

Granulozytäre Elastase als lysosomales Markerenzym für pathobiochemische Veränderungen bei entzündlichen Erkrankungen

Jochum M.¹, Duswald K.-H.², Dittmer H.² und Fritz H.¹

¹Abteilung für Klinische Chemie und Klinische Biochemie in den ²Chirurgischen Kliniken der Universität München

Summary

In the course of severe pathological processes associated with an inflammatory response — e.g. major abdominal surgery, multiple trauma etc. — various blood and tissue cells including PMN granulocytes are stimulated thereby releasing lysosomal proteinases into the circulation. Such enzymes as well as oxidizing agents normally produced intracellularly during phagocytosis — e.g. oxygen radicals or hydrogen peroxide in combination with myeloperoxidase — may strongly enhance the inflammatory response by inactivation of connective tissue structures, cell membrane constituents and soluble native substances (proteins) either by proteolytic degradation or denaturation by oxidation.

In a first approach we used the PMN granulocytic elastase (E) as a marker of such pathological release reactions. The liberated proteinase competes with susceptible protein substrates including α_1 -proteinase inhibitor (α_1 PI) and α_2 -macroglobulin being thus finally eliminated as inactive enzyme-inhibitor complexes via the reticulo endothelial system. Using a recently developed enzymelinked immunoabsorbent assay we determined the plasma levels of E- α_1 PI in patients subjected to major abdominal surgery as well as in patients suffering from multiple trauma. Whereas the operative trauma was followed by a moderate (up to 3fold) increase of the E- α_1 PI levels, post-operative septicemia was associated with a 10- to 20fold increase of the E- α_1 PI concentration. Most remarkably, a clear correlation was found between the increase of E- α_1 PI and the decrease of plasma factors such as antithrombin III, clotting factor XIII and α_2 -macroglobulin, i.e. proteins or inhibitors known to be easily accessible to proteolytic degradation or cleavage by elastase and/or other lysosomal proteinases, respectively. Multiple traumas caused also a highly significant increase of the E- α_1 PI levels up to 16 hours after accident; the amount of liberated elastase seems to correlate with the severity of injury. In these patients establishment of a clear correlation between elastase release and consumption of suitable plasma factors is complicated by massive transfusion of plasma constituents.

The results obtained so far in the different clinical trials indicate that the E- α_1 PI plasma level may be a suitable marker for the pathobiochemistry (especially for unspecific proteolysis by liberated lysosomal proteinases) as well as for the severity of inflammatory processes.

Key words:

α_1 -proteinase inhibitor
 α_2 -macroglobulin
 antithrombin III

acute phase reactants
 blood transfusions
 elastase- α_1 -proteinase inhibitor complex
 enzyme-linked immunoassay
 inflammation
 inhibitor therapy
 lysosomal proteinases
 multiple trauma
 neutrophil elastase
 phagocytosis
 plasma proteinase inhibitors
 polymorphonuclear granulocytes
 septicemia
 unspecific proteolysis

Schlüsselwörter

α_1 -Proteinaseinhibitor
 α_2 -Makroglobulin
 Antithrombin III
 Akutphasenproteine
 Bluttransfusionen
 Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplex
 Enzymimmunoassay
 Entzündung
 Inhibitortherapie
 lysosomale Proteinasen
 Multiples Trauma
 neutrophile Elastase
 Phagozytose
 Plasma-Proteinaseinhibitor
 polymorphkernige Granulozyten
 Sepsis
 unspezifische Proteolyse

Einleitung

Schwere Verletzungen oder Infektionen lösen die sog. „Entzündungsantwort“ des Organismus aus. Diese Antwort schließt, neben anderen Reaktionen, die Aktivierung sowohl von humoralen (Gerinnungs-, Fibrinolyse-, Komplement- und Kallikrein/Kinin-Kaskaden) wie auch von zellulären Systemen (Phagozyten, Mastzellen, Lymphozyten und Streßhormon-produzierenden Zellen) ein.

Phagozyten, wie z. B. polymorphkernige Granulozyten und Makrophagen, enthalten in ihren zahlreichen Lysosomen eine Enzymausstattung mit großer hydrolytischer oder proteolytischer Wirksamkeit (Dingle, 1977). Normalerweise nützt die Zelle dieses enzymatische Potential, zusätzlich zu oxidierenden Agenzien, im wesentlichen für zwei Aufgaben (Klebanoff und Clark, 1978):

1. zur Aufrechterhaltung des intrazellulären Proteinkata-

bolismus einschließlich des Abbaus verbrauchter endogener Substanzen, und

2. zur Abwehr invasiver Organismen durch Degradierung von Viren und Bakterien nach erfolgter Phagozytose.

Werden die lysosomalen Enzyme jedoch extrazellulär freigesetzt, so können sie die Entzündungsantwort auf zweierlei Weise verstärken (Abb. 1):

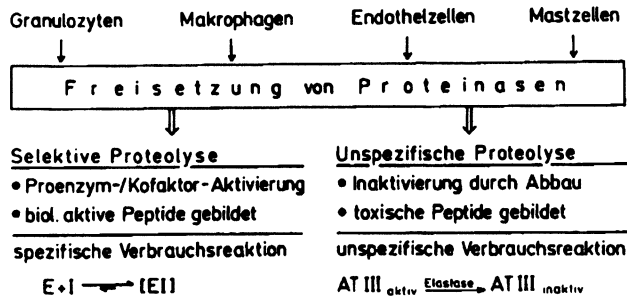


Abbildung 1: Proteolytische Prozesse, ausgelöst durch die Freisetzung lysosomaler Proteinase aus verschiedenen Körperzellen.

Durch **selektive Proteolyse** werden Proenzyme und/oder Cofaktoren aktiviert, wodurch es auch zur Bildung biologisch hochwirksamer Peptide, wie z.B. der Kinine und Anaphylatoxine, kommt. Die aktiven Proteinase werden schließlich durch spezifische Interaktionen mit ihren Zielinhibitoren eliminiert. Auf diese Weise sind Reaktionsmechanismen von hoher Selektivität verantwortlich für den sog. **spezifischen Verbrauch** von Faktoren der Gerinnungs-, Fibrinolyse-, Komplement- und Kallikrein-Kinin-Kaskaden.

Durch **unspezifische Proteolyse** werden lösliche Proteine inaktiviert oder Strukturelemente proteolytisch „verdaut“. Solche **unspezifischen Verbrauchsreaktionen** können ebenfalls begleitet sein von der Bildung toxischer Peptide, wie etwa die der gerinnungshemmenden Fibrin/ogen-spaltprodukte.

Lysosomale Proteinase

Von den bisher bekannten lysosomalen Proteinase verdienen die im **neutralen pH-Bereich wirksame Elastase** und das **Kathepsin G** aus polymorphkernigen Granulozyten besonderes Interesse. Ähnlich den sauren Thiol- und Aspartatproteinase — den Kathepsinen im engeren Sinne — sind sie in den Lysosomen bereits in voll aktiver Form gespeichert. Abgesehen von ihrem großen mengenmäßigen Vorkommen ist vor allem eine nahezu **unbegrenzte Spaltungsspezifität** der Elastase und des chymotrypsinähnlichen Kathepsin G bemerkenswert (Abb. 2).

Lysosomale Proteinase (vorgebildet)

| neutrale (pH 6—9) | saure (pH 3—7) |
|-------------------------------|---------------------------------|
| ● Elastasen | ● Cathepsin B |
| ● Cathepsin G | ● Cathepsine H, L |
| ○ Collagenasen | ● Cathepsine A, C |
| ○ Kininogenasen (Kallikreine) | ● Cathepsin D (Leukokinogenase) |
| ● spalten unspezifisch | ○ spalten spezifisch |

Abbildung 2: Lysosomale Proteinase aus polymorphkernigen Granulozyten.

Diese beiden Enzyme sind nicht nur in der Lage, zahlreiche humorale Faktoren einschließlich Proteinaseinhibi-

toren zu degradieren, sondern auch Strukturelemente wie Elastin und Kollagen Typ III und IV. Die potentielle lysosomale Verdauungskapazität wird durch die Synthese von mehr als 1g neutraler Proteinase pro Tag klar belegt. Durch ihr Vorkommen in membranumgebenen Organellen bzw. durch die Anwesenheit von Cytosolinhibitoren (Kopitar et al., 1980) wird ihre proteolytische Aktivität innerhalb der Zellen jedoch wirksam kontrolliert.

Plasma-Proteinaseinhibitoren

Den extrazellulär freigesetzten lysosomalen Proteinase stehen normalerweise sehr potente Antagonisten, die bekannten Plasma-Proteinaseinhibitoren (Abb. 3) gegenüber (Travis und Salvesen, 1983).

| Abb. | Inhibitor | K_i $\times 10^{-3}$ | Durchschnittskonzentration ng/100 ml | μ mol/l | Zielenzyme |
|--------------|-------------------------------------|---------------------------|---|-------------|---|
| α_2M | α_2 -Makroglobulin | 725 | 260 | 3,6 | Neutrale und saure Proteinase, Thiolproteinase |
| α_1PI | α_1 -Proteinaseinhibitor | 50 | 260 | 52 | Neutrale Proteinase aus Leukozyten, Pankreas u. anderen Geweben |
| α_1C | α_1 -Antichymotrypsin | 70 | 45 | 6,4 | Chymotrypsin, Kathepsin G |
| β_2C | β_2 -Kollagenaseinhibitor | 40 | 1,5 | 0,4 | Kollagenasen (Metalloenzyme) |
| α_2II | inter- α_2 -Trypsininhibitor | 180 | 45 | 2,6 | Trypsin, Chymotrypsin, Akrosin Plasmin |
| AT III | Antithrombin III | 65 | 26 | 4,0 | Gerinnungsenzyme |
| α_2PI | α_2 -Plasmininhibitor | 70 | 6 | 0,9 | Fibrinolytische Enzyme |
| C1 INA | C1-Inaktivator | 100 | 24 | 2,4 | Komplementenzyme, Kallikrein |

Abbildung 3: Plasma-Proteinaseinhibitoren und ihre Zielenzyme.

α_2 -Makroglobulin (α_2M) hemmt sowohl Serinproteinase wie auch Thiol-, Aspartat- und Metalloproteinase. Aufgrund seines hohen Molekulargewichtes ist die Funktion dieses Inhibitors allerdings überwiegend auf das Gefäßsystem beschränkt.

α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1PI , früher α_1 -Antitrypsin), der wichtigste Gegenspieler der lysosomalen Elastase aus Granulozyten, tritt in bemerkenswert hoher Konzentration im Blut auf; daneben ist er jedoch auch in der interstitiellen Flüssigkeit und mukösen Sekreten zu finden.

α_1 -Antichymotrypsin (α_1AC), ein sehr schnell reagierendes Akutphasenprotein — es steigt während der Entzündungsantwort bis zum 6fachen seiner Normalkonzentration an —, stellt einen wirkungsvollen Hemmstoff für das lysosomale Kathepsin G aus Granulozyten und die Chymase aus Mastzellen dar.

Im Vergleich zu den genannten Inhibitoren ist die Konzentration der übrigen plasmatischen Hemmstoffe deutlich geringer. Nichtsdestoweniger repräsentieren, abgesehen von Albuminen und Immunglobulinen, Proteinaseinhibitoren ca. 60% der übrigen Plasmaproteine. Dies ist sicherlich als indirekter Hinweis auf die Bedeutung von Proteinaseinhibitoren als regulatorisches Prinzip im Organismus zu werten.

Die Assoziierung zwischen den bekannten Plasma-Proteinaseinhibitoren und ihren Zielenzymen ist in Abb. 4 schematisch wiedergegeben.

Die excessive Aktivierung der Blutsysteme wird hauptsächlich von drei Inhibitoren kontrolliert: **Antithrombin III (AT III)** reguliert die Gerinnung, **α_2 -Plasmininhibitor (α_2PI)** die Fibrinolyse und der **C1-Inaktivator (C1-INA)** beide, die klassische Komplement- wie auch die intrinsic Gerinnungskaskade.

Das Auftreten von Komplexen zwischen α_2 -Makroglobulin und Plasmakallikrein oder Plasmin im Plasma unter bestimmten pathologischen Bedingungen weist

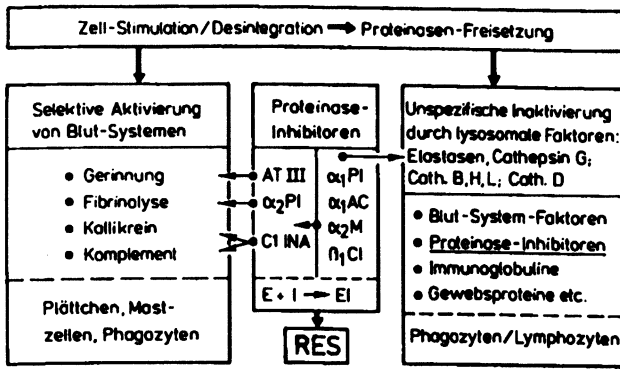


Abbildung 4:

Aktivierungs- und Verbrauchsreaktionen: spezifische Aktivierung von Blutsystemen durch systemspezifische Proteinase (linker Teil); unspezifischer Abbau von Plasmafaktoren durch lysosomale Proteinase (rechter Teil); Komplexbildung mit Proteinaseinhibitoren und Eliminierung der Enzym/Inhibitor-Komplexe (EI) durch Phagozyten des Retikulo-endothelialen Systems (RES; mittlerer Teil).

darauf hin, daß dieses multifunktionelle Glykoprotein auch an der Regulation der Blutsystemkaskaden beteiligt ist. Jedoch besteht ohne Zweifel die hervorragende protektive Rolle dieses Inhibitors in der Verhinderung unspezifischer Proteolyse durch Komplexierung aller Klassen von freigesetzten lysosomalen Proteinase während des Entzündungsgeschehens. Bemerkenswerterweise reagiert das α_2M beim Menschen, im Gegensatz zu α_1PI , α_1AC , α_2PI und C1-INA, nicht als Akutphasenprotein, obwohl es als der wichtigste endogene Plasma-Proteinaseinhibitor angesehen wird.

Durch die Hemmung von aktivierten oder liberierten Proteinase wird auch die Bildung vasoaktiver oder toxischer Peptide, wie die der Kinine und Anaphylatoxine, unterdrückt. Darüber hinaus kommt es aber auch zur Verminderung der Proteolyse-induzierten Stimulierung von zellulären Systemen, beispielsweise der Thrombin-abhängigen Plättchenaggregation oder Anaphylatoxin-ausgelösten Chemotaxis von Granulozyten. Zieht man also die eminent wichtige regulatorische Bedeutung endogener Proteinaseinhibitoren in Betracht, so stellt ihr Verbrauch durch unspezifische Proteolyse einen der erstaunlichsten pathologischen Effekte lysosomaler Proteinase dar. Wie wir vor einiger Zeit zeigen konnten, wird z.B. AT III bereits durch katalytische Mengen granulozytärer Elastase *in vitro* sehr rasch inaktiviert (Jochum et al., 1981 a). Das gleiche gilt für α_2PI und C1-INA (Brower und Harpel, 1982). Sogar α_1PI , der Hauptantagonist der granulozytären Elastase, kann durch ein lysosomales Metalloenzym aus Makrophagen proteolytisch inaktiviert werden (Banda et al., 1980). Darüber hinaus bewirkt die Oxidation des Methioninrestes im reaktiven Zentrum des α_1PI eine signifikante Reduktion der Affinität dieses Inhibitors zur granulozytären Elastase (Beatty et al., 1980). Solch oxidierende Agenzien, wie z.B. Superoxid, Hydroxylradikale und Wasserstoffperoxid werden zur Erleichterung des intrazellulären Proteinabbaus in großen Mengen in den Phagozytomen produziert und dürften unter pathologischen Bedingungen gemeinsam mit lysosomalen Enzymen freigesetzt werden (Klebanoff und Clark, 1978).

Schwere Verletzungen oder Infektionen können also den Verbrauch von Proteinaseinhibitoren über drei Wege induzieren:

1. durch Komplexierung freigesetzter lysosomaler oder aktivierter Plasmaproteinase,
2. durch proteolytische Inaktivierung und
3. durch oxidative Denaturierung.

Der letztgenannte Mechanismus verdient besondere Aufmerksamkeit im Hinblick auf die vermutete pathologische

Wirkung der Elastase. Zwar ist der oxidierte α_1 -Proteinaseinhibitor noch in der Lage — wenn auch deutlich verlangsamt —, die granulozytäre Elastase zu hemmen, der gebildete Komplex wird jedoch sehr schnell wieder durch Substanzen mit höherer Affinität zur Elastase, z.B. Elastin, dissoziiert. Der oxidierte Inhibitor kann somit also den Abbau natürlicher Substrate der Elastase kaum verhindern (Travis, persönliche Mitteilung). Dazu kommt, daß, im Gegensatz zum nativen Inhibitor, der oxidierte α_1PI überhaupt nicht mit der lysosomalen Elastase aus dem Pankreas reagiert, deren Freisetzung im pankreatogenen Schock von zusätzlicher pathologischer Wirkung sein dürfte.

Freisetzungsmechanismen und Nachweis liberierter lysosomaler Proteinase

Von hervorragender Bedeutung sind zweifelsohne diejenigen Mechanismen, die für eine mehr oder weniger dramatische extrazelluläre Freisetzung lysosomaler Enzyme verantwortlich sind (Abb. 5).

Freisetzungsmechanismen für lysosomale Proteinase

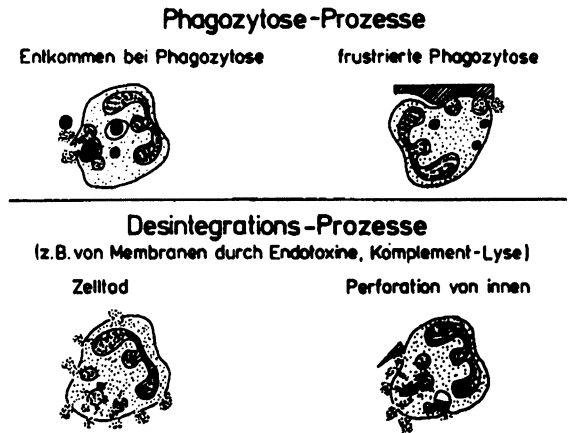


Abbildung 5:

Extrazelluläre Freisetzung lysosomaler Proteinase (modifiziert nach Klebanoff und Clark, 1978).

Während nur geringe Mengen durch normale Phagozytose aus der Zelle entkommen sollten, werden relativ große Enzymkonzentrationen durch die frustrane Phagozytose von Strukturelementen wie Membranbruchstücken oder Knorpelteilen liberiert. Zellerstörungsprozesse, verursacht von endogenen oder exogenen Endotoxinen — eventuell in Verbindung mit Komplementlyse —, stellen äußerst dramatische Vorgänge dar, die letztlich zur Freisetzung der gesamten lysosomalen Inhaltsstoffe führen.

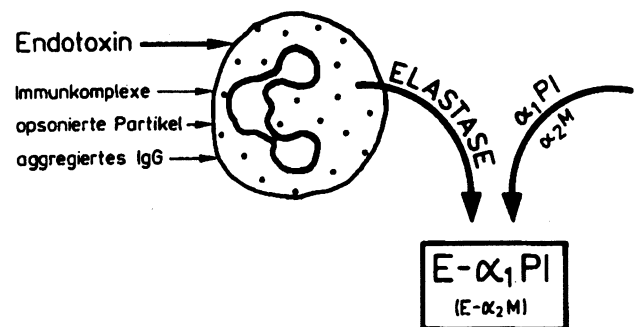


Abbildung 6:

Freisetzung lysosomaler Elastase (E) aus polymorphkernigen Granulozyten und Komplexbildung mit α_1 -Proteinaseinhibitor (α_1PI ; ca. 90 %) bzw. α_2 -Makroglobulin (α_2M ; ca. 10 %).

Aus Granulozyten liberierte Elastase liegt in der Zirkulation vornehmlich (ca. 90 %) in Form des Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplexes (E- α_1 PI) vor (Abb. 6). Ein geringer Teil (ca. 10 %) kann auch an α_2 -Makroglobulin gebunden (E- α_2 M) auftreten. Im Gegensatz zum E- α_1 PI-Komplex wird der E- α_2 M-Komplex jedoch sehr viel rascher aus der Zirkulation eliminiert ($t_{1/2} \sim 10$ min gegenüber $t_{1/2} \sim 1$ h), sodaß die Bestimmung des E- α_2 M-Komplexes im Plasma besondere Nachweismethoden von extremer Sensitivität erfordert.

Die an α_1 PI gebundenen Elastasespiegel (im folgenden auch als E- α_1 PI bezeichnet!) können sehr genau mit einem neuentwickelten **Enzymimmunoassay** (Neumann et al., 1981) gemessen werden (Abb. 7).

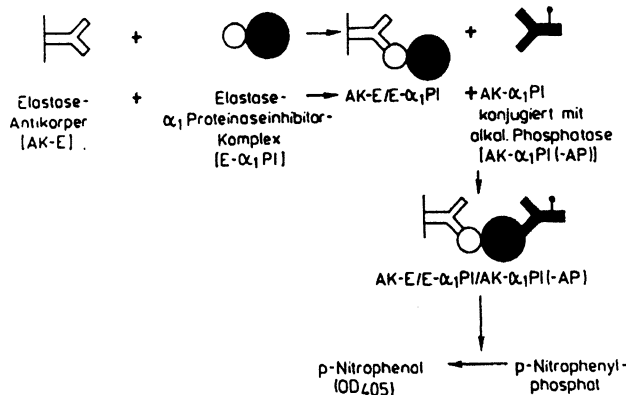


Abbildung 7: Prinzip des Enzymimmunoassays für die Bestimmung des Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplexes (E- α_1 PI).

AK-E = Antikörper gegen humane granulozytäre Elastase.

AK- α_1 PI (-AP) = Antikörper gegen humanen α_1 -Proteinaseinhibitor, markiert mit alkalischer Phosphatase.

Erläuterungen siehe Text.

Der E- α_1 PI-Komplex aus Plasmaproben oder anderen Körperflüssigkeiten wird an Festphasen-gebundene Antikörper gegen humane granulozytäre Elastase (AK-E) gekoppelt. Nach mehreren Waschschrritten wird mit einem Antikörper gegen α_1 -Proteinaseinhibitor inkubiert, der seinerseits mit alkalischer Phosphatase markiert ist [AK- α_1 PI (-AP)]. Die Aktivität der auf diese Weise an den E- α_1 PI-Komplex gebundenen alkalischen Phosphatase gegen p-Nitrophenylphosphat ist proportional der Konzentration der komplexierten Elastase in der Probe.

Klinische Studien

Multiples Organversagen während schwerer Entzündungen oder nach Polytrauma betrifft vorwiegend Lungen, Leber und Nieren. Diese Organe sind besonders reichhaltig an Zellen mit potenter lysosomaler Enzymausstattung. Darüber hinaus stellt die rasche Sequestrierung von polymorphkernigen Granulozyten in den Lungen während der Entzündungsreaktion ein bekanntes Phänomen dar. Deshalb sollte ein Zusammenhang zwischen der klinisch beobachtbaren Abfolge eines Organversagens und der inhärenten Funktion der Lysosomen dieses Organs ernsthaft in Betracht gezogen werden.

Freisetzung granulozytärer Elastase nach schweren abdominalen Operationen

In unserer ersten prospektiven klinischen Studie wurden in mehr als 120 Patienten die Plasmaspiegel der komplexierten Elastase in geeigneten Zeitintervallen nach abdominalchirurgischen Eingriffen untersucht. Von den Patienten, die als Folge der Operation eine schwere Infektion erlitten, erfüllten nur 30 prospektiv festgelegte, allge-

mein anerkannte Sepsiskriterien (Jochum et al., 1983 a). Vierzehn von ihnen überlebten die Infektion (Gruppe B), während die übrigen 16 Patienten (Gruppe C) an den Folgen der Sepsis verstarben. Elf Patienten, die die Operation komplikationslos überstanden, dienten als Kontrolle (Gruppe A). Im Vergleich zu gesunden Probanden bzw. präoperativen Werten (unterhalb 110 ng/ml) verursachte das operative Trauma in den Gruppen A und B eine Zunahme des E- α_1 PI-Spiegels bis zum Dreifachen der Norm (Abb. 8). Die erhöhten präoperativen Werte in Gruppe C hingegen wurden durch 6 Patienten hervorgerufen, die bereits vor dem Eingriff eindeutige Infektionszeichen (z.B. eitrige Peritonitis) aufwiesen; die geringfügige postoperative Abnahme lag wahrscheinlich in der chirurgischen Entfernung des Infektionsherdes begründet.

Im Gegensatz zur Gruppe A blieben die E- α_1 PI-Werte in den Gruppen B und C über mehrere Tage nach der Operation deutlich erhöht. Zum Zeitpunkt der Diagnose der Sepsis wurden jedoch hochsignifikant gestiegene Spiegel der komplexierten Elastase gemessen, entsprechend einer im Mittel bis zur 6fachen respektive 10fachen Erhöhung in den Gruppen B und C. Individuelle Spitzenwerte lagen über 2.500 ng/ml in beiden Patientenkollektiven. Interessanterweise blieben in Patienten mit persistierender Sepsis (Gruppe C) die E- α_1 PI-Spiegel bis zum letalen Ausgang stark erhöht, während eine Erholung von der Infektion (Gruppe B) durch eine Abnahme der komplexgebundenen Elastase bis zum Normalbereich begleitet war.

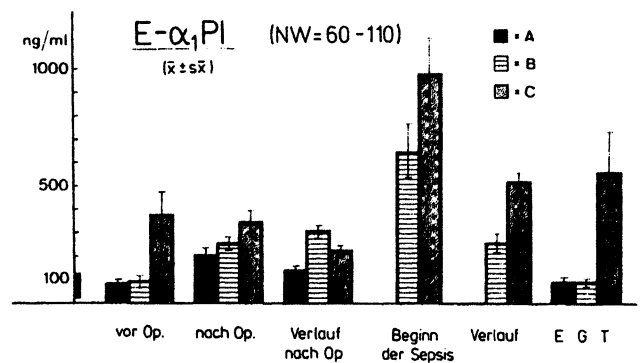


Abbildung 8: Plasmaspiegel an Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplex (E- α_1 PI) von Patienten nach abdominalchirurgischen Operationen.

A = Patienten ohne postoperative Infektion (n = 11).

B = Patienten, die die postoperative Infektion überlebten (n = 14).

C = Patienten, die an der postoperativen Infektion verstarben (n = 16).

Die E- α_1 PI-Konzentrationen sind angegeben als Mittelwerte für den Tag vor der Operation, für den Tag nach der Operation, den Zeitraum vor Beginn einer Sepsis und für den Verlauf der Septikämie. Die letzte Bestimmung erfolgte am Tag der Entlassung (E) in der Gruppe A, am Tag der Genesung (G) in Gruppe B und vor Eintritt des Todes (T) in Gruppe C.

Parallel zu den E- α_1 PI-Werten wurden auch die Plasmaspiegel anderer Faktoren gemessen, von denen wir erwarteten, daß sie ein typisches Bild des entzündlichen Stimulus widerspiegeln.

Das Hemmverhalten von Antithrombin III (AT III), dem wichtigsten regulatorischen Inhibitorprotein der Gerinnungskaskade, zeigte im Vergleich zur komplexierten Elastase ein inverses Muster (Abb. 9). Insbesondere beim Auftreten einer Sepsis und während des nachfolgenden Sepsisverlaufes wurden AT-III-Werte (unter 60 % der Norm) erreicht, die aus klinischer Sicht als erhöhtes Risiko für Hyperkoagulabilität und disseminierte intravasale Gerinnung anzusehen sind.

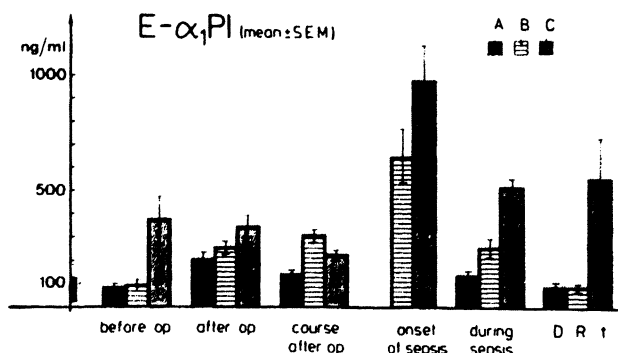
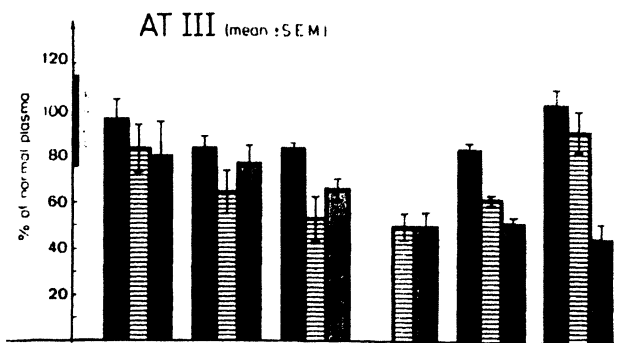


Abbildung 9: Vergleich des Gehaltes von Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplex (E- α_1 PI) mit der inhibitorischen Aktivität von Antithrombin III (AT III) im Plasma von Patienten nach abdominalchirurgischen Eingriffen.

Weitere Erläuterungen siehe Abb. 8.

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

| Parameter | | Sepsis | Prefinal | Genesung |
|---------------------------------|---|--------|----------|----------|
| E- α_1 PI Komplex | c | ↑↑ | ↑↑ | n |
| Antithrombin III | a | ↓↓ | ↓↓ | n |
| Faktor XIII | a | ↓↓ | ↓↓ | n |
| α_2 -Makroglobulin | a | ↓↓ | ↓↓ | n |
| | c | ↓↓ | ↓↓ | n-↓ |
| C-reactives Protein | c | ↑↑ | ↑↑ | n |
| α_1 -Proteinaseinhibitor | a | n-↓ | n-↓ | n-↓ |
| α_2 -Plasmininhibitor | a | n | n | n |
| α_1 -Antichymotrypsin | c | ↓ | n | n |
| C1 Inaktivator | a | n-↓ | n | n-↓ |
| | c | n | n | n |

^a Aktivitätstest ^c Konzentrationsbestimmung (immun.)

Abbildung 10: Korrelation zwischen den Plasmaspiegeln von Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplex (E- α_1 PI) und anderen Plasmafaktoren in Sepsis-Patienten nach abdominalchirurgischen Operationen.

Die Aktivitätsmuster für den fibrinstabilisierenden Gerinnungsfaktor F XIII und den polyvalenten Proteinaseinhibitor α_2 -Makroglobulin entsprachen dem des Antithrombin III; sie sind in Abb. 10 zusammengefaßt: hochpathologische Werte zu Beginn der Sepsis und präfinal, normale Spiegel bei Überwinden der Infektion. Das Verhalten des Akutphasereaktanten C-reaktives Protein (CRP) wies große Parallelen zum Elastasespiegel auf, gab jedoch bei genauerer Betrachtung den Verlauf der Sepsis weit weniger spezifisch wieder (Jochum et al., 1983 b).

Im Gegensatz zu den bisher erwähnten Faktoren konnten für die ebenfalls in Abb. 10 dargestellten Proteinaseinhibitoren (α_1 PI, α_2 PI, α_1 AC und C1-INA) keine signifikanten krankheitsbedingten Veränderungen und damit auch keine Korrelationen zum E- α_1 PI-Spiegel nachgewiesen werden. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich in dem Umstand zu suchen, daß diese Inhibitoren gleichzeitig auch als Akutphaseproteine reagieren. Somit dürfte der Verbrauch der Hemmstoffe über die Komplexierung ihrer Zielenzyme oder anderer Inaktivierungsreaktionen gerade kompensiert werden durch eine gesteigerte Produktion dieser Proteine während des Entzündungsprozesses.

Fassen wir die Ergebnisse dieser klinischen Studie zusammen, so konnte klar gezeigt werden, daß bei einer schweren entzündlichen Erkrankung wie der Sepsis eine eindeutige Korrelation zwischen der Freisetzung der **granulozytären Elastase** — eines wichtigen lysosomalen Markerenzym — und der klinischen Situation des Patienten bzw. dem Verbrauch ausgewählter Plasmafaktoren besteht. Wir nehmen dies als deutlichen Hinweis dafür, daß extrazellulär liberierte lysosomale Faktoren, speziell granulozytäre Proteinase, beträchtlich zur Entzündungsreaktion des Organismus in Form des **unspezifischen Abbaus** von Plasmaproteinen und anderen biologischen Substraten beitragen. Diese Ansicht wird zudem durch Ergebnisse aus einer experimentellen Studie über die Endotoxinämie beim Hund unterstützt (Jochum et al., 1981 b). Durch eine frühzeitige Applikation exogener Proteinaseinhibitoren konnte der Endotoxin-induzierte Verbrauch verschiedener Plasmaproteine (u. a. AT III und F XIII) hochsignifikant vermindert werden.

Freisetzung granulozytärer Elastase nach Polytrauma

In einer vorläufigen Studie wurde die Freisetzung granulozytärer Elastase in polytraumatisierten Patienten über einen Zeitraum von 100 Stunden nach dem Unfallgeschehen verfolgt. Die Probenentnahmen wurden direkt nach Aufnahme in die Klinik, dann zunächst 4stündlich, später 6stündlich und gegen Ende der Beobachtungsperiode 12stündlich durchgeführt. Die Zunahme der komplexierten Elastase bis zur 12., in einzelnen Fällen bis zur 16. Stunde nach Trauma entsprach erstaunlich genau dem Schweregrad der zugrundeliegenden Verletzungen (Abb. 11). Die Schweregradeinteilung in drei Gruppen erfolgte nach einem Bewertungsschema („Essener Punkteskala“), das in einer gemeinsamen Sitzung der Unfallchirurgen der Universitätskliniken Essen, München und Hannover im Juli 1981 in Essen erstellt wurde und im DFG-Schwerpunktprogramm „Grundmechanismen des posttraumatischen progressiven Lungenversagens“ niedergelegt ist. Die Verletzungsskala berücksichtigt vor allem das Ausmaß des Gewebetraumas und den zu erwartenden Blutverlust. Patienten der Gruppe I ($\bar{x} = 6,3 \pm 0,6$ Punkte) zeigten im Mittel eine Erhöhung des E- α_1 PI-Komplexes bis auf das 5fache des Normalbereiches, die Patienten der Gruppe II ($\bar{x} = 10,0 \pm 1,0$ Punkte) bis auf das 10fache.

In der Gruppe III ($\bar{x} = 15,3 \pm 1,0$ Punkte), bei den Schwereverletzten also, wurden Spitzenwerte bis zum 20–30-fachen der Norm gemessen. Während der weiteren Beobachtungsperiode war eine signifikante Abnahme der Elastasespiegel in Richtung Normalwerte in allen Patienten zu verzeichnen.

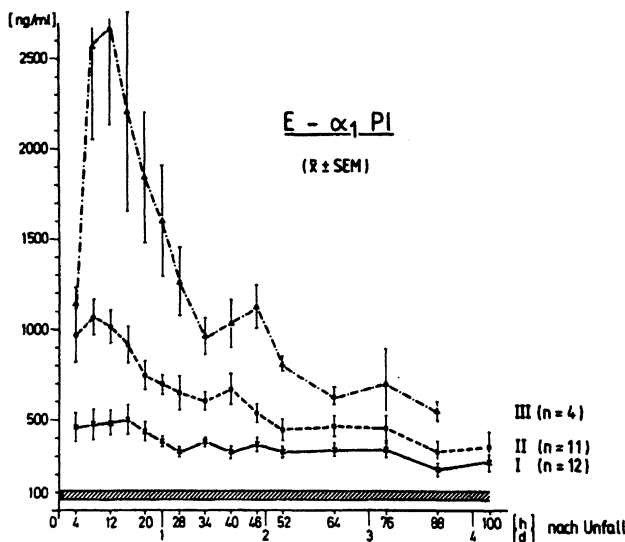
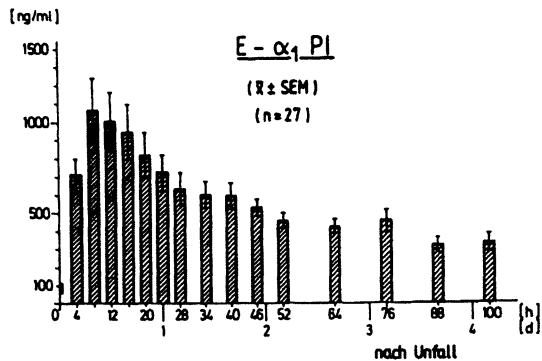


Abbildung 11: Plasmaspiegel des Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplexes (E- α_1 PI) in Patienten nach Polytrauma. Das Gesamtkollektiv ($n = 27$) wurde anhand einer Verletzungsskala („Essener Punkteskala“) in drei Schweregrade eingeteilt (I = leicht verletzt; II = mittelschwer verletzt; III = schwerst verletzt):

| Gruppe | Punkte |
|-----------------|------------|
| I ($n = 12$) | 6,3 + 0,6 |
| II ($n = 11$) | 10,0 + 1,0 |
| III ($n = 4$) | 15,3 + 1,0 |

Normalbereich von E- α_1 PI: 60–110 ng/ml

Weitere Erläuterungen siehe Text.

Überraschenderweise zeigte sich keine Korrelation zwischen der Menge an komplexierter Elastase und anderen Plasmafaktoren wie z.B. Antithrombin III, Faktor XIII, Prothrombin, α_2 -Makroglobulin, Plasminogen oder α_2 -Antiplasmin. Als eine mögliche Ursache für dieses im Vergleich zur Sepsis so unterschiedliche Verhalten haben wir daher die z. T. sehr hohen Mengen an transfundiertem Blut bei Polytraumapatienten vermutet. Die Bestimmung der Plasmaaktivitäten von Antithrombin III, Prothrombin und α_2 -Makroglobulin in Abhängigkeit von der Lagerungsdauer der Blutkonserven ergab Normalwerte bzw. nur unwesentlich erniedrigte Konzentrationen über einen Zeitraum von 35 Tagen. Der Gehalt an komplexierter Elastase stieg jedoch aufgrund des Zerfalls von Granulozyten während dieser Beobachtungsphase beträchtlich auf das mehr als 60fache der Norm an (Ergebnisse hier nicht dar-

gestellt!). Aus diesen Befunden und dem Verhalten der Plasmafaktoren bei Polytrauma-Patienten zogen wir zwei Schlüsse:

1. Aufgrund massiver Bluttransfusionen und relativ langer Halbwertszeiten der untersuchten Blutproteine auch in der Zirkulation bleiben die Konzentrationen dieser Faktoren in den Patientenplasmen nahezu unbeeinträchtigt von der frühen endogenen Freisetzung granulozytärer Proteinase nach Polytrauma.
2. Hohe Spiegel von komplexierter Elastase, als Maß für die in vivo-Freisetzung lysosomaler Enzyme nach einem traumatischen Geschehen, könnten auch durch Bluttransfusionen vorgetäuscht sein.

Um letzteres auszuschließen, haben wir bei drei mit großen Blutmengen substituierten Patienten die tatsächlich gemessene E- α_1 PI-Konzentration mit einem hypothetischen Spiegel verglichen, der unter Einbeziehung der transfundierten Menge und der bekannten Eliminierungshalbwertszeit des Komplexes (ca. 1 Stunde) berechnet wurde. Die mit den Blutkonserven applizierten E- α_1 PI-Mengen zeigten jedoch in keinem Fall einen signifikanten Einfluß auf den Kurvenverlauf des E- α_1 -Spiegels im Patientenplasma, sodaß davon ausgegangen werden kann, daß die gemessene Elastase in vivo freigesetzt wurde. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß neben der Freisetzung aus körpereigenen Leukozyten erhebliche Mengen auch aus transfundierten Granulozyten in die Zirkulation liberiert wurden.

Die bisher vorliegenden Ergebnisse aus der Polytraumastudie haben gezeigt, daß aufgrund massiven Blutfaktorenersatzes durch Transfusionen eine Beziehung zwischen der Freisetzung von lysosomalen Proteinase und einem Verbrauch von humoralen Faktoren systematisch kaum zu belegen ist. Erste Untersuchungen zum Nachweis von Proteolyse-induzierten Spaltprodukten, wie z.B. den Fibrin/ogenspaltprodukten, bestätigen jedoch klar die aktive Beteiligung eines offenbar überschießenden proteolytischen Potentials an der Entzündungsantwort des Organismus auch bei diesen Patienten.

Freisetzung granulozytärer Elastase bei weiteren Erkrankungen (Abb. 12).

PMN Elastase als Marker entzündlicher Reaktionen

| Anwendungsbereich | Bedeutung erhöhter E- α_1 -PI-Spiegel |
|---------------------------|---|
| Postoperative Infektionen | Diagnose, Verlauf, Prognose (Sepsis) |
| Polytrauma/Schocklunge | Schweregrad, Verlauf, Komplikationen (Sepsis) |
| Schwangerschaftsgestosen | Früherkennung des ARDS |
| Rheumat. Erkrankungen | Differenzierung { entzündlich/nicht entzündlich entzündlich/maligne |
| Pleuraergüsse | |
| Hämodialyse | Eignung/Effekt von Dialysemembranen |
| Myeloische Leukämien | Verbesserte Klassifizierung: normale/defekte Enzymausstattung leukämischer Zellen |

Abbildung 12: Polymorphkernige (PMN) Elastase als Marker entzündlicher Reaktionen unter verschiedenen pathologischen Bedingungen. Literaturhinweise siehe Text.

Eine mögliche diagnostische Signifikanz von komplexierter granulozytärer Elastase wurde kürzlich bei Gestose (Schlebusch et al., 1983) und Rheumatoider Arthritis (Kleesiek et al., 1982) untersucht. In Verbindung mit spezifi-

schen klinischen Parametern scheint der Elastasespiegel im Plasma eine frühe Diagnose eines „Adult Respiratory Distress Syndrome“ (ARDS) bzw. eine Differenzierung zwischen entzündlichen und nicht-entzündlichen Stadien eines Krankheitsverlaufes zu erlauben. Letzteres dürfte auch für pathologische Vorgänge zutreffen, die zu Pleuraergüssen führen (Bayer et al., 1983). Darüber hinaus hat sich der E- α_1 PI-Gehalt auch als sensitiver Marker für die Stimulierung von Granulozyten durch Fremdoberflächen während der Hämodialyse erwiesen (Hörl et al., 1983). Untersuchungen zur lysosomalen Enzymausstattung von Leukämiezellen und der Freisetzung von Elastase bei Leukämiepatienten unter bestimmten klinischen und therapeutischen Bedingungen repräsentieren ein weiteres Anwendungsgebiet, welches allerdings nicht direkt in Bezug zur Entzündung steht (Hiller und Jochum, 1983).

Resümée

Bei schweren entzündlichen Prozessen werden eine Reihe verschiedener Zellarten (Granulozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Mastzellen etc.) stimuliert oder desintegriert. Hierdurch kommt es zur Freisetzung hochwirksamer lysosomaler Enzyme, wobei den Proteinasen eine ganz besondere pathogenetische Bedeutung zugemessen werden muß. Studien aus unserem Arbeitskreis und auch von anderen Autoren (Egbring et al., 1977) weisen deutlich darauf hin, daß eine **substratspezifische Proteolyse** durch lysosomale Proteinasen, vor allem durch **granulozytäre Elastase**, beträchtlich zum Verbrauch von extrazellulären Proteinen beiträgt. Die Menge an komplexierter Elastase (E- α_1 PI) gibt offensichtlich sowohl die Intensität des entzündlichen Stimulus wie auch die Reaktionsfähigkeit der Granulozyten wieder. In den meisten Fällen repräsentiert jedoch die Zunahme des E- α_1 PI in der Zirkulation nur das systemische Signal eines lokalen Entzündungsvorganges, weshalb für eine diagnostische Interpretation des E- α_1 PI-Gehaltes im Plasma die klinische Situation des Patienten besonders sorgfältig berücksichtigt werden muß. Dessen ungeachtet sollte zur Vermeidung eines deletären endogenen Proteinase/Proteinaseinhibitor-Ungleichgewichtes die frühzeitige Applikation eines geeigneten, exogenen Inhibitors gegen lysosomale Enzyme einen positiven therapeutischen Effekt auch beim Menschen zeitigen.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Sonderforschungsbereiche 51 (B/30) und 0207 (LP 8) München, unterstützt.

Wir sind Dr. S. Neumann und Dr. H. Lang, Biochemische Forschung E. Merck, Darmstadt, für die Bereitstellung des E- α_1 PI-Enzymimmunoassays zu großem Dank verpflichtet.

Die hervorragende technische Assistenz von Frau U. Hof und Frau C. Seidl verdient besondere Anerkennung.

Literatur:

- Banda, M. J., Clark, E. J., and Werb, Z. (1980): Limited proteolysis by macrophage elastase inactivated human α_1 -proteinase inhibitor. *J. Exp. Med.* 152, 1563—1570.
- Bayer, P. M., Lanschützer, H., Knoth, E., Klech, H., and Kummer, F., (1983): Elastase-Inhibitor-Komplex in der Differentialdiagnose von Pleuraergüssen. *Lab. med.* 7, 106.
- Beatty, K., Beith, J., and Travis, J. (1980): Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized α_1 -proteinase inhibitor and α_1 -antichymotrypsin. *J. Biol. Chem.* 255, 3931—3934.

Brower, M. S., and Harpel, P. C. (1982): Proteolytic cleavage and inactivation of α_2 -plasmin inhibitor and C1-inactivator by human polymorphonuclear leukocyte elastase. *J. Biol. Chem.* 257, 9849—9854.

Dingle J. T. (1977): *Lysosomes: A laboratory handbook.* North-Holland Publ. Comp., Amsterdam — New York — Oxford.

Egbring, R., Schmidt, W., Fuchs, G., and Havemann, K. (1977): Demonstration of granulocytic proteases in plasma of patients with acute leukemia and septicemia with coagulation defects. *Blood* 49, 219—231.

Jochum, M., Lander, S., Heimbürger, N., and Fritz, H. (1981a): Effect of human granulocytic elastase on isolated human antithrombin III. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* 362, 103—112.

Jochum, M., Witte, J., Schiessler, H., Selbmann, H. K., Ruckdeschl, G., and Fritz, H. (1981b): Clotting and other plasma factors in experimental endotoxemia: Inhibition of degradation by exogenous proteinase inhibitors. *Europ. Surg. Res.* 13, 152—168.

Jochum, M., Duswald, K.-H., Hiller, E., and Fritz, H. (1983a): Plasma levels of human granulocytic elastase- α_1 -proteinase inhibitor complex (E- α_1 PI) in patients with septicemia and acute leukemia. In: *Selected Topics in Clinical Enzymology* (Goldberg, D. M. and Werner, M., eds.), Walter de Gruyter Verlag Berlin, 85—100.

Jochum, M., Duswald, K.-H., Dittmer, H., and Neumann, S. (1983b): Elastase- α_1 -proteinase inhibitor complex (E- α_1 PI) and C-reactive protein (CRP): Early indicators of inflammatory processes. In: *Marker Proteins in Inflammation. Vol II.* Edited by Walter de Gruyter. In press.

Hiller, E., and Jochum, M. (1983): Plasma levels of human granulocytic elastase- α_1 -proteinase inhibitor complex (E- α_1 PI) in leukemia. *Blut*, accepted for publication.

Hörl, W. H., Jochum, M., Heidland, A., and Fritz, H. (1983): Release of granulocyte proteinases during hemodialysis. *Am. J. Nephrol.* 3, 213—217.

Kopitar, M., Giraldi, T., Locnikar, P., and Turk, V. (1980): Biochemical and biological properties of leukocyte intracellular inhibitors of proteinases. In: *Macrophages and Lymphocytes, Part, A.*, Escobar, M. R., and Friedman, H. (eds.), Plenum Publishing Corp., New York, NY, 75—83.

Klebanoff, S. J., and Clark, R. A. (1978): *The Neutrophil. Function and clinical disorder.* North-Holland Publ. Comp., Amsterdam—New York—Oxford.

Neumann, S., Hennrich, N., Gunzer, G., and Lang, H. (1981): Enzyme-linked immunoassay for elastase from leukocytes in human plasma. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 19, 232.

Schlebusch, H., Garstka, G., Rommelsheim, K., Grönn, U., and Stoeckel, H. (1983): Biochemische Befunde bei Gestose-Patientinnen mit Lungenkomplikationen. *Anästh. Intensivther. Notfallmed.* 18, 187—192.

Travis, J., and Salvesen, G. S. (1983): Human plasma proteinase inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* 52, 655—709.

Anschrift des Verfassers:

Frau Dr. M. Jochum
Abteilung Klinische Chemie
Chir. Klinik Innenstadt
der Universität München
Nußbaumstraße 20
D-8000 München 2