

Medizinische Enzymforschungsgesellschaft e. V.:

Monographie zur Protease Lysozym (L.)

Einleitung

Im Gegensatz zu den Proteasen Bromelain und Papain bzw. den in der indianischen bzw. indischen Medizin seit über tausend Jahren verwendeten Früchten (Ananas) bzw. Blättern und Früchten (Papaya) sowie im Gegensatz zu den bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts bekannt und teilweise in der Medizin eingesetzten Verdauungsenzymen des Pankreas (Chymotrypsin/Trypsin) war die Entdeckung des Lysozyms durch den schottischen Arzt Fleming 1922 eher zufällig und unspektakulär. Erstaunlich war allerdings, dass diese Substanz-offensichtlich Bestandteil des menschlichen Nasensekrets- in kürzester Zeit Bakterien lysieren konnte. Nach Pellegrini (1995) z. B. lysiert L. eine Suspension von *Micrococcus lysodeiteticus* innerhalb von 60 Sekunden.

Der damalige Wunsch des Dr. Fleming, mit Lysozym ein neues Antibiotikum zu entdecken, ging zwar nicht in Erfüllung. Ohnehin ging es ihm und anderen Forschern zu dieser Zeit darum, die Entwicklung von Antibiotika (Penicillin!) voranzutreiben. Aber spätestens ab 1945 setzte eine weltweite Forschung zu Lysozym ein. Befördert wurde die Entwicklung durch die Entdeckung, dass sich Lysozym aus Hühnereiweiß gut und einfach gewinnen ließ und diese Extraktionsmöglichkeit galt als einzige Methode bis zur Entdeckung des aus genetisch verändertem Reis gewinnbaren humanen Lysozyms am Ende des letzten Jahrtausends.

Es gelang schließlich, die Struktur des Lysozyms komplett aufzuklären (1965) und auch den Wirkmechanismus gegenüber Bakterien zu charakterisieren. Besonders die Tatsache überraschte, dass Lysozym bzw. sehr verwandte Stoffe beim Menschen zum natürlichen Immunschutz gehören und dass es auch bei Pflanzen, Fischen oder anderen Säugetieren die gleichen Funktionen erfüllt.

Mittlerweile wurde Lysozym bzw. andere der natürlichen Abwehr dienende Stoffe- die antimikrobiell wirksamen Peptide (AMPs)/ "Defensine"- in der Tränenflüssigkeit (höchste Konzentration im menschlichen Organismus-siehe Tabelle 1), im Nasalsekret, in der Muttermilch (2.höchste Konzentration), im Darmbereich (in den Paneth'schen Zellen) und vor allem in den Granula von Neutrophilen und Makrophagen entdeckt.

Table 1. Lysozyme Levels in Human Exocrine Secretions

Fluid	Lysozyme (µg/mL)	Reference
Breast milk	65-400	(Jolles and Jolles 1984)
Tears	1267	(Jolles and Jolles 1984)
Urine	0.5	(Jolles and Jolles 1984)
Nasal secretions	10-60	(Raphael, Jeney et al. 1989)
Amniotic fluid	9.3	(Jolles and Jolles 1984)
Gastric juice	74.2	(Jolles and Jolles 1984)
Cerebrospinal fluid	0.5	(Jolles and Jolles 1984)
Saliva	8.8	(Jolles and Jolles 1984)
Serum	10.8	(Jolles and Jolles 1984)
Neutrophil	0.095	(Moreira-Ludewig and Healy 1992)

Lysozym wird derzeit in mehr als 20 Ländern (EG, Japan, USA, China) unter unterschiedlichen Eigennamen vertrieben, es ist in einigen Arzneibüchern (Pharmakopöen) beschrieben und von der Us-amerikanischen Zulassungsbehörde FDA wurde sowohl humanes wie aus Hühnereiweiß gewonnenes Lysozym als GRAS (**G**enerally **A**ccepted **A**s **S**afe) Substanz eingestuft. Derzeit wird es am häufigsten als Nahrungsergänzungsmittel bzw. als Hilfs-/Zusatzstoff zur Konservierung von Käse oder Wein verwendet.

Lysozym und andere im Rahmen von Entzündungen induzierbare AMPs werden bisher bevorzugt in Lehrbüchern der Immunologie oder in Übersichtsartikeln pharmazeutischer Zeitungen dargestellt. Wenn L. aber doch in internistischen Aufsätzen Erwähnung findet, stellt es einen Laborparameter zur Beurteilung unterschiedlicher Erkrankungen dar, z. B. Beurteilung des Schweregrads einer Niereninsuffizienz, einer Sarkoidose oder von Hämoblastosen.

Tabelle 2 Übersicht AMPs/ Defensine (nach Schroeder. PZ 16/2010)

antimikrobielles Peptid/Protein	Lokalisation	induzierbar	grampositive Bakterien	gramnegative Bakterien	Pilze, Hefen	antivirale Aktivität
Alpha-Defensin 1 bis 4	Granulozyten	nein	++	++	++	+++
Alpha-Defensine 5, 6	Panethzellen des Darms, Urogenitaltrakt	nein	++	+++	+	+
Beta-Defensin-1	Epithelien des Urogenitaltrakts	nein	-	++	?	?
Beta-Defensin-2	Epithelien	ja	-	+++	++	++
Beta-Defensin-3	Epithelien	ja	+++	+++	+++	+++
Beta-Defensin-4	Testes	ja	+	+	?	?
Beta-Defensin-artige Peptide	Epididymis	nein	?	+	?	?
Calprotectin	Granulozyten, Epithelien	ja	+++	-	+++	?
Cathelizidine	Granulozyten, Epithelzellen	nein	++	++	++	?
Laktoferrin	Drüsen, Sekrete, Granulozyten	nein	+	+	+	?
Lysozym	Drüsen, Sekrete, Granulozyten	nein	++	++	++	?
RNase-7	Epithelien	ja	+++	+++	+++	?
Psoriasin	Epithelien	ja	+	+++	?	?

Lysozym (L.): Kurzcharakteristik der Protease (Übersicht in Wikipedia)

Einteilung nach FIP 3.2.1.17 bzw. CAS Nr. 9001-63-2 oder gemäß Merk Index 5514

L. aus Hühnereiweiß) besteht aus 129 Aminosäuren mit einem MG von 14.600 Dalton.

Das aktive Zentrum der 3-dimensinalen Struktur wird aus folgenden Aminosäuren gebildet: Aspartat, Glutaminsäure und Tryptophan

L. spaltet 1-4 beta-glykosidische Bindungen, z. B. bei Zellwänden von Gram positiven wie gramnegativen Bakterien

Das pH Optimum liegt bei 6,2 mit einem gesamten Aktivitätsbereich zwischen 6-9.

Lysozym: Pharmakologie und Toxikologie sowie mögliche Risiken

Es gibt einige orale kurz- und Langzeit Toxizitätsuntersuchungen für das Enzym L. an Ratten und Mäusen. Ferner wurde L. bei Meerschweinchen (NICHEM) in einer Dosis von 500 mg/kg KG intravenös appliziert und bei Ratten akut und bei Meerschweinchen in Langzeituntersuchungen (ECHA=Europäische Chemikalienagentur) auf die Haut aufgetragen. Auch Untersuchungen an Menschen wurden durchgeführt, wobei beispielsweise Lysozym der Muttermilch beigegeben wurde. Die Kleinkinder nahmen dabei 60-80 mg Lysozym /Tag auf. Ausser einer anaphylaktischen Reaktion nach intravenöser Zufuhr wurden keine nennenswerten UAW berichtet, vor allen nicht nach Langzeitanwendung.

Aus solchen Untersuchungen kann gefolgert werden, dass L. bei oraler oder dermalen Anwendung eine nur sehr gering toxische Substanz darstellt. Zudem lagen die Dosierungen bei oralen Tieruntersuchungen bei 1.500 bis zu 4.000 mg/kg KG. Diese Dosierungen entsprechen der mehr als 100-fachen Dosis wie sie beim Menschen angewendet wird.

Pharmakokinetik

Zur Pharmakokinetik von L. liegen bisher nur wenige Erkenntnisse vor. Das Datenblatt zu Lysozym (Schweiz) nimmt keine Stellungnahme zur Resorption von L. aus dem Darm, sondern beschreibt lediglich die Ausscheidung von oral angewendetem Lysozym durch die Niere.

In Anlehnung an die Resorption von oral appliziertem Bromelain/Papain kann auch für L. gefolgert werden, dass es als komplettes Molekül über die M-Zellen des Darms aufgenommen und im Blut an Anti-Proteasen (z. B. alpha 2 Makroglobulin) gebunden wird. So kann es dann über den Blutweg an die Stellen von Entzündungen verbracht werden (Mörsky et al).

In vitro und in vivo Tier-Untersuchungen (Standardmodelle)

Entzündungsmodelle

Im Dossier der FDA zur GRAS Beurteilung von Lysozym finden sich nur spärliche Hinweise zur antiphlogistischen Wirkung von L. Dabei wird darauf hingewiesen, dass durch L die Wanderungsgeschwindigkeit von Abwehrzellen nicht inhibiert wird, aber weitere Untersuchungen einen antioxidativen Zellschutz aufzeigen.

Bianchi beschreibt in einer Modelluntersuchung eine mögliche analgetische Wirkung von L. die nicht mit der Wirkung von NSAR zu vergleichen sei. Dabei werden Ratten subplantar Irritantien injiziert und die Wirkung von L nach oraler oder iv (100 bis 400 mg/kg KG) Zufuhr beobachtet: Die Sensitivität nimmt ab, das Ödem wird nicht beeinflusst.

Aktuelle Studien von Chung legen nahe, dass übermäßig aktivierte Abwehrzellen bzw. deren typischen Zytokine (TNF alpha, IL1) im Rahmen des septischen Schocks durch L. signifikant reduziert werden. Gallo et al zeigten in einem in vitro Modell mit humanen Tubuluszellen, dass L die im Rahmen von AGE induzierte Interleukinbildung 6 dosisabhängig und signifikant reduziert. Diese Forschergruppe wies später an diabetischen Wistar-Ratten nach, dass oral verabreichtes L. die Serumkonzentration von AGEs signifikant senkte. Dadurch wurde die Mikroalbuminurie reduziert und die initiale diabetische Nephropathie verhindert. In einem ähnlichen Tiermodell kamen Zheng et al zum Schluss, dass L. die Ausscheidung von AGEs verbessert, die Mikroalbuminurie verringert und damit die Nieren schützt:

***Oral appliziertes Lysozym verhindert im Tierversuch die Anfangsstadien der diabetischen Nephropathie!

Lyse von verschiedenen Bakterien durch L.

Seit langem wird die Wirkung von L auf grampositive wie gramnegative Bakterien untersucht, zuletzt durch Levashov et al, wobei diese Forschergruppe die Wirkung von L mit der Wirkung von IL 2 sowie SDS bei unterschiedlichen pH-Werten verglichen. Dabei zeigte sich, dass unter Lysozymeinwirkung besonders Bacillus Subgruppen, Laktobazillus acidoph., Proteus vulgaris, Pseudomonas aeruginosa, Serratia marc., Staphylococcus haemolyticus sowie Streptokokkus agalact. effektiv bei pH Werten zwischen 6,5 bis 8 lysiert werden.

Griswold et al. untersuchten eine Kombination von genmanipuliertem Lysozym in Kombination mit Tobramycin bei einer Pseudomonas- Infektion der Lunge von Mäusen. Sie fanden eine signifikante Steigerung der Tobramycinwirkung ohne unerwünschte Begleiterscheinungen.

***L. zeigt also in in-vitro-Untersuchungen sowie im Tierversuch gerade bei den sog. Problemkeimen eine gute Wirkung.

Untersuchungen an Tiertumor -Standardmodellen (Übersicht in Demming S., 2008)

In Tierversuchen konnten antineoplastische Eigenschaften von Lysozym nachgewiesen werden. Beim Walker-Sarkom, Sarkom 180, Yoshida-Sarkom und Ehrlich-Asziteskarzinom konnte in jeweils mehreren Studien eine Reduktion der Tumorgroße zwischen 5% und 85% erreicht werden. Eine antimetastatische Aktivität zeigte sich bei Mäusen mit Lewis-Lungenkarzinom (Übersicht bei Sava et al., 1989). Die Applikation des Lysozyms (meist aus Hühnereiweiß) erfolgte dabei überwiegend intraperitoneal oder peritumoral.

Sava et al. konnte 1995 im Tierversuch bei der Kombinationsgabe von Lysozym und Zytostatika bei Mamakarzinom und Lungenmetastasen, eine Reduzierung des Tumorwachstums, sowohl bei Primärtumor und Metastase, als auch eine postoperative Überlebenszeit-Verlängerung beobachten.

Ehrlich Aszites Tumormodell: transplantabler Mäusetumor (von einem spontanen Mamma-karzinom abgeimpft), der bei Verimpfung in die Bauchhöhle als Aszitestumor (EAT), sonst als solides Adenokarzinom wächst.

Lewis lung carcinoma is a tumor discovered by Dr. [Margaret R. Lewis](#) of the [Wistar Institute](#) in 1951. This tumor originated spontaneously as a carcinoma of the lung of a C57BL mouse. It is also called 3LL and LLC and is used as a transplantable malignancy. It has been used in many studies.^[2] (Wikipedia)

***In klassischen Tiertumor-Standardmodellen konnte einer Reduzierung des Tumorwachstums und der Metastasierung sowie eine Stimulation des körpereigenen Immunsystems nachgewiesen werden.

Klinische Studien/Einzelfallbeobachtungen am Menschen

Wirksamkeit/Wirkungen von Lysozym bei Gingivitis, Periodontitis

Je 10 Patienten mit Ging. oder Periodontitis wurden in einer Studie hinsichtlich der Wirkung des Lysozyms beim Erhalt der elastischen Fasern untersucht. Es konnte nachgewiesen werden, dass durch Lysozym die bei diesen Erkrankungen typische Zerstörung der elastischen Fasern unterbleibt. (Young et al.).

Ito et al wiesen nach, dass bei 40 Patienten mit Periodontitis im Vergleich zu gesunden Kontrollen (27 Personen) die Lysozymkonzentration signifikant erniedrigt war.

Wirkung/Bedeutung von Lysozym bzw. nahe verwandten induzierbaren AMPs bei Infekten der oberen Luftwege sowie der ableitenden Harnwege

Schwaab et al untersuchten die Konzentrationen von Lysozym in operativ entnommenem Tonsillengewebe (16 Studienteilnehmer) und anderen Adenoiden (18 Studienteilnehmer) sowohl bei Gesunden wie bei chronischen Entzündungen. Sie zeigten, dass bei Infekten, speziell die Konzentration von Lysozym ansteigt und auch bei chronischen Infekten unabhängig vom Alter die Konzentration erhalten bleibt.

Guggenbichler untersuchte zwischen 1995-2005 bei 53 Kindern unter 14 Jahren mit rezidiv. Infekten (mehr als 6 Infekte/Jahr) die Konzentration der beta Defensine, wobei speziell

Trisomie kranke Kinder (8 Patienten) eine nur max. 29%ige Konzentration im Vergleich zu den übrigen 45 Kindern erreichten.

Ähnliches zeigt sich im Morgenharn von an Harnwegsinfekten erkrankten Kindern: die in vitro Stimulation der Uroepithelien mit E coli ergab keine adäquate Erhöhung der Defensinkonzentration.

Wirksamkeit von Lysozym bei Herpes (Zoster) Infektionen und Plantarwarzen

Cavicchini (1984) behandelte 30 Patienten mit Herpes Zoster und 10 Patienten mit viral verursachten Plantarwarzen mit parenteral applizierten Lysozyminjektionen. Bei allem Patienten erzielte er gute Ergebnisse. Auffällig war, dass bei mit lysozym-therapierten Patienten keine Zosterneuralgie auftrat.

Wirkung/Bedeutung von Lysozym beim Sport

Seit langem ist bekannt, dass extreme Belastungen des Sports (sowohl Dauer wie Intensität) zu vermehrter Infektanfälligkeit führen. Es wurde der Ausdruck des "open window" geprägt, weil es offensichtlich zu typischen Veränderungen immunologischer Parameter führt wie verminderte Aktivität der NK Zellen oder inadäquate Erhöhungen von Serum -Zytokinspiegel.

Wirksamkeit von Lysozym/Lysozymkombinationen bei humanen Tumoren

Castellari und Gardini (1964) behandelten 10 Patienten mit *Karzinomen des Uterus, der Vulva, des Kolons, des Rektums und der Mundhöhle in einer Dosierung von 500 mg Lysozym i.v.* Die Autoren machten keine Aussagen zu der Wirkung auf die Tumorgroße, berichteten aber über einen deutlich analgetischen Effekt der Behandlung. Ähnliche Beobachtungen machten 1964 Battaglia et al. bei Patienten mit *Magen-, Prostata-, Uterus- und Mamma-Karzinomen*. 1980 wurde Lysozym in Japan für die Behandlung von humanen Tumoren patentiert (Hiroshi et al., 1980a, b). Sava et al. konnte 1995 im Tierversuch bei der Kombinationsgabe von Lysozym und Zytostatika bei Mamakarzinom und Lungenmetastasen, eine Reduzierung des Tumorwachstums, sowohl bei Primärtumor und Metastase, als auch eine postoperative Überlebenszeit- Verlängerung beobachten.

Wird Lysozym in Kombination mit Bromelain und Papain verwendet (Stand 12/2016), ergeben sich bei folgenden Einzelfallbeobachtungen/ case reports günstige Entwicklungen, teilweise erfasst durch SF 36 Bögen:

in Organe des Oberbauchs, Leber und Knochen metastasierender kleinzelliger Bronchialtumor (SJ): innovazym, D- Mulsin, Selen + Mistelpeptide mit einer Überlebenszeit von Juli 2013 bis Mai 2014 und zwischenzeitlich aufgetretenem generalisiertem Herpes Zoster

seit 3 Jahren bekanntes inoperables Adenokarzinom der Lunge(VA): innovazym, D Mulsin, Mistelpeptide- in Behandlung Klinikum r. d. I. München

vor 12 Monaten im Stadium 2 radikal entferntes Blasenkarzinom mit Bildung einer Ersatzblase (KM): innovazym- derzeit voll arbeitsfähig

vor 6 Jahren radikal operiertes, mit Chemo und Radiatio behandeltes metastasierendes Mammakarzinom (CC): innovazym plus

im Stadium 1 vor 8 Jahren radikal entferntes Prostatakarzinom(KE) mitlaufend ansteigender Tumorfatigue: innovazym

vor 9 Monaten im Stadium 4 entferntes Rezidiv eines Dickdarmkarzinoms mit Lungenbefall(IJ): Innovazym + Innova Mulsin

seit 2 Jahren bekanntes operiertes Uteruskarzinom mit Knochenmetastasen(PA): innovazym, D Mulsin, Selen, Mistelpeptide; Schmerzmittel

Literatur

Bianchi C Is Fleming's lysozyme an analgesic substance? An experimental reappraisal of clinical data. Eur. J Pharmacol 8 1981

Cavicchini S Use of high-dose lysozyme in the treatment of herpes zoster and flat warts. Minerva medica 75 1984

Cocchietto M et al: Orally administered microencapsulated lysozyme downregulates serum AGE and reduces the severity of early-stage diabetic nephropathy. Diabetes Metabol 34 2008

Chung J et al Suppressive effects of lysozyme on poly-phosphat-mediated vascular inflammatory responses Biochem Biophys Res Commun 474 2016

Das S et al Experimental evaluation of preventive and therapeutic potentials of Lysozyme. Chemotherapy 38 1992

Demming S Zelladhäsionsblockade von U937 Zellen an aktivierten HUVEC Zellen durch hLysII/IV-FucTVI. Inaugural Dissertation Universität Würzburg 2008

ECHA Registration Dossier zu Lysozyme: Acute Toxicity: Dermal Toxicity.

FDA: Lysozym als GRAS Substanz
GRAS Notice (GRN) No. 174
<http://www.fda.gov/Food/FoodIngredientsPackaging/GenerallyRecognizedasSafeGRAS/GRASListings>

Fukawa K et al Experimental studies on antitumor effects of lysozyme-II Effect of Lysozyme on immunopotential. Ganto 1982

Gallo D et al Human recombinant lysozyme downregulates advanced glycation endproducts-induced interleukin 6- production and release in an in-vitro model of human proximal tubular epithelial cells. Experimental biology and medicine 239, 2014

Griswold KE Bioengineered lysozyme in combination therapies for Pseudomonas aeruginosa lung infections. Bioengineered 5 2014, Landesbioscience.com

Guggenbichler JP Mechanismen der körpereigenen Abwehr und deren Störung. internist. Prax 49, 2009

Huixian L et al Amelioration of oxidant stress by the defensin lysozyme. Am J Physiol Endocrinol Metabol 290 2006

Inderst R Der regulative Einfluss von Proteasen auf low-level-Entzündungen und AGEs (Advanced Glycation Endproducts). zaenmagazin3/2013

Inderst R Chronische Low-Level Entzündungen EHK 1/2017 - in press

Kalfa VC et al. Lysozyme levels in the nasal secretions of patients with perennial allergic rhinitis and recurrent sinusitis

König D et al Sport und Infekte der oberen Luftwege-Epidemiologie, Immunologie und Einflussfaktoren. Deutsche Z für Sportmedizin 51 2000

Levashov P A et al.: Human Interleukin 2 and Hen Egg White Lysozyme: Screening for Bacteriolytic Activity against various Bacterial Cells. Acta naturae 8 2016

Mörsky P. (1988) Detection of lysozyme and alpha-2-macroglobulin-lysozyme complexes by immunoblotting. Clin. Chim. Acta 178; 327-336.

Pellegrini A: Lysozym: ein "altes" Protein hält die Forschung immer noch in Atem. Antrittsvorlesung, Zürich 1995

Sava G Pharmacological aspects and therapeutic applications of Lysozyme. IN: EXS 75,1996

Schröder JM Körpereigene Antibiotika schützen Haut und Schleimhäute. Pharm. Ztg. 155 2010

Younes R et al The defensive role of lysozyme in human gingiva in inflammatory periodontal disease. J Periodontal Res 44 2009

www.inchem.org/jecfa/jecmono/v30je04.html: Lysozyme Speijers GJS and ME Appeldoorn

Stand 1/2017