



Gdański Uniwersytet Medyczny

Ulana Juhas

Charakterystyka komórek pochodzenia monocytarnego
u dzieci i młodzieży z cukrzycą typu 1

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych

Gdańsk 2019

Pracę zrealizowano w Pracowni Immunologii Doświadczalnej

Katedry i Zakładu Immunologii Medycznej

Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

Promotor:

Prof. dr hab. med. Jolanta Myśliwska

Składam serdeczne podziękowania

Promotorowi, Pani Profesor Jolancie Myśliwskiej
za opiekę merytoryczną, cenne uwagi i sugestie
udzielone podczas powstawania niniejszej pracy.

Pracownikom Zakładu Immunologii
za życzliwość, okazaną pomoc, cenne rady
oraz liczne, inspirujące dyskusje naukowe
prowadzone w pokoju nr 15.

Dziękuję moim Rodzicom i Jankowi
za cierpliwość, ogromne wsparcie, wiarę w moje możliwości
i za to, że zawsze mogłam na nich polegać.

Niniejszą pracę dedykuję mojemu Dziadkowi, Piotrowi Juhasowi

SPIS TREŚCI

WYKAZ ARTYKUŁÓW WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ	5
TABELA SKRÓTÓW	6
STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM	7
Wprowadzenie	7
Cele pracy	9
Grupy badane	9
Materiały i metody	10
Wyniki	11
Zwiększone odsetki monocytów CD14 ^{bright} CD16 ⁺ oraz CD14 ^{dim} CD16 ⁺ we krwi obwodowej mogą przyczyniać się do rozwoju retinopatii u młodych pacjentów z cukrzycą typu 1.	11
Monocyty młodych pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 mają skłonność do różnicowania się w makrofagi regulatorowe M2 produkujące IL-10.	12
Wraz z progresją cukrzycy typu 1 dochodzi do obniżenia ekspresji rozpuszczalnej formy cząsteczki CD83, co może wiązać się ze zmniejszeniem aktywności immunosupresyjnej w późnej fazie choroby.	13
Wnioski i implikacje kliniczne	14
SUMMARY IN ENGLISH	15
Introduction	15
Purposes	17
Examined groups	17
Materials and methods	17
Results	18
Elevated levels of peripheral blood CD14 ^(bright) CD16 ⁺ and CD14 ^(dim) CD16 ⁺ monocytes may contribute to the development of retinopathy in patients with juvenile onset type 1 diabetes.	18
Monocytes of newly diagnosed juvenile DM1 patients are prone to differentiate into regulatory IL-10 ⁺ M2 macrophages.	19
Putative loss of CD83 immunosuppressive activity in long-standing complication-free juvenile diabetic patients during disease progression.	20
Conclusions and clinical implications	21
BIBLIOGRAFIA	22

WYKAZ ARTYKUŁÓW WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- Ryba-Stanisławowska M, Myśliwska J, Juhas U, Myśliwiec M. Elevated levels of peripheral blood CD14^(bright)CD16⁺ and CD14^(dim)CD16⁺ monocytes may contribute to the development of retinopathy in patients with juvenile onset type 1 diabetes. APMIS. 2015;123:793-9
<https://doi.org/10.1111/apm.12419>

IF: 1.933; MNiSW: 20.000

- Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Brandt-Varma A, Myśliwiec M, Myśliwska J. Monocytes of newly diagnosed juvenile DM1 patients are prone to differentiate into regulatory IL-10⁺ M2 macrophages. Immunol Res. 2019;67:58-69
<https://doi.org/10.1007/s12026-019-09072-0>

IF: 2.487; MNiSW: 25.000

- Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Ławrynowicz U, Myśliwiec M, Myśliwska J. Putative loss of CD83 immunosuppressive activity in long-standing complication-free juvenile diabetic patients during disease progression. Immunol Res. 2019;67:70-76
<https://doi.org/10.1007/s12026-019-09074-y>

IF: 2.487; MNiSW: 25.000

Sumaryczny wskaźnik Impact Factor: **6.907**

Sumaryczna punktacja MNiSW: **70.000**

TABELA SKRÓTÓW

AGEs	ang. advanced glycation end products (zaawansowane końcowe produkty glikacji)
CD	ang. cluster of differentiation (antygen różnicowania komórkowego)
CRP	ang. C-reactive protein (białko C-reaktywne)
DC	ang. dendritic cells (komórki dendrytyczne)
DM1	ang. type 1 diabetes mellitus (cukrzyca typu 1)
ELISA	ang. enzyme-linked immunosorbent assay (test immunoenzymatyczny)
HbA1c	ang. glycated haemoglobin A1c (glikowana hemoglobina A1c)
IL-10	ang. interleukin 10 (interleukina 10)
IL-4	ang. interleukin 4 (interleukina 4)
IRF4	ang. interferon regulatory factor 4 (czynnik regulujący interferon 4)
IRF5	ang. interferon regulatory factor 4 (czynnik regulujący interferon 5)
LPS	ang. bacterial lipopolysaccharide (lipopolisacharyd bakteryjny)
LS-DM1	ang. long-standing type 1 diabetes mellitus (długotrwała cukrzyca typu 1)
mCD83	ang. membrane CD83 (powierzchniowa forma cząsteczki CD83)
MFI	ang. mean fluorescence intensity (średnia intensywność fluorescencji)
MoDCs	ang. monocyte derived dendritic cells (komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego)
ND-DM1	ang. newly diagnosed type 1 diabetes mellitus (nowo rozpoznana cukrzyca typu 1)
PBMCs	ang. peripheral blood mononuclear cells (jednojądrzaste komórki krwi obwodowej)
PBS	ang. phosphate buffered saline (zbuforowany roztwór soli)
RD	ang. retinopathy development value (wskaźnik rozwoju retinopatii cukrzycowej)
sCD83	ang. soluble CD83 molecule (rozpuszczalna cząsteczka CD83)
TNFα	ang. tumor necrosis factor α (czynnik martwicy nowotworów α)

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Wprowadzenie

Cukrzyca typu 1 (DM1, ang. *type 1 diabetes mellitus*) jest narządowo specyficzną, wieloczynnikową chorobą zapalną o podłożu autoimmunizacyjnym. Dotyczy przede wszystkim dzieci oraz młodych dorosłych poniżej 30. roku życia [1] i stanowi 7-12% wszystkich przypadków cukrzycy [2]. Ponadto wyniki badań epidemiologicznych jednoznacznie wskazują na utrzymującą się na przestrzeni ostatnich lat tendencję wzrostową zapadalności na cukrzycę typu 1 w grupie dzieci najmłodszych. W 2017 roku na całym świecie chorowało 586 000 dzieci poniżej 15. roku życia [2].

Postępujący proces autoagresji u osób predysponowanych początkowo jest bezobjawowy i określa się go mianem *'pre-diabetes'*. Wraz z rozwojem choroby, w obrębie wysp Langerhansa, obserwuje się m.in. powstawanie nacieków leukocytarnych (*'insulitis'*), apoptozę komórek β wysp trzustki oraz rekrutację komórek prezentujących antygeny. W efekcie tego procesu, u chorych dochodzi do upośledzenia lub całkowitego zahamowania produkcji insuliny [3].

Podstawowy problem zdrowotny osób z DM1 stanowi towarzyszące chorobie wysokie ryzyko rozwoju przewlekłych powikłań naczyniowych. Ich powstawanie związane jest z występowaniem patologicznych zmian w obrębie dużych i małych naczyń krwionośnych (makro i mikroangiopatie). Do najczęściej występujących powikłań mikronaczyniowych, będących przyczyną trwałego kalectwa bądź śmierci pacjentów z DM1, należą nefropatia i retinopatia cukrzycowa [4].

Wśród czynników ryzyka występowania i progresji nefropatii i retinopatii cukrzycowej wymienić można m.in. czas trwania choroby, stężenie glukozy we krwi, a także wartość ciśnienia tętniczego, czy wskaźników lipidowych [5-6]. Do rozwoju zmian mikronaczyniowych przyczyniają się również m.in. mechanizmy *'pamięci hiperglikemicznej'*, czy wysoka aktywność czynników prozapalnych [7-11]. Co interesujące, u chorych, mimo normalizacji hiperglikemii, nie dojdzie do zniwelowania charakterystycznych zaburzeń w funkcjonowaniu szlaków metabolicznych i czynności komórek uszkodzonych jej działaniem [12-13]. Choć dokładne mechanizmy molekularne odpowiedzialne za rozwój „pamięci hiperglikemicznej” są nadal mało poznane, istnieje hipoteza, że u podstaw występowania tego zjawiska mogą leżeć modyfikacje epigenetyczne. U chorych tego typu zmianom mogą podlegać zarówno komórki naczyń krwionośnych, jak i komórki układu odpornościowego, takie jak monocyty czy makrofagi [14-16]. Często to właśnie komórki monocytarne jako pierwsze infiltrują obszary naczyniowe zagrożone rozwojem angiopatii, w odpowiedzi na działanie odpowiednich czynników chemotaktycznych, a ich silna adhezja do komórek śródbłonna naczyń może zapoczątkować postępujący proces degeneracyjny [17-19].

We krwi pełnej osób zdrowych, na podstawie ekspresji cząsteczek powierzchniowych CD14 i CD16, wyróżnia się trzy subpopulacje monocytów. Główną subpopulację tworzą komórki o fenotypie CD14^{bright}CD16⁻, nazywane klasycznymi i stanowią około 90% krążących we krwi monocytów. Drugą grupę, pod względem wielkości, stanowią monocyty nieklasyczne (CD14^{dim}CD16⁺), natomiast trzecią, najpóźniej wyodrębnioną, tworzą monocyty pośrednie o fenotypie CD14^{bright}CD16⁺ [20].

Wśród znanych czynników wpływających na aktywność monocytów w DM1, wymienić można m.in. końcowe produkty zaawansowanej glikacji białek (AGEs, ang. *advanced glycation end products*). Wiążą się one z odpowiednimi receptorami powierzchniowymi monocytów, pobudzają ich chemotaksję oraz produkcję TNF α (ang. *tumor necrosis factor α* , czynnik martwicy nowotworów α) [21]. Główną pulę producentów tej prozapalnej cytokiny wśród komórek monocytarnych stanowią komórki nieklasyczne [22]. Co również istotne, liczne prace wskazują na istotną wartość predykcyjną TNF α dotyczącą wystąpienia objawów mikroangiopatii cukrzycowych [23-27].

Wcześniejsze badania prowadzone w Zakładzie Immunologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, wykazały istotny wzrost populacji monocytów nieklasycznych we krwi dzieci z DM1. Jednak w tej pracy, z populacji komórek CD16⁺, nie wyodrębniono monocytów pośrednich [28]. Inni autorzy zwrócili również uwagę, że u pacjentów z DM1 wzrasta odsetek populacji monocytów CD16⁺, podczas gdy odsetek tych komórek spada u chorych, u których doszło już do rozwoju powikłań naczyniowych [29]. Zjawisko to może być związane z różnicowaniem tych komórek w makrofagi, które zasiedlają tkanki.

Makrofagi, w zależności od tego, jakie czynniki brały udział w ich aktywacji, dzielimy na komórki klasycznie spolaryzowane – M1, o profilu prozapalnym oraz alternatywnie spolaryzowane – M2, które wykazują właściwości antyzapalne [30]. Różnicowaniu komórek M2 towarzyszy wzrost wewnątrzplazmatycznej ekspresji czynnika transkrypcyjnego IRF4 (ang. *interferon regulatory factor 4*, czynnik regulujący interferon 4), który ponadto jest negatywnym regulatorem ekspresji czynnika IRF5 (ang. *interferon regulatory factor 5*, czynnik regulujący interferon 5) i procesu klasycznej polaryzacji. Makrofagi znane są jednak ze swej niezwyklej plastyczności i możliwości przełączania fenotypu, a za proces ten odpowiada w głównej mierze, regulacja poziomu ekspresji czynnika IRF5 [31].

Ponieważ DM1 w swoim przebiegu wiąże się z narastającą intensywnością stanu zapalnego [28], ważnym markerem odpowiedzi zapalnej wydaje się być cząsteczka CD83. Ten powierzchniowy marker jest glikoproteiną należącą do rodziny molekuł o budowie immunoglobulinowej [32]. Jego wewnątrzplazmatyczną ekspresję mogą wykazywać zarówno monocyty, makrofagi jak i niedojrzałe komórki dendrytyczne, a do jego ekspresji na powierzchni komórki może dojść np. pod wpływem stymulacji przez LPS (ang. *bacterial lipopolysaccharide*, lipopolisacharyd bakteryjny) [33]. Ponadto, w surowicy osób zdrowych, wykrywana jest także rozpuszczalna forma molekuły CD83 (sCD83, ang.

soluble CD83), która powstaje m.in. w wyniku proteolitycznego usunięcia formy powierzchniowej z komórek. Uwalniają ją zarówno zaktywowane monocyty, komórki dendrytyczne pochodzenia monocytarnego (MoDCs, ang. *monocyte derived dendritic cells*) otrzymane w warunkach hodowli *in vitro*, czy krążące we krwi komórki dendrytyczne CD1c⁺ [34-35]. Ju et al. w swojej pracy wysunął wniosek, że funkcje cząsteczki CD83 różnią się w zależności od tego w jakiej formie występuje ona w organizmie – forma powierzchniowa (mCD83, ang. *membrane CD83*) odgrywa przede wszystkim rolę stymulatora aktywności komórek układu odpornościowego, natomiast forma rozpuszczalna może hamować nadmierną odpowiedź immunologiczną [35], co byłoby pożądane w kwestii wygaszania toczącej się u chorych odpowiedzi zapalnej.

Cele pracy

- Określenie związku między odsetkiem subpopulacji monocytów nieklasycznych (CD14^{dim}CD16⁺) i pośrednich (CD14^{bright}CD16⁺) we krwi pełnej dzieci z cukrzycą typu 1, a ryzykiem rozwoju retinopatii i nefropatii cukrzycowej u chorych.
- Uzyskanie alternatywnie spolaryzowanych, a więc wyrażających ekspresję czynnika transkrypcyjnego IRF4 i produkujących IL-10, makrofagów pochodzenia monocytarnego od pacjentów z cukrzycą typu 1, w warunkach hodowli *in vitro*.
- Określenie związku między efektywnością różnicowania monocytów CD16⁺ w komórki wykazujące powierzchniową ekspresję cząsteczki CD83 w warunkach hodowli *in vitro*, z uwzględnieniem stężenia jej rozpuszczalnej formy w osoczu chorych, a przebiegiem klinicznym choroby.

Grupy badane

Łącznie do badań zakwalifikowanych zostało 144 pacjentów chorych na cukrzycę typu 1. Wśród nich, 38 należało do grupy nowo rozpoznanych (ND-DM1, ang. *newly diagnosed type 1 diabetes mellitus*) oraz 106 do grupy z długotrwałą (ponad rok od diagnozy) postacią choroby (LS-DM1, ang. *long standing type 1 diabetes mellitus*), u których nie rozpoznano powikłań naczyniowych. Pacjenci znajdowali się pod opieką Kliniki Pediatrii, Diabetologii i Endokrynologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego. Chorobę zdiagnozowano zgodnie z obowiązującymi kryteriami American Diabetes Association [36]. Osoby ze współistniejącymi schorzeniami o podłożu autoimmunizacyjnym oraz z rozpoznaniem ostrym lub przewlekłym stanem zapalnym, zostały wyłączone z badania. Grupę kontrolną stanowiło łącznie 41 zdrowych dzieci, dobranych pod względem wieku oraz płci, z negatywnym wywiadem rodzinnym w kierunku DM1. Pacjenci i ich opiekunowie, zostali poinformowani o celu prowadzonych badań oraz wyrazili pisemną zgodę na udział w projekcie.

Materiały i metody

Materiał do analizy stanowiła krew żylna, pobrana przez pielęgniarkę w trakcie rutynowych badań. U każdego pacjenta, w dniu pobrania, oznaczony został poziom hemoglobiny glikowanej (HbA1c, ang. *glycated haemoglobin A1c*), natomiast u części chorych (61 osób), zmierzono również stężenie białka CRP (ang. *C-reactive protein*, białko C-reaktywne), kreatyniny i albuminy w surowicy. Badania zostały wykonane w Centralnym Laboratorium Klinicznym Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego w Gdańsku.

We krwi pełnej, za pomocą cytometrii przepływowej, oceniono wartości odsetków trzech znanych subpopulacji monocytów. Analizie poddana została również efektywność różnicowania i alternatywnej polaryzacji makrofagów M2 oraz zdolność monocytów linii CD16⁺ do ekspresji powierzchniowej formy cząsteczki CD83, w warunkach hodowli *in vitro*.

Jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (PBMC, ang. *peripheral blood mononuclear cells*) uzyskano metodą wirowania krwi pełnej w gradiencie gęstości. Z kolei populację monocytów CD14⁺, wykorzystaną w procesie różnicowania makrofagów, wyodrębniono metodą selekcji immunomagnetycznej (użyto zestawu EasySep™ Human CD14 Isolation Kit®). Identyfikacja komórek przeprowadzona została na podstawie ekspresji określonych markerów powierzchniowych i wewnątrzplazmatycznych: komórki pochodzenia monocytarnego oceniono na podstawie ekspresji molekuł powierzchniowych CD14, CD16 i CD83, natomiast do identyfikacji makrofagów wykorzystano markery CD206, CD14 oraz CD86. Ocenie poddano również ekspresję czynników transkrypcyjnych IRF4 i IRF5 oraz wewnątrzplazmatyczną produkcję IL-10 (ang. *interleukin 10*, interleukina 10).

Osocze uzyskano w wyniku wirowania krwi pełnej, rozporcjowano i przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20°C do momentu badania. Stężenie cząsteczki sCD83 oraz TNF α w osoczu oznaczono za pomocą testu immunoenzymatycznego ELISA (Aviscera Bioscience/R&D Systems).

Analiza statystyczna danych została przeprowadzona za pomocą oprogramowania STATISTICA w wersji 10 lub 12 (StatSoft Inc.). Do oceny istotności różnic, występujących pomiędzy dwoma niezależnymi grupami, zastosowano test U Manna Whitneya. Do porównania dwóch zależnych pomiarów, zastosowano test kolejności par Wilcoxon. Do oceny zależności między badanymi parametrami, wykorzystano test korelacji rang Spearmana oraz metodę regresji wielorakiej. Przyjęty poziom istotności statystycznej wynosił $p < 0.05$.

Badania realizowano w ramach pracy statutowej Zakładu Immunologii Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego – ST-28.

Wyniki

Zwiększone odsetki monocytów CD14^{bright}CD16⁺ oraz CD14^{dim}CD16⁺ we krwi obwodowej mogą przyczyniać się do rozwoju retinopatii u młodych pacjentów z cukrzycą typu 1.

Ryba-Stanisławowska M, Myśliwska J, Juhas U, Myśliwiec M. *Elevated levels of peripheral blood CD14^(bright)CD16⁺ and CD14^(dim)CD16⁺ monocytes may contribute to the development of retinopathy in patients with juvenile onset type 1 diabetes*. APMIS. 2015;123(9):793-9. IF: 1.933; MNiSW: 20.000

Już we wczesnych fazach choroby, w wyniku zwiększonej adhezji komórkowej w naczyniach kapilarnych siatkówki, powstają nacieki leukocytarne składające się m.in. ze zaktywowanych monocytów. Przyczyniają się one do wystąpienia zjawiska okluzji, zaburzenia perfuzji, a także uszkodzenia śródbłonna naczyniowego, dlatego wymienia się je wśród istotnych biomarkerów rozwoju retinopatii [37].

We krwi pełnej, uzyskanej od 61 młodych pacjentów z długotrwałą cukrzycą typu 1 i 30 osób z grupy kontrolnej, za pomocą cytometrii przepływowej wyodrębniono trzy znane subpopulacje monocytów: klasycznych (CD14^{bright}CD16⁻), pośrednich (CD14^{bright}CD16⁺) i nieklasycznych (CD14^{dim}CD16⁺). Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała istotnie wyższy odsetek monocytów nieklasycznych i pośrednich u dzieci z grupy badanej, w odniesieniu do wyników uzyskanych w grupie kontrolnej.

Kolejnym krokiem była ocena związku między ryzykiem rozwoju retinopatii cukrzycowej u chorych, a zwiększonym odsetkiem badanych subpopulacji komórek. Pod uwagę wzięto wartości stężenia hemoglobiny glikowanej – HbA1c oraz czas trwania choroby. Wartości obu wskaźników istotnie korelowały ze zwiększonym odsetkiem monocytów nieklasycznych i pośrednich (ocena dokonana za pomocą testu Spearmana). Następnie ustalona została również dodatnia korelacja między wartościami odsetków komórek z linii CD16⁺ i wskaźnika RD (ang. *retinopathy development value*, wskaźnik rozwoju retinopatii cukrzycowej) [38].

Nie wykazano istotnych korelacji między zwiększonym odsetkiem obu subpopulacji monocytów z linii CD16⁺, a wartościami parametrów związanych ze zwiększonym ryzykiem rozwoju nefropatii cukrzycowej (stężenie kreatyniny i albuminy w surowicy krwi) [6], czy stężeniem białka CRP.

Monocyty młodych pacjentów z nowo rozpoznaną cukrzycą typu 1 mają skłonność do różnicowania się w makrofagi regulatorowe M2 produkujące IL-10.

Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Brandt-Varma A, Myśliwiec M, Myśliwska J. *Monocytes of newly diagnosed juvenile DM1 patients are prone to differentiate into regulatory IL-10⁺ M2 macrophages.* Immunol Res. 2019;67:58-69. IF: 2.487; MNiSW: 25.000

Nadmierna aktywacja krążących we krwi monocytów w cukrzycy typu 1, może mieć związek z długotrwałym działaniem hiperglikemii na badane komórki i może przyczyniać się do zaburzeń procesu różnicowania i polaryzacji makrofagów o profilu antyzapalnym [16].

Analiza cytometryczna makrofagów, uzyskanych w warunkach 7-dniowej hodowli *in vitro* monocytów wykazała, że proces alternatywnej polaryzacji tych komórek jest mniej efektywny w grupach LS-DM1 oraz ND-DM1 niż w grupie kontrolnej. Wniosek ten wysunięto na podstawie zwiększonego odsetka komórek niespolaryzowanych w hodowli M2 (CD206⁺CD14⁺) w odniesieniu do wartości otrzymanych w grupie kontrolnej. Ponadto subpopulacja niespolaryzowanych komórek w hodowli M2, prezentowała nadmierną ekspresję badanych markerów powierzchniowych w grupie ND-DM1 (CD206, CD14 i CD86) i LS-DM1 (CD206) w odniesieniu do kontroli.

Analizie poddano również ekspresję czynników transkrypcyjnych IRF4 i IRF5. Wykazano, że analizowane komórki w hodowli M2 prezentowały zwiększoną ekspresję czynnika IRF4 w obu grupach badanych DM1, w odniesieniu do wyników z grupy kontrolnej. Podobne zależności rozpoznano podczas oceny ekspresji czynnika IRF5 w grupie ND-DM1.

Uzyskane wyniki sugerują również upośledzoną zdolność do regulacji zależnej od IL-4 (ang. *interleukin 4*, interleukina 4) ekspresji czynnika IRF4 w badanej subpopulacji komórek o fenotypie CD206⁺CD14⁺. Co ciekawe, ekspresja czynnika IRF5 istotnie wzrastała podczas procesu polaryzacji w obu grupach badanych i kontroli, co wraz z ograniczaniem możliwości regulacji poziomu czynnika IRF4 może przyczyniać się do obniżenia efektywności alternatywnej polaryzacji makrofagów w hodowli M2.

Przeprowadzona została również ocena odsetka komórek IL-10⁺ w hodowlach M2, aby ocenić, w jakim stopniu badane komórki zachowały zdolność do produkcji tej antyzapalnej cytokiny. Wyniki wskazują, że produkcja IL-10 w hodowlach makrofagów M2 u badanych pacjentów była obniżona. Istotną redukcję odsetka komórek produkujących tę cytokinę wykazano w grupie LS-DM1.

Niestety w grupie 5 pacjentów (zakwalifikowanych do grupy Excluded LS-DM1 patients) nie udało się uzyskać odpowiedniej ilości adherentnych komórek o prawidłowej morfologii. Z tego względu niemożliwe stało się przeprowadzenie wiarygodnej oceny procesu różnicowania i polaryzacji makrofagów. Pacjenci z tej grupy byli starsi, odznaczali się dłuższym czasem trwania choroby oraz istotnie wyższą wartością parametru HbA1c niż pacjenci z grupy LS-DM1.

Napotkane trudności w procesie różnicowania makrofagów na poziomie komórek M0 sugerują, że w procesie kwalifikacji do badania należałoby rozszerzyć kryteria włączenia pacjentów do grupy LS-DM1 o wartości parametrów biochemicznych i klinicznych, takich jak wartość wskaźnika HbA1c czy czas trwania choroby. Ponadto zwiększona ekspresja markerów CD14/CD86/IRF5 sugeruje, że makrofagi uzyskane w hodowli M2 w grupie dzieci z DM1 wykazują wspólne cechy z klasycznie spolaryzowanymi, prozapalnymi makrofagami M1.

Biorąc pod uwagę stopień nasilenia wykrytych defektów, wnioskować można, że lepszy model do dalszych badań w kierunku rozwoju terapii z zastosowaniem miejscowego transferu makrofagów antyzapalnych, stanowią komórki izolowane od dzieci z grupy ND-DM1.

Wraz z progresją cukrzycy typu 1 dochodzi do obniżenia ekspresji rozpuszczalnej formy cząsteczki CD83, co może wiązać się ze zmniejszeniem aktywności immunosupresyjnej w późnej fazie choroby.

Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Ławrynowicz U, Myśliwiec M, Myśliwska J. Putative loss of CD83 immunosuppressive activity in long-standing complication-free juvenile diabetic patients during disease progression. Immunol Res. 2019;67:70-76. IF: 2.487; MNiSW: 25.000

Komórki pochodzenia monocytarnego są potencjalnym źródłem rozpuszczalnej formy cząsteczki CD83 – sCD83. Molekuła ta może wykazywać działanie immunosupresyjne wobec toczącej się w organizmie nadmiernej odpowiedzi zapalnej [35]. Należałoby wspomnieć, że jednym ze znanych biomarkerów obecności stanu zapalnego u osób z DM1 jest cytokina TNF α [39]. Wydaje się, że cząsteczka CD83 może mieć istotny wpływ na wyciszenie odpowiedzi odpornościowej w cukrzycy typu 1.

Z ustaleń autorów wynika, iż brak jest prac przedstawiających analizę zdolności komórek monocytarnych z linii CD16⁺ do ekspresji powierzchniowej formy molekuły CD83 u dzieci z DM1, w zależności od etapu choroby, przy jednoczesnej ocenie stężenia jej rozpuszczalnej formy w osoczu chorych.

Analiza statystyczna wyników wykazała istotnie obniżoną wartość stężenia molekuły sCD83 w osoczu chorych z grupy LS-DM1, w odniesieniu do wyników uzyskanych zarówno w grupie ND-DM1 jak i kontrolnej. Obie grupy badane DM1, charakteryzowały się podwyższonym stężeniem cytokiny TNF α w osoczu, w odniesieniu do wyników u osób zdrowych. Za pomocą testu korelacji rang Spearmana, wykazano negatywne korelacje między wartością stężenia sCD83 w osoczu i parametru HbA1c u pacjentów z grupy LS-DM1. Nie wykazano jednak podobnych korelacji w przypadku wartości innych istotnych parametrów, m.in. wieku, czasu trwania choroby czy stężenia TNF α w osoczu. Z kolei wartość stężenia molekuły sCD83 dodatkowo korelowała z wartością TNF α w grupie ND-DM1. Wyniki

sugerują, że molekula CD83 może tracić swoją potencjalną, immunosupresyjną rolę u pacjentów z długotrwałą cukrzycą typu 1, co z kolei może mieć związek ze słabą kontrolą glikemii u tych chorych.

Analiza cytometryczna komórek PBMC, poddanych niestymulowanej hodowli *in vitro* wykazała, że komórki monocytarne z linii CD16⁺ wykazują zdolność do ekspresji powierzchniowej formy cząsteczki CD83 już w 24. godzinie hodowli, z tendencją wzrostową do 72. godziny inkubacji. Otrzymane wyniki dotyczą zarówno dzieci chorych na DM1 oraz grupy kontrolnej. Ustalono jednak, że zarówno odsetek badanych komórek mCD83⁺, jak i poziom ekspresji analizowanego markera, wyrażony poprzez wskaźnik MFI (ang. *mean fluorescence intensity*, średnia intensywność fluorescencji), w 72. godzinie hodowli był znacznie obniżony w grupie LS-DM1 w odniesieniu do kontroli. Wyniki sugerują, że zdecydowanie lepszym źródłem molekuly CD83 mogą być komórki monocytarne pacjentów będących na etapie rozpoznania choroby.

W badaniu uwzględniono również wpływ prozapalnej cytokiny TNF α na proces różnicowania komórek mCD83⁺ w hodowli *in vitro*. Efektem stymulacji komórek PBMC była istotna redukcja odsetka komórek mCD83⁺ w odniesieniu do niestymulowanej kontroli, we wszystkich grupach badanych. Wyniki wskazują, że jedynie w przypadku dzieci z grupy ND-DM1 i kontrolnej dodatek TNF α miał również istotne znaczenie w kwestii redukcji poziom ekspresji badanego markera.

Wnioski i implikacje kliniczne

- Wzrastające wraz z czasem trwania choroby odsetki subpopulacji krążących we krwi monocytów nieklasycznych (CD14^{dim}CD16⁺) i pośrednich (CD14^{bright}CD16⁺), są wskaźnikami ryzyka rozwoju retinopatii cukrzycowej u dzieci z DM1.
- Efektywność procesu alternatywnej polaryzacji makrofagów pochodzenia monocytarnego jest obniżona u pacjentów z DM1, bez względu na stopień zaawansowania choroby.
- Utrata zdolności do produkcji powierzchniowej cząsteczki CD83, jak również rozpuszczalnej formy sCD83, może przyczyniać się do utrzymywania permanentnego stanu zapalnego na etapie długotrwałej cukrzycy typu 1.

SUMMARY IN ENGLISH

Introduction

Type 1 diabetes mellitus (DM1) is an organ-specific, multifactorial inflammatory disorder with an autoimmune background. It primarily concerns children and young adults below the age of 30 [1] and it accounts for 7-12% of diabetes cases [2]. Additionally, the results of epidemiological studies clearly indicate a growing trend in the incidences of DM1 in the youngest children in recent years. In 2017 there were 586 000 children under the age of 15 worldwide [2]. The progressive process of autoimmunity is initially asymptomatic in predisposed people and it is called as '*pre-diabetes*'. The disease development is accompanied by formation of leukocyte infiltrations ('insulinitis'), apoptosis of pancreatic β cells and recruitment of antigen presenting cells around the islets of Langerhans. Consequently, the impaired or completely inhibited insulin production is observed in patients [3].

A high risk of vascular complications development is a major medical problem of patients with chronic DM1. Their formation is connected with the occurrence of pathological changes in the large and small blood vessels (micro and macroangiopathies, respectively). Diabetic nephropathy and retinopathy are the most common microvascular complications, which cause permanent disability or death of DM1 patients [4].

The duration of the disease, blood glucose level, arterial blood pressure as well as lipid indicators are among the risk factors of those pathological changes occurrence and progression [5-6]. Besides above mentioned, the mechanisms of 'hyperglycaemic memory' or high activity of proinflammatory factors may also contribute to development of angiopathies [7-11]. Interestingly, in spite of the hyperglycaemia normalization, characteristic dysfunctions in metabolic pathways and cellular functions will not be overcome [12-13]. Although, the exact molecular mechanisms responsible for the development of 'hyperglycaemic memory' are not well understood, there is a hypothesis that the epigenetic modifications underlie this phenomenon. Vascular as well as immune cells, like monocytes or macrophages, can undergo such changes [14-16]. Those monocytic cells are often the first which infiltrate vascular areas endangered by angiopathy, in response to the appropriate chemotactic factors and their strong adhesion to the endothelial cell could initiate a progressive degenerative process [17-19].

Three different monocyte subpopulations, according to the CD14 and CD16 surface expressions can be distinguished. The main subset of classical monocytes consists of CD14^{bright}CD16⁻ and makes up approximately 90% of whole blood monocytes. The second, non-classical group is represented by the CD14^{dim}CD16⁺ monocytes. The phenotype of the least numerous, intermediate

population is CD14^{bright}CD16⁺ [20]. Among the well-known factors influencing the monocyte activity in the DM1 are inter alia advanced glycation end products of proteins (AGEs). AGEs bind to the relevant monocyte surface receptors and may stimulate their chemotaxis and TNF α (tumor necrosis factor α) production [21]. The non-classical monocyte subset constitutes the main pool of proinflammatory cytokine TNF α producers [22]. Several studies indicate a significant predictive value of this proinflammatory cytokine regarding the onset of diabetic microangiopathy [23-27].

Previous studies conducted in the Department of Immunology (Medical University of Gdańsk), showed a significant increase in the subpopulation of non-classical blood monocytes in children with DM1. However, the intermediate subset was not distinguished from the population of CD16⁺ cells in this work [28]. Others have also emphasized that the percentage of the CD16⁺ monocyte population increases in DM1 patients, whereas the percentage of these cells decreases in patients who had already developed vascular complications [29]. This phenomenon may be related to monocyte differentiation process into resident macrophages.

Macrophages, depending on the factors involved in their activation, are divided into classically polarised M1 cells with a proinflammatory profile and alternatively polarised M2 cells, which present antiinflammatory properties [30]. Among the transcription factors, which are known to promote M2 phenotype, we can mention a member of interferon regulatory factors family, the IRF4 (interferon regulatory factor 4). The IRF4 negatively regulates the IRF5 factor (interferon regulatory factor 5), which promotes the M1 polarisation. Additionally, the macrophage polarisation status is highly plastic and those cells are able to switch their phenotype. This process mainly corresponds to the IRF5 levels regulation [31].

Since in the course of DM1 inflammatory activity is permanently growing important role in this process may be played by the CD83 molecule, a marker of inflammatory response [28]. This surface molecule is a single chain glycoprotein member of the Ig superfamily [32]. Its intracellular expression may be showed by both monocytes, macrophages and immature dendritic cells, and its surface expression may occur, for example, under the stimulation by LPS (bacterial lipopolysaccharide) [33]. Furthermore, the soluble form of the CD83 molecule (sCD83) is also detected in the serum of healthy people, which arises, among others, as a result of the proteolytic cleavage of the cell surface form. It may be released by activated monocytes, in vitro cultured monocyte derived dendritic cells (MoDCs) or circulating CD1c⁺ dendritic cells [34-35]. Ju X. et al. concluded that the CD83 functions may differ depending on their form in the body. The membrane CD83 molecule (mCD83) primarily plays a role of the immune system's activity stimulator, while the sCD83 may inhibit an excessive immune response [35], desirable function to depress the inflammatory response in diabetic patients.

Purposes

The purpose of the presented study was to:

- evaluate the relationship between percentage of non-classical (CD14^{dim}CD16⁺) and intermediate (CD14^{bright}CD16⁺) monocyte subpopulations in whole blood of children with type 1 diabetes and the risk of diabetic retinopathy and nephropathy development in patients,
- obtain alternatively polarised monocyte derived macrophages *in vitro*, showing intracellular expression of the IRF4 transcription factor and producing the IL-10, in patients with type 1 diabetes,
- evaluate the relationship between the effectiveness of the CD16⁺ monocytes differentiation into cells expressing the CD83 surface molecule *in vitro* and clinical course of the disease.

Examined groups

A total of 144 patients with DM1 were qualified for the study. Among them, 38 were newly diagnosed group (ND-DM1, newly diagnosed type 1 diabetes mellitus) and 106 constituted the group with a long-standing disease (LS-DM1, long standing type 1 diabetes mellitus) without vascular complications. The participants were recruited from The Academic Clinic of Paediatric, Diabetology and Endocrinology, Medical University of Gdańsk. DM1 was defined in accordance with American Diabetes Association criteria [36]. Patients with concomitant autoimmune diseases and acute or chronic inflammation were excluded from the study. A total of 41 healthy age- and sex-matched children with a negative family history of DM1 constituted the control group. Patients and their guardians were informed about the purpose of the research and gave a written consent to participate in the project.

Materials and methods

The peripheral venous blood was collected by the nurse, during routine examinations. For each patient, the level of glycated haemoglobin A1c (HbA1c) was determined on the day of collection, while for some patients (61 people) the concentration of CRP (C-reactive protein), serum creatinine and albumin were examined as well (examination was provided by the Clinical Laboratory, University Clinical Centre in Gdańsk).

By means of flow cytometry, the percentages of three known monocyte subpopulations were evaluated in peripheral blood. The effectiveness of the differentiation and alternative M2 macrophage polarisation process, as well as the capacity of the CD16⁺ monocytes *in vitro* cultured to express the surface CD83 molecule were also analysed.

Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated from the patients' blood by the method of density gradient centrifugation. The CD14⁺ monocyte population, used in the macrophage differentiation process, was isolated from PBMCs using immunomagnetic selection (EasySep™ Human CD14 Isolation Kit®). Analysed cells were identified on the basis of the specific surface and intracellular markers expression: monocyte derived cells were assessed based on the CD14, CD16 and CD83 surface molecules expression, whereas the CD206, CD14 and CD86 markers were used to identify macrophages. The intracellular expression of the IRF4 and IRF5 transcription factors were also evaluated, as well as the production of IL-10 (interleukin 10) cytokine.

The patients' plasma was obtained by a peripheral blood centrifugation, next aliquot and stored in a freezer at -20°C until testing. The concentration levels of the sCD83 and TNFα were quantified using ELISA test (Aviscera Bioscience and R&D Systems respectively).

The statistical analysis of the data was made using the STATISTICA version 10 or 12 (StatSoft Inc.). The U Mann Whitney test was used to assess the significance of the differences between the two independent groups. The Wilcoxon signed ranks test was used for paired data comparison among groups. The Spearman rank correlation test was used to assess the correlation between the analysed parameters. Multiparametric regression analysis was also carried out. The level of statistical significance was p<0.05.

Results

Elevated levels of peripheral blood CD14^(bright)CD16⁺ and CD14^(dim)CD16⁺ monocytes may contribute to the development of retinopathy in patients with juvenile onset type 1 diabetes.

Ryba-Stanisławowska M, Myśliwska J, Juhas U, Myśliwiec M. *Elevated levels of peripheral blood CD14^(bright)CD16⁺ and CD14^(dim)CD16⁺ monocytes may contribute to the development of retinopathy in patients with juvenile onset type 1 diabetes.* APMIS. 2015;123(9):793-9. IF: 1.933; MNiSW: 20.000

Leukocyte infiltrations, consisting of i.e. activated monocytes, may occur already at the early stages of the disease as a result of enhanced cell adhesion to the retina capillaries. They contribute to the occurrence of occlusion, perfusion disorders and damage of a vascular endothelium, which is why they are listed among the significant biomarkers of the diabetic retinopathy development [37].

In a peripheral blood of 61 young patients with long-standing DM1 and 30 healthy volunteers, three known monocyte subpopulations were distinguished by means of flow cytometry: classical (CD14^{bright}CD16⁻), intermediate (CD14^{bright}CD16⁺) and non-classical (CD14^{dim}CD16⁺). The statistical analysis showed a significantly higher percentage of non-classical and intermediate cells in the DM1 children, in comparison to the results from the control group.

Afterwards, a relationship between enhanced percentage of the examined cell subpopulations and the risk of diabetic retinopathy development in patients was assessed. The values of HbA1c and duration of the disease were taken into account. Both factors significantly correlated with an increased percentage of non-classical and intermediate monocytes (data was analysed using the Spearman rank test). When comparing the increased percentages of CD16⁺ cell subsets with the rate of RD index (retinopathy development value) [38] a significant positive relationship was found. No significant correlations between the increased percentages of CD16⁺ monocyte subpopulations and other parameters associated with an increased risk of developing diabetic nephropathy (serum creatinine and albumin) [6] or CRP protein were found.

Monocytes of newly diagnosed juvenile DM1 patients are prone to differentiate into regulatory IL-10⁺ M2 macrophages.

Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Brandt-Varma A, Myśliwiec M, Myśliwska J. *Monocytes of newly diagnosed juvenile DM1 patients are prone to differentiate into regulatory IL-10⁺ M2 macrophages.* Immunol Res. 2019;67:58-69. IF: 2.487; MNiSW: 25.000

The excessive activation status of circulating monocytes may be due to the long-term exposition to hyperglycaemia and may prohibit the macrophage's differentiation and the M2 polarization process in DM1 patients [16].

Flow cytometry analysis of monocyte derived macrophages, cultured *in vitro* for 7 days, revealed that the process of alternative M2 polarisation was less effective in the LS-DM1 and ND-DM1 study groups than in the control group. We observed an increased percentage of non-polarised cells in the M2 culture (CD206⁺CD14⁺) in comparison to the results in the healthy controls. In addition, a non-polarised cells overexpressed the following surface markers in ND-DM1: CD206, CD14 and CD86 and LS-DM1 patients: CD206, when compared to control group.

The expressions of IRF4 and IRF5 transcription factors were also analysed. It was showed that the analysed cells from M2 culture presented an increased IRF4 expression in both DM1 groups, when compared to the results from the control group, while the upregulated IRF5 expression was observed in ND-DM1 children only. Impaired ability to regulate the IRF4 levels in analysed CD206⁺CD14⁺ cell subpopulation by IL-4 (interleukin 4) was also revealed. Interestingly, the IRF5 expression levels significantly increased during the polarisation process in both DM1 groups and controls. These two phenomena could probably be responsible for reduced effectiveness of M2 polarisation.

The IL-10⁺ cell percentage was examined in M2 cultures to assess the ability of analysed cells to produce this antiinflammatory cytokine. The results indicated that the IL-10 production was limited in M2 macrophage cultures of DM1 patients and the reduction was significant in the LS-DM1 group.

Unfortunately, an adequate number of adherent cells with typical M2 morphology could have not been effectively differentiated and polarised in a group of 5 patients (children were qualified to the Excluded LS-DM1 patients group). For this reason, a reliable examination of analysed cells was impossible. Patients in this group were significantly older, characterized by a longer duration of the disease and a higher value of the HbA1c parameter when comparing with patients from the LS-DM1 group. Encountered complications in the process of M0 macrophage differentiation suggested that including criteria for LS-DM1 group of patients should be extended by an addition of biochemical and clinical parameters, such as HbA1c levels and duration of the disease. Moreover, an overexpression of the CD14/CD86/IRF5 markers suggests that the phenotype of macrophages from M2 cultures shows common features with the M1 cells.

Considering the severity of macrophage defects detected in LS-DM1 group of patients, it can be concluded that a better model for further research towards the future therapies relying on local transfer of antiinflammatory macrophages, should use the cells isolated from children from the ND-DM1 group.

Putative loss of CD83 immunosuppressive activity in long-standing complication-free juvenile diabetic patients during disease progression.

Juhas U, Ryba-Stanisławowska M, Ławrynowicz U, Myśliwiec M, Myśliwska J. *Putative loss of CD83 immunosuppressive activity in long-standing complication-free juvenile diabetic patients during disease progression*. Immunol Res. 2019;67:70-76. IF: 2.487; MNiSW: 25.000

Monocyte derived cells are potential source of the sCD83 molecule. The sCD83 may exert immunosuppressive functions and suppress the excessive immune response [35]. It should be mentioned, that the one of well-known inflammatory biomarkers in DM1 patients is the TNF α cytokine [39]. Results of multiple studies suggest that the CD83 molecule may be useful for silencing inflammation in diabetes.

As far as we know, there are no works presenting the analysis of the CD16⁺ cultured monocytes ability to express the surface CD83 molecule in DM1 children depending on the stage of the disease, together with the evaluation of the sCD83 concentration levels in patients' plasma.

The results of our study showed that the sCD83 concentration level was significantly reduced in LS-DM1 patients' plasma in comparison to healthy controls and ND-DM1 children. Both DM1 groups of children showed statistically higher TNF α plasma concentration in comparison to healthy volunteers. The Spearman test revealed a negative correlation between the sCD83 and HbA1c plasma level in LS-DM1. No significant relationship between the sCD83 level and patients' age, duration of the disease or TNF α levels in this group of children was found during this study. However, in this group

a higher TNF α concentration was accompanied by higher sCD83 levels in plasma of ND-DM1 children. Presented results suggest that the CD83 molecule may lose its immunosuppressive role in long-standing patients, which in turn may be associated with a poor glycaemic control in those patients.

Flow cytometry analysis of unstimulated PBMCs showed that the CD16⁺ cells from 24 hour-lasting *in vitro* cultures expressed the CD83 surface molecule and its level significantly increased up to 72 hour of incubation. These results were found in both DM1 groups of children and the controls. However, it was found that both the analysed mCD83⁺ cell percentages as well as the levels of examined surface marker, expressed as the MFI value (mean fluorescence intensity), were significantly reduced in the 72 hour-lasting cultures of the LS-DM1 group in comparison to the controls. It indicates that monocytes of ND-DM1 children may be a preferable source of the CD83 molecule.

The effect of proinflammatory TNF α stimulation on the CD83⁺ cell differentiation process *in vitro* was also examined. The results indicated a significant reduction of the mCD83⁺ cell percentage in comparison to results from unstimulated cultures, in the all study groups. It was also revealed that the TNF α addition reduced the analysed marker expression only in case of ND-DM1 and control groups of children.

Conclusions and clinical implications

- The percentages of non-classical (CD14^{dim}CD16⁺) and intermediate (CD14^{bright}CD16⁺) monocyte subsets, increasing along with disease duration points to the risk of diabetic retinopathy development in DM1 children.
- The effectiveness of monocyte derived macrophage alternative polarisation is limited in DM1 patients, regardless of the stage of the disease.
- Loss of the ability to produce the surface CD83 molecule as well as its soluble form sCD83 may contribute to maintaining a permanent inflammation in long-standing type 1 diabetes.

BIBLIOGRAFIA

- [1] Szablewski L. Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Int Immunopharmacol.* 2014;22:182-91
- [2] Federation ID. IDF Diabetes Atlas Eighth Edition. International Diabetes Federation. 2017
- [3] Vives-Pi M, Rodríguez-Fernández S, Pujol-Autonell I. How apoptotic β -cells direct immune response to tolerance or to autoimmune diabetes: a review. *Apoptosis.* 2015;20:263-72
- [4] Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab.* 2013;17:20-33
- [5] Tarr JM, Kaul K, Chopra M, Kohner EM, Chibber R. Pathophysiology of diabetic retinopathy. *ISRN ophthalmol.* 2013:343560
- [6] Dabla PK. Renal function in diabetic nephropathy. *World J Diabetes.* 2010;1:48-56
- [7] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes.* 2005;16:15-25
- [8] Dogan Y, Akarsu S, Ustundag B, Yilmaz E, Gurgoze MK. Serum IL-1beta, IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children. *Mediators Inflamm.* 2006:59206
- [9] Netea MG, Hancu N, Blok WL, Grigorescu-Sido P, Popa L, Popa V, van der Meer JW. Interleukin 1 beta, tumour necrosis factor-alpha and interleukin 1 receptor antagonist in newly diagnosed insulin-dependent diabetes mellitus: comparison to long-standing diabetes and healthy individuals. *Cytokine.* 1997;9:284-7
- [10] Alexandraki KI, Piperi C, Ziakas PD, Apostolopoulos NV, Makrilakis K, Syriou V, Diamanti-Kandarakis E, Kaltsas G, Kalofoutis A. Cytokine secretion in long-standing diabetes mellitus type 1 and 2: associations with low-grade systemic inflammation. *J Clin Immunol.* 2008;28:314-21
- [11] Reddy MA, Zhang E, Natarajan R. Epigenetic mechanisms in diabetic complications and metabolic memory. *Diabetologia.* 2015;58:443
- [12] Vlassara H. Recent progress in advanced glycation end products and diabetic complications. *Diabetes.* 1997;46(supl. 2):S19-S25
- [13] Ihnat MA, Thorpe JE, Ceriello A. Hypothesis: the "metabolic memory", the new challenge of diabetes. *Diabet. Med.* 2007;24:582-6
- [14] Cipolletta C, Ryan KE, Hanna EV, Trimble ER. Activation of peripheral blood CD14+ monocytes occurs in diabetes. *Diabetes.* 2005;54:2779-86
- [15] Devaraj S, Glaser N, Griffen S, Wang-Polagruto J, Miguelino E, Jialal I. Increased monocytic activity and biomarkers of inflammation in patients with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2006;55:774-9
- [16] van Diepen JA, Thiem K, Stienstra R, Riksen NP, Tack CJ, Netea MG. Diabetes propels the risk for cardiovascular disease: sweet monocytes becoming aggressive? *Cell Mol Life Sci.* 2016;3:4675-84

- [17] Kiyici S, Erturk E, Budak F, Ersoy C, Tuncel E, Duran C, Oral B, Sigirci D, Imamoglu S. Serum monocyte chemoattractant protein-1 and monocyte adhesion molecules in type 1 diabetic patients with nephropathy. *Arch Med Res.* 2006;37:998-1003
- [18] Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell.* 1997;91:521-30
- [19] Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev.* 2013;93:137-88
- [20] Ziegler-Heitbrock L, Hofer TP. Toward a Refined Definition of Monocyte Subsets. *Front Immunol.* 2013;4:23
- [21] Festa A, Schmölder B, Schernthaner G, Menzel EJ. Differential expression of receptors for advanced glycation end products on monocytes in patients with IDDM. *Diabetologia.* 1998;41:674-80
- [22] Wong KL, Yeap WH, Tai JJ, Ong SM, Dang TM, Wong SC. The three human monocyte subsets: implications for health and disease. *Immunol Res.* 2012;53:41-57
- [23] Zorena K, Myśliwska J, Myśliwiec M, Balcerska A, Hak Ł, Lipowski P, Raczyńska K. Serum TNF- α level predicts nonproliferative diabetic retinopathy in children . *Mediators Inflamm.* 2007:92196
- [24] Schramm MT, Chaturvedi N, Schalkwijk C, Giorgino F, Ebeling P, Fuller JH, Stehouwer CD. Vascular risk factors and markers of endothelial function as determinants of inflammatory markers in type 1 diabete. *Diabetes Care.* 2003;26:2165-73
- [25] Myśliwiec M, Balcerska A, Zorena K, Kamińska H, Nowacka M, Sibińska Ż, Wiśniewski P, Myśliwska J. Relationship between the level of TNF- α , IL-6 and risk of renal proximal tubules damage in children with newly diagnosed diabetes mellitus type 1. *PJES.* 2005;Vol.14, Sup II:292-5
- [26] Mysliwiec M, Zorena K, Balcerska A, Mysliwska J. Does tumor necrosis factor- α precede occurrence of microalbuminuria in type 1 diabetes mellitus children? *J. Polish Diabetol. Assoc.* 2006;3:131-6
- [27] Myśliwiec M, Zorena K, Balcerska A, Myśliwska J, Lipowski P, Raczyńska K. The activity of N-acetyl-beta d-glucosaminidase and tumor necrosis factor-alpha at early stage of diabetic retinopathy development in type 1 diabetes mellitus children. *Clin. Biochem.* 2006;39:851-6
- [28] Myśliwska J, Smardzewski M, Marek-Trzonkowska N, Myśliwiec M, Raczyńska K. Expansion of CD14+CD16+ monocytes producing TNF- α in complication-free diabetes type 1 juvenile onset patients. *Cytokine.* 2012;60:309-17
- [29] Min D, Brooks B, Wong J, Salomon R, Bao W, Harrisberg B, Twigg SM, Yue DK, McLennan SV. Alterations in monocyte CD16 in association with diabetes complications. *Mediators Inflamm.* 2012:649083
- [30] Zhou D, Huang C, Lin Z, Zhan S, Kong L, Fang C, Li J. Macrophage polarization and function with emphasis on the evolving roles of coordinated regulation of cellular signaling pathways. *Cell Signal.* 2014;26:192-7

- [31] Krausgruber T, Blazek K, Smallie T, Alzabin S, Lockstone H, Sahgal 480 N, Hussell T, Feldmann M, Udalova IA. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat Immunol.* 2011;12:231-8
- [32] Zhou LJ, Tedder TF. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J Immunol.* 1995;154:3821-35
- [33] Cao W, Lee SH, Lu J. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J.* 2005;385:85-93
- [34] Hock BD, Kato M, McKenzie JL, Hart DN. A soluble form of CD83 is released from activated dendritic cells and B lymphocytes, and is detectable in normal human sera. *Int Immunol.* 2001;13:959-67
- [35] Ju X, Silveira PA, Hsu WH, Elgundi Z, Alingcastre R, Verma ND, Fromm PD, Hsu JL, Bryant C, Li Z, Kupresanin F, Lo TH, Clarke C, Lee K, McGuire H, Fazekas de St Groth B, Larsen SR, Gibson J, Bradstock KF, Clark GJ, Hart DN. The Analysis of CD83 Expression on Human Immune Cells Identifies a Unique CD83+-Activated T Cell Population. *J Immunol.* 2016;197:4613-25
- [36] American Diabetes Association. Diabetes classification and diagnosis of diabetes: standards of medical care diabetes. *Diabetes Care.* 2018;41:13-27
- [37] Jenkins AJ, Joglekar MV, Hardikar AA, Keech AC, O'Neal DN, Januszewski AS. Biomarkers in diabetic retinopathy. *RDS.* 2015;12:159:95
- [38] Tatoń J. Pathophysiological Background for “shared” diabetological and ophthalmological care – what ophthalmologist may expect from diabetologist? *Med Metab.* 2007;1:3
- [39] Qiao YC, Chen YL, Pan YH, Tian F, Xu Y, Zhang XX, Zhao HL. The change of serum tumor necrosis factor alpha in patients with type 1 diabetes mellitus: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One.* 2017;12:e0176157