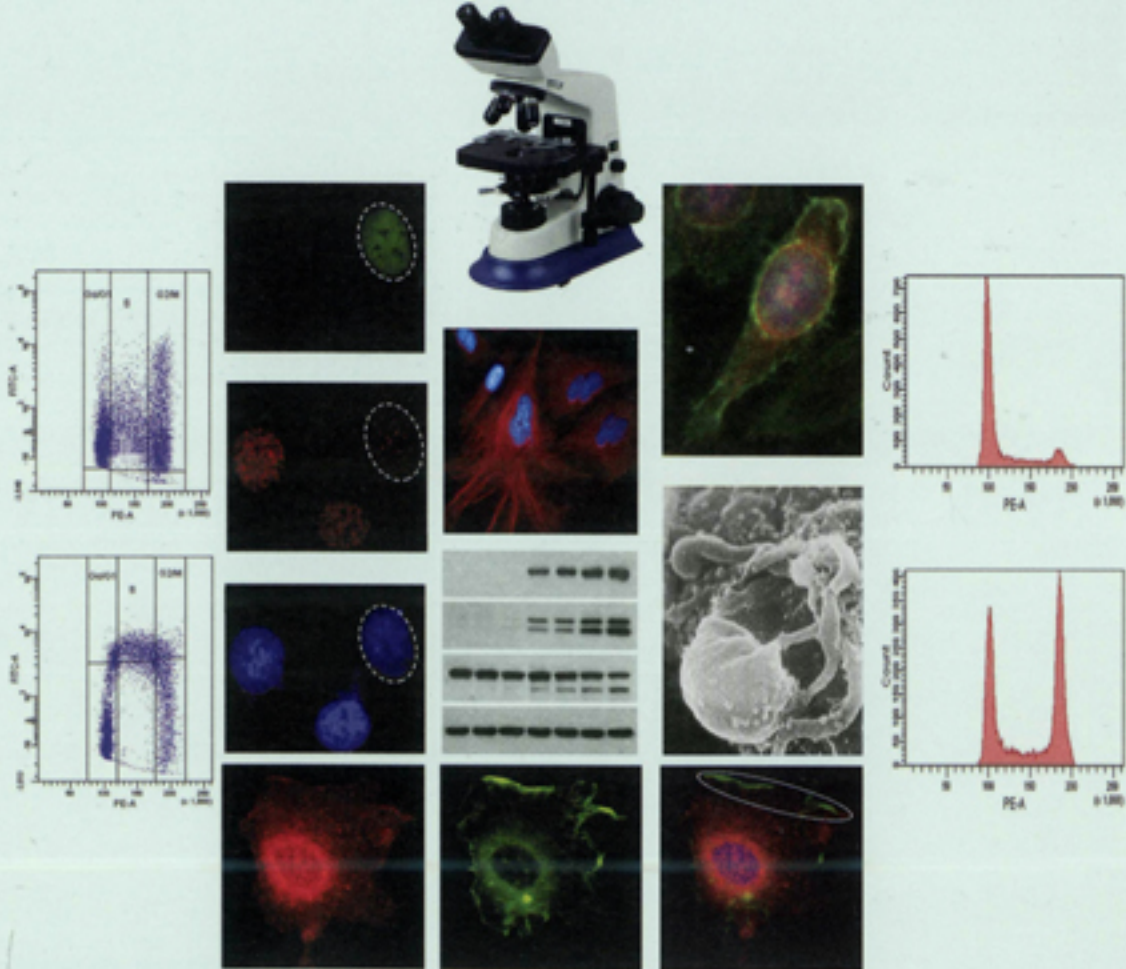




HÜCRE ÖLÜMÜ ARAŞTIRMA DERNEĞİ

I. HÜCRE ÖLÜMÜ ARAŞTIRMA TEKNİKLERİ TEORİK KURSU



Yer: DEÜ Tıp Fakültesi Derslikler Binası Kurucu
Öğretim Üyeleri Konferans Salonu

İzmir - 2011

DENEYSEL ALLOJENİK ADACIK NAKLİNDE APOPTOZ ÜZERİNDEN IMMUN TOLERANS GELİŞİMİ

Salih Şanlıoğlu

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Gen ve Hücre Tedavi Merkezi, Antalya

Tip 1 diyabet aslında pankreastaki insülin üreten beta hücre kümelerinin (adacıkların) vücudumuzun bağışıklık sistemi hücrelerinden biri olan T hücrelerinin saldırısına uğraması sonucu ortaya çıktığından, bu saldırıyı gerçekleştiren T hücrelerinin moleküler bir yaklaşımla ortadan kaldırılması, öteden beri bizim denemeyi çok arzu ettiğimiz bir tedavi yaklaşımıydı. Buradan hareketle Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Gen Tedavi Merkezi'nde; adacıklarda sentezlendiğinde nakil sonrası bu adacıklara saldıran T hücrelerini ortadan kaldıracak deneysel bir gen tedavi yaklaşımını, 4 yıl süren bir çalışma sonunda geliştirmeyi başardık. TÜBİTAK destekli bu çalışmamızda Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Gen Tedavi Merkezi'nden Doç. Dr. Ahter D. Şanlıoğlu, Dr. Ercüment Dirice, Araş. Gör. Sevim Kahraman, Araş. Gör. Saffet Öztürk, Prof. Dr. Mustafa Kemal Balcı, Harvard Üniversitesi Joslin Diyabet Merkezi'nden Doç. Dr. Abdulkadir Ömer ve Iowa Üniversitesi Gen Tedavi Merkezi'nden Prof. Dr. Thomas Griffith yer aldı. Bu çalışmamızın sonuçları dünyaca ünlü James M. Wilson'ın editörlüğünü yaptığı Amerika'nın gen tedavisi alanında ilk dergisi olan Human Gene Therapy dergisinin 2009 yılı Ekim ayı sayısında yayınlandı. Aynı zamanda bu çalışmamız adacık hücre nakline getirdiği yenilikler sebebiyle aynı sayıda derginin kapak konusu oldu (Dirice, Sanlioglu et al. 2009). Biz de apoptoz üzerinden allojenik adacık nakli reddinin ortadan kaldırılabilceğini gösteren bu stratejiyi; Hücre Ölümü Araştırma Derneği'nin 2011 yılı 1. Hücre Ölümü Araştırma Teknikleri Kursu sebebiyle sizler için kaleme aldık.

Her canlıda olduğu gibi bizimde yaşamak için enerjiye ihtiyacımız var. Normalde dışardan gıdalarla aldığımız veya karaciğerdeki depolarımızdan kana salgıladığımız şeker (glükoz), insülin adı verilen hormon sayesinde hücrelerimize girer ve orada yakılarak vücut için gerekli enerjiye dönüşür. Yani kan şekerimiz pankreasın beta hücrelerinde sentezlenen insülin sayesinde düşer. Bu amaçla, beta hücreleri kan şeker düzeyini kendince tartarak doğru zamanda doğru miktardaki insülini kana salar. Gerek insülin üretiminin ve salınımının gerekse insülin hormonunun hücreler üzerinde etki mekanizmasının bozulması sonucu kan şekerinin yüksekliği ile seyreden hastalığa **şeker hastalığı** diyoruz. Şeker hastalığı iki farklı formda karşımıza çıkıyor. Pankreastaki insülin sentezleyen beta hücrelerinin vücudumuzun kendi hücreleri tarafından yabancı olarak algılanması sonucu parçalanmasıyla ortaya çıkan insülin yokluğuna insülin bağımlı şeker hastalığı (Tip 1 diyabet) diyoruz. Kanımızda yeterli seviyede insülin olmasına rağmen bu hormonun hücreler üzerindeki etki mekanizmasının bozulması sonucu açığa çıkan insülin dirençliliğine de insülin bağımlı olmayan şeker

hastalığı (Tip 2 diyabet) denir. Dünyada malesef 250 milyon diyabetli hasta var ve bunlardan 25 milyonu Tip 1 diyabetli. Türkiye’de ise 6 milyondan fazla diyabetli hasta (gizli diyabetle birlikte gerçek rakam 10 milyonun üzerinde) olduğu bilinmektedir. Genelde tip 1 diyabet 35 yaş öncesi (ortalama 12-13 yaş) ortaya çıktığından hastalar genelde çocuk. Başlangıçta hastalık ender görülen bir hastalık gibi algılansa da her bin çocuktan üç tanesinin yetişkin çağa gelmeden Tip 1 diyabete yakalanıyor olması gerçeği hastalığın sanıldığı kadar nadir görülmediğini düşündürüyor.

Günümüzde Tip 1 diyabetli hastaların kan şekerini kontrol altında tutmanın tek yolu insulin enjeksiyonudur. İnsülin tedavisinin esas amacı da yüksek kan şekerini normal düzeylere çekmektir. Ancak gerçekte hastaların kan şeker düzeylerini uzun yıllar insulin enjeksiyonuyla kontrol etmek oldukça zordur. Nihayetinde insulin enjeksiyonuna rağmen zaman içerisinde hastalarda körlük, böbrek yetmezliği, felç, iyileşmeyen yaralar, kalp ve damar hastalıkları gibi ciddi komplikasyonlar gelişebilmektedir. Aslında Tip 1 diyabet hastalarında kabul görmüş en kalıcı çözüm yolu pankreas naklidir. Ancak bunun için hastaların büyük bir operasyon geçirmesi ve nakil yapılan organın reddedilmemesi için hastaların hayatları boyunca kendi bağışıklık sistemlerini baskılayıcı ilaç kullanmaları gerektiğini, bunların da bir takım ciddi dezavantajları olduğunu unutmamız gerekiyor. Bu nedenle pankreas transplantasyonu sadece böbrek nakline ihtiyaç duyan (böbreği iflas etmiş) ileri evre diyabetik hastalar için önerildiğinden, bu yöntemin Tip 1 diyabetli hastalar için yaygın bir kullanım alanı bulamayacağını şimdiden kabullenmek zorundayız.

Tip 1 diyabet tedavisinde pankreas organ nakline alternatif olabilecek en iyi yöntem pankreas beta hücre (adacık) naklidir. Bu yöntemde beyin ölümü gerçekleşmiş kişilerin pankreasından izole edilen beta hücreleri Tip 1 diyabetli hastaların karaciğerine nakledilir. Burada karaciğere nakledilen pankreas adacıklarının insulin salgılayarak hastaların uzun süreli insulin ihtiyacını karşılaması, dolayısıyla onları şeker hastalığından koruması beklenir. Adacık nakil işlemi basit gibi görünse de beta hücre izolasyonunda ciddi zorluklarla karşılaşıyoruz. Aslında pankreastan beta hücrelerini adacıklara zarar vermeden izole etmek oldukça zor bir işlem. Bunu başarsanız bile nakil sonrası alıcının bağışıklık hücrelerinin doku uyumsuzluğundan dolayı adacıklara saldırısını bir şekilde önlemeniz gerekiyor. Bu nedenle adacık graft reddini engelleyen bağışıklık sistemini bloke eden ilaçları nakil sonrası mutlaka kullanmak zorundayız. Ancak bu sayede kan şeker düzeyini uzun süreli olarak kontrol altında tutmayı başarabiliriz. Bir insan pankreasındaki 1 milyon adacıktan % 80’inden fazlasının kaybedilmesi şeker hastalığına yol açmakla birlikte, kan şekerinin normal seviyelere çekilmesi için toplam adacıkların % 20’sinden çok daha fazlasını nakletmek gerekiyor. Bu bağlamda bir hastada diyabetin gerçek manada düzeltilmesi için en azından yetişkin birey başına 800,000 adacık nakline ihtiyaç var. Her ne kadar bir insan pankreasında 1 milyon adacık olsa da, izolasyon işlemi esnasında bu adacıkların tamamının sağlığı

korunamadığından; hasta başına bir seferlik yapılacak adacık nakil işlemi için en az iki tane insan pankreasına ihtiyaç duyulduğu unutulmamalıdır.

Adacık naklinin ilk denemelerinde başarı oranının oldukça düşük olduğunu söyleyebiliriz. Örneğin bu işlemin uygulandığı 10 hastadan sadece bir tanesinde nakledilen adacıklar ancak bir yıl süren insülin senteziyle bu hastayı diyabetten koruyabildi. Hastaların dışardan insülin enjeksiyonuna ihtiyaç duymaksızın yaşayabilmesine insülin bağımsızlığı diyoruz. Sonraki yıllarda adacık izolasyon ve saflaştırma tekniklerinde kaydedilen ilerlemeler sayesinde yıllık adacık nakli başarı düzeyi %10 dan %50' ye çıktı. Yani adacık nakli yapılan hastaların en az yarısında bir yıl süreyle insülin bağımsızlığı kazandırıldı. Sonrasında, Kanada'nın Edmonton kentinde Alberta Üniversitesi Diyabet Enstitüsü'nde çalışan James Shapiro ve arkadaşları, tüm dünyada Edmonton protokolü olarak tanınacak klinik bir yöntem geliştirerek, adacık transplantasyon çalışmalarında devrim kabul edilen bir başarıya imza attı (Shapiro, Lakey et al. 2000). Bu metod ilk kez 1999 yılında Alberta Diyabet Enstitüsünde insülin bağımlı Tip 1 diyabet hastalarına uygulandı. Hatta haber ilk duyurulduğunda 3 gün boyunca hastanenin telefon santralı şeker hastaları ve yakınları tarafından yaratılan yoğun telefon trafiği nedeniyle kilitlendi. Bu klinik protokolün esasını; beyin ölümü gerçekleşmiş verici pankreasından izole edilen adacıkların organ reddini önleyen çok özel bir ilaç kombinasyonu ile birlikte (sirolimus, takrolimus, daklizumab isimli ilaçlar) alıcı hastanın karaciğerine (kg başına 13,000 tane adacık) transferi oluşturuyor. Bu protokolün uygulandığı daha ilk denemede yedi hastanın yedisinde de bir yıl süre boyunca dışardan insülin enjeksiyonu yapılmasına gerek olmadı. Böylelikle tedavi uygulanan hastalarda yıllık insülin bağımsızlık oranı Edmonton yöntemiyle % 100'e çıkartılmış oldu. Karaciğer içerisine yapılan adacık nakli (Edmonton yöntemi) gelecekte çok ümit vaat eden bir yaklaşım olsa da aynı araştırmacılar tarafından bu konuda uzun takipli ve çok merkezli yapılan çalışmalar; ilk bir kaç yıl içerisinde nakledilen adacıkların karaciğerde fonksiyonlarını yitirdiklerini dolayısıyla hastaların pek çoğunun 5 yıl sonra tekrar insülin enjeksiyonuna ihtiyaç duyduklarını gösterdi (Ryan, Paty et al. 2005).

Nakledilen adacıkların sağlığını olumsuz etkileyen faktörlerden biri de şüphesiz adacıkların reddini önlemek için kullanılan ilaçlardır. Bu nedenle, hastalarda ciddi yan etkiler oluşturma potansiyeli olan bağışıklık sistemini baskılayıcı ilaçlar kullanmaksızın, nakledilen adacıkları vucut içerisinde uzun süreli tahribatdan koruyabilecek yeni metodları mutlaka geliştirmemiz gerekiyor (Kahraman, Dirice et al. 2011). Bu amaçla bir çalışmada, adacıklar nakil öncesi kendilerini dış etkilerden koruyabilecek fakat insülin salınımını etkilemeyecek bir materyalle kaplandı (enkapsülasyon). Ancak sonrasında adacıkları kaplayan malzemenin alıcının hücresel bağışıklık sistemini tetiklediği ve nakil bölgesinde kaplamada kullanılan malzemeye karşı dokusal yangı reaksiyonu (fibrozis) geliştiği belirlendi. Neticede bu yöntemle yapılan adacık nakli de başarısızlıkla sonuçlandı. Peki adacıkları bir materyalle

kaplayarak onları alıcının bağışıklık sisteminden koruyamıyorsa, bunları vücudumuzda atılmıyacakları bölgelere nakletmek sorunu çözer mi ? Bu amaçla araştırmacılar önce testis, beyin ve timus gibi alıcının bağışıklık sisteminin nakledilen adacıklara karşı en az tepki vereceği bölgelere deneysel maksatlı adacık naklini denedi. Yapılan deneysel çalışmalarda bu bölgelerde adacıkların kendilerini bağışıklık sisteminden uzakta tutarak (saklanarak) değil, bu adacıklara ev sahipliği yapan dokuların kendi hücrelerinde sentezlenen ölümcül moleküller sayesinde (dokunduğu bağışıklık hücrelerini öldüren-hücrelerden çıkan kılıç benzeri bir yapı) bağışıklık sistemi hücrelerinden korunduğu ortaya çıktı. Aslında vücudumuzdaki bu bölgeler adacıkların uzun süreli insülin sentezi yapabilecekleri ideal bölgeler değildir. Adacıkları bu bölgelere nakletmek yerine, bu dokularda sentezlenen ilgili moleküllerin gen nakli yoluyla nakil öncesi adacıklara dışardan kazandırılmasını daha avantajlı bir tedavi seçeneği olarak değerlendirdik (Sanlioglu, Griffith et al. 2008). İnsan pankreasında fazla miktarda TNF Related Apoptosis Inducing Ligand (TRAIL) sentezinin hücre ölümleriyle birlikte seyretmesi çalışmamızın TRAIL geni üzerine yoğunlaşmasına yol açtı (Sanlioglu, Dirice et al. 2008). TRAIL normal hücrelere zarar vermeden kanser hücrelerinde spesifik olarak apoptozu indükleyen ölümcül bir ligand olarak bilinir (Sanlioglu, Dirice et al. 2009). Bu özelliğinden dolayı TRAIL gen naklinin kanser hastalarında klinik denemelerde terapötik etkinliği şu anda test edilmektedir (Holoch and Griffith 2009).

Metodumuzu test edebilmek için deney hayvan modellerinden sıçanları seçtik. Öncelikle sıçanların pankreasından yüksek kalitede çok sayıda adacık izole edebilmek için mevcut yöntemleri aylarca süren bir çalışma sonunda geliştirdik. Sonrasında adacıklara gen nakli yapabilecek uygun bir taşıyıcı (vektör) bulmak amacıyla farklı gen transfer yöntemlerini, hatta gen tabancasını bile denedik. Bunlar arasında adenovirüsü adacıklara gen nakli yapabilen en iyi vektör olarak belirledik. Adenovirüsün bugün için klinik gen tedavi denemelerinde en fazla kullanılan gen tedavi vektörü olduğunu hatırlatmamızda yarar var (Kahraman, Dirice et al. 2010). Adacıkların yeşil floresan proteini kodlayan geni taşıyan adenovirüslerle enfeksiyonu sonrasında tüm adacıkların floresan mikroskopta yeşil renkte gözükmesi bu virüsün pankreas adacıklarına çok iyi gen transferi yapabildiğini gösterdi (Şekil AdEGFP). Bu sonuç bize alıcıda bağışıklık sistemini baskılayabilecek bir geni (örneğin TRAIL isimli bir insan geni) adenovirüse yüklediğimiz zaman bu vektörün ilgili geni adacıklara kolayca aktarabileceğini gösterdi (Şekil TRAILmodel). Deneysel metodumuzu test edebilmek için deney hayvanlarında insanlardakine benzer bir tip 1 şeker hastalığı modeli oluşturmamız gerekiyordu. Biz de Streptozotosin isimli bir ilacı sıçanlara vererek pankreatik beta hücrelerini spesifik olarak tahribata uğrattık. İnsülin üretimi olmadığından dolayı bu sıçanlarda kan şeker düzeyi beklenildiği gibi yükseldi. Aynı zamanda bu sıçanlara adacık nakli yapabilmek için sağlıklı sıçanlardan yeterli sayıda adacık izolasyonu yapmamız gerekiyordu. Bu amaçla sağlıklı sıçanların pankreasını enzimle şişirerek adacık izolasyonu ve sonrasında saflaştırma

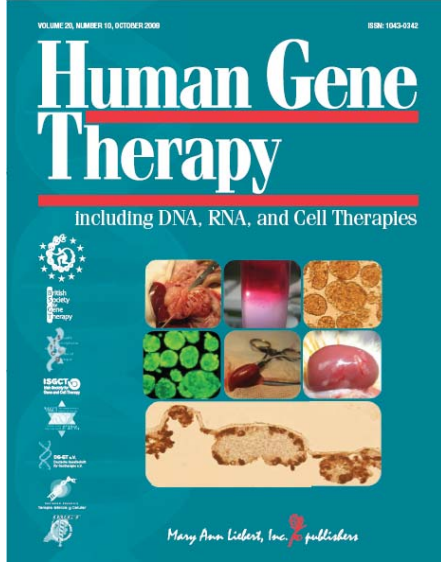
işlemini uyguladık (Şekil PancreasSisirilmesi). Sonra sağlıklı sıçanlardan aldığımız adacıkları şeker hastalığı oluşturduğumuz sıçanların böbrek kapsülü altına cerrahi bir girişimle yerleştirdik (Şekil AdacıkNakli). Nakil sonrası bu sıçanların şeker düzeyi beklediğimiz gibi sadece kısa süreli olarak normal seviyelerde seyretti ama akabinde tekrar yükseldi. Bu sıçanlarda kan şekerinin yükselmesi nakledilen adacıkların bir süre sonra vucuttan reddedildiğini (atıldığını) gösterir. Aynı yöntemi gen nakli yaptığımız adacıklarla uyguladığımızda ise, normal adacık nakline (gen nakli yapılmamış) oranla bu sıçanlarda kan şeker seviyesinin çok daha uzun süreli olarak normal seviyelerde tutulabildiğini gözlemledik. Ayrıca gen nakli yapılmış adacıkları alan sıçanların böbrek kesitlerinde, bağışıklık sistemi hücrelerinin gen nakli yapılmamış adacıkları alan sıçanlara oranla çok daha az miktarda biriktiğini tesbit ettik. Gen nakli yapılmış adacıklarla kan şeker düzeyinde daha uzun süreli normalleşmenin yani kontrolün sağlanması, bunun yanında doku reddinden sorumlu hücrelerin nakil bölgesinde daha az birikmeleri, nakledilen genin insülin üreten adacıkları alıcı hastanın bağışıklık sistemine karşı koruduğunu gösterir. Üstelik nakledilen gen gerçekte bir insan geni ve bu genin sıçan adacıklarını tahribattan koruması oldukça ilginç bir durum. Bunu başarırken hastalıklı sıçanlarda bağışıklık sistemini baskılayıcı herhangi bir ilaç kullanmadığımızı belirtmek isteriz. Pankreatik beta hücre nakli konusunda yaptığımız bu çalışma prensip olarak gen nakli yoluyla adacıkların tahribattan korunabileceğini gösterdiğinden dolayı bundan sonraki yapılacak çalışmalara da ışık tutacaktır. Edmonton protokolünü geliştiren James Shapiro ve arkadaşlarının yaptığı klinik çalışmalarla bizim henüz deneysel aşamada olan çalışmamız karşılaştırıldığında yaklaşım tarzlarımızda, adacıkların nasıl daha iyi korunacağına dair bir takım benzerliklerin yanında farklılıkların da dikkat çekici olduğunu düşünüyoruz. Benzerliklerin başında adacıkların fonksiyonunu uzun süre devam ettirebilmek için hem bizim hem de Shapiro grubunun bağışıklık sistemini hedef aldığını söyleyebiliriz. Ancak Shapiro grubunun şu anda olduğu gibi ileriki yıllardaki başarısının bağışıklık sistemini baskılayıcı yeni kimyasal ilaçların geliştirilmesine bağlı olduğunu belirtmemiz gerekiyor. Her durumda bu ilaçların, alıcının bağışıklık sistemini genel olarak baskılayacaklarından dolayı henüz sözünü etmediğimiz diğer dezavantajlarının yanında gerek alıcının vücudunda gerekse nakledilen adacıklar üzerinde toksik etkilerinin olması söz konusu olacaktır. Bizim kullandığımız yöntemde ise adacıklara gen nakli yoluyla sadece nakil bölgesinde bir korunma sağlanmaktadır. Bizim yöntemimizin ileriki yıllardaki başarısı kullanılan genlerin etkinliğine ve bunların sentez sürelerine bağlı olacaktır. Çağımız genom çağı olduğundan, bu konudaki bilgiler her gün büyük bir hızla artıyor. Bu bilgiler ışığında yakın gelecekte bu konuda çok önemli gelişmelere tanık olacağımızı şimdiden müjdelemek isteriz. Netice olarak bugün için pankreatik beta hücre naklinde karşılaşılan en önemli sorunları gidermek, ancak bu ve benzer yöntemlerin zamanla kliniğe uygulanabilmesiyle mümkün olabilecektir.

Teşekkür: Bu yazının hazırlanmasında emeği geçen Tıp Fakültesi Gen ve Hücre Tedavi Merkezi Başkanı Doç. Dr. Ahter D. Şanlıoğlu'na, Prof. Dr. Mustafa Kemal Balcı'ya, Prof. Dr. Hasan Ali Altunbaş'a teşekkür ederim. Bu çalışma TÜBİTAK tarafından (104S224) desteklenmiştir.

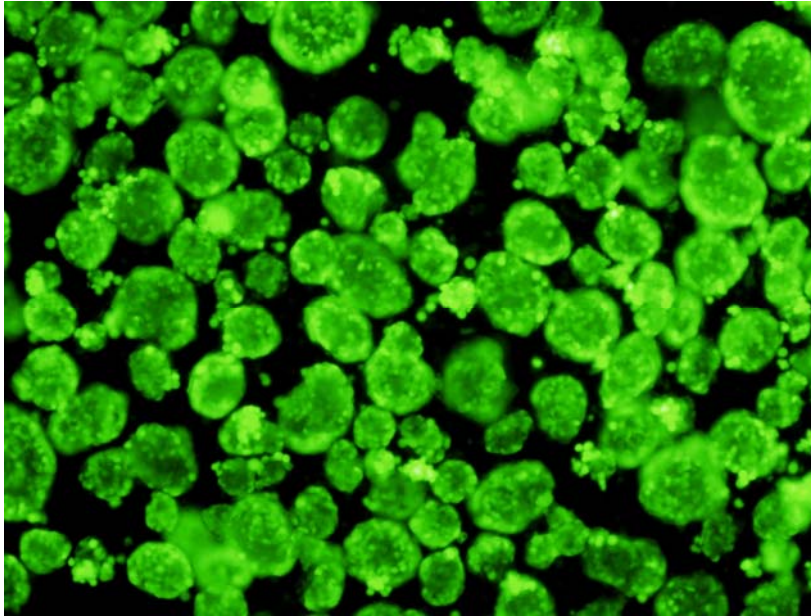
Hazırlayan: Prof. Dr. Salih Şanlıoğlu Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik AD, Gen ve Hücre Tedavi Merkezi öğretim üyesi olup, yüksek lisans (1990-1992) ve doktora eğitimini (1992-1996) Ohio State Üniversitesi'nde (Columbus OH, ABD) moleküler genetik alanında yapmıştır. Yüksek lisans eğitimini çocuk genetik hastalıkları üzerine (2 yeni insan geni keşfeten bir grupta yer alarak), doktora eğitimini de in vivo gen transfer modelleri üzerinde gerçekleştirmiştir. Gen tedavi ihtisas eğitimine gen tedavisinin 2. babası kabul edilen Dr. James M. Wilson'ın başkanlığını yaptığı Pensilvanya Üniversitesi İnsan Gen Tedavi Enstitüsü'nde (Filadelfiya, PA, ABD) başlayıp (1996) İowa Üniversitesi Gen Tedavi Merkezi'nde (Iowa City, IA, ABD) tamamlamıştır (2002). Sonrasında Türkiye'ye dönerek Antalya'da Akdeniz Üniversitesi'nde Türkiye'nin ilk gen tedavi ünitesinin kuruluşunu gerçekleştirmiştir. Kendisi halen Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalında, Gen ve Hücre Tedavi Merkezinde profesör olarak çalışmaktadır.

Şekiller:

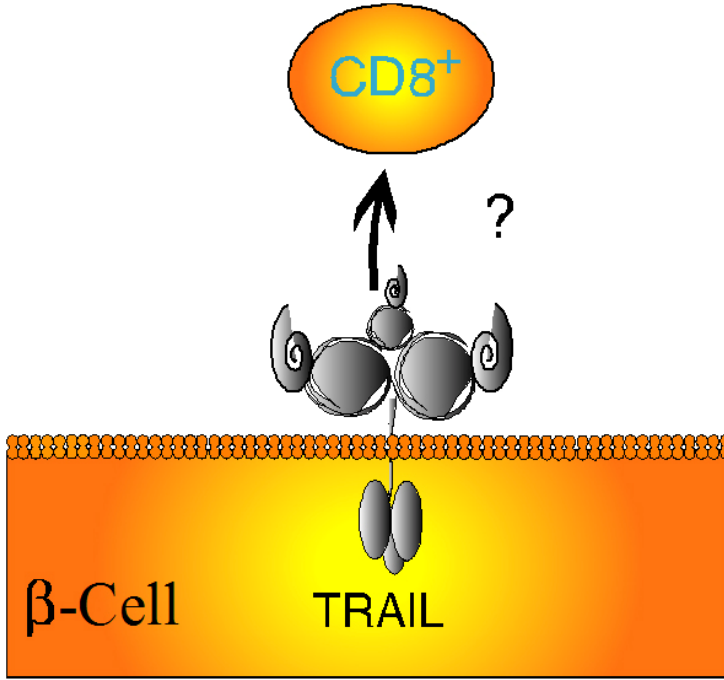
Kapak resmi: 2009 yılı Ekim ayı Human Gene Therapy dergisi kapak konusu. Kapak açıklaması Adacık izolasyonu, gen transferi, adacık nakli ve insan geninin adacıklarda sentez profili.



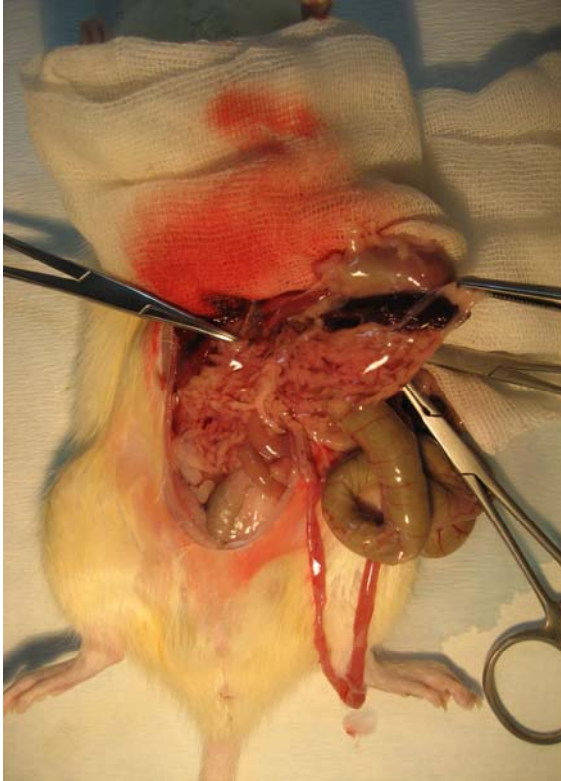
Şekil_AdEGFP: Adacıklara adenovirus aracılı gen nakli.



Şekil_TRAILmodel: T hücreleri saldırılarını önlemek için adacıkların silanlandırılma senaryosu.



Şekil_PankreasSisirilmesi: Adacık izolasyonu için pankreasın şişirilmesi.



Şekil_AdacıkNakli: Böbrek kapsülü altına adacık nakli.



Kaynaklar

- Dirice, E., A. D. Sanlioglu, et al. (2009). "Adenovirus-mediated TRAIL gene (Ad5hTRAIL) delivery into pancreatic islets prolongs normoglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats." *Hum Gene Ther* **20**(10): 1177-1189.
- Holoch, P. A. and T. S. Griffith (2009). "TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): a new path to anti-cancer therapies." *Eur J Pharmacol* **625**(1-3): 63-72.
- Kahraman, S., E. Dirice, et al. (2011). "Tracing of islet graft survival by way of in vivo fluorescence imaging." *Diabetes Metab Res Rev* **27**(6): 575-583.
- Kahraman, S., E. Dirice, et al. (2010). "In vivo fluorescence imaging is well-suited for the monitoring of adenovirus directed transgene expression in living organisms." *Mol Imaging Biol* **12**(3): 278-285.
- Ryan, E. A., B. W. Paty, et al. (2005). "Five-year follow-up after clinical islet transplantation." *Diabetes* **54**(7): 2060-2069.
- Sanlioglu, A. D., E. Dirice, et al. (2008). "High levels of endogenous tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand expression correlate with increased cell death in human pancreas." *Pancreas* **36**(4): 385-393.
- Sanlioglu, A. D., E. Dirice, et al. (2009). "High TRAIL death receptor 4 and decoy receptor 2 expression correlates with significant cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma patients." *Pancreas* **38**(2): 154-160.
- Sanlioglu, A. D., T. S. Griffith, et al. (2008). "Molecular mechanisms of death ligand-mediated immune modulation: a gene therapy model to prolong islet survival in type 1 diabetes." *J Cell Biochem* **104**(3): 710-720.
- Shapiro, A. M., J. R. Lakey, et al. (2000). "Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen." *N Engl J Med* **343**(4): 230-238.

NOTLAR: