

# **Neue Wege in der Entzündungsdiagnostik**

## **PMN Elastase**

Beiträge der Symposien  
beim Kongreß für Laboratoriumsmedizin in Wien im April 1983  
und bei der MEDICA in Düsseldorf im November 1983.

Herausgeber  
M. Jochum, F. Gabl, H. Greiling, H. Fritz

GIT VERLAG · DARMSTADT

G786/1016

# Inhaltsverzeichnis

Vorwort	
H. Fritz . . . . .	IX
Granulozytäre Elastase als Marker der unspezifischen Proteolyse in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen	
M. Jochum und H. Fritz . . . . .	1
Enzymimmunoassay für Granulozyten-Elastase im Komplex mit $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor	
S. Neumann, G. Gunzer, N. Hennrich und H. Lang . . . . .	9
Elastase- $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor-Komplex: Ein Indikator für pathobiochemische Veränderungen in der Sepsis und nach Polytrauma	
M. Jochum, K.H. Duswald, H. Dittmer und H. Fritz . . . . .	17
Granulozyten-Elastase, ein Indikator für das Auftreten von Lungenkomplikationen bei Patientinnen mit schwerer Gestose (Prä-Eklampsie): Fallstudien	
H. Schlebusch, G. Garstka, C. Rommelsheim und U. Grün . . . . .	33
Freisetzung von Granulozyten-Elastase bei akutem Nierenversagen und während der Hämodialysebehandlung bei chronisch niereninsuffizienten Patienten	
W. H. Hörl, M. Jochum, S. Neumann und A. Heidland . . . . .	43
<i>Elastase-Inhibitor-Komplexe in der Differentialdiagnose von Pleuraergüssen</i>	
P. M. Bayer, H. Lanschützer, E. Knoth, H. Klech und F. Kummer . . . . .	53
Zur Bedeutung der Bestimmung des Elastase- $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor-Komplexes im Plasma bei Patienten mit rheumatischer Arthritis	
D. Neumeier, J.-H. Hatz, G. Menzel, D. Nagel, H. Kaiser und A. Fateh-Moghadam . . . . .	59
Elastase aus Granulozyten bei chronischen Gelenkerkrankungen: Konzentration und Aktivität der Elastase-Inhibitor-Komplexe in Plasma und Synovialflüssigkeit	
K. Kleesiek, D. Brackertz und H. Greiling . . . . .	71
Autorenverzeichnis . . . . .	83
Sachwortregister . . . . .	83

# Granulozytäre Elastase als Marker der unspezifischen Proteolyse in der Pathogenese entzündlicher Erkrankungen

M. JOCHUM und H. FRITZ

Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Universität München

## Proteinasen mit substratspezifischer und unspezifischer Wirksamkeit

Die Aktivierung humoraler Systeme wie Gerinnung, Fibrinolyse und Komplement ist durch hochspezifische, überwiegend enzymkatalysierte Reaktionsschritte charakterisiert. Die kaskadenartigen Mechanismen werden durch Proteinase mit hoher Substratspezifität ausgelöst, so z. B. die Gerinnung durch Thrombokinase und die Fibrinolyse durch Plasminogenaktivatoren. Diese substrat- oder *systemspezifischen Proteinase* (Tab. 1) sind normalerweise im Organismus nur in relativ geringen Konzentrationen vorhanden. Ihre Synthese und/oder Freisetzung in das umgebende Milieu kann jedoch aufgrund hormoneller oder entzündlicher Stimuli beträchtlich gesteigert werden [1]. Beim größten Teil der die Gerinnung, Fibrinolyse und Komplementkaskade unterhaltenden Faktoren handelt es sich ebenfalls um substratspezifische Proteinase.

### Systemspezifische, nicht-lysosomale Proteinase

Hohe Substrat-Spaltsspezifität		
• Gewebe-Thrombokinase	→	Aktivierung von Gerinnung
• Plasminogen-Aktivatoren (Synthese stimulierbar)	→	Fibrinolyse (Komplement)

Tab. 1: Systemspezifische, primär nicht-lysosomale Proteinase mit hoher Substratspezifität. Das spezifische Substrat der Thrombokinase ist Faktor VII und das der Plasminogenaktivatoren das Plasminogen.

Im Gegensatz dazu sind *lysosomale Proteinase* bereits vorgebildet und werden in voll aktiver Form in den Lysosomen von Granulozyten, Makrophagen, Endothelzellen etc. gespeichert [2]. Die lysosomalen Proteinase (Tab. 2) stellen sehr potente intrazelluläre Stoffwechsellzyme dar, die auch native Proteine und Glykoproteine rasch abbauen und damit inaktivieren können. Eine hervorragende Rolle kommt hierbei den „neutralen“ Proteinase Elastase und Cathepsin G aus den Granula der polymorphkernigen (PMN) Leukozyten sowohl aufgrund ihrer hohen Konzentration innerhalb der Zellorganellen als auch wegen ihres Wirkungsoptimums im physiologischen pH-Bereich zu. Darüberhinaus sind diese Enzyme noch durch ihre geringe Substratspezifität für den intra- und extrazellulären Proteinabbau besonders geeignet (Tab. 3).

neutrale (pH 6–9)	saure (pH 3–7)
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Elastasen</li> <li>● Cathepsin G</li> <li>○ Collagenasen</li> <li>○ Kininogenasen (Kallikreine)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Cathepsin B</li> <li>● Cathepsine H, L</li> <li>● Cathepsine A, C</li> <li>● Cathepsin D (Leukokininogenase)</li> </ul>
● spalten unspezifisch	○ spalten spezifisch

Tab. 2: Lysosomale Proteinasen (mit neutralem und saurem Wirkungsoptimum) aus neutrophilen Granulozyten

Proteoglycane	Elastase, Cathepsin G
Elastin	Elastase, Cathepsin G
Collagen I	Collagenase
Collagen III	Elastase (Collagenase)
Gerinnungsfaktoren	Elastase, Cathepsin G
Fibrinolysefaktoren	Elastase, Cathepsin G
Komplementfaktoren	Elastase, Cathepsin G
Immunglobuline	Elastase
Transportproteine	Elastase

Tab. 3: Biologische Substrate lysosomaler neutraler Proteinasen aus polymorphkernigen Granulozyten

Eine generalisierte Proteolyse durch lysosomale und/oder systemspezifische Proteinase wird normalerweise durch eine Vielzahl ubiquitär im Organismus vorkommender Proteinaseinhibitoren verhindert (Tab. 4). Als wichtigste primär im Plasma auftretende Hemmstoffe der unspezifisch spaltenden Enzyme haben sich  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor ( $\alpha_1$ PI, früher  $\alpha_1$ -Antitrypsin,  $\alpha_1$ AT),  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin ( $\alpha_1$ AC) und insbesondere  $\alpha_2$ -Makroglobulin ( $\alpha_2$ M) erwiesen. Bemerkenswerterweise ist gerade der letztgenannte Inhibitor nicht nur in der Lage, nahezu alle lysosomalen Proteinase zu hemmen, sondern auch systemspezifische Enzyme wie Plasmin, Plasma-Kallikrein und Thrombin. Eine überschießende Aktivierung der Gerinnung wird jedoch vor allem durch das Antithrombin III (AT III), der Fibrinolyse durch den  $\alpha_2$ -Plasmininhibitor ( $\alpha_2$ PI) und des Komplement- und Kallikrein-Kinin-Systems durch den C1-Inaktivator (C1 INA) unterbunden.

Abk.	Inhibitor	M.G. $\times 10^{-3}$	mittl. Konzentration mg/100 ml	$\mu$ mol/l
$\alpha_2$ M	$\alpha_2$ -Makroglobulin	725	260	3.6
$\alpha_1$ PI	$\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor	50	260	52
$\alpha_1$ AC	$\alpha_1$ -Antichymotrypsin	70	45	6.4
$\beta_1$ CI	$\beta_1$ -Collagenaseinh.	40	1.5	0.4
ITI	Inter- $\alpha$ -Trypsininhibitor	160	45	2.8
AT III	Antithrombin III	65	26	4.0
$\alpha_2$ PI	$\alpha_2$ -Plasmininhibitor	70	6	0.9
C1 INA	C1-Inaktivator	100	24	2.4

Tab. 4: Proteinaseinhibitoren im menschlichen Plasma. Angegeben sind das Molekulargewicht (M.G.) und die mittlere Konzentration im Plasma.

## Pathobiochemie lysosomaler Enzyme

Zu den gravierendsten pathophysiologischen Geschehen vieler entzündlicher Prozesse zählt die Zerstörung von extrazellulären Gewebestrukturen sowie von Zellmembranen und die dadurch bedingte Freisetzung normalerweise zellständiger lysosomaler Enzyme. Besonders reich an solchen Enzymen sind Endothelzellen, Fibroblasten, Makrophagen und Mastzellen sowie basophile und polymorphkernige Granulozyten (Abb. 1). Eine zusätzliche rasche Ansammlung von PMN Leukozyten in der Lunge während einer entzündlichen Reaktion, z. B. nach Polytrauma, ist hinlänglich bekannt.

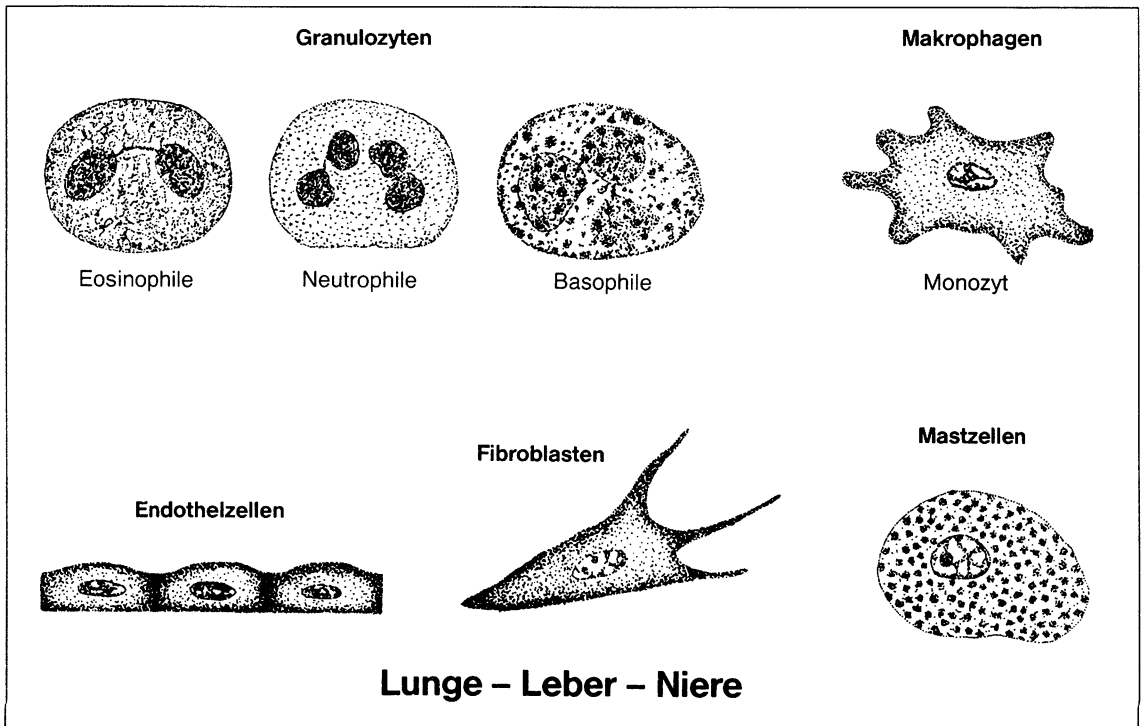


Abb. 1: Primäre Lokalisation von Blut- und Gewebezellen mit reichhaltiger lysosomaler Enzymausstattung

Bedenkt man, daß bereits physiologischerweise täglich eine Menge von ca. 1 g neutraler lysosomaler Proteinasen (vor allem Elastase und Cathepsin G) aus zugrundegehenden PMN Granulozyten inhiert und eliminiert werden muß, so ist es nicht verwunderlich, daß mehr als 10% der Plasmaproteine Proteinaseinhibitoren repräsentieren. Dieses umfassende Inhibitorpotential – weitere Inhibitoren sind in mukösen Sekreten und im Cytosol der Zellen selbst zu finden – werten wir als überzeugenden Hinweis auf die immense pathobiochemische Effektivität der lysosomalen Proteinasen, wenn sie erst einmal aus ihren membranumgebenen Organellen, den Lysosomen, freigesetzt sind.

### Mechanismen der Aktivierung und des Verbrauchs von Plasmafaktoren

Kommt es im Verlaufe von pathologischen Prozessen im Organismus (schwere Entzündung und Gewebszerstörung etc.) sowohl zur Degranulierung und somit zur massiven Freisetzung lysosomaler Enzyme aus Leukozyten als auch zur Freisetzung von systemspezifischen Proteinasen aus

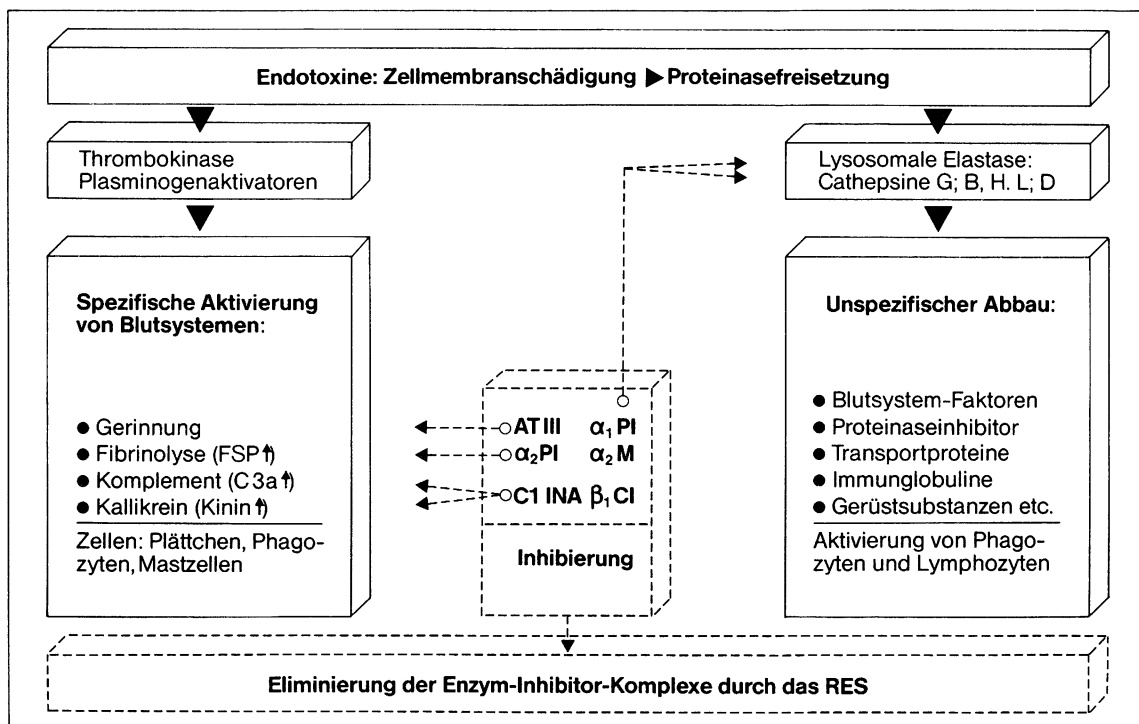


Abb. 2: Aktivierungs- und Verbrauchsreaktionen: spezifische Aktivierung von Blutsystemen u. a. durch systemspezifische Proteinase (linker Teil), unspezifischer Abbau von Plasmaproteinen durch lysosomale neutrale Proteinase u. a. (rechter Teil); Komplexbildung mit Proteinase-Inhibitoren und Eliminierung der Enzym-Inhibitor-Komplexe (mittlerer Teil) durch Zellen des retikulo-endothelialen Systems (RES).

FSP = Fibrin(ogen)spaltprodukte; C3a = Anaphylatoxin C3a

Endothelzellen u. a., so können die proteolytisch wirksamen Faktoren den „Pathomechanismus der Entzündung“ auf zweierlei Weise verstärken (Abb. 2):

- *Systemspezifische Proteinase* wie die Thrombokinase und der Plasminogenaktivator induzieren die Aktivierung der „Blutsysteme“ (Gerinnung, Fibrinolyse, Komplement, Kallikrein-Kinin-System), d. h. die Umwandlung von Proenzymen in Enzyme durch *limitierte, substratspezifische Proteolyse*. Durch die nachfolgende Hemmung und Eliminierung der Enzym-Inhibitor-Komplexe werden nicht nur die Enzyme selbst, sondern auch ihre Inhibitoren (AT III, α<sub>2</sub>PI, C1 INA) verbraucht.
- *Unspezifisch spaltende Proteinase* wie Elastase und Cathepsin G inaktivieren in vitro durch *substratspezifische Proteolyse* eine Vielzahl von Plasmaproteinen (Tab. 3: Blutsystemfaktoren, Transportproteine, Immunglobuline, Proteinaseinhibitoren etc.). Nach massiver Freisetzung in vivo scheint diese proteolytische Aktivität – wohl aufgrund einer lokal nicht ausreichenden Inhibitorkonzentration – beträchtlich zum Verbrauch von Plasmaproteinen beizutragen. Klinisch relevante Beispiele sind die Gram-negative Sepsis, die akute myeloische Leukämie, Polyarthrit, obstruktives Lungenemphysem etc. [4, 5, 6, 7].

Neuere Ergebnisse sowohl aus klinischen wie auch aus experimentellen Studien stützen die derzeitige Arbeitshypothese eines Proteinase-Proteinaseinhibitor-Ungleichgewichts (proteinase-proteinase inhibitor imbalance), womit die ursächliche Beteiligung im Überschuss freigesetzter, vom

endogenen Inhibitorpotential nicht mehr regulierbarer Proteinase am Pathomechanismus verschiedener Erkrankungen gemeint ist. Für die Verminderung der körpereigenen Proteinasehemmaktivität wird neben der Inhibierung der Zielenzyme und dem proteolytischen Abbau durch nicht hemmbare Proteinase auch eine oxidative Inaktivierung von Inhibitoren diskutiert (Tab. 5). So kann aus phagozytierenden Granulozyten oder Makrophagen neben lysosomalen Proteinase auch Myeloperoxidase und Wasserstoffperoxid freigesetzt werden. Dieses System ist in der Lage, den Methioninrest im reaktiven Zentrum des  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitors zum Sulfoxid zu oxidieren [8]. Hierdurch wird die normalerweise extrem rasche und irreversible Inhibierung der granulocytären Elastase durch  $\alpha_1$ PI so erheblich verzögert [9], daß ein unspezifischer Abbau von Plasmaproteinen durch Elastase trotz hoher endogener  $\alpha_1$ PI-Hemmstoffkonzentration (immunologisch oder über die Trypsinhemmung gemessen) auch in vivo möglich erscheint (Tab. 6).

Abbau bzw. Inaktivierung	durch Oxidation	oder Proteolyse
$\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor ( $\alpha_1$ PI)	$O_2^{\cdot-}$ , $HO^{\cdot}$ , $H_2O_2^{\cdot}$	Metalloproteasen Thiolproteasen
Antithrombin III (AT III) $\alpha_2$ -Plasmininhibitor ( $\alpha_2$ PI) C1-Inaktivator (C1 INA)		} PMN Elastase

\* Phagozytose-Produkte

Tab. 5: Inaktivierung von Plasma-Proteinaseinhibitoren durch lysosomale Faktoren. Die angegebenen Proteinase inaktivieren die Inhibitoren durch Spaltung einer oder weniger Peptidbindungen. Sauerstoff- und Hydroxylradikale sowie Wasserstoffperoxid zusammen mit Myeloperoxidase inaktivieren den  $\alpha_1$ PI (die Hemmung der PMN Elastase betreffend!) durch Oxidation des Methioninrestes im reaktiven Zentrum des Inhibitormoleküls.

Komplex mit PMN Elastase	$t_{1/2}$ assoz. [msec]	Delay time [sec]
$\alpha_1$ PI <sub>nativ</sub>	0,6	0,003
$\alpha_1$ PI <sub>oxid</sub>	1330	6,6

Tab. 6: Komplexierung von granulocytärer Elastase durch nativen bzw. oxidierten  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor ( $\alpha_1$ PI). Angegeben sind die Halbwertszeit für die Enzym-Inhibitor-Komplexbildung in Millisekunden und die „Verzögerungszeit“ (delay time) in Sekunden, die verstreicht, bis 95 % der beiden Reaktionspartner im Komplex gebunden sind. [Nach Beatty, Bieth und Travis (9)].

Der wichtigste indirekte Hinweis dafür, daß der unspezifische proteolytische Abbau durch lysosomale Granulozytenproteinase einen entscheidenden Einfluß auf die Spiegel bestimmter Plasmaproteine ausüben kann, ergab sich aus tierexperimentellen Untersuchungen [10]. Bei dieser Studie konnte gezeigt werden, daß der gravierende, Endotoxin-induzierte Verbrauch von Blutsystemfaktoren durch frühzeitige Applikation hoher Dosen eines geeigneten exogenen Elastaseinhibitors (Bowman-Birk-Inhibitor aus Sojabohnen) signifikant vermindert wird.

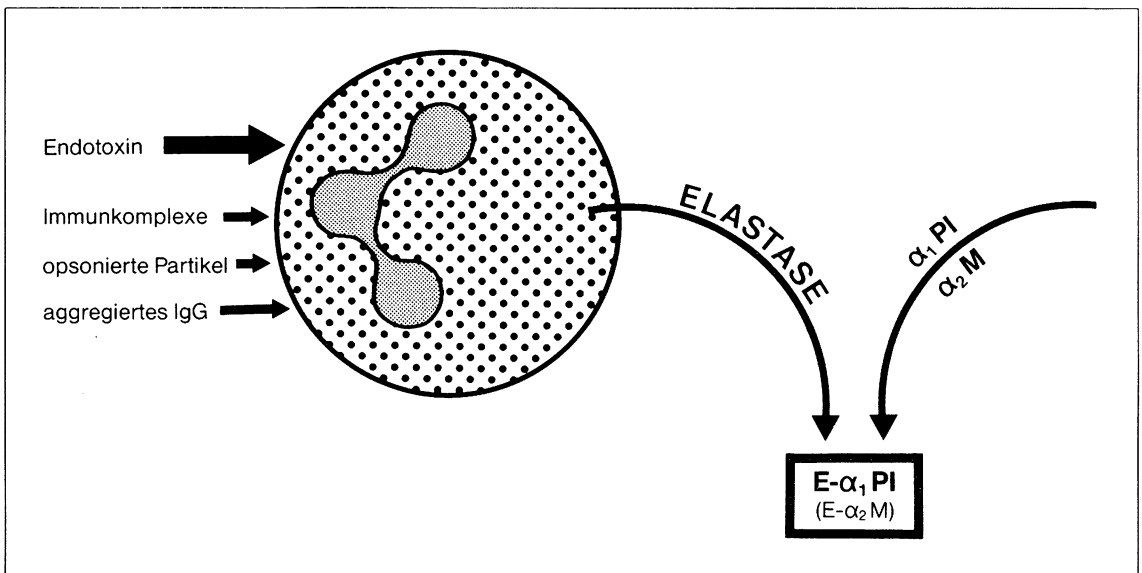


Abb. 3: Durch Stimulierung von PMN Granulozyten freigesetzte lysosomale Elastase. Sie reagiert primär mit dem  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor sowie in wesentlich geringerem Ausmaß mit  $\alpha_2$ -Makroglobulin. Im Komplex mit  $\alpha_1$ PI sind alle katalytischen Funktionen der Elastase blockiert, im Komplex mit  $\alpha_2$ M vermag die Elastase niedermolekulare synthetische Substrate noch zu hydrolysieren.

### Lysosomale Elastase als diagnostischer Marker

Aufgrund der zahlreichen, in jüngster Zeit publizierten Ergebnisse über die proteolytische Wirkung der granulozytären Elastase auf biologische Substrate *in vitro* und der indirekten Hinweise auf ihre Beteiligung an pathobiochemischen Prozessen *in vivo*, erscheint es uns aus diagnostischer Sicht besonders wichtig, das Ausmaß der Degranulierung von Leukozyten im Verlaufe von akuten Erkrankungen anhand der Freisetzung von lysosomaler Elastase exakt zu erfassen.

Während eines Entzündungsprozesses werden Neutrophile durch Endotoxin und/oder andere Entzündungsmediatoren stimuliert, wobei u. a. lysosomale Elastase aus den Zellen liberiert wird. Sie reagiert außer mit diversen Proteinen primär mit dem  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor, wobei sich ein stabiler Elastase- $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor-Komplex (E- $\alpha_1$ PI) bildet, der mit einer Halbwertszeit von ca. 1 Stunde aus der Zirkulation eliminiert wird (Abb. 3). Mittels eines Enzymimmunoassays (ELISA) ist es neuerdings möglich, die Konzentration dieses Komplexes in Plasma und anderen Körperflüssigkeiten quantitativ zu bestimmen [11; vergl. auch den nachstehenden Beitrag von NEUMANN et al.: Enzymimmunoassay für Granulozyten-Elastase im Komplex mit  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor].

Freie Elastase hingegen kann im Plasma nicht nachgewiesen werden, da normalerweise genügend nativer  $\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor vorhanden ist, um das aktive Enzym innerhalb einer gewissen, relativ kurzen Zeitspanne vollständig zu inhibieren (vgl. Tab. 4, 6). Eventuell mit synthetischen Substraten meßbare geringe Elastaseaktivitäten sind auf das Auftreten des  $\alpha_2$ -Makroglobulin-Elastase-Komplexes zurückzuführen, der jedoch sehr rasch aus der Zirkulation eliminiert wird ( $t_{1/2} \sim 10$  min).

Mit Hilfe des Enzymimmunoassays konnten wir in einer klinischen Studie den Nachweis erbringen, daß nach abdominal-chirurgischen Eingriffen Leukozytenelastase in erhöhtem Maße in das Plasma

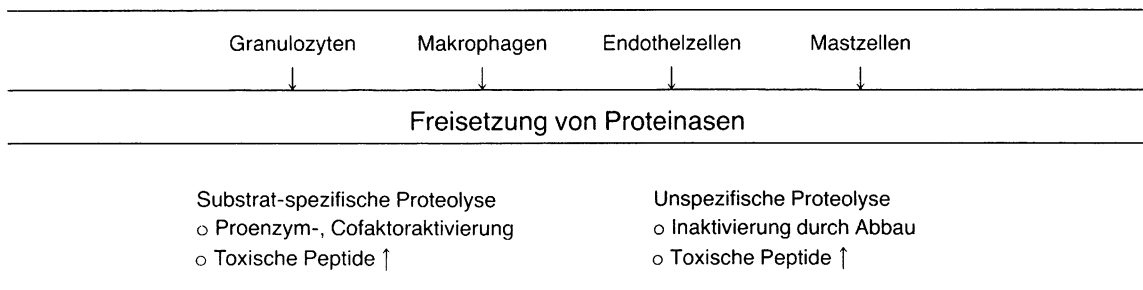


der Patienten freigesetzt wird, und daß die Höhe des Gehalts an E- $\alpha_1$ PI mit dem Schweregrad einer postoperativ auftretenden Infektion (Sepsis) korreliert [5].

Weitere Beispiele, die granulozytäre Elastase als Marker bei entzündlichen Erkrankungen betreffend, sind in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführt.

### Ausblick

Obwohl den neutralen Proteinase aus den PMN Granulozyten sicherlich eine sehr bedeutende Rolle in der Potenzierung entzündlicher Prozesse zukommt, sollte die Beteiligung weiterer lysosomaler Faktoren (klassische Cathepsine mit neutralem bis saurem pH-Optimum, Hydrolasen, Lysozym, Myeloperoxidase u.a.; oxidierende Agentien etc.) auch aus anderen Zelltypen (Tab. 4) nicht unterschätzt werden [12]. Hier sind vor allem Monozyten und Makrophagen zu nennen, die aufgrund ihrer längeren Lebenszeit bei kontinuierlicher Freisetzung gewebschädigender Produkte eine Persistenz des initialen, Granulozyten-bedingten Schadens bewirken können [13, 14]. Es sollte deshalb das Ziel zukünftiger Forschungsarbeiten sein, Methoden zur Erfassung einer Reihe weiterer, möglichst zelltypischer „Entzündungsmarker“ zu entwickeln. Es besteht aufgrund unserer heutigen Kenntnisse die berechtigte Hoffnung, daß damit der Grad der Beteiligung des einzelnen Zelltyps am Pathomechanismus der betreffenden Erkrankungen eindeutiger erfaßt sowie therapeutische Maßnahmen gezielter getroffen und hinsichtlich ihrer Wirksamkeit mittels dieser Methoden objektiviert werden können.



Tab. 4: Am Pathomechanismus entzündlicher Prozesse beteiligte Körperzellen, insbes. solche mit reicher lysosomaler Enzymausstattung. Im Verlaufe der Proenzym- und Cofaktoraktivierung sowie der Inaktivierung durch Abbau werden auch toxische Peptide frei, die das entzündliche Geschehen weiter verstärken.

## Literatur:

- [1] J.L. UNKELESS, S. GORDON, E. REICH. Secretion of plasminogen activator by stimulated macrophages. *J. Exp. Med.* **139** (1974) 834–850.
- [2] J.T. DINGLE. *Lysosomes: A Laboratory Handbook*. North-Holland Publ. Comp., Amsterdam-New York-Oxford 1977.
- [3] K. HAVEMANN, A. JANOFF. *Neutral Proteases of Human Polymorphonuclear Leukocytes*. Urban and Schwarzenberg-Verlag, Baltimore-Munich 1978.
- [4] R. EGBRING, W. SCHMIDT, G. FUCHS, K. HAVEMANN. Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood* **49** (1977) 219–231.
- [5] M. JOCHUM, K.H. DUSWALD, E. HILLER H. FRITZ. 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 (1983) 85–100.
- [6] P.S. WONG, J. TRAVIS. Isolation and properties of oxidized  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor from human rheumatoid synovial fluid. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **96** (1980) 1449–1454.
- [7] W.J. MARTIN, J.C. TAYLOR. Abnormal interaction of  $\alpha_1$ -antitrypsin and leukocyte elastolytic activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *American Review of Respiratory Disease* **120** (1979) 411–419.
- [8] N.R. MATHESON, A. JANOFF, J. TRAVIS. Enzymatic oxidation of alpha-1-proteinase inhibitor in abnormal tissue turnover. *Mol. and Cell Biochem.* **45** (1982) 65–71.
- [9] K. BEATTY, J. BIETH, J. TRAVIS. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor and  $\alpha_1$ -antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.* **255** (1980) 3931–3934.
- [10] M. JOCHUM, J. WITTE, H. SCHIESSLER, H.K. SELBMANN, G. RUCKDESCHL, H. FRITZ. Clotting and other plasma factors in experimental endotoxemia: inhibition of degradation by exogenous proteinase inhibitors. *Eur. surg. Res.* **13** (1981) 152–168.
- [11] S. NEUMANN, N. HENNRICH, G. GUNZER, H. LANG. Enzymelinked immunoassay for human granulocyte elastase in complex with  $\alpha_1$ -proteinase inhibitor. In: *Proteases: Potential Role in Health and Disease* (Hörl, W.A., Heidland, A., eds.) Plenum Press, New York, London (1984) 379–390.
- [12] S.J. KLEBANOFF, R.A. CLARK. *The Neutrophil Function and Clinical Disorders*. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, The Netherlands 1978.
- [13] A. KITAGAWA, F. TAKAKU, S. SAKAMOTO. Evidence that proteases are involved in superoxide production of human polymorphonuclear leukocytes and monocytes. *J. Clin. Invest.* **65** (1980) 74–81.
- [14] A.B. COHEN. Potential adverse effects of lung macrophages and neutrophils. *Federation Proc.* **38** (1979) 2644–2647.