

내독소로 자극된 당뇨병 환자의 중성구에서 기획성 세포사멸과 과산화수소 분비능*

순천향대학교 의과대학 내과학 교실, 임상의학연구소

*서기현, 나주옥, 문승혁, 어수택, 김용훈, 박춘식

Neutrophil Apoptosis and H₂O₂ Release by LPS in Diabetics

*Ki Hyun Seo, M.D., Joo Ock Na, M.D., Seung Hyug Moon, M.D., Soo Taek Uh, M.D., Yong Hoon Kim, M.D., Choon Sik Park, M.D.

Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University College of Medicine, Clinical research institute, Cheonan, Korea

Background : Bacterial infections in diabetic patients are an important cause of increased morbidity and mortality. It has been reported that bacterial infections in diabetics showed more impaired PMN functions such as reduced PMN respiratory burst and decreased microbicidal activity in inflamed tissues. Also, apoptosis(programmed cell death) is postulated to be a key mechanism for neutrophil elimination. It is very important that PMN apoptosis keeps the balance from an area of inflammation. Actually, as little was known about PMN apoptosis and respiratory burst in diabetes, we investigated PMN apoptosis and hydrogen peroxide production after endotoxin exposure.

Methods : Peripheral venous blood samples were collected by routine venipuncture from healthy volunteers and diabetics to harvest neutrophils. We respectively measured the PMN apoptosis, the production of hydrogen peroxide, and the cell viability.

Results : Normal neutrophils showed a tendency to decreased apoptosis after endotoxin treatment. In patients with diabetes, PMN apoptosis was significantly decreased compared with healthy controls. In addition, the LPS-induced neutrophils in diabetics demonstrated more decreased apoptosis. However, the production of hydrogen peroxide was not different between groups.

Conclusion : These observations suggest that the decreased PMN apoptosis in diabetics with endotoxin exposure may also affect the increased susceptibility and severity of infections. (*Tuberc Respir Dis 2004; 57:250-256*)

Key words : LPS(lipopolysaccharide), PMN apoptosis, hydrogen peroxide, Diabetes.

서 론

중성구는 인체조직 손상이나 감염으로 인한 염증부위에 중요한 역할을 하는 세포이면서도 염증 반응을 더욱 강화시키고 정상 조직의 손상을 유발할 수 있다고 한다¹⁻³. 5-6시간의 짧은 반감기를 갖는 중성구는 염증부위로 이동 후 괴사(necrosis)나 기획성 세포사멸(apoptosis or programmed cell death)을 통해 제거된다고 알려져 있다⁴. 괴사를 통해 제거될 경우 주변환

경에 독성물질을 분비하여 조직 손상을 유발할 수 있고 기획성 세포사멸을 통해 제거될 경우 부착분자(adhesion molecule)에 결합력이 떨어지고⁵ 과립물질 분비가 감소되어 정상 조직의 손상을 최소화 할 수 있다고 알려져 있다⁶. 기획성 세포사멸을 억제하는 물질로는 GM-CSF(granulocyte-macrophage CSF), IL-1, IL-2, LPS(lipopolysaccharide)가 있었고⁷⁻¹¹ C5a, G-CSF, IL-6, fMLP(formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)는 상반된 의견을 갖는다⁷⁻¹³. 일부 연구에서 활성 산화기의 일부인 과산화수소는 기획성 세포사멸을 유발한다고 보고하고 있다^{14,15}.

당뇨환자에서 세균 감염 시 이환율과 사망률이 증가하고¹⁶⁻¹⁹ 중성구의 기능 장애가 중요한 기전으로 알려져 있다²⁰⁻²². 즉 중성구의 화학주성, 부착력, 포식작용의 기능 이상과 또한 중성구가 분비하는 활성 산화기의 기능이상, 살균 능의 저하를 가져온다고 현재까지 밝혀져 있으나^{23,24} 기획성 세포사멸에 대한 견해가 부족한 편이다.

*본 연구과제는 2002학년도 순천향대학교 임상의학연구소 학술 연구조성비 일반연구 과제로 지원을 받아 수행하였음.

Address for correspondence : **Yong Hoon Kim, M.D.**
Department of Internal Medicine, Soonchunhyang University Hospital, 23-20, BongMyung-Dong, Cheonan, 330-721, Korea.
Phone : 041-570-3681 Fax : 041-574-5762
E-mail : welkim@schch.co.kr
Received : Mar. 3. 2004.
Accepted : Aug. 18. 2004.

Table 1. General characteristics of study population

Sex	Healthy subjects		Diabetic patient	
	M=4	F=1	M=3	F=2
Age(y)	27.5±3.1		53.4±8.8	
HbA1c(%)	4.6±1.5		11.2±1.4	
Glucose(mg%)	95.2±10.8		306.5±82.6	

이에 저자들은 정상과 당뇨병 환자의 중성구를 내독소인 지질다당질(Lipopolysaccharide)로 자극했을 때 관찰되는 기획성 세포사멸의 변화와 과산화수소 분비능을 알고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

2002년 3월부터 8월까지 5년 이상 당뇨치료를 해왔고 단지 당 조절을 위해 입원한 당뇨병 환자 5명을 선택하였다. 남자 3명, 여자 2명이었으며 평균 연령은 53.4세였다. HbA1c는 11.2±1.4%였고 채혈당시 당 농도는 306±82.6 mg/dL였다. 건강 대조 군으로 최근 한 달 사이에 감염의 증거나 약물 복용력, 당뇨가 없는 정상인을 선택하였고 남자 4명, 여자 1명이었으며 평균 연령은 27.5세였다. 이들의 HbA1c는 4.6±1.5%였고 채혈당시 당 농도는 95.2±10.8 mg/dL였다(Table 1).

2. 연구 방법

1) 다형 핵 백혈구 분리

정상인과 당뇨병 환자에서 전혈 50 ml 채혈하여 4% dextran solution 20 ml를 첨가한 후 실온에서 20-30분간 방치한다. 하층에 적혈구가 가라앉은 것을 확인하고 245 g에서 10분간 원심 분리한 후 상층의 백혈구 층을 따내어 다시 30 ml 생리 식염수와 섞고 상층에 Histopaque 10 ml를 첨가하여 제동 없이 400 g에서 40분간 원심 분리한다. 우선 중간의 단핵 세포 층을 분리하고 저장성 생리식염수(hypotonic saline)로 남아있는 적혈구를 용해한 후 순수한 중성구를 추출한다. Cytospin 후 diff-quick(modified Giemsa) stain을 이용하여 세포 순도(purity)를 측정하였고 95%이상일 때

실험을 진행하였다.

2) 기획성 세포사멸(apoptosis)

정상인과 당뇨병 환자에서 추출된 중성구를 당 농도 100 mg%의 항생제가 포함된 배지(10% RPMI/FBS)에 1.25×10^6 cell/ml이 되게끔 희석한 후 24 well plate에 분주하고서 각각 내독소 10 µg/ml을 첨가하였다. 측정 1시간 전에 fMLP 5×10^{-7} M 추가하여 세포 활성도를 증가시켰고, 3시간과 20시간째에 배양된 각각의 세포를 추출하여 Annexin V-PE 염색 방법을 이용하여 flow cytometry(Beckman Coulter)로 측정하였다. 이 실험에 사용되는 Annexin-V는 apoptotic cell 표면에 노출된 phosphatidylserine에 형광물질인 PE(phycoerythrin)가 결합되어 있어 주로 초기의 세포 변화를 보는 방법으로 이용된다. 측정 방법은 1×10^6 cells/ml, 300 µl를 분주한 후 Annexin-V, 5 µl를 첨가하고, 다른 관에는 같은 양의 세포만 분주한다. 각각의 실험관에 binding buffer 200 µl를 첨가하고 15분간 암실에서 배양하고서 575 nm의 발광으로 FL2에서 flow cytometry를 이용하여 Annexin-V가 첨가되지 않은 negative control에서 측정된 값을 교정하여 실제의 기획성 세포사멸(apoptosis)을 측정한다. 측정된 값은 괴사된 세포도 포함되어 있으므로 trypan blue 염색을 통해 감별하였다. 또한 실제 중성구의 처리 과정에서도 기획성 세포사멸이 진행되기 때문에 중성구 분리 과정이나 기획성 세포사멸 측정시 오염이나 시간 지체가 없어야 한다.

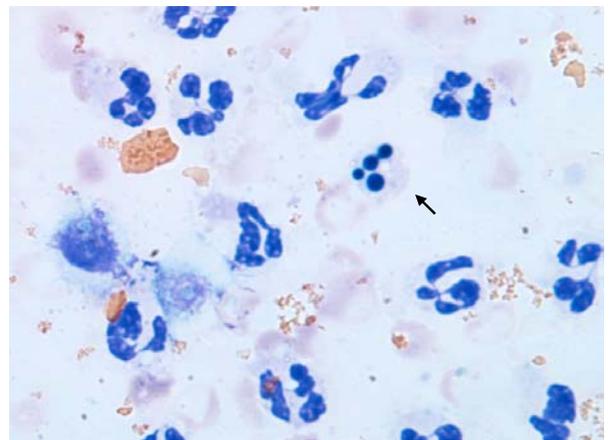


Figure 1. Morphologic feature of apoptotic PMN (arrow)

Table 2. Ex vivo, Apoptosis at 3, 20hrs in normal control and diabetic PMN

Time after endotoxin	PMN Apoptosis(%)			
	Healthy subjects		Diabetic patient	
	ETX(-)	ETX(+)	ETX(-)	ETX(+)
3hrs	17.9±2.7	14.6±2.3	12.6±2.3	10.1±1.1*
20hr	36.3±2.4	33.7±2.3	21.5±3.3	19.8±2.4+

* p=0.046, Normal vs DM
+p=0.005, Normal vs DM

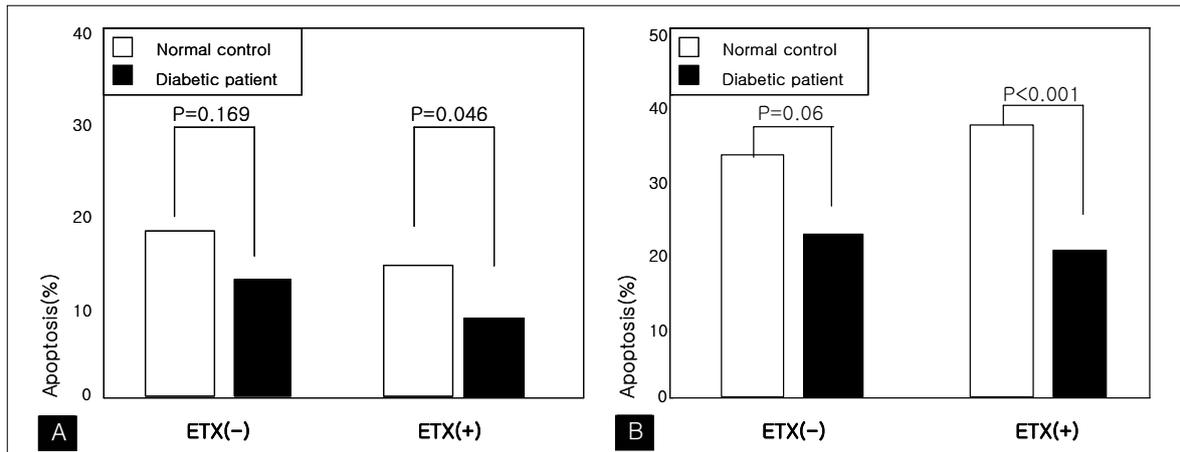


Figure 2. Comparison of neutrophil apoptosis between normal controls and diabetic patients at 3 (A) and 20 hours (B)

3) 과산화수소 분비능

세포외에 존재하는 과산화수소에 phenol red를 결합시키고 horseradish peroxidase로 산화한 후 600 nm의 분광 광도법을 이용하여 과산화수소 분비능을 측정하였다.

4) 세포 생존율(viability)

배양된 세포의 일부를 따서 trypan blue로 염색한 후 염색된 세포는 괴사(necrosis)된 세포로 간주하였다.

3. 통계

통계는 Window용 SPSS 10.0을 이용하여 분석하였고, 여러 변수에 따른 평균값과 표준 오차(mean±SEM)을 계산하고, 각 집단간의 비교는 일차적으로 Kruskal-Wallis 검정을 이용하였다. P 값이 0.05 미만인 경우를 유의성이 있다고 판정하였고 의미있는 차

이를 보인 변수를 대상으로 두 군간의 비교는 Mann-Whitney U 검정을 이용하였고 p 값이 0.05 이하인 경우를 유의한 차이가 있다고 판정하였다.

결 과

1. 중성구의 기획성 세포사멸

기획성 세포사멸 된 중성구의 형태학적 특징은 그림 1에서 보는 바와 같이 전형적인 소견인 염색질과 세포질 농축과 수축, 다형성 세포핵의 융합을 관찰할 수 있었다(Fig 1). 정상 농도의 기획성 세포사멸은 3시간째 17.9±2.7%였고, 20시간째는 36.3±2.4%였다. 정상 농도와 고농도 군에서 시간에 따른 기획성 세포사멸은 의미 있게 증가하였고, 내독소 투여에 따른 기획성 세포사멸은 통계적으로 의미는 없지만 감소하는 경향을 보였다(Table 2). 정상인과 비교하여 당뇨병자에서는 내독소를 투여한 군의 기획성 세포사멸이 3시간째

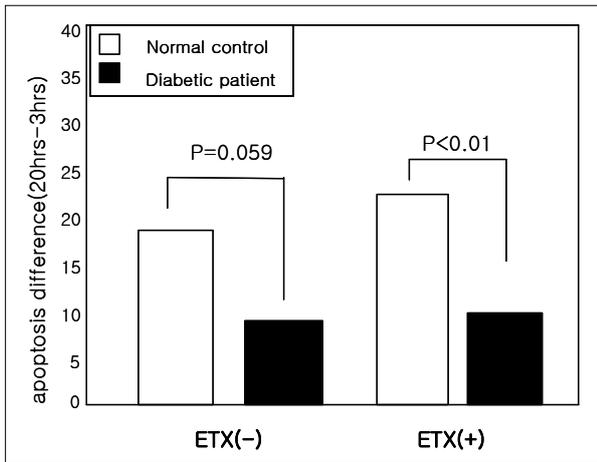


Figure 3. Comparison of neutrophil apoptosis between normal controls and diabetic patients.

는 4.5% 감소를 보였고(p=0.046), 20시간째는 17% 감소하였다(p<0.001)(Fig. 2). 당뇨병환자에서 3시간째와 20시간째의 기획성 세포사멸의 차를 비교했을 때 내독소를 투여한 군에서는 의미 있게 적었고(p<0.01), 내독소를 투여하지 않는 군에서는 통계적인 의미는 없지만 줄어드는 경향을 보였다(p=0.059)(Fig. 3).

2. 과산화수소 분비능

정상 농도와 고농도의 당에서 중성구의 과산화 분비능에 차이가 없었고, 정상인과 당뇨병환자에서도 과산화수소 분비 능의 차이는 없었다(Table 3).

3. 세포 생존율

전 실험 과정을 통해 계산된 세포 생존율은 95-99%의 생존율을 보여 20시간까지 관찰했을 때 괴사된 세포는 5% 미만이었다(Table 4).

고 찰

기획성 세포사멸(Apoptosis)은 여러 염증반응에서 더 이상 필요 없는 세포를 제거하는 과정으로, 괴사와는 달리 과도한 세포 수와 그에 따른 독성 물질 분비를 조절할 수 있으므로 기획성 세포사멸의 증감이 정상 조직 손상에 미치는 영향을 관찰하는 것은 매우 중요하다고 하겠다. 특히 중증 감염을 유발하는 당뇨에서 급성 폐 손상은 더욱 심해질 것으로 예상하는데 이의 기전으로 중성구의 기획성 세포사멸이 현저한 감소할 것으로 기대하고서 본 실험을 진행하였다.

기획성 세포사멸된 세포의 형태학적 특징은 염색질과 세포질 농축과 수축, 다형성 세포핵을 관찰할 수 있고^{4,26} 생화학적으로 뉴클레오솜 간의 DNA 분열, 세포 표면에 phosphatidylserine (PS) 의 노출, CD16의 발현을 볼 수 있다²⁷. 본 연구에서도 특징적인 기획성 세포사멸된 중성구를 관찰할 수 있었다.

본 실험에서 이용된 Annexin-V 염색법은 세포 표면 내 phosphatidylserine의 노출을 측정하는 방법으로 기

Table 3. Hydrogen peroxide release at 3hrs, 20hrs in normal & diabetic PMN

Time after endotoxin	H ₂ O ₂ (x 10 ⁻⁴ M/10 ⁶ cells)			
	Healthy subjects		Diabetic patient	
	ETX(-)	ETX(+)	ETX(-)	ETX(+)
3hrs	1.92±0.37	2.06±0.45	2.31±0.61	1.81±0.43
20hrs	1.40±0.25	2.52±0.59	2.15±0.21	3.22±0.62

Table 4. Viability at 3, 20hrs in normal & diabetic PMN

Time after endotoxin	PMN viability(%)			
	Healthy subjects		Diabetic patient	
	ETX(-)	ETX(+)	ETX(-)	ETX(+)
3hrs	96.4±2.51	97.4±1.95	98.3±2.36	97.5±1.73
20hrs	97.8±3.35	93.8±7.43	97.5±2.65	96.5±2.52

획성 세포사멸에서 자극의 종류와 관련없이 초기에, 공통적으로 일어날 수 있는 변화를 측정하기 때문에 최근에 가장 널리 알려지고 사용되는 방법이다^{28,29}. 중성구의 자발성 기획성 세포사멸은 3시간째 17.9±2.7%, 20시간째는 36.3±2.4%였다. 그리고 20시간 배양된 중성구 중 괴사된 세포는 5% 이내였다. 이 같은 결과는 2시간째 10.0±1.3%, 24시간째 39.5±3.0% 결과를 보고한 다른 연구 논문과 비슷하였고³⁰ 실제 24시간에 98-99%, 48시간에 36.8±5.3%, 72시간에 14.5±3.1%, 96시간에 4.2±2.9%의 생존율을 보인 연구 결과와도 일치하였다⁷.

내독소 투여 후 중성구의 기획성 세포사멸은 감소한다고 알려져 있다^{9,11,12}. 또한 저자는 본 실험에서 내독소 투여 후 중성구의 기획성 세포사멸의 감소를 기대하였고 의미 있는 차이는 없으나 감소하는 경향을 보였다. 실험 방법에는 언급이 없지만 실험 초기에 내독소만 투여하여 반응을 보았고 결과에 차이를 보이지 않아서, 화학주성인자이면서 세포활성을 자극시키는 물질인 fMLP(N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine)를 첨가하였다. 아직까지 이견이 있으나 낮은 농도의(10⁻⁸M) fMLP는 기획성 세포사멸을 약간 늦추고²⁶ 높은 농도에서는(10⁻⁶M) 영향이 없는 것으로 알려져 있으므로⁷ 본 실험 농도인 5×10⁻⁷M는 기획성 세포사멸에 거의 영향을 주지 않았을 것으로 사료된다.

당뇨 환자에서는 많은 중성구 기능 장애가 관찰되고 중증 감염에 쉽게 노출된다¹⁶⁻²². 특히 기획성 세포사멸이 중요한 역할을 할 것으로 사료되는데 본 실험에서 정상과 비교하여 3시간째는 중성구 기획성 세포사멸이 감소하는 추세이고 20시간째는 의미 있게 감소하여 시간 경과에 따라 현저히 감소하는 소견을 보였다. Glowacka 등은²³ 당뇨에서 시간 경과에 따른 중성구의 기획성 세포사멸이 정상보다 늘지 않는다고 보고하였고 당뇨에서 내독소를 투여한 군의 기획성 세포사멸이 정상과 비교하여 오히려 늘어나는 결과를 보였다. 즉 감소된 기획성 세포사멸 억제에 의해 감염부위의 중성구 제거가 증가하여 중증 감염을 유발할 수 있다고 설명하였다. 본 연구에서는 당뇨에서 시간에 따른 중성구 기획성 세포사멸은 정상보다 줄어 기존의 연구결과와 같았으나, 내독소 투여시 정

상보다 오히려 줄어드는 상반된 결과를 보였다. 하지만 실제 중증 감염 시 감염부위의 백혈구 수는 현저히 증가하고 이로 인한 과도한 독성 물질의 분비로 더욱 심한 손상을 유발한다고 알려져 있기 때문에³ 기존의 실험 결과인 중성구의 기획성 세포사멸의 증가로 이를 설명하기 어렵다. 즉 본 실험 결과를 토대로 당뇨 환자에서 발생한 중증 감염시 기획성 세포사멸로 소멸되지 않은 중성구의 과다한 독성 물질로 인해 더욱 심한 조직 내 손상을 초래할 것을 예상할 수 있겠다.

중성구에 내독소, fMLP, PMA 등으로 자극하면 활성 산소의 활성도가 증가한다는 보고가 많지만, 당뇨 환자에서는 감소를 보인다고 한다^{24,25}. 또한 기획성 세포사멸의 기전으로 활성 산소에 대한 연관성을 보고하고 있다^{14,15}. 기존의 실험 결과와는 달리 본 실험에서는 내독소 투여 후 정상과 당뇨에 따른 활성 산소 분비의 차이를 보이지 않았다. 물론 당뇨에 내독소를 가하면 활성 산소의 분비능이 상쇄됐을 것으로 생각할 수 있으나 정상에서 내독소를 가하면 활성이 증가해야 하는데 본 실험에서는 다른 결과를 보였다. 실제 활성 산소는 매우 불안하고 쉽게 과 반응을 유발하여 직접 생물학적 체계에서는 측정하기 매우 어려워 측정 방법의 대부분은 반응 물질의 산화 반응을 기초로 한 간접 측정 방법을 이용하고 있다³¹. 많은 실험에서 사용하는 horseradish-peroxidase를 이용한 방법은 세포의 과산화수소를 측정하는 방법으로 반응 물질의 과 반응을 유발하여 높은 민감도와 특이도를 보이거나 산도에 따른 영향이 크다고 한다³². 기존의 실험 방법의 단점을 보완한 새로운 방법을 이용하여 활성 산소 분비능을 측정해 볼 필요성이 있겠다.

결론적으로 당뇨에서 중성구 기획성 세포사멸은 정상보다 감소하였고 내독소 투여로 더욱 감소하는 결과를 보여, 중증 감염에 중요한 세포인 중성구가 당뇨 환자에서는 기획성 세포사멸을 통해 소멸되지 않아 그로 인해 조직 내 손상을 가중시킬 것을 예상할 수 있었다.

요 약

배 경 :

세균 감염 시 이환율과 사망률이 증가한다고 알려

져 있는 당뇨에서 염증 조직 내 활성 산소 기능과 세균감소를 보이는 중성구의 기능 이상이 잘 알려져 있다. 또한, 기획성 세포사멸이 중성구 제거에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 중성구의 기획성 세포사멸은 염증 조직 내 균형을 유지하는 데 중요하다. 실제 당뇨병에서 중성구의 기획성 세포사멸과 활성 산소에 대한 연구가 없는 실정으로 본 연구를 통해 당뇨에서 내독소 투여시 중성구의 기획성 세포사멸과 과산화수소 분비능을 알고자 하였다.

방 법 :

정상과 당뇨 환자의 전혈을 뽑아 중성구만을 추출하여 내독소에 노출시킨 후 중성구의 기획성 세포사멸, 과산화수소 분비능, 생존율을 각각 측정하였다.

결 과 :

정상 중성구는 내독소 투여 후 기획성 세포사멸이 감소하는 경향을 보였다. 정상과 비교할 때 당뇨환자의 중성구는 기획성 세포사멸이 감소하였고 특히 내독소를 투여한 군에서 더욱 감소하였다. 과산화수소 분비능의 차이는 보이지 않았다.

결 론 :

본 연구를 통해 당뇨환자에서 내독소 투여로 인한 중성구의 기획성 세포사멸 감소가 당뇨에서 중증 감염과 높은 사망률에 영향을 줄 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Cochrane CG. Immunologic tissue injury mediated by neutrophilic leukocytes. *Adv Immunol.* 1968;9:97-162
2. Henson PM, Johnston RB Jr. Tissue injury in inflammation: oxidants, proteinases and cationic proteins. *J Clin Invest.* 1987;79:669-74
3. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 1989;320:365-76
4. Savill JS, Wyllie AH, Henson JE, Walport MJ, Henson PM, and Haslett C. Macrophage phagocytosis of aging neutrophils in inflammation: programmed cell death in the neutrophil leads to recognition by macrophages. *J Clin Invest* 1989;83:865-75
5. Dransfield I, Stocks SC, Haslett C. Regulation of cell adhesion molecule expression and function associated with neutrophil apoptosis. *Blood* 1995;85: 3264-73
6. Haslett C, Savill JS, Whyte MK, Stern M, Dransfield I, Meagher LC. Granulocyte apoptosis and the control

- of inflammation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1994;345:327-33
7. Colotta F, ReF Polentarutti N, Sozzani S, Montobani A. Modulation of granulocyte survival and programmed cell death by cytokines and bacterial products. *Blood* 1992;80:2012-20
8. Brach MA, deVos S, Gruss HJ, Herrmann F. Prolongation of survival of human polymorphonuclear neutrophils by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor is caused by inhibition of programmed cell death. *Blood* 1992;80:2920-4
9. Yamamoto C, Yoshida S, Taniguchi H Qin MH, Miyamoto H, Mizuguchi H. Lipopolysaccharide and granulocyte colony-stimulating factor delay neutrophil apoptosis and ingestion by guinea pig macrophages. *Infect Immun* 1993;61:1972-9
10. Pericle F, Liu JH, Diaz JI, Blanchard DK, Wei S, Forni G, Djeu JY. Interleukin-2 prevention of apoptosis in human neutrophils. *Eur J Immunol* 1994; 24:440-4
11. Hachiya O, Takeda Y, Miyata H, Watanabe H, Yamashita T, Sendo F. Inhibition by bacterial lipopolysaccharide of spontaneous and TNF- α -induced human neutrophil apoptosis in vitro. *Microbiol Immunol* 1995;39:715-23
12. Haslett C. Resolution of acute inflammation and the role of apoptosis in the tissue fate of granulocytes. *Clin Sci* 1992;83:639-48
13. Biffl WL, Moore EE, Moore FA, Barnett CC Jr. Interleukin-6 suppression of neutrophil apoptosis is neutrophil concentration dependent. *J Leukoc Biol* 1995;58:582-4
14. Riley PA. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 1994;65:27-33
15. Lennon SV, Martin SJ, Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 1991;24:203-14
16. Larkin JG, Frier BM, Ireland JT. Diabetes mellitus and Infection. *Postgrad Med J* 1985;61:233-7
17. Murphy DP, Tan JS, File TM Jr. Infectious complications in diabetic patients. *Primary Care* 1981; 8:695-714
18. Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias CH, Smith H. Infection and diabetes: the case for glucose control. *Am J Med* 1982;72:439-50
19. Wheat LJ. Infection and diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1980;3:187-97
20. Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1974;23:9-15
21. Bagdade JD, Stewart M, Walters E. Impaired

- granulocyte adherence: a reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes* 1978;27:677-81
22. Marhoffer W, Stein M, Maeser E, Federhn K. Impaired of polymorphonuclear leukocyte function and metabolic control of diabetes. *Diabetes Care* 1992;15: 256-60
 23. Glowacka E, Banasik M, Lewkowicz P, Tchorzewski H. The effect of LPS on neutrophils from patients with high risk of type I diabetes mellitus in relation to IL-8, IL-10 and IL-12 production and apoptosis in Vitro. *Scand J Immunol* 2002;55:210-7
 24. Shah SV, Wallin JD, Eilen SD. Chemiluminescence and superoxide anion production by leucocytes from diabetic patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1983;57: 402-9
 25. Nielson CP, Hindson DA. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. *Diabetes* 1989;38: 1031-5
 26. Hebert MJ, Takano T, Holthofer H, Brady HR. Sequential morphologic events during apoptosis of human neutrophils. Modulation by lipoxygenase-derived eicosanoids. *J Immunol* 1996;157:3105-15
 27. Brown SB, Bailey K, Savill J. Actin is cleaved during constitutive apoptosis. *Biochem J* 1997;323:233-7
 28. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Ruder JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-56
 29. Verhoven B, Krahlings S, Schlegel RA, Williamson P. Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell Death Differ* 1999;6:262-70.
 30. Watson RW, Redmond HP, Wang JH, Condron C, Bouchier-Hayes D. Neutrophils undergo apoptosis following ingestion of *Escherichia coli*. *The Journal of Immunol* 1996;156:3986-92
 31. Victor JT, Barry LF. Reactive oxygen species in cell signaling. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L1005-28
 32. Panus PC, Radi R, Chumley PH, Lillurd RH, Freeman BA. Detection of H₂O₂ release from vascular endothelial cells. *Free Radic Biol Med* 1993;14:217-23
-