

Korzystna dynamika zmian subpopulacji komórek dendrytycznych u dzieci z cukrzycą typu 1 w czasie stosowania analogu witaminy D

Dynamics of Changes in Dendritic Cell Subsets in Children with Type 1 Diabetes During Treatment with Vitamin D Analogue

¹Robert Piekarski, ¹Leszek Szewczyk, ²Jacek Tabarkiewicz, ²Jacek Roliński

¹Klinika Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ²Katedra i Zakład Immunologii Klinicznej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
¹Dept. Pediatric Endocrinology and Diabetology, Medical University of Lublin, ²Dept. Clinical Immunology, Medical University of Lublin

Adres do korespondencji: Robert Piekarski, Klinika Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ul. Chodźki 2, 20-093 Lublin, r.piekarski@wp.pl

Słowa kluczowe: cukrzyca typu 1, komórki dendrytyczne, witamina D
Key words: type 1 diabetes mellitus, dendritic cells, vitamin D

Grant MNiSzW N N407 310033

STRESZCZENIE/ABSTRACT

Wstęp. Cukrzyca typu 1 jest chorobą o podłożu autoimmunizacyjnym, w której w inicjacji jak i modulowaniu odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciwko antygenom komórek β wysp trzustkowych ważną rolę odgrywają m.in. komórki dendrytyczne (DC). Celem naszego badania była ocena krążących komórek dendrytycznych mieloidalnych (mDC) i plazmacytoidalnych (pDC) u dzieci z cukrzycą typu 1 przed i po roku stosowania analogu witaminy D3 (Alfadiol) w obu badanych grupach oraz porównując do grupy dzieci zdrowych. **Materiał i metody.** Badaniem objęto grupę 90 dzieci w wieku średnio $8,75 \pm 3,13$ lat ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1, które losowo włączono do 2 grup (otrzymujących analog witaminy D3 lub nie) i poddano rocznej obserwacji. U wszystkich dzieci oceniono dwukrotnie poziom 25(OH) D3, c-peptydu oraz przeciwciała a-GAD i a-IA2 oraz badane populacje komórek przy pomocy cytometrii przepływowej. Grupę odniesienia stanowiło 15 zdrowych dzieci. Analizowano odsetek niedojrzałych DC mieloidalnych BDCA-1+/CD19- i plazmacytoidalnych BDCA-2+/CD123+. **Wyniki.** U 72% dzieci, które otrzymywały Alfadiol, oraz u 50% bez Alfadiolu stwierdzono wzrost lub utrzymywanie się wartości c-peptydu w ciągu rocznego monitorowania w porównaniu z wartościami wyjściowymi. We krwi dzieci chorych na cukrzycę typu 1 nieotrzymujących Alfadiolu stwierdzono średni odsetek mieloidalnych DCs wynoszący 0,79% i istotnie wyższy ($p < 0,05$) niż w grupie dzieci zdrowych (0,26%). Natomiast nie stwierdzono różnic dotyczących odsetka komórek BDCA1+ pomiędzy grupą otrzymującą Alfadiol a grupą kontrolną. Odsetek komórek plazmacytoidalnych nie różnił się istotnie pomiędzy badanymi grupami. Przeanalizowano dynamikę zmian odsetka badanych subpopulacji DC w relacji do stanu wyjściowego (świeżo rozpoznana cukrzyca). **Wnioski.** Wykazane różnice analizo-

wanych parametrów i populacji komórek układu immunologicznego zachęcają do bardziej szczegółowej analizy zaobserwowanych zależności, bowiem wydają się wskazywać na pewne pozytywne elementy stosowanego analogu witaminy D3 u dzieci z cukrzycą typu 1. Endokrynol. Ped. 11/2012;4(41):9-16.

Background. Type 1 diabetes is a disease of autoimmune pathogenesis in which dendritic cells (DC) plays an important role in the initiation and modulation of immune response against antigens of pancreatic islet β cells. The aim of our study was to evaluate circulating myeloid dendritic cells (mDC) and plasmacytoid dendritic cells (pDC) in children with type 1 diabetes before and after application of the vitamin D3 analogue (Alfadiol) in both groups and compared to a group of healthy children. **Materials and methods.** The study group comprised 90 children, mean age $8,75 \pm 3,13$ years, with newly diagnosed type 1 diabetes who were randomly enrolled into two groups (treated with vitamin D3 analogue or not) and subjected to annual follow-up. In all children were assessed twice the level of 25 (OH) D3, C-peptide and anti-GAD and anti-IA2 antibodies and cell subpopulations were examined using flow cytometry. The reference group consisted of 15 healthy children. We analyzed the percentage of immature myeloid DC BDCA-1 + / CD19- and plasmacytoid BDCA-2 + / CD123 +. **Results.** In 72% of children who received Alfadiol and in 50% without Alfadiol, an increase or maintain the value of C-peptide during the annual monitoring as compared with baseline values was observed. In the blood of children with type 1 diabetes not receiving Alfadiol the average percentage of myeloid DCs was 0.79% and was significantly higher ($p < 0.05$) than in healthy children (0.26%). However, there were no differences in the percentage of BDCA1 + cells between the group receiving Alfadiol and a control group. The percentage of plasmacytoid cells did not differ significantly between groups. The dynamics of changes in the percentage of DC subsets in relation to baseline (newly diagnosed diabetes) was analyzed. **Conclusions:** The demonstrated differences of the analyzed parameters and the population of immune system cells encouraging more detailed analysis of the observed dependence, because they seem to indicate certain positive elements of used vitamin D3 analogue in children with type 1 diabetes. *Pediatr. Endocrinol.* 11/2012;4(41):9-16.

Wstęp

Cukrzyca typu 1 jest chorobą o podłożu autoimmunizacyjnym, w której odpowiedź immunologiczna skierowana przeciwko antygenom komórek β wysp trzustkowych doprowadza do ich zniszczenia i bezwzględnego niedoboru insuliny. W jej patogenie biorą udział czynniki genetyczne [1] i immunologiczne, począwszy od zaburzenia centralnych mechanizmów autotolerancji [2] poprzez aktywację komórek dendrytycznych (DC), które w lokalnych węzłach chłonnych aktywują autoreaktywne limfocyty T [3,4], do zaburzenia immunoregulacji ze strony limfocytów T regulatorowych (Treg) [5].

Przeprowadzone liczne badania oceniają immunomodulacyjne właściwości witaminy D i jej analogów, podejmowane są próby wykorzystania preparatów witaminy D w prewencji i leczeniu chorób o podłożu autoimmunologicznym, m.in. cukrzycy typu 1 [6–8]. Aktywna forma witaminy D₃ (1,25(OH)₂D₃) wywiera działanie immunomodulacyjne poprzez swoiste receptory jądrowe (VDR) obecne w wielu komórkach układu odpornościowego (makrofagi, komórki dendrytyczne, aktywowane L_T i L_B) [9–12].

Komórki dendrytyczne (DC) uważane są za wyspecjalizowane komórki prezentujące antygen. Ich rolą jest • aktywacja zarówno odpowiedzi komórkowej, jak i humoralnej • indukcja odpowiedzi

przeciwwirusowej, bakteryjnej, nowotworowej • indukcja tolerancji immunologicznej • cytotoxiczność? Tworzą heterogenną grupę komórek od prekursorowych stwierdzanych w szpiku, niedojrzałych DC – w narządach Nielimfatycznych, poprzez migrujące DC – obecne w limfie i krwi oraz dojrzałe DC – stwierdzane w narządach limfatycznych. Komórki dendrytyczne dostępne badaniom we krwi obwodowej różnią się fenotypem oraz funkcją. Wyróżnia się komórki dendrytyczne mieloidalne (mDC) o fenotypie: BDCA1+, BDCA3+, CD11c+, CD13+, CD33+, plazmacytoidalne (pDC) o fenotypie: BDCA2+, BDCA4+, CD4+, CD10+, CD123+, CD11c- oraz grudkowe [13].

Celem pracy był ocena krążących komórek dendrytycznych mieloidalnych (mDC) i plazmacytoidalnych (pDC) u dzieci z cukrzycą typu 1 przed i po roku stosowania analogu witaminy D3 (Alfadiol-Alfakalcidol) w porównaniu do grupy dzieci zdrowych.

Materiał i metody

Grupę badawczą stanowiło 90 dzieci w wieku 2–17 lat (średnia 8 8/12) ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1. Losowo zakwalifikowano je do 2 grup: 43 dzieci otrzymujących analog witaminy D3 oraz 47 nieotrzymujących analogu witaminy D3. Materiał biologiczny pobierano po wyprowadzeniu

z ketozy i uzyskaniu względnego wyrównania glikemii (1–2 tydzień po rozpoznaniu cukrzycy) oraz po roku obserwacji. Grupę kontrolną stanowiło 15 zdrowych rówieśników.

Wszystkie osoby w czasie badań oraz w okresie miesiąca poprzedzającego badania nie wykazywały cech infekcji, nie przyjmowały leków mających wpływ na układ immunologiczny, nie miały też wykonywanej transfuzji krwi. Z badań zostały wykluczone osoby podające w wywiadzie choroby alergiczne.

Protokół badania został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną Uniwersytetu Medycznego w Lublinie. Pacjenci oraz ich rodzice wyrazili zgodę na badania i obserwacje.

U badanych dzieci oznaczano poziom 25(OH)D3 przy pomocy metody elektrochemiluminescencji w analizatorze Elecsys 2010, poziom c-peptydu metodą elektrochemiluminescencji dla pośredniej oceny funkcji jeszcze czynnych komórek beta wysp trzustki oraz miano przeciwciał przeciw dekarboksylazie kwasu glutaminowego (α -GAD) i przeciw fosfatazie tyrozyny (IA2) metodą ELISA firmy Immunotech, świadczących o podłożu autoimmunologicznym cukrzycy.

Wśród parametrów immunologicznych: odsetek niedojrzałych DC mieloidalnych BDCA-1+/CD19- oraz odsetek niedojrzałych DC plazmacytoidalnych BDCA-2+/CD123+ poddanych analizie w cytometrze przepływowym przy pomocy programu CellQuest.

Izolacja komórek mononuklearnych z krwi obwodowej

Krew obwodową rozcieńczono zbuforowanym roztworem soli fizjologicznej – PBS bez soli wapnia i magnezu (Biochrome AG, Niemcy) w proporcji 1:1. Rozcieńczoną krew nawarstwiono na preparat Gradisol L (Aqua Medica, Polska) o ciężarze właściwym 1,077 g/ml. Komórki wirowano w gradiencie gęstości przez 20 min. przy przyspieszeniu 700 xg. Uzyskane komórki płukano dwukrotnie w roztworze PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} . Następnie oceniono ich ilość w komorze Neubauera i żywotność za pomocą błękitu trypanu (0,4% Trypan Blue Solutioin, Sigma, Niemcy). Żywotność poniżej 90% dyskwalifikowała komórki z dalszych badań.

Ocena krążących komórek dendrytycznych

Wyizolowane komórki mononuklearne wypłukano dwukrotnie w buforze PBS bez Ca^{2+} i Mg^{2+} z dodatkiem 0,5% albuminy bydlęcej (BSA) (Sig-

ma-Aldrich, Niemcy) oraz 2mM EDTA (Sigma-Aldrich, Niemcy). Komórki zawieszano w wyżej opisanym buforze w ilości 80 μ l na 10⁷ komórek oraz dodawano 20 μ l FcR Blocking Reagent (Miltenyi Biotec, Niemcy) w celu wykluczenia niespecyficznego wiązania przeciwciał przez fragment Fc. Następnie dodawano 10 μ l przeciwciał na 10⁷ badanych komórek według następujących kombinacji: anti-BDCA-1 (CD1c) FITC (Miltenyi-Biotec, Niemcy)/anti-CD19 CyChrome (BD Pharmingen, USA) (Izotyp IgG₁/IgG₁), anti-BDCA-2 (CD303) FITC (Miltenyi-Biotec, Niemcy)/anti CD123 PE (Becton Dickinson, USA) (Izotyp IgG₁/IgG₁) i inkubowano przez 10 min. w tem. 4°C w ciemności. Po upływie tego czasu dodawano 2 ml buforu i wirowano komórki przez 10 min. przy przyspieszeniu 300 xg w tem. 4°C. Po odwirowaniu i ostrożnym zlaniu supernatantu komórki podawano natychmiastowej analizie w cytometrze przepływowym. Przy pomocy programu CellQuest analizowano odsetek niedojrzałych komórek dendrytycznych mieloidalnych BDCA-1+/CD19- i plazmacytoidalnych BDCA-2+/CD123+ wśród mononuklearnych leukocytów.

Bankowanie komórek

Proces zamrażania przeprowadzony był w łaźni lodowej. Medium do zamrażania składało się z RPMI 1640 (Biochrome AG, Niemcy) z dodatkiem 10% ludzkiej albuminy (Baxter, USA) i 10% DMSO (ICN Polfa Rzeszów, Polska). Do 1 ml medium dodawano po 20 x 10⁶ komórek. PBMC przechowywano w parach ciekłego azotu. Zamrożone komórki przenoszone były do łaźni wodnej o tem. 37°C, gdzie stopniowo dodawana była pożywka RPMI 1640 z dodatkiem 10% ludzkiej albuminy. Następnie komórki odwirowano przy obrotach 700 xg przez 10 min., określono żywotność przy użyciu błękitu trypanu, zawieszono w odpowiednim buforze i przygotowano do oznaczanie odsetka limfocytów Treg. Jednocześnie przeprowadzono standardowe kliniczne monitorowanie przebiegu cukrzycy (badanie lekarskie, ocena glikemii, ketonemii, glikacji białek, dobowego zapotrzebowania na insulinę oraz monitorowanie równowagi wapniowo-fosforanowej).

Analiza statystyczna

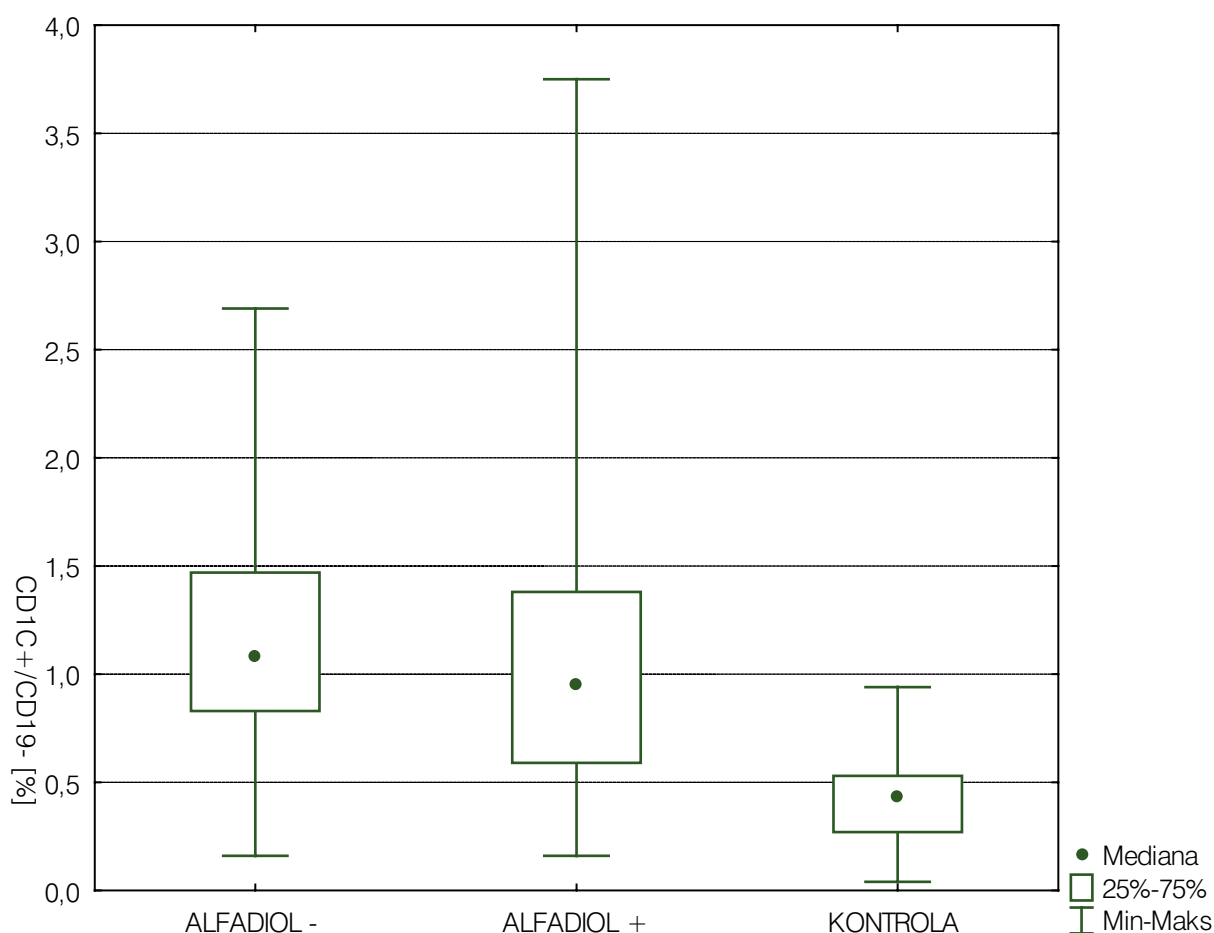
Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy pomocy programu Statistica 7.0 PL. Zgodność rozkładu poszczególnych zmiennych w obrębie grup z rozkładem normalnym sprawdzono przy pomocy testu W Shapiro-Wilka.

Ponieważ badane zmienne nie miały rozkładu normalnego, do analizy użyto testów nieparametrycznych U Manna Whitneya do oceny różnic pomiędzy grupami. Otrzymane wyniki przedstawiono jako: medianę oraz wartość najmniejszą szeregu statystycznego (Min.) oraz wartość największą szeregu statystycznego (Maks.). Wyniki jako istotne statystycznie przyjmowano przy poziomie istotności $p \leq 0.05$.

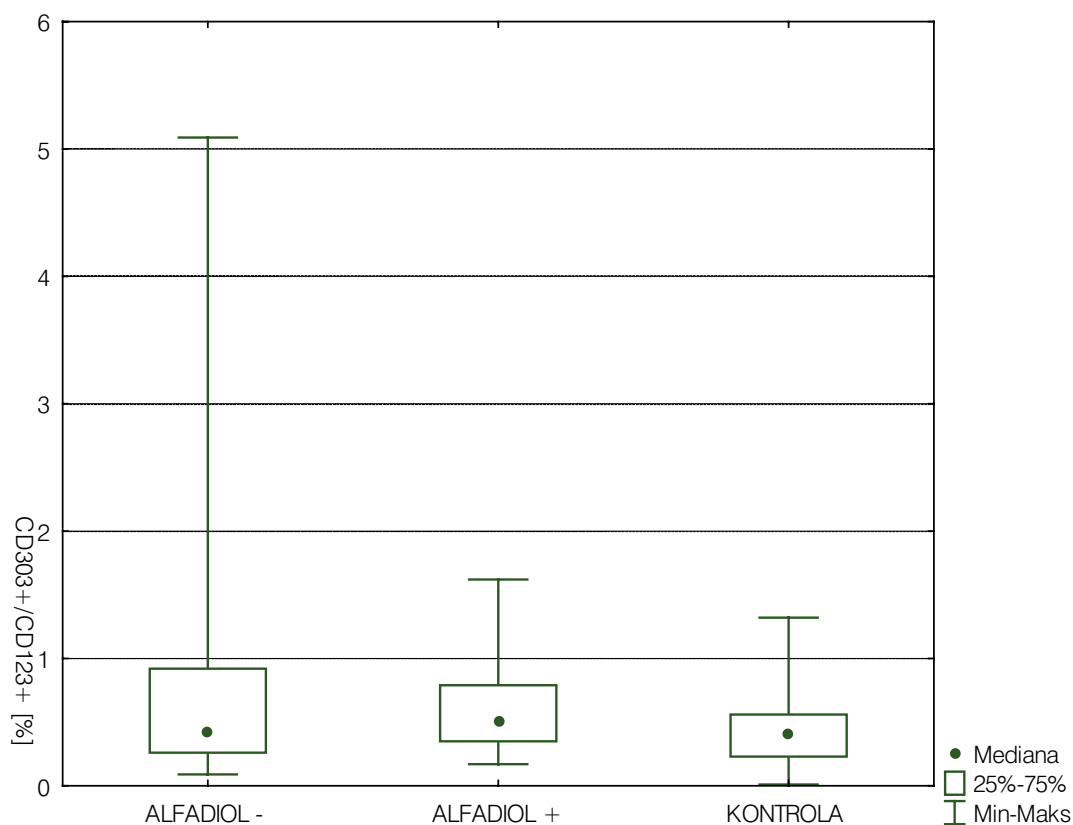
Wyniki

U 72% dzieci, które otrzymywały Alfadiol, oraz u 50% bez Alfadiolu stwierdzono wzrost lub utrzymanie się wartości c-peptydu w ciągu rocznego monitorowania w porównaniu z wartościami wyjściowymi. W naszych badaniach przeanalizowaliśmy odsetek krążących we krwi dendrytycznych mieloidalnych BDCA-1+/CD19- i plazmacytoidalnych BDCA-2+/CD123+ wśród jednojądrzastych u pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1

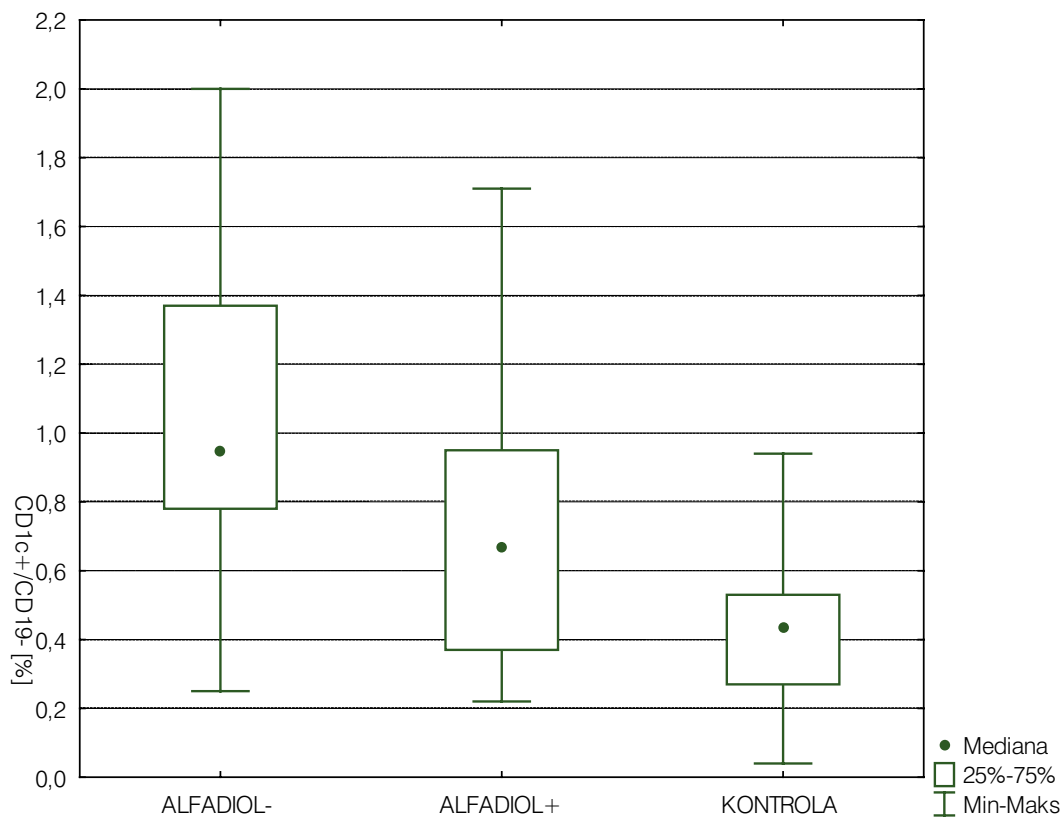
oraz po roku stosowania analogu witaminy D. Odsetek mieloidalnych DC w świeżo rozpoznanej cukrzycy wyniósł 0,99% i był istotnie statystycznie wyższy ($p < 0,05$) w porównaniu do dzieci zdrowych (0,44%) (ryc. 1). Natomiast nie obserwowano różnic w odsetku komórek dendrytycznych plazmacytoidalnych w świeżo rozpoznanej cukrzycy w porównaniu do dzieci zdrowych (ryc. 2). Po roku obserwacji odsetek mieloidalnych DC u dzieci z cukrzycą nieotrzymujących Alfadiolu wyniósł 0,95% i różnił się zarówno w porównaniu do dzieci z cukrzycą otrzymujących Alfadiol (0,67%) ($p < 0,05$), jak i w porównaniu do dzieci zdrowych (0,45%) ($p < 0,05$) (ryc. 3). W grupie dzieci otrzymujących Alfadiol odsetek mieloidalnych DC po roku obserwacji nie różnił się istotnie statystycznie w porównaniu do dzieci zdrowych, natomiast odsetek DC w grupie dzieci nieotrzymujących Alfadiolu pozostał zbliżony do wartości wyjściowych. Nie stwierdzono istotnych różnic po roku obserwacji w odsetku komórek dendrytycznych plazmacytoidalnych.



Ryc. 1. Odsetek mieloidalnych DC w świeżo rozpoznanej cukrzycy w porównaniu do dzieci zdrowych
Fig. 1. Percentage of mDC in new onset type 1 DM in comparison to healthy children



Ryc. 2. Odsetek plazmocytoidalnych DC w świeżo rozpoznanej cukrzycy w porównaniu do dzieci zdrowych
Fig. 2. Percentage of pDC in new onset type 1 DM in comparison to healthy children

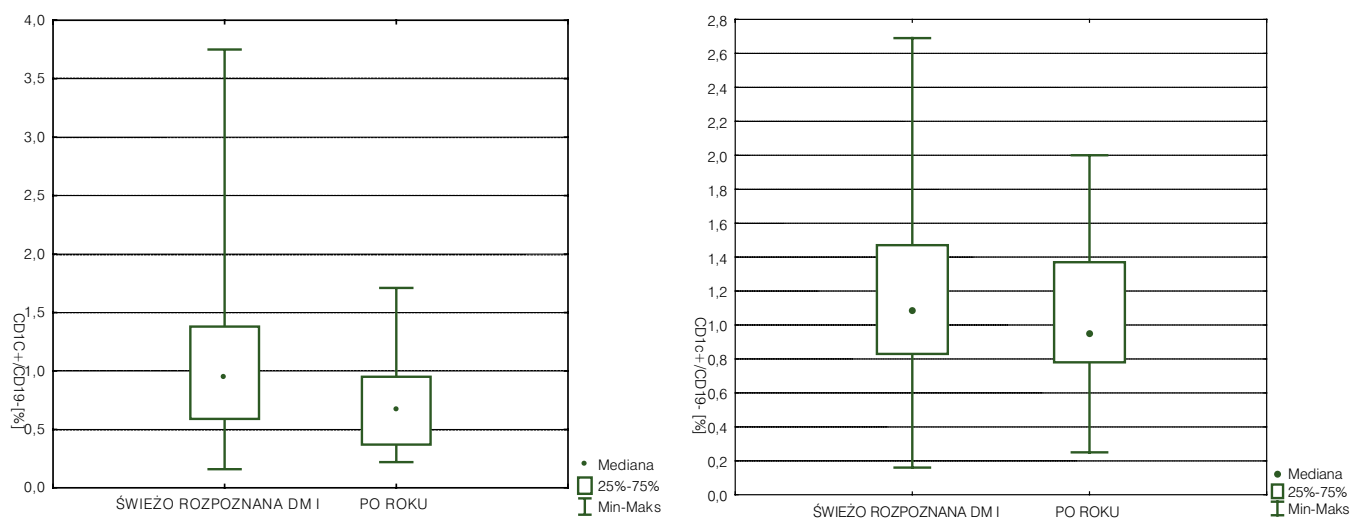


Ryc. 3. Odsetek mieloidalnych DC po roku obserwacji u dzieci z cukrzycą w porównaniu do dzieci zdrowych
Fig. 3. The percentage of mDC after one year observation in children with diabetes compared to healthy children

Omówienie

W cukrzycy typu 1 komórki dendrytyczne odgrywają istotną rolę zarówno w inicjacji, jak i w podtrzymywaniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko komórkom beta wysp trzustki. W ostatnich latach nieustannie poszukuje się czynnika o właściwościach immunomodulujących, który odpowiadałby za indukcję tolerancji immunologicznej przez komórki prezentujące antygen, jak komórki dendrytyczne i w następstwie hamowanie nadmiernej odpowiedzi immunologicznej skierowanej przeciw komórkom beta wysp trzustki, m.in. wskutek stymulacji komórek regulatorowych. Aktywna forma witaminy D (1,25(OH)2D3 jest uznanym czynnikiem o właściwościach hamowania odpowiedzi immunologicznej, m. in. przez wpływ na funkcję i fenotyp DC. W eksperymentalnych modelach zwierzęcych aktywna forma witaminy D lub zastosowane ligandy receptora dla witaminy D wpływały na hamowanie wydzielania IL12 przez komórki dendrytyczne, istotnej we wzbudzaniu odpowiedzi typu Th1, a poprzez zwiększenie produkcji IL10 na hamowanie dojrzewania i różnicowania DC zmniejszenie ekspresji cząsteczek kostymulujących CD80, CD86, CD40, prowadzące do zmniejszenia aktywacji limfocytów T [14–18]. We wcześniejszych badaniach własnych stwierdziliśmy obniżone stężenie witaminy D3 u większości dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 [19]. Podobne wyniki otrzymali autorzy z ośrodka gdańskiego jak i z ośrodków zagranicznych [20,21]. Nie stwierdziliśmy natomiast korelacji poziomów witaminy D3 z odsetkiem badanych populacji komórek dendrytycznych. W gru-

pie dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 odnotowaliśmy istotnie wyższy odsetek krążących mieloidalnych komórek dendrytycznych. Steptoe i wsp. wykazali w modelu mysim wzrost generacji komórek dendrytycznych linii mieloidalnej [22], a Peng i wsp. stwierdzili blokadę dojrzewania komórek dendrytycznych w myszach NOD, co prowadziło do rozwoju zapalenia wysp trzustkowych [23]. Wyniki te pozostają w zgodności z naszymi, gdyż krążące mieloidalne komórki dendrytyczne BDCA-1+ wykazują cechy niedojrzałych komórek dendrytycznych [24]. Ciekawe, chociaż sprzeczne doniesienia opisują rolę plazmacytoidalnych DC w patogenezie cukrzycy typu 1. Chen i wsp. opisali istotnie obniżone odsetki pDC we krwi pacjentów w stosunku do zdrowych dawców [25]. Jednak w grupie Chen zdrowi dawcy byli istotnie starsi od pacjentów, podczas gdy w naszych badaniach nie było istotnych różnic wiekowych między badanymi grupami. Z kolei Allen i wsp. opisali istotnie wyższy odsetek plazmacytoidalnych komórek dendrytycznych we krwi osób z cukrzycą w porównaniu do zgodnej wiekowo grupy kontrolnej [26]. Vuckovic i wsp. oraz Nieminen i wsp. opisali jeszcze inne zależności, w ich badaniach pacjenci mieli istotnie obniżone odsetki obu populacji komórek dendrytycznych w porównaniu ze zgodną wiekowo grupą kontrolną [27,28]. Wyniki autorów fińskich mogą wskazywać ponadto na upośledzenie funkcji obu badanych populacji DC, stwierdzili oni bowiem zmniejszoną ekspresję CCR2- CC chemokine receptor 2, receptora dla monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) – chemokiny odgrywającej istotną rolę w chemotaksji DC do miejsc zapalnych.



Ryc. 4. Dynamika zmian odsetka mieloidalnych DC w trakcie rocznej obserwacji u dzieci z cukrzycą

Fig. 4. The dynamics of changes in the proportion of myeloid DC during the annual observation in children with diabetes

Po roku naszych obserwacji odsetek krążących komórek mieloidalnych istotnie obniżył się jedynie w grupie pacjentów otrzymujących analog witaminy D3 (Alfadiol) i jednocześnie nie różnił się istotnie w stosunku do grupy dzieci zdrowych. Ponadto, jak wykazaliśmy we wcześniejszych badaniach, w grupie otrzymującej Alfadiol dobowe zapotrzebowanie na insulinę było istotnie niższe, a poziom c-peptydu istotnie wyższy niż w grupie nieotrzymującej preparatu witaminy D [29,30]. Powyższe obserwacje mogą wskazywać na udział witaminy D w zmniejszeniu nasilenia odpowiedzi autoimmunologicznej w cukrzycy typu 1 poprzez wpływ na komórki DC. Do potwierdzenia tej tezy niezbędne są dalsze badania eksperymentalne. Wykazano dotychczas, iż komórki dendrytyczne, które początkowo są odpowiedzialne za indukcję zjawisk autoimmunizacyjnych w patogenezie cukrzycy typu 1, mogą być użyteczne w immunomodulacji i indukcji auto-tolerancji [31]. W badaniach na myszach NOD wykazano, że modyfikowane komórki dendrytyczne

mogą zapobiegać wystąpieniu cukrzycy [32], a także skutecznie ją leczyć [33]. W obu przypadkach za korzystny efekt odpowiadała indukcja limfocytów Treg przez komórki dendrytyczne.

Wnioski

1. Wyższy odsetek mieloidalnych DCs w grupie dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą w porównaniu do grupy kontrolnej może wskazywać na udział tych komórek w patogenezie cukrzycy typu 1 (promowanie odpowiedzi Th1).

2. Zmniejszenie się odsetka mDC w trakcie rocznego podawania Alfadiolu wskazuje na rolę witaminy D w mechanizmach „immunosupresyjnych” procesów autoimmunizacyjnych w cukrzycy typu 1.

3. Wykazane różnice dotyczące populacji komórek dendrytycznych wydają się wskazywać na pewne pozytywne elementy stosowanego analogu witaminy D3 u dzieci z cukrzycą typu 1.

REFERENCES/PIŚMIENNICTWO

- [1] Davies J.L., Kawaguchi Y., Bennett S.T. et al.: A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes. *Nature*, 1994: 371, 130-136.
- [2] Egwuagu C.E., Charukamnoetkanok P., Gery I.: Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J. Immunol.*, 159(1997), 3109-3112.
- [3] Morel P.A., Vasquez A.C., Feili-Hariri M.: Immunobiology of DC in NOD mice. *J. Leukoc. Biol.*, 1999:66, 276-280.
- [4] Calderon B., Suri A., Miller M.J., Unanue E.R.: Dendritic cells in islets of Langerhans constitutively present beta cell-derived peptides bound to their class II MHC molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008:105, 6121-6126.
- [5] Brusko T.M., Putnam A.L., Bluestone J.A.: Human regulatory T cells: role in autoimmune disease and therapeutic opportunities. *Immunol Rev.*, 2008:223, 371-390.
- [6] Cantorna M.T., Mahon B.D.: D-hormone and immune system. *J. Rheumatol. Suppl.*, 2005:76, 11-20.
- [7] Harris S.: Can vitamin D supplementation in infancy prevent type 1 diabetes? *Nutrition Rev.*, 2002:60, 118-121.
- [8] Mathieu C., Adorini L.: The coming of age of 1,25-dihydroxyvitamin D3 analogs as immunomodulatory agents. *Trends Mol. Med.*, 2002:8, 174-179.
- [9] Adorini L., Penna G., Giarratana N. et al.: Tolerogenic dendritic cells induced by vitamin D receptor ligands enhance regulatory T cells inhibiting allograft rejection and autoimmune diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2003:88, 227-233.
- [10] Mathieu C., van Etten E., Decallonne B. et al.: Vitamin D and 1,25-dihydroxyvitamin D(3) as modulators in the immune system. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 2004:89-90, 449-452.
- [11] Mathieu C., Gyseman C., Giulietti A., Bonillon R.: Vitamin and diabetes. *Diabetologia*, 2005:48, 1247-1257.
- [12] Angelini F., Del Luca E., Piccinini S. et al.: Altered phenotype and function of dendritic cells in children with type 1 diabetes. *Clin Exp Immunol.*, 2005:42, 341-346.
- [13] Kadowaki N.: The divergence and interplay between pDC and mDC in humans. *Front Biosci.*, 2009:14, 808-917.
- [14] Berer A., Stockl J., Majdic O.: 1,25 – Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro. *Exp. Hematol.*, 2000:28, 575-583.
- [15] Canning M.O., Grotenhuis K., de Wit H. et al.: 1-alpha,25 Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur. J. Endocrinol.*, 2001:145, 351-357.
- [16] Griffin M.D., Lutz W.H., Phan V.A.: Dendritic cell modulation by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and its analogs: potent inhibition of dendritic cells differentiation and maturation by vitamin D analogs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2000:270, 701-708.
- [17] Penna G., Adorini L.: 1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation. *J. Immunol.*, 2000:164, 2405-2411.

- [18] Piemonti L., Monti P., Sironi M. et al.: Vitamin D3 affects differentiation, maturation and function of human monocytes-derived dendritic cells. *J. Immunol.*, 2000;164, 4443-4451.
- [19] Szewczyk L., Piekarski R., Azab Y., Wysocka-Łukasik B.: Poziom witaminy D3 w relacji do stopnia autoimmunizacji i dysfunkcji komórek beta w świeżo rozpoznanej cukrzycy typu 1. *Endokrynol. Pediatr.*, 2008;7, 17-22.
- [20] Myśliwiec M., Brandt A., Bautembach-Minkowska J. et al.: Ocena poziomu witaminy D3 u dzieci zdrowych i z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1. *Endokrynol. Pediatr.*, 2008;7, 23-30.
- [21] Pozzilli P., Manfrini S., Crino A. et al.: Low levels of 25-hydroxyvitamin D3 and 1,25-dihydroxyvitamin D3 in patients with newly diagnosed type 1 diabetes. *Horm. Metab. Res.*, 2005;37, 680-683.
- [22] Steptoe R.J., Ritchie J.M., Harrison L.C.: Increased generation of dendritic cells from myeloid progenitors in autoimmune-prone nonobese diabetic mice. *J. Immunol.*, 2002;168, 5032-5041.
- [23] Peng R., Bathjat K., Li Y. et al.: Defective maturation of myeloid dendritic cell (DC) in NOD mice is controlled by IDD10/17/18. *Ann N Y Acad Sci.*, 2003;1005, 184-186.
- [24] Dzionek A., Fuchs A., Schmidt P. et al.: BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.*, 2000;165, 6037-6046.
- [25] Chen X., Makala L.H., Jin Y. et al.: Type 1 diabetes patients have significantly lower frequency of plasmacytoid dendritic cells in the peripheral blood. *Clin Immunol.*, 2008;129, 413-418.
- [26] Allen J.S., Pang K., Skowera A. et al.: Plasmacytoid dendritic cells are proportionally expanded at diagnosis of type 1 diabetes and enhance islet autoantigen presentation to T-cells through immune complex capture. *Diabetes*, 2009;58, 138-145.
- [27] Vuckovic S., Withers G., Harris M. et al.: Decreased blood dendritic cell counts in type 1 diabetic children. *Clin Immunol.*, 2007;123, 281-288.
- [28] Nieminen J.K., Vakkila J., Salo H.M. et al.: Altered phenotype of peripheral blood dendritic cells in pediatric type 1 diabetes. *Diabetes Care*. 2012;11, 2303-2310.
- [29] Szewczyk L., Piekarski R.: Stopień autoimmunizacji i dysfunkcji komórek beta u dzieci z cukrzycą typu 1 po roku stosowania analogu vit. D. *Endokrynol. Pediatr.*, 2010;9, 19-24.
- [30] Szewczyk L., Bury A., Piekarski R.: Stosowanie profilaktycznej dawki Alfakalcidolu niezależnie od wieku dziecka podtrzymuje remisję u dzieci ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1. Dwuletnia obserwacja. *Endokrynol. Ped.*, 2012;2, 17-22.
- [31] Pasquali L., Giannoukakis N., Trucco M.: Induction of immune tolerance to facilitate beta cell regeneration in type 1 diabetes. *Adv Drug Deliv Rev.*, 2008;60, 106-113.
- [32] Cheatem D., Ganesh B.B., Gangi E. et al.: Modulation of dendritic cells using granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) delays type 1 diabetes by enhancing CD4+CD25+ regulatory T cell function. *Clin Immunol.*, 2009;131:260-270.
- [33] Tarbell K.V., Petit L., Zuo X. et al.: Dendritic cell-expanded, islet-specific CD4+ CD25+ CD62L+ regulatory T cells restore normoglycemia in diabetic NOD mice. *J. Exp Med.*, 2007;204, 191-201.