

TÜRK DİYABET YILLIĞI 2017-2018

Year Book of
Turkish Diabetology
2017-2018



TÜRKİYE DİYABET VAKFI

Türkiye Diyabet Vakfı ve Türk Diyabet Cemiyeti
tarafından hazırlanmıştır



TÜRK DİYABET CEMİYETİ

TÜRK DİYABET

YILLIĞI

2017-2018

TÜRK DİYABET YILLIĞI
2017-2018
(*Year Book of Turkish Diabetology*)

YAYIN YÖNETİM KURULU
(*Executive Editorial Board*)
Prof. Dr. Hasan İLKOVA
Prof. Dr. M. Temel YILMAZ

BİLİMSEL YAYIN KURULU
(*Scientific Editorial Board*)
Prof. Dr. Miyase BAYRAKTAR
Prof. Dr. Nevin DiİNÇÇAĞ
Prof. Dr. M. Kemal BALCI
Prof. Dr. Zeynep OŞAR SIVA
Prof. Dr. Tamer TETİKER
Prof. Dr. Ahmet KAYA

YAYIN YÖNETİCİLERİ
(*Executive Managing Editors*)
Prof. Neslihan Başçıl TÜTÜNCÜ
Prof. İbrahim ŞAHİN
Prof. Dr. Rifat EMRAL
Doç. Dr. Ayşe KUBAT ÜZÜM

İÇİNDEKİLER

Diyabet ve Magazin <i>Prof. Dr. Adnan GÖKÇEL</i>	9
Yeni Teknolojili Çok Kısa, Çok Hızlı, Smart İnsülinler ve Klinik Kullanımı <i>Prof. Dr. Ahmet ÇORAKCI</i>	11
Diyabet Sürecinde Beta Hücre Kitlesinin Beta veya Beta-Hücresi Olmayan Kaynaklarla Artırılması <i>Prof. Dr. Ahmet KAYA</i>	21
Diyabet Tedavisine Yönelik Transplantasyon Çalışmaları <i>Ali Osman GÜROL</i>	27
İnsülin Biyobenzerleri <i>Prof. Dr. Alper B. SK T</i>	31
Tip 1 ve Tip 2 Diabetes Mellitus'ta Kemik Metabolizması Değişiklikleri <i>Uzm. Dr. Süleyman Nahit ENDUR, Prof. Dr. Alper GÜRLEK</i>	33
Metforminin Antikanserijen Etkileri <i>Dr. Aslı NAR</i>	37
Podolog Gözüyle Diyabetik Ayak <i>Yrd. Doç. Dr. Ayfer PEKER</i>	43
Statin Dışı İlaçlarla Son Durum: -PCSK9 İnhibitörleri <i>Prof. Dr. Aysen AKALIN</i>	47
Kronik Böbrek Yetmezliğinde Diyabet Tedavisi <i>Prof. Dr. Ay e Çıkım SERTKAYA</i>	51
Diyabetik Yağlı Karaciğer Hastalığının Yönetimi <i>Prof. Dr. Belgin EFE</i>	57
DPP4 İnhibitörleri <i>Prof. Dr. Berrin Çarmıklı DEM RBA</i>	65
Yazılı ve Görsel Medyada Diyabet ve Beslenme <i>Yrd. Doç. Dr. Birsen DEM REL</i>	71
İnsülin ve İnsülin Tedavi Protokolleri <i>Prof. Dr. Canan ERSOY</i>	75
Sağlıklı Gebelikte Glukoz Metabolizması <i>Prof. Dr. Canan ERSOY</i>	79
Diabetes Mellitus ve Kardiyovasküler Hastalık <i>Doç. Dr. Cavit ÇULHA</i>	83
Metabolik Cerrahi Gerekli mi? Cerrahi Teknik Seçimi ve Erken Dönem Komplikasyonlar <i>Prof. Dr. Cüneyt KAYAALP</i>	91
Diyabetik Yağlı Karaciğer ile Nonalkolik Yağlı Karaciğer Hastalığı Farklı mıdır? <i>Doç. Dr. Didem ÖZDEM R</i>	93

Genitoüriner Otonom Nöropati <i>Prof. Dr. M. Nur KEBAPÇI</i>	103
Diabetik Periferik Nöropati; Çevresel ve Genetik Faktörlerin Etkisi <i>Dr. Emre BOZKIRLI</i>	107
İnkretin Mimetikler <i>Prof. Dr. Engin GÜNEY</i>	111
Oral Antidiyabetik ve Kemik <i>Uzm. Dr. İknur ÖZTÜRK ÜNSAL, Prof. Dr. Erman ÇAKAL</i>	117
Diyabette Kullanılan Bitkisel Desteklerin Etkinliği ve Güvenilirliği <i>Uzm. Dyt. Ezgi BELL KC KOYU</i>	123
Makronutrientlerin Önemi <i>Doç. Dr. Faruk KUTLUTÜRK</i>	135
Remnant Kolesterol Düşürülmeli mi? <i>Dr. G. Gonca ÖRÜK</i>	141
Son Dönem Böbrek Yetmezliğinde Diyabet Tedavisi; Güncel Bilgiler <i>Doç. Dr. Gonca TAMER</i>	145
Bariyatrik Cerrahi Öncesi Beta Hücre Fonksiyonları Diyabetik Remisyonu Öngörebilir mi? <i>Prof. Dr. Güzin Fidan YAYLALI</i>	151
Çoklu Doz İnsülin Uygulamasından İnsülin Pompasına Geçiş Kriterleri <i>Uzm. Dr. İknur ÖZTÜRK ÜNSAL, Prof. Dr. Erman ÇAKAL</i>	153
Gestasyonel Diyabet Tedavisinde Güncel <i>Doç. Dr. Hasan AYDIN</i>	167
Postprandial Glukoz Kontrolünde Yağ, Protein ve Glisemik İndeksin Etkisi <i>Uz. Dyt. Hidayet A ÖREN</i>	171
Sürekli Glukoz Monitarizasyon Sistemi ile Uyumlu SCII İnsülin Pompa Çalışma Prensipleri <i>Uzm. Dr. Hülya HACI AH NO ULLARI</i>	175
Pre-Probiyotikler ve Diyabet <i>Yrd. Doç. Dr. Hülya KAMARLI ALTUN</i>	181
Metformin: Etkinlik ve Güvenlik <i>Doç. Dr. Çi dem ÖZKAN, Prof. Dr. İhan YETK N</i>	191
Diyabet ile Yaşlanma; Yaşlanma ve Hipoglisemi Cevabı <i>Dr. Kamile GÜL</i>	193
İntermittan Hipoksi ve Yağ Dokusu İnflamasyonu <i>Prof. Dr. Kevser ONBA I</i>	199
Diyabetik Retinopati ve Lipidler <i>Dr. M. Eda ERTÖRER</i>	201
Retinopati Patogenezinde Son Durum <i>Doç. Dr. Mine ADA</i>	205

Kronik Karaciğer Hastalığında Diyabet tedavisi <i>Dr. Mustafa KULAKSIZO LU</i>	211
Diyabet, Enfeksiyon ve Aşılama <i>Prof. Dr. Mustafa CESUR</i>	215
Karsonhidrat Sayımı Yöntemi Kime? Neden? Ne Zaman? <i>Uzm. Dyt. Neslihan KOYUNO LU B NGÖL</i>	233
Fizyolojik ve Patolojik İnsülin Direnci Nasıl Ayrılır? <i>Prof. Dr. Nilgün Güvener DEMIRA</i>	241
İnsülin Direnci ve Prediyabetin Yönetimi <i>Doç. Dr. Okan BAKINER</i>	243
Sulfonylüre ve Glinidler <i>Doç. Dr. Oya TOPALO LU</i>	247
Diyabet ve Kronik Böbrek Yetmezliğinde Beslenme <i>Yrd. Doç. Dr. Perim F. TÜRKER</i>	251
Gerçek Zamanlı (Real Time) Glukoz Monitarizasyon Sistemleri ve İşleyiş Mekanizması <i>Uzm. Dr. Ramazan ÇAKMAK</i>	257
Endoskopik Duodenal Mukozal “Resurfacing” ve Endoskopik Bariatrik Tedaviler <i>Doç. Dr. Ramazan GEN</i>	261
Transplantasyon Hastalarında Diyabet Yönetimi <i>Prof. Dr. Ramazan SARI</i>	265
Yapay Pankreas Doktorun Yerini Alabilir mi? <i>Prof. Dr. Ramis ÇOLAK</i>	269
İleri Yaşta Oral Antidiyabetik Ajanların Güvenliği: Güncel Veriler <i>Prof. Dr. Rifat EMRAL</i>	277
Hasarlı Böbrekte Dislipidemi Tedavisi <i>Prof. Dr. Rü ü SERTER</i>	281
Tip 1 Diyabetin Önlenmesinde Yapılanlar ve Beklentiler <i>Prof. Dr. Rüveyde BUNDAK</i>	285
Tasarımdan Beta Hücre Rejenerasyonuna İnsülin Gen Nakli <i>Yanus Emre EK , Hale M. TA YÜREK, Ahter D. ANLIO LU, Hasan Ali ALTUNBA , Mustafa Kemal BALCI, ve Salih ANLIO LU</i>	289
İntraperitoneal Kablosuz Pompalar ve Çift Hormon Salınımlı Pompalar Tedaviyi Nasıl Etkileyecek? <i>Uzm. Dr. Seher TANRIKULU</i>	301
Diyabetli Kadınlarda Cinsel İşlev Bozukluğu <i>Yrd. Doç. Dr. Selda ÇEL K</i>	307
Serbest Yağ Asitlerinin Diyabetik Nefropatideki Rolü: Lipotoksisite veya “Yağlı Böbrek” <i>Doç. Dr. Sibel Ertek YALÇIN</i>	313

Tip 1 Diyabet Genetiđi ve Risk Altındakiler <i>Prof. Dr. Sibel TULGAR KINIK</i>	319
Diyabet Tedavisinde Yeni Teknolojiler - Pompalar <i>Doç. Dr. Soner CANDER</i>	325
Glikasyon ve İleri Glikasyon Ürünlerinin Kardiyometabolik Etkileri <i>Doç. Dr. Süleyman PEKÇ</i>	329
Diyabette Ara Öğünün Önemi <i>Dr. Umut MOUSA</i>	335
Yaşlanma ile İlişkili Hastalıklar ve İnsülin İlişkisi <i>Prof. Dr. Zeliha Fulden SARAÇ</i>	341
Diyabetik Kardiyovasküler Otonom Nöropati <i>Prof. Dr. Zeliha HEK MSOY</i>	349

ÖNSÖZ

Ulusal Diyabet Kongrelerin bu yıl 54.'sünü düzenliyoruz. Türk Diyabet Cemiyeti'nin 2000 yılına kadar düzenlediği kongreler 2000 yılından itibaren Türkiye Diyabet Vakfı'nın katılımı ve onun getirdiği sinerji ile hem kapsamı genişlemiş hem de bilimsel düzeyi artmış ve de ülke genelinde hekimler, diyetisyenler ve de diyabet hemşirelerinin eğitimlerinde ve bilgi paylaşımlarında çok önemli bir bilimsel arena haline gelmiştir. İlaç firmalarının bilimsel programa ve kongreye destekleri ise bunu güçlendirmiştir. Türk Diyabet Cemiyeti ve Türkiye Diyabet Vakfı'nın bundan sonra amacı bu yıllığın yılda bir önceki kongrede tartışılan konuların yayınlandığı bir kitap olmanın yanı sıra daha sık aralıklarla yayınlanan bir dergi haline dönüştürmek ve diyabetoloji alanında ülkemizde önemli bir açığı kapatmak olacaktır.

Türk Diyabet Vakfı

Türkiye Diyabet Cemiyeti

TASARIMDAN BETA HÜCRE REJENERASYONUNA İNSÜLİN GEN NAKLİ

Yunus Emre Ekşi^{1,*}, Hale M. Taşyürek^{1,*}, Ahter D. Şanlıoğlu¹, Hasan Ali Altunbaş²,
Mustafa Kemal Balcı², ve Salih Şanlıoğlu^{1**}

¹Gen ve Hücre Tedavi Merkezi, ²İç Hastalıkları AD, Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları BD, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Antalya

* İlk iki yazar (YEE ve HMT) yayına eşit derecede katkı sağladılar.

ÖZET

Tip 1 Diyabet (T1DM), pankreas adacıklarındaki insülin sekresyonu yapan beta hücrelerinin otoimmün yıkımı sonucu gelişen insülin yetmezliği ile karakterize pandemik bir hastalıktır. Gen transfer vektörleri aracılığıyla insülin gen aktarımının, diyabetik hastalarda endojen insülin ekspresyon profilini taklit edebilecek potansiyel bir yaklaşım olduğu açıktır. Bu nedenle, insülin gen terapisinin ana hedefleri, insülin gen ekspresyonunun sağlanabilmesi, periferel dokulara glukoz alımının artırılması, glukagon sekresyonunun baskılanması ve hipergliseminin azaltılabilmesi için hepatik glukoz üretiminin inhibe edilmesi olarak tanımlanabilir. Bu hedeflere ulaşılırken, hipogliseminin engellenebilmesi amacıyla, hücre tipine spesifik regüle edilebilir insülin gen ekspresyonu da gereklidir. İnsülin gen naklinin T1DM'de başarılı olabilmesi için gen naklinin glukoz duyarlı bir organa yapılması, anlık değişebilen kan glukoz seviyelerine cevap verebilmesi ve insülin sentezinin uzun süreli olması gerekmektedir. Bunlara ilave olarak az insülin gen ekspresyonu kan şekerini düşürmede etkisiz kalırken, gereğinden fazla sentez hastaların hipoglisemik komaya girmelerine sebebiyet verdiği için, hücrede üretilen insülin miktarının mutlaka kontrol altına alınması gerekmektedir. Sonuç olarak insülin gen terapisi, başarıyla uygulandığında tek bir enjeksiyonla diyabet hastalarını ömür boyu insülin enjeksiyonu yapma zorunluluğundan kurtarma potansiyeli olan bir tedavi stratejisidir.

Anahtar Kelimeler: İnsülin gen tedavisi, beta hücreleri, Tip 1 diyabet.

İNSÜLİN GEN TEDAVİ STRATEJİLERİNİN TEMEL İLKELERİ

Tip 1 Diyabet (T1DM) hastaları, insülin sentezleme yeteneğine sahip tek hücre tipi olan pankreatik beta hücrelerinin immün aracılı yıkımıyla, kan glukozunu düzenleme yeteneklerini kaybederler. Dolayısıyla bu hastaların prognozu, enjeksiyon veya pompalar aracılığıyla ömür boyu ekzojen insülin alınımına bağlıdır. T1DM tedavisinde kullanılan genetik mühendislik ürünü olan sentetik insan insülini, ilk olarak 33 yıl önce üretilmiştir (1). Günümüzde, ekzojen sentetik insülin ihtiyacını azaltmaya yönelik olarak yeni insülin gen tedavi metodları geliştirilmektedir. İlk kez 1983 yılında, beta hücresi olmayan bir hücre olan fare hipofiz kortikot-

rof hücrelerinin (AtT20), proinsülin sentezleyebildiği, sentezlenen proinsülini küçük fragmentler halinde ürettikten sonra salgı granüllerinde depolayabildiği, ve uyarıldığı zaman bu insülin-benzeri yapıları salgılayabildiği gösterildi (2). Nöroendokrin hücreler, prohormon konvertaz ekspresyonu (PC 1/3 ve PC2) ve regüle edilebilir bir sekreteruar yolak içermeleri açısından beta hücrelerine oldukça benzer hücreler olsa da, Glukokinaz (GK) ve Glukoz Taşıyıcı-2 (GLUT-2) ekspresyon etmemeleri dolayısıyla glukoz duyarlı değildirler. Ayrıca bu hücreler, adenokortikotropik hormon salgılayarak, insülinin etkisini inhibe edici özellik gösteren glukokortikoidi de sentezlediklerinden, gelecekte diyabete yönelik geliştirilecek bir tedavi yaklaşımında bu gibi hücrelerin kullanılması

mümkün değildir. Bu ve benzeri gelişmeler, beta hücresi dışındaki hücrelerde in vivo rekombinant insülin üretimini sağlamaya yönelik insülin gen terapi stratejileri ile, ekzojen insülin terapisi veya pankreatik adacık hücre transplantasyonu gibi yöntemlere alternatif olabilecek T1DM tedavi stratejilerinin araştırılmasının önünü açmıştır.

İnsülin gen tedavisi stratejileri, beta hücresi dışındaki hücrelerin, tıpkı pankreatik beta hücrelerinde olduğu gibi insülin sentezleme, depolama ve salgılama işlevlerini yerine getirebilecek şekilde genetik olarak manipüle edilmesini amaçlamaktadır. Tedavi stratejilerinde beta hücreleri yerine, beta olmayan hücrelerin hedef alınmasının sebebi, bu hücrelerin T1DM'li hastalarda oluşan beta-hücre spesifik otoimmün yanıtı karşı direnç gösterebilme özellikleridir (3). Bir insülin gen tedavi sisteminde, terapötik başarı oranının artırılması için dikkate alınması gereken özelliklerden ilki, hedef organa etkili bir gen aktarımı sağlayacak metodun seçilmesidir. İkinci önemli özellik ise, seçilen hedef organın; özellikle GLUT2'ye, GK'ya ve proinsülini olgun insüline dönüştürecek biyokimyasal işleme elemanlarına, dolayısıyla glukoz duyarlı bir mekanizmaya sahip olması gerekliliğidir. Ayrıca, seçilen hedef hücreler üretilen insülini depolayabilme kapasitesine ve glukoz aracılığıyla indüklenebilen bir sekretuar yolağa sahip olmalıdır. Son olarak, hiperglisemik koşullarda indüklenebilen ve hipoglisemik koşullarda baskılanabilen bir mekanizmayla insülin transgeninin transkripsiyonal kontrolü sağlanabilmelidir. Gen aktarımının etkin olarak sağlanabileceği tekniklere olan gereksinim dolayısıyla, insülin gen transfer çalışmalarında hem viral hem de viral olmayan aktarım sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları olsa da, viral vektörler, transdükte edebildikleri hücre çeşitliliği açısından, viral olmayan vektörlere göre daha kullanışlıdır (4-6). Lentiviruslar, güvenlik, etkinlik ve uzun süreli gen ekspresyonu açısından, beta hücresi dışındaki hücrelerin hedef alındığı insülin aracılı gen tedavisi için tercih edilmesi gereken viral

vektörlerdendir (7; 8). Lentiviral vektörlerin hem bölünen hem de bölünmeyen hücreleri transdükte edebilme yetenekleri en önemli avantajlarından bir tanesidir (9; 10). Birçok farklı çalışmada insülin gen terapi stratejileri için tercih edilen vektörlerden bir diğeri de Adeno-asosiyasyon viruslarıdır (AAV). Yüksek dozlarda ileri derecede immünojenik ve toksik etki gösteren birinci nesil adenovirüslerin aksine, AAV'ler, toksisiteye neden olmaksızın uzun vadeli gen ekspresyonu sağlarlar (11-14). Bununla birlikte, yabancıl tip AAV'ler, insanda 19. kromozomda spesifik bir lokusa, bölge spesifik entegrasyon gösterse de rekombinant AAV'ler (rAAV) bu yetenektan yoksundur (15). rAAV vektörlerin transgen kapasitesinin 4.7 kb ile sınırlı olması bu vektörlerin kullanım alanını daraltmaktadır (16; 17). Diğer taraftan, viral gen sekansları tamamen çıkarılarak daha büyük DNA parçası taşıma kapasitesine sahip son nesil adenoviral vektörler geliştirilmiştir. Bu vektörler, önceki nesillere kıyasla daha düşük toksik etkileri ile birlikte, sürekli transgen ekspresyonu sağlayabilen ve in vivo transdüksiyon etkinliği yüksek olan vektörlerdir (18; 19).

KONTROLSÜZ UZUN SÜRELİ İNSÜLİN GEN EKSPRESYONU SAĞLAMAK AMAÇLI GELİŞTİRİLEN İNSÜLİN GEN NAKLİ ÇALIŞMALARI

Viral vektörler ile gerçekleştirilen deneysel insülin gen aktarım teknikleri için yapılan ilk denemeler 20 yıl öncesine dayanmaktadır. Sıçan preproinsülin 1 cDNA'sı kodlayan Moloney Mürin Lösemi Virus (MMLV) tabanlı retroviral vektörlerin, kısmen hepatoktomize edilmiş (%70) sıçan karaciğerine portal ven aracılı aktarımıyla, %5-15 oranında karaciğer transdüksiyonu ve en az 6 ay süreyle kalıcı gen ekspresyonu sağlanmıştır (20). Düşük seviyede hepatik insülin gen ekspresyonunun sağlanabildiği bu çalışmada, hipoglisemiye neden olmaksızın STZ indüklü diyabetik sıçanlarda, açlık hiperglisemisi, glikojen yıkımı, trigliserit depolanması ve ketoasidoz iyileştirilmiş, diyabetik sıçan-

ların sağkalım oranı ise arttırılmıştır. Bununla birlikte, genetik modifikasyonlar sonucu insan olgun insülini salınımı yapabilen insan fibroblastlarının implantasyonunun gerçekleştirildiği bir başka çalışmada, kontrolsüz insülin gen ekspresyonu ile, hipoglisemi riskinin arttığı gösterilmiştir (21). Ayrıca, proinsülin işleme mekanizmalarının eksikliği dolayısıyla karaciğerde üretilen insülin, daha düşük aktivite sergilemektedir. Proinsülinin işlenmesi, dolayısıyla aktif insülin üretiminin arttırılması amacıyla PC2 ve PC3 kodlayan adenoviral vektörlerle karaciğere ve kas dokusuna yapılan uygulamalar sonucunda, proinsülin işleme mekanizmasının kas dokusunda çalıştığı ancak karaciğerde çalışmadığı gözlenmiştir (22). Bu doğrultuda, karaciğer hücrelerinde, sekretuar yollarında var olan proteazların, ekzojen aktarılan PC2 ve PC3 aktivitesini maskeleyen dolayısıyla, insülin ekspresyonu ve sekresyonunun karaciğerde tam fonksiyonellik gösterebilmesi için transgene ileri modifikasyonlar yapılması gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Temel olarak, sekretuar yollara sahip hücreler, salgıladıkları peptidleri spesifik bölgelerden etkin bir şekilde kesmek için furin endopeptidazları kullanır (23). Proinsülinin olgun insüline dönüştürülmesinde de görev alan furin endopeptidazlar, insülinin BC ve CA bağlantı noktalarında bulunan dibazik aminoasit dizilerini (Arg-X-Lys-Arg) tanırlar. HEK293 (24) ve miyoblast hücre hattı (25) gibi non-hepatom hücre hatlarının, furin tanıma bölgesi içeren modifiye insan insülin cDNA'sı ile geçici transfeksiyonu sonucunda, proinsülinin translasyonel işleme mekanizmasının devreye girerek biyolojik olarak aktif insülin üretiminin gerçekleştiği gösterilmiştir. PC2 veya PC3'ün rekombinant adenovirus aracılı arttırılmış ekspresyonu ile sıçan insülinoma hücrelerinde proinsülinin kolaylıkla insüline dönüştürülmüş olması da bu sonuçları destekler niteliktedir (26). Farklı bir stratejide, hepatositlerin proinsülin sentezi ve olgun insülin salınımını ne ölçüde sağlayabildiğini test etmek için, replikasyon defektli bir adenovirus ile (H4-II-E) hepatosit hücre hattının transfeksiyonu

gerçekleştirilmiştir. Bu adenovirusler üzerinde insan proinsülin cDNA'sı ile birlikte, dibazik prohormon konvertaz (PC) tanıma bölgesi ve tetrabazik furin kesim bölgesi içerecek şekilde değişikliğe uğratılmış bir bölge de bulunmaktadır (27). Bu viruslerin farelere enjeksiyonuyla karaciğerde insülin gen ekspresyonu sağlanmış ve diyabet geçici süreyle tersine çevrilmiştir. Benzer şekilde, sürekli hepatik insülin üretiminin glisemik kontrol üzerindeki faydalı etkilerini değerlendirmek amacıyla, STZ indüklü diyabetik nude farelerin karaciğerleri, insan elongasyon faktörü 1-alfa (EF1 alfa) promotörünün kontrolü altında sıçan preproinsülini eksprese eden adenoviruslerle enfekte edilmiştir (28). Bu uygulamada, plazma insülininin uzun süreli bazal ekspresyonu dolayısıyla diyabetik hayvanların plazma glukagon ve glukoz seviyelerinde önemli ölçüde azalma tespit edilmiştir. T1DM ile ilişkili karaciğer patolojisi incelendiğinde, glikojen parçalanması ve lipid birikiminin, hepatik insülin gen ekspresyonu ile azaltıldığı belirlenmiştir. Bununla birlikte, sürekli insülin gen ekspresyonu nedeniyle, tedavi edilen tüm hayvanlarda, aç bırakıldıklarında şiddetli hipoglisemi geliştiği gözlenmiştir. Prohormonları tamamen aktif formlarına dönüştürmek için gerekli olan konvertazlardan yoksun hepatositlerin aksine, akciğer dokusu prohormon konvertazları doğal olarak eksprese eden bol miktarda nöroendokrin salgı hücresine sahiptir. Yapılan bir çalışmada, CMV promotörü tarafından kontrol edilen sıçan insülin genini içeren bir plazmidin akciğere lipozom aracılı aktarımı gerçekleştirilmiştir (29). Yapılan çoklu enjeksiyonlar sonucunda, akciğer alveolar epitel hücrelerinde insülin gen ekspresyonunda belirgin bir artış ile birlikte, insülin proteininin işlenmesi ve sekresyonunda da artış gözlenmiştir. Bu artışın bir sonucu olarak STZ indüklü diyabetik farelerde hiperglisemi ve ketoasidoz herhangi bir yan etki gözlenmeksizin iyileştirilmiştir. Bu çalışmada da görüldüğü gibi, non-viral vektörlerle yapılan çalışmalarda, viral vektörlere göre daha az yan etki ve immünojenite söz konusu olsa da, terapö-

tik etkiyi sürdürmek için tekrarlayan vektör uygulamalarına gereksinim duyulmaktadır. rAAV vektörleri birinci ve ikinci nesil adenoviral vektörlere kıyasla çok daha uzun bir transgen ekspresyonu sağlar. rAAV aracılı uzun süreli insülin gen tedavisinin etkinliği, CMV promotor kontrolü altında insan insülini kodlayan, furin kesim bölgesi içeren modifiye bir rAAV kullanılan bir çalışmayla gösterilmiştir (30). Furin eklenmiş insan insülini kodlayan rekombinant bir adenovirus ile tedavi edilen hayvanlarda geçici normoglisemi gözlenirken, rAAV vektörlerinin portal venden verilmesi sonucu, STZ indüklü diyabetik sıçanlarda tedaviyi takiben 90 gün süreyle normoglisemi gözlenmiştir. Ek olarak, devam eden insülin üretimi HbA1c düzeylerini düşürmüş ve herhangi bir yan etki göstermeksizin glukoz toleransını iyileştirmiştir. Benzer şekilde, Elsner ve ark.'nın otoimmün diyabetik sıçanlarda ve STZ indüklü diyabetik farelerde, furin kesim bölgesi içeren insan insülini kodlayan bir lentiviral vektörün terapötik etkinliğini test etmek amacıyla yaptıkları bir çalışmada (31), tedavi edilen hayvanlarda gözlem periyodu boyunca (yaklaşık bir yıl) kan glukoz seviyelerinin normalizasyonu sağlanmıştır. Bu sonuçlar, endokrin olmayan hücrelerden insülin salınımını hedefleyen somatik bir gen tedavi yaklaşımıyla, diyabetin tersine çevrilebileceğini düşündürmektedir. Beta olmayan hücrelerde proinsülinin insüline işleme mekanizmasının yetersizliği dolayısıyla karşılaşılan engeller, furin tanıma dizisi içeren modifiye insan insülini cDNA'sının kullanıldığı yaklaşımlarla aşılabılır. Ancak, insülin ekspresyonunun gün boyu değişmekte olan metabolik ihtiyaca göre düzenlenme gerekliliği, üstesinden gelinmesi gereken bir diğer önemli engeldir.

İNSÜLİN GEN EKSPRESYONUNUN FİZYOLOJİK KONTROLÜNÜ SAĞLAMAYA YÖNELİK İNSÜLİN GEN NAKİL ÇALIŞMALARI

Glukoz, pankreatik beta hücrelerinde ve hepatositlerde birçok genin sentezinde rol aldığından, insülin üretimi üzerinde etkili

bir regülatör moleküldür. Beta hücreleri ve hepatositler kan glukoz seviyesindeki değişimlere GLUT2 ve GK aktiviteleri ile yanıt verirler. Hepatositlerde, insülin ile azalan PEPCK promotor aktivitesi, glukagon ve cAMP ile indüklenir. Dolayısıyla, PEPCK promotorunu takiben, furin tanıma bölgesi içeren bir proinsülin DNA'sı tasarlandığında, insülin üreten aday hücreler olarak hepatositlerin hedeflendiği kontrol edilebilir bir sistem oluşturulabilir (32). Buna benzer bir tasarımla, primer sıçan hepatosit kültürlerine rekombinant adenovirus aracılı aktarım sonucunda, hepatositlerin olgun insan insülini üretebildiği gösterilmiştir. PEPCK yerine S14 veya L-PK gibi, bazal glukoz duyarlı promotorların kullanıldığı sistemler, bu promotorların karaciğerdeki zayıf aktiviteleri dolayısıyla yetersiz bulunmuşlardır (32).

Glukoz ile regüle edilen doğal promotorların kontrolündeki insülin ekspresyonu, zayıf transkripsiyonal aktiviteleri dolayısıyla tokluk hiperglisemisini baskılayamamaktadır. Bu nedenle, karaciğer hedefli insülin gen tedavi çalışmalarında, HNF-1, C/EBP bağlanma elementleri, GIRE ve L-PK promotorunun kombinasyonu ile oluşturulan sentetik promotorlar denenmiştir (33). Sentetik promotor kontrolü altında furin kesim bölgesi içeren insülin eksprese edebilen rekombinant adenovirusların, STZ indüklü diyabetik NOD-SCID farelere intravenöz enjeksiyonu sonrasında, bu farelerde hiperglisemi düzelmiş ve glukoz toleransı gelişmiştir. Bu sonuçlar, karaciğer hedefli insülin gen tedavisinde, glukoz duyarlı insülin üretimini düzenleyebilmek için yapay promotorların da kullanılabilmesi için göstermektedir. CMV promotoru ile gerçekleştirilen belirgin insülin ekspresyonu, hipoglisemi oluşturması nedeniyle ölümlere sebep olurken, glukoz duyarlı enhancer (gen ifadesini artırıcı diziler)/karaciğer-spesifik promotor içeren tasarımlarda daha hafif hipoglisemi gözlenmiştir. Ek olarak, yapılan glukoz tolerans testleriyle, normogliseminin daha geç sürede sağlanabildiği gösterilmiştir. Dolayısıyla, negatif yönde de düzenlenebilir bir yanıt oluşturulabilmesi için vektör tasarımlarının

daha da geliştirilmesi büyük önem arz etmektedir.

PEPCK ve L-PK promotorlarına ve insülinin negatif yanıtına alternatif olarak, karaciğer hücrelerinde furin ile kesilebilen modifiye insülin gen ekspresyonunun glukoz duyarlılığını sağlamak amacıyla (34); glukoz ile indüklenebilen regülatör elementler (GIRE) içeren karaciğer spesifik albumin promotoru (35) kullanılmıştır. Karaciğerde, adenovirus aracılı, glukoz duyarlı insülin sekresyonu glukoz toleransının gelişimiyle birlikte açlık normoglisemisi sağlamıştır. Bununla birlikte, insülin sentezinin uzayan lag fazı ve yetersiz insülin üretiminin bir sonucu olarak gelişen tokluk hiperglisemisi düzeltilenmemiştir. Hepatositlerde aktif, glukoz duyarlı ve insülin tarafından negatif olarak da regüle edilebilen özgün bir promotor oluşturmak amacıyla, sıçan L-PK geninden karbonhidrat-duyarlı elementler, sıçanlardaki insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein-1 (qIGFBP-1) geninin, insülin ile baskılanan bazal promotor bölgesine klonlanmıştır (36). Modifiye rekombinant insülin cDNA'sı içeren glukoz-insülin duyarlı promotor kullanılarak oluşturulan adenoviral vektör aracılığıyla, sıçan primer hepatositlerinde in vitro glukoz-indüklü insan insülin sekresyonu sağlanmıştır. Ek olarak, hepatik insülin gen tedavisi ile diyabetik sıçanlarda, gliseminin geliştiği, adipositokin profilinin olumlu yönde indüklendiği ve endotelyum bağımlı vasküler fonksiyonların korunarak insülin duyarlılığının artırıldığı belirlenmiştir (37).

Glukoz-6-fosfat'ın glukoz dönüşümünü katalizleyen, Glukoz-6-fosfat (G6Pase) enzimi; karaciğerden glukoz çıkışının kontrolünde primer sorumludur. Diyabetik hastalarda karaciğerden salınan glukoz miktarının artışıyla açlık kan glukozu da arttığından, sıçan hepatoma hücre hatlarında insülin gen ekspresyonunun regülasyonu için; diyabetik koşullarda oldukça aktif olan ve insülin tarafından negatif olarak regüle edilebilir bir promotor (38) olan G6Pase promotoru (39) kullanılmıştır. G6Pase promotor kontrolü altında insan insülin geni eksprese eden ade-

noviral vektörler ile, glukoz indüklü insülin üretimi gerçekleştirilmiştir, ancak insülin tarafından oluşturulan negatif geribesleme dolayısıyla karaciğerdeki transgen ekspresyonu düşük kalmıştır. Dolayısıyla, glukoz duyarlı gen ifadesini artırıcı dizilerin de katkısıyla daha güçlü promotorların oluşturularak, diyabetik koşullarda kan glukoz seviyesini düşürmeye yetecek miktarda insülin ekspresyonunun sağlanabileceği yeni yaklaşımların geliştirilmesi önerilmektedir. Bu doğrultuda, aldolaz B geninin intronik gen ifadesini artırıcı dizilere bağlanan hibrit G6Pase promotoru kullanılarak karaciğerde kendi kendini regüle edebilen bir insülin gen ekspresyonu sağlanması amaçlanmıştır (40). STZ indüklü diyabetik nude sıçanların karaciğerine, bu modifiye insülin geninin adenoviral aktarımı; hipoglisemi yaratmadan, tokluk hiperglisemisini belirgin oranda düşürmüştür.

Glukoz miktarına bağlı olarak regüle edilebilen hepatik insülin gen ekspresyonu sağlayabilmesi açısından, farklı glukoz duyarlı insülin promotorlarının kullanımı da değerlendirilmektedir. İnsan insülin promotoru (HIP), beta hücre spesifik bir promotor olsa da, birçok hepatosit hücre hattında güçlü gen ekspresyonu sağlamaktadır (41). Gen aktarım aracı olarak AAV vektörlerin kullanılması durumunda, karaciğerde glukoz yanıt olarak insülin gen ekspresyonu sağlamak amacıyla insan insülin promotoru denenmiştir (42; 43). Multimerize sıçan insülin promotoru (RIP), furin kesim bölgeleri de eklenerek sıçan proinsülin cDNA'sı ile birleştirildikten sonra, Epstein-Barr virus (EBV) tabanlı plazmid vektörlere klonlanmış ve STZ indüklü diyabetik sıçanlara kuyruk veninden enjekte edilmiştir (44). Her ne kadar, RIP ile kontrol edilen insülin gen ekspresyonu karaciğerde glukoz yanıtı bir insülin gen ekspresyonu sağlasa da, açlık hiperglisemisinin düzeltilmesine yetecek seviyede bir gen ekspresyonu sağlanamamıştır. rAAV-aracılı karaciğer transduksiyon oranları genellikle düşüktür, dolayısıyla karaciğere rAAV aracılı insülin gen aktarımını arttırmak amacıyla çeşitli metodlar de-

nenmiştir. Örneğin, diyabetik hayvanlara rAAV-aracılı insülin tedavisinde kalsiyum fosfat (CaPi)'ın etkisini araştırmak amacıyla, PEPCK promotörü altında insan insülin geni eksprese eden rAAV vektörler kullanılmıştır (45). rAAV uygulamasıyla diyabetik hayvanların kan glukoz seviyelerinde belirgin bir azalma gözlenirse de, rAAV'lerin kalsiyum fosfat ile birlikte uygulanması sonucu, insülin gen transferinin hipoglisemik etkisi artmıştır. Mutant furin bölgesi içeren, 410 bp uzunluğunda sıçan insülin 1 promotörü kontrolünde insülin geni eksprese eden rAAV vektör ile polietilenimin (PEI) kompleksi oluşturularak, bu kompleksin diyabette glukoz duyarlı insülin gen tedavisi için uygulanabilirliği araştırılmıştır (46; 47). Endokrin pankreatik hücre benzeri özelliklere sahip insan hepatoma hücre hattı olan Huh7 hücrelerinin rAAV ile transdüksiyonu sonrasında, yüksek glukoz seviyelerine yanıt olarak insülin sekresyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir. Ayrıca, insülin salgılayan ajanlar (dibutiril siklik adenosin mono fosfat-dbcAMP, teofilin, forskolin) kullanıldığında glukoz yanıtı rAAV-aracılı transgen ekspresyonunun artışı, insülin biyosentezinin daha iyi indüklenebilmesi için metabolik ve hormonal regülasyonun bir arada gerçekleşebileceğini göstermektedir. Ek olarak, insan insülin sekresyonu glukoz miktarına bağlı olarak artmış ve STZ indüklü diyabetik farelerin hiperglisemisi belirgin oranda düşmüştür. Yine de, insülin sekresyonunun indüklenmesi için 30 dakikalık bir lag fazının olması, transkripsiyonal regülasyon kinetiğinin yavaş olduğunu göstermektedir. Bu bulgulara rağmen, rAAV-PEI kompleksi ile tedavi edilmiş hayvanların hiçbirinde hipoglisemi gözlenmemiştir. PEI uygulamasıyla karaciğerde rAAV-aracılı transdüksiyon artırılrsa da, bu uygulama apoptozu indüleyecek bir membran hasarına yol açabilir. Ayrıca, rAAV tarafından kodlanan transgen ürünleri, aktarım yoluna bağlı olarak immünojenik olabilmektedir (48). Dolayısıyla, tedavinin etkinliğini kısıtlamamak adına, AAV vektörlere karşı oluşabilecek immüniteden korumak için bireylere immünesupresör uy-

gulanması gerekebilir (49; 50).

İNSÜLİN GEN EKSPRESYONUNUN FARMAKOLOJİK KONTROLÜNÜ SAĞLAMAYA YÖNELİK İNSÜLİN GEN TRANSFER ÇALIŞMALARI

Karaciğer, her ne kadar insülin ekspresyonunun glukoz aracılı fizyolojik kontrolünün tam olarak sağlanabilmesi açısından yetersiz kalsa da, pankreasın insülin üretme yeteneğinden yoksun kaldığı durumlarda, gen tedavisi yoluyla insülin üretimi için ilk tercih edilen organdır. Regülasyon kinetikleri dolayısıyla; glukoz duyarlı promotörler ile diyabetik hayvanların kan glukoz seviyelerinin düzenlenmesinde kısıtlı bir başarıya ulaşılabilmektedir. Örneğin, insülin gen transkripsiyon ve translasyonunun efektif olabilmesi için gereken birkaç saatlik süre, hipergliseminin başlangıcından itibaren oldukça uzun bir süre anlamına gelmektedir. Ayrıca, normoglisemi oluşturulduktan sonra insülin gen ekspresyonunun durdurulması için transkripsiyonun baskılanması da zaman almaktadır. Dolayısıyla, hastalar hiperglisemi ya da hipoglisemiye uzun süreyle maruz kalmaktadır. Karaciğerden sürekli insülin salınımının hipoglisemi oluşturmaya dolayısıyla, insülin transkripsiyonunun farmakolojik stimülasyonunu hedefleyerek insülin sekresyonunun kontrolünü ele almaya yönelik özgün bir strateji geliştirilmiştir. Bu senaryoda, insülin gen ekspresyonunu indükleyen rekombinant transkripsiyon faktörü, farmakolojik bir ajan tarafından kontrol edilmektedir. Örneğin, diyabetik nude farelerde furin kesimli proinsülin geninin adenovirus aracılı transkripsiyonunda kullanılmak üzere rapamisin tabanlı bir regülatör sistem geliştirilmiştir (22). Yabanıl tip proinsülin (hIns-wt) kodlayan ve eş zamanlı eksprese olan proteaz furin tarafından kesilebilen modifiye proinsülin (hIns-M3) kodlayan adenoviral vektörler, terapötik etkinlik ve dolayısıyla karaciğerde olgun insülin üretiminin varlığını test etmek için kullanılmıştır. Furin ile kesilebilen proinsülin eksprese eden adenovirusların intravenöz uygulaması, yabanıl tip proinsülin geni eksprese eden

vektörlere oranla, karaciğerde daha fazla miktarda olgun insülin üretimi sağlamıştır. Bu sonuçlar, proinsülinin furin kesim bölgesi içeren formunu kodlayan adenoviruslarla enfekte edilen karaciğerde, yüksek seviyede olgun insülin üretiminin gerçekleştirilebileceğini göstermektedir. Rapasimin ile indüklenebilen sistemin etkinliğini test etmek amacıyla, rapamisin ile regüle edilebilen transkripsiyon faktör kodlayan adenoviral vektörler (Ad-CMV-TF1) ile transkripsiyon faktörünün 12 adet bağlanma bölgesinin önüne hIns-M3 transgeninin yerleştirildiği (Ad-Z12-hInsM3) adenoviral vektörlerin her ikisi birden diyabetik farelere enjekte edilmiştir. Sadece rapamisin varlığında, farelerin karaciğerinden insülin sekresyonu indüklenerek kan glukozu düşürülmüş ve ilacın ortamdaki uzaklaştırılmasıyla insülin gen ekspresyonu durdurulmuştur. Bu sonuçlar, diyabetik hayvanlarda glukoz homeostazının kontrolü için karaciğerdeki insülin gen ekspresyonunun farmakolojik regülasyonu yönteminin, umut vaat eden bir alternatif olduğunu doğrular niteliktedir. Rapamisinin doza bağımlı uygulanması ile, dolaşımdaki insülin seviyesinin yükseltilerek diyabetik hayvanlarda hipergliseminin düşürülmesi mümkün olsa da, optimum seviyelerde insülin ekspresyonunun gerçekleşmesi için 12 saatlik bir süre gerekmektedir. Dolayısıyla bu yaklaşım, postprandiyal akut insülin artışını sağlayamasa da, hastalarda uzun etkili insülin uygulamasına benzer şekilde etki edecek bazal insülin ekspresyonu sağlamak için faydalı bir yaklaşım olabilir.

İNSÜLİN GEN TERAPİSİNDE MEVCUT ENGELLER VE GELECEKTEN BEKLENTİLER

Hepatositlerin proteinleri bazal seviyelerde sürekli olarak salgılaması, postprandiyal glukoz artışı ile başa çıkmak için yeterli miktarda insülinin anında salınmasını zorlaştırmaktadır. Postprandiyal glukoz düzeylerini düzenlemek için tasarlanan rekombinant insülinin, sekretuar sinyallerin alınmasını takiben hızlı bir şekilde üretilmesi gerekmektedir. Beta hücrelerinde, insülin salgıla-

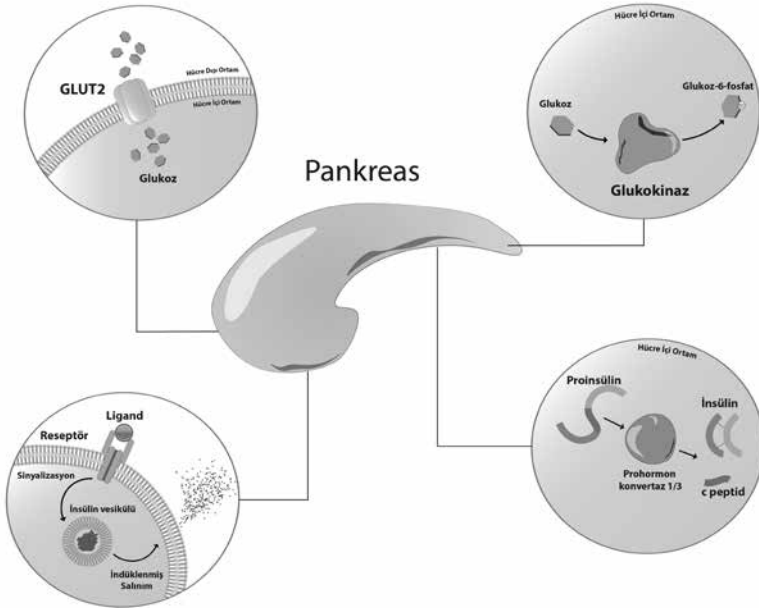
nacağı zamana kadar salgı granüllerinde depolandığından, gen tedavi yoluyla üretilen insülinin sekresyonunun da fizyolojik olarak kontrol edilebilmesi büyük önem arz etmektedir. Dolayısıyla, sekresyonun doğrudan kontrolü, transkripsiyonel kontrol mekanizmalarına kıyasla kan şekerinin daha hızlı düzenlenmesini sağlar. Kontrollü insülin salınımı sağlamak amacıyla, endoplazmik retikulumda (ER) kontrollü agregasyon yoluyla insülin sekresyonunun düzenlenmesini öneren özgün bir yöntem geliştirilmiştir (51). Bu modelde, çeşitli moleküllerin ER'da tutulmasını sağlayacak geleneksel agregasyon bölgeleri olarak bilinen CAD sinyal sekansını içerecek şekilde modifiye edilen proinsülin, sekretuar hücrelerin ER'lerinde tutulur. Ek olarak, proinsülinin posttranslasyonel modifikasyonu için proinsülin kodlama dizisine furin kesim bölgeleri de eklenmiştir. Dolayısıyla, oral yolla alınacak küçük bir molekül aracılığıyla insülinin işlenerek, hızla büyük miktarlarda salınımı indüklenir. Bu senaryoda, beta hücreleri gibi özelleşmiş sekretuar hücrelerin granüllerinden gerçekleşen salınım fonksiyonunun, ER tarafından gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Küçük bir ilaç aracılığıyla proinsülin agregatlarının çözülerek golgiye translokasyonu sağlanır. Golgide proinsülinin işlenmesini takiben olgun insülin hızla salınarak, ilaç uygulamasından sonra 15. dakikada kanda saptanabilir düzeye gelir ve 2 saat sonunda kandaki insülin miktarı en yüksek seviyeye ulaşır. Bu sayede kan glukoz seviyelerinde %90 oranında bir azalma meydana gelebilmektedir. İlaç etkisinin yok olması halinde, dolaşımdaki insülin miktarı azalmaya, glukoz seviyeleri de tekrar yükselmeye başlar. Bu bulgular doğrultusunda oluşturulan modelin, doğal insülin sekresyonuna oldukça benzer nitelikte bir insülin sekresyon kinetiğine sahip olduğu gözlenmiştir. Sonuç olarak, ilaç indüklü bir sistemle kombine edilmiş bir glukoz bağımlı insülin sekresyon sistemiyle, pankreatik beta hücre fonksiyonlarını taklit edebilme potansiyeli yüksek bir yöntem geliştirilmesi mümkün olabilir.

Kontrollü proinsülin transkripsiyon ve trans-

lasyonu, regüle edilebilir bir sekreteruar yolağı içermesi ve indüklebilir bir salınım mekanizmasına sahip olması, pankreatik beta hücrelerinin en önemli özellikleri olarak sıralanabilir (Şekil 1). Hepatositler, GK ve GLUT2 aracılığıyla oluşan glukoz duyarlı bir mekanizmaya sahip olsalar da, kontrol edilebilir bir sekreteruar yolağından yoksundurlar. Bununla birlikte, nöroendokrin hücreler, kontrollü bir sekreteruar yolağına sahip olup, salgı granüllerinde insülin depolayabilirler,

ancak bu hücreler ise glukoz duyarlı mekanizmalardan yoksundur. Bu nedenle ne hepatositler ne de nöroendokrin hücreler ideal bir beta hücre adayı olarak değerlendirilmemektedir. Buna karşılık, duodenum ve jejunumda bulunan K hücreleri; aynı beta hücrelerindeki benzer şekilde GK, GLUT2 ve prohormon konvertaz ekspresyonu yapabilen hücrelerdir (3). Dolayısıyla bu hücreler, glukoz kontrollü bir insülin sentez ve sekresyonunun gerçekleştirilebilmesi amacıyla

Şekil 1: Pankreatik beta hücrelerinin özellikleri. İnsulin gen tedavisinin esas amacı; hücreleri genetik olarak manipüle ederek insulinin sentezlenmesini, depolanmasını ve sekresyonunu sağlamak olsa da, mevzu bahis insulin gen transfer sistemi; tedavinin başarısını arttıracak bir takım anahtar özelliklere de sahip olmalıdır. İlk olarak sistem hedef organa etkin bir biçimde gen aktarımı yapabilmelidir. İkincisi, hedef organ GLUT2 ve GK gibi glukoz duyarlılık sistemini içermeli ve proinsülini insüline dönüştüren gerekli biyokimyasal enzimleri (prohormon konvertazları) içinde barındırmalıdır. Üçüncüsü, hedef hücreler depolama özelliğinin yanında glukoz ile regüle edilebilir sekreteruar bir yolağına sahip olmalıdır. Dördüncüsü ve en sonuncusu da, insülin transgeninin transkripsiyonu hiperglisemiyle başlamalı ve hipoglisemiyle sonlandırılmalıdır.



alternatif hedef hücre adayları olarak değerlendirilmektedir. K hücrelerine özgü promotorlar kullanılarak insan proinsülin gen ekspresyonu sağlanan transgenik hayvanların STZ uygulamasına direnç göstermiş olması (52), beta hücrelerinin yokluğuna rağmen glukoz homeostazının başarıyla kontrol edilebileceğinin bir örneği olarak değerlendirilmiştir (53). Bununla birlikte, bağırsak epitel hücrelerinin dönüşüm ve yenilenme hızlarının yüksek olması nedeniyle, uzun vadeli gen ekspresyonu sağlayabilmek adına K hücre progenitörleri hedeflenmelidir. Barsak epitel hücre popülasyonunun yalnızca %1'i enteroendokrin hücrelerden oluşmaktadır. Bu nedenle insülin üretimi için hedef hücre olarak seçilebilmesi için öncelikle, enteroendokrin hücrelerin izolasyon ve tanımlama çalışmalarının gerçekleştirilmesi gerekmektedir. Yine de, rAAV2 gibi viral vektörler kullanılarak başarılı bir şekilde transdükte edilen ve genetik olarak modifiye edilen enteroendokrin (NCI-H716) L-hücrelerinin, çok sayıda enterositin bulunduğu ko-kültür ortamında dahi, kontrollü bir insülin yanıtı göstermesi, umut verici gelişmeler olarak karşımıza çıkmaktadır (Caco-2 or T84) (54). Gastrointestinal sistem hücrelerine, kitosan nanopartiküller aracılı insan insülini gen aktarımının yapıldığı bir çalışmada, STZ indüklü diyabetik sıçanların açlık kan glukozunda azalma gözlenmiştir. Bu sonuçlar, insülin üretimi için hedef hücre adayı olarak enteroendokrin hücrelerin değerlendirilmesi fikrini destekler niteliktedir (55).

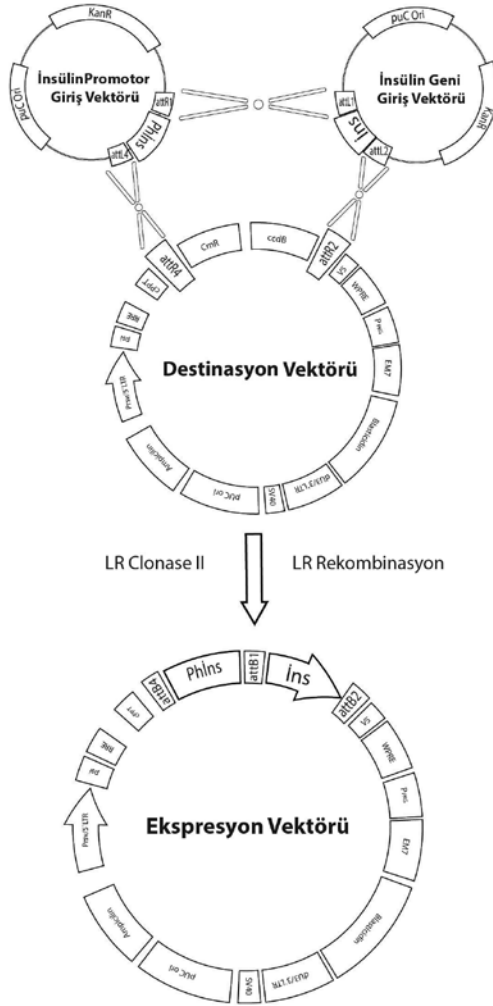
İdeal olarak, pankreatik beta hücresi yerine kullanılacak bir aday hücrenin, glukoz indüklü postprandiyal insülin sekresyonunun düzenlenmesinde önemli rol oynayan GLP-1 reseptörlerini de eksprese etmesi beklenmelidir (56). Ayrıca metabolik stres altında PACAP ve VIP indüklü sinyal yolları aracılığıyla glukoz metabolizmasının kontrol edilebilmesi için nöronal sinyallere de ihtiyaç duyulmaktadır. İnsülin, normal koşullar altında beta hücrelerin uyarılmasını takiben birkaç dakika içinde, hücrelerin sitoplazmasında halihazırda var olan salgı granüllerinin boşaltılmasıyla, hücrelerden salınır. Aday

bir hücreden insülin sekresyonu, transkripsiyonal aktivasyona bağlı olarak dakikalardan çok saatler içinde gerçekleşir. Preproinsülin mRNA'sının yarılanma ömrü, aday beta hücrelerinde (6 saatten daha kısa) normal beta hücrelerine göre (yaklaşık 24 saat) çok daha kısa olmasına rağmen, transkripsiyonel inhibisyonu takiben sinyalin sonlandırılması da oldukça yavaş gerçekleşen bir işlemdir. Ancak, fizyolojik kontrolün sağlanabilmesi için insülin sekresyonunun uyarıcı yokluğunda birkaç dakika içerisinde sonlanması gerekmektedir. Preproinsülin mRNA stabilitesinin ve işlenme sürecinin kontrolünde, beta hücre spesifik faktörler rol oynadığından; aday beta hücrelerinde düzgün bir kontrollü regülatör sistem oluşturabilmek için, preproinsülin cDNA'sını kodlayan gen tedavi vektörlerinin, tüm bu özelliklerin göz önünde bulundurulması, dikkatlice tasarlanması gerekmektedir. Tüm bunlarla birlikte, somatik hücrelerin hedeflendiği C-peptid ile kombine (57) insülin gen tedavi yaklaşımlarının büyük bir potansiyele sahip olduğuna dair (31) ön bulgular olsa da, adacık transplantasyonu ve insülin uygulamaları gibi halihazırda kullanılan tedavi yöntemlerine kıyasla etkinliklerinin gösterildiği ileri çalışmaların yapılması gerekmektedir (58; 59).

GEN TERAPİ ARACILI BETA HÜCRE OLUŞUMUNUN İNDÜKLENMESİ VE İNSÜLİN GEN TERAPİ STRATEJİLERİ AÇISINDAN TİP 1 DİYABET TEDAVİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Pankreas gelişimi ve beta hücrelerinin olgunlaşması için insülin promotör faktör 1 olarak da bilinen Pankreatik ve Duodenal Homeobox 1 (PDX-1) proteini gereklidir (60). Ek olarak, PDX-1 transkripsiyon faktörü, adacık hücre fonksiyonunun ve adacık spesifik insülin gen ekspresyonunun düzenlenmesinde ana regülatör görevi görür. Gen tedavisi yoluyla insülinin ekzokrin olmayan bir dokudan ekspresyonunun sağlanmasına makul bir alternatif, diğer somatik hücre tiplerinden gen aktarımı yoluyla insülin salgılayan beta hücrelerinin üretilmesidir (61). He-

Şekil 2: İnsülin promotor kontrolü altında insülin geni kodlayan lentiviral ekspresyon vektörlerinin oluşturulması. İnsülin promotörü ve proinsülin sekansı iki ayrı giriş vektörlerine klonlanır. Gateway rekombinasyon reaksiyonları ile insülin promotörlü (pENTR5'Ip) ve proinsülin sekanslı giriş vektörlerindeki (pENTRIns) genler lentiviral iskelet taşıyan destinasyon vektörüne aktarılır ve böylece pLenti-IPINS ekspresyon vektörü (transfer plazmid) oluşur. Transfer plazmidle lentiviral paketleme plazmidlerinin 293T hücrelerine transfeksiyonuyla insülin promotörlü proinsülin sekanslı lentiviral vektörler (LentiINS) oluşturulur.



patositler ve pankreatik asiner hücrelerin her ikisi de aynı germ tabakasından (ilkel barsak endodermi) orijin alır. Bu nedenle, ekzojen PDX-1 ekspresyonu sağlayarak, adacık dışı bir dokuda hepatositlerin “beta benzeri hücrelere” ne ölçüde programlanabileceğinin in vivo test edilmesi amacıyla, farelerin karaciğerine rekombinant adenovirus aracılı PDX-1 (Ad-CMV-PDX-1) aktarımı yapılmıştır (62). STZ indüklü diyabetik farelerde, PDX-1 gen ekspresyonuyla, endojen insülin 1 ve 2 genlerinin ve prohormon konvertaz 1/3’ün stimülasyonu sonucu oluşan biyolojik aktif insülin sayesinde, hiperglisemi iyileştirilmiştir (63). Adenoviruslerin doğaları gereği geçici gen ekspresyonu sağladıkları bilinmesine rağmen, Ad-CMV-PDX-1 rekombinant adenovirüsler ile yapılan bir uygulamanın, Balb/C fareleri STZ indüklü hiperglisemiden 8 ay süreyle koruyabildiği gösterilmiştir (64). Obez olmayan siklofosamid indüklü diyabetik (CAD-NOD) farelerde yapılan rekombinant adenovirus aracılı PDX-1 gen terapisiyle hipergliseminin iyileştirilebildiğinin gösterilmesi de bu terapötik yaklaşımı desteklemektedir (65). MafA, Ngn3 ve/veya NeuroD1 de dahil olmak üzere bir veya birkaç farklı pankreatik transkripsiyon faktörünün PDX-1 ile ko-ekspresyonu sonucunda, karaciğer hücrelerinin adacık beta hücre benzeri hücre kümelerine yeniden programlanma etkinliklerinde artış gözlenmiştir (66-68). Bunlara ek olarak, PDX-1 ve çözünür faktörlerin bir arada kullanımıyla, erişkin insan karaciğer hücrelerinin insülin üreten fonksiyonel hücrelere başarıyla dönüştürüldüğü belirtilmiştir (69). Erişkin insan karaciğer hücre kökenli bu dönüştürülen hücrelerin, diyabetik farelerin böbrek altı kapsülüne transplantasyonu sonrasında, daha uzun süreyle normoglisemi sağlandığı gösterilmiştir. Dolayısıyla, otolog beta hücresi replasman tedavisi için bir alternatif olarak yetişkin insan karaciğer dokusunun kullanım potansiyeli artmıştır. Karaciğer dokusunun yanı sıra, JAK2/STAT3 sinyal yolunun agonistleri (epidermal büyüme faktörü ve lösemi inhibe edici faktör) kullanılarak, asiner ekzokrin hücrelerin beta hücrelerine

yeniden programlanması başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir (70). Benzer şekilde, üç transkripsiyon faktörünün (Ngn3, PDX-1 ve MafA) in vivo olarak yeniden eksprese edilmesiyle, yetişkin farelerde pankreas ekzokrin hücrelerin, beta hücresi benzeri hücre kümelerine dönüşümü sağlanmıştır (71). Son olarak, erişkin somatik hücrelerinin doğrudan endokrin pankreasa yeniden programlanabilme olasılığını incelemek amacıyla yapılan bir çalışmada; gelişimsel süreçle bağlantılı olmayan bir doku olan, ektodermal kökenli insan deri keratinositleri kullanılmıştır (72). PDX-1 uygulanan keratinositlerin; yeniden programlanarak, yüksek glukoz seviyelerine yanıt olarak insülin üretebilme, insülini işleyebilme ve salgılayabilme gibi beta hücresi benzeri fonksiyonlar kazandığı gösterilmiştir.

Beta hücre neogenezi, embriyogenez sırasında duktal epitelden adacık endokrin hücrelerinin tomurcuklanmasıyla gerçekleşebilir. Pankreasın gelişimi esnasında tomurcuklanan kanallarda Ngn3 aktivasyonu ile, epitel-yal progenitor hücrelerin adacık hücrelerine farklılaşması indüklenir. Bu bilgiler ışığında, yetişkin insan pankreatik kanal hücrelerinde Ngn3’ün ektopik ekspresyonu gerçekleştirilmiştir. Kanal hücrelerinde Ngn3’ün ekspresyonu; kanal hücrelerinin adacık endokrin hücre türüne yeniden programlanmasını sağlayacak bir gen ekspresyon profilinin oluşmasına yol açmıştır (73). Tüm bu bulgular, diyabetik hastalarda bozulan adacık hücre fonksiyonlarının geri kazandırılması için insülin gen tedavisine bir alternatif olarak; aday hücrelerin beta hücrelerine farklılaştırılması amacıyla geliştirilecek gen tedavi stratejilerinin faydalı olabileceğini ortaya koymaktadır.

SONUÇ

Tip 1 diyabet hastalarının hepsi ve Tip 2 Diyabet hastalarının (T2DM) çoğunluğu, hastalığın ilerleyen dönemlerinde beta hücre kaybına bağlı olarak zaman içinde insüline bağımlı hale geldiklerinden, gen transfer vektörleri aracılığıyla insülin gen aktarımı; diyabetik hastalarda endojen insülin sentez

profilini taklit edebilecek potansiyel terapötik bir yaklaşımdır. Bu nedenle, insülin gen terapisinin ana hedefleri, hedef dokularda insülin gen ekspresyonunun sağlanabilmesi, periferel dokulara glukoz alımının artırılması, glukagon sekresyonunun baskılanması ve hipergliseminin azaltılabilmesi için hepatik glukoz üretiminin inhibe edilmesi olarak tanımlanabilir (74). İnsülin gen terapisi, hastalarda en azından bazal plazma insülin gereksiniminin karşılanabilmesi için gerekli çözümü sağlayabilecek bir yaklaşımdır (75). Bunun yanısıra insülin gen nakli ile; T1DM hastalarında metabolik stabilite için esansiyel olan rezidüel beta hücre fonksiyonunun korunması ve zamanla artırılması da mümkün olabilir. Ayrıca, diyabetik hastalarda C-peptidin yararlı etkiler göstermesine rağmen, regüler insan insülini ve insülin analoglarında C-peptid olmadığından, T1DM hastalarında C-peptidin insülin preperatlarına dahil edilip edilmemesi gerekliliği konusunda bilim camiasında bir kargaşa yaşanmaktadır. Tip 2 diyabet hastalarında, hastalığın erken evrelerinde C-peptid seviyesinde bir artış gözlenmesi ilk başlarda bu konuda bir tereddüte sebebiyet vermiş olsa da, bugün için C-peptidin bir insülin belirteci olmaktan öte, diyabetik hastalarda böbrek ve sinir fonksiyonlarını arttıran, esansiyel organlara kan akışını sağlayan bir peptid olduğu belirlenmiştir (76). Dolayısıyla insülin gen nakli yalnızca insülin ihtiyacını karşılamak için değil, aynı zamanda şu anda T1DM hastalarının insülin preperatlarında olmayan C-peptid gereksinimini karşılayarak diyabetik komplikasyonların gelişimini engelleyebilmek için de gerekli olabilir. Sadece bazal insülin ihtiyacını karşılayacak özellikte değil, aynı zamanda gün içerisinde değişen kan glukoz düzeylerine cevap verebilecek (özellikle yemek sonrası-postprandiyal glukoz düzeyi) özellikte, yeni bir insülin gen nakil vektörü (LentiİNS) oluşturularak T1DM deney hayvan modelinde etkinliğinin araştırılmasını içeren örnek bir insülin gen nakli çalışması önerilebilir. Bu amaçla insan insülin promotörlü doğal proinsülin kodlayan DNA dizileri, güvenilirliği ve etkinliği

linik denemelerde kanıtlanmış 3. jenerasyon lentiviral vektörlere aktarılabilir (Şekil 2). İnsan insülin promotör kullanımı hem glukoz yanıtı oluşturmak için hem de insülin gen sentezini pankreatik beta hücrelerine özgün kılmak için gereklidir. Oluşturulan LentiİNS vektörünün terapötik etkinliğinin T1DM sıçanlarda test edilmesi gerekmektedir. Böylece, LentiİNS vektörünün T1DM hastalığının gelişimindeki etkisi veya gelişen T1DM bulgularının vektör uygulaması ile geri döndürülüp döndürülemeyeceği belirlenebilir. Bunun yanısıra, deneklerde bazal insülin düzeylerinin ve postprandiyal insülin seviyelerinin glukoz tolerans testleriyle belirlenmesi gerekmektedir. Pankreatik beta hücrelerine spesifik ekzojen insülin sentezinin insülin duyarlılığını etkileyip etkilemediği insülin tolerans testleriyle ölçülmelidir. LentiİNS uygulamasının pankreatik beta hücreleri üzerindeki antiapoptotik ve proliferatif etkilerinin immunohistokimyasal deneylerle de araştırılması gerekmektedir. Bunların dışında T1DM deneklerindeki oto-reaktif hücrel immüniteyi baskılamak ve immün toleransı indükleyebilmek için ek olarak immün regülatör gen nakli (örneğin Vazoaktif İntestinal Peptid kodlayan lentiviruslarla (LentiVİP)) gerçekleştirilebilir (77). Böylelikle deneysel kombine gen terapi uygulamalarıyla T1DM hastalığına karşı köklü bir çözüm bulunup bulunamayacağına yönelik çalışmalar yapılabilir. Bu örnek gen tedavi yaklaşımında temel düşünce, T1DM modelinde deneklerin insülin ihtiyacını karşılayan, otoreaktif hücrel yanıtı baskılayan ve immün toleransı geliştiren özelliklere sahip bir strateji geliştirerek, T1DM hastalığının tedavi edilebilme olasılığını değerlendirmektir (78; 79).

TEŞEKKÜR

Fulya Erendor ve Elif Özgecan Şahin'e yayının hazırlanmasında buldukları katkılardan dolayı teşekkür ederiz. Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri ve TUBITAK (TUBITAK-215S820) tarafından desteklenmektedir.

KAYNAKLAR

1. Teuscher A: [The biological effect of purely synthetic human insulin in patients with diabetes mellitus]. *Schweiz Med Wochenschr* 1979;109:743-747
2. Moore HP, Walker MD, Lee F, Kelly RB: Expressing a human proinsulin cDNA in a mouse ACTH-secreting cell. Intracellular storage, proteolytic processing, and secretion on stimulation. *Cell* 1983;35:531-538
3. Dong H, Woo SL: Hepatic insulin production for type 1 diabetes. *Trends Endocrinol Metab* 2001;12:441-446
4. Wong MS, Hawthorne WJ, Manolios N: Gene therapy in diabetes. *Self/Nonself* 2010;1:165-175
5. Hughes A, Jessup C, Drogemuller C, Mohanasundaram D, Milner C, Rojas D, Russ GR, Coates PT: Gene therapy to improve pancreatic islet transplantation for Type 1 diabetes mellitus. *Curr Diabetes Rev* 2010;6:274-284
6. Bagley J, Paez-Cortez J, Tian C, Iacomini J: Gene therapy in type 1 diabetes. *Crit Rev Immunol* 2008;28:301-324
7. Nett PC, Sollinger HW, Alam T: Hepatic insulin gene therapy in insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Transplant* 2003;3:1197-1203
8. Kobinger GP, Deng S, Louboutin JP, Vatamaniuk M, Matschinsky F, Markmann JF, Raper SE, Wilson JM: Transduction of human islets with pseudotyped lentiviral vectors. *Hum Gene Ther* 2004;15:211-219
9. Zhang B, Xia HQ, Cleghorn G, Gobe G, West M, Wei MQ: A highly efficient and consistent method for harvesting large volumes of high-titre lentiviral vectors. *Gene Ther* 2001;8:1745-1751
10. Tasyurek HM, Altunbas HA, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S: Therapeutic potential of lentivirus-mediated glucagon-like peptide-1 (GLP-1) gene therapy for diabetes. *Hum Gene Ther* 2018; DOI: 10.1089/hum.2017.180
11. Sanlioglu S, Monick MM, Luleci G, Hunninghake GW, Engelhardt JF: Rate limiting steps of AAV transduction and implications for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 2001;1:137-147
12. Doerschug K, Sanlioglu S, Flaherty DM, Wilson RL, Yarovsky T, Monick MM, Engelhardt JF, Hunninghake GW: First-generation adenovirus vectors shorten survival time in a murine model of sepsis. *J Immunol* 2002;169:6539-6545
13. Barbu AR, Akusjarvi G, Welsh N: Adenoviral-mediated transduction of human pancreatic islets: importance of adenoviral genome for cell viability and association with a deficient antiviral response. *Endocrinology* 2005;146:2406-2414
14. Zhang JA, Jia D, Olson DE, Campbell AG, Thule PM: Hepatic insulin gene therapy diminishes liver glycogen despite insulin responsive transcriptional effects in diabetic CD-1 mice. *J Gene Med* 2009;11:588-597
15. Sanlioglu S, Engelhardt JF: Cellular redox state alters recombinant adeno-associated virus transduction through tyrosine phosphatase pathways. *Gene Ther* 1999;6:1427-1437
16. Sanlioglu S, Benson PK, Yang J, Atkinson EM, Reynolds T, Engelhardt JF: Endocytosis and nuclear trafficking of adeno-associated virus type 2 are controlled by rac1 and phosphatidylinositol-3 kinase activation. *J Virol* 2000;74:9184-9196
17. Sanlioglu S, Benson P, Engelhardt JF: Loss of ATM function enhances recombinant adeno-associated virus transduction and integration through pathways similar to UV irradiation. *Virology* 2000;268:68-78
18. Alba R, Bosch A, Chillon M: Gutless adenovirus: last-generation adenovirus for gene therapy. *Gene Ther* 2005;12 Suppl 1:S18-27
19. Palmer DJ, Ng P: Helper-dependent adenoviral vectors for gene therapy. *Hum Gene Ther* 2005;16:1-16
20. Kolodka TM, Finegold M, Moss L, Woo SL: Gene therapy for diabetes mellitus in rats by hepatic expression of insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:3293-3297
21. Falqui L, Martinenghi S, Severini GM, Corbella P, Taglietti MV, Arcelloni C, Saruger E, Monti LD, Paroni R, Dozio N, Pozza G, Bordignon C: Reversal of diabetes in mice by implantation of human fibroblasts genetically engineered to release mature human insulin. *Hum Gene Ther* 1999;10:1753-1762
22. Auricchio A, Gao GP, Yu QC, Raper S, Rivera VM, Clackson T, Wilson JM: Constitutive and regulated expression of processed insulin following *in vivo* hepatic gene transfer. *Gene Ther* 2002;9:963-971
23. Vollenweider F, Kaufmann J, Irrminger JC, Halban PA: Processing of proinsulin by furin, PC2, and PC3 in (co)transfected COS (monkey kidney) cells. *Diabetes* 1995;44:1075-1080
24. Groskreutz DJ, Sliwkowski MX, Gorman CM: Genetically engineered proinsulin constitutively processed and secreted as mature, active insulin. *J Biol Chem* 1994;269:6241-6245
25. Simonson GD, Groskreutz DJ, Gorman CM, MacDonald MJ: Synthesis and processing of genetically modified human proinsulin by rat myoblast primary cultures. *Hum Gene Ther* 1996;7:71-78
26. Irrminger JC, Meyer K, Halban P: Proinsulin processing in the rat insulinoma cell line INS after overexpression of the endoproteases PC2 or PC3 by recombinant adenovirus. *Biochem J* 1996;320 (Pt 1):11-15
27. Short DK, Okada S, Yamauchi K, Pessin JE: Adenovirus-mediated transfer of a modified human proinsulin gene reverses hyperglycemia in diabetic mice. *Am J Physiol* 1998;275:E748-756
28. Dong H, Morral N, McEvoy R, Meseck M, Thung SN, Woo SL: Hepatic insulin expression improves

- glycemic control in type 1 diabetic rats. *Diabetes Res Clin Pract* 2001;52:153-163
29. Tanaka SI, Yamakawa T, Kimura M, Aoki I, Kamei J, Okuda K, Mobbs C: Daily nasal inoculation with the insulin gene ameliorates diabetes in mice. *Diabetes Res Clin Pract* 2004;63:1-9
 30. Park YM, Woo S, Lee GT, Ko JY, Lee Y, Zhao ZS, Kim HJ, Ahn CW, Cha BS, Kim KS, Park CW, Lee HC: Safety and efficacy of adeno-associated viral vector-mediated insulin gene transfer via portal vein to the livers of streptozotocin-induced diabetic Sprague-Dawley rats. *J Gene Med* 2005;7:621-629
 31. Elsner M, Terbish T, Joms A, Naujok O, Wedekind D, Hedrich HJ, Lenzen S: Reversal of diabetes through gene therapy of diabetic rats by hepatic insulin expression via lentiviral transduction. *Mol Ther* 2012;20:918-926
 32. Lu D, Tamemoto H, Shibata H, Saito I, Takeuchi T: Regulatable production of insulin from primary-cultured hepatocytes: insulin production is up-regulated by glucagon and cAMP and down-regulated by insulin. *Gene Ther* 1998;5:888-895
 33. Han J, McLane B, Kim EH, Yoon JW, Jun HS: Remission of diabetes by insulin gene therapy using a hepatocyte-specific and glucose-responsive synthetic promoter. *Mol Ther* 2011;19:470-478
 34. Alam T, Sollinger HW: Glucose-regulated insulin production in hepatocytes. *Transplantation* 2002;74:1781-1787
 35. Shih H, Towle HC: Definition of the carbohydrate response element of the rat S14 gene. Context of the CACGTG motif determines the specificity of carbohydrate regulation. *J Biol Chem* 1994;269:9380-9387
 36. Thule PM, Liu J, Phillips LS: Glucose regulated production of human insulin in rat hepatocytes. *Gene Ther* 2000;7:205-214
 37. Thule PM, Campbell AG, Kleinhenz DJ, Olson DE, Boutwell JJ, Sutliff RL, Hart CM: Hepatic insulin gene therapy prevents deterioration of vascular function and improves adipocytokine profile in STZ-diabetic rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;290:E114-E122
 38. Chen R, Meseck M, McEvoy RC, Woo SL: Glucose-stimulated and self-limiting insulin production by glucose 6-phosphatase promoter driven insulin expression in hepatoma cells. *Gene Ther* 2000;7:1802-1809
 39. Argaud D, Zhang Q, Pan W, Maitra S, Pilkis SJ, Lange AJ: Regulation of rat liver glucose-6-phosphatase gene expression in different nutritional and hormonal states: gene structure and 5'-flanking sequence. *Diabetes* 1996;45:1563-1571
 40. Chen R, Meseck ML, Woo SL: Auto-regulated hepatic insulin gene expression in type 1 diabetic rats. *Mol Ther* 2001;3:584-590
 41. Burkhardt BR, Loiler SA, Anderson JA, Kilberg MS, Crawford JM, Flotte TR, Goudy KS, Ellis TM, Atkinson M: Glucose-responsive expression of the human insulin promoter in HepG2 human hepatoma cells. *Ann NY Acad Sci* 2003;1005:237-241
 42. Duan D, Sharma P, Dudus L, Zhang Y, Sanlioglu S, Yan Z, Yue Y, Ye Y, Lester R, Yang J, Fisher KJ, Engelhardt JF: Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression. *J Virol* 1999;73:161-169
 43. Sanlioglu S, Duan D, Engelhardt JF: Two independent molecular pathways for recombinant adeno-associated virus genome conversion occur after UV-C and E4orf6 augmentation of transduction. *Hum Gene Ther* 1999;10:591-602
 44. Yasutomi K, Itokawa Y, Asada H, Kishida T, Cui FD, Ohashi S, Gojo S, Ueda Y, Kubo T, Yamagishi H, Imanishi J, Takeuchi T, Mazda O: Intravascular insulin gene delivery as potential therapeutic intervention in diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;310:897-903
 45. Yang YW, Chao CK: Incorporation of calcium phosphate enhances recombinant adeno-associated virus-mediated gene therapy in diabetic mice. *J Gene Med* 2003;5:417-424
 46. Hsu PY, Yang YW: Effect of polyethylenimine on recombinant adeno-associated virus mediated insulin gene therapy. *J Gene Med* 2005;7:1311-1321
 47. Hsu PY, Kotin RM, Yang YW: Glucose- and metabolically regulated hepatic insulin gene therapy for diabetes. *Pharm Res* 2008;25:1460-1468
 48. Brockstedt DG, Podsakoff GM, Fong L, Kurtzman G, Mueller-Ruchholtz W, Engleman EG: Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol* 1999;92:67-75
 49. Flotte TR: Immune responses to recombinant adeno-associated virus vectors: putting preclinical findings into perspective. *Hum Gene Ther* 2004;15:716-717
 50. Sun JY, Anand-Jawa V, Chatterjee S, Wong KK: Immune responses to adeno-associated virus and its recombinant vectors. *Gene Ther* 2003;10:964-976
 51. Rivera VM, Wang X, Wardwell S, Courage NL, Volchuk A, Keenan T, Holt DA, Gilman M, Orci L, Cerasoli F, Jr., Rothman JE, Clackson T: Regulation of protein secretion through controlled aggregation in the endoplasmic reticulum. *Science* 2000;287:826-830
 52. Cheung AT, Dayanandan B, Lewis JT, Korbitt GS, Rajotte RV, Bryer-Ash M, Boylan MO, Wolfé MM, Kieffer TJ: Glucose-dependent insulin release from genetically engineered K cells. *Science* 2000;290:1959-1962
 53. Corbett JA: K cells: a novel target for insulin gene therapy for the prevention of diabetes. *Trends En-*

- doocrinol Metab 2001;12:140-142
54. Tang SC, Sambanis A: Differential rAAV2 transduction efficiencies and insulin secretion profiles in pure and co-culture models of human enteroendocrine L-cells and enterocytes. *J Gene Med* 2004;6:1003-1013
 55. Niu L, Xu YC, Dai Z, Tang HQ: Gene therapy for type 1 diabetes mellitus in rats by gastrointestinal administration of chitosan nanoparticles containing human insulin gene. *World J Gastroenterol* 2008;14:4209-4215
 56. Halban PA, Kahn SE, Lemmark A, Rhodes CJ: Gene and cell-replacement therapy in the treatment of type 1 diabetes: how high must the standards be set? *Diabetes* 2001;50:2181-2191
 57. Wahren J, Kallas A, Sima AA: The clinical potential of C-peptide replacement in type 1 diabetes. *Diabetes* 2012;61:761-772
 58. Kahraman S, Dirice E, Hapil FZ, Ertosun MG, Ozturk S, Griffith TS, Sanlioglu S, Sanlioglu AD: Tracing of islet graft survival by way of in vivo fluorescence imaging. *Diabetes Metab Res Rev* 2011;27:575-583
 59. Shapiro AM, Lakey JR, Paty BW, Senior PA, Bigam DL, Ryan EA: Strategic opportunities in clinical islet transplantation. *Transplantation* 2005;79:1304-1307
 60. Collombat P, Xu X, Heimberg H, Mansouri A: Pancreatic beta-cells: from generation to regeneration. *Semin Cell Dev Biol* 2010;21:838-844
 61. Yi F, Liu GH, Izpisua Belmonte JC: Rejuvenating liver and pancreas through cell transdifferentiation. *Cell Res* 2012;22:616-619
 62. Ferber S, Halkin A, Cohen H, Ber I, Einav Y, Goldberg I, Barshack I, Seijffers R, Kopolovic J, Kaiser N, Karasik A: Pancreatic and duodenal homeobox gene 1 induces expression of insulin genes in liver and ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia. *Nat Med* 2000;6:568-572
 63. Ferber S: Can we create new organs from our own tissues? *Isr Med Assoc J* 2000;2 Suppl:32-36
 64. Ber I, Shternhall K, Perl S, Ohanuna Z, Goldberg I, Barshack I, Benvenisti-Zarum L, Meivar-Levy I, Ferber S: Functional, persistent, and extended liver to pancreas transdifferentiation. *J Biol Chem* 2003;278:31950-31957
 65. Shternhall-Ron K, Quintana FJ, Perl S, Meivar-Levy I, Barshack I, Cohen IR, Ferber S: Ectopic PDX-1 expression in liver ameliorates type 1 diabetes. *J Autoimmun* 2007;28:134-142
 66. Kaneto H, Miyatsuka T, Fujitani Y, Noguchi H, Song KH, Yoon KH, Matsuoka TA: Role of PDX-1 and MafA as a potential therapeutic target for diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2007;77 Suppl 1:S127-137
 67. Tang DQ, Cao LZ, Chou W, Shun L, Farag C, Atkinson MA, Li SW, Chang LJ, Yang LJ: Role of Pax4 in Pdx1-VP16-mediated liver-to-entodocrine pancreas transdifferentiation. *Lab Invest* 2006;86:829-841
 68. Wang AY, Ehrhardt A, Xu H, Kay MA: Adenovirus transduction is required for the correction of diabetes using Pdx-1 or Neurogenin-3 in the liver. *Mol Ther* 2007;15:255-263
 69. Sapir T, Shternhall K, Meivar-Levy I, Blumenfeld T, Cohen H, Skutelsky E, Eventov-Friedman S, Barshack I, Goldberg I, Pri-Chen S, Ben-Dor L, Polak-Charcon S, Karasik A, Shimon I, Mor E, Ferber S: Cell-replacement therapy for diabetes: Generating functional insulin-producing tissue from adult human liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:7964-7969
 70. Baeyens L, Bouwens L: Can beta-cells be derived from exocrine pancreas? *Diabetes Obes Metab* 2008;10 Suppl 4:170-178
 71. Zhou Q, Brown J, Kanarek A, Rajagopal J, Melton DA: In vivo reprogramming of adult pancreatic exocrine cells to beta-cells. *Nature* 2008;455:627-632
 72. Mauda-Havakuk M, Litichever N, Chemichovski E, Nakar O, Winkler E, Mazkereth R, Orenstein A, Bar-Meir E, Ravassard P, Meivar-Levy I, Ferber S: Ectopic PDX-1 expression directly reprograms human keratinocytes along pancreatic insulin-producing cells fate. *PLoS One* 2011;6:e26298
 73. Swales N, Martens GA, Bonne S, Heremans Y, Borup R, Van de Castele M, Ling Z, Pipeleers D, Ravassard P, Nielsen F, Ferrer J, Heimberg H: Plasticity of adult human pancreatic duct cells by neurogenin3-mediated reprogramming. *PLoS One* 2012;7:e37055
 74. Bansal P, Wang Q: Insulin as a physiological modulator of glucagon secretion. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2008;295:E751-761
 75. Marcin JP, Kuppermann N, Tancredi DJ, Glaser NS: Insulin administration for treatment of pediatric diabetic ketoacidosis: are lower rates of infusion beneficial? *Pediatr Crit Care Med* 2011;12:217-219
 76. Kamiya H, Zhang W, Sima AA: The beneficial effects of C-Peptide on diabetic polyneuropathy. *Rev Diabet Stud* 2009;6:187-202
 77. Tasyurek MH EY, Sanlioglu AD, Altunbas HA, Balci MK, Griffith TS, Sanlioglu S: HIV-based lentivirus-mediated vasoactive intestinal peptide gene delivery protects against DIO animal model of Type 2 diabetes. *Gene Therapy (In Press)* 2018;
 78. Wang M, Racine J, Song X, Li X, Nair I, Liu H, Avakian-Mansoorian A, Johnston H, Liu C, Shen C, Atkinson M, Todorov I, Kandeel F, Forman S, Wilson B, Zeng D: Mixed Chimerism and Growth Factors Augment beta Cell Regeneration and Reverse Late-Stage Type 1 Diabetes. *Sci Transl Med* 2012;4:133ra159
 79. Chong A, Bell G: Three Strikes and You're Cured. *Sci Transl Med* 2012;4:133f112

