biokompatiblen Superkleber an der Haut der Ratte festgeklebt. Anschließend wurden die Sensoren mit dem Original-Transmitter und -Empfänger oder, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, mit einem Potentiostaten kontaktiert und betrieben (Abb. 24C) und die Sensordaten auf einen Laptop-Computer aufgezeichnet.



**Abb. 24: Setzen der Kontroll-Sensoren und der Prototypen ins Fettgewebe:** **A)** Zum Setzen der Prototypen wurde zuerst mit Kathetern die Haut am jeweiligen Einbringungsort untertunnelt. **B)** In die Katheterlumen wurden dann der Kontroll-Sensor und die Prototypen eingeführt. Entfernte man anschließend die Katheter, verblieben die Kontroll-Sensoren und Prototypen im Fettgewebe der Ratte. Die Gehäuse der Prototypen und des Kontroll-Sensors wurden anschließend an der Haut der Ratte festgeklebt. **C)** Die Kontroll-Sensoren und die Prototypen wurden mithilfe der an das Originalgehäuse angepassten Kontaktplatten mit einem Potentiostat verbunden und betrieben. Alternativ konnte auch der originale Transmitter zum Betreiben verwendet werden.

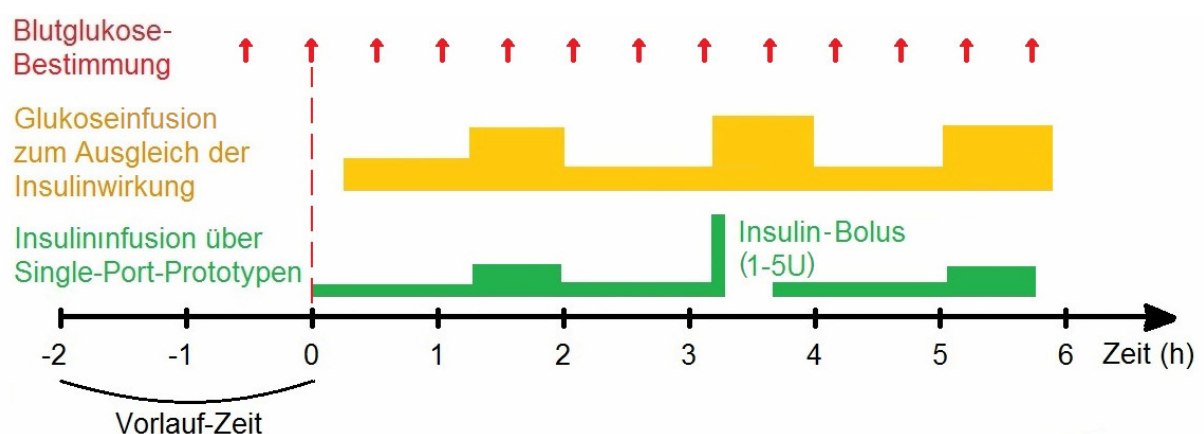
### 2.6.1.5. Insulin Infusion, Blutglukosebestimmung und Sensorbetrieb bei Ratten

Nach einer Vorlauf-Zeit von zwei Stunden wurden die Sensoren der Prototypen und der originale Kontroll-Sensor mithilfe eines gemessenen Blutzuckerwertes kalibriert.

Danach wurde mit dem Zuführen von Insulin über die Prototypen begonnen. Das Insulin wurde dabei über einige Stunden mit unterschiedlichen basalen Infusionsraten infundiert.

Weiters wurde Insulin auch in Form von unterschiedlich großen Bolus-Mengen abgegeben.

Während der Insulingabe wurde laufend (alle 15-30 min) die Blutglukosekonzentration der Ratte bestimmt. Dazu wurden über eine der beiden Verweilkanülen jeweils ca.0.5ml Blut entnommen. Bei diesen Proben wurden dann die Blutkörperchen vom Blutplasma getrennt, indem die Blutproben ca. 30 Sekunden lang mit 8000 U/min zentrifugiert wurden. Mithilfe eines Laborglukosemessgerätes (Glucose Analyzer, Beckman Coulter GmbH, GER) wurde daraufhin die Glukosekonzentration im Blutplasma bestimmt. Um den Blutglukosespiegel der Ratte während des Experimentes auf euglykämischen Werten zu halten, wurde nun damit begonnen, eine Glukoselösung, entsprechend der gemessenen Blutglukosewerten und der eingestellten Insulininfusionsrate, zu infundieren. Dazu wurde der zweite Zugang zum Blutkreislauf der Ratte über einen flexiblen Schlauch an eine Peristaltikpumpe (Minipuls 3, Gilson, USA) angeschlossen, die mit unterschiedlichen Raten, Glukoselösung (0.5 g/ml) aus einem Reservoir in den Blutkreislauf der Ratte pumpte. Nach ca. 8 Stunden wurde der Versuch beendet und die Ratte durch eine Überdosis Thiopental euthanasiert. In Abbildung 25 ist der geplante Ablauf eines solchen Tierversuches dargestellt.



**Abb. 25: Ablauf der Tierversuche:** Zur Kontrolle des Blutzuckerspiegels wurden ca. alle 15-30min Blutproben entnommen und darin mithilfe eines Labormessgerätes die Glukosekonzentration bestimmt. Nach dem Setzen des Kontroll-Sensors und der Prototypen musste eine zweistündige Einlauf-Zeit abgewartet werden. Danach wurden die Sensoren kalibriert und über die Prototypen Insulin infundiert. Durch die an den vorherrschenden Blutzuckerspiegel angepasste Glukoseinfusion konnte die Insulinwirkung ausgeglichen und der Blutzuckerspiegel der Ratte geregelt werden.

## 2.7. Studie an gesunden Probanden

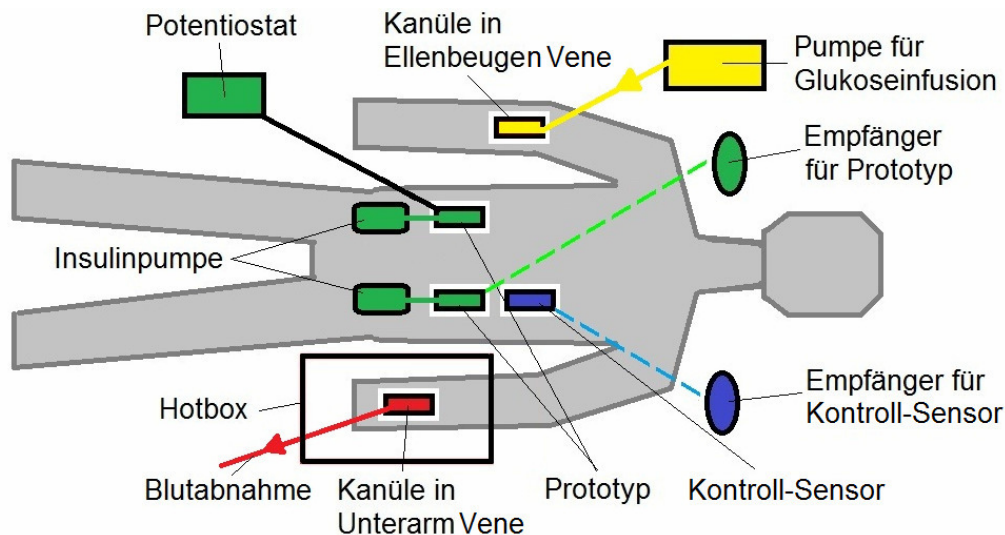
Da der geschaffene Prototyp der zweiten Generation (3.2.1. Der Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept B) nur geringfügige Modifikationen aufweist, welche die Sterilität und Biokompatibilität der zum Assemblieren verwendeten Infusionskanüle und des eingesetzten KmGs nicht beeinträchtigen, konnte dieser Prototyp auch direkt beim Menschen getestet werden. Vor allem die Auswirkungen von unterschiedlichen Insulin-Infusionsraten und unterschiedlich großen Insulin-Boli auf die Performance von Prototypen sollte bei den Versuchen an gesunden Probanden näher untersucht werden.

Dazu wurden Prototypen in das Fettgewebe eines gesunden Probanden eingebracht und mithilfe des originalen Transmitters oder eines Potentiostaten betrieben. Der Schlauch zu den Kanülen der Prototypen wurde an eine Insulinpumpe angeschlossen mit deren Hilfe Insulin mit unterschiedlichen Infusionsraten abgegeben werden konnte.

Um die Performance der Prototypen beurteilen zu können, wurde auch ein Kontroll-Sensor gesetzt, mit dessen Messwerten, die Messwerte der Prototypen verglichen werden konnten. Um die Messwerte der Prototypen weiters mit der tatsächlichen Blutglukosekonzentration des Probanden vergleichen zu können, wurde ein Zugang in die Unterarmvene des Probanden gelegt. Über diesen Zugang wurden laufend Blutproben entnommen in denen dann mithilfe eines Labormessgerätes die Blutzuckerkonzentration bestimmt wurde.

Um für diese Messung eine hohe Durchmischung von arteriellem mit venösem Blut zu erreichen, wurde der Arm des Probanden in eine auf 55°C eingestellte Hotbox gegeben. Am anderen Arm des Probanden wurde ein weiterer Zugang in die Ellenbogenvene gelegt. Über diesen Zugang wurde dann mithilfe einer Infusionspumpe eine Glukoselösung mit einer an die gemessenen Blutzuckerwerte und an die infundierte Insulinmenge angepassten Infusionsrate infundiert.

Der gesamte Versuchsaufbau ist schematisch in Abbildung 26 dargestellt.



**Abb. 26: Schematischer Aufbau des Versuches an gesunden Probanden:** Bei den Versuchen wurden zwei Prototypen gesetzt und mit Potentiostat oder mit Original-Transmitter und -Empfänger betrieben. Zusätzlich zu den Prototypen wurde ein Kontroll-Sensor gesetzt. Über Verweilkanülen in der Unterarmvene und in der Ellenbeugevene konnten einerseits Blutproben zur Bestimmung der Blutzuckerwerte genommen und andererseits die Glukoseinfusion zur Kontrolle des Blutzuckerspiegels durchgeführt werden. Um arterielles mit venösem Blut zu vermischen und um die Kanüle zur Blutabnahme in der Unterarmvene offen zu halten, befand sich der Arm des Probanden in einer auf 55°C eingestellten Hotbox. Die so gewonnenen Blutproben wurden mit einem Laborglukosemessgerät analysiert. Die erhaltenen Blutglukosewerte dienen als Referenzgröße für die Beurteilung der Messgenauigkeit der Sensoren der Prototypen als auch der Kontroll-Sensoren.

## 2.7.1. Protokoll zur Studie an gesunden Probanden

### 2.7.1.1. Voruntersuchung und Aufklärung der gesunden Probanden

Einige Tage vor dem Termin des Experimentes wurden die Probanden von einem Arzt über den geplanten Versuch und alle damit verbundenen Eingriffe und Risiken aufgeklärt. Im Anschluss an dieses klärende Gespräch mussten die Versuchspersonen eine Einverständniserklärung unterschreiben in der sie bestätigten, dass sie über Ziel, Dauer, Methode und Risiken des Experimentes aufgeklärt wurden und mit einer Durchführung des Versuches einverstanden sind. Danach wurden die Probanden einer medizinischen Voruntersuchung unterzogen, bei der ihre Eignung für den Versuch getestet wurde. Im Verlauf dieser Untersuchung wurden Daten über Alter, Gewicht, Größe, Blutdruck und derzeitige Erkrankungen mit dazugehöriger Medikation erhoben. Anschließend wurde eine Blutprobe abgenommen und für eine Routinediagnostik verwendet. Da schwangere Frauen nicht an der Studie teilnehmen durften, wurde bei weiblichen Probanden ein zusätzlicher Schwangerschaftstest durchgeführt.

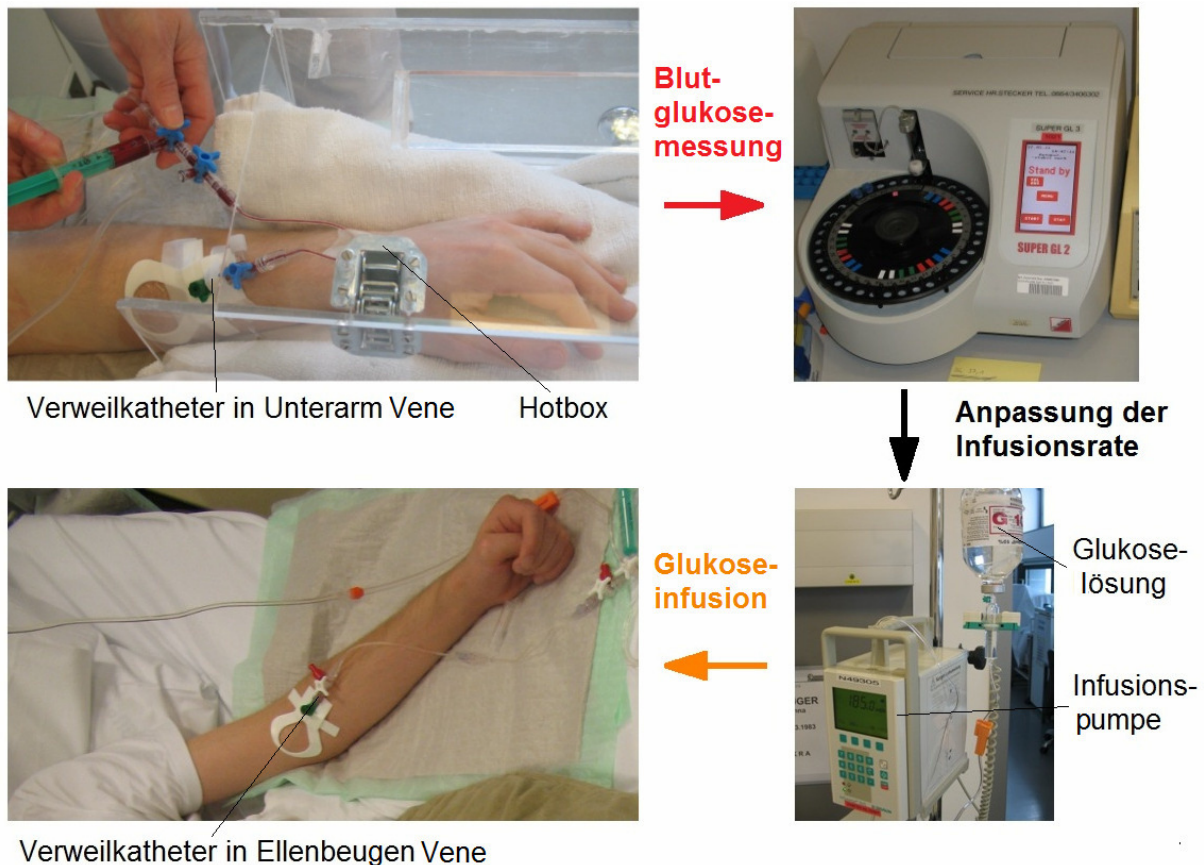
### *2.7.1.2. Zugänge zum Blutkreislauf der gesunden Probanden (Glucose-Clamp)*

Am Morgen des Studientages um 7:00 erschienen die Probanden im Studienraum. Sie sollten nüchtern erscheinen, das heißt, sie durften am Vorabend nach 23:00 keine Mahlzeit mehr zu sich genommen haben. Nach einer kurzen Ruhepause von ca. 15min wurde von medizinisch geschultem Personal eine Verweilkanüle (1,2mm x 40mm, TriCath, Codan Medizinische Geräte GmbH & Co KG, GER) in eine Unterarmvene eines Armes und eine weitere Verweilkanüle in die Ellenbeugenvene des zweiten Armes gelegt.

Über die Kanüle in der Unterarmvene wurden während des Versuches alle 15- 30min jeweils ca. 0,5ml Blut entnommen. Diese Blutproben wurden zentrifugiert (30s bei 8000U/min) und im gewonnenen Blutplasma wurde dann mit einem Labormessgerät (SuperGL, Dr.Müller Gerätebau GmbH, GER) die Blutglukosekonzentration bestimmt. Um zu verhindern, dass sich der Zugang zur Unterarmvene verschließt, wurde zwischen den Blutabnahmen ständig kleine Mengen von Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, Fresenius Kabi GmbH, GER) infundiert. Eine Arterialisierung des venösen Blutes wurde erreicht (es besteht ein Unterschied in der Blutglukosekonzentration von arteriellem und venösem Blut [26]), indem der Arm des Probanden in eine auf 55°C eingestellte Hotbox (Hotbox, Med. Universität Graz, AUT) gegeben wurde.

Die gemessenen Blutglukosewerte dienten als Referenz für die Beurteilung der Sensorperformance als auch für die Einstellung einer intravenösen Glukoseinfusion, mit der das Absinken des Blutglukosewertes des Probanden als Folge des über die Prototypen abgegebenen Insulins vermieden und ein Konstanthalten der Blutglukosekonzentration erreicht werden konnte. Die dazu verwendete Glukoselösung (10%, Glucosteril, Fresenius Kabi GmbH, GER) wurde mithilfe einer Infusionspumpe (Infusomat Space, B-Braun, GER) über die, in die Ellenbogenvene gelegte Verweilkanüle eingebracht. Diese angewandte Methode des Konstanthaltens des Blutzuckerspiegels wird als Glukose-Clamp bezeichnet [27]. In Abbildung 27 ist der Ablauf von Blutabnahme, Glukosebestimmung, Infusionsratenanpassung und Glukoseinfusion dargestellt.





**Abb. 27: Glukose-Clamp:** Um während des Versuches die Blutglukosekonzentration zu kontrollieren, wurde eine Verweilkanüle in eine Unterarmvene des Probanden eingebracht. Über diesen Zugang zum Blutkreislauf wurden alle 15- 30min Blutproben entnommen, in denen dann die Glukosekonzentration bestimmt wurde. Mithilfe einer Hotbox wurde dafür gesorgt, dass das abgenommene Blut arterialisiert war. Zum Ausgleich der Wirkung des über die Prototypen abgegebenen Insulins wurde Glukoselösung über eine in der Ellenbogenvene des Probanden gelegene Verweilkanüle infundiert.

### 2.7.1.3. Setzen der Prototypen und des Kontroll-Sensors bei gesunden Probanden

Nach dem Legen der Verweilkanülen wurden dann zwei Prototypen in das Bauchfettgewebe der Probanden gesetzt. Das Vorbereiten dieser Prototypen und die verwendeten Setzmethoden sind in Abschnitt 3.2.1.1. und 3.2.1.2. (Zusammenstellen und Setzen eines Prototyps) genau beschrieben. Nach dem Setzen wurden die Sensoren der Prototypen mit einem originalen Transmitter oder mit einem Potentiostaten (siehe auch Abschnitt 2.4.: Betreiben eines KmG's mit Potentiostat) kontaktiert und damit betrieben. Über Insulinpumpen, die an die Insulininfusionskanülen der Prototypen angeschlossen wurden, konnte dann Insulin mit unterschiedlichen Infusionsraten infundiert werden. Abbildung 28 zeigt die Anordnung der Prototypen und des Kontroll-Sensors bei einem gesunden Probanden.



**Abb. 28: Anordnung der Prototypen und des Kontroll-Sensors bei gesunden Probanden:** Die Prototypen und Kontroll-Sensor wurden ins Fettgewebe des Bauches der Probanden gesetzt. Der Kontroll-Sensor und die Sensoren der Prototypen wurden dann mit einem Potentiostat oder mit einem originalen Transmitter betrieben. Die Infusionskanülen der Prototypen waren über flexible Schläuche an Insulinpumpen angeschlossen mit deren Hilfe Insulin mit unterschiedlichen Raten infundiert wurde.

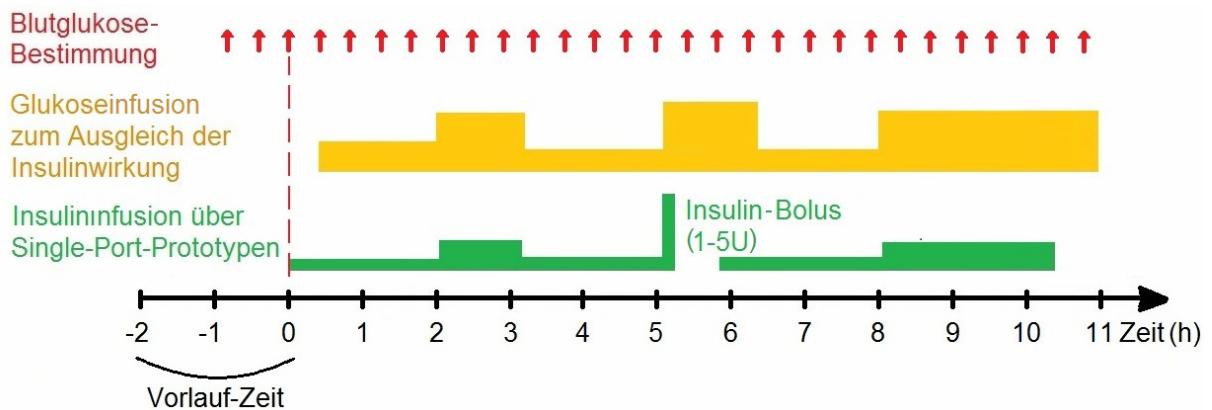
#### 2.7.1.4. Insulin Infusion und Sensorbetrieb bei gesunden Probanden

Zwei Stunden nach dem Setzen der Prototypen und des Kontroll-Sensors wurde ein Blutzuckerwert bestimmt und zur Kalibrierung der Prototypen- und Kontroll-Sensoren herangezogen. Danach wurde damit begonnen, Insulin mit unterschiedlichen Raten über die Prototypen abzugeben. Zu diesem Zweck wurden die gewünschten Insulininfusionsraten, an den Insulinpumpen, die mit den Insulininfusionskanülen der Prototypen verbunden waren, eingestellt. Insulin konnte so in der Form einer niederratigen Infusion (basale Infusionsrate) als auch in der Form einer kurzzeitigen, höherratigen Infusion (Bolus-Infusion) (Abb. 3C) über die Prototypen abgegeben werden. Zum Ausgleich der Wirkung des über die Prototypen abgegeben Insulins und zur Erzeugung hyperglykämischer Blutglukosewerte wurde Glukoselösung mit unterschiedlichen Raten intravenös infundiert.

Während der Versuchsdauer von 13 Stunden wurden laufend Blutzuckerwerte bestimmt und die Messsignale der Prototypen- und Kontroll-Sensoren aufgezeichnet. Am Ende des Versuches wurden die Venenkatheter, der Kontroll-Sensor und die Prototypen entfernt.



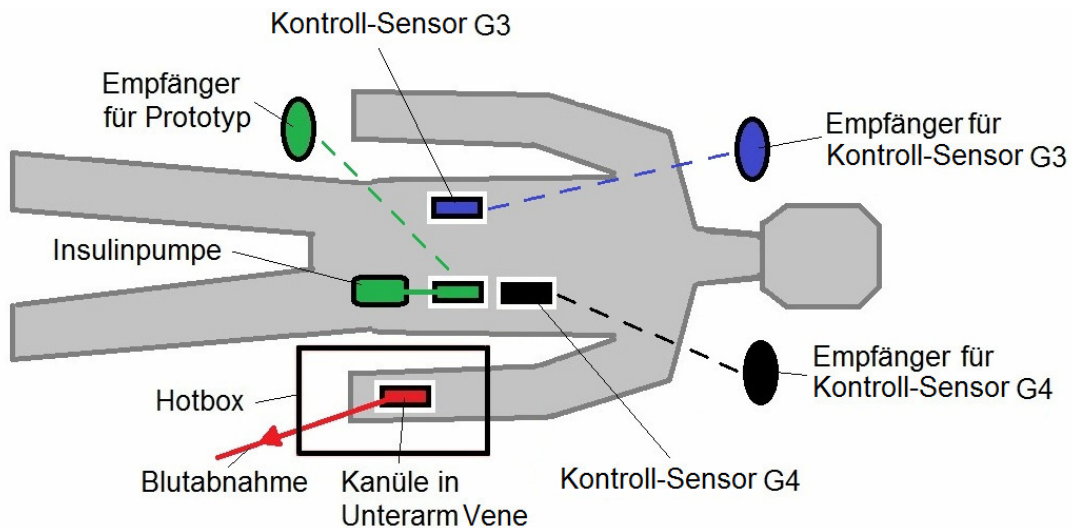
Vor dem Verlassen des Studienortes nahm der Proband eine Mahlzeit zu sich. In Abbildung 29 ist der Ablauf des Versuches an den gesunden Probanden dargestellt.



**Abb. 29: Ablauf der Studie an gesunden Probanden:** Zur Kontrolle des Blutzuckerspiegels wurden alle 30-15min Blutproben entnommen und darin mithilfe eines Labormessgerätes die Glukosekonzentration bestimmt. Nach dem Setzen des Kontroll-Sensors und der Prototypen musste eine zweistündige Einlauf-Zeit abgewartet werden. Danach wurden der Kontroll-Sensor und die Prototypen-Sensoren kalibriert und über die Prototypen wurde Insulin infundiert. Durch die an den Blutzuckerspiegel und an die Insulininfusionsrate angepasste Glukoseinfusion konnte die Insulinwirkung ausgeglichen und der Blutzuckerspiegel auf dem gewünschten Niveaugehalten werden. Nach insgesamt 13 Stunden wurde der Versuch beendet.

## 2.8. Studie bei Probanden mit Typ 1 Diabetes

Ziel dieser Studie war es, den geschaffenen Prototypen bei Typ 1 Diabetikern anzuwenden und dabei die Durchführbarkeit der gleichzeitigen Insulinzufuhr und Glukosemessung zu testen. Bei der Studie sollte Insulin während einer 10-stündigen Fastenphase in Form einer basalen Insulininfusion und vor der Einnahme einer Standard-Glukoselösung (Oraler Glukosetoleranztest) in Form eines Boluses über den Prototyp verabreicht werden. Die Messwerte des Prototyp-Sensors wurden bei dieser Studie mit den Blutzuckermesswerten und den Messwerten zweier Kontroll-Sensoren unterschiedlicher Generation (Dexcom KMG´s der Generation 3 und 4) verglichen. Zur Messung der Blutzuckerkonzentration wurden laufend Blutproben über einen Zugang in einer Unterarmvene entnommen und darin die Glukosekonzentration bestimmt. Auch die Hotbox zum Arterialisieren des Blutes wurde wieder eingesetzt. Um sicher zu stellen, dass die Regulierung des Blutzuckerspiegels zur Gänze durch das über den Prototypen zugeführte Insulin erfolgte, wurden für diese Versuche Diabetiker herangezogen, die keine eigene Insulinsekretion besaßen (C-Peptid-negativ). Während der Versuche wurden allfällige Unterzuckerungen durch zusätzliche Einnahme einer Glukoselösung vermieden. In Abbildung 30. ist der prinzipielle Versuchsaufbau schematisch dargestellt.



**Abb. 30: Schematischer Aufbau des Versuches an Probanden mit Typ 1 Diabetes:** Bei den Versuchen wurde ein Prototyp gesetzt und mit einem originalen Transmitter betrieben. Zusätzlich wurden zwei Kontroll-Sensoren unterschiedlicher Generation gesetzt. Über eine Verweilkanüle in der Unterarmvene wurden Blutproben zur Bestimmung der Blutzuckerkonzentration des Probanden gewonnen. Die Blutzuckermesswerte dienten als Referenzgröße für die Bewertung der Performance des Prototypen- und der Kontroll-Sensoren als auch zum Anpassen der Insulininfusionsrate. Um arterielles mit venösem Blut zu vermischen und um die Kanüle zur Blutabnahme in der Unterarmvene offen zu halten, befand sich der Arm des Probanden in einer auf 55°C eingestellten Hotbox.

## 2.8.1. Protokoll zur Studie an Probanden mit Typ 1 Diabetes

### 2.8.1.1. Voruntersuchung und Aufklärung der Probanden mit Typ 1 Diabetes

Die Probanden mit Typ 1 Diabetes wurden, gleich wie die gesunden Probanden, über Zweck und Risiken der Studie aufgeklärt. Zusätzlich zu den Daten die bei der Routineuntersuchung von gesunden Probanden erhoben wurden, wurden bei den Probanden mit Typ 1 Diabetes auch der C-Peptid-Wert und der HbA<sub>1c</sub>-Wert bestimmt. Der C-Peptid-Wert ist direkt proportional zur endogenen Insulinproduktion. Lag dieser Wert über einem bestimmten Schwellwert (50 pmol/l), wurde der Diabetiker nicht in die Studie eingeschlossen.

Der HbA<sub>1c</sub>-Wert gibt Auskunft über die Menge von Glukose die sich mit der Zeit an das Hämoglobin im Blut des Diabetikers gebunden hat. Dieser Wert ist daher ein Marker für die Fähigkeit des Diabetikers seinen Blutzucker im normoglykämischen Bereich von 70mg/dl bis 120mg/d zu halten. Ein zu hoher HbA<sub>1c</sub>-Wert (über 10%) war ein Ausschlusskriterium für die Studie.

### *2.8.1.2. Zugänge zum Blutkreislauf der Probanden mit Diabetes Typ 1*

Die Probanden erschienen am Abend um 21:30 am Studienort. Sie wurden gebeten an diesem Abend ihre letzte Mahlzeit bis spätestens 20 Uhr zu sich zu nehmen. Probanden, die nicht die Insulinpumpentherapie (Abschnitt 1.1.2) einsetzten, sondern ihren Blutzucker mit subkutanen Injektionen von schnell- und langsam wirkenden Insulinen (Abschnitt 1.1.1) regeln, verzichteten auf die normalerweise abendliche Injektion von langsam wirkendem Insulin. Dies war nötig, um während des Versuches kein Depot-Insulin mehr im Körper zu haben. Nach einer Ruhepause von ca. 15min bekamen die Probanden eine Verweilkanüle (1,2mm x 40mm, TriCath, Codan Medizinische Geräte Gmb&Co KG, GER) in eine Vene des Unterarmes gesetzt (Abb. 31) die, wie bei den gesunden Probanden, während des Versuches alle 15- 30min zum Abnehmen von Blutproben verwendet wurde (Abb. 27).

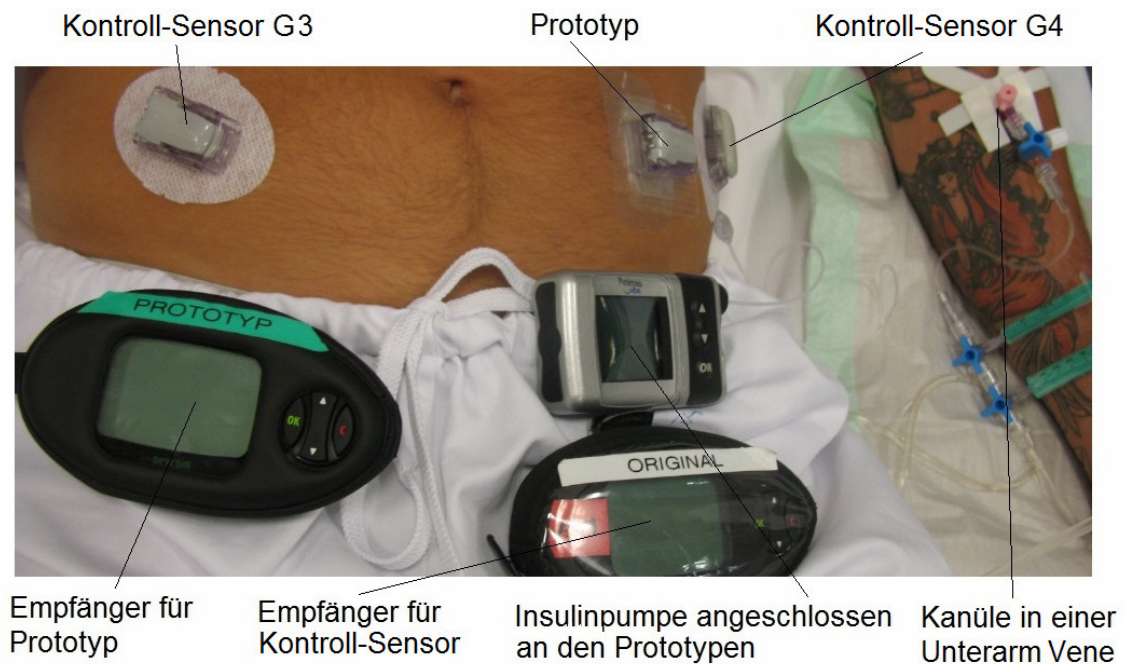
Die Hotbox wurde hierbei wiederum zur Arterialisierung des abgenommenen Blutes verwendet. Die abgenommenen Blutproben wurden zentrifugiert, und die Glukosekonzentration wurde im gewonnenen Blutplasma gemessen.

### *2.8.1.3. Setzen der Prototypen und der Kontroll-Sensoren bei Probanden mit Typ 1 Diabetes*

Nach dem Legen der Verweilkanüle zur Blutabnahme, wurde ein Prototyp, wie in Abschnitt 3.2.1.1. und 3.2.1.2. beschrieben (Zusammenstellen und Setzen eines Prototyps), in das Bauchfettgewebe des Probanden gesetzt. Die Insulininfusionskanüle des Prototyps wurde an eine Insulinpumpe angeschlossen. Der Sensor im Prototypen wurde mit einem Transmitter kontaktiert und betrieben.

Zusätzlich zu dem Prototypen wurden zwei originale Sensoren der Firma Dexcom gesetzt. Auf einer Seite des Bauches wurde ein Dexcom Sensor der dritten Generation (G3) (der gleiche KMG wird auch in den Prototypen verwendet) und auf der anderen Seite des Bauches wurde das neueste Sensorsystem von Dexcom (G4) positioniert. Bei diesem neueren Sensorsystem werden die gemessenen Glukosewerte nicht an einen normalen Empfänger sondern an eine Insulinpumpe übertragen. Diese Insulinpumpe kann wie eine gewöhnliche Insulinpumpe verwendet werden, zusätzlich können aber auch die gemessenen Glukosewerte des Sensors (G4) angezeigt und gespeichert werden.

Abbildung 31 zeigt die Anordnung des Prototyps und der Kontroll-Sensoren bei einem Probanden mit Diabetes Typ1.



**Abb. 31: Anordnung des Prototyps und der Kontroll-Sensoren bei Probanden mit Typ 1 Diabetes:** Der Prototyp wurde in das Fettgewebe am Bauch des Probanden gesetzt. Die Insulininfusionskanüle des Prototyps wurde an eine Insulinpumpe angeschlossen, der Prototyp-Sensor wurde mithilfe eines Transmitters betrieben. Ein Kontroll-Sensor der dritten (G3) und vierten (G4) Dexcom-Generation wurden für Vergleichszwecke zusätzlich in das Unterhautfettgewebe am Bauch des Probanden eingesetzt.

#### 2.8.1.4. Insulininfusion und Sensorbetrieb bei Probanden mit Typ 1 Diabetes

Zwei Stunden nach dem Setzen der Sensoren und des Prototyps (um 00:30) wurde ein Blutzuckerwert gemessen und zur Kalibrierung der Kontroll-Sensoren und des Sensors des Prototyps herangezogen. Nach dieser Kalibrierung wurden die Messwerte der jeweiligen Sensoren am Display ihres Empfängers angezeigt und gespeichert. Über die an den Prototypen angeschlossene Insulinpumpe wurde dann Insulin in Abhängigkeit des Insulinbedarfs des Diabetikers infundiert. Durch diese variable Insulininfusion konnte über Nacht die Blutglukosekonzentration des Diabetikers auf euglykämische Werte gebracht und dort gehalten werden.

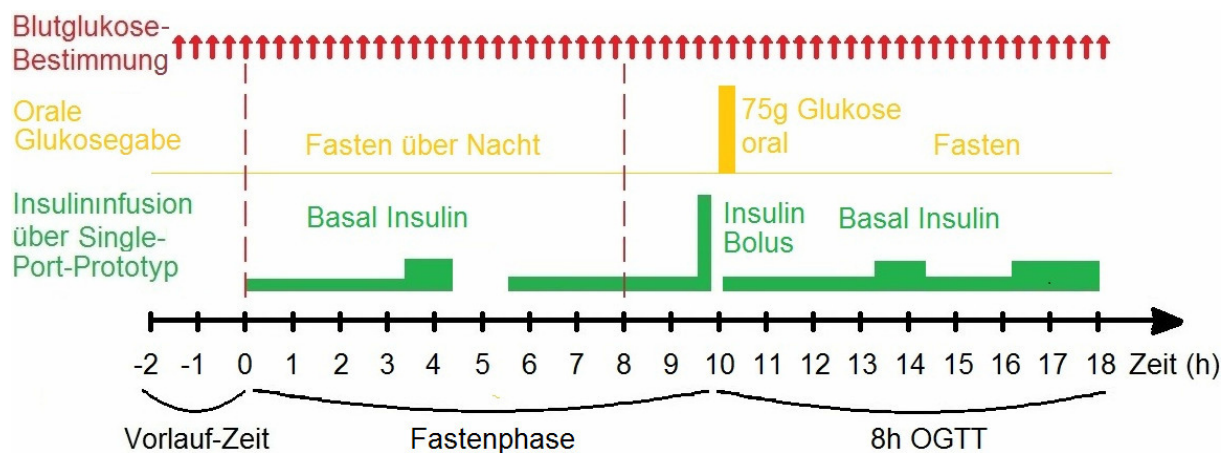
Am Morgen des Versuchstages (um 8:30) wurden die Sensoren ein weiteres Mal auf den vorherrschenden Blutglukosewert kalibriert. Nach einer 2-stündigen basalen Phase wurde ein oraler Glukose-Toleranz-Test (OGTT) durchgeführt. Für diesen standardisierten Test [28] mussten die Probanden eine Glukose-hältige Lösung (75g, glucoral-75-citron, Germania Pharmazeutika, AUT) trinken.

Um den durch die aufgenommene Glukosemenge verursachten Anstieg der Blutglukosekonzentration des Probanden abzufangen und die Blutglukosekonzentration

wieder auf euglykämischen Werte zu bringen, wurde ungefähr zwanzig Minuten vor der Einnahme der Glukoselösung ein Insulinbolus über den Prototypen abgegeben. Die bei diesem Bolus verabreichte Insulinmenge wurde über die Insulinsensitivität des Probanden errechnet. Während des OGTTs wurde die basale Insulininfusion fortgeführt und die Infusionsrate so angepasst, dass am Ende des Versuches (um ca. 18:30) der Proband stabile, euglykämische Blutzuckerwerte erreichte.

Am Ende des Versuches wurde Venenkanüle, Prototyp und Kontroll-Sensoren entfernt. Vor dem Verlassen des Studienzentrums nahmen die Probanden eine Mahlzeit zu sich.

In Abbildung 32 ist der Ablauf des Versuches an Probanden mit Typ 1 Diabetes dargestellt.



**Abb. 32: Ablauf der Studie bei Probanden mit Typ 1 Diabetes:** Zur Kontrolle des Blutzuckerspiegels wurde während des Versuches alle 15-30min Blutproben entnommen und darin mithilfe eines Labormessgerätes die Glukosekonzentration bestimmt. Nach dem Setzen der Kontroll-Sensoren und des Prototypen musste eine zweistündige Einlauf-Zeit abgewartet werden. Danach wurden die Kontroll-Sensoren und der Prototyp-Sensor kalibriert. Während einer darauf folgenden Fastenphase von 10 Stunden und eines 8-stündigen OGTTs wurde mit dem Prototypen Glukose gemessen und gleichzeitig Insulin mit variablen Raten infundiert. Die Insulininfusionsrate wurde an den vorherrschenden Blutzuckerspiegel, an die am Anfang des OGTTs aufgenommene Glukosemenge und an die Insulinsensitivität des Probanden angepasst. Dadurch konnte die Blutzuckerkonzentration während der Fastenphase und des OGTTs auf euglykämische Werte gebracht und dort gehalten werden..

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Auswahl des am besten zu realisierenden Singleport-Konzeptes

#### 3.1.1. Genauigkeit der zur Realisierung verwendeten Sensoren

Kürzlich durchgeführte Studien [18, 19, 20] bescheinigen dem Sensorsystem von Abbott eine höhere Genauigkeit (mittlere absolute relative Differenz von 11,8% bis 16,1%) als dem System von Dexcom (mittlere ARD 16,7% bis 16,8%) und dem System von Medtronic (mittlere ARD von 19,9% bis 20,2%). Aufgrund dieser Literaturdaten ergibt sich folgende Gewichtung der Sensorgenauigkeit der am Markt befindlichen Sensorsysteme:

**Abbott > Dexcom > Medtronic**

#### 3.1.2. Stabilität und Linearität der Sensoren in Insulinflüssigkeiten

Die in vitro Versuche zum Langzeiteinfluss von Insulin auf die Sensoren (Abschnitt 2.5.2.1) ergaben, dass jedes der drei Sensorsysteme die Glukosekonzentration (200mg/dl) in den schnellwirksamen Insulinflüssigkeiten von Lilly und Novo über 12 Stunden lang stabil messen konnte. Es waren keine größeren Drifts oder Sprünge in den Signalen zu erkennen (Abb. 33). Man kann also davon ausgehen, dass die Insulinflüssigkeiten die Sensoren über längere Zeiträume nicht negativ beeinflussen.

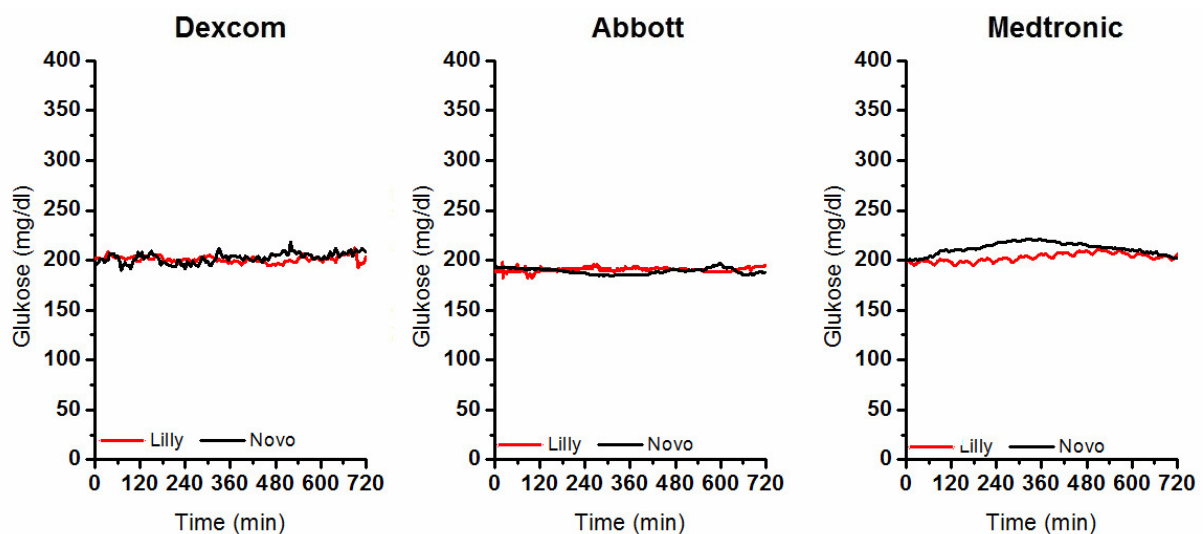
Die Versuche zur Sensorlinearität in Insulinflüssigkeiten (Abschnitt 2.5.2.3) zeigten für jedes der Sensorsysteme eine hohe Linearität (Abb. 34A). Um dies zu veranschaulichen, wurde jeweils eine lineare Regression durchgeführt. Dazu wurden die „steady state“-Stromwerte der einzelnen Glukoseniveaus (Werte der letzten 20min jedes Konzentrationsniveaus) gemittelt. Durch diese Mittelwerte wurde dann eine Regressionsgerade gelegt (Abb. 34B). Man kann erkennen, dass die Regressionsgerade den Werteverlauf sehr gut repräsentiert. Dies drückt sich auch in einem hohen Wert des errechneten Bestimmtheitsmaßes (nahe 1) aus. Ein interessantes Detail ist, dass der Sensor der Firma Medtronic Ströme liefert, die im Vergleich zu den anderen Sensorsystemen um den Faktor 10 höher liegen.

Die Sensorsignalverläufe die während der Präsentation von Insulinflüssigkeiten mit unterschiedlichen Konservierungsstoffkonzentrationen (Abschnitt 2.5.2.3) aufgezeichnet wurden, sind in Abbildung 35 dargestellt. Man kann erkennen, dass beim Übergang von einer

Lösung mit niedriger Konservierungsstoffkonzentration zu einer Lösung mit höherem Konservierungsstoffgehalt keine Veränderung in den vom Sensor erzeugten Strömen auftritt. Die drei Sensorsysteme zeigten für die Insulinflüssigkeiten der Firma Novo als auch für die der Firma Lilly ein vergleichbares Verhalten.

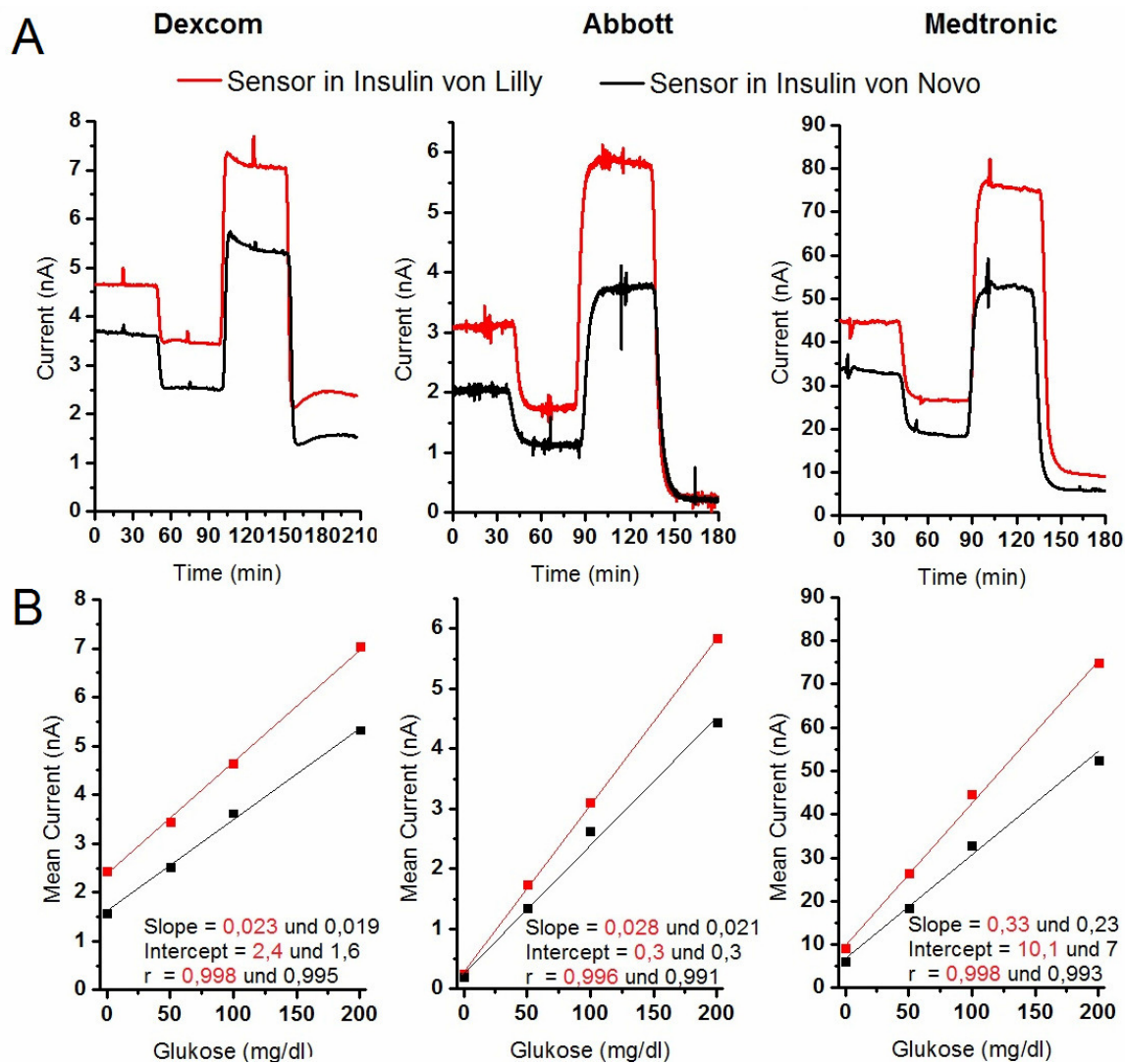
Da alle Sensoren in Insulinflüssigkeit sensitiv, langzeitstabil und linear arbeiteten und weiters kein Einfluss der Lösungsmittel m-Cresol und Phenol zu erkennen war, ergab sich eine gleichwertige Beurteilung der Sensorsysteme bezüglich des Sensorverhaltens in Insulinflüssigkeiten:

### Abbott = Dexcom = Medtronic



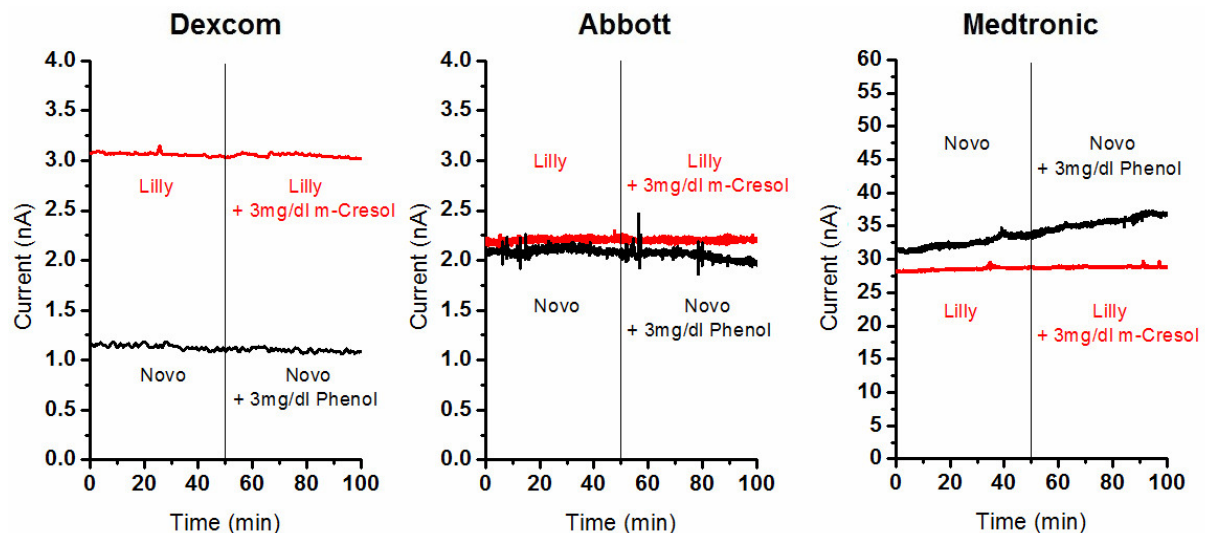
**Abb. 33: Ergebnisse der in vitro Versuche zum Langzeiteinfluss von Insulinflüssigkeit auf die Sensoren:** Gemessene Glukosewerte der Sensorsysteme von Dexcom, Abbott, und Medtronic in Insulinflüssigkeiten der Firmen Lilly und Novo, die mit einer Glukosekonzentration von jeweils 200mg/dl versehen waren. Alle Sensorsysteme lieferten stabile Glukosewerte über den 12-stündigen Versuchszeitraum.





**Abb. 34: Ergebnisse der Untersuchung der Linearität von Sensoren in Insulinflüssigkeiten:** A) Beobachteter Sensorverlauf bei Präsentation der Insulinflüssigkeiten von Lilly und Novo mit Glukosekonzentrationen von 100mg/dl, 50mg/dl, 200mg/dl und 0mg/dl. Man erkennt, dass sich die Sensorströme schnell an die Glukosekonzentration anpassen und Änderungen gut folgen. B) Lineare Regressionsanalyse der von den unterschiedlichen Glukoseniveaus erzeugten „steady state“-Stromwerte. Alle Werte liegen nahe an der Regressionsgerade. Die hohe Linearität spiegelt sich auch in dem hohen Wert des Bestimmtheitsmaßes wieder (nahe 1)





**Abb. 35: Ergebnisse der Untersuchung des Einflusses von wechselnder Konservierungsstoffkonzentration:** Beobachtete Sensorstromverläufe bei einem Wechsel von Insulinflüssigkeit der Firma Lilly von normaler auf eine um 3mg/dl erhöhte m-Cresolkonzentration (rot). Weiters ist der Übergang von Insulinflüssigkeit der Firma Novo von normaler auf eine um 3mg/dl erhöhte Phenolkonzentration gezeigt (schwarz). Es ist deutlich zu sehen, dass der Sensorstrom jedes Sensorsystems nach einer Änderung der Konservierungsstoffkonzentration unverändert bleibt.

### 3.1.3. Verfügbarkeit der Sensoren für die Realisierung der Single-Port-Konzepte

Die Firma Abbott hat 2010 auf Grund von Fertigungsproblemen den Vertrieb ihres Sensorsystems eingestellt. Als die Probleme auch im darauf folgenden Jahr nicht gelöst wurden, kündigte Abbott den vollständigen Stopp des Vertriebs in den USA an [19, 20]. Aufgrund dieser Entwicklung wurde das Risiko einer Produktionseinstellung des Sensorsystems von Abbott auch für Europa höher bewertet als bei den Firmen Dexcom und Medtronic. Die Reihung der Sensorsysteme bezüglich des Kriteriums der Sensorverfügbarkeit ergab sich daher mit:

**Dexcom = Medtronic > Abbott**

### 3.1.4. Interesse des Sensorherstellers an einer Kooperation

In den letzten zwei Projektjahren hat die Firma Dexcom ein hohes Interesse an einer Realisierung eines Single-Port-Systems gezeigt. Als einer der ersten Schritte einer möglichen Kooperation wurde ein Lieferabkommen unterzeichnet, das den Erwerb der Sensorsysteme zu deutlich günstigeren Preisen ermöglichte. Vor Beginn des EU-Projektes

„AP@Home“ wurden allerdings auch Studien in Kooperation mit Abbott durchgeführt. Dieser Partner zog sich aber aufgrund der erwähnten Produktionsprobleme von einer weiteren Kooperation zurück. Die Firma Medtronic hatte nie besonderes Interesse an einer Kooperation gezeigt. Daher ergab sich folgende Bewertung:

**Dexcom > Abbott > Medtronic**

### 3.1.5. Kompatibilität von Sensorsetzmethode und Kanülensetzmethode

In Abschnitt 1.1.4 wurde erläutert, wie eine Insulininfusionskanüle und ein KMG der Firma Dexcom in das Fettgewebe eines Diabetikers eingebracht wird (Abb. 6). Im Gegensatz zu der, im Querschnitt O-förmigen Setznadel des Dexcom Systems, verwenden Abbott und Medtronic eine V-förmige bzw. C-förmige Setznadel. Durch diese längsseitig offenen Setznadeln könnte eine Insulininfusionskanüle, in der eine solche Nadel für eine Single-Port-Anordnung platziert werden müsste, beschädigt werden. Der Außendurchmesser der O-förmigen Dexcom Setznadel stimmt auch weitgehend mit dem Innendurchmesser einer Insulininfusionskanüle überein. Dies erlaubt es, einen Prototyp nach dem Singleportkonzept B (Abb. 9B) zu bauen, bei dem die Setznadel von Dexcom gleichzeitig zum Einbringen des Sensors und der Insulininfusionskanüle verwendet werden kann. Bei dieser Art der Sensorplatzierung ist der Sensor während des Setzvorganges durch die Nadel mechanisch geschützt. Da der Sensor bei der Realisierung nach Single-Port-Konzept A (Abb. 9A) durch die Wand der doppellumigen Kanüle nicht vollständig abgedeckt wird, ist der Sensor bei diesem Realisierungskonzept Reibungskräften ausgesetzt, die ihn während des Setzens beschädigen können (Abb. 9A, 9B). Bei Single-Port-Konzept C (Abb. 9C) ist der Sensor im Lumen der Insulininfusionskanüle platziert. Beim Setzen können daher die Reibungskräfte nicht direkt auf den Sensor einwirken. Bei der Realisierung des Single-Port-Konzeptes C wäre es jedoch wiederum günstig, den Dexcom-Sensor aufgrund der ähnlichen Geometrie von Sensorsetznadel und Infusionskanülensetznadel zu verwenden.

Hinsichtlich des Kriteriums der Kompatibilität von Sensorsetz- und Kanülensetzmethode ergab sich aus den oben genannten Gründen folgende Reihenfolge für die Sensorsysteme und Single-Port-Konzepte:

**Dexcom > Abbott = Medtronic**

**Single-Port-Konzept B = Single-Port-Konzept C > Single-Port-Konzept A**

### 3.1.6. Kompatibilität von Sensorbetrieb und Insulinpumpenbetrieb

Die Betriebsarten einer Insulinpumpe (Infusion mit basalen Raten und Bolusgabe) wurden in Abschnitt 1.1.2 erläutert. Für die derzeit am Markt erhältlichen Pumpen war es bisher nicht notwendig von einem Infusionsbetrieb auf einen Ansaugbetrieb umzuschalten, da nur Insulin mit unterschiedlichen Raten infundiert werden muss. Bei Single-Port-Konzept C (Abb. 9C) ist der Sensor allerdings im Inneren der Kanüle platziert und dadurch nicht direkt der ISF ausgesetzt. Es ist daher nötig, vom Pumpbetrieb auf einen Saugbetrieb zu wechseln, um ISF zum Sensor zu transportieren und eine Glukosemessung durchzuführen.

Die dazu notwendige Manipulation an der Insulinpumpe (bidirektionale Pumpe) würde die Entwicklungskosten für ein Singleportkonzept C deutlich erhöhen. Bei Singleportkonzept A und B ist der Sensor direkt der ISF ausgesetzt. Für diese Single-Port-Konzepte könnten deshalb die am Markt erhältlichen Insulinpumpen herangezogen werden. Es würden also keine zusätzlichen Entwicklungskosten für deren Relisierung entstehen. Aufgrund dieser Betrachtungen ergab sich folgende Bewertung der Single-Port-Konzepte:

**Single-Port-Konzept A = Single-Port-Konzept B > Single-Port-Konzept C**

### 3.1.7. Möglichkeit der Kalibrierung der Sensoren mithilfe der Insulinflüssigkeit

Bei Single-PortKonzept A und B kommt der KmG nicht direkt in Kontakt mit der infundierten Insulinflüssigkeit. Nur beim Single-Port-Konzept C wird die Insulinflüssigkeit direkt über den Sensor gepumpt (Abb. 9).

Versieht man die Insulinflüssigkeit mit einer bestimmten Glukosekonzentration (z.B.: 100mg/dl) könnte man bei diesem Single-Port-Konzept während des Insulininfusionsbetriebes eine Kalibrierungen durchführen. Dies würde die Notwendigkeit des Bestimmens der Glukosekonzentration in einem Bluttröpfchen zu Sensorkalibrierung hinfällig machen und so eine deutlich höhere Anwenderfreundlichkeit und Sensorgenauigkeit ermöglichen.

Für dieses Kriterium ergab sich daher folgende Reihung:

**Single-Port-Konzept C > Single-Port-Konzept A = Single-Port-Konzept B**

### 3.1.8. Entscheidungsfindung bei der Wahl des Sensorsystems und Single-Port-Konzeptes

Zur leichteren Entscheidungsfindung wurden die einzelnen Sensorsysteme und Single-Port-Konzepte mit Punkten bewertet. Für jedes Kriterium wurden hierbei 0 bis 2 Punkte verteilt (2 Punkte für das am besten, 1 Punkt für das mittelmäßig und 0 Punkte für das am schlechtesten geeignete System bzw. Konzept). Die Ergebnisse dieser Bewertung sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 zusammengefasst.

**Tabelle 1: Bewertung der Sensorsysteme**

<b>Kriterium</b>	<b>Dexcom</b>	<b>Abbott</b>	<b>Medtronic</b>
<b>Sensor Genauigkeit</b>	1	2	0
<b>Wirkung von Insulin</b>	2	2	2
<b>Sensor Verfügbarkeit</b>	2	0	2
<b>Kooperationswille</b>	2	1	0
<b>Punktesumme</b>	<b>7</b>	<b>5</b>	<b>4</b>

**Tabelle 2: Bewertung der Single-Port-Konzepte**

<b>Kriterium</b>	<b>Konzept A</b>	<b>Konzept B</b>	<b>Konzept C</b>
<b>Setzmethode</b>	0	2	2
<b>Pumpenbetrieb</b>	2	2	0
<b>Kalibrierung in Insulin</b>	0	0	2
<b>Punktesumme</b>	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

Die erhaltene Punkteverteilung legt es nahe, für die Fertigung der Prototypen der zweiten Generation den KmG von Dexcom zu verwenden. Weiters ist ersichtlich, dass die Zusammenlegung von Glukosemessung und Insulingabe nach dem Singleportkonzept B und C (Abb. 9) erfolgen sollte. Es wurde daher beschlossen, Prototypen der zweiten Generation mit dem Dexcom Sensor einmal nach Singleportkonzept B und einmal nach Singleportkonzept C zu fertigen.

## 3.2. Realisierung von Prototypen der 2. Generation

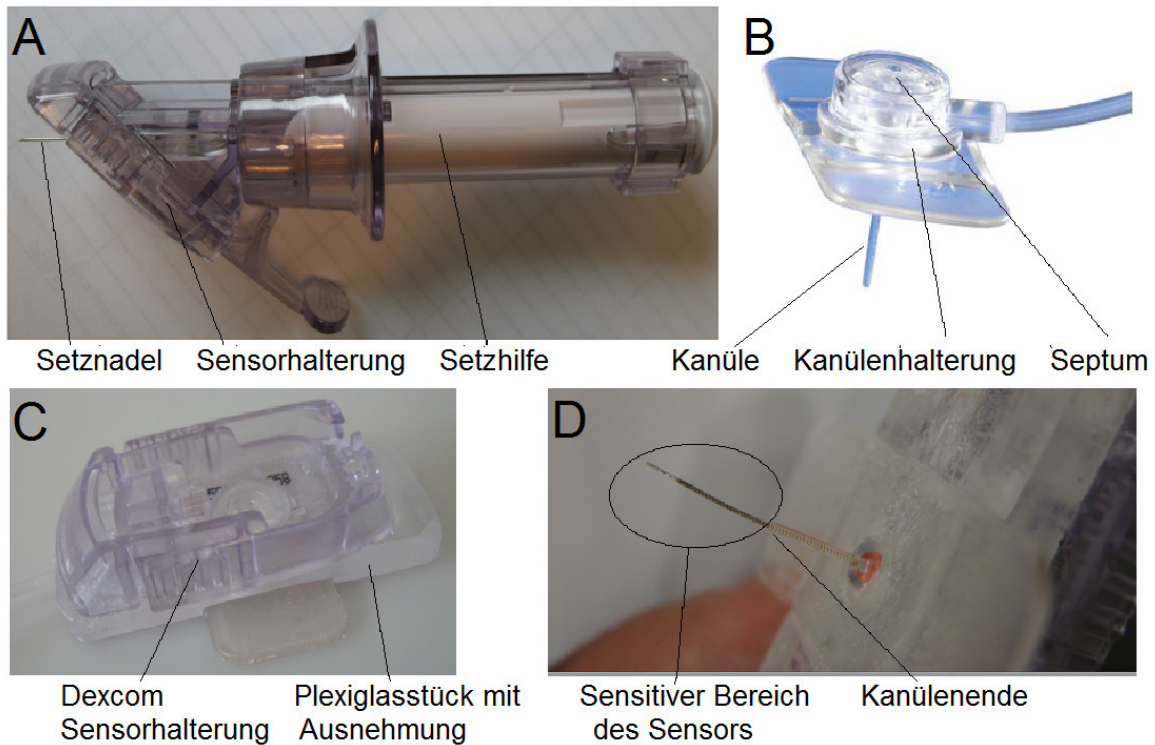
### 3.2.1. Der Prototyp der 2. Generation nach Singleportkonzept B

Für die Realisierung des Prototyps nach Singleportkonzept B wurde eine am Markt erhältliche Infusionskanüle gefunden (SOF-SET MICRO QR 6mm, Medtronic MiniMed, USA; Abb. 36B), die es erlaubte, die Sensorsetznadel des Dexcom-Systems der 3. Generation (Seven Plus continuous glucose monitoring system, Dexcom, USA; Abb. 4 und 36A) für das gleichzeitige Setzen von Sensor und Infusionskanüle zu verwenden.

Dies war möglich, da die Setznadel des Dexcom-Systems den gleichen Außendurchmesser besitzt wie die Setznadel der Insulininfusionskanüle und die Infusionskanülenlänge im passenden Verhältnis zur Länge des Sensors steht.

Weiters wurde ein Verbindungsstück gebaut, das den Sensor während des Setzvorganges in der Kanüle so positioniert, dass der Sensor mit seinem gesamten sensitiven Teil (d.h., der Glukoseoxidase-beschichtete Bereich der Working-Elektrode und der mit Silberchlorid beschichtete Bereich der Counter-Elektrode; Abb.5A und 5B) über das Ende der Kanüle hinausragt (Abb. 36D).

Für die Fertigung dieses Verbindungsstückes wurde die Dexcom-Sensorhalterung (Abb. 5C) mit Superkleber (Cyanolit, Panacol Elosol GmbH, GER) auf eine Plexiglasplatte aufgeklebt, die vorher mit einer Ausnehmung versehen worden war, in der die Infusionskanülenhalterung durch eine Druckpassung fixiert werden kann (Abb. 36C). Durch eine weitere Ausnehmung in der Plexiglasplatte kann der Schlauch des Insulininfusionssets bis zur Insulinpumpe geführt und dort mit dem Insulinreservoir verbunden werden.



**Abb. 36: Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept B:** **A)** Dexcom Seven Plus Glukosesensor (G3) mit Setzapparat. Der Sensor befindet sich im Ausgangszustand noch im Inneren der Setznadel und wird erst während des Setzvorganges freigelegt. **B)** Medtronic-Insulininfusionskanüle deren Setznadel den gleichen Durchmesser wie die Setznadel des Dexcom Sensors besitzt und daher durch diese ersetzt werden kann. **C)** Als Verbindungsstück für Sensor und Kanüle wurde eine Dexcom-Sensorhalterung auf ein Plexiglasplättchen aufgeklebt. In diesem Verbindungsstück befindet sich eine Ausnehmung, in der die Infusionskanülenhalterung durch eine Druckpassung fixiert werden kann. **D)** Bei diesem Prototyp kann der Sensor innerhalb der Insulininfusionskanüle so positioniert werden, dass sein gesamter sensitiver Bereich über das Kanülenende hinausragt.

### 3.2.1.1. Zusammenbau des Prototyps der zweiten Generation nach Singleportkonzept B

Um den Prototypen unter sterilen Bedingungen einsatzbereit zu machen wurde folgende Prozedur entwickelt:

Alle benötigten Werkzeuge sowie ein Stück einer 0.5mm Nadel werden in einem Autoklaven bei 134°C fünf Minuten lang mit Trockenvakuum sterilisiert. Kurz vor dem Setzen des Prototyps wird dieser in einem Laminar-Flow-Gerät steril zusammengebaut.

Dazu wird die Verpackung eines Insulininfusionskanülensets geöffnet und der Infusionsschlauch wird 15cm vor dem Ende der Kanülenhalterung mit einem Skalpell abgeschnitten (Abb. 37A). Die Kanülensetznadel wird dann aus dem Septum herausgezogen und der Infusionsschlauch durch die Längsbohrung des Kontaktstückes gefädelt (Abb. 37B). Danach wird die Kanülenhalterung in die Ausnehmung des Kontaktstückes gepresst und

somit fixiert (Abb. 37C). Das abgeschnittene Ende des Schlauches wird unter Verwendung des 0.5mm-Nadelstückes mit dem Schlauch einer Insulinpumpe (MiniMed Paradigm, Medtronic, USA) verbunden. Mithilfe der Insulinpumpe wird der Infusionsschlauch vollständig mit Insulin gefüllt (Abb. 37D). Im nächsten Schritt wird die Dexcom-Sensorpackung geöffnet und der Sensor samt Setzhilfe entnommen. Die Setzhilfe wird von der Sensorhalterung gelöst (Abb. 37E). Dabei ist darauf zu achten, dass die Kontaktgeleeplatte (Abb. 37F) auf der Setznadelhülse verbleibt.

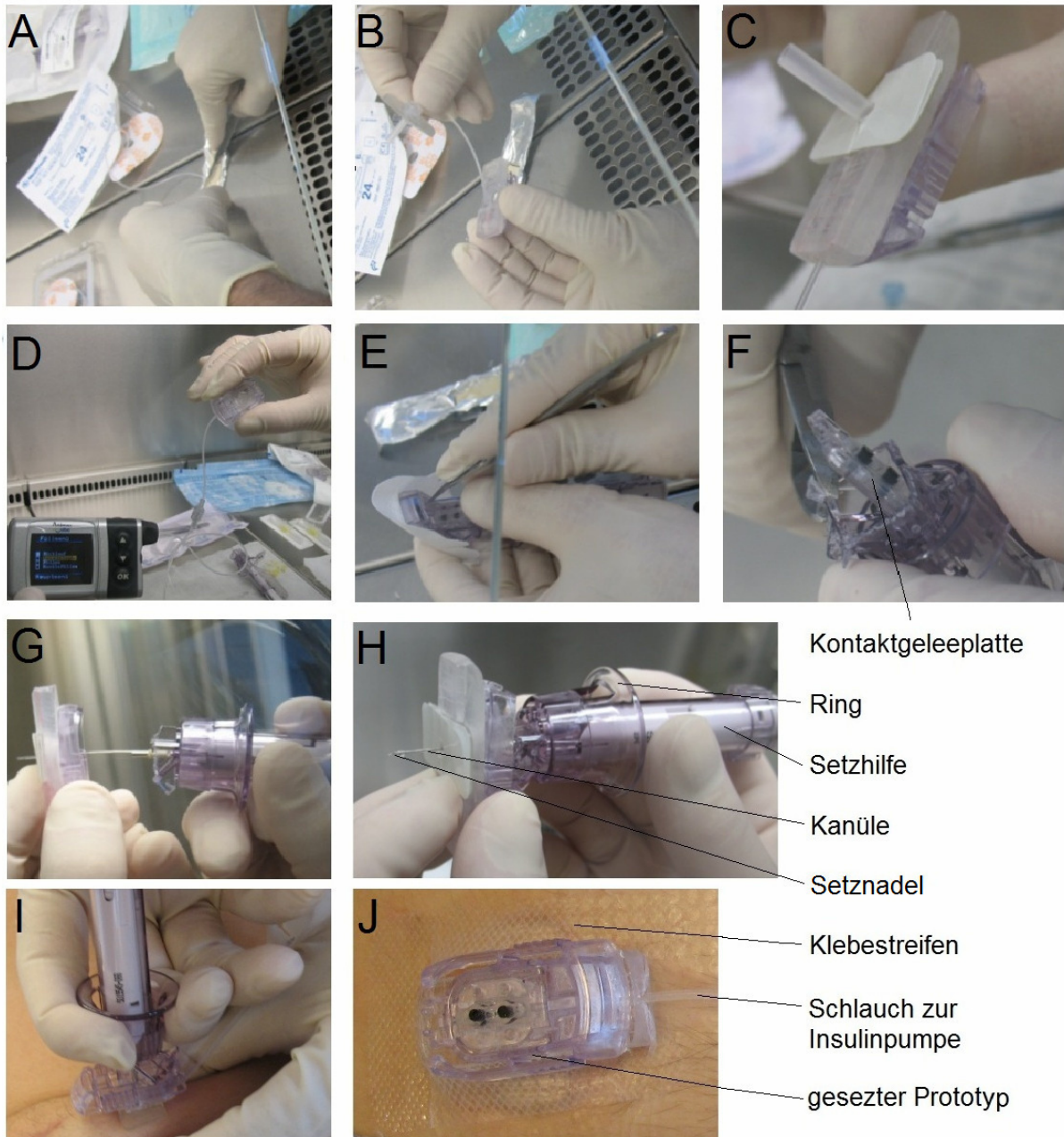
Der vordere Teil der Setzhilfe wird dann mit einem Seitenschneider entfernt (Abb. 37F). Die Kontaktgeleeplatte wird danach von der Setznadelhülse gezogen. Dabei werden auch eventuelle Plastikpartikel, die durch das Beschneiden der Setzhilfe entstanden sind, von der Setznadelhülse entfernt. Durch das Drücken des Kolbens an der Setzhilfe wird hernach die Setznadel aus der Setznadelhülse heraus geschoben. Die Setznadel wird darauf sehr vorsichtig durch das Septum der Insulininfusionskanülenhalterung in das Lumen der Kanüle eingeführt (Abb. 37G). Der Prototyp ist jetzt einsatzbereit und kann in das Fettgewebe eines Probanden eingestochen werden (Abb. 37H).

### *3.2.1.2. Setzen des Prototyps der zweiten Generation nach Singleportkonzept B*

Für das Setzen des Prototyps wird die Hautstelle, an der der Prototyp platziert werden soll desinfiziert. Danach wird die Setznadel des Prototyps eingestochen (Abb. 37I). Damit werden Sensor und Insulininfusionskanüle gleichzeitig platziert. Mithilfe des Ringes an der Setzhilfe wird die Setznadel zurückgezogen. Dadurch bleiben nur der Sensordraht und die Kanüle im Körper des Patienten zurück.

Der Prototyp wird danach mithilfe von Klebestreifen an der Haut fixiert. Hernach kann der Dexcom-Sensor über seine Kontaktgeleeplatte mit dem originalen Transmitter oder mit einem Potentiostaten verbunden und betrieben werden (Abb. 37J).





**Abb. 37: Vorbereitung und Setzen des Prototyps nach Singleportkonzept B:** **A)** Der Infusionsschlauch wird ungefähr 15cm vom Kanülenende entfernt durchgeschnitten. **B)** Das an der Kanüle befindliche Schlauchende wird dann durch die Längsbohrung im Verbindungsstück gefädelt. **C)** Die Kanülenhalterung wird in eine Ausnehmung des Verbindungsstückes gedrückt und dadurch fixiert. **D)** Das Schlauchende wird danach mit dem zur Insulinpumpe führenden Schlauch verbunden. Danach wird der Schlauch vollständig mit Insulin gefüllt. **E)** Von der Setzhilfe des Dexcom-Sensors wird die Sensorhalterung abgenommen. **F)** Die Setzhilfe wird mit einem Seitenschneider an der Spitze beschnitten. **G)** Die Setznadel wird ausgefahren und durch das Septum der Kanülenhalterung in das Lumen der Kanüle eingestochen. **H)** Der unter sterilen Bedingungen zusammengebaute Prototyp kann nun ins Gewebe gesetzt werden. **I)** Nach der Desinfektion der Haut wird der Prototyp an dieser Hautstelle eingestochen. Durch Zurückziehen des Ringes an der Setzhilfe wird die Setznadel entfernt. Dadurch verbleiben nur der Sensor und die Insulininfusionskanüle im Fettgewebe des Probanden. **J)** Mithilfe des Klebestreifens an der Insulininfusionskanüle wird der Prototyp auf der Haut fixiert. Danach kann der Prototyp mit einem Transmitter oder mit einem Potentiostat kontaktiert und betrieben werden.



### 3.2.2. Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept C:

#### 3.2.2.1. Zusammenbau des Prototyps der zweiten Generation nach Singleportkonzept C:

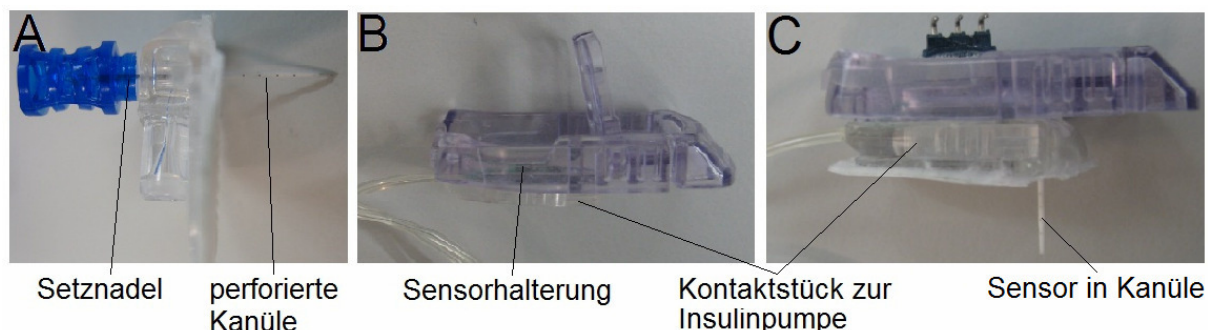
Für die Realisierung des Prototyps nach dem Singleportkonzept C wurde eine am Markt erhältliche Insulininfusionskanüle (10mm, Accu-Chek FlexLink, Roche AG, CH; Abb. 38A) verwendet, die es erlaubte, den sensitiven Teil des Dexcom-Sensors der 3. Generation im Kanülenlumen vollständig aufzunehmen und gleichzeitig die Sensorhalterung mit der Kanülenhalterung auf einfache Weise zu verbinden.

Um im Glukosemess-Modus ein effizienteres Ansaugen der ISF zum Sensor zu ermöglichen, wurden die Kanülenwände mit Perforationen versehen. Diese Perforationen wurden mithilfe eines Lasers gefertigt (Laser-Zentrum Hannover, GER). Da für eine sterile Fertigung der Perforationen ein großer finanzieller Aufwand vonnöten wäre, wurde die Laser-Prozedur unter nicht sterilen Bedingungen durchgeführt. Daher konnte dieser Prototyp vorerst nur in vitro oder im Tiermodell getestet werden.

Zum einfachen Verbinden von Sensor und Insulininfusionskanüle wurde die Steckverbindung, mit dem die Insulininfusionskanüle normalerweise mit dem Schlauch der Insulinpumpe verbunden wird (Abb. 38B), an die Unterseite einer Dexcom-Sensorhalterung geklebt.

Die Dexcom Sensorhalterung kann dadurch so an die Kanülenhalterung angesteckt werden, dass das Septum der Kanülenhalterung genau an der Stelle zu liegen kommt an welcher der Dexcom-Sensor aus der Sensorhalterung herausragt.

Verbindet man nun die Kanüle über dieses Kontaktstück mit dem Sensor, kann der Sensor durch das Septum in die Kanüle so eingestochen werden, dass sein sensitiver Bereich im Inneren der Kanüle positioniert ist (Abb. 38C).



**Abb. 38: Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept C:** A) Eine im Handel erhältliche Insulininfusionskanüle wurde mithilfe eines Lasers mit mehreren Kanülenwand-Perforationen versehen. B) Das Kontaktstück mithilfe dessen die Insulininfusionskanüle normalerweise mit dem Insulin Reservoir einer Insulinpumpe verbunden wird, wurde an die Sensorhalterung eines Dexcom-Sensors angeklebt. C) Der sensitive Bereich des Sensors wird durch das Septum der Infusionskanüle ins Kanülenlumen eingeführt.

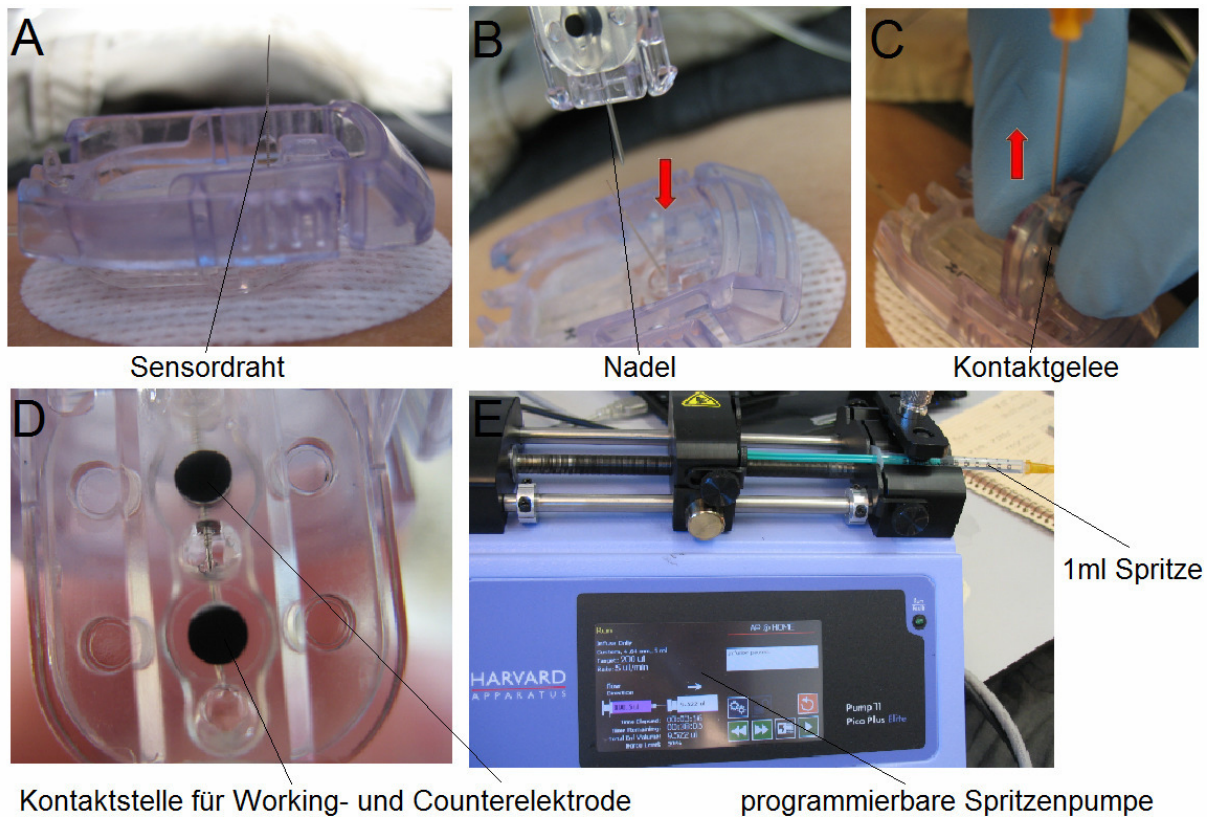
### *3.2.2.2. Setzen des Prototyps nach Singleportkonzept C:*

Zum Setzen des Prototyps wurde die gelochte Insulininfusionskanüle mit der Kanülensetznadel in der gewöhnlichen Art und Weise (wie in Abschnitt 1.2.1.3. beschrieben) gesetzt. Danach wird das Kontaktstück an dem die Dexcom-Sensorhalterung festgeklebt wurde, an die Insulininfusionskanülenhalterung angesteckt.

Durch das Septum der Insulininfusionskanüle wurde dann eine Hohlnadel mit einem Innendurchmesser von 0,55mm gestochen. Danach wurde der Sensordraht in das Lumen der Nadel und der Kanüle eingeführt. Anschließend wurde die Nadel vorsichtig abgezogen, sodass der sensitive Teil des Sensordrahtes im Lumen der perforierten Kanüle verblieb und das andere Ende des Sensordrahtes aus der Dexcom-Sensorhalterung herausragte (Abb. 39A). Das Kontaktgelee des Dexcom Sensors (Abb. 5A) wurde danach mit einer Hohlnadel durchstochen und gemeinsam mit ihr über das herausstehende Sensordrahtende geschoben (Abb. 39B). Mit dem anschließenden Abziehen der Nadel (Abb. 39C) konnte der Sensor im Kontaktgelee passend positioniert werden (Abb. 39D).

Danach wurde mithilfe einer an das Originalgehäuse angepassten Kontaktplatte der Potentiostat mit dem Kontaktgelee verbunden und der Sensor, wie in Abschnitt 2.4 beschrieben, betrieben (Abb. 39C).

Der Infusionsschlauch wurde hernach an eine Spritze (1 ml), die in eine programmierbare Spritzenpumpe (Pico Puls Elite, Harvard, USA) eingelegt war, angeschlossen (Abb. 39E). Mithilfe dieser programmierbaren Spritzenpumpe konnte dann ein periodisches Infundieren von Insulin und Ansaugen von ISF durchgeführt werden.



**Abb. 39: Setzen und Betreiben des Prototyp nach Singleportkonzept C:** **A)** Eine an den Seitenwänden perforierte Insulininfusionskanüle wurde gesetzt, und an das Infusionsschlauch-Kontaktstück, an das die Sensorhalterung angeklebt war, angesteckt. Mithilfe einer Hohlnadel wurde der Dexcom Sensor durch das Septum in die Kanüle so eingeführt, dass der sensitive Bereich des Sensors im Lumen der Kanüle positioniert war und das andere Sensorende aus dem Septum herausragte. **B)** Das Kontaktgelee des Dexcom-Sensors wurde mit einer Nadel durchstoßen. Diese Nadel wurde dann gemeinsam mit dem Kontaktgelee über den Sensor geschoben. **C)** Danach wurde die Nadel vorsichtig zurückgezogen und das Kontaktgeleestück dabei festgehalten. **D)** Dadurch konnte der Sensor in seinem Kontaktgelee positioniert und mit einem Potentiostaten betrieben werden. **E)** Da eine herkömmliche Insulinpumpe die Pumprichtung nicht umdrehen kann, wurde zum abwechselnden Ansaugen von ISF und Infundieren von Insulin eine programmierbare Harvard Spritzenpumpe verwendet, in die eine mit Insulin gefüllte 1ml-Spritze eingelegt worden war.

### 3.3. Ergebnisse der Versuche an Ratten

Es wurden insgesamt 9 Versuche an Zuckerratten durchgeführt (Ratte #1 bis #9). Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden die aufschlussreichsten Versuchsergebnisse gezeigt.

Bei diesen Tierversuchen wurden die Prototypen der zweiten Generation nach den Singleportkonzepten B und C (Abb. 35 und 37) eingesetzt. Aus diesen in vivo Versuchen konnten wichtige Erkenntnisse für das Betreiben der Prototypen und über den optimalen Versuchsaufbau bei Humanversuchen gezogen werden.

Weiters konnte das Protokoll des Tierversuchs soweit verfeinert werden, dass es als standardisierte Methode für zukünftige Versuche eingesetzt werden kann.

### 3.3.1. Ergebnisse der Versuche an Ratten mit dem Prototyp nach Singleportkonzept C

Bei diesen Versuchen sollte herausgefunden werden, mit welchen Einstellungen die Pumpe des Prototyps nach Singleportkonzept C betrieben werden sollte, um einerseits Insulin in ausreichender Menge infundieren zu können und, andererseits, ISF zum Sensor zu saugen. Dazu wurden einige Versuche unternommen, von denen in dieser Diplomarbeit die Ergebnisse zweier Versuche beispielhaft gezeigt werden.

#### 3.3.1.1. Versuch an Ratte #6: laufendes Infundieren von Insulin

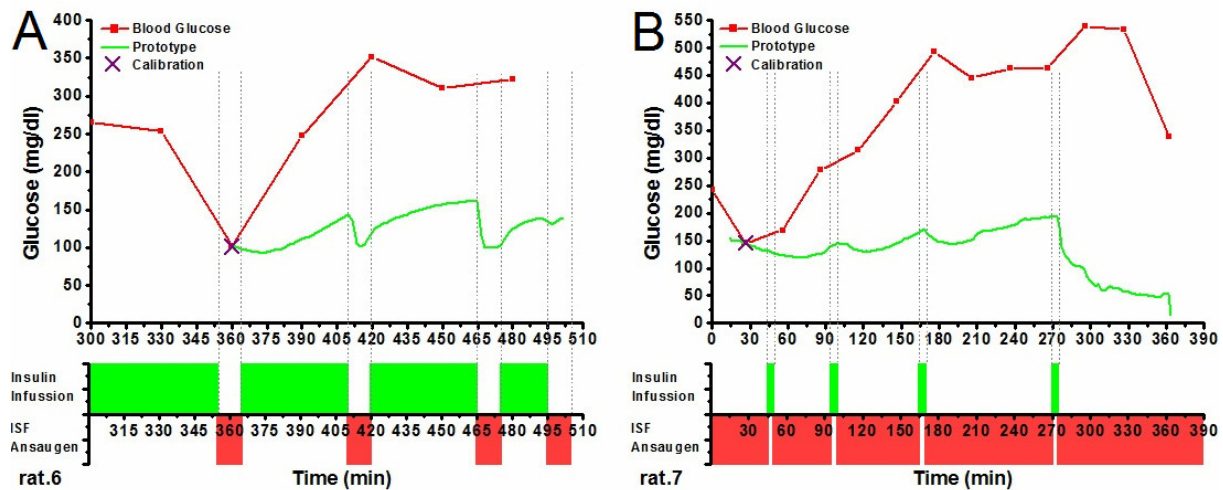
Der Prototyp nach dem Singleportkonzept C wurde bei diesen Versuchen mit einem Potentiostat betrieben. Die programmierbare Spritzenpumpe wurde so eingestellt, dass laufend Insulin infundiert wurde. Nur zur Glukosebestimmung wurde die Infusion gestoppt und ISF wurde für 20min mit einer Rate von 0,2  $\mu\text{l}/\text{min}$  zum Sensor gesaugt.

Der vom Potentiostat aufgezeichnete Sensorstrom (Abb. 40A) wurde mit einer Einpunktkalibrierung an einen gemessenen Blutglukosewert angepasst. Leider konnte bei diesem Versuch keine Korrelation zwischen den Messwerten des Prototyps und den Glukosekonzentrationen im Blut erreicht werden.

#### 3.3.1.2. Versuch an Ratte #7: laufendes Ansaugen von ISF

Bei diesem Versuch wurde der Prototyp nach Singleportkonzept C ebenfalls mit einem Potentiostat betrieben. Die Pumpe wurde diesmal aber so eingestellt, dass laufend ISF mit einer Rate von 0,1 $\mu\text{l}/\text{min}$  zum Sensor gesaugt wurde. Für die Insulininfusion wurde das Ansaugen kurzzeitig gestoppt und Insulin wurde jeweils für 5min mit einer höheren Rate (je nach Insulinbedarf der Ratte mit 5 bis 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ ) infundiert.

Der vom Potentiostat aufgezeichnete Sensorstrom (Abb. 40B) wurde wieder mit einer Einpunktkalibrierung an einen Blutglukosewert angepasst. Leider konnte auch bei diesem Versuch keine Übereinstimmung der gemessenen Glukosekonzentrationen des Prototyps mit der im Blut gemessenen Konzentration erreicht werden.



**Abb. 40: Versuche an Ratten mit dem Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept C:** Gezeigt sind die vom Potentiostat aufgezeichneten, kalibrierten Messwerte des Prototyp-Sensors (grün) und die Glukosekonzentrationen im Blut der Ratte (rot). Weiters ist zu sehen, zu welchen Zeiten Insulin infundiert bzw. ISF zum Sensor gesaugt wurde. **A)** Ergebnis des Versuches an Ratte 6: Mit der Pumpe wurde abwechselnd Insulin infundiert und ISF kurzzeitig angesaugt. **B)** Ergebnis des Versuches an Ratte 7: Die Pumpe wurde dabei so programmiert, dass laufend ISF angesaugt wurde und nur kurz Insulin infundiert wurde. Bei beiden Versuchen konnte keine Korrelation zwischen den Messwerten des Prototyps und denen im Blut der Ratte festgestellt werden.

### 3.3.2. Ergebnisse der Versuche an Ratten mit dem Prototyp nach Singleportkonzept B

Bei diesen Versuchen sollte herausgefunden werden, ob die Glukosemessung und gleichzeitige Insulininfusion mit dem Prototyp nach Singleportkonzept B durchführbar ist. Dazu wurden mehrere Versuche bei Zucker-Ratten durchgeführt, von denen zwei Ergebnisse in dieser Diplomarbeit beispielhaft gezeigt werden.

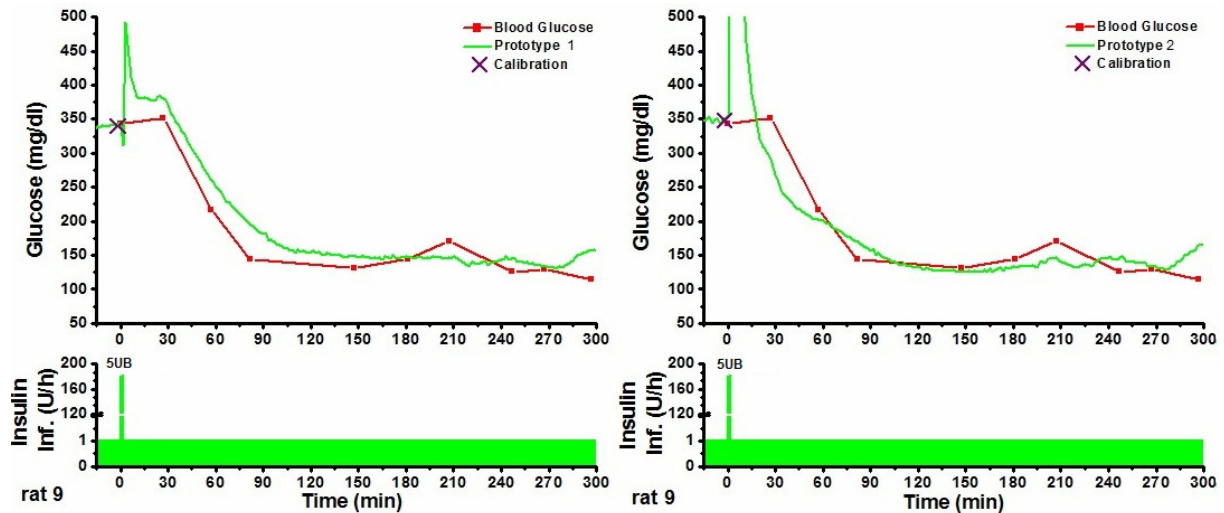
#### 3.3.2.1. Versuch an Ratte #9: Feststellung der Funktionstauglichkeit des Prototyp nach Singleportkonzept B

Zwei Prototypen nach dem Singleportkonzept B wurden bei diesem Versuch gleichzeitig in das subkutane Gewebe einer Ratte gesetzt. Die Sensoren beider Prototypen wurden jeweils mit einem Potentiostaten betrieben. Über die Kanüle der Prototypen wurde laufend Insulin mit einer basalen Rate von 1U/h infundiert.

Der Sensor des Prototyps wurde gleich nach dem Setzen mit einem zu dieser Zeit gemessenen Blutglukosewert kalibriert (prospektive Einpunktkalibrierung). Kurz nach dem Kalibrierzeitpunkt wurde über die Prototypen ein Insulinbolus von 5U abgegeben.



Die Sensormesswerte und die Insulininfusionsraten der beiden Prototypen sind in Abbildung 41 dargestellt. Es ist ersichtlich, dass während der Insulinzufuhr mit basalen Raten die Sensormesswerte sehr gut mit den korrespondierenden Blutglukosekonzentrationen übereinstimmen. Während der Abgabe des Insulin-Boluses kommt es jedoch zu einer Störung im Sensorsignal.

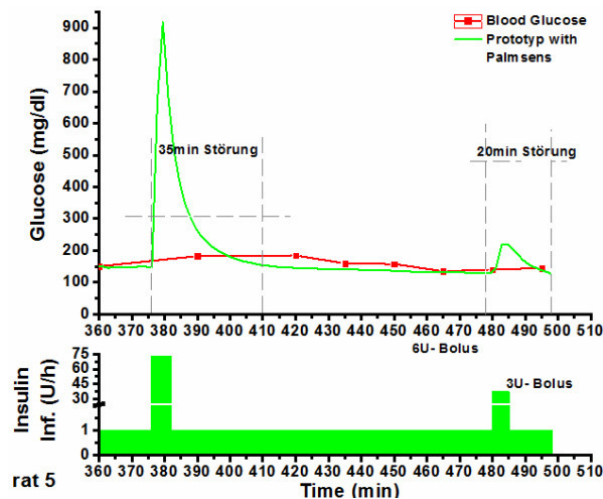


**Abb. 41: Versuch an Ratten mit dem Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept D:** Gezeigt sind die vom Potentiostat aufgezeichneten, kalibrierten Messwerte der Prototypen (grün), die Glukosekonzentrationen im Blut der Ratte (rot) sowie die Insulininfusionsraten (grün). Man kann erkennen, dass während der Insulininfusion mit basalen Raten der Sensormesswert mit der Blutzuckerkonzentration gut übereinstimmt. Während der Abgabe des Insulinboluses kommt es allerdings zu einer Störung im Sensorsignal.

### 3.3.2.2. Versuch an Ratte #5: Störung im Sensorsignal hervorgerufen durch einen Insulinbolus

Bei diesem Versuch wurde ein Prototyp nach dem Singleportkonzept B gesetzt und mit einem Potentiostat betrieben. Über den Prototyp wurde laufend Insulin mit einer basalen Rate von 1U/h infundiert. Nach 6 Stunden wurde ein Insulinbolus von 6U abgegeben. Nach einer weiteren Stunde wurde ein zweiter Bolus von 3U über den Prototyp abgegeben. Der Prototyp-Sensor wurde eine Stunde nach dem Setzen auf der zu diesem Zeitpunkt vorherrschenden Blutzuckerkonzentration kalibriert. Man erkennt, dass zum Zeitpunkt der Insulinbolusgabe von 6U (Minute 0) die Sensorglukose zu einem Spitzenwert von ~900mg/dl nach oben schnellte und sich danach über einen Zeitraum von 30 min wieder auf den Ausgangswert senkte. Bei der darauf folgenden Insulinbolusgabe von 3U ist die hervorgerufene Störung im Sensorsignal wesentlich kleiner. Der Spitzenwert lag hier bei 200mg/dl.

Die durch die beiden Insulinboli hervorgerufenen Störungen im Sensorsignal dauert ca. eine halbe Stunde (Abb. 42).



**Abb. 42: Störung im Sensorsignal durch Insulinboli:** Gezeigt sind die vom Potentiostat aufgezeichneten, kalibrierten Messwerte der Prototypen (grün), die Glukosekonzentrationen im Blut der Ratte (rot) sowie die Insulininfusionsraten. Man erkennt, dass die basale Insulininfusion keine Störung im Sensorsignal verursacht. Der erste Insulinbolus verursachte allerdings eine erhebliche Störung im Sensorsignal. Der zweite Insulinbolus verursachte eine wesentlich geringere Störung. Jeder Bolie verursacht eine ca. halbstündige Störung im Signal.

### 3.4. Ergebnisse der In Vivo Versuche an gesunden Probanden

Es wurden insgesamt 15 Versuche an gesunden Probanden durchgeführt (Proband #1 bis #15). Im Rahmen dieser Diplomarbeit werden die aufschlussreichsten Ergebnisse dieser Versuchsreihe gezeigt. Es sind dies Ergebnisse, die die Funktion des Prototyp-Sensors bei basaler Insulininfusion und während der Abgabe eines Insulinbolus beschreiben.

Da die durchgeführten Tierversuche kein zufriedenstellendes Ergebnis für den Prototyp nach dem Singleportkonzept C (Abb. 38) lieferten, wurde für die Humanstudie nur noch der Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept B (Abb. 36) verwendet.

#### 3.4.1. Funktion des Prototyps bei basalen Insulininfusionsraten

Bei diesen Versuchen wurde untersucht, wie gut der Sensor des Prototyps Änderungen der Blutglukosekonzentration folgt. Weiters wurde untersucht, ob das Infundieren von Insulin mit basalen Infusionsraten Unterschiede in den Sensorsignalen des Prototyps im Vergleich mit denen eines Kontroll-Sensors hervorruft.

#### *3.4.1.1. Basale Insulininfusion und Glukosemessung mit dem Prototypen bei Proband #3*

Bei diesem Versuch wurden zwei Prototypen gesetzt, der eine wurde mithilfe eines Transmitters betrieben der andere wurde mit einem Potentiostaten betrieben. Zwei Stunden nach der Kalibrierung der Prototypen-Sensoren wurde die Blutzuckerkonzentration des Probanden mithilfe der Glukoseinfusion erhöht. Nach 6,5 Stunden wurde dann begonnen, Insulin mit einer basalen Rate von jeweils 1U/h über die Kanülen der Prototypen zu infundieren.

Wie in der Abbildung 43 erkennbar, hatte die Insulininfusion keinen störenden Einfluss auf das Signal der Prototypen-Sensoren. Deutlich lässt sich aber die Wirkung des abgegebenen Insulins auf die Blutglukosekonzentration erkennen. Sie fiel rasch und musste durch eine erhöhte intravenöse Glukoseinfusion abgefangen werden.

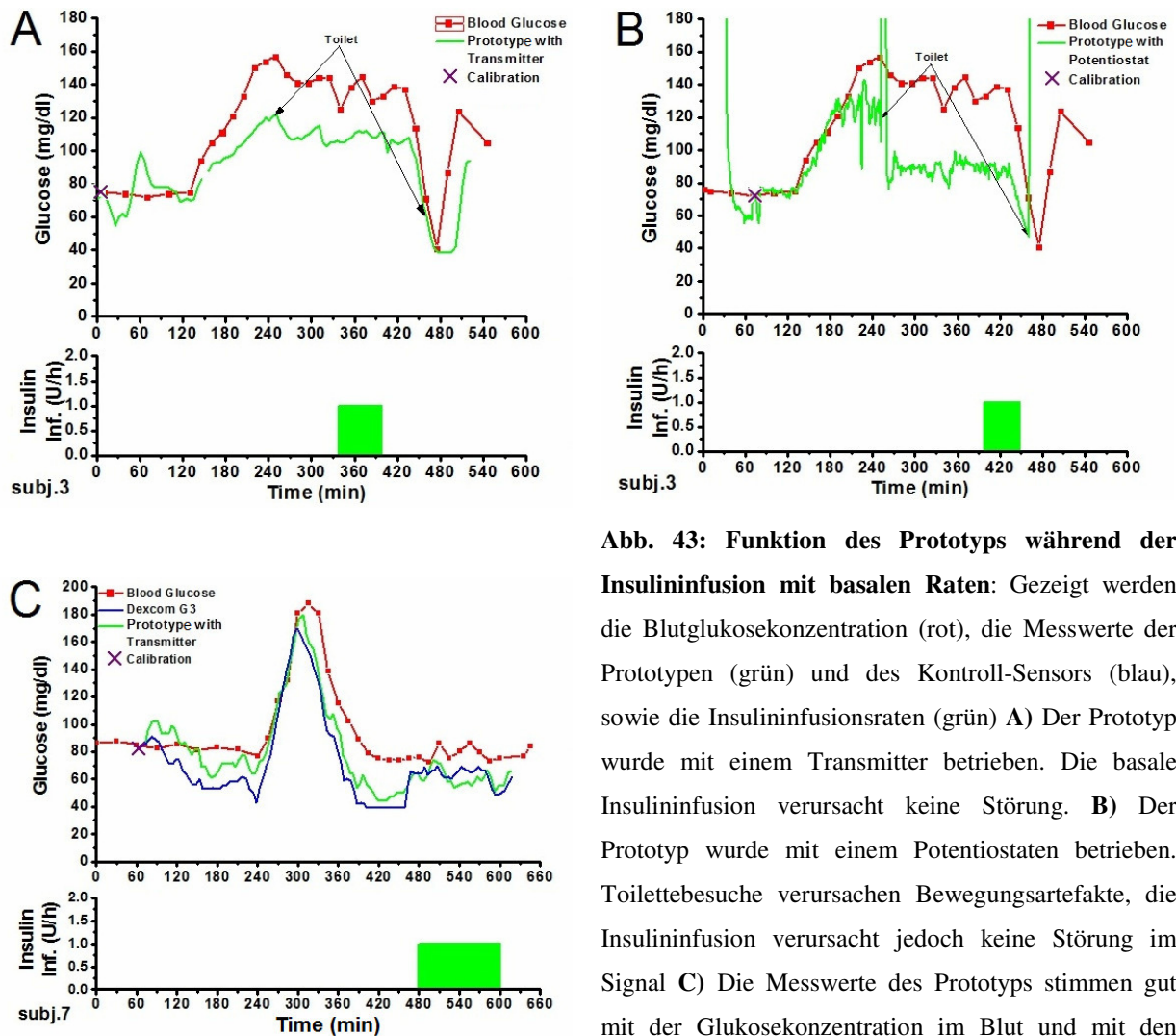
Weiters lässt sich erkennen, dass beim Betreiben der Prototypen mit Potentiostaten Körperbewegung (z.B.: bei Toilettenbesuchen) Störungen im Sensorsignal hervorrufen können (Abb. 43B). Im Vergleich dazu waren beim Betreiben der Prototypen mit originalem Transmitter keine Bewegungsartefakte im Sensorsignal sichtbar (Abb. 43A).

#### *3.4.1.2. Basale Insulininfusion und Glukosemessung mit dem Prototypen bei Proband #7: Vergleich des Prototyps mit einem Kontroll-Sensor*

Bei diesem Versuch wurden ein Prototyp und ein Kontroll-Sensor gesetzt. Der Prototyp wurde mit einem Transmitter betrieben. Drei Stunden nach der Kalibrierung der Sensoren wurde die Blutzuckerkonzentration durch die Glukoseinfusion erhöht.

Man kann erkennen, dass der Prototyp diese Glukosekonzentrationsänderung gleich gut wie der Originalsensor wiedergibt (Abb. 43C). Nach der Senkung der Glukosekonzentration durch eine Reduktion der Glukoseinfusion, wurde über zwei Stunden Insulin mit einer basalen Rate von 1U/h über den Prototyp abgegeben. Man erkennt, dass die basale Insulininfusion keine Störung im Messsignal des Prototyps bewirkte.





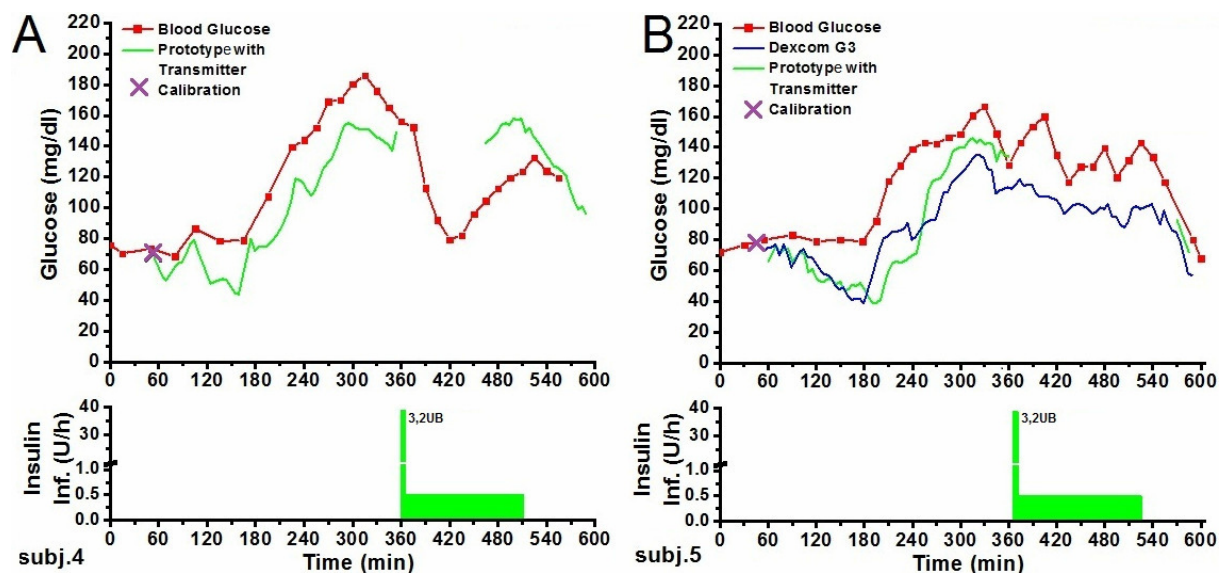
**Abb. 43: Funktion des Prototyps während der Insulininfusion mit basalen Raten:** Gezeigt werden die Blutglukosekonzentration (rot), die Messwerte der Prototypen (grün) und des Kontroll-Sensors (blau), sowie die Insulininfusionsraten (grün) **A**) Der Prototyp wurde mit einem Transmitter betrieben. Die basale Insulininfusion verursacht keine Störung. **B**) Der Prototyp wurde mit einem Potentiostat betrieben. Toilettebesuche verursachen Bewegungsartefakte, die Insulininfusion verursacht jedoch keine Störung im Signal **C**) Die Messwerte des Prototyps stimmen gut mit der Glukosekonzentration im Blut und mit den Messwerten eines Kontroll-Sensors überein.

### 3.4.2. Funktion des Prototyps bei Abgabe eines Insulinbolus

Wie aus den Tierersuchen schon bekannt war, verursachen Insulinboli beim Sensor des Prototyps eine Störung. Um dies genauer zu untersuchen, und eventuell eine Lösung für dieses Problem zu finden, wurden bei den Versuchen an den gesunden Probanden unterschiedlich große Insulinboli über unterschiedlich lange Zeiten abgegeben und die Reaktion des Prototypen-Sensors aufgezeichnet.

### 3.4.2.1. Proband #4, #5: Auswirkung von Insulinboli auf das Sensorsignal eines mit Transmitter betriebenen Prototyps

Die Prototypen wurden bei diesen Versuchen mit Transmitter betrieben. Zwei Stunden nach der Kalibrierung der Sensoren wurde durch eine Glukoseinfusion eine Erhöhung des Blutzuckers herbeigeführt. In Abbildung 44A ist zu sehen, dass der Prototyp diesem Blutglukoseanstieg gut folgen kann. Nach dieser Glukoseerhöhung wurde ein Insulinbolus von 3,2U über den Prototyp abgegeben. Danach wurde 2,5 Stunden lang Insulin mit einer basalen Rate von 0,5 U/h infundiert. Es ist erkennbar, dass der Insulinbolus sowohl bei Proband #4 (Abb. 44A) als auch bei Proband #5 (Abb. 44B) zu einer mehrstündigen Unterbrechung der Messwertaufzeichnung der Prototypen führte.



**Abb. 44: Auswirkung eines Insulinbolus auf einen mit Transmitter betriebenen Prototypen:** Gezeigt werden die Blutglukosekonzentration (rot) und die Messwerte der Prototypen (grün) und eines Kontroll-Sensors (blau) sowie die Insulininfusionsraten **A**) Bei Proband #4 führte der Insulinbolus zu einer 2-stündigen Unterbrechung der Messwertaufzeichnung **B**) Bei Proband #5 führte der Insulinbolus zu einer 3,5-stündigen Unterbrechung der Messwertaufzeichnung des Prototyps.

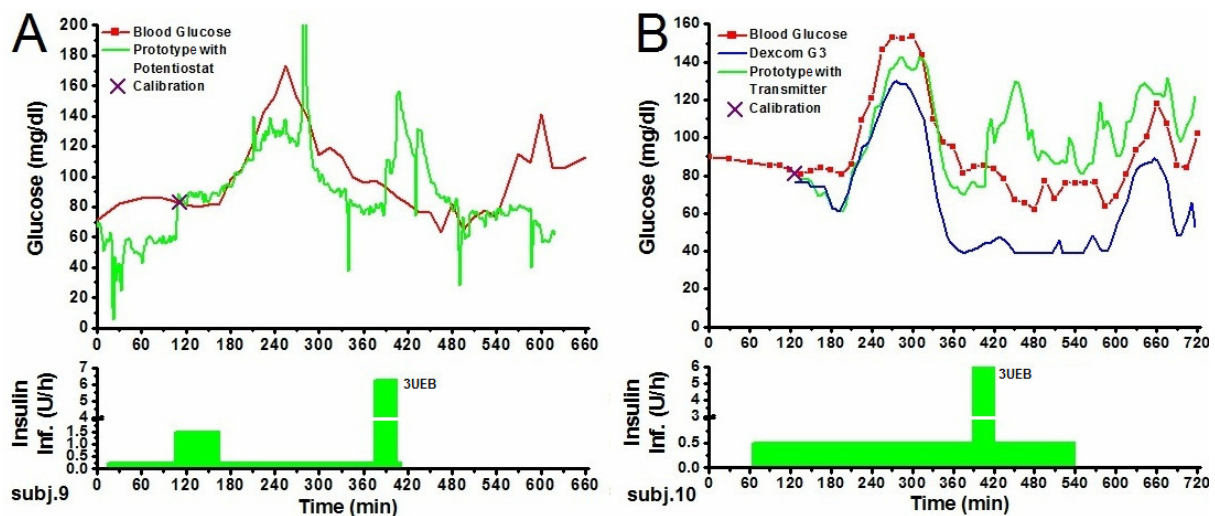
### 3.4.2.2. Proband #9, #10: Auswirkung eines über einen längeren Zeitraum abgegebenen Insulinbolus (extended Bolus) auf das Sensorsignal eines Prototyps

Ein Prototyp wurde bei Proband #9 (Abb. 45A) gesetzt und mit einem Potentiostaten betrieben. Bei Proband #10 wurde ebenfalls ein Prototyp gesetzt, der jedoch mit einem Transmitter betrieben wurde. Zusätzlich zu dem Prototyp wurde bei Proband #10 ein Kontroll-Sensor gesetzt.

Über die Prototypen wurde laufend Insulin mit basalen Raten zwischen 0,25U/h und 1,5U/h abgegeben. Um eine Änderung in der Blutglukosekonzentration zu erreichen, wurde eine Stunde nach der Kalibrierung der Prototypen mit einer Erhöhung der Glukoseinfusion begonnen. Nach der Glukoseerhöhung wurde dann die Glukoseinfusion wieder verringert, worauf die Blutglukosekonzentration der gesunden Probanden wieder auf ihren Normalwert zurückging. Dieser hyperglykämischen Phase folgend, wurde über die Prototypen Insulinboli von 3U über einen verlängerten Zeitraum von 30min abgegeben (extended Bolus).

Dieser bei Insulinpumpen abrufbare Bolusgabe-Modus ermöglicht die Zufuhr einer gewählten Bolusmenge über einen längeren, einstellbaren Zeitraum. Im Vergleich zu einer Bolusgabe mit normalem Abgabe-Modus, ergeben sich bei dieser Art der Bolusgabe geringere Infusionsraten. Diese schonendere Insulinbolusabgabe führte bei Proband #9 zu einer kleineren Störung im vom Potentiostat aufgezeichneten Sensorsignal (Abb. 45A).

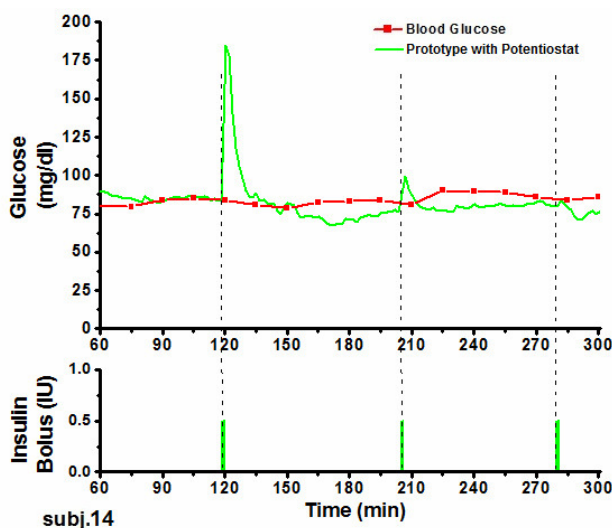
Bei Proband #10 (Abb. 45B) gelang es durch die Wahl dieses Abgabe-Modus das Unterbrechen der Messwertaufzeichnung des mit Transmitter betriebenen Prototyps zu verhindern.



**Abb. 45: Abgabe eines Insulinbolus über einen längeren Zeitraum (extended Bolus):** Gezeigt werden die Blutglukosekonzentration (rot) und die Messwerte der Prototypen (grün) und eines Kontroll- Sensors (blau) sowie die Insulininfusionsraten. **A)** Der Prototyp wurde mit einem Potentiostat betrieben. Die Störung die durch den „extended Bolus“-Modus hervorgerufen wird ist kleiner als wie wenn die selbe Menge Insulin als normaler Bolus verabreicht worden wäre. **B)** Der Prototyp wurde mit einem Transmitter betrieben. Die Abgabe des Insulinbolus als „extended Bolus“ verursachte zwar eine Störung im Signal, nicht aber das Unterbrechen der Messwertaufzeichnung des mit Transmitter betriebenen Prototyps.

### 3.4.2.3. Proband #14: Wirkung von sequentiell abgegebener Boli auf das Sensorsignal eines Prototyps

Bei diesem Versuch wurde ein mit Potentiostat betriebener Prototyp verwendet. Der Sensor wurde dabei so im Kanülenlumen des Prototyps positioniert, dass sein sensitiver Bereich kurz nach dem Kanülenende anfang (Abb. 49B). Auf diese Weise konnte sichergestellt werden, dass der Sensor auch bei der Abgabe kleinerer Insulinboli mit Insulin umspült wurde (bei gesunden Probanden ist es aufgrund der Eigeninsulinproduktion problematisch größere Insulinmengen zu verabreichen). Nach der Kalibrierung des Prototyps wurden drei gleich große Insulinboli von 0,5U im Abstand von ca. 90min abgegeben. In Abbildung 46 ist das Ergebnis dieses Versuches dargestellt. Man erkennt, dass der erste Insulinbolus eine größere Störung im Sensorsignal verursachte als die darauf folgenden. Das Ausmaß der Störung ist bei jedem weiteren Bolus geringer als bei seinen Vorgängern.



**Abb. 46: Wirkung aufeinander folgender Insulinboli auf den Sensor eines Prototyps:** Gezeigt werden die Blutglukosekonzentration (rot), die Messwerte des Prototypen (grün), und die abgegebenen Insulinboli. Der Sensor wurde bei diesem Versuch so im Prototyp positioniert, dass er auch durch kleine Insulinbolie vollständig in Kontakt mit dem Insulin kommt. Man erkennt, dass das Ausmaß der Störung im Sensorsignal mit jedem weiteren Bolus kleiner wird.

## 3.5. Ergebnisse der In Vivo Versuche an Probanden mit Type 1 Diabetes

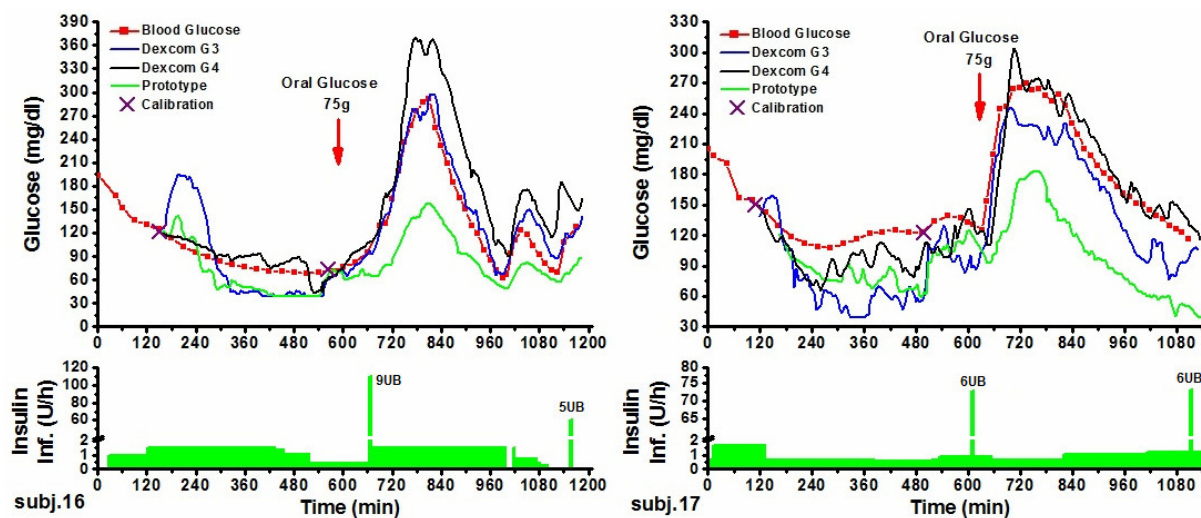
Es wurden insgesamt 15 Versuche an Probanden mit Typ 1 Diabetes durchgeführt (Proband #16 bis #30). Ziel war es, den gesamten Insulinbedarf dieser Diabetiker über einen eingesetzten Prototyp zu decken und die Messwerte des Prototyps mit der Blutglukosekonzentration und den Messwerten von Kontroll-Sensoren zu vergleichen. Zusätzlich war es vorgesehen, eine Mittelung über die Glukosemesswerte möglichst vieler Probanden durchzuführen.

### 3.5.1. Konditionierung des Sensors des Prototyps am Versuchsanfang mit Insulin

Die Ergebnisse der ersten Versuche bei Typ 1 Diabetikern (Proband #16 und #17) sind in der Abbildung 47 dargestellt. Man kann erkennen, dass während der basalen Insulingabe über Nacht der Prototyp-Sensor die Blutzuckerwerte ähnlich genau wiedergab wie die beiden Kontroll-Sensoren. Nach der Abgabe des Insulinbolus am Anfang des OGTTs kam es jedoch zu einem Verlust der Empfindlichkeit des Prototyp-Sensors, sodass die Sensormesswerte nach dem Insulinbolus weit kleiner als die Messwerte im Blut und die Messwerte der Kontroll-Sensoren waren (Abb. 47).

Als eine mögliche Lösung für dieses Problem wurden deshalb bei den darauf folgenden Versuchen die Sensoren der Prototypen vor jeder Kalibrierung schonend mit einer kleinen Menge von Insulin (1U) in Kontakt gebracht (in vivo Konditionierung mit Insulin).

Weiters wurden die großen Insulinboli vor dem Beginn der OGTT's nicht mehr im normalen Abgabe-Modus, sondern langsam (über 30min) in Form eines „extended Bolus“ abgegeben.



**Abb. 47: Ergebnisse der ersten Versuche bei Typ 1 Diabetikern (Proband #16 & #17):** Gezeigt werden die Blutglukosekonzentration (rot), die Messwerte der Prototypen (grün), die Messwerte der Kontroll-Sensoren G3 (blau) und G4 (schwarz) sowie die Insulininfusionsrate. Bei der Abgabe basaler Insulinraten während der Nacht waren die Messwerte der Prototypen vergleichbar mit denen der Kontroll-Sensoren. Nach der Abgabe des Insulin-Bolus vor dem Beginn des OGTTs waren die Messwerte der Prototypen jedoch wesentlich kleiner als die beobachteten Messwerte im Blut und die der Kontroll-Sensoren.

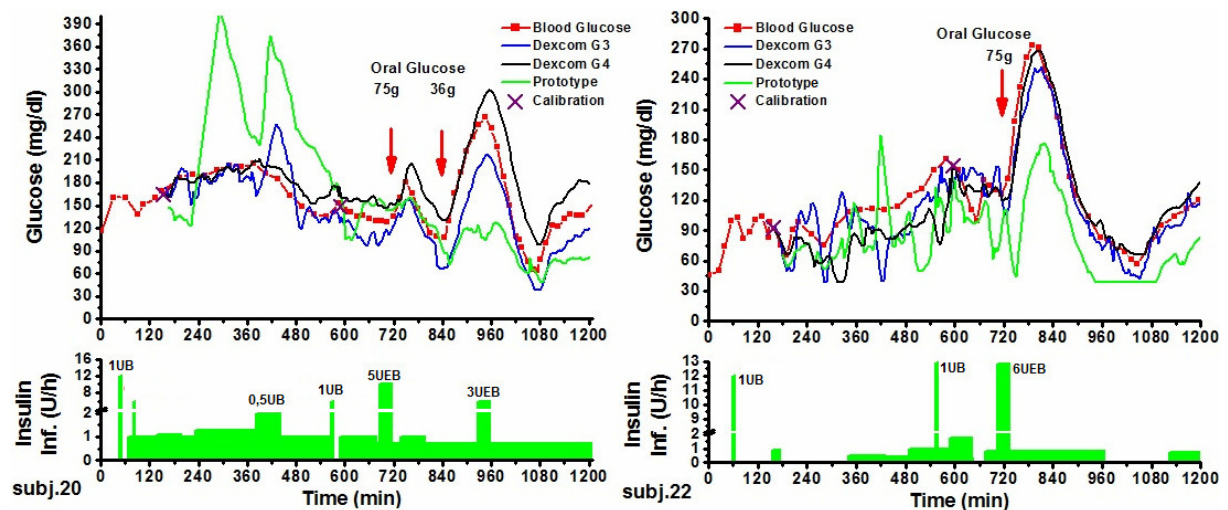


### 3.5.2. Optimierung der Position des Prototyp-Sensors in der Infusionskanüle

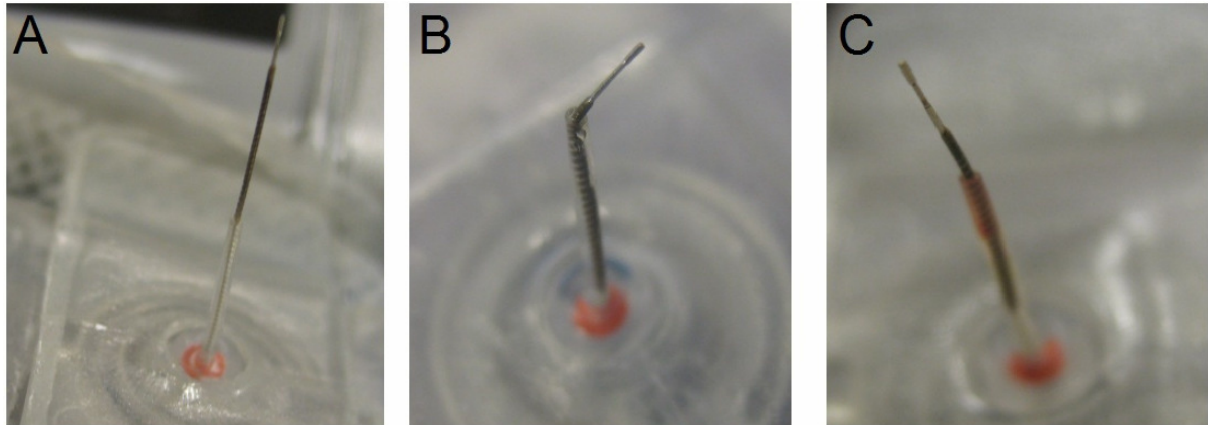
Um den Prototyp-Sensor mit kleinen Insulinboli schonend konditionieren zu können, sollte der sensitive Bereich des Sensors nicht zu weit vom Kanülenende entfernt sein (Abb. 49A). Bei den Probanden #20 und #22 wurde der Sensor innerhalb der Infusionskanüle des Prototyps so positioniert, dass der sensitive Bereich des Sensors nur sehr wenig über das Kanülenende hinausragte (Abb. 49B).

Dies hat sich ebenfalls als problematisch herausgestellt, da der Sensor bei dieser Positionierung schon bei höheren basalen Infusionsraten vollständig der Insulinflüssigkeit ausgesetzt war, was zu erheblichen Störungen im Messsignal (Abb. 48) und zu Sensitivitätsverlusten führte.

Bei den darauf folgenden Versuchen wurde deshalb darauf geachtet, dass das Ende des Prototyp-Sensors ungefähr 4,5mm vom Kanülenende entfernt zu liegen kam (Abb. 49C). Damit konnten Störungen im Sensorsignal, die bei Übergängen von basaler Insulininfusion zu Bolusgaben entstehen, minimiert werden.



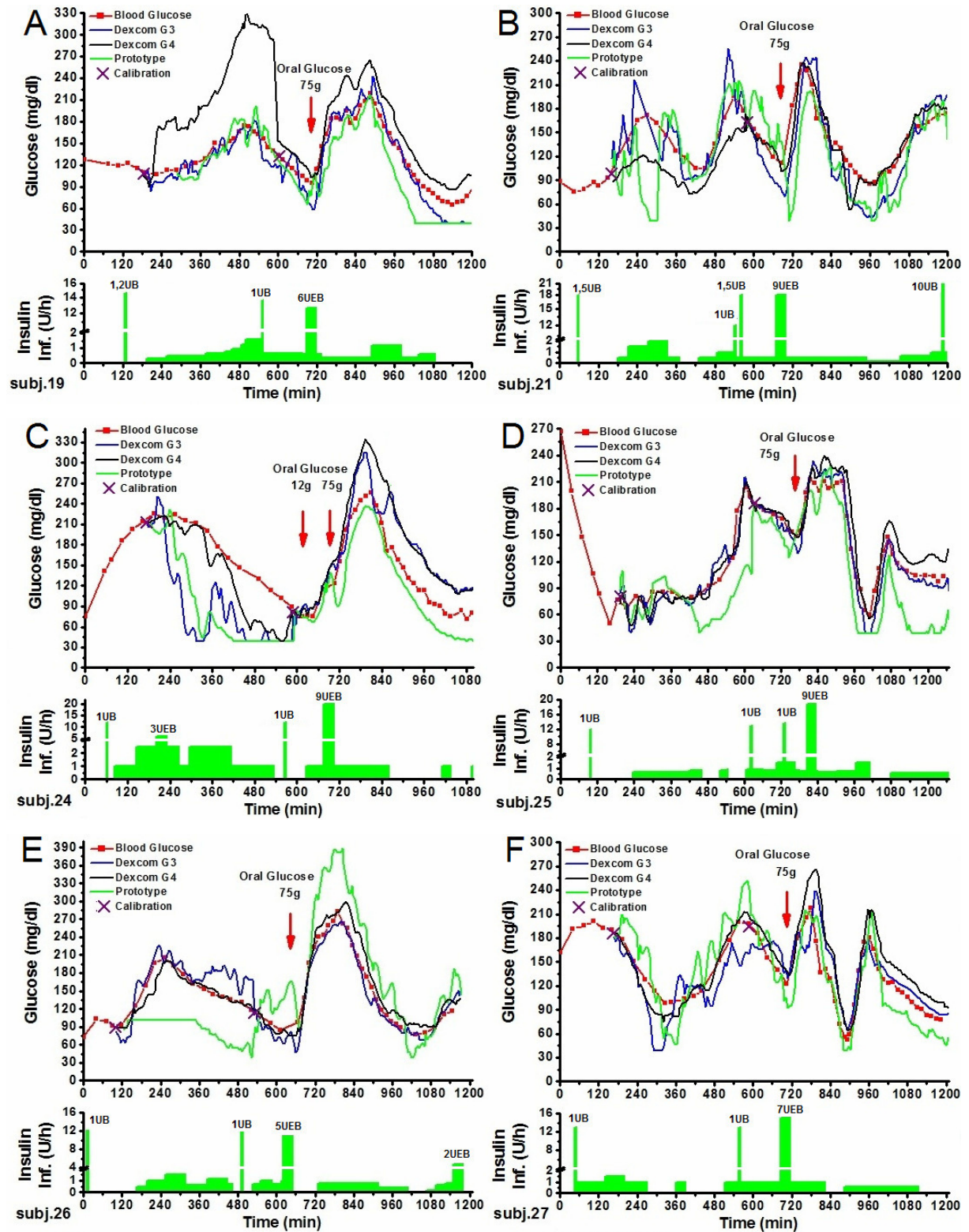
**Abb. 48: Störungen und Sensitivitätsverlust bei Prototyp-Sensoren die zu wenig über das Kanülenende des Prototyps hinausragten (Proband #20 & #22):** Gezeigt werden die Blutglukosekonzentration (rot), die Messwerte der Prototypen (grün), die Messwerte der Kontroll- Sensoren G3 (blau) und G4 (schwarz) sowie die Insulininfusionsrate. Zu erkennen sind die erheblichen Glukosesignalstörungen und die verringerte Sensitivität beim Prototyp.



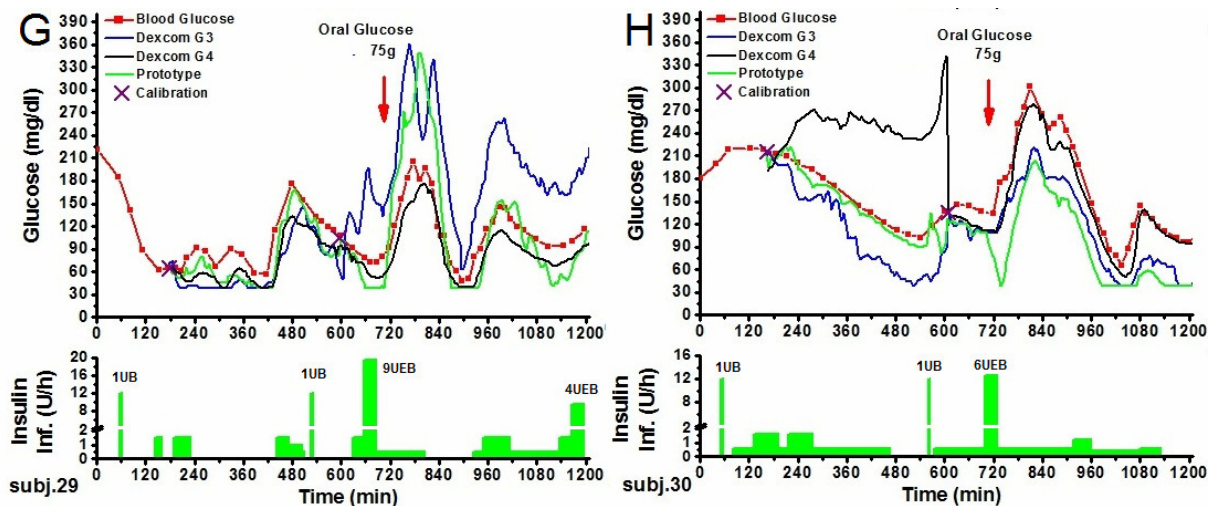
**Abb. 49: Optimierung der Position des Sensors in der Kanüle des Prototyps** A) Der sensitive Bereich des Sensors ist so weit von dem Kanülenende entfernt, dass er durch einen kleinen Insulinbolus nicht mit Insulin konditioniert werden kann. B) Der sensitive Bereich des Sensors ist zu nah am Kanülenende. Größere Änderungen bei den basalen Insulinraten erzeugen Störungen im Sensor-Signal. C) Versuche zeigten, dass eine optimale Position des Sensors in der Kanüle des Prototyps die ist, bei der der sensitive Bereich des Sensors ungefähr 4,5mm über das Kanülenende hinausragt. In dieser Position konnte der Prototyp gut konditioniert werden und der Einfluss von Insulinboli auf den Prototyp war minimal.

### 3.5.3. Versuche mit Prototyp-Konditionierung und optimierter Prototyp-Sensor-Positionierung (Probanden #19, #21, #24, #25, #26, #27, #29 und #30)

Bei acht verbleibenden Versuchen (Probanden #19, #21, #24, #25, #26, #27, #29 und #30) konnten die Sensoren der Prototypen in deren Insulininfusionskanülen in gewünschter Weise positioniert werden (~4,5mm vom Kanülenende entfernt; Abb. 49C). Weiters konnte vor den jeweiligen Kalibrierungen der Prototyp-Sensoren ein kleiner Insulinbolus von 1U über den Prototyp abgegeben werden, um eine schonende Konditionierung des Sensors mit Insulin zu erreichen. Die größeren Mengen an Insulin die kurz vor Beginn der OGTTs abgegeben wurden, wurden über 30min im „extended Bolus“-Modus verabreicht. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abbildung 50 dargestellt.







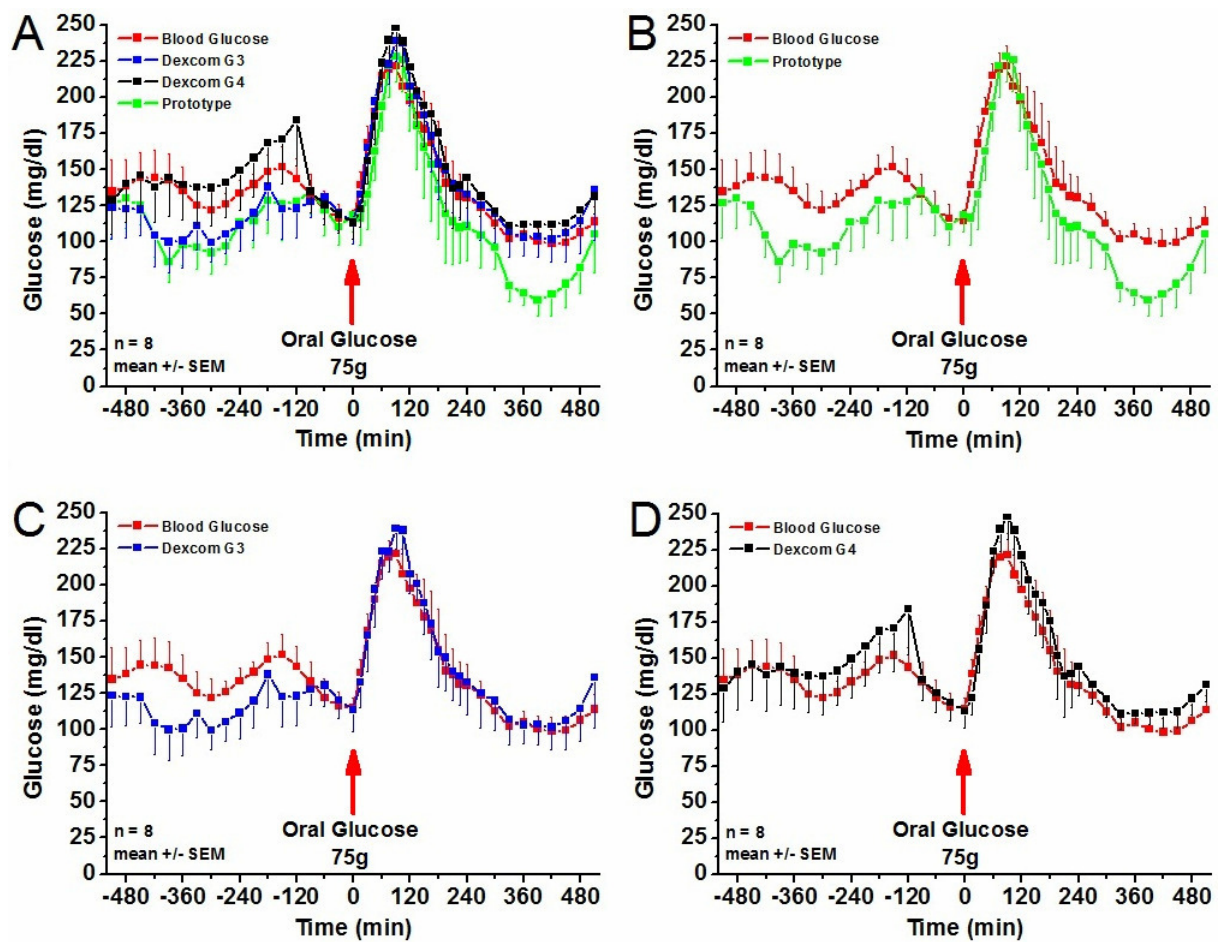
**Abb. 50: Versuche mit Konditionierung und optimierter Positionierung des Prototyp-Sensors:** Gezeigt werden die Blutglukosekonzentration (rot), die Messwerte der Prototypen (grün), die Messwerte der Kontroll-Sensoren G3 (blau) und G4 (schwarz) sowie die Insulininfusionsraten für die Probanden #19 (A), #21 (B), #24 (C), #25 (D), #26 (E), #27 (F), #29 (G) und #30 (H).

#### 3.5.4. Mittelung der Messergebnisse der Versuche bei Probanden mit Typ1 Diabetes.

Um die Güte der Übereinstimmung der Prototyp- und Kontroll-Sensorwerte mit den Blutglukosewerten besser abschätzen zu können, wurden die Glukoseverläufe über die gezeigten 8 Versuche (Abb. 50) gemittelt und in Abbildung 51 dargestellt.

Die Versuche bei Proband #16, #17 und #18 wurden für die Mittelung nicht verwendet, da die Prototyp-Sensoren noch nicht mit kleinen Insulinboli konditioniert wurden. Bei den Probanden #20 und #22 war der Abstand zwischen Kanülenende und sensitiven Bereich des Prototyp-Sensors zu gering, sodass Änderungen bei der basalen Insulininfusionsrate erhebliche Störungen verursachten. Diese Versuche wurden bei der Mittelung daher auch nicht berücksichtigt. Bei Proband #23 wurde der Prototyp-Sensor schlecht mit dem Transmitter kontaktiert, sodass die Messung nicht funktionierte. Bei Proband #28 konnten leider alle Sensoren (auch die Kontroll-Sensoren G3 und G4) nicht kalibriert werden. Daher konnte auch dieser Versuch nicht für die Mittelung verwendet werden.

Von den bei den Typ1 Diabetikern durchgeführten 15 Versuchen konnten daher 8 Versuche (Proband #19, #21, #24, #25, #26, #27, #29 und #30) für eine Mittelung herangezogen werden (Abb. 51). Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Werte der gemittelten Blutglukose jeweils separat mit den mittleren Messwerten des Prototyps (Abb. 51B), und der Kontroll-Sensoren G3 (Abb. 51C) und G4 (Abb. 51D) dargestellt.



**Abb. 51: Gemittelte Messergebnisse der Versuche bei Probanden mit Typ1 Diabetes (n=8):** Gezeigt werden die gemittelten Blutglukosekonzentration (rot), die gemittelten Messwerte der Prototypen (grün), die gemittelten Messwerte der Kontroll-Sensoren G3 (blau) und G4 (schwarz) sowie die zugehörigen SEM Werte. **A)** Die gemittelten Messergebnisse des Prototyps und der Kontroll-Sensoren G3 und G4 sind der mittleren Blutglukosekonzentration gegenübergestellt. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Einzelkurven des Prototyps (**B**), des Kontroll-Sensors G3 (**C**) und des Kontroll-Sensors G4 (**D**) separat der gemittelten Blutglukosekonzentration gegenübergestellt.

### 3.5.5. Absolute Relative Differenz

Um die Güte der Übereinstimmung der Prototyp- und der Kontroll-Sensorwerte mit den Blutglukosewerten zu quantifizieren, wurde die mittleren und medianen Absoluten Relativen Differenzen (ARD's) aus den Blutglukosemesswerten und den Sensormesswert bei den Versuche an den 8 Probanden (#19, #21, #24, #25, #26, #27, #29 und #30) berechnet. Die berechneten mittleren und medianen ARD's sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Die aus den Messdaten der Prototypen errechneten Werte der mittleren wie auch medianen ARD waren mit denen der Kontroll-Sensoren G3 und G4 vergleichbar.

**Tabelle 3: Mittlere und mediane Absolute Relative Differenz**

	<b>mittlere ARD</b>	<b>mediane ARD</b>
<b>Prototyp (%)</b>	42.3	31.4
<b>Dexcom G3 (%)</b>	38.0	28.9
<b>Dexcom G4 (%)</b>	41.5	30.2

### 3.5.6. Bland & Altman Analyse

Um die Güte der Übereinstimmung der Prototyp- und Kontroll-Sensorwerte mit den Blutglukosewerten zu quantifizieren, wurde auch eine Bland & Altman Analyse [29] der Ergebnisse der Versuche an den 8 Probanden (#19, #21, #24, #25, #26, #27, #29 und #30) durchgeführt. Dabei wurde die relative Differenz zwischen den Sensorwerten und den korrespondierenden Blutglukosewerten gebildet und in einem Diagramm (y-Achse) über den zugehörigen Blutglukosewerten (x-Achse) aufgetragen.

Zusätzlich wurde der Mittelwert der Differenzen sowie der Mittelwert der Differenzen +/- der doppelten Standardabweichung der Differenzen dargestellt.

In Abbildung 52 sind die Ergebnisse dieser Analyse für die Prototypen (Abb. 52A), sowie den Kontroll-Sensoren G3 (Abb. 52C) und G4 (Abb. 52E) gezeigt.

In Tabelle 4 werden die Mittelwerte und Standardabweichungen aus der Bland & Altman Analyse für den jeweiligen Kontroll-Sensor und für die Prototyp-Sensor gezeigt.

**Tabelle 4: Bland & Altman Analyseergebnisse - Mittelwert und Standardabweichung**

	<b>Prototyp</b>	<b>Dexcom G3</b>	<b>Dexcom G4</b>
<b>Mittelwert (%)</b>	15,7	1,3	-6,9
<b>Standardabweichung (%)</b>	31,0	37,4	30,2

### 3.5.7. Clark Error Grid Analyse

Zusätzlich zur Berechnung der ARD's und der Bland & Altman Analyse wurde für die Ergebnisse der Versuche bei den 8 Typ 1 Diabetikern (Probanden # 19, #21, #24, #25, #26, #27, #29 und #30) eine Clark Error Grid Analyse [30] durchgeführt. Mit dieser Analyse kann die Güte der klinischen Genauigkeit der Prototypen im Vergleich zu den Kontroll-Sensoren beurteilt werden. Dabei wurden die Glukosewerte der Prototypen bzw. Kontroll-Sensoren in einem Diagramm (y-Achse) über den zugehörigen Blutglukose-Referenzwerten (x-Achse) aufgetragen. Das Diagramm ist mit Regionen versehen, mit deren Hilfe die Messpunkte beurteilt werden können.

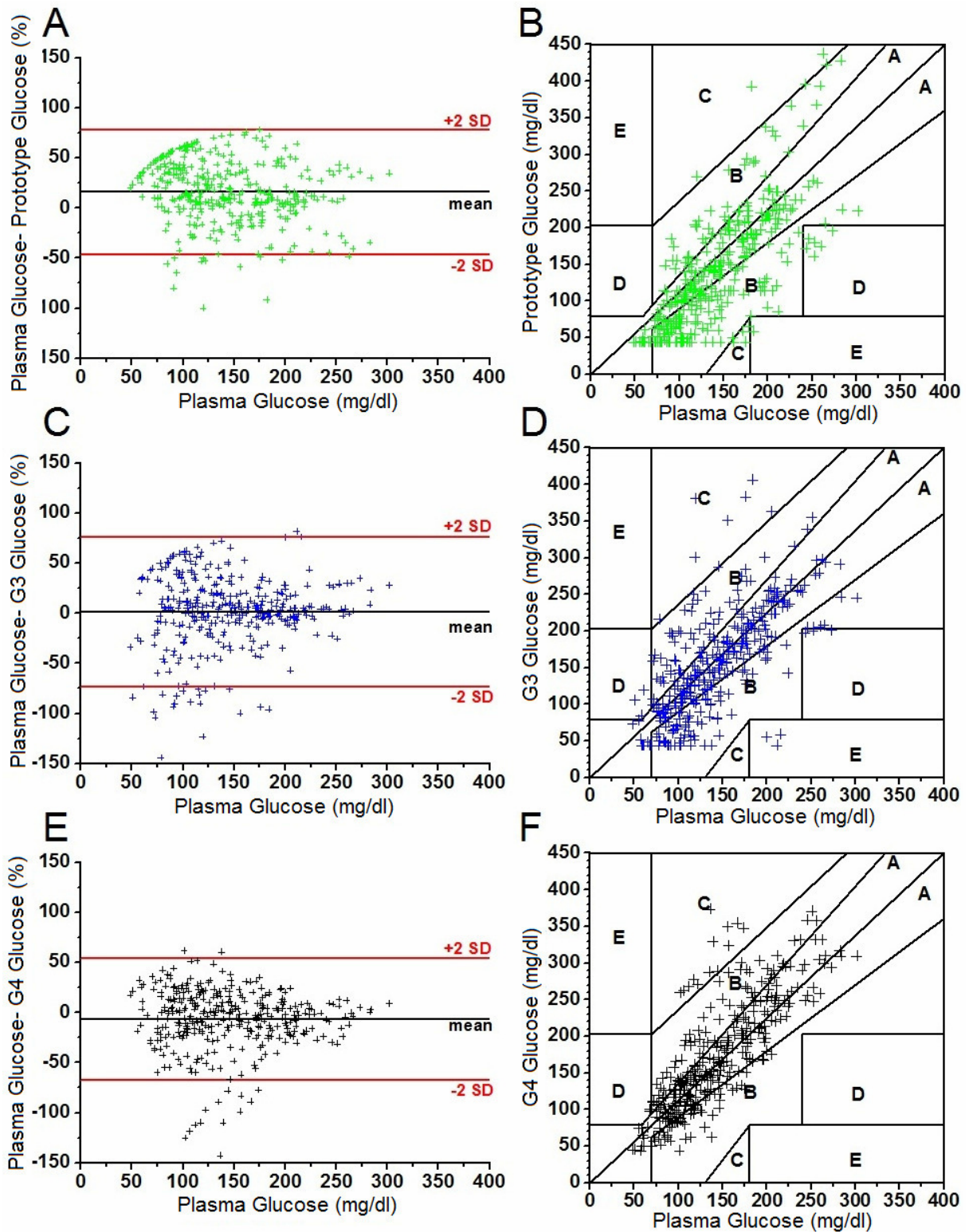
Region A beinhaltet Messwerte mit einer maximalen Abweichung von 20% gegenüber der Referenzmessung. Messwerte in Region B haben eine höhere Abweichung als 20%, führen jedoch nicht zu einer Entscheidung (Insulingabe oder Nahrungsaufnahme) die negative Auswirkungen auf die Diabetes Therapie hätte. In Region C befinden sich die Messwerte, die zu einer fehlerhaften Therapieentscheidung führen würden. Region D weist Messwerte auf, bei denen Fehler bei der Erkennung von Hyper- oder Hypoglykämie eintreten würden. In Region E kommen schlussendlich die Messwerte zu liegen, die eine fehlerhafte Therapieentscheidung (Insulingabe bei Hyperglykämie oder Glukoseaufnahme bei Hypoglykämie) herbeiführen würden.

In Abbildung 52 B wurde dies für den Prototyp, in Abbildung 52 D für den Kontroll-Sensor G3 und in Abbildung 52F für den Kontroll-Sensor G4 dargestellt.

In Tabelle 5 ist angegeben, wie viel Prozent der Messwerte der Prototypen und Sensoren in den jeweiligen Regionen des Error Grids zu liegen kamen.

**Tabelle 5: Verteilung der Datenpunkte im Clark Error Grid (in % aller Datenpunkte)**

	<b>A</b>	<b>B</b>	<b>C</b>	<b>D</b>	<b>E</b>	<b>A und B</b>	<b>C, D und E</b>
<b>Prototyp</b>	47,4	48,5	2,1	1,7	0,3	95,9	4,1
<b>Dexcom G3</b>	54,7	40,4	2,3	1,7	0,9	95,1	4,9
<b>Dexcom G4</b>	59,9	35,8	3,7	0,6	0	95,7	4,3



**Abb. 52: Bland & Altman und Clark Error Grid Analyse:** Gezeigt werden die Ergebnisse der Bland & Altman Analyse für den Prototyp (A), für den Kontroll-Sensor G3 (C), und für den Kontroll-Sensor G4 (E) sowie die Ergebnisse der Clark Error Grid Analyse für den Prototyp (B), den Kontroll-Sensor G3 (D) und den Kontroll-Sensor G4 (F).

## 4. Diskussion

Das Ziel dieser Diplomarbeit war es, mehrere unterschiedliche Kombinationen von KMG und Insulininfusionskanüle für die Realisierung einer künstlichen Bauchspeicheldrüse in Single-Port-Form zu testen. Die für eine Realisierung geeignetste Art der Kombination von KMG und Insulininfusionskanüle sollte dann weiterentwickelt und bei einer Pilotstudie am Tiermodell, bei einer weiteren Pilotstudie an gesunden Probanden und schlussendlich bei einer Studie an Typ 1 Diabetikern eingesetzt werden.

### 4.1. Wahl des Single-Port-Konzepts und des KMG's

Die in Abschnitt 3.1.7. gezeigten Ergebnisse legten es nahe, Prototypen der zweiten Generation nach dem Single-Port-Konzept B (Abb. 36) und C (Abb. 38) unter Verwendung des Dexcom-Glukosesensors zu erstellen. Die für diese Konzept- und Sensorwahl herangezogenen Kriterien waren: 1) Sensor-Genauigkeit, 2) Sensor-Stabilität und Sensor-Linearität in Insulinflüssigkeiten, 3) Sensor Verfügbarkeit, 4) Kooperationsbereitschaft des Sensorherstellers, 5) Kompatibilität von Sensorsetzmethode und Kanülensetzmethode, 6) Kompatibilität von Sensorbetrieb und Insulinpumpenbetrieb sowie 7) die Möglichkeit einer Kalibrierung des KMG's mit Insulinflüssigkeit. Der Entscheidungsfindungsprozess führte zu dem Ergebnis, dass Prototypen nach Singleportkonzept B und C weiterentwickelt werden sollten.

Bei den ersten Tierversuchen mit dem Prototyp nach Single-Port-Konzept C (Abb. 40) hat sich dann jedoch herausgestellt, dass das Ansaugen von ISF zu dem in der Infusionskanüle positioniertem KMG große Probleme bereitete. Es konnte keine Korrelation zwischen den mit diesen Prototypen aufgezeichneten Messwerten und den Blutglukosewerten gefunden werden. Aus diesem Grund wurde auf die weitere Verwendung des Prototyps nach Single-Port-Konzept C verzichtet und nur Prototypen nach Single-Port-Konzept B bei den darauffolgenden Humanstudien eingesetzt.

Prinzipiell könnte das Single-Port-Konzept C aber noch weiter getestet und verbessert werden. Durch Änderungen an den Infusions- und Ansaugeräten und durch Minimierung der Todräume in der Kanüle könnte eventuell doch noch ein funktionierendes System geschaffen werden.



## 4.2. Der Prototyp der zweiten Generation nach Singleportkonzept B

Für den Zusammenbau der Single-Port-Prototypen nach Konzept B (Abb. 36) und für das Setzen dieser Prototypen in das Fettgewebe von Probanden (Abb. 37) wurde eine Methodik entwickelt, die größtmögliche Sterilität gewährleistet. Bei allen durchgeführten Humanversuchen wurde diese Methodik erfolgreich angewendet. Aufgrund der hohen Anzahl und Komplexität der darin vorkommenden Arbeitsschritte, könnte ein Patient diese Methodik aber noch nicht allein bei sich selbst anwenden.

Diese hier beschriebene Vorgehensweise könnte jedoch als Basis für eine neue Setzmethodik dienen, die ähnlich einfach wie das Setzen von originalen Sensoren oder das Setzen von Insulininfusionskanülen (Abb. 6) funktioniert. Eine derartige, vereinfachte Setzmethode wurde in einer Patentschrift beschrieben und am Patentamt angemeldet [33]. Weiters könnte auch ein Setzapparat entwickelt werden, der das Einstechen und anschließende Zurückziehen der Setznadel automatisch auf Knopfdruck erledigt und so ein komfortables und standardisiertes Einbringen der Infusionskanüle und des Glukosesensors in das Fettgewebe ermöglicht. Zu diesem automatischen Setzen ist derzeit eine weitere Patentschrift in Arbeit.

### 4.2.1 Problemlose Insulininfusion mit dem Prototyp

Bei den Prototypen der zweiten Generation nach Singleportkonzept B ist der Glukosesensor im Inneren der Insulininfusionskanüle positioniert (Abb. 9B). Die dadurch entstehende Verringerung des Querschnitts des für die Insulinflüssigkeit zur Verfügung stehenden Infusionskanals führt zwangsläufig zu einer Erhöhung des hydraulischen Widerstandes. Bei allen durchgeführten in vivo Versuchen an Probanden mit Typ1 Diabetes konnte aber mithilfe der Insulinpumpe des Prototyps ausreichend Insulin infundiert werden, um beispielsweise die Blutglukose des Probanden nach dem OGTT wieder auf seinen Normalwert zurückzubringen (Abb. 50).

Auch über Nacht konnte die Blutglukose der Probanden problemlos durch die Abgabe von basalen Insulinraten geregelt werden. Bei keinem der Versuche gab es einen Verstopfungsalarm der Insulinpumpe. Es hat sich also herausgestellt, dass die für die Prototypen eingesetzte Insulinpumpe ohne Probleme gegen den leicht erhöhten Widerstand der mit dem KMG versehenen Insulininfusionskanüle arbeiten kann.



#### 4.2.2. Keine Auswirkungen der basalen Insulininfusion auf die Glukosemessung

Das Infundieren von Insulin mit basalen Infusionsraten (getestete Raten zwischen 0-3 U/h) verursachte bei Prototypen, bei denen die Glukosesensoren passend in der Insulininfusionskanüle positioniert waren (Abb. 49C) keine Störungen der Glukosemessung. Die Glukosemessergebnisse der Prototypen lassen sich in den Zeiten basaler Insulininfusion sehr gut mit den Messergebnissen der originalen Kontroll-Sensoren G3 vergleichen die ja auch in den Prototypen zum Einsatz kamen. Sehr deutlich zeigt sich dies in den ersten acht Stunden (Abb. 50) der Versuche an Probanden mit Typ 1 Diabetes.

Auch die gemittelten Glukosemesswerte der Sensoren in den Prototypen stimmen während der ersten acht Stunden der Versuche gut mit den gemittelten Messwerten der Kontroll-Sensoren G3 überein (Abb. 51A). Diese Beobachtungen lassen daher die Schlussfolgerung zu, dass bei basaler Insulininfusion die eingebrachte Insulinflüssigkeit sich so mit der ISF in der Sensorumgebung vermischt, dass daraus keine negativen Einflüsse auf die Qualität der Glukosemessung mit dem Prototyp-Sensor entstehen.

#### 4.2.3. Wirkung von Insulinboli auf die Glukosemessung des Prototyps

Bei der Insulinabgabe in Form eines Bolus über die Prototypen, kam es bei den ersten in vivo Versuchen allerdings zu Einflüssen auf die Glukosemessung der Sensoren der Prototypen. Dies war überraschend, da vorab bei in vitro Versuchen gezeigt werden konnte, dass sich die am Markt erhältlichen Glukosesensoren in Insulinflüssigkeiten gut betreiben lassen und dort langzeitstabil, linear und sensitiv die Glukosekonzentration messen können (Abschnitt 3.1.2.). Wurde bei den in vivo Versuchen jedoch Insulin mit sehr hohen Raten infundiert, kam es zu deutlichen Störungen im Messsignal der Prototypen (Abb. 42), was manchmal zu einer Unterbrechung der Datenaufzeichnung bei der mit Transmitter betriebenen Prototypen führte (Abb. 44).

### 4.3. Mögliche Ursachen für die Wirkung von Insulinboli auf die Glukosemessung der Prototypen

Die möglichen Gründe für die Auswirkungen von Insulinflüssigkeit auf die Sensorperformance der Prototypen lassen sich in zwei Kategorien unterteilen. Zum einen wirkt sich das Insulin auf das Gewebe aus, in dem der Glukosesensor bei einer Anordnung nach Single-Port-Konzept B platziert ist. Zum anderen könnte es bei einem vollständigen Kontakt der Sensormembran mit Insulinflüssigkeit in vivo zu direkten Einflüssen der Insulinflüssigkeit auf den Glukosesensor selbst kommen.

#### 4.3.1. Mögliche Einflüsse von infundierter Insulinflüssigkeit auf die Gewebsumgebung des Glukosesensors

Die Wirkung der Insulinflüssigkeit, die an dieselbe Gewebsstelle infundiert wird, in der auch der KMG des Prototyps positioniert ist, kann wiederum auf zwei Weisen erfolgen.

Einerseits verdünnt die eingeleitete Insulinflüssigkeit die ISF und senkt dadurch die Glukosekonzentration am Ort der Insulingabe. Andererseits führt die Insulingabe zu einer am Abgabeort stark erhöhten Insulinkonzentration, was zu einer höheren, lokalen Glukoseaufnahme der dortigen Zellen und in weiterer Folge zu einer Senkung der Glukosekonzentration in der die Zellen umgebenden ISF führen kann. Diese vom Sensor wahrgenommene Glukosekonzentration ist dann niedriger als die in der ISF von Infusionsfernen Gewebstypen vorherrschende Konzentration.

##### *4.3.1.1. Mögliche Verdünnung der interstitiellen Flüssigkeit durch die Insulinflüssigkeit*

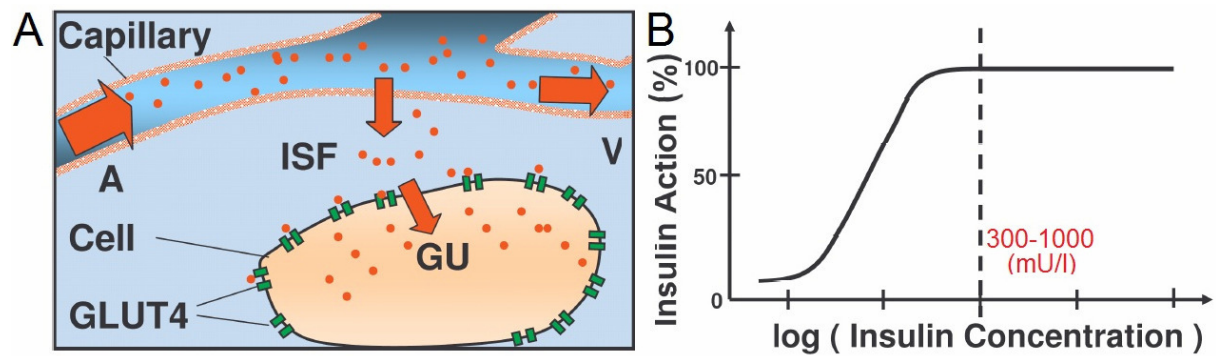
Die gängigen, schnell-wirkenden Insulinanaloga, die bei Insulinpumpen eingesetzt werden, sind, um sie infundierbar zu machen in Wasser gelöst [21, 22]. Dieses kann am Infusionsort eine lokale Verdünnung der ISF und daher auch eine Verringerung der Glukosekonzentration bewirken. Wird nun Insulinflüssigkeit in Form eines Bolus über die Kanüle eines Prototyps abgegeben und erreicht diese Flüssigkeit den Gewebstyp an dem auch der sensitive Bereich des KMG des Prototyps positioniert ist, kann es zu einem kurzzeitigen Sinken der gemessenen Glukosekonzentrationswerte kommen.

#### *4.3.1.2. Mögliche Wirkung des Insulins auf die Glukoseaufnahme der Zellen am Ort der Insulininfusion*

Wird Insulinflüssigkeit über eine Kanüle ins Fett- oder Muskelgewebe infundiert, docken die Insulinproteine an Insulinrezeptoren, die sich an der Oberfläche der Muskel- und Fettzellen befinden, an. Dieses Andocken bewirkt einen Reiz, der die Zellen dazu bringt Glukosetransporter (GLUT-4), die sich im Zellinneren in Vesikeln befinden, in ihre Zellmembran einzubauen (Abb. 53A). Diese Glukosetransporter erleichtern das Einströmen von Glukose in die Zelle [31, 32]. Nach einer Insulininfusion dauert es einige Zeit bis die Insulinmoleküle über die Kapillaren absorbiert und über das Gefäßsystem im Körper verteilt werden und in der Folge den Blutzuckerspiegel senken. Lokal kommt es am Ort der Insulininfusion aber wahrscheinlich sofort zu einer erhöhten Glukoseaufnahme der Zellen und dadurch zu einer Verringerung der Glukosekonzentration der ISF. Der Glukosesensor eines Prototyps hat in seiner Umgebung also eine geringere Glukosekonzentration als ein KMG, der an einer Stelle in den Körper eingebracht wurde, in deren näheren Umgebung kein Insulin infundiert wurde. Eine geringere Glukosekonzentration würde dann zu einer geringeren Produktion von Wasserstoffperoxyd im Sensor (Abschnitt 1.2.1.2. Der kontinuierlich messende Glukosesensor der Firma Dexcom) und dadurch zu einem kleineren Messstrom des Sensors führen. Wird der Glukosesensor des Prototyps aber im Bereich dieser geringeren Glukosekonzentration der ISF mithilfe eines gemessenen Blutglukosewertes kalibriert, wird dies trotzdem zu richtigen Glukosemessergebnissen führen, solange das Verhältnis zwischen Glukosekonzentration am Ort der Insulingabe und Glukosekonzentration im Blut konstant ist. Ein konstantes Verhältnis zwischen der Glukosekonzentration am Ort der Insulingabe und der im Blut könnte dadurch entstehen, dass die Glukoseaufnahme der Zellen durch die maximal vorhandenen Glukosetransporter im Zellinneren begrenzt ist. Insulin führt daher nur bis zu einer gewissen Konzentration zu einer Erhöhung der Glukoseaufnahme von Zellen. Wird diese maximal effektive Insulinkonzentration überschritten, haben die Zellen alle vorhandenen Glukosetransporter in ihre Zellmembranen eingebaut und es kommt zu keiner weiteren Erhöhung der Glukoseaufnahme. Die maximal wirksame Insulinkonzentration liegt zwischen 300 und 1000 mU/l (Abb. 53B) [17]. Die gängigen Insulinflüssigkeiten beinhalten Insulin in einer normierten Konzentration von 100U/ml [21, 22]. Diese Konzentration ist  $10^5$  fach höher als die maximal wirksame Insulinkonzentration der Gewebe. Man kann daher davon ausgehen, dass sich am Ort der Insulingabe durch die äußerst hohe Insulinkonzentration, eine maximale Glukoseaufnahme der Zellen einstellt und ein

Glukosesensor nach seiner Kalibrierung richtige Messergebnisse liefert. Dieses konstante Verhältnis zwischen Blutglukose und Glukosekonzentration am Ort der Insulingabe wurde durch eine Studie der Medizinischen Universität Graz gezeigt [17].

Für einen Prototypen nach Single-Port-Konzept B wäre es daher nötig, in einer Umgebung zu messen, in der die Zellen durch das Vorhandensein einer hohen Insulinkonzentration eine maximale Glukoseaufnahme haben.



**Abb. 53: Insulinwirkung auf Zellen und maximal effektiv wirksame Insulinkonzentration:** **A)** Schematische Darstellung des ISF, einer Kapillare mit arteriellem (A) und venösem (V) Teil und einer Fettzelle, die der maximalen Insulinwirkung ausgesetzt ist. Rote Pfeile und Punkte stellen den Glukosefluss bzw. einzelne Glukosemoleküle dar. Zellen haben eine begrenzte Anzahl von GLUT-4 Glukosetransportern in ihrem Zellinneren. Insulin bewirkt, dass sich diese Glukosetransporter in die Zellmembran einbauen und somit die Glukoseaufnahme der Zelle steigern [17]. **B)** Ab einer Insulinkonzentration von 300 bis 1000 (mU/l) in der Zellumgebung sind alle Glukosetransporter in die Zellmembran eingebaut. Eine höhere Insulinkonzentration als diese maximal wirkende Insulinkonzentration, würde daher keine weitere Erhöhung der Glukoseaufnahme der Zellen bewirken [nach 17].

#### 4.3.2. Mögliche Wirkung der Insulinflüssigkeit auf den Sensor selbst

Bei den durchgeführten in vitro Tests konnte gezeigt werden, dass ein KMG in einer Insulinlösung über längere Zeit ohne Sensitivitätsverlust betrieben (Abb. 33) und auch unterschiedliche Glukosekonzentrationen mit einer hohen Linearität gemessen werden können (Abb. 34A).

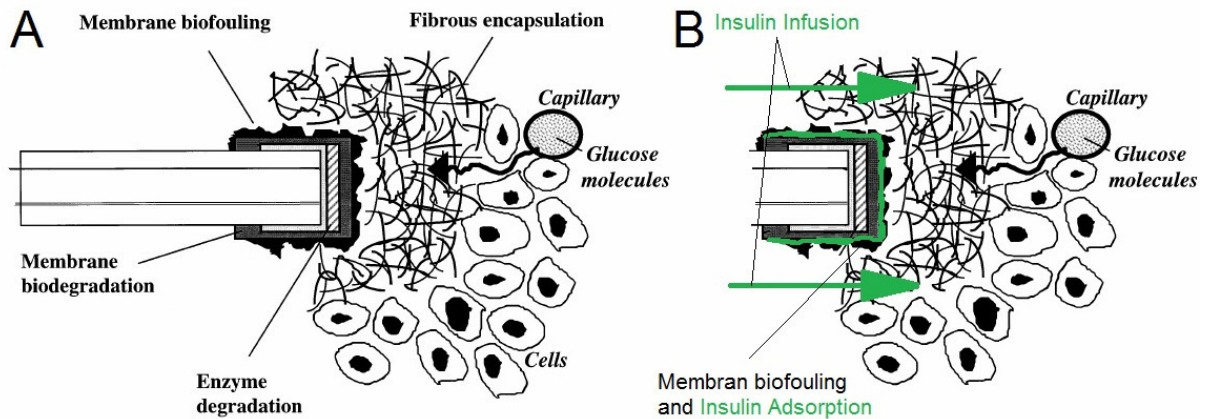
Bei den ersten in vivo Versuchen kam es während der Abgabe eines Insulinbolus über den Prototyp jedoch zu Störungen bei der mit dem Prototypen durchgeführten Glukosemessung (Abb. 42, 44). Für diese Störungen im Sensorsignal eines Prototyps kann aber wahrscheinlich nicht allein die Insulinwirkung auf das den Sensor umgebende Gewebe verantwortlich gemacht werden. Es kann wohl auch zu Einflüssen der Insulinflüssigkeit auf den Sensor selbst gekommen sein. Drei weitere, den Sensor betreffende Ursachen werden im Folgenden näher betrachtet.

#### *4.3.2.1. Möglicher Einfluss der Flüssigkeitsleitfähigkeit auf den Messstrom eines KMG's*

Die in Insulinpumpen eingesetzten Insulinflüssigkeiten beinhalten, neben den Insulinproteinen, Wasser als Lösungsmittel, verschiedene für die Haltbarkeit nötige Zusatzstoffe und kleinmolekulare Ionen zur Einstellung des pH-Wertes der Lösung [21, 22]. Messungen der elektrischen Leitfähigkeit von Insulinflüssigkeiten haben ergeben, dass die elektrische Leitfähigkeit dieser Flüssigkeiten nur ungefähr 20% der Leitfähigkeit der ISF von Fett- und Muskelgeweben ausmacht [17]. Sobald nun eine Insulinflüssigkeit mit erhöhter Rate ins Gewebe eingebracht wird, kann sich der Leitwert des Mediums, in dem der Glukosesensor eines Prototyps arbeitet, stark ändern und Störungen im Sensorsignal hervorrufen.

#### *4.3.2.2. Möglicher Einfluss der Adsorption von Proteinen an der Membran eines KMG's*

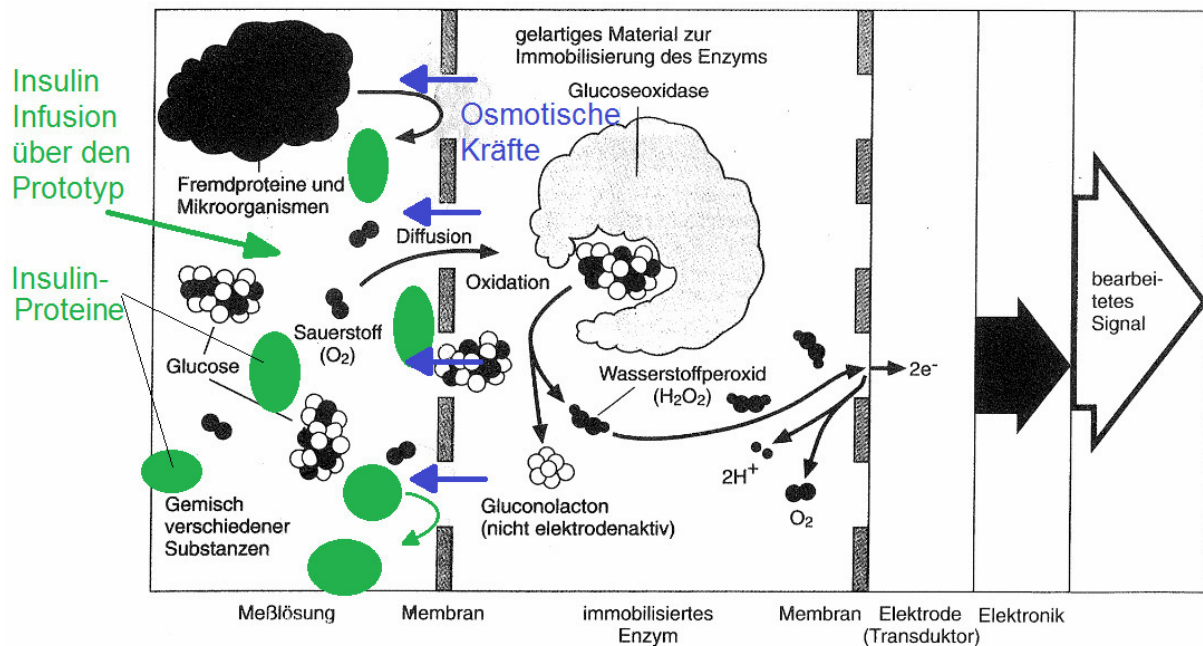
Beim Betreiben von in vivo Biosensoren stellt die Anlagerung von Proteinen, Zellen und anderen biologischen Materialien an den Oberflächen von implantierten Sensorbestandteilen (Biofouling) ein großes Problem dar (Abb. 54A) [37]. Die Anlagerung von Proteinen an festen Oberflächen wird hauptsächlich durch auftretende elektrostatische Kräfte und hydrophobe Effekte verursacht [38, 39, 40]. Wird nun ein KMG in den Körper eingebracht, werden sich Proteine aus der den Sensor umgebenden ISF (z.B. Albumin, das dort mit einer Konzentration von ungefähr 1% vorkommt [34]) an der Sensor-Membran anlagern. Die Veränderungen der Diffusionswege der Glukose- und Sauerstoffmoleküle, die durch diese Anlagerungen entstehen können, machen sich in weiterer Folge in einer Sensordrift und in einer Sensitivitätsänderung des Sensors bemerkbar. Häufige Kalibrationen können die Auswirkungen dieser Effekte auf den Sensor minimieren. Da Insulinproteine sich generell stark an Kunststoffoberflächen anlagern können [35], kann es sein, dass eine Einbringung von Insulinflüssigkeit unter hohen Raten, eine Änderung bei der an der Membran angelagerten Proteinschicht bewirkt (Abb. 54B) und sich in weiterer Folge als Störungen im Sensorsignal niederschlägt.



**Abb. 54:** Schematische Darstellung eines ins Gewebe implantierten Glukosesensors und der damit verbundenen Reaktion des Gewebes: **A)** Neben Störungen wie Enzym-Degradation, kommt es auch zu mehreren physiologischen Störwirkungen, wie Membran-Biodegradation, fibrinogener Einkapselung und Membran-Biofouling [5]. **B)** Erreicht Insulinflüssigkeit den sensitiven Bereich des Sensors können zusätzliche Störungen aufgrund der Anlagerung von Insulin an die Sensormembran und der dadurch entstehenden Veränderungen der Diffusionswege entstehen.

#### 4.3.2.3. Möglicher Einfluss osmotischer Kräfte an der Membran eines KMG's

Eine weitere mögliche Störquelle wären osmotische Kräfte, die während der Insulin-Bolusgabe an der Sensormembran auftreten können. Da Insulinmoleküle (6000 Da) die Sensormembran wegen zu kleiner Porengröße nicht oder nur sehr schlecht passieren können, kann eine höherratige Einbringung von Insulin an der Membran osmotische Ausgleichskräfte generieren, die einen Flüssigkeitsfluss vom Sensorinneren durch die Membran in die ISF zur Folge hat. Dieser damit verbundene Abtransport von kleinmolekularen Substanzen (Ladungsträger, Glukosemoleküle, Sauerstoffmoleküle, usw.) könnte dadurch zu einer Destabilisierung des Prototyp-Sensors führen (Abb.55).



**Abb. 55: Schematische Darstellung des sensitiven Bereiches eines Glukosesensors, der schnell in Kontakt mit Insulinproteinen kommt:** Die während einer höherrätigen Insulininfusion angelieferten Insulinproteine (grün) können die Sensormembran nicht oder nur langsam passieren. Dabei können osmotische Ausgleichsvorgänge ausgelöst werden (blaue Pfeile; Flüssigkeitsfluss vom Sensorinneren ins umliegende Interstitium), die die Sensorfunktion stören [modifizierte Darstellung von 36].

#### 4.4. Getroffene Maßnahmen zur Verbesserung der Sensorperformance des Prototyps

Da bei den ersten durchgeführten in vivo Versuchen Sensor-Instabilitäten nach der Insulin-Bolusgabe aufgetreten sind, wurden mehrere Maßnahmen getroffen, die diese Instabilitäten minimierten bzw. vermieden. Die getroffenen Maßnahmen waren 1) die Prä-Konditionierung des Sensors mit Insulin, 2) die Bolusgabe des Insulins im „extended Bolus“-Modus und 3) die Optimierung der Positionierung des Sensors in der Kanüle des Prototyps.

##### 4.4.1. Konditionieren der Glukosesensoren mit Insulinflüssigkeit vor den Kalibrierungen

Bei den Versuchen an Ratten (Abb. 42) und an gesunden Probanden (Abb. 46) ergab sich, dass bei wiederholter Abgabe eines Insulinbolus, das Ausmaß der Störung im Signal eines in einem Prototyp eingesetzten Glukosesensors von Bolusgabe zu Bolusgabe geringer wurde. Aus dieser Beobachtung und aus dem Grund, dass Glukosesensoren der Prototypen in einer Gewebsumgebung mit stabiler und maximaler Glukoseaufnahme der Zellen kalibriert werden sollten (Abb. 53), wurde bei den Versuchen an den Probanden mit Typ1 Diabetes vor jeder



Kalibrierung ein kleiner Insulinbolus von 1U abgegeben. Dabei wurde so vorgegangen, dass die basale Insulininfusionsrate solange abgeschaltet wurde, bis sich aus der abgewarteten Zeit und der Infusionsratenhöhe eine Insulinmenge von 1U ergab, die dann auf einmal als Bolus abgegeben wurde. Dieser Bolus stellte dann sicher, dass der Glukosesensor bereits am Anfang des Versuches vollständig in Kontakt mit der Insulinflüssigkeit kam.

Diese Sensorkonditionierung mit Insulin könnte möglicherweise an der Sensormembran eine stabile Schicht adsorbierten Insulins geschaffen haben, sodass während der späteren Abgabe von Insulinboli Änderungen an der Adsorptionsschicht und damit verbundene Störeinflüsse minimiert wurden. Weiters könnte diese Sensorkonditionierung mit Insulin sichergestellt haben, dass das Gewebe, in dem der Glukosesensor arbeitete, schon zum Kalibrierungszeitpunkt eine stabile und maximale Insulinwirkung auf die Glukoseaufnahme hatte.

#### 4.4.2. Schonendere Abgabe der Insulinflüssigkeit im „extended Bolus“-Modus

Das Insulin, das den Probanden vor einem OGTT verabreicht wurde, wurde bei den Versuchen an Probanden mit Typ 1 Diabetes nicht als normaler Bolus, sondern im „extended Bolus“-Modus abgegeben. Dieser bei Insulinpumpen abrufbare Abgabemodus erlaubt es, die vorgesehene Menge Insulin über einen erweiterten Zeitraum (z.B. 30min) in das Gewebe einzubringen. Da bei den Versuchen eine Bolusdauer von 30 min verwendet wurde, wurde die bei dieser Bolusgabe auftretenden Infusionsraten, gegenüber der bei normalen Bolusgabe auftretenden, um den Faktor 6 verringert. Die infundierte Insulinflüssigkeit wird wahrscheinlich dadurch viel stärker mit ISF verdünnt bevor sie den sensitiven Bereich des Sensors erreicht. Mögliche Störeinflüsse durch Verdünnung der ISF und Änderung Leitfähigkeit in der Umgebung des Sensors könnten dadurch verringert worden sein.

#### 4.4.3. Optimierte Positionierung des Sensors in der Kanüle des Prototyps

Erste Versuche bei gesunden Probanden und Probanden mit Typ 1 Diabetes zeigten, dass die Güte der Glukosemessung mit dem Prototypen auch mit der Positionierung des Sensors in der Kanüle des Prototyps zusammenhängt (Abb. 49). Bei einem zu großen Abstand zwischen sensitiven Bereich des Sensors und dem Kanülenende waren nach dem Übergang von basaler Insulininfusion zur Bolusgabe große Instabilitäten im Sensorsignal bemerkbar (Abb. 47).

Weiters waren bei einer zu nahen Positionierung des sensitiven Bereiches des Sensors am Kanülenende auch Instabilitäten im Sensorsignal nach größeren Änderungen bei der basalen Infusionsrate bemerkbar (Abb. 48).

Die kleinsten Störungen während der basalen Insulininfusion und nach dem Übergang zur Bolusgabe wurden bei einem Abstand zwischen Sensor- und Kanülenende von 4,5mm beobachtet. Mit dieser optimierten Positionierung des Sensors in der Kanüle konnten möglicherweise jene Störeinflüsse, die durch eine Verdünnung der ISF und Änderung Leitfähigkeit in der Umgebung des Sensors während einer Bolusgabe entstehen, minimiert werden. Weiters konnte bei dieser Positionierung möglicherweise eine effektive Konditionierung durchgeführt werden, sodass einerseits an der Sensormembran eine stabile Schicht adsorbierenden Insulins geschaffen wurde und, andererseits, das Gewebe, in dem der Glukosesensor arbeitete, schon zum Kalibrierungszeitpunkt eine stabile und maximale Insulinwirkung auf die Glukoseaufnahme hatte.

#### 4.5. Vergleich der Genauigkeit der Prototypen mit den Kontroll-Sensoren.

Mit den getroffenen Maßnahmen beim Betreiben des Prototyps konnten die durch die Bolusgabe verursachten Störungen stark reduziert werden. Die Ergebnisse der Versuche an Typ 1 Diabetikern, bei denen alle oben beschriebenen Maßnahmen getroffen wurden, sind in Abbildung 50 und Abbildung 51 dargestellt. Man erkennt, dass während der Fastenphase mit basaler Insulingabe und während des größten Teils des OGTTs der Prototyp ähnlich gut der Blutglukose folgte wie die Kontroll-Sensoren G3 und G4. Für eine quantitative Beurteilung der Güte der Übereinstimmung zwischen Blutglukosewerte und der Glukosewerte der Kontroll-Sensoren bzw. Prototypen wurden die ARD Werte bestimmt und eine Bland & Altman Analyse so wie eine Clark Error Grid Analyse durchgeführt.

##### 4.5.1. Vergleich anhand der berechneten ARD Werte

Die für den Prototypen und Kontroll-Sensoren erhaltenen ARD Werte (Tabelle 3) zeigen, dass sich der Prototyp gleich gut zur Glukosekonzentrationsbestimmung eignet wie die Kontroll-Sensoren. Die medianen ARD Werte lagen für Prototyp und Kontroll-Sensoren bei 30% und die mittleren ARD Werte bei 40%. Die hier erhaltenen ARD Werte sind höher als die bei früheren Studien gefundenen Werte [18, 19, 20]. Bei diesen Studien wurde für das Sensorsystem von Dexcom (G3) eine mittlere absolute Abweichung von 16,5 % gefunden.

Für die Bestimmung der ARD Werte wurde in diesen Studien Sensordaten von Versuchen, die über 7 Tage (der Lebensdauer der Sensoren) liefen, herangezogen. Es ist bekannt, dass die Glukosesensoren von Dexcom erst nach 2 bis 3 Einsatztagen ihre größte Genauigkeit erreichen. Die große Differenz zwischen diesen und unseren ARD Werten lässt sich daher damit erklären, dass in den veröffentlichten Studien die Bewertung der Sensorgenauigkeit über die volle Sensorlebenszeit erfolgte, während bei unserer Studie die Bewertung der Sensorgenauigkeit während des ersten Einsatztages der Sensoren (über die ersten 20 Stunden) gemacht worden ist.

#### 4.5.2. Vergleich anhand der Bland & Altman Analyseergebnisse

Die bei der Bland & Alman Analyse erhaltenen Standardabweichungen waren für Prototyp und Kontroll-Sensoren ähnlich hoch (Tabelle 4). Die Standardabweichung für den Prototyp lag bei 31,02%, die für den Kontroll-Sensor G3 bei 37,39%, und die für den Kontroll-Sensor G4 bei 30,19%. Diese für Prototyp und Kontroll-Sensoren vergleichbaren Werte der Standardabweichung weisen darauf hin, dass die Glukosekonzentrationsbestimmung mit dem Prototyp ähnliche Güte besitzt wie die mit den Kontroll-Sensoren. Die bei der Bland & Alman Analyse erhaltenen Mittelwert lag für den Prototyp bei 15,67 %, für den Kontroll-Sensor G3 bei 1,27 % und für den Kontroll-Sensor G4 bei -6,92 %. Das bedeutet, dass im Mittel die Glukosemessung des Prototyps zu niedere Werte ergeben hat, die mittleren Glukosewerte des G3 Sensors sehr genau mit den mittleren Blutglukosewerten übereinstimmten und dass die Glukosemessung des G4 Sensors im Mittel zu hoch lag. Für den Prototyp kann dieser Mittelwert durch die teilweise niedrigeren Messwerte während des OGTTs (Abb. 51B) erklärt werden. Bei dem Kontroll-Sensor G4 liegt es daran, dass die Glukosemessungen vor der zweiten Kalibrierung teilweise zu hoch gelegen waren (Abb. 51D).

#### 4.5.3. Vergleich anhand der Error Grid Analyseergebnisse

Die Clark Error Grid Analyse (Abb. 52B, 52D, 52F) zeigte, dass 95% der mit dem Prototyp und mit den Kontroll-Sensoren gemessenen Glukosewerte in den klinisch akzeptablen Regionen A und B zu liegen kamen (Tab.5). Ungefähr 5% der mit Dem Prototyp als auch mit den Kontrollsensoren gemessenen Glukosewerte vielen in den für die Diabetetherapie kritische Regionen C, D und E (Tab.5). Angesichts dieser Glukosewerte-Verteilung im Error

Grid Diagramm kann gesagt werden, dass die Güte der Glukosemessung des Prototyps vergleichbar mit der der Kontroll-Sensoren war.

## 4.6. Schlussfolgerungen

### 4.6.1. Erreichen der Ziele der Diplomarbeit

Die Ziele der vorliegenden Diplomarbeit konnten erfüllt werden. Es wurden mehrere Prototypen der ersten Generation, die sich in der Kombinationsart von Kanüle und Sensor unterschieden gebaut. Unter Anwendung mehrerer Beurteilungskriterien wurde der geeignetste Prototyp ausgewählt und zu einem Prototyp der zweiten Generation weiterentwickelt. Dieser Single-Port-Prototyp der zweiten Generation wurde dann in einer in vivo Studie an Ratten, sowie bei Studien an gesunden Probanden und Typ 1 Diabetikern getestet. Die Ergebnisse zeigten, dass die Insulinabgabe über den Prototyp gleich gut bewerkstelligt werden kann wie über eine herkömmliche Infusionskanüle. Weiters hat sich gezeigt, dass nach Einführung gewisser Maßnahmen beim Betreiben des Prototyps, die Genauigkeit der Glukosemessung mit dem Prototyp vergleichbar mit der Messgenauigkeit parallel eingesetzter Kontroll-Sensoren ist. Herkömmliche Glukosesensoren und Insulinabgabegeräte können daher in einer Single-Port-Form kombiniert und zur Realisierung einer künstlichen Bauchspeicheldrüse für eine Vereinfachung und Verbesserung der Therapie von Typ 1 Diabetes verwendet werden.

### 4.6.2. Weitere geplante Versuche

Für eine erfolgreiche Realisierung einer künstlichen Bauchspeicheldrüse mit dem Single-Port-Ansatz müssen jedoch noch weitere Versuche unternommen werden, um die Mechanismen der störenden Wirkung von Insulinboli auf die Glukosesensoren genauer zu beschreiben und zu verhindern. Es sind daher weitere Experimente geplant, die sich mit der Adsorption von Insulin an der Sensormembran, mit der Wirkung von Änderungen der Leitfähigkeit auf die Glukosesensoren und mit eventuell auftretenden osmotischen Ausgleichsvorgängen während der Insulinbolusgabe beschäftigen.

#### 4.6.3. Kooperation mit der Firma Dexcom

In den letzten Monaten zeigte die Firma Dexcom ein großes Interesse an der Realisierung eines Single-Port-Therapiegerätes mit Einsatz eines Dexcom Glukosesensors. Das ist auch der Grund, warum diese Diplomarbeit derzeit noch nicht öffentlich gemacht werden kann. Eine erweiterte Kooperation mit Dexcom würde einen großen Schritt zur Realisierung eines Single-Port-Medizinproduktes bedeuten. Dexcom könnte nämlich wichtige Informationen über die Detail-Beschaffenheit des Glukosesensors liefern und auch offen legen, welche Algorithmen hinter der Kalibrierung und der Störunterdrückung liegen. Auch eventuell nötige Änderungen in der Sensorgeometrie, für die Behebung von Störungen bei der Abgabe von Insulinboli, könnten von der Firma Dexcom leichter umgesetzt werden.

## 5. Referenzen

1. Daneman D: Type 1 diabetes. *Lancet* 367:847-858, 2006
2. Mathis D, Vence L, Benoist C: beta-Cell death during progression to diabetes. *Nature* 414:792-798, 2001
3. Langin D: Diabetes, Insulin Secretion, and the Pancreatic Beta-Cell Mitochondrion. *N Engl J Med*, Vol. 345, No. 24 , 2001
4. Dietel M, Suttorp N, Zeitz M: *Harrisons Innere Medizin Band 2*. ABW Wissenschaftsverlag Berlin; 17.Auflage, 2008
5. Moller DE: New drug targets for type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Nature* 414:821-827, 2001
6. Owens DR: New horizons- alternative routes for insulin therapy. *Nat Rev Drug Discov* 1:529-540, 2002
7. Lenhard MJ, Reervers GD: Continuous subcutaneous insulin infusion: a comprehensive review of insulin pump therapy. *Nat Rev Drug Discov* 1:529-540, 2002
8. Barnett A, Owens D: Insulin analogues. *Lancet* 349:47-51,1997
9. Henderson J, Moss M: A Morphometric Study Of The Endocrine And Exocrine Capillaries Of The Pancreas. *Quarterly Journal of Experimental Physiology* 70:347-356, 1985
10. Boland E, Monsod T, Delucia M, Brand CA, Fernando S, Tamborlane WV: Limitations of conventional methods of self-monitoring of blood glucose: lessons learned from 3 days of continuous glucose sensing in pediatric patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 24:1858-1862, 2001
11. The Diabetes Control and Complications Trial Research Group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications insulin-dependent diabetes melitus. *N Engl J Med* 329:977-986, 1993
12. Kollipara S, Silverstein J, Marschilok K: Diabetes Technologies and Their Role in Diabetes Management. *American Journal of Health Education* 40:292-297,2009
13. Wang J: Electrochemical Glucose Biosensors. *Chem Rev* 108:814-825, 2008
14. Hovorka R: Closed-loop insulin delivery: from bench to clinical practice. *Nat.Rev.Endocrinol.* 7:385-395, 2011
15. Cobelli C, Renard E, Kovatchev B: Artificial Pancreas: Past, Present, Future. *Diabetes* 60:2672-2682,2011

16. Lindpointner S, Korsatko S, Khöler G, Khöler H, Kaidar R, Yodfat O, Schaller R, Schaup L, Ellmerer M, Pieber TR, Regittnig W: Use of the Site of Subcutaneous Insulin Administration for the Measurement of Glucose in Patients with Type 1 Diabetes. *Diabetes Care* 33:595-601, 2010
17. Lindpointner S, Korsatko S, Khöler G, Khöler H, Schaller R, Schaup L, Ellmerer M, Pieber TR, Regittnig W: Glucose Levels at the Site of Subcutaneous Insulin Administration and Their Relationship to Plasma Levels. *Diabetes Care* 33:833-838, 2010
18. Mazze RS, Strock E, Borgman S, Wesley D, Stout P, Racchini J: Evaluating the accuracy, reliability, and clinical applicability of continuous glucose monitoring (CGM): Is CGM ready for real time? *Diabetes Sci Technol* 11:11-18, 2009
19. Garg SK, Smith J, Beatson C, Lopez-Baca, Voelmle M, Gottlieb PA: Comparison of accuracy and safety of the SEVEN and the Navigator continuous glucose monitoring system. *Diabetes Technol Ther* 11:65-72, 2009
20. Russell S, Nathan DM, El-Khatib FH, Damiano ER: A comparative analysis of three continuous glucose monitors – not all are created equal. Abstract presented at the 5th International Conference on Advanced Technologies & Treatments for Diabetes, February 8-11, 2012, Barcelona, Spain
21. European Medicines Agency- SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000088/WC500050332.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000088/WC500050332.pdf)
22. European Medicines Agency- SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Product\\_Information/human/000258/WC500030372.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000258/WC500030372.pdf)
23. Zhang Y, Hu Y, Willson GS : Elimination of the Acetaminophen Interference in an Implantable Glucose Sensor. *Anal.Chem.* 66:1183-1188,1994
24. WO 084130, Patent: Low Oxygen In Vivo Analyte Sensor, 2007 Schults M, Dexcom
25. Cline GW, Johnson K, Regittnig W, Perret P, Tozzo E, Xiao L, Damico C, Shulman GI: Effects of a novel glycogen synthase kinase-3 inhibitor on insulin-stimulated glucose metabolism in Zucker diabetic fatty (fa/fa) rats. *Diabetes* 51:2903-10, 2002
26. A. van der Weerd, L. Klein, C. Visser, F. Visser, A. Lammertsma: Use of arterialised venous instead of arterial blood for measurement of myocardial glucose metabolism during euglycaemic-hyperinsulinaemic clamping. *European Journal of Nuclear Medicine* Vol. 29, No. 5, 2002



27. A Brehm, M Roden: Glucose Clamp Techniques. In M Roden: Clinical Diabetes Research: Methods and Techniques. John Wiley & Sons: 44-70. 2007
28. American Diabetes Association: Standards of Medical Care in Diabetes-2010. Diabetes Care Vol.33: Supplement 1, 11-61, 2010
29. Bland J, Altman D: Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 372: 307-310, 1986
30. Clarke W, Cox D, Gonder-Frederick L, Carter W, Pohl S: Evaluating Clinical Accuracy of Systems for Self-Monitoring of Blood Glucose. Diabetes Care 10: 622-628, 1987
31. Watson R, Kanzaki M, Pessin J: Regulated membrane trafficking of the insulin-responsive glucose transporter 4 in adipocytes. Endocr Rev 25:177- 204, 2004
32. Shepherd P, Kahn B: Glucose transporters and insulin action-implications for insulin resistance and diabetes mellitus. N Engl J Med 341:248-57, 1999
33. US 61/545,77, Patent Anmeldung: Medical apparatus having infusion and detection capabilities, 2011 Regittnig W, Medizinische Universität Graz
34. Ellmerer M, Schaupp L, Brunner GA, Sendlhofer G, Wutte A, Wach P, Pieber T: Measurement of interstitial albumin in human skeletal muscle and adipose tissue by open-flow microperfusion. Am J Physiol Endocrinol Metab 278:E352- E356, 2000
35. Kraegen E, Lazarus L, Meler H, Campbell L, Chia Y: Carrier solutions for low-level intravenous insulin infusion. Br Med J 3:464-466, 1975
36. Die Funktionsweise von Biosensoren. Spektrum der Wissenschaft: Dossier: Mikrosysteme S85; Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH GER, 1996
37. Wisniewski N, Reichert M: Methods for reducing biosensor membrane biofouling. Colloids and Surfaces 18:197–219, 2000
38. Hlady V, Buijs J: Protein adsorption on solid surfaces. Curr Opin Biotechnol 17:72-77, 1996
39. 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
40. Norde W, Lyklema J: Why proteins prefer interfaces. J Biomater Sci Polym: 183-202, 1991