

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

G 86/1016

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 α_1 -Proteinaseinhibitor	
S. Neumann, G. Gunzer, N. Hennrich und H. Lang	9
Elastase- α_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. Grönn	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
Elastase-Inhibitor-Komplexe in der Differentialdiagnose von Pleuraergüssen	
P. M. Bayer, H. Lanschützer, E. Knoth, H. Klech und F. Kummer	53
Zur Bedeutung der Bestimmung des Elastase- α_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

Freisetzung von Granulozyten-Elastase bei akutem Nierenversagen und während der Hämodialysebehandlung bei chronisch niereninsuffizienten Patienten ^{*})

W.H. HÖRL ¹⁾, M. JOCHUM ²⁾, S. NEUMANN ³⁾ und A. HEIDLAND ⁴⁾

¹⁾ Abteilung Innere Medizin IV, Universitätsklinik Freiburg.

²⁾ Abteilung für Klin. Chemie und Klin. Biochemie in der Chirurg. Klinik Innenstadt der Universität München.

³⁾ E. Merck, Darmstadt.

⁴⁾ Medizinische Universitätsklinik Würzburg

^{*}) Mit Unterstützung durch die DFG, Ho 781/3–3 und des Sonderforschungsbereichs (Universität München) 207, LP 8

Einleitung

Trotz intensiver experimenteller und klinischer Untersuchungen ist die Pathogenese der katabolen Stoffwechsellage in Kombination mit einer chronischen oder akuten Niereninsuffizienz weitgehend unklar. Solche Patienten leiden häufig an Malnutrition und werden durch Komplikationen wie Sepsis oder intestinale Blutungen hyperkatabol. Glukose-, Aminosäuren- und Eiweißverluste während der Hämo- oder Peritonealdialyse begünstigen zusammen mit dem Verlust an wasserlöslichen Vitaminen die Entstehung der katabolen Stoffwechselsituation [1, 2].

Zwei Ursachen sollen für den Eiweißkatabolismus während der Hämodialyse verantwortlich sein:

1. Aktivierung der Glukoneogenese, um Glukoseverluste (vor allem bei glukosefreiem Dialysat) zu ersetzen.
2. Eiweißabbau, um die Aminosäurenverluste auszugleichen.

Die Zugabe von Glukose ins Dialysat läßt jedoch den dialysebedingten Katabolismus unbeeinflusst [3]. Die kontinuierliche Zufuhr von Aminosäuren während der Dialysebehandlung führt nicht immer zu einer Abnahme des dialysebedingten Proteinkatabolismus [4].

Methodik

Untersucht wurden in der vorliegenden Studie 70 terminal niereninsuffiziente Patienten mit einem mittleren Alter von $48,8 \pm 1,4$ Jahren (Mittelwerte \pm SEM) und einer dreimaligen wöchentlichen Hämodialysebehandlung seit $39,4 \pm 3,5$ Monaten. Die Grunderkrankung war bei 44 Patienten eine chronische Glomerulonephritis, bei 9 Patienten eine chronische Pyelonephritis bzw. interstitielle Nephritis, bei 10 Patienten eine polyzystische Nierendegeneration, bei 6 Patienten eine diabetische Glomerulosklerose und bei einem Patienten ein Alport-Syndrom. Die Harnstoff-N-Werte lagen vor der Dialyse bei $82,3 \pm 3,2$ mg/dl, die Kreatininwerte bei $12,9 \pm 0,4$ mg/dl, die Hämoglobinkonzentration bei $8,4 \pm 0,2$ g% und der Hämatokrit bei $27,9 \pm 0,7\%$. Untersucht wurden ferner 12 gesunde Kontroll-Personen im Alter zwischen 22 und 39 Jahren, sowie 12 Patienten mit postoperativem oder posttraumatischem akutem Nierenversagen im Alter zwischen 19 und 45 Jahren.

Neutrale PMN Proteinasen wurden in Blutaussstrichen nach der Methode von KLESSEN [5] nachgewiesen. Die Bestimmung der Granulozyten-Elastase, gemessen als Elastase- α_1 -Proteinaseinhibitor-Komplex (E- α_1 PI) wurde nach NEUMANN et al. [6] durchgeführt. Die Bestimmung der Plasmaproteasenaktivität erfolgte mit Azocasein oder Phosphorylase-Kinase, isoliert aus Skelettmuskulatur von Kaninchen, als Substrate [7, 8]. Die Proteinkonzentration im Plasma nach

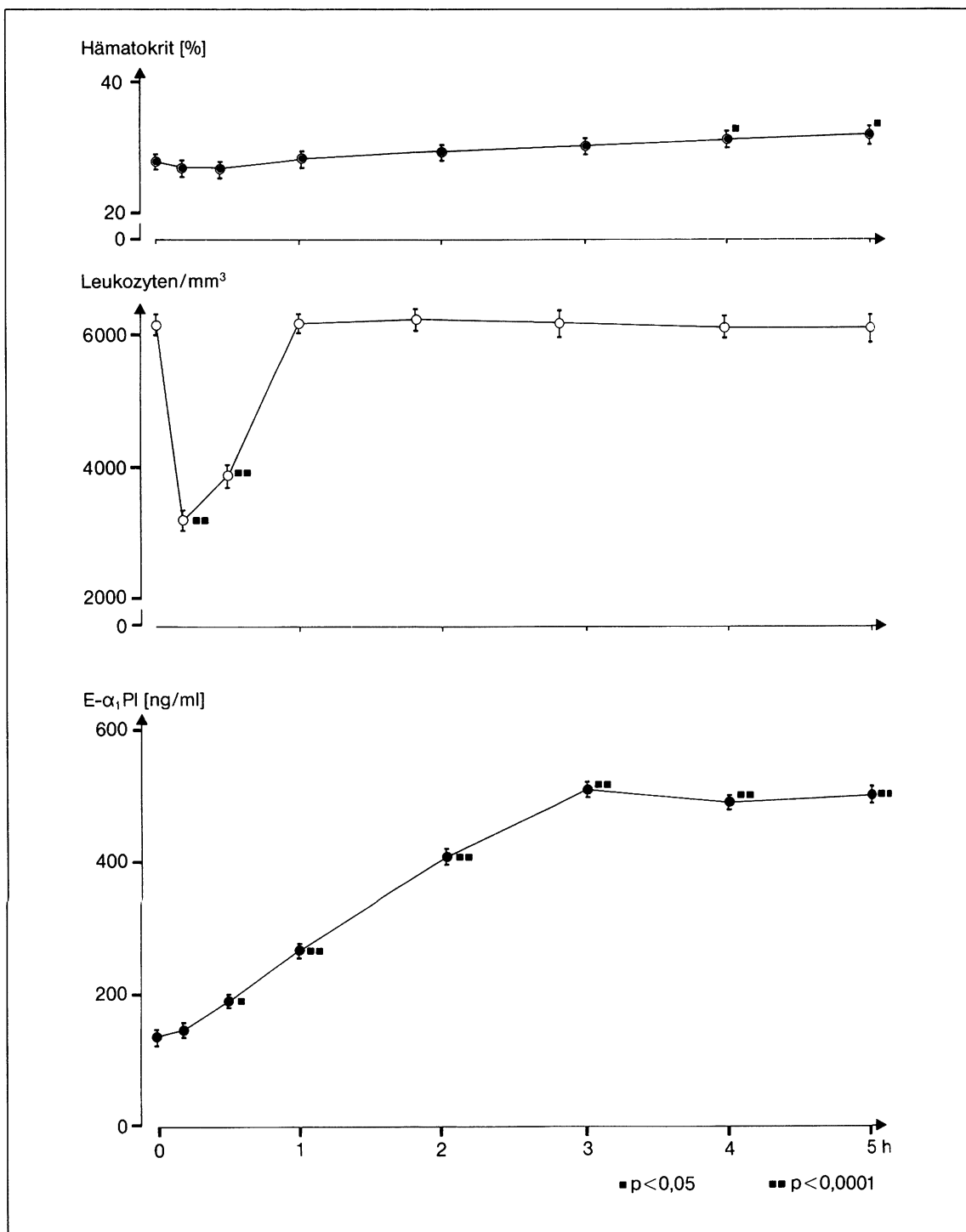


Abb. 1: Einfluß der Hämodialysebehandlung auf Leukozytenzahl, Plasmakonzentration von Elastase mit α_1 -Proteinaseinhibitor (E- α_1 PI) und Hämatokrit. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM von 70 Patienten vor und während 5stündiger Hämodialysebehandlung.
p: vor vs. während Dialyse

Trichloressigsäurefällung wurde wie früher beschrieben [9] ermittelt. Die Polyacrylamid-Gel-elektrophorese in Gegenwart von SDS wurde nach WEBER und OSBORN [10] durchgeführt.

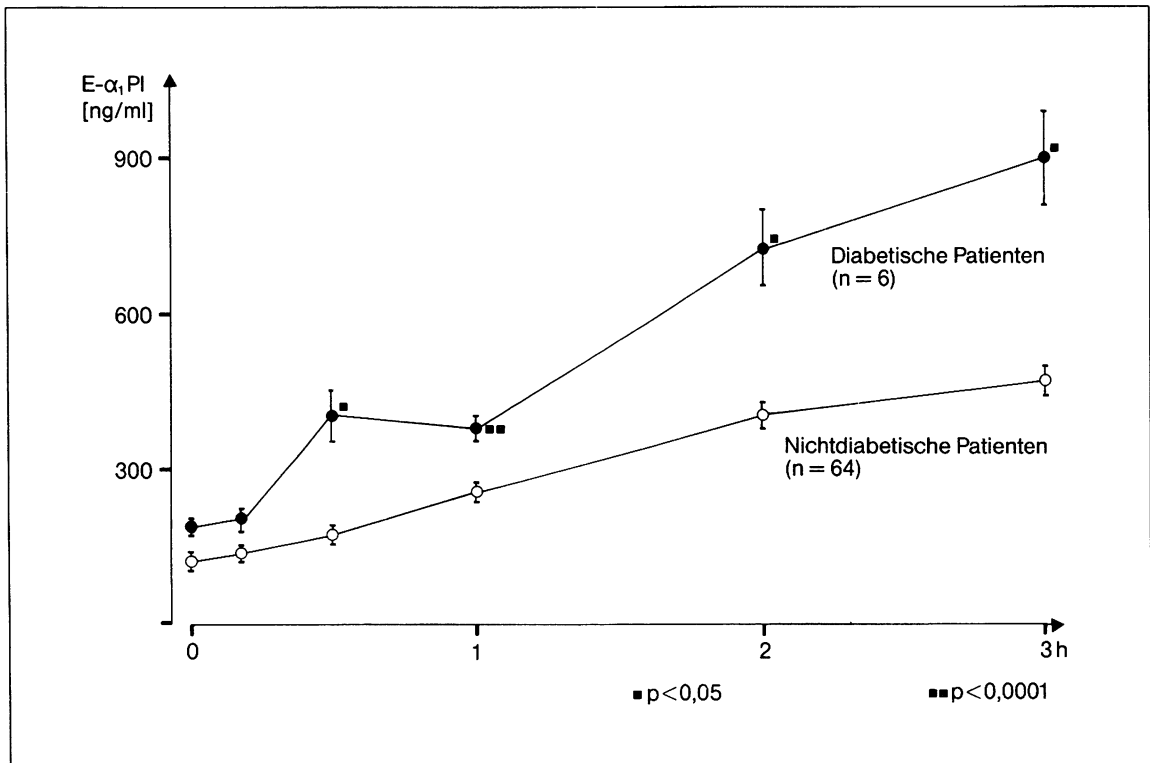


Abb. 2: Einfluß der Hämodialysebehandlung auf die Plasma-E- α_1 PI-Konzentration von 6 diabetischen und 64 nicht diabetischen Dauerdialysepatienten. Die Ergebnisse sind dargestellt als Mittelwerte \pm SEM vor und innerhalb 3 Stunden nach Beginn der Hämodialysebehandlung.
p: vor vs. während Dialyse

Ergebnisse

Abb. 1 zeigt den Abfall der Leukozytenzahl unmittelbar nach Einleitung der Hämodialysebehandlung. 60 Minuten nach Hämodialysetherapie liegt die Leukozytenzahl wieder im Normbereich. Die Konzentration von E- α_1 PI erhöht sich vom Zeitpunkt 0 bis 3 Stunden nach Beginn der Hämodialysebehandlung, um während der weiteren Dialysedauer auf einem Plateau um 500 ng/ml komplexierter Elastase zu bleiben.

Signifikant am höchsten war die Freisetzung von Granulozyten-Elastase während der Hämodialysebehandlung bei Patienten mit diabetischer Glomerulosklerose (Abb. 2), kein sicherer Unterschied ergab sich bei Patienten mit Glomerulonephritis, Pyelonephritis oder Zystennieren. 33 Patienten zeigten nur wenig erhöhte E- α_1 PI-Spiegel, während die E- α_1 PI-Konzentrationen bei 37 Patienten über 400 ng/ml lagen, davon bei 13 Patienten über 800 ng/ml (Normalwert: ca. 60 ng/ml). Maximalspiegel von 2700 ng/ml wurden bei 2 Patienten ermittelt.

Der zytochemische Nachweis von Leukozytenproteasen wurde bei Patienten mit akuter und chronischer Niereninsuffizienz nach KLESSEN [5] durchgeführt. Nach Fixierung mit Formalin/Sublimat und Inkubation mit Borat-Puffer läßt sich bei Blutaussstrichen gesunder Kontroll-Personen ein Lysishof rund um die Leukozyten nachweisen, hervorgerufen durch eine proteolytische Verdauung benachbarter Erythrozyten und von Plasmaeiweiß (Abb. 3). Ein derartiger Lysishof um die Leukozyten ist bei Patienten mit akutem Nierenversagen wesentlich geringer ausgeprägt (Abb. 4). Auch

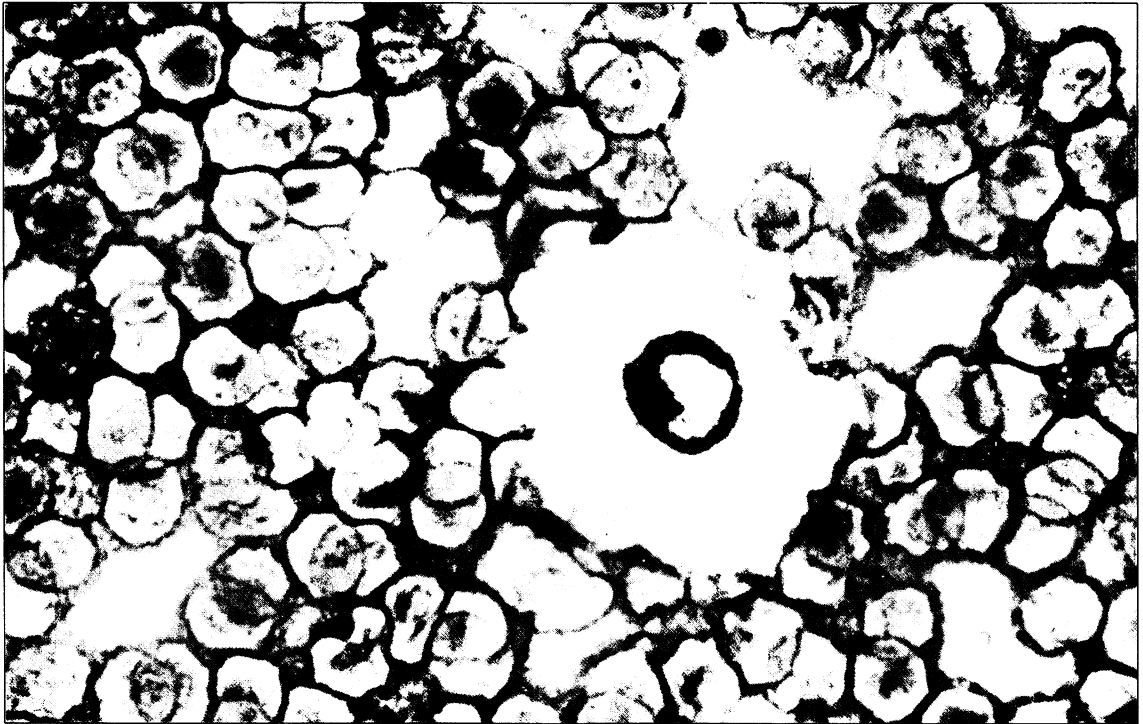


Abb. 3: Blutausstrich einer gesunden Kontroll-Person. Die Fixierung erfolgte mit Formalin/Sublimat. Der Ausstrich wurde mit 0,25 M NaCl/Borat-Puffer (pH 8,5) für 120 Minuten bei 37°C inkubiert und mit kolloidalem Eisen gefärbt.

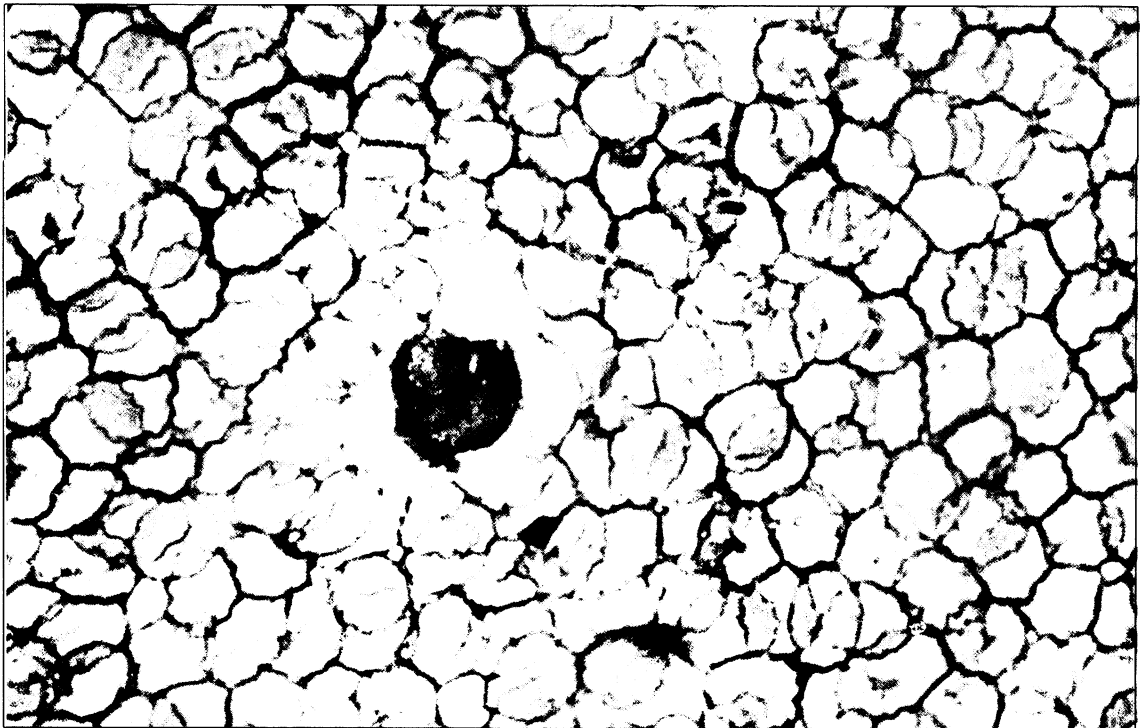


Abb. 4: Blutausstrich eines Patienten mit akutem Nierenversagen. Inkubationsbedingungen siehe Legende zu Abb. 3.

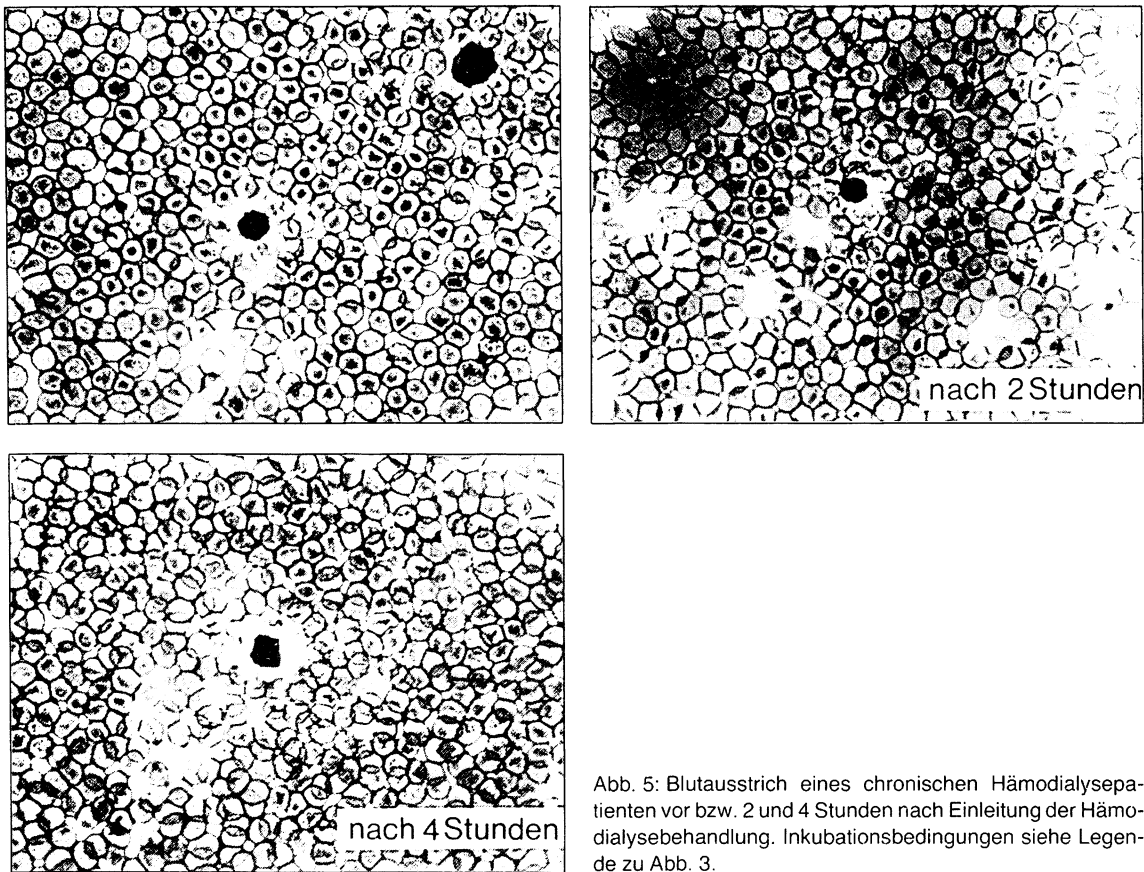


Abb. 5: Blutausstrich eines chronischen Hämodialysepatienten vor bzw. 2 und 4 Stunden nach Einleitung der Hämodialysebehandlung. Inkubationsbedingungen siehe Legende zu Abb. 3.

bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz ist nur ein schmaler Lysishof um die Leukozyten nachweisbar (Abb. 5). 2 Stunden nach Einleitung der Hämodialysebehandlung fehlt der Lysishof rund um die Leukozyten gänzlich und läßt sich in nahezu „normaler“ Ausprägung etwa 4 Stunden nach Beginn der Hämodialysebehandlung wieder in vitro induzieren (Abb. 5).

Mit Azocasein als Substrat ließ sich im Plasma von 12 chronisch niereninsuffizienten Patienten eine unspezifische Proteasenaktivität ermitteln ($0,127 \pm 0,019$ U/mg Protein), wobei dieser Wert für die Patienten mit akutem Nierenversagen doppelt so hoch lag. Unter der Hämodialysebehandlung kommt es zu einer signifikanten Abnahme dieser unspezifischen Proteasenaktivität in den Normbereich (Tab. 1).

Minuten nach Dialysebeginn	0	10	30	60	120	180
U/mg Protein	0,127	0,103	0,095	0,087	0,059*	0,037**
	$\pm 0,019$	$\pm 0,014$	$\pm 0,013$	$\pm 0,013$	$\pm 0,010$	$\pm 0,007$

Tab. 1: Einfluß der Hämodialysetherapie auf die Plasmaproteinasen-Aktivität. Substrat: Azocasein
Mittelwerte \pm SEM von 12 Patienten. Gesunde Kontrollen: $0,052 \pm 0,004$ ($p < 0,01$)
p: vor vs. während Dialyse
(* $p < 0,01$; ** $p < 0,001$)

Minuten nach Dialysebeginn			Stunden nach Dialysebeginn				
0	10	30	1	2	3	4	5
1,036	1,037	1,011	1,074	0,931*	0,840**	0,755**	0,727**
± 0,029	± 0,030	± 0,032	± 0,086	± 0,0365	± 0,035	± 0,038	± 0,035

Tab. 2: Einfluß der Hämodialysebehandlung auf die Proteinkonzentration (mg/ml) im Plasmaüberstand nach Trichloressigsäurefällung

Mittelwerte ± SEM von 70 Patienten

p: vor vs. während Dialyse

(* p < 0,05; ** p < 0,0001)

Tab. 2 zeigt die Proteinkonzentration im Plasmaüberstand nach Trichloressigsäurepräzipitation bei 70 Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz. Unmittelbar vor Einleitung der Hämodialysebehandlung wurde ein Mittelwert von $1,036 \pm 0,29$ mg/ml ermittelt. Während der 5stündigen Hämodialysebehandlung kommt es zu einem signifikanten Rückgang auf $0,727 \pm 0,35$ mg/ml, jedoch nicht bis in den Normbereich un behandelter Kontroll-Personen von $0,246 \pm 0,019$ mg/ml. Für Patienten mit posttraumatischem akuten Nierenversagen wurde ein Vergleichswert von $1,650 \pm 0,110$ mg/ml ermittelt.

Im ultrafiltrierten Plasma (Molekulargewicht < 50000) von Patienten mit Polytrauma und akutem posttraumatischem Nierenversagen gelang der Nachweis einer proteolytischen Verdauung der Untereinheiten α , β und γ von Phosphorylase-Kinase. Während Plasmafraktionen des Patienten H. H. innerhalb von 10 Stunden 50 % der α -Polypeptidkette und die γ -Untereinheit komplett proteolytisch degradierten (Abb. 6), kam es durch Plasmafraktionen des Patienten T. Sch. innerhalb von 9 Stunden zu einer kompletten proteolytischen Verdauung der γ -Untereinheit und zu einer etwa 80 %igen proteolytischen Degradation der α - und β -Untereinheiten (Abb. 7). Innerhalb von 24 Stunden war durch Plasmaproben dieser Patienten die gesamte Phosphorylase-Kinase (Molekulargewicht 1,3 Mill.) vollständig proteolytisch degradiert.

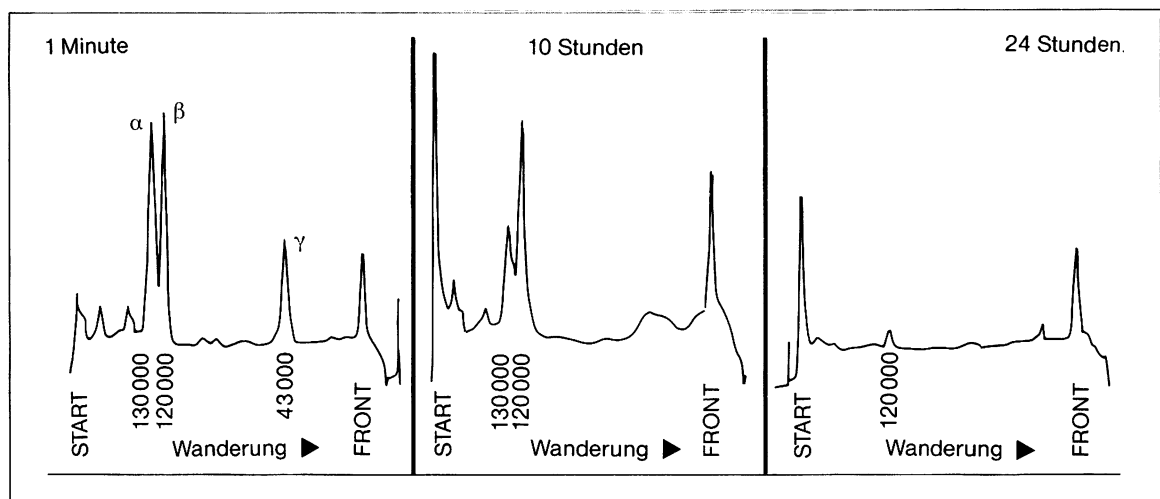


Abb. 6: Verdauung von Phosphorylase-Kinase durch Ultrafiltrat des Patienten H.H. mit posttraumatischem akuten Nierenversagen. 0,1 ml des gereinigten Enzymes (1,5 mg pro ml) wurden bei 37°C mit 0,1 ml Ultrafilter (Molekulargewicht < 50000) inkubiert. Proben zu je 20 µl wurden nach einer Minute, nach 10 und 24 Stunden entnommen, mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Weber und Osborn [10] aufgetrennt und densitometrisch ausgewertet (O.D. 583 nm).

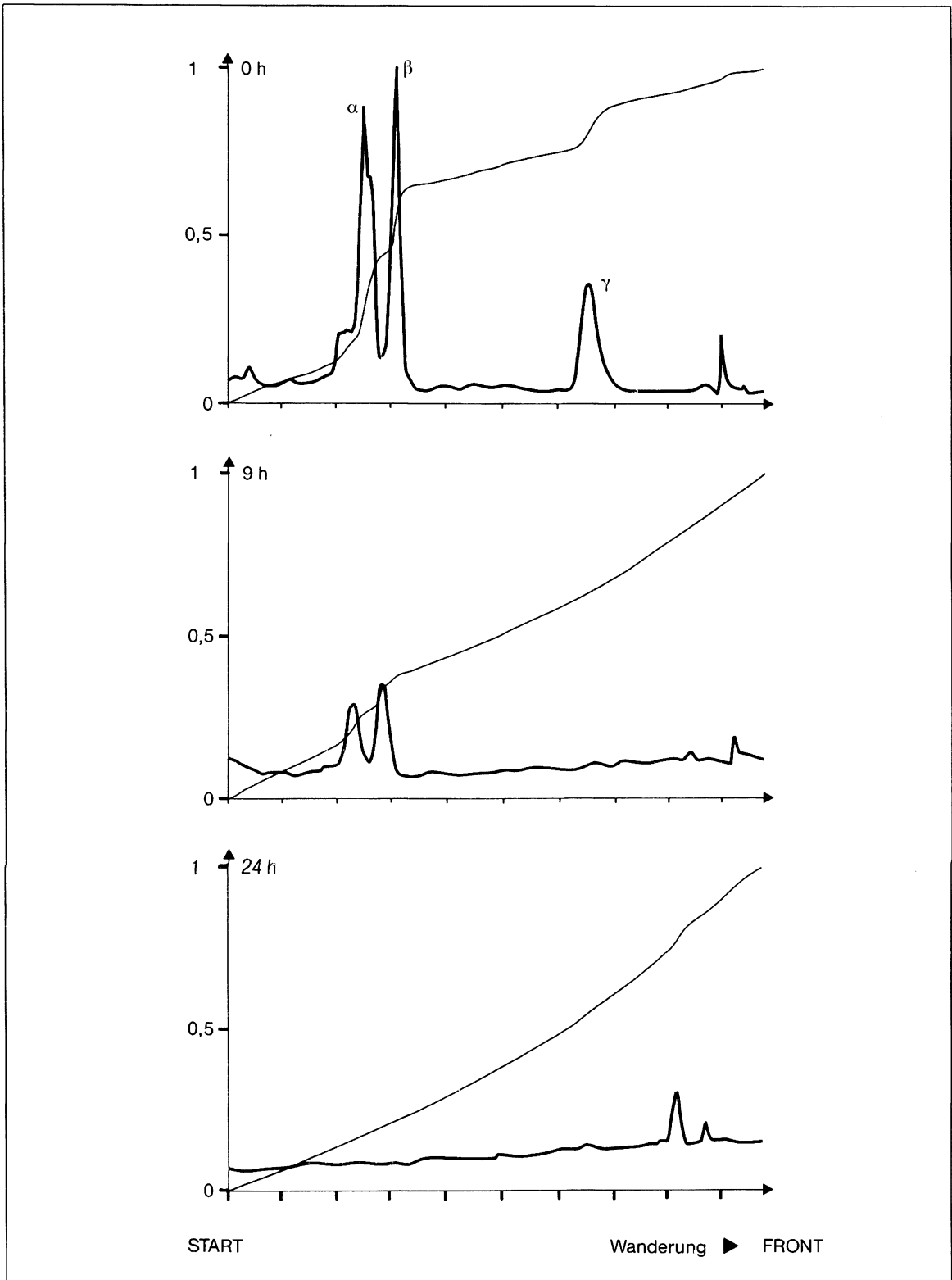


Abb. 7: Verdauung von Phosphorylase-Kinase durch Ultrafiltrat des Patienten T.S. mit Tourniquet-Syndrom und post-traumatischem akuten Nierenversagen. Proben wurden zum Zeitpunkt 0 sowie nach 9 und 24 Stunden entnommen, übrige Versuchsbedingungen siehe Legende zu Abb. 6.

Diskussion

Neutrophile Granulozyten enthalten ein breites Spektrum an proteolytischen Enzymen, die u. a. in Abwehr und Verdauung eindringender Mikroorganismen involviert sind [11], nämlich die neutralen Proteasen Elastase [11, 12], Cathepsin G [13] und Kollagenase [14, 15] sowie die sauren Proteasen Cathepsin B und D. Lysosomale Proteasen können freigesetzt werden durch Zelltod, während der Phagozytose, sowie bei Reaktionen mit Antigen-Antikörper-Komplexen, aktivierten Komplementkomponenten (C3a, C5a) und toxischen Substanzen (Endotoxine) [16, 17].

Parallel mit dem Abfall der Leukozytenzahl durch den Kontakt der Leukozyten mit der Cuprophanmembran kam es zu einem Anstieg der Granulozyten-Elastase, gemessen als Elastase- α_1 -Proteinase-Inhibitor-Komplex (E- α_1 PI) mit einem Maximalwert 3 Stunden nach Initiierung der Hämodialysebehandlung. Signifikant am höchsten war die Elastasefreisetzung während der Hämodialysebehandlung bei diabetischen Patienten, jedoch ohne sicheren Unterschied bei Patienten mit chronischer Glomerulonephritis, Pyelonephritis oder polyzystischer Nierendegeneration. Bei diabetischen Dialysepatienten läßt sich besonders häufig eine Malnutrition nachweisen, charakterisiert durch erheblichen Gewichtsverlust, verminderten Armumfang sowie erniedrigtes Serum-Albumin und Serum-Transferrin [18]. Die Freisetzung von Granulozyten-Elastase während der Hämodialysebehandlung resultiert u. E. aus dem Kontakt der Blutzellen mit der Membran des Dialysators. Solch ein Kontakt kann zu einer sog. frustranen Phagozytose führen, die bekanntermaßen mit einer extrazellulären Freisetzung lysosomaler Proteinase einhergeht.

Die verminderte proteolytische Aktivität der polymorphkernigen Leukozyten, nachgewiesen in vitro in Blutaussstrichen von Patienten unter der Hämodialysebehandlung und bei Patienten mit akutem Nierenversagen, spricht dafür, daß die neutralen Granulozytenproteinase unter diesen Bedingungen bereits in vivo freigesetzt worden sind. Da die Leukopenie nicht parallel einhergeht mit der Freisetzung der Granulozyten-Elastase während der Hämodialysebehandlung, muß eine Leukostase in der Lunge, hervorgerufen durch Komplementaktivierung durch die Membran des Dialysators, als weitere Quelle einer lokalen lysosomalen Enzymfreisetzung diskutiert werden [19]. Obwohl die Konzentration des dominierenden Elastase-Inhibitors α_1 PI (α_1 -Antitrypsin) während der Hämodialysebehandlung im Plasma unverändert blieb, könnte eine lokale Freisetzung von Granulozyten-Elastase zusammen mit anderen lysosomalen Enzymen schließlich zu einem lokalen Proteinase-Proteinaseinhibitor-Ungleichgewicht führen und so die Entstehung verschiedener Langzeitkomplikationen (z. B. destruktive Lungenerkrankungen) begünstigen.

Die Plasmaproteinkonzentration nach Trichloressigsäurefällung liegt vor Hämodialysebehandlung etwa 5 mal höher als bei gesunden Kontroll-Personen. Wesentlich höhere Konzentrationen dieser nicht durch Trichloressigsäure fällbaren Plasmafraktion wurden bei Patienten mit posttraumatischem akutem Nierenversagen und akutem Nierenversagen in Kombination mit einer akuten Pankreatitis beschrieben [9]. Diese Plasmaproteinfraktion besteht nach unseren Untersuchungen zu einem überwiegenden Anteil aus niedermolekularen Proteinen, Peptiden und freien Aminosäuren, die durch Hämodialysebehandlung weitgehend eliminiert werden dürften. Der zwar signifikante, jedoch relativ geringe Abfall unter der Hämodialysebehandlung könnte durch den intradialytischen Katabolismus bedingt sein.

Mit Azocasein als Substrat lag die proteolytische Aktivität des Plasmas unbehandelter Kontroll-Personen bei $0,052 \pm 0,04$ U/mg Protein, während die Vergleichswerte für Patienten mit akutem Nierenversagen $0,255 \pm 0,044$ U/mg und für Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz $0,127 \pm 0,019$ U/mg betragen. Unter der Hämodialysebehandlung kam es zu einer kontinuierlichen Ab-

nahme der erhöhten Plasmaproteinasen-Aktivität [20]. Es ist bislang unklar, ob dieser günstige Effekt der Hämodialysebehandlung auf einer Eliminierung nicht identifizierter Proteinasen beruht.

Bei Patienten mit Polytrauma und posttraumatischem akuten Nierenversagen lassen sich wohl durch Inaktivierung und/oder Verbrauch des körpereigenen Proteaseninhibitorsystems freie proteolytische Enzyme im ultrafiltrierten Plasma (Molekulargewicht < 50000) mit Phosphorylase-Kinase als Substrat nachweisen (Abb. 6 u. 7). Durch Inkubation von Phosphorylase-Kinase mit Elastase, Cathepsin G, Trypsin, Chymotrypsin oder Kallikrein gelingt eine proteolytische Verdauung der α - und/oder β -Untereinheiten. Bislang ist keine Protease identifiziert, die zu einer bevorzugten Spaltung der γ -Untereinheit führt.

Zusammenfassend sprechen unsere Befunde dafür, daß verschiedene Proteasen an der katabolen Stoffwechsellage von Patienten mit akutem und chronischem Nierenversagen beteiligt sind. Als Ursache der Proteasenfreesetzung nach Einleitung der Hämodialyse vermuten wir eine Granulozyten- und Komplement-Aktivierung durch Kontakt des Bluts mit dem Membransystem des Dialysators. Die Proteasenfreesetzung ist von potentieller klinischer Relevanz für verschiedene Langzeitkomplikationen der Hämodialysetherapie.

Literatur

- [1] J.D. KOPPLE, M.E. SWENDSEID, J.H. SHINABERGER, C.Y. UMEZAWA. The free and bound amino acids removed by hemodialysis. *Trans. Am. Soc. Artif. Internal. Organs* **19** (1973) 309–313.
- [2] R. WATHEN, P. KESHAVIAH, P. HOMMEYER, K. CADWELL, C. COMTY. Role of dialysate glucose in preventing gluconeogenesis during hemodialysis. *Trans. Am. Soc. Artif. Internal. Organs* **23** (1977) 393–398.
- [3] P. FARRELL, P. HONE. Dialysis-induced catabolism. *Am. J. Clin. Nutr.* **33** (1980) 1417–1422.
- [4] F. GOTCH, M. BORAH, M. KEEN, J. SARGENT. The solute kinetics of intermittent dialysis therapy (IDT). *Proc. Annu. Contractors Conf. Artif. Kidney Program (NIAMDD, Washington)* **10** (1977) 105–111.
- [5] C. KLESSEN, W. TEKOLF. Cytochemical investigation of neutral proteases in polymorphonuclear (PMN) neutrophils in acute inflammatory diseases. *Histochemistry* **69** (1980) 307–314.
- [6] S. NEUMANN, N. HENNRICH, G. GUNZER, H. LANG. Enzyme-linked immunoassay for human granulocyte elastase in complex with α_1 -proteinase inhibitor. In: *Proteases: Potential Role in Health and Disease* (Hörl, W.H., Heidland, A., eds.) Plenum Press, New York, London (1984) 379–390.
- [7] W.H. HÖRL, A. HEIDLAND. Enhanced proteolytic activity – cause of protein catabolism in acute renal failure. *Am. J. Clin. Nutr.* **33** (1980) 1423–1427.
- [8] M. HÖRL, W.H. HÖRL, A. HEIDLAND. Proteinkatabolismus und Tourniquet-Schock: Rolle proteolytischer Enzyme. *Chirurg* **53** (1982) 253–257.
- [9] W.H. HÖRL, J. STEPINSKI, C. GANTERT, M. HÖRL, A. HEIDLAND. Evidence for the participation of proteases on protein catabolism during hypercatabolic renal failure. *Klin. Wochenschr.* **59** (1981) 751–759.
- [10] K. WEBER, M. OSBORN. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244** (1969) 4406–4412.
- [11] J. BLONDIN, A. JANOFF. The role of lysosomal elastase in the digestion of Escherichia coli proteins by human polymorphonuclear leukocytes. *J. Clin. Invest.* **58** (1976) 971–979.
- [12] A. JANOFF, J. SCHERER. Mediators of inflammation in leukocyte lysosomes. IX. Elastolytic activity in granules of human polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.* **128** (1968) 1137–1155.
- [13] R. RINDLER, F. SCHMALZL, H. BRAUNSTEINER. Isolierung und Charakterisierung der chymotrypsinähnlichen Protease aus neutrophilen Granulozyten des Menschen. *Schweiz. Med. Wschr.* **104** (1974) 132–133.
- [14] G.S. LAZARUS, J.R. DANIELS, R.S. BROWN, H.A. BLADEN, H.M. FULLMER. Degradation of collagen by a human collagenolytic system. *J. Clin. Invest.* **47** (1968) 2622–2628.
- [15] K. OHLSSON, J. OLSSON. The neutral proteases of human granulocytes. Isolation and partial characterization of two granulocyte collagenases. *Europ. J. Biochem.* **36** (1973) 473–481.
- [16] A. JANOFF, J. BLONDIN, R.A. SANDHAUS, A. MOSSER, C.J. MALEMUD. Human neutrophil elastase: in vitro effects on natural substrates suggest important physiological and pathological action: In: *Proteases and Biological Control*. (Reich E. et. al. eds.) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor. (1975) 603–630.
- [17] J.E. SMOLEN, G. WEISSMANN. The granulocyte: Metabolic properties and mechanisms of lysosomal enzyme release. In: *Neutral proteases of human polymorphonuclear leukocytes*. (Havemann K, Janoff A eds.) Urban and Schwarzenberg Inc, Baltimore, Munich. (1978) 56–76.
- [18] D.G. MILLER, S. LEVINE, B. BISTRIAN, J.A.D. ELIA. Diagnosis of protein calorie malnutrition in diabetic patients on hemodialysis and peritoneal dialysis. *Nephron* **33** (1983) 127–132.
- [19] P.R. CRADDOCK, J. FEHR, A.P. DALMASSO, K.L. BRIGHAM, H.S. JACOBS. Hemodialysis leukopenia. Pulmonary vascular leukostasis resulting from complement activation by dialyzer cellophane membranes. *J. Clin. Invest.* **59** (1977) 879–888.
- [20] W.H. HÖRL, M. JOCHUM, A. HEIDLAND, H. FRITZ. Release of granulocyte proteinases during hemodialysis. *Am. J. Nephrol* **3** (1983) 213–217.