

Dynamika zachowania się limfocytów Th17 a markery kliniczne cukrzycy typu 1

The dynamics of Th17 cells and clinical markers of type 1 diabetes

¹Robert Piekarski, ¹Leszek Szewczyk, ¹Barbara Wilczyńska, ²Jacek Tabarkiewicz

¹Klinika Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej, Uniwersytet Medyczny w Lublinie, ²Przyrodniczo-Medyczne Centrum Badań Innowacyjnych, Wydział Medyczny Uniwersytetu Rzeszowskiego

¹Department of Paediatric Endocrinology and Diabetology, Medical University of Lublin, Poland, ²Centre for Innovative Research in Medical and Natural Sciences, Medical Faculty of University of Rzeszow

Słowa kluczowe

cukrzyca typu 1, Th17, C-peptyd

Key words

type 1 diabetes mellitus, Th17, C-peptide

Streszczenie

W proces niszczenia komórek beta wysp trzustki zaangażowanych jest wiele różnych populacji komórkowych, takich jak komórki dendrytyczne, makrofagi, limfocyty T i B czy komórki NK, a ostatnio opisano nową populację limfocytów pomocniczych tzw. TH17, nazwanych od wydzielanej przez nie swoistej IL-17A o działaniu prozapalnym. **Celem pracy** było prześledzenie odsetka krążących komórek CD4+IL17A+ i CD4+/CD3+/IL17A+ w relacji do stopnia autoimmunizacji oraz stopnia dysfunkcji sekrecyjnej komórek beta trzustki. **Materiał i metody.** Badaniami objęto 53 dzieci, średnia wieku $10,2 \pm 3,2$ lat, z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1, u których oceniono odsetek limfocytów Th17, poziom C-peptydu oraz miana przeciwciał a-GAD i a-IA2. Grupę porównawczą stanowiło 20 zdrowych dzieci. **Wyniki.** We krwi dzieci chorych na cukrzycę typu 1 stwierdziliśmy, że średni odsetek komórek CD4 +IL17A + i CD4+/CD3+/IL17A+ był wyższy, lecz nieistotnie statystycznie ($p > 0,05$) w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. Ponadto odsetek limfocytów Th17 w relacji do poziomu C-peptydu wykazywał ujemną zależność, lecz nieistotną statystycznie ($p=0,11$). **Wnioski.** Prezentowane wyniki badań wymagają bardziej szczegółowej analizy obserwowanych zależności w celu oceny potencjalnego znaczenia tych komórek w rozwoju cukrzycy typu 1.

Abstract

In the process of destruction of pancreatic islet beta cells are involved many different cell populations such as dendritic cells, macrophages, T and B lymphocytes and NK cells and recently described, the new population of T helper cells – Th17 cells, characterized by specific IL-17A secretion with proinflammatory action. **The aim of the study** was to investigate the expression of circulating CD4+17A+ and CD4+/CD3+/17A+ cells in relation to the degree of autoimmunity and the degree of secretory dysfunction of pancreatic beta cells. **Material and Methods.** The study comprised 53 children, mean age 10.2 ± 3.2 years with newly diagnosed type 1 diabetes, in whom the percentage of Th17 cells, the level of C-peptide and anti-GAD and anti-IA2 antibodies have been assessed. The control group consisted of 20 healthy children. **Results.** In the blood of children with type 1 diabetes, we found that the average percentage of CD4+17A+ and CD4+/CD3+/17A+ was higher but not statistically significantly ($p > 0.05$) compared to the group of healthy children. The proportion of Th17 cells in relation to the level of C-peptide showed a negative correlation, either not statistically significant ($p = 0.11$). **Conclusions.** The results presented in this study require a more detailed analysis of the observed dependence to assess the potential importance of these cells in the development of type 1 diabetes.

Endokrynol. Ped. 2015.14.1.50.37-42.
© Copyright by PTEIDD 2015

Pediatri. Endocrinol. 2015.14.1.50.37-42.
© Copyright by PTEIDD 2015

Wstęp

W diabetologii przyjmuje się, że w zdecydowanej większości przypadków cukrzyca typu 1 jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym. Wiele badań dotyczyło roli układu immunologicznego w procesie destrukcji komórek beta wysp trzustki. Dużo miejsca poświęcono zachowaniu się różnych subpopulacji komórek immunokompetentnych, lecz wyniki badań nie są jednoznaczne. W proces niszczenia komórek beta wysp trzustki zaangażowanych jest wiele różnych populacji komórkowych, takich jak komórki dendrytyczne, makrofagi, limfocyty T i B czy komórki NK, a ostatnio opisano nową populację limfocytów pomocniczych tzw. TH17 [1–3]. Doniesienia ostatnich lat [4,5] wskazują na istotną rolę w rozwoju reakcji zapalnej w przebiegu różnych chorób o podłożu autoimmunologicznym – w tym w cukrzycy – tej populacji limfocytów posiadających selektywną zdolność produkcji interleukiny 17, stąd ich nazwa Th17. IL-17, a właściwie IL-17A, obok stosunkowo niedawno odkrytych IL-17E, swoistych dla komórek Th17, należą do rodziny liczącej 6 cytokin wydzielanych przez różne rodzaje komórek (IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E in. IL-25, IL-17F) [6]. Obie izoformy IL-17 odpowiadają za działanie prozapalne komórek TH17. IL-17A/IL-17F przypisuje się głównie rolę w obronie przeciwbakteryjnej i przeciwgrzybiczej, poprzez indukcję innych cytokin i chemokin wpływających na aktywację i migrację neutrofilów, ale również wskazuje się na udział tych cytokin w patogenezie chorób o podłożu zapalnym, alergicznym (astma oskrzelowa), autoimmunologicznym (nie-swoiste zapalenia jelit, toczeń rumieniowy układowy, RZS, stwardnienie rozsiane, łuszczyca) czy wreszcie w odpowiedzi przeciwnowotworowej ze względu na m.in. właściwości proangiogenne [7–10]. Komórki Th17 są źródłem poza IL17 również innych cytokin głównie o charakterze zapalnym, jak: IL-6, IL-21, IL-22, IL-26, TNF α [9].

W ostatnich latach ukazały się pojedyncze prace oceniające rolę Th17 w cukrzycy typu 1, wśród których większość opiera się na modelach zwierzęcych cukrzycy, głównie myszy NOD (*the nonobese diabetic mouse*), a tylko nieliczne opierają się na materiale ludzkim.

Cel pracy

Celem pracy było prześledzenie odsetka krążących komórek CD4 +IL17A + i CD4+/CD3+/

IL17A+ w relacji do stopnia autoimmunizacji oraz stopnia dysfunkcji sekrecyjnej komórek beta trzustki.

Materiał i metody

Do badań włączono grupę 53 dzieci (29 dziewcząt i 24 chłopców) w wieku średnio 10,2 lat \pm 3,2 ze świeżo rozpoznaną cukrzycą typu 1, leczonych w Klinice Endokrynologii i Diabetologii Dziecięcej UM w Lublinie. Między 10 a 14 dniem od rozpoznania cukrzycy po wcześniejszym wyprowadzeniu z ketozy i uzyskaniu względnego wyrównania glikemii oznaczono u wszystkich pacjentów poziom C-peptydu metodą elektrochemiluminescencji, miano przeciwciał przeciwko dekarboksylazie kwasu glutaminowego (a-GAD) oraz przeciwko fosfatazie tyrozyny (a-IA2) metodą ELISA firmy Immunotech. Wyniki badań laboratoryjnych przedstawiono w tabeli I.

Tabela 1. Parametry charakteryzujące grupę dzieci z cukrzycą typu 1

Table 1. The parameters characterized in children with type 1 DM

Badany parametr	Średnia	SD
C-peptyd 0 min. (ng/ml)	0,5	0,39
a-GAD (ng/ml)	16,9	21,4
a-IA2 (ng/ml)	15,57	17,22
zapotrzebowanie dobowe na insulinę (jedn./kg)	0,36	0,32
HbA1c (%)	10,7	2,19

Grupę kontrolną stanowiło 20 zdrowych dzieci w wieku średnio 11,2 \pm 2,8. Od wszystkich badanych dzieci zabezpieczono próbki krwi do dalszej oceny immunologicznej.

Protokół badania został zaakceptowany przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie. Po uzyskaniu świadomej zgody od opiekunów oraz pacjentów po ukończeniu 16 roku życia w czasie standardowych badań diagnostycznych pobierano 5 ml krwi obwodowej do heparanizowanych probówek (Sarstedt, Niemcy). 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 lub autoimmunologiczne.

Równocześnie przeprowadzono standardowe kliniczne monitorowanie przebiegu cukrzycy (badanie lekarskie, ocena glikemii, ketonemii, glikacji białek, dobowego zapotrzebowania na insulinę).

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 minut przy przyspieszeniu 700 xg. Uzyskane komórki płukano dwukrotnie w roztworze PBS bez Ca²⁺ i Mg²⁺. Następnie oceniono ich ilość w komorze Neubauera i żywotność za pomocą błękitu trypanu (0,4% Trypan Blue Solution, Sigma, Niemcy). Żywotność poniżej 90% dyskwalifikowała komórki z dalszych badań.

Oznaczenie limfocytów Th17 za pomocą cytometrii przepływowej

Limfocyty Th17 oznaczono przy pomocy zestawu Human Th17 Cytokine Flow Phenotyping Panel (eBiosciences). Limfocyty początkowo były poddawane stymulacji PMA przy jednoczesnej blokadzie wydzielania cytokin brefeldyną A. Do oznaczenia zostały użyte następujące przeciwciała: anti-CD4 eFluor® 450, anti-IL-17A FITC, anti-IL-17F PE. Do oceny cytometrycznej wykorzystano trójlaserowy cytometr BDFACS Canto II.

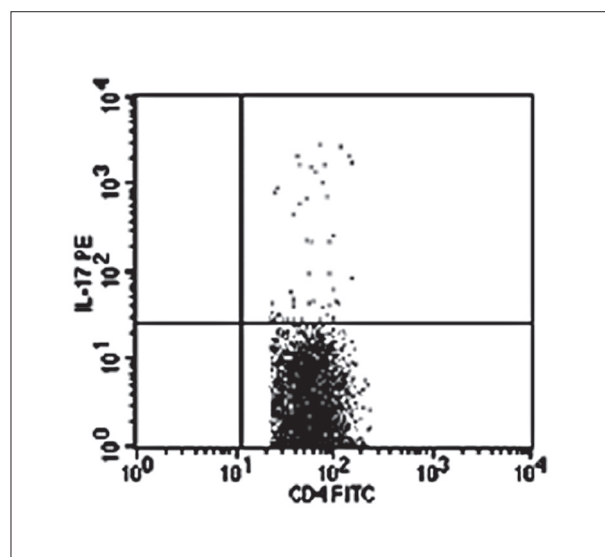
Analiza statystyczna

Analizę statystyczną otrzymanych wyników przeprowadzono przy pomocy programu STATISTICA 10.0 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 te-

stów nieparametrycznych U Manna-Whitneya do oceny różnic pomiędzy grupami i współczynnika korelacji rang Spearmana do oceny zależności pomiędzy zmiennymi. 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 $p < 0,05$.

Wyniki

W naszych badaniach przeanalizowaliśmy odsetek krążących we krwi komórek CD4 + IL17A+ i CD4+/CD3+ / IL17A+ wśród jednojądrzastych (ryc. 1). We krwi dzieci chorych na cukrzycę typu 1 stwierdziliśmy, że średni odsetek komórek CD4 + IL17A + wynosił $0,41 \pm 0,31\%$ i był wyższy, lecz



Ryc. 1. Przykładowa ocena cytometryczna odsetka komórek CD4+17A+ we krwi obwodowej dziecka z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 – 1,03%

Fig. 1. An example of cytometric analysis of the percentage of CD4+17A+ cells in the peripheral blood of a child with newly diagnosed type 1 diabetes – 1.03%

Tabela II. Statystyki opisowe badanych parametrów immunologicznych
Table II. Statistics of investigated immunological parameters

	Mediana		Min. – Maks.		p
	cukrzyca	grupa kontrolna	cukrzyca	grupa kontrolna	
Odsetek CD4 +IL17A+	0,41%	0,32%	0,01-1,81%	0,08-0,63%	NS
Odsetek CD4+/CD3+ / IL17A+	0,6%	0,52%	0,02-2,16%	0,09-1,14%	NS

nieistotnie statystycznie ($p > 0,05$), niż w grupie dzieci zdrowych ($0,32 \pm 0,15\%$). Podobnie średni odsetek komórek CD4+/CD3+/IL17A+, który wynosił $0,60 \pm 0,39\%$, był wyższy (nieistotnie statystycznie) ($p > 0,05$) niż w grupie dzieci zdrowych ($0,52 \pm 0,32\%$) (tabela II).

Miana przeciwciał a-GAD u dzieci z cukrzycą były podwyższone – wynosiły od 0,6 do 91 ng/ml (śr. $16,9 \pm 21,4$ ng/ml). U 39,6% pacjentów miana przeciwciał mieściły się w zakresie do 10 ng/ml, u kolejnych 56,6% w zakresie 10–50 ng/ml, zaś u pozostałych 3,8% powyżej 50 ng/ml.

Przeciwciała przeciw fosfatazie tyrozyny były niskie u 13,2% dzieci z cukrzycą typu 1 ($< 0,5$ ng/ml), zaś u 86,8% były podwyższone powyżej normy (śr. miano przeciwciał a-IA2 $15,57 \pm 17,22$ ng/ml, zakres 0,6–70 ng/ml), w tym u 43,3% mieściły się w zakresie < 10 ng/ml, u kolejnych 52,9% w zakresie 10–50 ng/ml, zaś u pozostałych powyżej 50 ng/ml.

Z kolei stężenie C-peptydu było obniżone poniżej 0,9 ng/ml u 96% badanych, śr. $0,50 \pm 0,39$ ng/ml, a u pozostałych dwojga dzieci było na poziomie dolnej normy. Poziom C-peptydu poniżej 0,5 ng/ml dotyczył 58% dzieci, poziom od 0,5 do 0,9 ng/ml 38% dzieci i poziom od 0,9 do 1,07 ng/ml tylko dwojga dzieci.

Zapotrzebowanie dobowe na insulinę pod koniec hospitalizacji wynosiło śr. $0,36 \pm 0,32$ jedn./kg (od 0,11 jedn./kg do 1,09 jedn./kg). U 51% dzieci zapotrzebowanie wynosiło poniżej 0,3 jedn./kg, u 28% mieściło się między 0,3 a 0,5 jedn./kg, zaś u 21% przekraczało 0,5 jedn./kg masy ciała.

Analizie zostały poddane także zależności pomiędzy parametrami immunologicznymi a laboratoryjnymi. Zachowanie się limfocytów Th17 w relacji do poziomu C-peptydu wykazało zależność ujemną, lecz nieistotną statystycznie ($p=0,11$), natomiast nie stwierdzono zależności pomiędzy odsetkiem limfocytów Th17 a poziomami przeciwciał a-GAD i przeciw fosfatazie tyrozynowej oraz pozostałymi badanymi parametrami klinicznymi (HbA1c, fruktozamina, dobowy dawka insuliny).

Interpretacja wyników i dyskusja

W rozwoju procesu autoimmunologicznego prowadzącego do zniszczenia komórek beta wysp trzustki zaangażowanych jest wiele różnych populacji komórkowych, takich jak komórki dendrytyczne, makrofagi, limfocyty T i B oraz komórki NK. W ostatnich latach badana jest rola limfocytów Th17 w cu-

krzycy typu 1. Większość badań opiera się na modelach zwierzęcych cukrzycy, głównie myszy NOD. Martin-Orozco i wsp. wykazali podwyższone stężenie IL-17 miejscowo w ognisku zapalnym w obrębie wysp trzustki u myszy NOD i podwyższone stężenie tej cytokiny w krążeniu obwodowym [11]. Natomiast wykorzystanie swoistej terapii antygenowej z zastosowaniem GAD2 spowodowało ustąpienie cukrzycy i wiązało się ze zmniejszeniem populacji TH17 [12]. Wyniki badań Emamaullee i wsp. [13] świadczą o tym, że blokada IL-17 przez przeciwciała anti-IL17 lub anti-IL-25 chroni przed zachorowaniem na cukrzycę myszy jedynie te po 10 tygodniu życia przy interwencji, wpływając na zmniejszenie okołowykowego nacieku komórkowego CD4+, CD8+.

Nieliczne prace przeprowadzone na materiale ludzkim wskazują na związek zwiększonej odpowiedzi Th17 z zachorowaniem na cukrzycę typu 1 [14–17]. W tych pracach badawczych wykorzystywano dwa źródła komórek Th17: dziewicze Th stymulowane TGF β i IL-21 oraz komórki pamięci stymulowane IL-1 β i IL-6. Pośrednim dowodem na rolę Th17 w cukrzycy typu 1 u ludzi jest wykazanie sekrecji IL-17 przez allogeniczne LT pamięci pod wpływem stymulacji tych komórek monocytami syntetyzującymi IL-1 i IL-6 pochodzącymi od osób chorych na cukrzycę [15]. Podobnie jak na modelach zwierzęcych, jedynie w grupie pacjentów z cukrzycą trwającą ponad 12 miesięcy stwierdzono wzrost sekrecji IL-17 pod wpływem stymulacji w przeciwieństwie do cukrzycy o krótkim przebiegu < 12 miesięcy oraz osób zdrowych. W innej pracy autorzy stwierdzili zwiększoną aktywność subpopulacji komórek Th17 oraz dysfunkcję Tregs w lokalnych węzłach chłonnych trzustki u badanych pacjentów z typem 1 cukrzycy, czego nie potwierdzono we krwi obwodowej tych pacjentów [16].

W badaniu przeprowadzonym u dzieci z cukrzycą typu 1 wykazano natomiast subpopulację limfocytów o pośrednim fenotypie Foxp3+RORC2+, która cechowała się zwiększoną sekrecją IL-17, zwiększoną ekspresją IL-17, IL-22, czynnika transkrypcyjnego RORC2 (*retinoid acid related orphan receptor isoform 2*) oraz równocześnie ekspresją FoxP3+, czynnika transkrypcyjnego typowego dla Treg [17]. Reinert-Hartwall i wsp. opisali zaś inną subpopulację o pośrednim fenotypie Th1/Th17, która wydaje się odzwierciedlać stopień uszkodzenia komórek beta trzustki [18]. Opisywane populacje o pośrednim fenotypie wskazują na swego rodzaju „plastyczność” komórek Th17, możliwość przekształcania zróżnicowanych komórek Th17 w komórki regulatorowe lub efektorowe, a tym sa-

mym na możliwość modulacji odpowiedzi immunologicznej w zależności od charakteru mikrośrodowiska.

W naszych badaniach przeprowadzonych u dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 odsetek krążących we krwi obwodowej komórek CD4 +IL17A + i CD4+/CD3+/ IL17A+ był nieistotnie statystycznie wyższy w porównaniu do grupy dzieci zdrowych. W badaniach innych autorów uzyskano odmienne wyniki. W kilku pracach otrzymano statystycznie wyższy odsetek badanych limfocytów u pacjentów z cukrzycą typu 1, a w jednej – przeciwnie wyniki. W pracy Marwahi i wsp. [19] średni odsetek komórek CD4 +IL17 + wynosił 0,47% i był wyższy w porównaniu do grupy kontrolnej (odpowiednio 0,18%). Ferrero i wsp. [15] odnotowali również podobne zależności, ale w grupie osób dorosłych z wieloletnią cukrzycą typu 1. Natomiast w pracy powstałej w ośrodku białostockim [20] odnotowano niższy odsetek komórek CD4 +CD161+ u dzieci z nowo rozpoznaną cukrzycą w porównaniu do dzieci zdrowych (odpowiednio 1,8% i 3,9%). Być może rozbieżności wynikają z różnic metodologicznych, jak zastosowanie różnych metod stymulacji badanych komórek oraz odmiennych populacji.

Analiza zachowania się limfocytów Th17 w relacji do poziomu C-peptydu wykazała ujemną zależność, lecz nieistotną statystycznie, natomiast nie stwierdzono zależności pomiędzy odsetkiem

limfocytów Th17 a poziomami przeciwciał a-GAD i przeciw fosfatazie tyrozynowej oraz pozostałymi badanymi parametrami klinicznymi, tj. oceną glikemii, HbA1c, dobowym zapotrzebowaniem na insulinę.

Podsumowując, wyniki naszych badań nie wykazały znaczących różnic w odsetku komórek Th17 u dzieci z nowo ujawnioną klinicznie cukrzycą typu 1 w porównaniu z grupą dzieci zdrowych w przeciwieństwie do cytowanych powyżej prac, zarówno przeprowadzonych na modelach zwierzęcych cukrzycy na tle autoimmunologicznym, jak również pierwszych prac klinicznych opartych na materiale ludzkim. Być może, jak wynika to z wcześniejszych prac eksperymentalnych, wpływ populacji Th17 na progresję cukrzycy ujawnia się jedynie w okresie insulitis. Dlatego interesujące dla dalszego wyjaśnienia znaczenia limfocytów Th17 w cukrzycy typu 1 wydawać się mogą badania, które ocenią rolę komórek TH17 już od okresu prediabetes (etap klinicznie bezobjawowy) poprzez okres początkowy choroby (pierwsze tygodnie po ujawnieniu klinicznym cukrzycy po wystąpieniu charakterystycznych objawów) aż po okres późniejszy (po zakończeniu remisji), a tym samym ocenią ich znaczenie w procesie inicjowania i modulowania insulitis i w konsekwencji ujawnienia się cukrzycy oraz wpływu na przebieg choroby.

Piśmiennictwo / References

1. Morel P.A., Vasquez A.C., Feili-Hariri M.: Immunobiology of DC in NOD mice. *J. Leukoc. Biol.*, 1999:66, 276-280.
2. 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. USA*, 2008:105, 6121-6126.
3. 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.
4. Bettelli E, Korn T, Kuchroo V.K.: Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol.*, 2007 Dec:19(6), 652-657.
5. Kurts C.: Th17 cells: a third subset of CD4+ T effector cells involved in organ-specific autoimmunity. *Nephrol Dial Transplant*, 2008 Mar:23(3), 816-819.
6. Piekarski R., Szewczyk L.: Rola limfocytów Th17 w cukrzycy typu 1. *Endokrynol. Ped.*, 2011:4, 61-68.
7. Romagnani S.: Human Th17 cells. *Arthritis Res. Ther.*, 2008:10, 206-213.
8. Liang S.C., Tan X.Y., Luxenberg D.P., Karim R., Dunussi-Joannopoulos K., Collins M., Fouser L.A.: Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J. Exp. Med.*, 2006:203, 2271-2279.
9. Arican O., Aral M., Sasmaz S., Ciragil P.: Serum levels of TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, and IL-18 in patients with active psoriasis and correlation with disease severity. *Mediators Inflamm.*, 2005:5, 273-279.
10. Bullens D.M., Truyen E., Coteur L., Dillissen E. et al.: IL-17 mRNA in sputum of asthmatic patients: linking T cell driven inflammation and granulocytic influx? *Respir. Res.*, 2006:7, 135.
11. Martin-Orozco N., Chung Y., Hee Chang S., Hong Wang Y., Dong Ch.: Th17 cells promote pancreatic inflammation but only induce diabetes efficiently in lymphopenic hosts after conversion into Th1 cells. *Eur. J. Immunol.*, 2009:39, 216-224.
12. Jain R., Tartar D.M., Gregg R.K., Divekar R.D. et al.: Innocuous IFN gamma induced by adjuvant-free antigen restorers normoglycemia in NOD mice through inhibition of IL-17 production. *J. Exp. Med.*, 2008:205, 207-218.
13. Emamaullee J.A., Davis J., Merani S., Toso Ch. et al.: Inhibition of Th17 Cells Regulates Autoimmune Diabetes in NOD mice. *Diabetes*, 2009:58, 1302-1311.
14. Lee Y.K., Mukasa R., Hatton R.D. and Weaver C.T.: Developmental plasticity of Th17 and Treg cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2009:21, 274-280.
15. Bradshaw E.M., Raddassi K., Elyaman W., Orban T. et al.: Monocytes from patients with type 1 diabetes spontaneously secrete proinflammatory cytokines inducing Th17 cells. *J. Immunol.*, 2009:183, 4432-4439.
16. Ferraro A., Soccì C., Stabilini A. et al.: Expansion of th17 cells and functional

- defects in T regulatory cells are key features of the pancreatic lymph nodes in patients with type 1 diabetes. *Diabetes*, 2011;11, 2903-2913.
17. Honkanen J., Nieminen J. K., Gao R., Luopajarvi K. et al.: IL-17 Immunity in Human Type 1 Diabetes. *J. Immunol.*, 2010;185, 1959-1967.
18. Reinert-Hartwall L., Honkanen J., Salo H.M. et al.: Th1/Th17 Plasticity Is a Marker of Advanced beta Cell Autoimmunity and Impaired Glucose Tolerance in Humans. 2015;194, 68-75.
19. Marwaha A.K., Crome S.Q., Panagiotopoulos C., Berg K.B. et al.: Cutting edge: increased IL-17-secreting T cells in children with new-onset type 1 diabetes. *J. Immunol.*, 2010;185, 3814-3818.
20. Łuczyński W., Szypowska A., Bosowski A., Stasiak-Barmuta A.: Ocena komórek CD4+CD161+ we krwi obwodowej dzieci z cukrzycą typu 1 oraz dzieci z otyłością centralną. *Endokrynol. Ped.*, 2011;4, 37-34.