

Zusammenarbeit von Klinik  
und Klinischer Chemie

---

# Pathobiochemie der Entzündung

Herausgeber

H. Lang · H. Greiling

Mit 107 Abbildungen und 24 Tabellen

Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie  
Merck-Symposium 1983

---

Springer-Verlag Berlin · Heidelberg · New York · Tokyo · 1984

6808538

Dr. HERMANN LANG, Biochemische Forschung E. Merck, Darmstadt

Prof. Dr. Dr. HELMUT GREILING

Lehrstuhl für Klinische Chemie und Pathobiochemie

Klinisch-Chemisches Zentrallaboratorium, Medizinische Fakultät der RWTH, Aachen

Merck-Symposium  
der Deutschen Gesellschaft für Klinische Chemie  
Bonn, 5.-7. Mai 1983  
Leitung: H. GREILING

Universitäts-  
Bibliothek  
München

GH 84/494

ISBN 3-540-13533-2 Springer-Verlag Berlin · Heidelberg · New York · Tokyo  
ISBN 0-387-13533-2 Springer-Verlag New York · Heidelberg · Berlin · Tokyo

CIP-Kurztitelaufnahme der Deutschen Bibliothek

Pathobiochemie der Entzündung : [Bonn, 5. - 7. Mai 1983] / Dt. Ges. für Klin. Chemie.  
Hrsg. H. Lang ; H. Greiling. [Leitung: H. Greiling]. - Berlin ; Heidelberg ; New York ; Tokyo :  
Springer, 1984. (Merck-Symposium ; 7) (Zusammenarbeit von Klinik und klinischer Chemie)  
ISBN 3-540-13533-2 (Berlin...) ISBN 0-387-13533-2 (New York...)

NE: Lang, Hermann [Hrsg.]; Deutsche Gesell-

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdruckes, der Entnahme von Abbildungen, der Funksendung, der Wiedergabe auf photomechanischem oder ähnlichem Wege und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten.

Die Vergütungsansprüche des § 54, Abs. 2 UrhG werden durch die ‚Verwertungsgesellschaft Wort‘, München, wahrgenommen.

© by Springer-Verlag Berlin · Heidelberg 1984

Printed in Germany

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Produkthaftung: Für Angaben über Dosierungsanweisungen und Applikationsformen kann vom Verlag keine Gewähr übernommen werden. Derartige Angaben müssen vom jeweiligen Anwender im Einzelfall anhand anderer Literaturstellen auf ihre Richtigkeit überprüft werden.

Offsetdruck und Bindearbeiten: Beltz Offsetdruck, Hemsbach Bergstr.

2127/3130-543210

# Inhaltsverzeichnis

Einführung	
H. LANG (Mit 4 Abbildungen).....	1
<hr/>	
Erste Sitzung	Moderator: W.G. GUDER
<hr/>	
Klinische Befunde und klinisch-experimentelle Untersuchungen zur Pathogenese entzündlicher Erkrankungen	
J.R. KALDEN (Mit 3 Abbildungen).....	9
Diskussion.....	20
Komplement und zelluläre Interaktion	
U. ROTHER und K. ROTHER (Mit 9 Abbildungen).....	26
Diskussion.....	38
Prostaglandine, Entzündungen und die Wirkung antiphlogistischer Analgetika	
K. BRUNE (Mit 9 Abbildungen).....	47
Diskussion (Mit 1 Abbildung).....	64
Zweite Sitzung	Moderator: I. TRAUTSCHOLD
<hr/>	
Lysosomale Proteinase als Mediatoren der unspezifischen Proteolyse bei der Entzündung	
H. FRITZ, M. JOCHUM, K.-H. DUSWALD, H. DITTMER u. H. KORTMANN (Mit 12 Abbildungen).....	75
Granulocyten-Elastase als Marker für entzündliche Prozesse	
S. NEUMANN (Mit 5 Abbildungen).....	94
Diskussion.....	102
Reaktive Veränderungen der Hämostase bei der Entzündung	
I. WITT (Mit 8 Abbildungen).....	110
<u>Eingeladene Diskussionsbemerkung</u>	
Reaktionsmuster von Gerinnungsfaktoren bei Krankheiten mit akut-entzündlichen Veränderungen	
T.H. SCHÖNDORF (Mit 6 Abbildungen).....	125

Diskussion.....	130
Entzündungsprozesse in der formalen Pathogenese von Lungenfibrosen	
U.N. RIEDE (Mit 4 Abbildungen).....	138
Diskussion.....	146
Dritte Sitzung	Moderator: H. MATTENHEIMER
<hr/>	
Pathobiochemische Prozesse bei entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems und deren Nachweis in der Cerebrospinalflüssigkeit	
H. REIBER (Mit 14 Abbildungen).....	153
Liquordiagnostik bei akuten entzündlichen Erkrankungen des Zentralnervensystems	
T.O. KLEINE (Mit 5 Abbildungen).....	176
<u>Eingeladene Diskussionsbemerkung</u>	
Schrankenkonzept und humorale Interaktion im Gewebe	
K. FELGENHAUER (Mit 9 Abbildungen).....	188
Diskussion.....	197
Pathobiochemische Mechanismen bei chronisch-entzündlichen Gelenkerkrankungen	
K. KLEESIEK, D. BRACKERTZ und H. GREILING (Mit 15 Abbildungen).....	203
<u>Eingeladene Diskussionsbemerkung</u>	
Interaktion von Entzündungen und der Pathogenese von Stoffwechselkrankheiten	
M. DOSS.....	226
Diskussion.....	228
Zusammenfassung	
H. GREILING (Mit 2 Abbildungen).....	238

# Lysosomale Proteinasen als Mediatoren der unspezifischen Proteolyse bei der Entzündung

H. Fritz, M. Jochum, K.-H. Duswald<sup>1</sup>, H. Dittmer<sup>2</sup> und H. Kortmann<sup>2</sup>

## Einleitung

Schwere Verletzungen oder Infektionen werden von einer Reihe von Entzündungsreaktionen begleitet, der sog. Entzündungsantwort (inflammatory response) des Organismus. Diese beinhaltet: 1. Die Aktivierung humoraler Systeme wie Gerinnung, Fibrinolyse, Komplement- und Kallikrein-Kinin-Kaskaden und 2. die Stimulierung der sog. Entzündungszellen, insbes. von Phagozyten, Mastzellen und Lymphozyten, aber auch von Streßhormone produzierenden Zellen. Bei der Aktivierung humoraler Systeme gebildete Faktoren sind oft potente Stimulatoren der Entzündungszellen und von diesen produzierte oder freigesetzte Faktoren können ihrerseits humorale Systeme aktivieren. Die bei der Entzündungsantwort initiierten Reparatonsmechanismen stellen offensichtlich ein sehr komplexes Geschehen mit den vielfältigsten Beziehungen zwischen den verschiedenen Systemen des Organismus dar [1].

## Lysosomale Proteinasen

### Physiologische und pathobiochemische Aspekte

Im Mittelpunkt dieses Berichtes stehen mögliche Pathomechanismen, die durch lysosomale Proteinasen verursacht werden können, wenn diese während der Entzündungsantwort extrazellulär freigesetzt werden. Phagozyten wie z.B. die polymorphkernigen Granulozyten und Makrophagen enthalten eine große Zahl von Lysosomen, die mit einem hohen Potential an hydrolytischen und proteolytischen Enzymen ausgestattet sind [2]. Normalerweise benützen die Phagozyten diese Enzymausstattung sowie zusätzlich oxidierende Agentien, die bei der Phagozytosestimulierung gebildet werden, im wesentlichen für zwei Funktionen: 1. für den intrazellulären Proteinkatabolismus, d.h. den Abbau verbrauchter endogener Substanzen des Organismus sowohl intra- als auch extrazellulären Ursprungs und 2. zur Abwehr invasiver Organismen, d.h. die Inaktivierung phagozytierter Viren und Bakterien. Die lysosomalen Enzyme erfüllen demnach ihre physiologische Funktion *innerhalb* der Zelle in den Phagolysosomen.

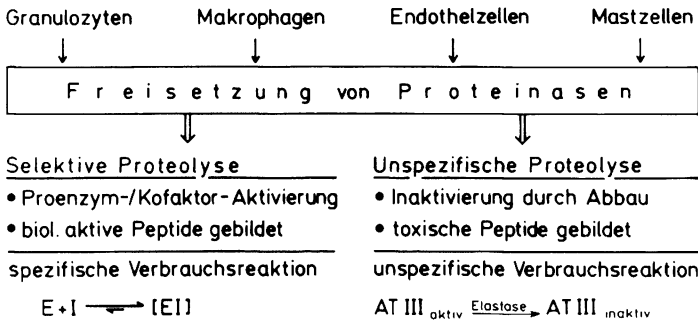
---

<sup>1</sup> Chirurgische Klinik Innenstadt der Universität München

<sup>2</sup> Chirurgische Klinik im Klinikum Großhadern der Universität München

Entkommen lysosomale Enzyme im Verlaufe einer Entzündung in das extrazelluläre Milieu, so können sie die Entzündungsantwort des Organismus auf zweierlei Wegen verstärken (Abb. 1):  
 1. Durch selektive Proteolyse werden Proenzyme und Kofaktoren aktiviert sowie biologisch hochaktive Proenzyme und Kofaktoren aktiviert sowie biologisch hochaktive Polypeptide wie Kinine und Anaphylatoxine gebildet; die aktiven Enzyme werden dann durch spezifische Interaktionen mit ihren natürlichen Inhibitoren gehemmt und als inaktive Enzym-Inhibitor-Komplexe eliminiert. Diesen Vorgängen liegen Reaktionsmechanismen von hoher Selektivität zu Grunde, so daß man von einem *spezifischen* Verbrauch der Faktoren der Gerinnungs-, Fibrinolyse-, Komplement- und Kallikrein-Kinin-Systeme sprechen kann. - 2. Durch unspezifische Proteolyse, d.h. durch einfache Verdauung werden lösliche Faktoren (z.B. Antithrombin III) oder Strukturproteine inaktiviert bzw. zerstört [4-8]. Solch *unspezifische* Verbrauchsreaktionen können ebenfalls von der Bildung toxischer Polypeptide begleitet sein; ein Beispiel dafür sind die gerinnungshemmenden Fibrin(ogen)-Spaltprodukte [9].

Klinisch steht bei Patienten mit schweren Entzündungen und Polytraumen das Organversagen bei Lunge, Leber und Niere im Vordergrund. Es ist dabei auffallend, daß die genannten Organe besonders reich an Zellen mit hohem Lysosomengehalt sind. Dazu gehören die Endothelzellen, Mastzellen, Fibroblasten und Makrophagen, sowie die polymorphkernigen Granulozyten, die während einer massiven Entzündungsantwort rasch in der Lunge akkumulieren. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der klinisch beobachtbaren Reihenfolge des Organversagens (Lunge>Leber>Niere) und der organständigen lysosomalen Verdauungskapazität ist deshalb unseres Erachtens ernstlich in Erwägung zu ziehen.



**Abb. 1.** Schematische Darstellung der Freisetzung lysosomaler Proteinase aus verschiedenen Körperzellen und der dadurch gegebenen Reaktionsmöglichkeiten. *E* = Enzym; *I* = Inhibitor; *EI* = Enzym-Inhibitor-Komplex; *AT III* = Antithrombin III

Von den bislang bekannten lysosomalen Enzymen kommt den neutralen Proteinase der polymorphkernigen Granulozyten (Neutrophilen), Elastase und Cathepsin G, besondere Bedeutung zu. Sie werden analog wie die "sauren" Cystein- (Cathepsin B, H, L) und Aspartat-Proteinase (Cathepsin D, E) in voll aktiver Form in den Lysosomen gespeichert. Beide, die Elastase und das Chymo-

trypsinähnliche Cathepsin G, besitzen eine nahezu unbegrenzte Spaltspezifität [3, 10] und sind deshalb imstande, zahlreiche humorale Faktoren einschließlich von Proteinaseinhibitoren [4, 11] durch Verdauung zu inaktivieren; sie zerstören aber auch native Elastin- [6] und Kollagenfasern vom Typ III und IV unter physiologischen Bedingungen (pH, etc.) (Tabelle 1). Die hohe Syntheserate von über 1 g neutraler Leukozytenproteinase pro Tag beim Menschen ist ein augenscheinliches Indiz für die effektive lysosomale Verdauungskapazität des Organismus.

Tabelle 1. Natürliche Substrate neutraler Proteinase aus polymorphkernigen Granulozyten

Proteinase <sup>a</sup>	Biologische Substrate
Elastase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Elastin, Kollagen III + IV, Proteoglykane, Fibronectin</li> <li>• Komplement-Faktoren (C3 + C5) + Immunglobuline</li> <li>• Protein-Inhibitoren (AT III, <math>\alpha_2</math> PI, C1 INA; ITI)</li> <li>• Transportproteine (Transferrin + Präalbumin)</li> </ul>
Kathepsin G	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kollagen I + II, Proteoglykane, Fibronectin</li> <li>• Gerinnungs- + Komplement-Faktoren</li> </ul>
Kollagenase	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kollagen I + II + III</li> </ul>

<sup>a</sup> > 1 g Umsatz/ Tag

AT III = Antithrombin III;  $\alpha_2$ PI =  $\alpha_2$ -Plasmininhibitor; C1 INA = C1-Inaktivator; ITI = Inter- $\alpha$ -trypsininhibitor

### Proteinase-Inhibitoren des Plasmas

#### Funktionelle Bedeutung und Interaktionen

Die Wirksamkeit lysosomaler Proteinase wird innerhalb der Zelle begrenzt durch deren Assemblierung in den von Membranen umschlossenen Lysosomen und Phago-lysosomen und, in geringerem Maße durch Proteinaseinhibitoren zytosolischer Herkunft [12].

Extrazellulär freigesetzte lysosomale Proteinase stehen einem potenten Hemmstoffpool gegenüber [13].  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ M) inhibitiert effektiv Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteinase; aufgrund seines hohen Molekulargewichts ist die Wirksamkeit allerdings normalerweise auf das Gefäßsystem beschränkt.  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor ( $\alpha_1$ PI; früher auch  $\alpha_1$ -Antitrypsin genannt), der wichtigste Hemmstoff der lysosomalen Elastase aus Neutrophilen, kommt in hoher Konzentration im Blut vor, man findet ihn aber auch in beträchtlicher Menge in der interstitiellen Flüssigkeit und in mukösen Sekreten.  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin ( $\alpha_1$ AC), ein sehr rasch reagierendes Akutphasenprotein mit Maximalspiegeln bis zum Sechsfachen der Norm, ist ein

potenter Inhibitor des Cathepsin G aus Neutrophilen und der Chymase aus Mastzellen. Die Konzentration von  $\alpha_1$ PI und  $\alpha_1$ AC im Plasma sind mit Abstand höher als die der anderen bekannten Proteinaseinhibitoren [13]. Insgesamt stellen die Proteinaseinhibitoren die drittgrößte Gruppe an Plasmafaktoren; sieht man von Albumin und den Immunglobulinen ab, so sind über 60% der verbleibenden Proteine Inhibitoren für Proteinasen. Dies kann als ein indirekter Hinweis für die eminente Bedeutung von Proteinaseinhibitoren zur Regulation der Proteinaseaktivitäten des Organismus gewertet werden.

Die Beziehungen zwischen den bekannten plasmatischen Proteinaseinhibitoren und ihren natürlichen Zielenzymen sind in Abb. 2 schematisch dargestellt. Eine überschießende Aktivierung der humoralen Systeme des Blutes (Blutsysteme) wird vorwiegend durch drei Inhibitoren verhindert: Antithrombin III (AT III) reguliert die Gerinnung, der  $\alpha_2$ -Plasmininhibitor ( $\alpha_2$ PI) die Fibrinolyse, der C1-Inaktivator (C1 INA) sowohl die Komplementaktivierung über den klassischen Weg als auch die endogene (intrinsische) Gerinnungskaskade, letzteres durch Hemmung des Plasma-Kallikreins und Hagemanfaktors bzw. des Hagemanfaktor-Fragments der Molekülmasse von 28 000 Dalton.

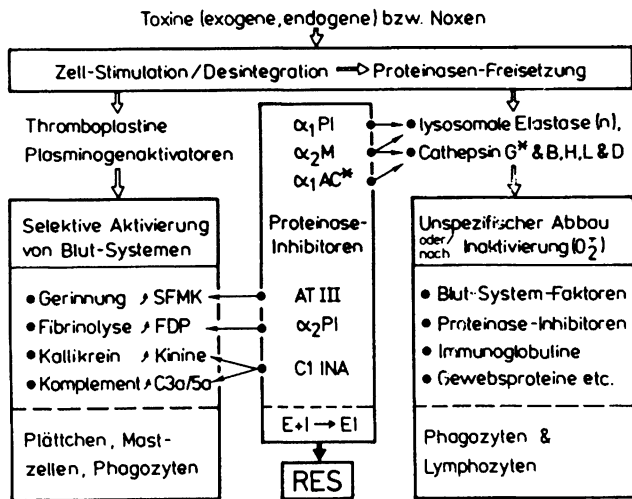


Abb. 2. Aktivierungs- und Verbrauchsreaktionen, die durch bei Stimulation oder Desintegration von Zellen freigesetzte Proteinasen verursacht werden. Systemspezifische Proteinasen (z.B. Thromboplastinase und Plasminogenaktivatoren) lösen die Aktivierung der Blutsystemkaskaden aus, wobei auch biologisch hochaktive Polypeptide gebildet werden, z.B. lösliche Fibrinmonomer-Komplexe (SFMK), Fibrin (ogen)splaltprodukte, Kinine und Anaphylatoxine (C3a und C5a), vgl. den linken Teil.

Inaktivierung durch unspezifischen Abbau von Plasmafaktoren wird verursacht durch lysosomale Proteinasen, Inaktivierung durch oxidative Denaturierung durch Sauerstoffradikale etc. aus den Phagolysosomen; dabei können ebenfalls toxische Polypeptide gebildet werden (vgl. den rechten Teil).

Letztlich reagieren die aktivierten bzw. freigesetzten Proteinasen (E) mit ihren Inhibitoren (I), z.B. mit  $\alpha_1$ PI ( $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor),  $\alpha_2$ M ( $\alpha_2$ -Makroglobulin),  $\alpha_1$ AC ( $\alpha_1$ -Antichymotrypsin), AT III (Antithrombin III),  $\alpha_2$ PI ( $\alpha_2$ -Plasmininhibitor) und C1 INA (C1-Inaktivator) zu inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplexen [EI], die dann durch Phagozyten des retikuloendothelialen Systems (RES) eliminiert werden, vgl. den mittleren Teil



Das Vorkommen von Komplexen des  $\alpha_2M$  mit Plasma-Kallikrein und Plasmin im Plasma unter bestimmten pathologischen Bedingungen läßt vermuten, daß dieses multifunktionelle Glykoprotein auch an der Regulation der Blutsystem-Kaskaden beteiligt ist. Aufgrund neuerer Erkenntnisse können wir jedoch derzeit davon ausgehen, daß die Funktion des  $\alpha_2M$  vorwiegend in einem Schutz des Organismus vor unspezifischer Proteolyse durch lysosomale Proteinase aller Klassen zu sehen ist. Dies betrifft sowohl die neutralen Proteinase Elastase und Cathepsin G als auch die sauren Cystein- bzw. Thiol-Proteinase Cathepsin B, H, L, die saure Aspartat-Proteinase Cathepsin D und neutrale Metalloenzyme wie die Collagenase.  $\alpha_2M$  ist auch der potenteste Inhibitor der pankreatischen Trypsine, die bei lokaler oder systemischer Freisetzung pathobiochemisch besonders effektiv sind: Sie können die Blutsystem-Kaskaden aktivieren, durch selektive Proteolyse Kinine freisetzen, verschiedene humorale und strukturelle Faktoren durch Verdauung inaktivieren und dabei zusätzlich toxische Peptide produzieren. Bemerkenswerterweise ist das  $\alpha_2M$  beim Menschen kein Akutphasenprotein, im Gegensatz zu  $\alpha_1PI$  und  $\alpha_1AC$ .  $\alpha_1PI$  hemmt außer der Elastase aus Neutrophilen auch sehr effektiv die Elastase und das Chymotrypsin des Pankreas sowie bakterielle Elastasen.  $\alpha_1AC$  hemmt außer dem pankreatischen Chymotrypsin zusätzlich die Chymase aus Mastzellen und Cathepsin G aus Neutrophilen [13].

Die Hemmung aktivierter oder liberierter Proteinase durch die genannten Inhibitoren hat zur Folge, daß auch die Bildung vasoaktiver und toxischer Peptide wie der Kinine und Anaphylatoxine verhindert wird, ebenso die Proteinase-induzierte Stimulierung von Entzündungszellen wie z.B. die Thrombin-induzierte Plättchenaggregation sowie die durch Anaphylatoxine bewirkte Chemotaxis von Granulozyten.

Die genannten plasmatischen Proteinaseinhibitoren bilden prinzipiell äquimolare Komplexe mit ihren Zielenzymen, in denen die katalytische Aktivität der Proteinase praktisch irreversibel blockiert ist.  $\alpha_2M$  stellt insofern eine Ausnahme dar, als es bis zu zwei Enzymmoleküle pro Inhibitormolekül binden kann und die resultierenden Komplexe Polypeptidsubstrate mit Molekülmassen unter etwa 10 000 Dalton noch zu hydrolisieren vermögen [14, 15]. Sobald jedoch der Enzym-Inhibitor-Komplex gebildet ist, wird er rasch durch das retikuloendotheliale System (RES) eliminiert [16].

#### Verbrauch durch lysosomale Faktoren

Die Schwächung des Hemmstoffpotentials für Proteinase durch unspezifische Proteolyse zählt zu den bemerkenswertesten pathologischen Effekten, die durch lysosomale Proteinase verursacht werden können. Antithrombin III wird z.B. durch katalytische Mengen der Elastase aus Neutrophilen rasch inaktiviert [4]. Ähnliches gilt für den  $\alpha_2$ -Plasmainhibitor und den C1 Inaktivator [11]. Selbst der  $\alpha_1PI$  wird durch eine Metalloproteinase aus Makrophagen, lysosomales Cathepsin B und eine bakterielle Elastase inaktiviert [13, 17]. Darüberhinaus führt die Oxidation

des Methioninrestes im reaktiven Zentrum des  $\alpha_1$ PI zu einer signifikanten Verringerung der Affinität des Inhibitors zur neutrophilen Elastase [18]. Derart oxidierende Agentien wie z.B. Superoxidanionradikale, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Myeloperoxidase werden in großer Menge in den Phagolysosomen produziert, um dort den Abbau von phagozytiertem Material einschließlich invasiver Organismen zu forcieren. Die Sauerstoffradikale etc. dürften zusammen mit den lysosomalen Enzymen unter den diskutierten pathologischen Bedingungen extrazellulär freigesetzt bzw. wirksam werden [3].

Proteinaseinhibitoren können demnach nach schweren Verletzungen oder Infektionen auf dreierlei Wegen verbraucht werden: 1. durch Komplexbildung mit liberierten lysosomalen und aktivierten plasmatischen Proteinase, 2. durch unspezifischen proteolytischen Abbau und 3. durch oxidative Denaturierung. Der letztgenannte Mechanismus ist für die pathologische Wirksamkeit der Neutrophilen-Elastase von besonderer Bedeutung. Obwohl der oxidierte  $\alpha_1$ PI mit der Neutrophilen-Elastase noch langsam zu reagieren vermag, wird der gebildete Komplex durch Substrate mit hoher Affinität zur Elastase, wie es z.B. das Elastin darstellt, wieder rasch dissoziiert; dies bedeutet, daß der oxidierte Inhibitor die Verdauung natürlicher Substrate durch die Elastase nicht zu verhindern vermag. Pankreatische Elastase wird im Gegensatz zur Neutrophilen-Elastase durch den oxidierten  $\alpha_1$ PI nicht gehemmt, s. Abbildung 3.

### Oxidation und Proteolyse

(Met-Rest (e) in  $\alpha_1$ PI oxidiert zu Met-sulfoxid)

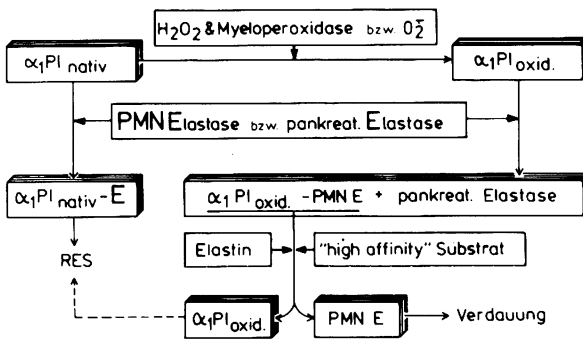


Abb. 3. Affinität von nativem und oxidiertem  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor ( $\alpha_1$ PI) zu Elastase (E) aus polymorphkernigen Granulozyten (PMN Elastase) und aus Pankreas. Der oxidierte  $\alpha_1$ PI ( $\alpha_1$ PI<sub>oxid</sub>) reagiert wesentlich langsamer (ca. 2000 mal) mit der PMN Elastase als nativer  $\alpha_1$ PI. Außerdem wird der Komplex der Elastase mit  $\alpha_1$ PI<sub>oxid</sub> durch Substrate mit hoher Affinität zu PMN Elastase wieder dissoziiert, so daß das Enzym wieder verdauen kann.  $\alpha_1$ PI<sub>oxid</sub> bildet keinen Komplex mit pankreatischer Elastase

## Freisetzungsmechanismen und Messung liberierter Proteinasen

Von Bedeutung ist in diesem Zusammenhang auch die Frage nach den Mechanismen, die für eine mehr oder weniger starke Freisetzung lysosomaler Faktoren aus der Zelle verantwortlich sind [3, 19]. Während bei einer "normalen" Phagozytose nur relativ geringe Mengen in das umgebende Milieu entkommen sollten, dürften relativ große Mengen während der sog. frustranen Phagozytose dorthin abgegeben werden; in diesem Falle versucht der Phagozyt erfolglos ein für seine Verhältnisse zu großes strukturelles Element, z.B. eine Plasmamembran oder ein Stück Knorpelsubstanz, einzuverleiben. Endogene oder exogene Endotoxine können, evtl. unter Mithilfe des Komplementsystems, eine Desintegration von Phagozyten bewirken, was mit der Freisetzung des gesamten Inhalts der Lysosomen und Phagolysosomen in das umgebende Milieu verbunden ist.

### Nachweis der liberierten Neutrophilen-Elastase

Aus Neutrophilen freigesetzte Elastase (E) ist in der Zirkulation primär in Form des E- $\alpha_1$ PI-Komplexes nachweisbar. Eine geringe Menge (ca. 10% der Elastase wird zwar auch an  $\alpha_2$ M gebunden, die Elimination dieses Komplexes aus der Zirkulation erfolgt jedoch sehr viel rascher ( $t_{1/2}$  10 min) als die des E- $\alpha_1$ PI-Komplexes ( $t_{1/2}$  1 h), so daß zur Erfassung des E- $\alpha_2$ M-Komplexes Verfahren mit extremer Empfindlichkeit erforderlich sind [16]. In lokalen Ergüssen wie der Synovialflüssigkeit kann sich der E- $\alpha_2$ M-Komplex dagegen u.U. stark anreichern, da er dort sehr viel langsamer eliminiert wird [20].

Die Bestimmung des E- $\alpha_1$ PI-Komplexes im Rahmen unserer klinischen Studien wurde mittels eines Enzymimmunoassays durchgeführt, den Herr NEUMANN im folgenden Referat vorstellen wird.

### Klinische Studien

#### Elastasefreisetzung nach ausgedehnten Operationen und bei Sepsis

In unserer ersten prospektiven klinischen Studie wurden die E- $\alpha_1$ PI-Spiegel bei mehr als 120 Patienten, die sich einem ausgedehnten abdominalchirurgischen Eingriff unterziehen mußten, über einen längeren Zeitraum hinweg verfolgt [21]. Von diesen Patienten erlitten 30 eine Sepsis, die aufgrund vorab definierter und allgemein anerkannter Kriterien diagnostiziert wurde: Eindeutig definierter primärer Infektionsherd mit positiver Kultur der invasiven Organismen, Körpertemperatur über  $38,5^{\circ}\text{C}$ , Leukozytenzahl über 15 000 oder unter 5000 pro  $\text{mm}^3$ , Plättchenzahl unter 100 000 pro  $\text{mm}^3$  oder mehr als 30 proz. Abfall unter den präoperativen Wert, positive Blutkultur. Von diesen Patienten überlebten 14 die Infektion (Gruppe B) während 16 an den

unmittelbaren Folgen der Sepsis verstarben (Gruppe C). Eine Gruppe von 11 Patienten (A) mit unkompliziertem postoperativen Heilungsverlauf diente als Kontrolle.

Die Spiegel der komplexierten Elastase gesunder Probanden und die preoperativen Werte nicht infizierter Patienten lagen unter 100 ng/ml. Das operative Trauma verursachte einen Anstieg bis zum dreifachen der Norm (s. Abb. 4). Der bereits präoperativ erhöhte Mittelwert der Gruppe C ist darauf zurückzuführen, daß hier 6 Patienten bereits vor der Operation an einer massiven Infektion litten. Der langsame Abfall des Mittelwertes dieser Gruppe nach der Operation ist wahrscheinlich durch die Entfernung des Infektionsherdes verursacht worden. Im Gegensatz zur Gruppe A beobachteten wir bei den Patienten der Gruppen B und C postoperativ mäßig erhöhte E- $\alpha_1$ PI-Spiegel für mehrere Tage. Zum Zeitpunkt der Diagnose der Sepsis stiegen diese Spiegel weiter an, im Mittel bis zum Sechsfachen der Norm bei Gruppe B und bis zum Zehnfachen bei Gruppe C. Bei Patienten beider Gruppen wurden individuelle Maximalwerte bis zu 2 500 ng/ml gemessen. Besonders interessant ist, daß bei andauernder Sepsis die E- $\alpha_1$ PI-Spiegel bis zum Eintritt des Todes hoch blieben (Gruppe C), während die parallel zur Genesung bis auf den Normbereich absanken (Gruppe B).

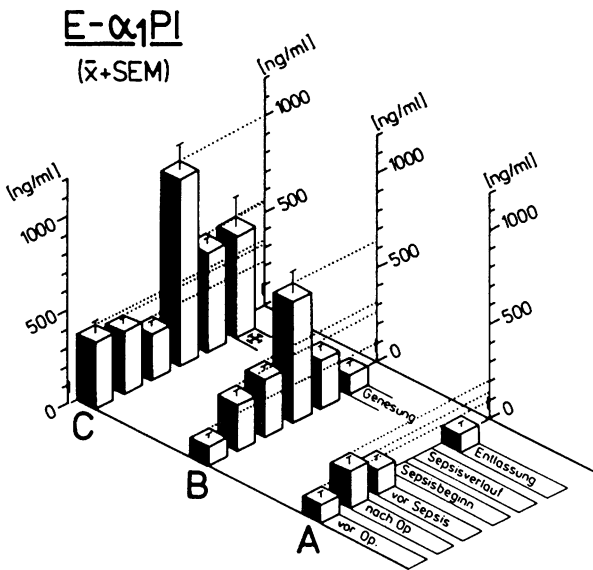


Abb. 4. Mittelwerte der Plasmaspiegel der Elastase im Komplex mit  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor (E- $\alpha_1$ PI) für Patientenkollektive vor und nach ausgedehnten abdominalchirurgischen Eingriffe. Gruppe A (n=11): Patienten ohne postoperative Infektion; Gruppe B (n=14): Patienten, die eine postoperative Sepsis überlebten; Gruppe C (n=16): Patienten, die an den Folgen einer postoperativen Sepsis verstarben. Die E- $\alpha_1$ PI-Spiegel sind wiedergegeben als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) für den Tag vor der Operation, den Tag nach der Operation, sowie für die postoperative Phase vor Eintritt einer Sepsis, zu Beginn der Sepsis und während der Sepsis. Die letzten Bestimmungen erfolgen am Tage der Entlassung bei Patienten der Gruppe A, am Tage der Genesung bei Patienten der Gruppe B und kurz vor dem Tode bei Patienten der Gruppe C. Normalbereich = 60 - 110 ng/ml

Elastasefreisetzung und Veränderungen von Plasmafaktoren einschließlich der Proteinaseinhibitoren bei der Sepsis

Zusätzlich zum E- $\alpha_1$ PI-Spiegel wurden auch solche Plasmafaktoren gemessen, die einen typischen Verlauf nach Stimulierung durch ein entzündliches Ereignis erwarten ließen.

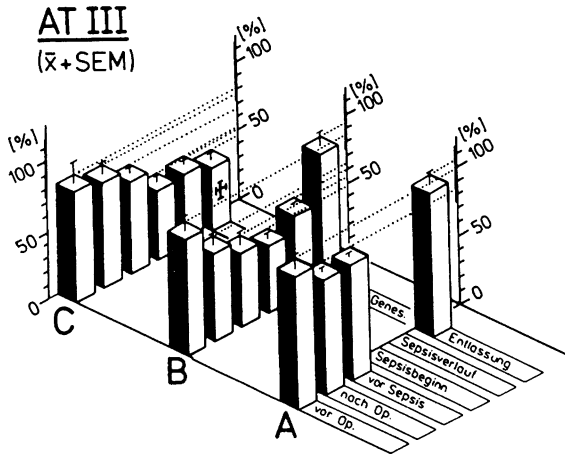


Abb. 5. Mittelwerte der Plasmaspiegel des Antithrombin III (AT III), gemessen mit einem funktionellen Test, bei Patienten mit ausgedehnten abdominalchirurgischen Eingriffen und ggfs. anschließender Sepsis. Details sind in der Legende zu Abb. 4 angegeben.

Plasmaspiegel: erhöht (↑), erniedrig (↓):  
 (↑↑) hoch-signif. (↑) signif. (n) normal

Parameter		Sepsis	Präfinal	Genesung
E- $\alpha_1$ PI Komplex	c	↑↑	↑↑	n
Antithrombin III	a	↓↓	↓↓	n
Faktor XIII	a	↓↓	↓↓	n
$\alpha_2$ -Makroglobulin	a	↓↓	↓↓	n
	c	↓↓	↓↓	n-↓
C-reactives Protein	c	↑↑	↑↑	n
$\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor	a	n-↓	n-↓	n-↓
$\alpha_2$ -Plasmininhibitor	a	n	n	n
$\alpha_1$ -Antichymotrypsin	c	↑	n	n
C1 Inaktivator	a	n-↓	n	n-↓
	c	n	n	n

Abb. 6. Beziehungen zwischen den Konzentrationen des Elastase- $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor-Komplexes (E- $\alpha_1$ PI) und denen anderer Plasmafaktoren bei Patienten mit ausgedehnten abdominalchirurgischen Eingriffen und anschließender Sepsis. Hochsignifikant erhöhte Plasmaspiegel des E- $\alpha_1$ -PI und C-reaktiven Proteins (unspezifisches Akutphasenprotein) sind korreliert mit einem hochsignifikanten Verbrauch von Antithrombin III, Faktor XIII und  $\alpha_2$ -Makroglobulin während der Sepsis und präfinal; die Plasmakonzentrationen der genannten Faktoren normalisierten sich bei allen Patienten, die die Infektion überlebten. Die weiteren angeführten Proteinaseinhibitoren ( $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor,  $\alpha_2$ -Plasmainhibitor,  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin und C1-Inaktivator), die alle Akutphasenproteine darstellen, zeigten normale oder mäßig erhöhte Plasmaspiegel

<sup>a</sup> Aktivitätstest <sup>c</sup> Konzentrationsbestimmung (immun.)

Die Aktivität von Antithrombin III, des wichtigsten regulatorischen Inhibitorproteins der Gerinnungskaskade, zeigte ein dem E- $\alpha_1$ PI-Spiegel diametral entgegengesetztes Verlaufsmuster (Abb. 5). Besonders zu Beginn und während der Sepsis wurden so niedrige AT III-Spiegel erreicht, daß aus klinischer Sicht ein erhebliches Risiko für eine Hyperkoagulopathie bzw. disseminierte intravasculäre Gerinnung (DIC) gegeben war. Dem AT III analoge Verlaufsmuster wurden auch für  $\alpha_2$ M und den fibrinstabilisierenden Faktor XIII gefunden (Abb. 6), die detaillierten Ergebnisse finden sich bei [21].

Der massive Verbrauch des  $\alpha_2$ M und AT III sowie der Trägeruntereinheit des Faktor XIII - einem sensitiven Substrat der lysosomalen Elastase - neben seiner enzymatischen Untereinheit reflektiert die gestörte Hämostase der verschiedenen Blutsysteme bei der Sepsis. Die parallel dazu stark erhöhten E- $\alpha_1$ PI-Spiegel legen die Vermutung nahe, daß freigesetzte lysosomale Proteinase an der Störung der Hämostase der Blutsystemkaskaden wesentlich beteiligt sind, und zwar vorwiegend durch den übermäßigen Verbrauch regulatorisch wirksamer Proteinaseinhibitoren.

Interessanterweise veränderten sich die Plasmaspiegel von  $\alpha_1$ PI,  $\alpha_2$ PI,  $\alpha_1$ AC und C1 INA weder zu Beginn noch während der Sepsis in auffallender Weise (Abb. 6). Diese Inhibitorproteine sind, im Gegensatz zu AT III und  $\alpha_2$ M, bekanntermaßen Akutphasenproteine. Deshalb steigt ihre Syntheserate infolge des durch das operative Trauma oder die Sepsis ausgelösten Entzündungsreizes beträchtlich an, so daß - abhängig vom Inhibitorprotein - zwei- bis sechsfach über die Norm erhöhte Inhibitorspiegel im Plasma erreicht werden. Auf diese Weise ist der Organismus imstande, den durch Komplexbildung und/oder Inaktivierung bedingten Verbrauch wichtiger Inhibitorproteine zu kompensieren, solange die Leber funktionell voll aktiv ist. Bei den Patienten dieser Studie wurde der erste massive Entzündungsreiz (zumindest bei den nicht infizierten Patienten) durch das operative Trauma gesetzt, so daß genügend Zeit für eine optimale Akutphasenreaktion zur Erreichung maximaler Inhibitorspiegel im Plasma verfügbar war. Diese Annahme wird durch den Konzentrationsverlauf des C-reaktiven Proteins, eines unspezifischen Akutphasenproteins gestützt, für das drei Tage nach der Operation bereits maximale Plasmaspiegel gemessen wurden. Zu Beginn und während der Sepsis wurde dann kein weiterer Anstieg des C-reaktiven Proteins mehr beobachtet, so daß dieser Parameter für eine Diskriminierung zwischen den Patientengruppen A und B und C andererseits zu Beginn der Sepsis sowie zwischen den B- und C-Patienten im Verlaufe der Sepsis nicht geeignet ist (Abb. 7). Offensichtlich markiert der E- $\alpha_1$ PI-Spiegel sowohl den Beginn als auch den Verlauf der Sepsis wesentlich spezifischer als das C-reaktive Protein.

In diesem Zusammenhang sind die Bestimmungsmethoden für die Proteinaseinhibitoren besonders zu beachten. Sofern sowohl ein funktioneller Test als auch eine immunologische Konzentrationsbestimmung angewandt wurde (letztere erfaßt neben dem aktiven Inhibitor auch inaktiviertes Inhibitorprotein und ggfs. Enzym-Inhibitor-Komplexe), kann der aktuelle Verbrauch an Inhibitor aus der Differenz beider Analysenwerte errechnet werden (Abb. 8);

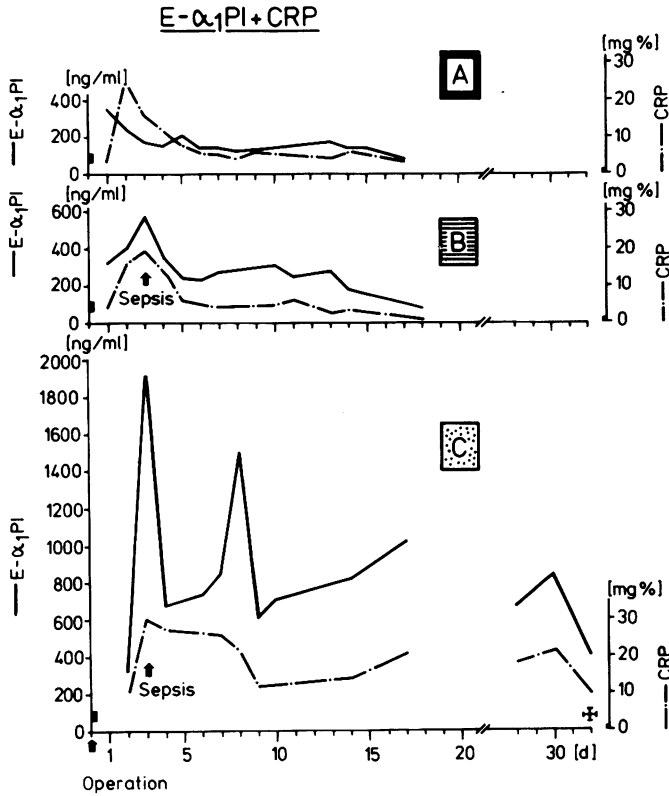


Abb. 7. Vergleich der Plasmaspiegel des Akutphasenproteins C-reaktives Protein und der mit  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor komplexierten Elastase (E $\alpha_1$ PI) bei drei Patienten mit abdominal-chirurgischen Eingriffen. Patient A erlitt postoperativ keine Infektion; Patient B überlebte eine postoperative Sepsis; Patient C verstarb an den Folgen einer postoperativen Sepsis. Die letzten Bestimmungen erfolgten am Tage der Entlassung bei Patient A, am Tage der Genesung bei Patient B und kurz vor dem Tode bei Patient C

Proteinase-Inhibitoren als Akutphasen-Proteine

( $\alpha_1$ PI  $\equiv$   $\alpha_1$ AT,  $\alpha_2$ PI, C1INA,  $\alpha_1$ AC)

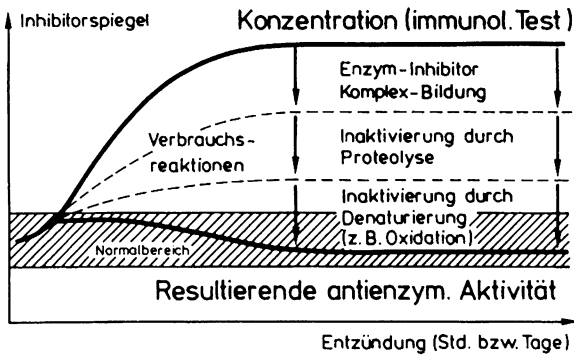


Abb. 8. Ursachen für die Diskrepanz zwischen immunologisch meßbarer Proteinkonzentration und antienzymatischer Aktivität bei plasmatischen Proteinaseinhibitoren, die auf einen Entzündungsreiz als Akutphasenproteine reagieren. Der Verbrauch durch Komplexbildung und andere Inaktivierungsprozesse kann durch die erhöhte Syntheserate kompensiert werden, so daß die Hemmaktivität im Normalbereich liegt. Die Abkürzungen sind in der Legende von Abb. 3 erklärt

aus klinischer Sicht ist ein funktioneller Hemmtest vorzuziehen. Im Falle des  $\alpha_2$ -Makroglobulin ergaben beide Methoden vergleichbare Resultate (Abb. 6), was sehr wahrscheinlich auf die rasche Elimination der  $\alpha_2$ -M-Proteinase-Komplexe zurückzuführen ist.

### Pankreatogener Schock und akute Entzündungen im allgemeinen

In einer weiteren klinischen Studie wurden Patienten untersucht, die mit der Diagnose einer akuten Pankreatitits hospitalisiert wurden. Bei diesen Patienten waren die Plasmaspiegel des E- $\alpha_1$ -PI-Komplexes stark erhöht, insbes. in der Schockphase mit einem Mittelwert um das Zehnfache über der Norm (n=8) bzw. um das Zwanzigfache (n=9), wenn ein Patient mit einem individuellen sechzigfachen Anstieg in das Kollektiv einbezogen wurde (Abb. 9). Die Plasmaspiegel des  $\alpha_2$ M und AT III verhielten sich, ähnlich wie bei der Sepsis, d.h. die Freisetzung der Neutrophilen-Elastase war wiederum von einem signifikanten Verbrauch der Proteinaseinhibitoren AT III und  $\alpha_2$ M begleitet und damit von einer entsprechend gestörten Homöostase der Blutsysteme.

Die bislang verfügbaren biochemischen und klinischen Daten stimmen mit folgender Hypothese überein: Bei akuten Entzündungen wie der Sepsis und dem pankreatogenen Schock korreliert die Menge an freigesetzter und systemisch faßbarer Neutrophilen-Elastase nicht nur mit dem Schweregrad der Entzündungsreaktion des Organismus, sondern auch mit der klinischen Situation des Patienten. Die Störung des physiologischen Gleichgewichts zwischen endogenen Proteinaseinhibitoren und ihren Inhibitoren dürfte eine wesentliche Ursache für die ablaufenden Pathomechanismen sein. Diese Ansicht wird durch die Resultate tierexperimenteller Studien gestützt [22]. Hier konnte bei frühzeitiger

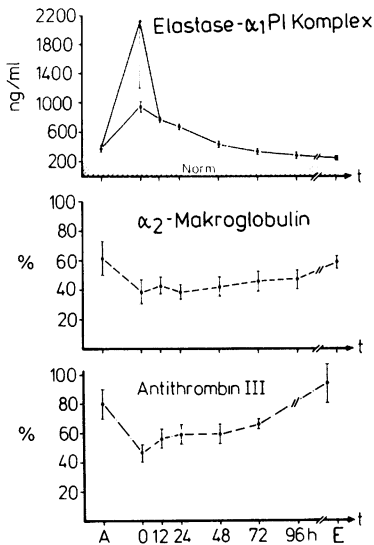


Abb. 9. Mittelwerte der Plasmaspiegel der mit  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor komplexierten Elastase (E- $\alpha_1$ PI) sowie von Antithrombin III (AT III) und  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ M) bei 9 Patienten mit akuter Pankreatitis bzw. pankreatogenem Schock. Beim Mittelwert der unteren E- $\alpha_1$ PI-Kurve ist ein Patient nicht berücksichtigt, der in der Schockphase einen 60fachen Anstieg des E- $\alpha_1$ PI-Spiegels über die Norm aufwies. Auf der Abszisse sind angegeben: Zeitpunkt der Diagnose der akuten Pankreatitis (A); Schockphase (O) mit daran anschließender Zeitskala in Stunden (h) zur Dokumentation des weiteren Krankheitsverlaufs (Genesung); Zeitpunkt der Entlassung (E)



Applikation exogener Proteinaseinhibitoren der Verbrauch verschiedener Plasmafaktoren einschließlich des AT III und Faktor XIII im Verlaufe der Endotoxinämie reduziert werden.

### Mehrfachverletzungen und Bluttransfusionen

Ein interessantes Verlaufsmuster hinsichtlich der Plasmaspiegel des E- $\alpha_1$ PI-Komplexes wurde von uns bei Mehrfachverletzten beobachtet. Zur Erfassung des Ausmaßes der Gewebeerstörung und des Blutverlustes nach dem Unfallereignis wurde eine interne Verletzungsskala mit maximal 34 Punkten verwendet. Wie aus Abb. 10 ersichtlich ist, besteht eine eindeutige Korrelation zwischen dem E- $\alpha_1$ PI-Spiegel und dem Verletzungsgrad. Zwischen 8 und 14 Stunden nach dem Unfall lag bei den mäßig verletzten Patienten (Gruppe I,  $\bar{x} \pm \text{SEM} = 6,3 \pm 0,6$  Punkte) der mittlere E- $\alpha_1$ PI-Spiegel fünfmal höher als die obere Grenze des Normbereichs (100 ng kompl. Elastase/ml); Patienten mit schwereren Verletzungen (Gruppe II,  $\bar{x} \pm \text{SEM} = 10,0 \pm 1$  Punkte) zeigten im Mittel einen zehnfachen Anstieg und bei sehr schwer verletzten Patienten (Gruppe III,  $\bar{x} \pm \text{SEM} = 15,3 \pm 1,0$  Punkte) wurden um mehr als das Zwanzigfache erhöhte E- $\alpha_1$ PI-Spiegel beobachtet. Während

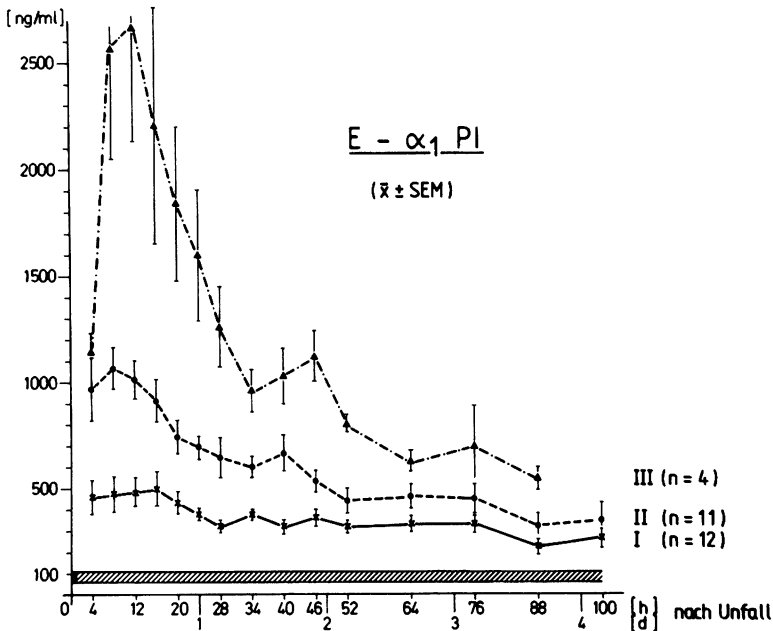


Abb. 10. Mittelwerte der Plasmaspiegel der mit  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor komplexierten Elastase (E- $\alpha_1$ PI) bei 27 polytraumatisierten Patienten. Auf der Basis einer internen Punkteskala (HIS), die den Schweregrad der Verletzung angibt (vgl. den Text) wurden die Patienten in drei Gruppen eingeteilt: I (n=12), leichte Verletzung, HIS =  $6,3 \pm 0,6$ ; II (n=11) mittelschwere Verletzungen, HIS =  $10,0 \pm 1,0$ ; III (n= 4) sehr schwere Verletzungen, HIS =  $15,3 \pm 1,0$ . Der Normbereich für E- $\alpha_1$ PI ist ebenfalls angegeben

der Genesung fielen die E- $\alpha_1$ PI-Konzentrationen im Plasma bei allen Patienten kontinuierlich in Richtung des Normbereiches ab.

Überraschenderweise fanden wir bei den polytraumatisierten Patienten keine Korrelation zwischen erhöhter Elastasefreisetzung und vermehrtem Verbrauch an Plasmafaktoren wie Prothrombin, Plasminogen,  $\alpha_2$ -PI sowie  $\alpha_2$ M und AT III. Dies würde sehr wahrscheinlich auf die extensive Substitution aller Plasmafaktoren im Rahmen der bei diesen Patienten angewandten Transfusionstherapie mit Blutkonserven, fresh-frozen Plasma etc. zurückzuführen sein, die den Verbrauch der endogenen Faktoren offensichtlich zu kompensieren vermochte.

Die genannten Plasmafaktoren sind während der Lagerung der Blutkonserven weitgehend stabil, dagegen steigt der E- $\alpha_1$ PI-Spiegel mit zunehmender Lagerungsdauer kontinuierlich auf extrem hohe Werte an (Abb. 11). Obwohl damit beträchtliche Mengen an E- $\alpha_1$ PI-Komplex den Patienten verabreicht werden, die das RES zusätzlich belasten, ergab eine eingehendere Untersuchung, daß die Menge des transfundierten E- $\alpha_1$ PI-Komplexes zum aktuellen Plasmaspiegel der Patienten nicht wesentlich beitrug. (M. Jochum und H. Dittmer, in Vorbereitung). Der Grund für diese Beobachtung dürfte wohl in der doch relativ raschen Elimination des E- $\alpha_1$ PI-Komplexes aus der Zirkulation zu suchen sein ( $t_{1/2}$  bei ca. 1 Stunde). Im Gegensatz dazu haben die transfundierten Plasmafaktoren Eliminations-Halbwertzeiten von mehreren Tagen.

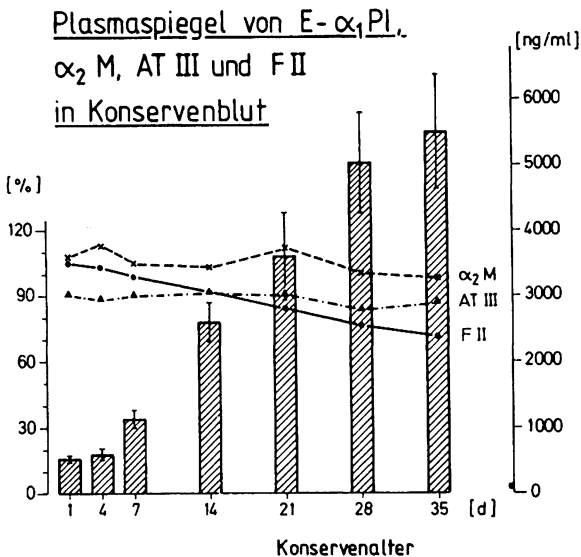


Abb. 11. Mittlere Plasmaspiegel der mit  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor komplexierten Elastase (E- $\alpha_1$ PI) und von  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ M), Antithrombin III (AT III) und Prothrombin (F II) in Konservenblut (n=11) als Funktion der Lagerungsdauer (in Tagen). Die Spiegel von  $\alpha_2$ M, AT III und F II sind auf Standardplasma (= 100%) bezogen (linke Ordinate)

Weitere Studien müssen nun zeigen, ob bei Patienten mit massiver Substitutionstherapie zumindest lokal, z.B. in Ergüssen und Lungenwaschflüssigkeiten bzw. der Lymphe oder venösen Blutproben aus dem Wundgebiet, ein Verbrauch humoraler Faktoren bei entsprechender Elastasefreisetzung nachweisbar ist. Es steht für uns jedoch außer Frage, daß die hohen E- $\alpha_1$ PI-Spiegel bei polytraumatisierten Patienten ein klares Indiz für eine im Organismus ablaufende massive Entzündungsreaktion darstellen.

### Weitere klinische Studien

Eine mögliche diagnostische Bedeutung der E- $\alpha_1$ PI-Spiegel im Plasma wurde neuerdings auch bei der Schwangerschaftstoxikose [23, 28] und der rheumatoiden Arthritis [20, 23] postuliert (Tabelle 2). Die Höhe der Plasmaspiegel scheint danach, in Kombination mit den klinischen Daten, eine frühe Diagnose des Lungenversagens (ARDS) zu ermöglichen und auch die Differenzierung einer entzündlichen von einer nicht entzündlichen Arthritis. Letzteres trifft analog auch für Pleuraergüsse produzierende Krankheitsphänomene zu, bei denen damit zwischen einer tumorbedingten und einer entzündlichen Grunderkrankung unterschieden werden kann [23].

Der E- $\alpha_1$ PI-Spiegel erwies sich auch als ein empfindlicher Indikator zur Verfolgung des stimulierenden Effektes fremder Oberflächen auf die Neutrophilen, z.B. bei der Hämodialyse [23, 24]. Ein weiteres Anwendungsgebiet für den E- $\alpha_1$ PI-Test ist bei Leukämien gegeben, wo sowohl die lysosomale Enzymausstattung leukämischer Zellen als auch die Freisetzung der Neutrophilen-Elastase bei Leukämiepatienten unter bestimmten klinischen und therapeutischen Bedingungen studiert werden kann [21, 25].

Tabelle 2. Elastase aus polymorphkernigen Granulozyten (PMN-Elastase) als Indikator der Entzündungsreaktion bei verschiedenen Erkrankungen. Literaturhinweise sind im Text angegeben

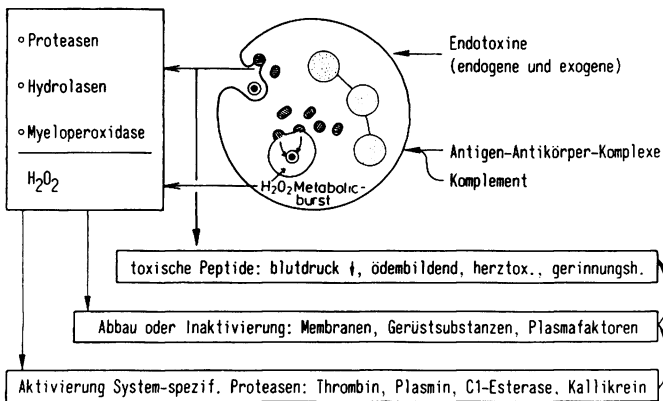
Anwendungsbereich	Bedeutung erhöhter E- $\alpha_1$ PI-Spiegel
Postoperative Infektion	Diagnose, Verlauf, Prognose (Sepsis)
Polytrauma/Schocklunge	Schweregrad, Verlauf, Komplikationen (Sepsis)
Schwangerschaftsgestosen	Früherkennung des ARDS
Rheumat. Erkrankungen	Differenzierung $\left\{ \begin{array}{l} \text{entzündlich / nicht entzündlich} \\ \text{entzündlich / maligne} \end{array} \right.$
Pleuraergüsse	
Hämodialyse	Eignung / Effekt von Dialysemembranen
Myeloische Leukämien	Verbesserte Klassifizierung: normale / defekte Enzymausstattung leukämischer Zellen

## Resumee und Ausblick

Erhöhte E- $\alpha_1$ PI-Spiegel im Plasma zeigen generell die Teilnahme polymorphkerniger Granulozyten an einem Entzündungsvorgang im Organismus an (Ausnahme sind die Leukämien, siehe oben). Die Höhe des Spiegels reflektiert mit hoher Wahrscheinlichkeit sowohl die Intensität des entzündlichen Stimulus als auch die Intensität der Reaktion der Neutrophilen auf diesen Reiz. Deshalb ist, abgesehen von generalisierten Infektionen, der Anstieg des E- $\alpha_1$ PI-Spiegels im Plasma als ein systemisches Signal eines zunächst noch lokalen Entzündungsereignisses zu werten. Wir möchten besonders hervorheben, daß für die diagnostische Interpretation erhöhter E- $\alpha_1$ PI-Spiegel deshalb die klinische Situation des Patienten zu berücksichtigen ist. Andererseits scheint die Zahl der in der Zirkulation verfügbaren Leukozyten ohne wesentlichen Einfluß auf den E- $\alpha_1$ PI-Spiegel zu sein, da wir bei unseren Sepsispatienten sowohl bei Leukozytose als auch bei Leukopenie ähnlich hohe Konzentrationen an E- $\alpha_1$ -Komplex fanden.

Infolge der allgemeinen Verfügbarkeit und der raschen Reaktion der Neutrophilen dürfte die lysosomale Elastase einen Schlüsselparameter<sup>3</sup> für traumatische und entzündliche Vorgänge im Organis-

### Freisetzung und Wirkung lysosomaler Faktoren



**Abb. 12. Freisetzung und Effekte lysosomaler Faktoren bei der Entzündung.** In den Phago lysosomen vorhandene Abbauprodukte (z.B. toxische Peptide) werden bei der Stimulierung und Desintegration der Phagozyten freigesetzt und sind ggfs. direkt wirksam. Aus Lysosomen und Phago lysosomen stammende Enzyme und Substanzen bauen native humorale Faktoren und strukturelle Elemente ab oder zerstören sie durch oxidative Denaturierung; dabei können ebenfalls toxische Produkte (Peptide) entstehen. Systemspezifische u.a. lysosomale Proteinasen aktivieren die Blutsystem-Kaskaden (vgl. Abb. 2); dabei gebildete aktive Proteinasen können ihrerseits humorale u.a. Faktoren abbauen und ggfs. toxische Peptide dabei freisetzen

<sup>3</sup> Der verwendete E- $\alpha_1$ PI-Test ist spezifisch für die Elastase der Neutrophilen; pankreatische und andere Elastasen werden damit nicht erfaßt

mus darstellen. Für eine differenziertere Diagnose hinsichtlich der Intensität der Entzündungsreaktion und der Lokalisation des Entzündungsherdes wäre jedoch der Nachweis zusätzlicher Mediatoren aus weiteren Entzündungszellen erforderlich. Hierfür eignen sich unseres Erachtens vor allem Mediatoren und lysosomale Faktoren aus Gewebszellen [1,26,27] wie den Makrophagen, Mastzellen, Fibroblasten und Endothelzellen der Kapillargefäße. Es ist Aufgabe zukünftiger Forschungstätigkeit, derartige Mediatoren zu identifizieren und geeignete Nachweismethoden dafür zu entwickeln. Zwei Gründe sprechen dafür, daß lysosomale und andere zellständige Proteasen geeignete Kandidaten wären, um ein differentialdiagnostisch verwertbares Entzündungsmuster zu erstellen: Sie sind einerseits infolge ihres hohen Potentials zur Inaktivierung durch Abbau sowie zur Produktion von Entzündungsmediatoren besonders interessante Kandidaten für die Aufklärung von Pathomechanismen (Abb. 12) und sie bieten andererseits ideale Ansatzpunkte für eine Therapie mit geeigneten Proteinaseinhibitoren.

### Zusammenfassung

Im Verlaufe schwerer, mit einer Entzündung verbundenen Erkrankungen wie z.B. abdominalchirurgischen Eingriffen, unfallbedingten Mehrfachverletzungen und dem pankreatogenen Schock werden verschiedene Zellen des Blutes und der Gewebe ("Entzündungszellen") einschließlich der polymorphkernigen Granulozyten stimuliert, wobei lysosomale Proteinasen aus den Zellen entkommen. Diese normalerweise zellständigen Enzyme sowie während der Phagozytose in den Phagolysosomen produzierte oxidierende Agentien (z.B. Sauerstoffradikale und Wasserstoffperoxid in Kombination mit Myeloperoxidase) können das entzündliche Geschehen zusätzlich verstärken durch proteolytischen Abbau und/oder oxidative Inaktivierung von Strukturproteinen, Membranbestandteilen und humoralen Faktoren.

Als Marker einer pathologischen Freisetzungsreaktion im Verlaufe der Entzündung diente uns die Elastase (E) aus polymorphkernigen Granulozyten. Die aus der Zelle entkommene Proteinase reagiert mit diversen verfügbaren Proteinsubstraten einschließlich dem  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor ( $\alpha_1$ PI) und  $\alpha_2$ -Makroglobulin, wobei sie letztlich als inaktiver Enzym-Inhibitor-Komplex durch Phagozyten des retikuloendothelialen Systems eliminiert wird. Mittels eines kürzlich entwickelten Enzymimmunoassays bestimmten wir die Plasmakonzentration des E- $\alpha_1$ PI-Komplexes in Patienten mit schweren abdominalchirurgischen Eingriffen, unfallbedingten Mehrfachverletzungen und akuter Pankreatitis. Während das operative Trauma nur eine mäßige Erhöhung (bis zum Dreifachen) der E- $\alpha_1$ PI-Spiegel im Plasma bewirkte, wurde im Verlauf der postoperativen Sepsis ein Anstieg auf das 10- bis 20fache der Norm beobachtet. Von besonderer Bedeutung ist die gefundene Korrelation zwischen erhöhter Freisetzung an lysosomaler Elastase und vermehrtem Verbrauch an Gerinnungsfaktoren wie Antithrombin III und fibrinstabilisierendem Faktor XIII sowie an

$\alpha_2$ -Makroglobulin; diese Faktoren sind sensitive Substrate der lysosomalen Elastase. Mehrfachverletzungen bewirkten ebenfalls einen hochsignifikanten Anstieg des E- $\alpha_1$ PI-Siegels im Plasma bis zu 14 Stunden nach dem Unfallereignis, wobei die Menge der freigesetzten lysosomalen Elastase mit dem Schweregrad der Verletzung korrelierte. Bei den polytraumatisierten Patienten konnte wohl infolge einer massiven Substitution durch Plasmafaktoren keine Beziehung zwischen dem Ausmaß ihres Verbrauchs in vivo und der Menge der liberierten Elastase beobachtet werden. Dagegen wurden bei Patienten mit akuter Pankreatitis wiederum ein massiver Verbrauch an Antithrombin III und  $\alpha_2$ -Makroglobulin gemessen und parallel dazu stark erhöhte E- $\alpha_1$ PI-Spiegel. Die Ergebnisse der erwähnten klinischen Studien werden hinsichtlich des vermuteten Beitrags der unspezifischen Proteolyse durch freigesetzte lysosomale Proteinase sowie der limitierten Proteolyse durch System-spezifische Proteinase zum Verbrauch von Plasmafaktoren diskutiert.

Danksagung. Diese Arbeiten wurden z.T. mit Mitteln der deutschen Forschungsgemeinschaft im Rahmen des SFB-51 (B/30) und SFB 0207 (LP 8) der Universität München finanziert. Wir danken Frau U. HOF und Frau C. SEIDL für hervorragende technische Assistenz, Frau M. WIND für die Ausführung der Zeichnungen und Frau H. GERSTENBERGER für die sorgfältige Ausfertigung des Manuskriptes.

#### Literatur

1. SOMOLKIN JS, SIMMONS RL (1983) Cellular and subcellular mediators of acute inflammation. Surg Clinics of North America 63: 225-243
2. DINGLE JT (ed) (1977) Lysosomes: A Laboratory Handbook. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam New York Oxford
3. KLEBANOFF SJ, CLARK RA (1978) The Neutrophil. Function and Clinical Disorders. North Holland Publ.Comp., Amsterdam New York Oxford
4. JOCHUM M, LANDER S, HEIMBURGER N, FRITZ H (1981) Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III. Hoppe-Seyler's Z. Physiol Chem 362: 103-112
5. SCHMIDT W, EGBRING R, HAVEMANN K (1974) Effect of elastase-like and chymotrypsin-like neutral protease from human granulocytes on isolated clotting factors. Thromb Res 6: 315-326
6. JANOFF A, SCHERER J (1968) Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastinolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. J Exp Med 128: 1137-1151
7. MENNINGER H, PUTZIER R, MOHR W, WESSINGHAGE D, TILLMANN K (1980) Granulocyte elastase at the site of cartilage erosion by rheumatoid synovial tissue. Z Rheumatol 39: 145-156
8. MAINARDI CL, DIXIT SN, KANG AH (1980) Degradation of type IV (basement membrane) collagen by a proteinase isolated from human polymorphonuclear leukocyte granules. J Biol Chem 255: 5435-5441
9. GRAMSE M, BINGENHEIMER C, SCHMIDT W, EGBRING R, HAVEMANN K (1978) Degradation products of fibrinogen by elastase-like neutral protease from human granulocytes. J Clin Invest Vol 61: 1027-1032
10. HAVEMANN K, JANOFF A (eds) (1978) Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes. Urban und Schwarzenberg, Baltimore, München

11. BROWER MS, HARPEL PC (1982) Proteolytic cleavage and inactivation of  $\alpha_2$ -plasmin inhibitor and C1-inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J Biol Chem* 257: 9849-9854
12. KOPITAR M, GIRALLI T, LOCNIKAR P, TURK V (1980) Biochemical and biological properties of leukocyte intracellular inhibitors of proteinases. In: *Macrophages and Lymphocytes, Part A*, ESCOBAR MR, FRIEDMAN H (eds), Plenum Publishing Corp., New York, NY pp 75-83
13. TRAVIS J, SALVESEN GS (1983) Human plasma proteinase inhibitors. *Ann Rev Biochem* 52: 655-709
14. SAYERS CS, BARRETT AJ (1980). Binding of anhydrotrypsin to  $\alpha_2$ -macroglobulin. *Biochem J* 189:255-261
15. CULLMANN W, DICK W (1981) A chromogenic assay for evaluation of  $\alpha_2$ -macroglobulin level in serum and cerebrospinal fluid. *J Clin Chem Clin Biochem* 19: 287-290
16. OHLSSON K, LAURELL CB (1976) The disappearance of enzyme-inhibitor complexes from the circulation of man. *Clin Sci Mol Med* 51: 87-92
17. BANDA MJ, CLARK EJ, WERB Z (1980) Limited proteolysis by macrophage elastase inactivates human  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor. *J Exp Med* 152: 1563-1570
18. BEATTY K, BIETH J, TRAVIS J (1980) Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor and  $\alpha_1$ -antichymotrypsin. *J Biol Chem* 255: 3931-3934
19. STOSSEL TP (1976) The mechanism of phagocytosis. *J Reticuloendothel Soc* 19: 237 pp
20. KLEESIEK K, NEUMANN S, GREILING H (1982) Determination of the elastase- $\alpha_1$ -proteinase inhibitor complex, elastase activity and proteinase inhibitors in the synovial fluid. *Fresenius Z Anal Chem* 311: 434-435
21. JOCHUM M, DUSWALD KH, HILLER E, FRITZ H (1983) Plasma levels of human granulocytic elastase- $\alpha_1$ -proteinase inhibitor complex (E- $\alpha_1$ PI) in patients with septicemia and acute leukemia. In: *Selected Topics in Clinical Enzymology*. GOLDBERG DM, WERNER M (eds), Walter de Gruyter Verlag Berlin, pp 85-100
22. JOCHUM M, WITTE J, SCHIESSLER H, SELBMANN HK, RUCKDESCHL G, FRITZ H (1981) Clotting and other plasma factors in experimental endotoxemia. Inhibition of degradation by exogenous proteinase inhibitors. *Eur Surg Res* 13: 152-168
23. FRITZ H, GABL F, GREILING H (1984) Neue Wege in der Entzündungsdiagnostik. PMN-Elastase 1. Bericht der Symposien vom Kongress für Laboratoriumsmedizin Wien April 1983 und Medica November 1983. GIT-Verlag, Darmstadt
24. HÖRL WH, JOCHUM M, HEIDLAND A, FRITZ H (1983) Release of granulocyte proteinases during hemodialysis. *Am J Nephrol* 3: 213-217
25. HILLER E, JOCHUM M (1984) Plasma levels of human granulocytic elastase- $\alpha_1$ -proteinase inhibitor complex (E- $\alpha_1$ PI) in leukemia. *Blut* 48: 1-7
26. COHEN AB (1979) Potential adverse effects of lung macrophages and neutrophils, *Federation Proc* 38: 2644-2647
27. BARRETT AJ (ed) (1977) *Proteinases in Mammalian Cells and Tissues*. Elsevier Biomedical Press North-Holland, Amsterdam
28. SCHLEBUSCH H, GARSTKA G, ROMMELSHEIM K, GRÜNN O, STOECKEL H. Biochemische Befunde bei Gestosepatientinnen mit Lungenkomplikationen. *Anaesth Intensivther Notfallmed* 18/4: 187-192