

**Erfassung der Ausscheidung eines D-Mannose-  
enthaltenden Nahrungsergänzungsmittel über  
den Urin bei gesunden Frauen mit anschließender  
in vitro Evaluierung des Effekts der erhaltenen  
Urinproben auf die adhäsiven Eigenschaften von  
UPECs**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Klußmann, Daniel Michael, geb. Faßl

aus Gießen

Gießen 2024

Aus dem Fachbereich Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des  
Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Florian Wagenlehner

Gutachter: Prof. Dr. Ekkehard Hauck

Tag der Disputation: 18.11.2024

*Meiner Familie gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	4
1.1	Hintergrund.....	4
1.2	Anatomie der Harnblase .....	6
1.2.1	Makroskopische Anatomie.....	6
1.2.2	Mikroskopische Anatomie .....	7
1.3	Erregerspektrum .....	8
1.3.1	Gram-positive Bakterien .....	8
1.3.2	Gram-negative Bakterien .....	10
1.4	Pathogenese von Harnwegsinfektionen.....	13
1.5	Alternative Behandlungsmethoden.....	15
1.5.1	Eigenschaften, Wirkmechanismus und Studienlage von D-Mannose .....	17
1.6	Ziele der Studie und Dissertation .....	22
2	Material und Methoden.....	24
2.1	Materialien.....	24
2.2	Methoden .....	25
2.2.1	Studiendesign und Konzept.....	25
2.2.2	Ein- und Ausschlusskriterien, Abbruchkriterien.....	26
2.2.3	Nicht erlaubte Begleitmedikation/ -therapien .....	29
2.2.4	Sicherheitsendpunkte .....	30
2.2.5	Ablauf der Studie .....	30
2.2.6	Statistische Analyse.....	38
3	Ergebnisse.....	41

3.1	Demografische Daten und grundlegende Merkmale .....	41
3.2	Darstellung des primären Zielendpunkts .....	47
3.2.1	D-Mannose-Konzentration im Urin in Phase I .....	48
3.2.2	D-Mannose-Konzentration im Urin in Phase II .....	53
3.2.3	Zusammenlegung der D-Mannose-Konzentrationen im Urin von Phase I und II	57
3.3	Darstellung des sekundären Zielendpunkts .....	61
3.3.1	In-vitro-Adhäsionshemmung der verwendeten UPECs .....	63
3.4	Ergebnisse der Sicherheitskriterien .....	67
3.4.1	Unerwünschte Ereignisse .....	67
3.4.2	Behandlungsabbrüche und -unterbrechungen .....	67
3.4.3	Bewertung der Verträglichkeit des Prüfpräparats .....	67
4	Diskussion.....	69
5	Zusammenfassung .....	81
6	Summary .....	82
7	Abkürzungsverzeichnis.....	83
8	Abbildungsverzeichnis.....	86
9	Tabellenverzeichnis .....	87
10	Literaturverzeichnis .....	89
11	Anhang.....	95
11.1	Votum Ethik-Kommision .....	95
11.2	Einwilligungserklärung.....	96

11.3 Acute Cystitis Symptom Score .....	101
12 Erklärung .....	102
13 Danksagung .....	103
14 Lebenslauf.....	104

# 1 Einleitung

## 1.1 Hintergrund

Harnwegsinfektionen (HWI) zählen zu den häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit<sup>77</sup>. Das weibliche Geschlecht ist hiervon wesentlich häufiger betroffen als das männliche<sup>19, 44, 78</sup>. Innerhalb der einzelnen Altersgruppen und Geschlechter unterscheiden sich die Auftretenswahrscheinlichkeiten. Ein Altersgipfel zeigt sich zwischen 15 und 35 Jahren und betrifft dabei Frauen 40-mal häufiger als Männer. Ein weiterer Altersgipfel findet sich in der Gruppe der über 80-jährigen Frauen. Allgemein lässt sich sagen, dass ca. 50% aller Frauen einmal in ihrem Leben eine Harnwegsinfektion entwickeln. Hierbei erhält jede dritte Frau eine antibiotische Therapie<sup>19, 44</sup>.

Ein Drittel der Patientinnen mit einer symptomatischen Harnwegsinfektion erkranken innerhalb von fünf Monaten an einem Rezidiv<sup>44</sup>. Eine symptomatische Harnwegsinfektion ist definiert durch die Anwesenheit von infektiösen Erregern im Harntrakt und dem Vorliegen von typischen Symptomen<sup>30</sup>. Hierbei wird je nach Lokalisation zwischen unterer Harnwegsinfektion (Zystitis) und oberer Harnwegsinfektion (Pyelonephritis) unterschieden. Typische Symptome der Zystitis sind Pollakisurie, Dysurie, imperativer Harndrang und ggf. begleitende Hämaturie. Eine Pyelonephritis ist charakterisiert durch Flankenschmerzen, ein klopfschmerzhaftes Nierenlager und ggf. begleitendes Fieber ( $> 38^{\circ}\text{C}$ )<sup>30</sup>. Die Urosepsis, als schwerste Form einer Infektion der Harnwege, ist ein klinisches Syndrom, bei dem komplexe physiologische und biochemische Veränderungen zu einem schweren Verlauf einer Infektion führen können<sup>8</sup>. Die Sepsis ist definiert als Symptomkomplex mit lebensbedrohlichen Organdysfunktionen, welche durch eine inädaquate Reaktion eines Wirts auf eine Infektion hervorgerufen werden<sup>67</sup>. Die Organdysfunktionen werden hierbei mittels des SOFA-Scores (sequential organ failure assessment score) ermittelt<sup>67</sup>.

Eine Harnwegsinfektion wird als unkompliziert eingestuft, wenn definitionsgemäß keine funktionellen oder anatomischen Behinderungen, keine Nierenfunktionsstörungen und keine relevanten Komorbiditäten vorliegen, die eine HWI begünstigen<sup>78</sup>. Dementsprechend gehören zu den prädisponierenden Faktoren anatomische Besonderheiten wie angeborene Ureterabgangsstenosen, Harnblasendivertikel oder erworbene Veränderungen wie Nieren-, Harnleiter- und Blasensteine, urogenitale

Tumore und das Vorliegen einer Schwangerschaft. Auch sich im Urogenitaltrakt befindliche Fremdkörper wie Harnblasenkatheter und Harnleiterschienen oder funktionelle Einschränkungen bei der Blasenentleerung und der Nierenfunktion können zu komplizierten Verläufen führen. Einschränkungen des Immunsystems wie beispielsweise ein schlecht eingestellter Diabetes mellitus oder beim Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) zählen ebenso zu den Bedingungen, die eine komplizierte HWI begünstigen <sup>76</sup>.

Eine rezidivierende Harnwegsinfektion (rHWI) wird bei zwei symptomatischen Episoden innerhalb der letzten sechs Monate, bzw. drei symptomatischen Episoden innerhalb der letzten zwölf Monate angenommen <sup>8</sup>.

Zusätzlich gilt es zwischen einer klinisch relevanten Infektion und einer asymptomatischen Bakteriurie (ABU) zu unterscheiden. Bei einer asymptomatischen Bakteriurie sind Mikroorganismen in Keimzahlen oberhalb definierter Grenzwerte nachweisbar. Es fehlen jedoch eine Leukozyturie oder typische Zystitis Symptome <sup>52</sup>.

Das häufige Auftreten von Harnwegsinfektionen bedingt einen hohen Verbrauch von Antibiotika. Der Einsatz von Antibiotika korreliert direkt mit der Entstehung von Resistenzen gegenüber den eingesetzten Antibiotika <sup>77</sup>. Die Zunahme von Antibiotikaresistenzen stellt ein globales Problem dar und bedroht die Behandlungen von Infektionen weltweit. Resistenzmechanismen entstehen und verbreiten sich durch die Globalisierung zunehmend. Hochrechnungen hierzu zeigen auf, dass die Anzahl der Toten durch antibiotikaresistente Keime von derzeit 700.000 pro Jahr, auf über zehn Millionen im Jahr 2050 ansteigen könnte <sup>25</sup>. Die World Health Organisation (WHO) hat bereits 2014 auf diese Tendenz aufmerksam gemacht und eine Faktenzusammenstellung hierzu vorgelegt <sup>65</sup>. Der WHO Report zeigt auf, dass ohne umfassende, koordinierte Aktionen zur Verminderung von Resistenzen die antiinfektiöse Therapie insgesamt gefährdet ist. Wenn bei banalen Infektionen die Medikamente der ersten Wahl nicht mehr wirksam sind, müssen Reserveantibiotika verwendet werden, was wiederum Resistenzen gegen diese Medikamente hervorruft, sodass sie für schwerwiegendere Infektionen nicht mehr zur Verfügung stehen. Außerdem sind die Reserveantibiotika unter Umständen weniger spezifisch, wodurch eine längere Krankheitsdauer und letztlich zusätzliche Kosten resultieren können. Hierdurch wird der gesamtgesellschaftliche Aspekt für Gesundheitssystem und Volkswirtschaft deutlich <sup>77</sup>.

Für Harnwegsinfektionen wird die Antibiotikaresistenz durch die Europäische Sektion für Infektionen in der Urologie (ESIU) mittels einer weltweit internetbasierten Studie gemessen. Die Global Prevalence Study of Infections in Urology (GPIU) zeigt gegen alle getesteten Antibiotika hohe Raten von Resistenzen. Hierzu zählen Breitband-Penicilline, Fluorchinolone und Cephalosporine der dritten Generation. Nur Imipenem, welches zur Gruppe der Carbapeneme und somit den Reserveantibiotika gehört, wies eine Resistenzrate  $< 10\%$  auf<sup>71</sup>.

Aufgrund dieser Entwicklungen hat die World Alliance Against Antibiotic Resistance (WAAAR) einen Aktionsplan erstellt, womit der Anstieg der weltweiten Antibiotikaresistenzen verlangsamt werden soll<sup>10</sup>. Strategien sind allgemeine Förderung des Bewusstseins, Organisation eines nationalen Plans zum verantwortlichen Gebrauch von Antibiotika in der Human- und Veterinärmedizin im Sinne des Antibiotic-Stewardship (ABS), sowie die Entwicklung und Erforschung neuer Antibiotika oder alternativer Behandlungsmethoden. In der AWMF S3-Leitlinie „Strategien zur Sicherheit rationaler Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus“ sind Empfehlungen zur Umsetzung der ABS-Programme beschrieben und ABS-Ziele definiert<sup>14</sup>. Diese Ziele zur Bekämpfung der Antibiotikaresistenz sind in Deutschland in der „Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie“ (DART) festgehalten worden<sup>9</sup>.

Auch diese Arbeit soll einen Beitrag zur Erforschung von alternativen Behandlungsmethoden leisten.

## 1.2 Anatomie der Harnblase

### *1.2.1 Makroskopische Anatomie*

Die Harnblase befindet sich zentral im kleinen Becken und zählt zu den ableitenden Harnwegen. Sie ist ein muskuläres Hohlorgan und dient der Speicherung und Entleerung von Urin. Der untere Pol ist auf Höhe des Unterrandes der Symphyse und der obere Pol ist je nach Füllungszustand zwischen Symphysenoberrand und Bauchnabel. Die Lage der Harnblase ist extraperitoneal. Die kraniale Fläche wird jedoch von Peritoneum überzogen, welches hier je nach Geschlecht die Excavatio vesicouterina oder die Excavatio rectovesicalis als Umschlagsfalte bildet und die dorsale Begrenzung darstellt. Kaudal stellt die Muskelplatte des Diaphragma pelvis mit M. levator ani und M. transversus perinei profundus die Begrenzung dar. Ventral und

lateral ist die Harnblase durch lockeres Bindegewebe mit zugehörigem Venenplexus umgeben. Durch dieses Bindegewebe sowie das leicht verschiebbare Peritoneum, werden erhebliche Größenveränderungen bei unterschiedlichen Füllungsvolumina der Harnblase ermöglicht <sup>61</sup>.

### ***1.2.2 Mikroskopische Anatomie***

Die ableitenden Harnwege und somit auch die Harnblase bestehen aus einer dreischichtig aufgebauten Wand. Dies sind von außen nach luminal eine Tunica adventitia, eine Tunica muscularis, sowie eine Tunica mucosa <sup>40</sup>.

Die Adventitia ist bindegewebig aufgebaut und verankert die Harnblase in der Umgebung. Die Muskelschicht der Harnblase mit dem M. detrusor vesicae ist stark ausgeprägt und zählt zu der glatten Muskulatur, welche parasymphatisch und sympathisch innerviert wird. In der Blasenwand befinden sich vegetative Ganglienzellen, Nerven und Mechanorezeptoren, wodurch über afferente Nervenbahnen Informationen über die Dehnung der Harnblase und somit den Füllungszustand vermittelt werden <sup>40</sup>.

Die luminal gelegene Tunica mucosa ist ein mehrschichtiges Epithel und besteht aus der Lamina epithelialis (Urothel/Übergangsepithel), sowie der Lamina propria. Die Lamina propria stellt die Bindegewebsschicht der Mucosa dar und enthält einen dichten Kapillarplexus. Die Lamina epithelialis wird auch als Übergangsepithel oder Urothel bezeichnet und setzt sich aus einer Basalschicht, Intermediärschicht und Superfizialschicht zusammen. Je nach Füllungszustand der Harnblase passt sich das Urothel mit einer Änderung der Epithelhöhe und Zellform den entsprechenden Bedingungen an. Die Zellen der Basalschicht bestehen aus einer Zelllage und dienen als Stammzellenvorrat für das Urothel. Die Intermediärschicht bildet die mittlere Schicht des Urothels und besteht aus mehreren Zelllagen. Die Anzahl der Zelllagen variiert je nach Füllungsvolumen der Harnblase von sechs bis sieben im ungedehnten Zustand zu drei bis vier in einem gedehnten Zustand. Die Superfizialschicht grenzt direkt an das Lumen der Harnblase an und besteht aus den Deckzellen des Urothels. Die Deckzellen sind oft polyploid und werden auch umbrella cells genannt. Sie können im gedehnten Zustand der Harnblase ihre apikale Oberfläche vergrößern und überspannen mehrere Zellen der Intermediärschicht. Eine Besonderheit der Deckzellen ist die lumenseitige Plasmamembran. Diese enthält spezifische Transmembranproteine, die Uroplakine

genannt werden und in der Membran Plaques bilden. Diese steifen Plaques werden durch flexible Membranen, welche Scharniere heißen, unterbrochen. Lateral zwischen den Deckzellen befinden sich tight junctions. Gemeinsam wird hierdurch eine Barriere des Urothels gegenüber den Harnbestandteilen hergestellt. Bei zunehmender Dehnung der Harnblase flachen die Deckzellen ab, wodurch die Membranoberfläche vergrößert wird und es zur Glättung von Membraneinstülpungen kommt. Zusätzlich befinden sich im Zytoplasma der Deckzellen zahlreiche flache Vesikel mit Membranmaterial aus Plaques und Scharnieren, die bei Bedarf in die apikale Plasmamembran eingebaut werden können. Dies könnte ebenfalls der Membranoberflächenvergrößerung, allerdings auch der Erneuerung der apikalen Plasmamembran dienen<sup>40</sup>.

Der histologische Aufbau des Urothels ist wichtig zum Verständnis der Pathogenese von Harnwegsinfektionen.

### 1.3 Erregerspektrum

Harnwegsinfektionen werden durch ein breites Spektrum von Krankheitserregern ausgelöst. Hierzu zählen vor allem Bakterien, welche in Gram-positive und Gram-negative klassifiziert werden, jedoch zu einem geringen Anteil auch Pilze. Das Keimspektrum bei unkomplizierten und komplizierten Harnwegsinfektionen unterscheidet sich. Der häufigste Erreger in beiden Gruppen ist jedoch *Escherichia coli*. Bei unkomplizierten Harnwegsinfektionen sind uropathogene *E. coli* (UPEC) zu 75% die auslösenden Keime. Die weiteren Erreger sind *Klebsiella pneumoniae* (6%), *Staphylococcus saprophyticus* (6%), *Enterococcus spp.* (5%), Streptokokken der Gruppe B (3%), *Proteus mirabilis* (2%), *Pseudomonas aeruginosa* (1%), *Staphylococcus aureus* (1%) und *Candida spp.* (1%). Bei den komplizierten Harnwegsinfektionen sind uropathogene *E. coli* zu 65% die verantwortlichen Erreger. Des Weiteren zeigt sich eine Zunahme bei *Enterococcus spp.* (11%), *K. pneumoniae* (8%), *Candida spp.* (7%), *P. aeruginosa* (2%) und *S. aureus* (3%)<sup>20</sup>.

#### 1.3.1 Gram-positive Bakterien

##### Staphylokokken

Staphylokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe, unbewegliche Kokken. Sie bilden keine Sporen und liegen aufgrund der Unbeweglichkeit haufenförmig zusammen.

Eine Differenzierung innerhalb der Spezies erfolgt durch ihr Koagulase-Verhalten. *S. aureus* zeigt ein Koagulase-positives Verhalten, *S. saprophyticus* ist Koagulase-negativ. Gegenüber Streptokokken lassen sie sich durch ihre Katalase-Positivität abgrenzen. Eine Anzüchtung von Staphylokokken gelingt gut bei 37° C. Auf bluthaltigen Nährböden zeigen sie ein unterschiedliches Hämolyseverhalten <sup>31</sup>.

*S. saprophyticus* besiedelt oft die Haut des Perineums und spielt als Erreger bei jungen, sexuell aktiven Frauen im Rahmen der „Honeymoon-Zystitis“ eine Rolle <sup>30</sup>.

*S. aureus* gehört zu den widerstandsfähigsten Bakterien und besiedelt zu 30 % dauerhaft die Haut oder Schleimhäute von Menschen. Weitere 30 % sind passagere Keimträger. Die bevorzugten Areale sind vor allem der Nasenvorhof, Rachen, Achsel und Rima Ani. Die Widerstandsfähigkeit zeigt sich vor allem gegenüber Austrocknung, Sonnenlicht und Hitze, pH-Veränderungen oder Änderungen des Salzgehalts. Harnwegsinfektionen werden durch *S. aureus* selten verursacht. Eher typisch sind Infektionskrankheiten mit Abszessbildungen der Haut oder Schleimhäute und Wundinfektionen oder Infektionen innerer Organe, wie Endokarditis und Osteomyelitis. *S. aureus* verfügt über viele Virulenzfaktoren. Die verschiedenen Stämme unterscheiden sich aber in ihrer pathogenen Potenz, da das Vorkommen der Virulenzfaktoren variabel ist. Als nosokomialer Problemstamm ist vor allem der methicillinresistente *S. aureus* (MRSA) wichtig. Dieser verfügt zumeist auch über Virulenzfaktoren, wodurch schwere Krankheitsverläufe entstehen können, die eine komplexe Therapie nach sich ziehen <sup>31</sup>.

### Streptokokken

Streptokokken sind grampositive, fakultativ anaerobe, unbewegliche Kokken. Sie bilden ebenfalls keine Sporen und lagern sich kettenförmig zusammen. Im Gegensatz zu den Staphylokokken sind sie Katalase-negativ. Viele der Streptokokken-Typen gehören zur physiologischen Normalflora der menschlichen Haut und Schleimhaut. Eine Differenzierung innerhalb der Spezies erfolgt anhand ihres Hämolyseverhaltens auf bluthaltigen Nährböden, sowie serologisch anhand des Antigenmusters des zellwandassoziierten C-Polysaccharids. Die Unterteilung in verschiedene Serogruppen erfolgt nach Lancefield. Für Harnwegsinfektionen relevant sind Streptokokken der Serogruppe B, welche ein vollständiges Hämolyseverhalten ( $\beta$ -Hämolyse) zeigen. Der Vertreter *S. agalactiae* besiedelt hauptsächlich die Schleimhaut des Urogenitaltrakts. Wichtiger Virulenzfaktor ist der CAMP-Faktor, der die Hämolyse verstärkt <sup>31</sup>.

### **Enterokokken**

Die Enterokokken sind besonders hitzestabile oftmals paarweise angeordnete Streptokokken. Sie zeigen somit dieselben oben beschriebenen Eigenschaften auf. Sie sind nicht in der Lage Nitrat zu Nitrit zu reduzieren, sodass der Nitrit-Nachweis im Urinstreifentest bei Harnwegsinfektionen durch Enterokokken stets negativ bleibt. Die humanpathogenen Vertreter werden der Serogruppe D nach Lancefield zugeordnet. Die zwei wichtigsten Vertreter *E. faecalis* und *E. faecium* können abhängig vom Ernährungsverhalten bis zu 50 % der physiologischen Darmflora ausmachen. Harnwegsinfektionen können durch Schmierinfektionen entstehen. Wichtiges Merkmal ist, dass Enterokokken intrinsisch resistent gegen alle Cephalosporine und Aminoglykoside sind. Bei nosokomialen Infektionen tritt gehäuft ein vancomycinresistenter *Enterococcus* (VRE) auf<sup>31</sup>.

### **1.3.2 Gram-negative Bakterien**

#### **Pseudomonas aeruginosa**

*P. aeruginosa* ist ein gramnegatives, fakultativ anaerobes, bewegliches Stäbchen, das keine Sporen bildet. Es ist Katalase- und Oxidase-positiv und ist ein nicht fermentierendes Bakterium. Pseudomonaden gelten als typischer Nasskeim mit anspruchsloser Lebensweise an seine Umgebung. Auf Kulturmedien präsentiert es sich grünlich-bläulich mit  $\beta$ -Hämolyse und einem süßlich-aromatischen Geruch. Dieser Geruch zeigt sich v.a. auch bei Wund- und Harnwegsinfektionen. Weitere typische Infektionen durch Pseudomonaden sind die Otitis externa, Atemwegsinfektion (beispielsweise durch kontaminierte Inhalationsgeräte oder Klimaanlage), Endokarditiden und Sepsis. Aufgrund der hohen Umweltpersistenz und der intrinsischen Resistenz gegenüber diversen Antibiotika ist *P. aeruginosa* ein bedeutender nosokomialer Erreger<sup>31</sup>.

#### **Enterobacteriaceae**

Enterobacteriaceae bilden eine Gruppe von gramnegativen Stäbchen, die sich unter aeroben und unter anaeroben Bedingungen (fakultativ anaerob) vermehren können. Sie

bilden keine Sporen und sind erregerabhängig begeißelt und dadurch beweglich oder unbegeißelt. Mit dem Enterobacteriaceae-common-Antigen (ECA) besitzen sie ein gemeinsames Antigen. Die Spezies stellen ca. 50 % der Erreger von nosokomialen Infektionen. In den folgenden Punkten werden die für Harnwegsinfektionen bedeutenden Erreger näher beschrieben <sup>31</sup>.

### **Proteus mirabilis**

*P. mirabilis* ist stark peritrich begeißelt und dadurch lebhaft beweglich. Dies bedingt auch das Phänomen des „Schwärmens“ auf festen, feuchten Nährböden. Hier werden keine klar abgrenzbaren umschriebene Kolonien gebildet, sondern sie zeigen sich flächenhaft. Proteus kommt als Fäulniserreger in der Erde, im Abwasser oder auf Tierkadavern vor, findet sich jedoch auch physiologisch in der Darmflora des Menschen. Dementsprechend ist die Gattung ein häufiger Erreger nosokomialer Harnwegsinfektionen. Zu den weiteren Infektionen, die durch *P. mirabilis* bedingt sind, zählen Atemwegsinfektionen, Wundinfektionen und Septikämien <sup>31</sup>.

Wichtiger Virulenzfaktor ist eine ausgeprägte Urease-Aktivität. Durch Urease wird Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak hydrolysiert. Daraus resultiert ein Anstieg des Urin-pH-Werts, wodurch Salze im Harntrakt auskristallisieren und es zur Bildung von Harnsteinen kommen kann. Hierdurch können sich kristalline Biofilme auf Kathetern bilden. Dadurch schützt sich der Erreger vor dem Immunsystem des Wirts und vor Antibiotika. Zusätzlich kann eine Blockierung des Urinabflusses aus Harnleitern oder Kathetern resultieren, was letztendlich die Infektion fortschreiten lässt <sup>20, 31</sup>.

### **Klebsiella pneumoniae**

*K. pneumoniae* ist ein unbewegliches, bekapseltes und gramnegatives Stäbchen. Die Kapsel besteht aus einer dicken Polysaccharidschicht und schützt den Erreger vor Phagozytose. Die Gattung kommt ubiquitär vor und findet sich physiologischerweise im Erdreich, im Wasser sowie auf Pflanzen. Teilweise kommen die Erreger auch in der Darmflora des Menschen vor. Kulturell wachsen Klebsiellen auf glukosehaltigen Nährböden in schleimigen, großen Kolonien. Infektionen durch Klebsiellen bedingt sind vor allem: Pneumonie, Otitis, Bronchitis, Meningitis, Endokarditis, Cholezystitis,

Harnwegsinfektionen und Sepsis. Wichtiger Virulenzfaktor ist eine Typ-1-Pili vermittelte Adhäsion am Epithel der Harnblase und die Ausbildung eines Biofilms, zur Herstellung der Erregerpersistenz. Die Therapie von Klebsiellen ist oft schwierig aufgrund von Mehrfachresistenzen. Deshalb ist *K. pneumoniae* ein wichtiger Erreger nosokomialer Infektionen<sup>20, 31</sup>.

### **Escherichia coli**

*E. coli* ist ein sporenloses, gramnegatives, fakultativ anaerobes und peritrich begeißeltes Stäbchenbakterium. *E. coli* ist ein klassischer Fäkalindikator, d.h., es wird als Nachweismittel für fäkale Verunreinigungen von z.B. Trinkwasser, Lebensmitteln oder Bedarfsgegenständen des täglichen Lebens verwendet. Im menschlichen Gastrointestinaltrakt leben viele verschiedene Stämme von *E. coli*, wovon die meisten harmlose Kommensalen sind, sodass durch diese keine Infektionen resultieren. Einige Stämme sind durch eine spezielle genetische Ausstattung jedoch humanpathogen. Diese humanpathogenen Stämme lassen sich in zwei Gruppen unterteilen. Man unterscheidet enteropathogene Stämme, die zu intestinalen Durchfallerkrankungen führen, von nicht-enteropathogenen Stämmen, die extraintestinale Infektionen auslösen<sup>31</sup>. Die nicht-enteropathogenen Stämme werden deshalb auch extraintestinal pathogene *E. coli* (ExPEC) genannt. Hierzu gehören auch die uropathogenen *E. coli* (UPEC), die im Folgenden näher beschrieben werden<sup>42</sup>.

UPEC sind hochspezialisierte Erreger mit vielen Virulenzfaktoren, welche in der Pathogenese von Harnwegsinfektionen eine wichtige Rolle spielen. Die Virulenzfaktoren können in folgende vier Gruppen unterteilt werden: Adhäsion, Toxine, Eisenakquirierung und Immun-Evasionsstrategien<sup>20</sup>.

Adhäsine dienen der Anheftung des Erregers an das Urothel. Die wichtigsten Pili sind Typ-1-Pili und P-Pili. Nach Bindung an das Urothel kann auch eine Internalisierung des Erregers in die Uroepithelzellen erfolgen. Die UPEC sammeln sich hierbei im Zytoplasma der Deckzellen und leiten die Replikation ein. Dadurch bilden sich intrazelluläre Kolonien in Biofilm-ähnlicher Organisation, welche *intracellular bacterial communities* (IBCs) genannt werden. Die Kolonien reifen, bis es zu einer Desintegration der Wirtszelle kommt, sodass die UPEC neuerlich an Wirtszellen adhären und sich die Infektion etabliert. Hierbei können auch tiefer liegende Zellschichten des Urothels befallen werden. Die hier ausgebildeten intrazellulären

Reservoirs werden *quiescent intracellular reservoirs* (QIRs) genannt. Die UPEC persistieren in diesen Zellschichten mit einer geringeren Erregerlast und sobald die Zellen sich weiter differenzieren und nach luminal entwickeln, startet der Infektionszyklus erneut. Dies erklärt u. a. die Entstehung eines Rezidivs<sup>20, 42</sup>. Das Eindringen der Erreger und die Ausbildung von intrazellulären Biofilm-ähnlichen Strukturen gehört zu den Immun-Evasionsstrategien<sup>20</sup>.

Ein weiterer Virulenzfaktor ergibt sich durch die Deckung des Nährstoffbedarfs, indem Eisen akquiriert wird. UPEC benötigen Eisen zur Durchführung ihrer biologischen Funktionen. Freies Eisen steht im menschlichen Körper jedoch nur begrenzt zur Verfügung, da der Hauptanteil in gebundener Form vorliegt. Durch die Synthetisierung von Siderophoren kann dem Wirt Eisen entzogen werden, welches die Bakterien zur Verstoffwechslung nutzen. Das Vorliegen von Eisenaufnahmesystemen trägt erheblich zur Pathogenität der Erreger bei<sup>21, 42</sup>.

Toxine und Proteasen als Virulenzfaktoren können die Wirtszellen direkt schädigen und zerstören. Hierdurch gelingt die Nährstoffversorgung, sowie das Vordringen in tiefer liegende Gewebsschichten. Dies geschieht durch Beeinflussung der zellulären Integrität mit Veränderung der zellulären Homöostase und Lyse der Zellen. Beispiele für Toxine von UPEC sind das Hämolysin und zytotoxischer Nekrosefaktor. Serinproteasen-Autotransporter sind beispielsweise das secreted autotransporter toxin (Sat), protein involved in intestinal colonization (Pic) und temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh)<sup>20, 42, 53</sup>.

## 1.4 Pathogenese von Harnwegsinfektionen

Harnwegsinfektionen entstehen durch die Adhäsion von uropathogenen Erregern an das Urothel. Dabei handelt es sich grundsätzlich um ascendierende Infektionen. Nur in seltenen Fällen ist der Infektionsweg per continuitatem z. B. bei Fistelbildung oder deszendierend durch Bakteriämien mit beispielsweise Staphylokokken<sup>30</sup>.

Die uropathogenen Erreger stammen zumeist aus dem Gastrointestinaltrakt und besiedeln die periurethrale Region. In der Folge kommt es zur Kolonisierung der Urethra und Aszension der Erreger in die Harnblase. Hier müssen die Erreger mit ihren Oberflächenstrukturen am Urothel adhären, wodurch ein Auswaschen durch den Urin verhindert und eine schnellere Vermehrung erreicht werden soll<sup>29, 42</sup>.

Die Deckzellschicht, als oberste Schicht des Urothels, besteht aus terminal differenzierten Urothelzellen. Sie fungiert als impermeable Barriere und ist mit Uroplakinen und einer ausgedehnten Glykosaminoglykanschicht ausgestattet. Die Anheftung der Uropathogenen erfolgt mittels spezieller Adhäsine. Dies sind urothelspezifische Pathogenitätsfaktoren wie z. B. Pili<sup>42</sup>.

Von besonderer Bedeutung sind der Typ-1-Pili und der P-Pili von *E. coli*. P-Pili binden über die PapG Domäne im Bereich der Nieren und sind mit Infektionen des oberen Harntrakts assoziiert. Typ-1-Pili binden mittels der Proteinuntereinheit FimH an Mannoseeinheiten der Uroplakine und  $\alpha_3\beta_1$ -Integrine der Deckzellenschicht. Typ-1-Pili nehmen bei der Infektion mit uropathogenen *E. coli* eine multifaktorielle Funktion ein, indem sie mehrere Pathogenitätsfaktoren vereinen: Adhäsion, Invasion, Biofilmbildung, Ausbildung von intrazellulären Reservoiren und Interaktion mit Rezeptoren des angeborenen Immunsystems. Dies führt zur Aktivierung von immunologischen Abwehrmechanismen wie der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten und zur differenzierten Zytokinantwort<sup>17, 27, 37, 49</sup>.

Dieser eingeleiteten Entzündungsreaktion begegnen die Erreger mit Immunevasionsprozessen, wie z.B. der Invasion der Wirtszellen. Durch das Anheften der Typ-1-Pili an die Uroplakine werden Signaltransduktionswege aktiviert, die zur Internalisierung der Erreger führen. Im Zytoplasma der Deckzellen verweilen die Bakterien geschützt vor dem Immunsystem und können dort auch replizieren. Hierdurch ist eine Zelllyse möglich und die Erreger können sich weiter verteilen. Bei neuerlicher Adhäsion an Uroplakine startet der Zyklus von vorne und es besteht die Möglichkeit, dass eine symptomatische Harnwegsinfektion entsteht<sup>23, 27</sup>.

Das angeborene Immunsystem leitet die oben beschriebenen Abwehrmechanismen durch die Erkennung der Bakterien durch spezielle Rezeptoren ein. Hierzu zählen die für den Harntrakt relevanten Toll-like-Rezeptoren 4 und 5 (TLR4 / TLR5). TLR4 wird durch Bindung von Lipopolysaccharid an der Oberfläche von Gram-negativen Bakterien, sowie durch Typ-1-Pili und P-Pili von UPECs aktiviert. Flagellin als Strukturprotein des fortbewegungsvermittelnden Geißelapparat von Bakterien aktiviert TLR5<sup>24, 27, 53, 68, 69</sup>.

Weitere Abwehrmechanismen nach Eindringen der uropathogenen Erreger sind ein Spüleffekt durch vermehrten Urinfluss, eine Exfoliation des Urothels, Rekrutierung von

Phagozyten, sowie die sich im Urin befindlichen antimikrobiellen Substanzen wie Tamm-Horsfall Protein und Defensine<sup>31, 42</sup>.

## 1.5 Alternative Behandlungsmethoden

Das folgende Kapitel soll einen Überblick über die derzeitigen alternativen nicht-antibiotischen Behandlungsmöglichkeiten in der Therapie und Prophylaxe von Harnwegsinfektionen darstellen. Hierbei wird zur Übersicht vor allem auf die Studienlage zu D-Mannose eingegangen.

Allgemeine Maßnahmen sind eine ausführliche Beratung und das Vermitteln von Verhaltensempfehlungen durch spezifische Schulungsprogramme, sowie die Förderung zur Immunstimulation<sup>18</sup>. Darunter versteht man eine pflanzenbetonte Kost, regelmäßige sportliche Aktivität und psychosoziale Aspekte<sup>73</sup>.

Bei der Ernährung sollte auf eine ausreichende Trinkmenge von mind. 1,5 Liter / Tag geachtet werden. Wobei eine übermäßige Flüssigkeitsaufnahme jedoch zu vermeiden ist, da ansonsten die im Urin befindlichen antibakteriellen Substanzen wie Tamm-Horsfall-Protein und Cathelicidin zu stark verdünnt werden könnten und hierdurch die antibakterielle Aktivität vermindert werden könnte<sup>18, 32</sup>. Der regelmäßige Verzehr von Säften aus Beeren zeigte sich vorteilhaft. Beeren enthalten Flavonole, welche als Inhibitoren der Adhäsion von coliformen Bakterien an menschlichen Zellen fungieren<sup>35</sup>.

Die Rate an Genitalkontakten korreliert direkt mit dem Auftreten von Harnwegsinfektionen, sodass eine sexuelle Abstinenz, auch von temporärer Dauer, die Häufigkeit reduzieren kann. Ebenfalls kann die Form der Verhütungsmethode, wie bei dem Gebrauch von Intravaginal-Ovula, mit Spermiziden beschichtete Diaphragmen, Kondomen oder Intrauterin-Spiralen das Risiko für Harnwegsinfektionen erhöhen<sup>18, 60</sup>.

Empfehlenswert ist es auch eine Auskühlung zu vermeiden. Bei einer offenen kontrollierten Studie von *BAERHEIM* und *LAERUM* führte eine gezielte Abkühlung der Füße mit einer durchschnittlichen Latenzzeit von 55 Stunden zu Zystitis-ähnlichen Symptomen. In einer Kontrollperiode traten hingegen keine Rezidive auf<sup>5</sup>.

Eine weitere Empfehlung ist der Verzicht auf übermäßige Intimhygiene, da dies das vorhandene lokale protektive Mikrobiom und Milieu, bestehend aus Laktobazillen und antimikrobiellen Peptiden, schädigen kann<sup>18</sup>.

Bei Frauen in der Postmenopause wird eine lokale Estriolsubstitution empfohlen, damit einer vaginalen Atrophie entgegengewirkt wird. Hierdurch soll die vaginale Besiedlung mit uropathogenen Erregern, sowie der vaginale pH-Wert vermindert werden<sup>7, 18</sup>.

Die Anwendung von Phytotherapeutika zählt ebenfalls zu den alternativen Behandlungsmethoden. Hierbei werden unterschiedliche Heilpflanzen zur antibakteriellen Wirksamkeit empfohlen. In einer Studie von *WAGENLEHNER et al.* konnte bei der Behandlung von unkomplizierten, neu diagnostizierten, unteren Harnwegsinfektionen gezeigt werden, dass eine Pflanzenkombination aus Rosmarin (*Rosmarini folium*), Tausendgüldenkräut (*Centaurii herba*) und Liebstöckel (*Levistici radix*) gegenüber einer Behandlung mit einem Standard-Antibiotikum nicht unterlegen ist<sup>75</sup>.

Für eine Immunoprophylaxe zur Stimulation des Immunsystems stehen verschiedene Applikationswege zur Verfügung. Als orales Immunstimulans ist vor allem das Produkt OM-89 zu nennen. Es handelt sich um Kapseln mit bakteriellen Zellwandbestandteilen 18 uropathogener *E. coli* Stämme. In Metaanalysen von *BAUER et al.* und *NABER et al.* konnte die Wirksamkeit von OM-89 zur Prävention bestätigt werden, da es die Rezidivrate im Durchschnitt um 39 % gegenüber Placebo gesenkt hat<sup>6, 51</sup>.

Parenteral ist der Impfstoff StroVac zur Langzeitprävention zugelassen. Dieser enthält 10<sup>9</sup> inaktivierte Erreger von insgesamt zehn Stämmen aus fünf Spezies und konnte Durchbruchinfektionen gegenüber Placebo senken<sup>18, 73</sup>.

Akupunktur konnte als kutane Immunstimulation einen positiven protektiven Effekt zeigen. *AUNE et al.* führte eine dreiarmlige kontrollierte Studie durch, wobei in der Akupunkturgruppe 85 % der Probandinnen keine Harnwegsinfektion entwickelten. In einer Scheinakupunkturgruppe waren dies nur 58 % und in der unbehandelten Kontrollgruppe 36 %<sup>4</sup>.

### **Hemmung der bakteriellen Adhäsion**

Die Aszension von uropathogenen Erregern und die Adhäsion an das Urothel ist der zentrale Mechanismus in der Pathogenese von Harnwegsinfektionen. Verschiedene

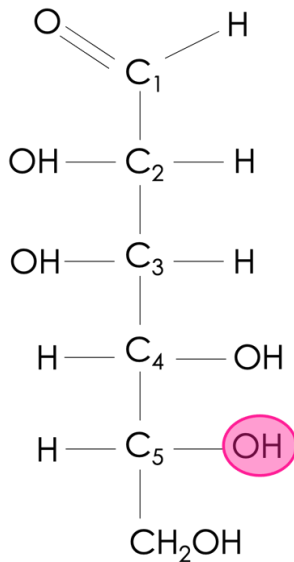
Vacciniumarten wie Cranberrys und Moosberen, Glucosaminoglykan-Schicht-Substituenten und Mannose sollen zu einer Verringerung von diesem Mechanismus beitragen <sup>78</sup>.

### ***1.5.1 Eigenschaften, Wirkmechanismus und Studienlage von D-Mannose***

#### *Chemischer Aufbau von D-Mannose*

Das Molekül D-Mannose gehört chemisch zur Gruppe der Kohlenhydrate. Kohlenhydrate (Saccharide) sind organische Verbindungen, welche aus einer Kette von mindestens drei Kohlenstoffatomen (C) bestehen. Mannose gehört mit insgesamt sechs Kohlenstoffatomen zu den Hexosen und ist ein Monosaccharid. Jedes Kohlenhydrat enthält eine Carbonylgruppe (C=O). Unterschieden wird, ob sich diese Carbonylgruppe endständig am ersten Kohlenstoffatom befindet und eine Aldehydgruppe (CH=O) bildet oder am zweiten und hier eine Ketogruppe (>C=O) existiert. Somit werden die Kohlenhydrate entsprechend weiter klassifiziert in Aldosen oder Ketosen. Die übrigen Kohlenstoffatome sind mit einem Wasserstoffatom und einer OH-Gruppe verbunden. Es ergeben sich H-C-OH-Gruppen. Ist ein Kohlenstoffatom von vier unterschiedlichen Substituenten umgeben, wird dieses als asymmetrisch substituiert bezeichnet. Die Bindungen der Substituenten zum jeweiligen Kohlenstoffatom liegen im größtmöglichen Abstand zueinander. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit, dass die OH-Gruppe eines asymmetrischen Kohlenstoffatoms nach links (L) oder rechts (D) zeigen kann. Die Bezeichnung der D- und L-Konfiguration wurde durch den Chemiker Emil Fischer definiert. Die Darstellung von Kohlenhydratmolekülen in gestreckter Form wird als Fischer-Projektion bezeichnet. Bei Kohlenhydraten mit mehr als drei Kohlenstoffatomen bezieht sich die Definition der D/L-Nomenklatur auf das am weitesten von der Aldehydgruppe entfernte asymmetrische Kohlenstoffatom. Abbildung 1 zeigt exemplarisch D-Mannose in der Fischer-Projektion. Im Stoffwechsel sind Kohlenhydrate als Bausteine von Membranen an Lipide oder Proteine gebunden. Dieser Prozess wird Glykosylierung genannt <sup>57</sup>.

Mannose wird über eine Stickstoff-Bindung an die Uroplakine der Deckzellenschicht glykosyliert gebunden <sup>82</sup>.



**Abb. 1: D-Mannose in der Fischer-Projektion. Das am weitesten von der Aldehydgruppe entfernte asymmetrische Kohlenstoffatom fünf hat die OH-Gruppe nach rechts (D).**

### Der vermutete Wirkmechanismus von D-Mannose zur bakteriellen Adhäsionshemmung

Wie bereits beschrieben bindet *E. coli* mittels Typ-1-Pili mit der Proteinuntereinheit FimH an Mannoseeinheiten der Uroplakine der Deckzellenschicht<sup>37, 49</sup>. Es wird angenommen, dass oral zugeführte D-Mannose ins Blut aufgenommen und ein bestimmter Anteil im Urin ausgeschieden wird. Enthält der ausgeschiedene Urin ausreichend hohe Mengen an D-Mannose, wirkt diese als FimH-Antagonist und bindet an die Typ-1-Pili von Bakterien. Dadurch wird die Anheftung der Bakterien an das Urothel blockiert und die Komplexe aus Zucker und Bakterien können bei der Miktion ausgeschwemmt werden<sup>13</sup>. Es kommt zu einer Absenkung der Bakterienlast intravesikal<sup>11, 33, 43, 54, 59, 79, 82</sup>.

### Studienübersicht zu D-Mannose

Studien haben gezeigt, dass D-Mannose, wenn sie als bioverfügbare Monomere aufgenommen wird, im oberen Darmanteil absorbiert wird und zu erhöhten Blutplasmaspiegeln führt<sup>3, 80</sup>. In der Studie von *ALTON et al.* konnte gezeigt werden, dass die Konzentration von D-Mannose im Blut dosisabhängig mit zunehmender oraler Einnahme anstieg. Nach dem Auftreten im Plasma wird D-Mannose mit einer geschätzten Halbwertszeit von vier Stunden rasch aus dem Blutkreislauf entfernt, wobei der Rest innerhalb von acht Stunden im Urin ausgeschieden wird<sup>3</sup>.

Studien zur Urinausscheidung von oral aufgenommener D-Mannose liegen nur in einem geringen Ausmaß vor, sodass es nicht möglich ist ein entsprechendes Verhältnis zu beschreiben<sup>28, 47</sup>.

Die ersten Untersuchungen zum Effekt von Kohlenhydraten auf die Adhäsion von Bakterien an menschlichen Schleimhautzellen fanden bereits Ende der siebziger Jahre statt.

*OFEK et al.* veröffentlichten 1977 Untersuchungen zur Adhäsion von Gram-negativen Bakterien an Schleimhautzellen durch Pili. Es wurden Daten präsentiert die darauf hindeuteten, dass die Anheftung von *E. coli* an Epithelzellen durch Mannoserezeptoren vermittelt wird. Zuvor war über die mutmaßlichen Rezeptorstellen nichts bekannt<sup>54</sup>.

1980 führten *SCHAEFFER et al.* eine Studie mit verschiedenen Kohlenhydraten zur Adhärenz von *E. coli* an Uroepithelzellen durch<sup>58</sup>. Hierbei zeigte eine Konzentration von 2,5 % D-Mannose, D-Mannitol,  $\alpha$ -methyl-D-Mannosid oder Hefemannan eine vollständige Hemmung der Adhärenz an Epithelzellen. Die Verringerung der Konzentration dieser Substanzen auf 1,0 % bis 0,1 % führte zu einer teilweisen Hemmung der Bakterianheftung an die Epithelzellen. D-Fructose, D-Lyxose, D-Arabinose und D-Glyceraldehyd führten bei einer 2,5 %-igen Konzentration nur zu einer teilweisen Hemmung der Adhäsion. Andere weitere getestete Kohlenhydrate wie beispielsweise D-Glucose oder L-Mannose zeigten selbst bei einer Konzentration von 2,5 % keinen inhibitorischen Effekt. Die höchste Hemmung der Bakterianheftung zeigten die Kohlenhydrate D-Mannose und D-Mannitol, welche sechs Kohlenstoffatome besitzen. Es konnte beobachtet werden, dass Kohlenhydrate mit derselben Konfiguration der Hydroxylgruppe (-OH) an Kohlenstoffatom zwei wie bei D-Mannose eine komplette Inhibition der Adhärenz bewirkten. War die Hydroxylgruppe von Kohlenstoffatom zwei auf der gegenüberliegenden Seite, zeigte sich auch bei einer 2,5 %-igen Konzentration der Kohlenhydrate kein Effekt. Die hemmende Wirkung von D-Mannose war nicht bei allen Epithelzellen gleich. Je eher die Epithelzellen zur Aufnahme von Erregern empfänglich waren und somit mutmaßlich mehr Bakterien zur gleichen Zeit andocken konnten, desto geringer war die hemmende Wirkung. Es wurde vermutet, dass es möglicherweise Unterschiede zwischen den Epithelzellen in der Anzahl der Rezeptorstellen bzw. dem Grad der Empfindlichkeit dieser Rezeptoren gegenüber Bakterien gibt<sup>58</sup>. Die Ergebnisse dieser Studie deuteten bereits darauf hin, dass die Adhärenz durch Wechselwirkungen zwischen spezifischen

Kohlenhydratmolekülen und Rezeptoren auf der Bakterienoberfläche verändert werden konnte.

Mehrere kleine klinische Studien lieferten erste Hinweise, dass eine orale D-Mannose-Supplementierung die Häufigkeit von HWI-Rezidiven reduzieren kann.

*PORRU et al.* untersuchten 2014 im Rahmen einer randomisierten cross-over-Studie die Wirksamkeit von D-Mannose bei der Behandlung und Prophylaxe von rHWI <sup>56</sup>. Patientinnen mit einer akuten symptomatischen HWI oder drei oder mehr rHWI im letzten Jahr wurden entweder einer Antibiotika-Therapie oder einer Behandlung mit oraler D-Mannose zugeführt. Als primärer Endpunkt war die Bewertung der verstrichenen Zeit bis zum Wiederauftreten einer HWI festgelegt. Orale D-Mannose erwies sich als eine sichere und vielversprechende Behandlungsmöglichkeit für akute und rezidivierende Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Frauen. Es wurde ein statistisch signifikanter Unterschied für die Patientinnen, welche orale D-Mannose einnahmen, festgestellt. Während einer durchschnittlichen 24-wöchigen Behandlung blieb diese Gruppe im Vergleich zur Antibiotika-Behandlungsgruppe signifikant länger infektionsfrei. Der Unterschied zeigte sich bei der Behandlung akuter Episoden als auch als sichere, präventive Therapie von Harnwegsinfektionsrückfällen, verglichen mit einer gezielten Antibiotikabehandlung <sup>56</sup>.

Eine weitere klinische Studie zur Untersuchung der Wirksamkeit von D-Mannose-Pulver zur Vorbeugung von rezidivierenden Harnwegsinfektionen wurde 2014 von *KRANJČEC et al.* durchgeführt <sup>36</sup>. Eingeschlossen wurden Patientinnen welche die Kriterien für rHWI erfüllten. Eine anfängliche Harnwegsinfektion wurde antibiotisch behandelt. Stellte sich die Kontrollurinprobe als unauffällig dar, wurden die Patientinnen in eine der drei zu untersuchenden Gruppen zur Prophylaxe randomisiert. Gruppe eins erhielt einmal täglich abends 2 g D-Mannose-Pulver. Gruppe zwei erhielt einmal täglich abends 50 mg Nitrofurantoin. Gruppe drei erhielt keine weitere Therapie. Die Prophylaxe wurde am Ende der Studienzeit nach sechs Monaten abgesetzt. Bei einem Wiederauftreten einer Infektion wurde die Prophylaxe abgesetzt, eine Antibiotikatherapie verordnet, und die Patientinnen wurden nicht wieder in die Studie aufgenommen. Der primäre Endpunkt der Studie war die Anzahl der Patientinnen in jeder Gruppe, die nach sechs Monaten keine rezidivierenden Harnwegsinfektionen hatten. Es konnte gezeigt werden, dass D-Mannose-Pulver bei der Prävention von Harnwegsinfektionen während der sechs-monatigen Prophylaxe

wirksam war. Die Rezidivrate unterschied sich nicht zwischen Patientinnen, die eine Standard-Nitrofurantoin-Prophylaxe erhielten, und denen, die D-Mannose-Pulver einnahmen. Im Vergleich zu Patientinnen in der Gruppe ohne Prophylaxe war die Rezidivrate bei den aktiven Gruppen signifikant erniedrigt. Die Patientinnen in der D-Mannose-Gruppe hatten zusätzlich ein signifikant geringeres Risiko für Nebenwirkungen als die Patientinnen in der Nitrofurantoin-Gruppe<sup>36</sup>.

*DOMENICI et al.* führten 2016 eine Pilotstudie durch, in der untersucht wurde, ob D-Mannose alleine bei der Behandlung akuter Harnwegsinfektionen bei Frauen wirksam ist und ob sie bei der Behandlung von Rezidiven von Nutzen ist<sup>15</sup>. Frauen mit akuter Blasenentzündung und / oder rezidivierenden Harnwegsinfektionen in der Vorgeschichte wurden zur Teilnahme eingeladen. Ein validierter Fragebogen zur Erfassung von Schlüsselsymptomen und Einschätzung des Schweregrads einer HWI wurde bei der Bewertung verwendet. Ein D-Mannose-Präparat wurde drei Tage lang zweimal täglich verabreicht und dann zehn Tage lang einmal täglich. Die Veränderungen bei den Symptomen der Patientinnen, die therapeutischen Wirkungen und die Veränderungen der Lebensqualität wurden klinisch und mit einem speziell validierten Fragebogen bewertet. Nach der beschriebenen Behandlung wurden die Patientinnen nach dem Zufallsprinzip ausgewählt, ob sie sechs Monate lang eine Prophylaxe mit D-Mannose (einmal täglich für eine Woche alle zwei Monate) erhielten oder nicht. Die nach Abschluss der Behandlung ermittelten mittleren Werte im Fragebogen zeigten im Vergleich zu den Ausgangswerten signifikante Auswirkungen auf die Kontrolle spezifischer Symptome wie Dysurie, Pollakisurie, Harndrang, suprapubische Schmerzen und Nykturie. D-Mannose schien eine signifikante positive Wirkung auf die Beseitigung von Harnwegsinfektionen und die Verbesserung der Lebensqualität zu haben. Eine prophylaktische Verabreichung über sechs Monate zeigte bei den behandelten Patientinnen 4,5 % Rezidive im Vergleich zu 33,3 % bei den unbehandelten Patientinnen<sup>15</sup>.

2017 führten *PHÉ et al.* eine offene Machbarkeitsstudie durch, in der untersucht wurde, ob D-Mannose bei Patienten mit Multipler Sklerose, die über rHWI berichten, zur Vorbeugung eingesetzt werden kann<sup>55</sup>. Multiple Sklerose Patienten mit und ohne Blasenkatheter mit wiederkehrenden Harnwegsinfektionen wurden aufgenommen. Die Teilnehmer erhielten 16 Wochen lang zweimal täglich 1,5 g D-Mannose-Pulver und wurden angewiesen, vermutete Harnwegsinfektionen zu Hause mit Urinstäbchen zu überwachen. In Tagebüchern wurden die Compliance, die Anzahl der

Antibiotikaverschreibungen für Harnwegsinfektionen sowie die Ergebnisse der Urinstäbchen und -kulturen festgehalten. Die Zahl der monatlich nachgewiesenen Harnwegsinfektionen nahm sowohl bei Katheteranwendern als auch bei Nichtanwendern ab. Es wurden keine unerwünschten Wirkungen gemeldet. Als Schlussfolgerung wurde die Anwendung von D-Mannose bei Multiple Sklerose Patienten mit rezidivierenden Harnwegsinfektionen und die Selbstüberwachung auf Infektionen als machbar und sicher eingestuft <sup>55</sup>.

## 1.6 Ziele der Studie und Dissertation

Die Relevanz der Forschung zu alternativen Behandlungsmethoden von HWI ergibt sich durch die derzeitige Situation. Das häufige Auftreten von Zystitiden in Verbindung mit zunehmenden Antibiotikaresistenzen erschwert die Behandlung von HWI. UPEC stellen die häufigsten Erreger dar. Durch ihren peritrich begeißelten Aufbau bieten sie einen Angriffspunkt in der Behandlung und Prophylaxe von HWI bei nicht-antibiotischen Strategien. Die bereits in Kapitel 1.1 beschriebene gesamtgesellschaftliche Problematik, unterstützt zusätzlich die Bedeutung der Entstehung einer Dissertation in diesem Sektor.

D-Mannose wird in Deutschland zur Rezidivprophylaxe von Harnwegsinfektionen verwendet. Dies beruht auf Veröffentlichungen der Deutschen Gesellschaft für Urologie e.V., die in der entsprechenden S3-Leitlinie zu Harnwegsinfektionen eine Einnahme in bestimmten Risikogruppen als Maßnahme zur Risikoreduktion empfehlen <sup>78</sup>. Diese Empfehlung weiter zu beurteilen, die Hintergründe von bereits zu D-Mannose durchgeführten Studien zu beleuchten und letztlich höhere Evidenz für die Substanz D-Mannose zu erhalten, war der Antrieb und das Ziel meiner Dissertation.

Die initiierte Studie des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH stellte die Grundlage hierfür dar. Die Dissertation war ein Teil der Studie, welche ich als klinischer Prüfarzt begleitet habe.

Bei den oben angeführten Studien konnten bereits klinische Effekte durch D-Mannose Einnahme gesehen werden. Vorliegende experimentelle Daten zeigten anti-adhäsive Eigenschaften bei uropathogenen *E. coli*. Im Rahmen der Grundlagenforschung fehlen jedoch Daten, welche den beschriebenen vermuteten Wirkmechanismus mit der Wirksituation beim Menschen zeigen. Der Gesamtansatz der initiierten Studie von

Klosterfrau hatte zum Ziel, einen Nachweis für die biologische Plausibilität einer oralen D-Mannose Einnahme zu erbringen. Hierfür sollte bei einem gesunden Probandenkollektiv die ausgeschiedene Menge von D-Mannose im Urin zwölf Stunden nach Einnahme gemessen werden. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob im Anschluss eine relevante Adhäsionswirkung bei einem *in-vitro* Adhäsionsassay gesehen werden kann.

Zur Vollständigkeit wurden entsprechend folgende Ziele im „Clinical Study Protocol“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH festgehalten und definiert <sup>46</sup>.

„Primäres Ziel:

Beurteilung und Quantifizierung der Urinausscheidung von D-Mannose (ausgedrückt als Urinkonzentration) nach oraler Einnahme von 2 g D-Mannose im Vergleich zu Placebo anhand von Urinproben, die zu Studienbeginn und innerhalb der ersten zwölf Stunden nach der Einnahme an zwei aufeinanderfolgenden Tagen entnommen wurden. Innerhalb dieser 12 Stunden werden drei 4-Stunden-Fractionen gesammelt (null bis vier, vier bis acht, acht bis zwölf Stunden), wobei erwartet wird, dass die D-Mannose-Konzentration im Urin von den ersten zu den letzten Stunden abnimmt.

Sekundäres Ziel:

Die an zwei aufeinanderfolgenden Tagen zu Studienbeginn gesammelten Urinproben und eine der drei 4-Stunden-Fractionen, die innerhalb der ersten 12 Stunden nach jeder Einnahme gesammelt wurden, werden in einem *ex-vivo/in-vitro*-Adhäsionshemmungstest mit UPECs und Harnblasenepithelzellen getestet, um die antiadhäsiven Eigenschaften der Urinproben zwischen den beiden Einnahmegruppen zu vergleichen. Die zu untersuchende 4-Stunden-Fraktion wird für jede Probandin unter Berücksichtigung der maximalen D-Mannose-Konzentration im Urin ausgewählt. Die folgende Hypothese hierzu wird aufgestellt: Die *in-vitro* Adhäsionshemmung ist von der D-Mannose-Konzentration im Urin abhängig. Mit ansteigender D-Mannose-Konzentration im Urin wird eine stärkere Adhäsionshemmung erwartet.“

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

- -80 °C Gefrierschrank [Thermo Scientific, Model: Hera Freeze HFU T Series Waltham, MA, USA]
- 0,22 µm Sterilfilter [Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland]
- 10 % fötales Rinderserum [Biochrom, Berlin, Deutschland]
- 24-Well Platten [Orange Scientific, Braine-l'Alleud, Belgien]
- 37 °C Wasserbad [VWR, Radnor, PA, USA]
- Agarplatten [Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA]
- Brutschrank [VWR, Radnor, PA, USA]
- Cobas u 411 urine-analyzer [Roche, Basel, Schweiz]
- Combur-Test® [Roche, Basel, Schweiz]
- Connex® Spot Monitor (CSM) [Welch Allyn, Skaneateles Falls, NY, USA]
- DMEM-Medium [Thermo Scientific, Waltham, MA, USA]
- *E. coli* CHD17 [Klinische Isolate, UKGM Urologie Gießen, Deutschland]
- *E. coli* CHD22 [Klinische Isolate, UKGM Urologie Gießen, Deutschland]
- *E. coli* CHD94 [Klinische Isolate, UKGM Urologie Gießen, Deutschland]
- *E. coli* UTI89 [DSMZ, Braunschweig, Deutschland]
- Humane weibliche T24-Harnblasenepithelzellen [DMSZ, Braunschweig, Germany]
- PBS [Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Deutschland]
- Placebo: Glukose [S.I.I.T, Metropolitanstadt Mailand, Italien]
- Prüfpräparat: D-Mannose [S.I.I.T, Metropolitanstadt Mailand, Italien.]
- S-Monovette® K3 EDTA 1,6 ml [Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland]
- S-Monovette® Lithium-Heparin Gel+ 4 ml [Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland]
- Safety-Multifly®-Kanüle [Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland]
- SAS-Software [SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA]

- Seca® 769 Säulenwaage [Seca GmbH und co. kg., Hamburg, Deutschland]
- Trypsin [Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA]
- Uricult® plus [Roche, Basel, Schweiz]
- Urin-Monovette® 4 ml [Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland]
- Urin-Monovette® 10 ml [Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland]
- Urin-Sammelflasche 2 l [Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland]
- Zentrifuge [Eppendorf, Hamburg, Deutschland]

## 2.2 Methoden

### **2.2.1 Studiendesign und Konzept**

Als unabhängiger Sponsor der durchgeführten Studie fungierte die MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH, Gereonsmühlengasse 1-11, 50670 Köln. Dieser war somit verantwortlich für Initiierung und gesamte Studienkonzeption, als auch an der Durchführung und Delegation von Teilschritten der Studie direkt beteiligt.

Für die unterschiedlichen Teilbereiche der Studie wurden durch den Sponsor Firmen oder Kliniken beauftragt.

Klinisches Studienzentrum war die Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen unter der Leitung von Prof. Dr. med. F. Wagenlehner. Dieser fungierte als Hauptstudienleiter. Unterstützt wurde die klinische Organisation und Umsetzung durch das Koordinierungszentrum für Klinische Studien (KKS-Marburg). Der klinische Teil fand an jeweils einem Wochenende (Tag null bis Tag zwei) im März und Mai 2020 statt. Die anschließenden *ex-vivo* Analysen der Urinproben wurden im urologischen Labor der urologischen Infektiologie des Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg (BFS) durchgeführt. Laborleitung des BFS war Frau Dr. M. Loose. Ich wurde durch Prof. Dr. med. F. Wagenlehner als klinischer Prüfarzt für die Studie vorgesehen. Die Unterstützung des Studienprojekts als klinischer Prüfarzt mit wissenschaftlicher Eigenleistung sollte den Rahmen für meine Dissertation geben. Diese Absicht des Studienleiters wurde vor Start des Studienprojekts mit dem Sponsor abgestimmt, vereinbart und genehmigt. Im Zuge dessen habe ich alle Teilschritte der klinischen Durchführung sowie der Laborarbeiten

begleitet. Hierzu gehören die Unterstützung bei der Probandinnenrekrutierung, Durchführung der Screeningvisite, Vorbereitung, Begleitung, Durchführung und Nachbereitung der Studienwochenenden sowie Unterstützung und Durchführung der *ex-vivo/in-vitro* Versuche im BFS.

An Auftragsforschungsinstitute (CRO, eng.: Contract Research Organisation) kann ein Sponsor Aufgaben bei Planung und Durchführung von klinischen Studien delegieren. Diese überwachen und vollziehen die Umsetzung der delegierten Aufgaben. In dieser Studie wurden die Firmen „Arbeitskreis klinische Prüfungen PD Dr. med. Seiler GmbH“ (AKP), „d.s.h. statistical services GmbH“ und „BBS - Büro für Biometrie und Statistik, Dipl.-Math. H. Lorenz“ vom Sponsor als CRO beauftragt. AKP überwachte sowohl die gesamte klinische Studiendurchführung als auch die bioanalytischen Umsetzungen und Interpretationen. Die statistische Konzeption und Auswertung fand von und durch Klosterfrau in Zusammenarbeit mit den gerade genannten Statistikfirmen statt. Die bioanalytische Bestimmung der D-Mannose Konzentration wurde durch das Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (IME), Institutsteil Translationale Medizin und Pharmakologie (TMP) in Frankfurt am Main unter der Leitung von Herrn Dr. R. G. durchgeführt.

Bei der vom Sponsor vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine monozentrische, doppel-blinde, randomisierte und Placebo-kontrollierte Studie. Im Vorfeld der Durchführung wurde das Studiendesign und die geplante Arbeit von der Ethikkommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität bewertet (Vorsitz Prof. Dr. H. Tillmanns, Aktenzeichen 214/19) und unter dem Studiencode MCMK0119 bei AKP als Projektkennung geführt.

Die Informationen und Aufklärungen über die Zielsetzungen und Durchführung der Studie wurde den Probandinnen in schriftlicher Form im Rahmen der Screening-Visite ausgehändigt. Die Teilnehmerinnen haben ihre schriftliche Einwilligungserklärung vor Studienteilnahme abgegeben. Die exakte Studienprozedur wird im Folgenden separat detailliert dargestellt.

### **2.2.2 Ein- und Ausschlusskriterien, Abbruchkriterien**

Folgende Kriterien wurden im „Clinical Study Protocol“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH festgehalten und definiert <sup>46</sup>.

### Einschlusskriterien

- Weibliche Probandinnen im Alter zwischen 18 und 64 Jahren
- Unterschriebene Einwilligungs- und Datenschutzerklärung
- Keine klinischen Anzeichen und Symptome (z.B. Dysurie, Pollakisurie und Harndrang) einer akuten Harnblasenentzündung am Tag des Screenings und der Randomisierung, definiert durch einen Acute Cystitis Symptom Score (ACSS) im Bereich „typische Symptome“ von < 6
- Negativer Teststreifen auf Leukozyten im Mittelstrahlurin am Tag des Screenings
- Bakterieller Urinstatus: Koloniebildende Einheiten <  $10^3$ /mL am Tag des Screenings
- Probandinnen, die gewillt sind, auf die Einnahme der unzulässigen Begleitmedikationen und Produkte zu verzichten
- Probandinnen, die gewillt sind, die Studienprozeduren und Vorgaben zur Diät zu befolgen

### Ausschlusskriterien

- Männer
- Schwangere oder stillende Frauen oder Frauen, die keine bewährte Methode zur Empfängnisverhütung nutzen
- Vorhandensein jeglicher prädisponierender Faktoren oder jeglicher Leiden, die möglicherweise eine Harnwegsinfektion fördern oder auslösen könnten (d.h. Nierenkrankheiten, Nierensteine, polyzystische Nieren, Anomalitäten des Harntrakts oder frühere Operationen der Harnwege, Katheterisierung der Harnwege, Verletzungen der Wirbelsäule etc.)
- Jegliche Anzeichen von komplizierten Harnwegsinfektionen und/oder Nierenbeckenentzündung (d.h. Fieber  $\geq 38^\circ$  C [aurikular gemessen], Flanken- oder Rückenschmerzen, Schüttelfrost) innerhalb von 30 Tagen vor dem Tag der Randomisierung und am Tag der Randomisierung
- Probandinnen mit Diabetes mellitus Typ 1 oder 2
- Probandinnen mit diagnostizierten (chronischen) Erkrankungen (z.B. Hypertonie)

- Probandinnen mit bekannter oder vermuteter Überempfindlichkeit gegen einen oder mehrere Inhaltsstoffe des Verums und / oder des Placebos
- Probandinnen, die innerhalb von 6 Stunden vor Randomisierung eine analgetische (z.B. NSARs etc.) und/oder diuretische Behandlung erhalten haben
- Verzehr von Xanthin-haltigen Präparaten oder Lebensmitteln (z.B. Kaffee, Cola, Schokolade, Schwarztee etc.) innerhalb von 12 Stunden vor Randomisierung
- Regelmäßige Nutzung von Vaccinium-haltigen Produkten (z.B. alle Formen von Blaubeeren, Cranberries, Heidelbeeren, Preiselbeeren etc., d.h. Früchte, getrocknete Früchte, Pillen, Säfte oder Zusätze), Probiotika oder andere Lebensmittel / Lebensmittelzusätze, von denen bekannt ist, dass sie einen Einfluss auf Harnwegsinfektionen haben, innerhalb eines Monats vor Randomisierung
- Infektion mit multi-resistenten Bakterien in den letzten 12 Monaten vor Randomisierung
- Nutzung jeglicher antimikrobieller Produkte oder anderer Begleitbehandlungen, die nach Meinung des Prüfarztes die Studienziele störend beeinflussen könnten
- Frühere(s) oder bestehende(s) klinisch signifikante(s) Krankheit/Leiden, die/das nach Einschätzung des Prüfarztes die Studienziele störend beeinflussen oder die Sicherheit der Probandin beeinträchtigen könnte
- Teilnahme an anderen klinischen Prüfungen zur gleichen Zeit oder innerhalb 4 Wochen vor Aufnahme in diese Studie oder vorangegangene Teilnahme an dieser Studie
- Bekannte oder vermutete Unfähigkeit dem Untersuchungsplan nachzukommen (z.B. keine feste Adresse, früherer oder (und) bekannter Drogenmissbrauch, bekannte Unzuverlässigkeit oder Vorhandensein einer labilen psychiatrischen Anamnese)
- Geschäftsunfähigkeit und/oder andere Umstände, die verhindern, dass die Probandin die Art, den Umfang und die möglichen Auswirkungen der Studie versteht
- In Haft auf gerichtliche oder behördliche Anordnung
- Schwierigkeiten die Sprache, in der die Probandeninformation, Einwilligungserklärung und die Datenschutzerklärung formuliert sind, zu verstehen
- Mitglieder der Prüfstelle (Prüfarzt, Study Nurse, usw.), Mitarbeiter des Sponsors oder von AKP, oder nahe Verwandte

### Abbruchkriterien

- Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse (SUEs)
- Rücknahme der Einwilligung der Probandin
- Jegliche Situation, die vom Prüfarzt oder der Probandin als schädigend für die Probandin eingeschätzt wird
- Erkrankungen, die im Verlauf der Studie auftreten, Behandlung benötigen und kein SUE darstellen, die jedoch nach Meinung des Prüfarztes dem Erreichen der Studienziele entgegenstehen
- Nicht-Einhaltung der Studienbedingungen oder erhebliche Abweichungen von den im Prüfplan vorgegebenen Prozeduren

### **2.2.3 Nicht erlaubte Begleitmedikation/ -therapien**

Folgende Kriterien wurden im „Clinical Study Protocol“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH festgehalten und definiert <sup>46</sup>.

Begleitmedikationen waren im Allgemeinen verboten. Ausnahmen gab es jedoch für Medikamente, welche bei der Behandlung von potentiell unerwünschten Ereignissen nötig sind sowie Medikamente, die mindestens vier Wochen vor Studieneinschluss regelmäßig und ohne Dosisänderung eingenommen wurden. Diese durften zusätzlich keinen Einfluss auf die Studienziele haben und sollten während der Studienteilnahme in derselben Dosierung wie zuvor eingenommen werden. Insbesondere die folgende Auflistung an Medikamenten bzw. Behandlungen waren während der Studienteilnahme nicht zugelassen:

- Systemisch oder lokal angewandte Antibiotika mit dem Ziel der Prophylaxe, wie beispielsweise eine niedrigdosierte Langzeitbehandlungen mit Antibiotika
- Nutzung von Cranberry-Saft oder jeglicher Medikationen bzw. Nahrungsergänzungsmitteln, welche Cranberry enthalten

- Nutzung von Agenzien, die die Wasserausscheidung fördern, z.B. Extrakte der gemeinen Goldrute, Birkenblätter oder anderer pflanzlicher urologischer Agenzien z.B. Extrakte der Moosbeerenblätter
- Agenzien zur Ansäuerung des Urins, z.B. L-Methionin
- Regelmäßiger Gebrauch von Vaccinium-haltigen Produkten. Zu nennen sind alle Formen von Blaubeeren, Cranberries, Heidelbeeren, Preiselbeeren, etc. in Form von Früchten, getrockneten Früchten, Pillen, Säften oder als Zusätze.
- Probiotika oder andere Lebens- und Nahrungsergänzungsmittel, von denen bekannt ist, dass sie einen Einfluss auf Harnwegsinfektionen haben

#### ***2.2.4 Sicherheitsendpunkte***

Folgende Kriterien wurden im „Clinical Study Protocol“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH festgehalten und definiert <sup>46</sup>.

- Die Verträglichkeit, einschließlich der Bewertung durch die Probandinnen und den Prüfarzt
- unerwünschte Ereignisse, die bei der Behandlung aufgetreten sind
- Dokumentation von Studienabbrüchen
- Vitalparameter und körperliche Untersuchungen (vor/nach der Behandlung)

#### ***2.2.5 Ablauf der Studie***

##### *Klinische Studienprozedur*

Zur Rekrutierung der Studienpopulation wurden im Vorfeld weibliche Personen über den internen E-Mail-Rundverteiler des Rechenzentrums der Justus-Liebig-Universität Gießen gesucht. Hierauf meldeten sich potenziell in Frage kommende Probandinnen und wurden, soweit möglich, gemäß den genannten Ein- und Ausschlusskriterien vorgescreeent. Die vorausgewählten Probandinnen wurden per E-Mail kontaktiert, um sie zum Screening durch den Prüfarzt einzuladen.

Die Screeningvisite erfolgte zwei Tage vor dem jeweiligen Studienwochenende. Als erstes führte der Prüfarzt das Aufklärungsgespräch. Hierbei wurden offene Fragen

geklärt und die schriftliche Einwilligungserklärung zur Teilnahme an der Studie eingeholt. Am ersten Screeningtag sind 18 Probandinnen gescreent worden, wovon zwölf an Tag null randomisiert wurden. Im Nachhinein wurde eine Probandin identifiziert, welche ein Einschlusskriterium verletzt hatte. Diese Probandin wurde mit in die Auswertung einbezogen aber durch eine weitere Probandin am zweiten Studienwochenende ersetzt. Letztlich wurden somit am zweiten Screeningtag 19 Probandinnen gescreent und weitere 13 Teilnehmerinnen an Tag null randomisiert. Jede am Screening teilnehmende Person erhielt fortlaufend eine Probandennummer.

Es wurden die demografischen Daten sowie die medizinische Vorgeschichte nach Maßgabe der Ein- und Ausschlusskriterien, inklusive aller aktuellen Begleitmedikationen erfasst. Anschließend erfolgte eine körperliche Untersuchung mit Erhebung von Körpergröße und -gewicht sowie Erfassung der Vitalzeichen bestehend aus Körpertemperatur aurikulär, Puls und Blutdruck. Zur Bestimmung der Bakterienbelastung und der Leukozyten im Urin, als auch zur Durchführung eines Schwangerschaftstests, wurde eine Urinprobe aus Mittelstrahlurin gewonnen. Der Leukozytennachweis erfolgte mittels Urinteststreifen in der Schnellanalyse im Urinlabor der urologischen Poliklinik. Die Bakterienlast wurde durch Anlage einer Urinkultur in der mikrobiologischen Routinediagnostik festgestellt. Zur Durchführung des Schwangerschaftstest wurde ein Teil der Urinprobe zur Analyse in das Zentrallabor des Klinikums versendet. Eine venöse Blutentnahme zur Bestimmung eines kleinen Blutbilds und klinischer Chemie, einschließlich errechneter Plasma-Kreatinin-Clearance, Natrium, Kalium und Glukose, wurde mittels Safety-Multifly®-Kanüle durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte ebenfalls im Zentrallabor des Klinikums. Als letzten Screeningparameter haben die Probandinnen den ACSS-Fragebogen ausgefüllt.

Am Tag der Randomisierung (Tag null) sind die geeigneten Probandinnen rechtzeitig zur Baseline-Bewertung in der Prüfstelle erschienen. Es wurden neuerlich die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft und der ACSS-Fragebogen ausgefüllt. Konnte Probandinnen-individuell kein Hinderungsgrund festgestellt werden, erfolgte die Randomisierung im Verhältnis 1:1 über alle verfügbaren Probandinnen. Jede Probandin erhielt eine spezifische Random-Nummer, die neben der Probandennummer in der Patientenakte und in der Randomisierungsliste dokumentiert wurde. Die Prüfpräparate waren äußerlich identisch und unterschieden sich insgesamt nicht vom Erscheinungsbild. Auf jedem Beutel und jeder Umverpackung war die Random-

Nummer aufgedruckt. Anhand dieser Nummer war es möglich die Einnahmezuweisung zu identifizieren, damit die Verblindung im Notfall hätte aufgehoben werden können.

Study Code: MCMK0119
Prüfarzt/Zentrum: Prof. Dr. med. F. Wagenlehner, Justus-Liebig-Universität Gießen
<b>Random-Nummer:</b>
1 Portionsbeutel (á 4g) enthält entweder 2 g D-Mannose oder Placebo.
Ch.-B.: _____ Mindestens haltbar bis Ende: _____
<b>Sponsor:</b> MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH • Gereonsmühlengasse 1-11 • 50670 Köln
<b>CRO:</b> AKP • Munzinger Str. 10 • 79111 Freiburg

**Abb. 2: Etikett der Prüfpräparate (Verum und Placebo); Alle Studienmaterialien wurden in einem verschlossenen Bereich unter Einhaltung der Lagerungsbedingungen (kühl, trocken, vor direkter Hitze oder Licht geschützt und unter 25°C) aufbewahrt.**

Gemeinsamer Studienstart für alle Teilnehmerinnen war um 18 Uhr an Tag null mit einem kohlenhydratarmen Abendessen. Für die Dauer der Studie wurde die standardisierte Aufnahme von Flüssigkeiten und Mahlzeiten beaufsichtigt. Die Probandinnen wurden zweieinhalb Tage durch das Studienpersonal betreut und beendeten die Teilnahme mit einer abschließenden Untersuchung an Tag zwei.

Die verblindete Verabreichung des Prüfpräparates an Tag null und Tag eins begann für die erste Probandin um 20 Uhr. Danach erfolgte ein zeitlicher Versatz von fünf Minuten zwischen jeder Probandin. Zur Standardisierung mussten die Teilnehmerinnen vor Einnahme der D-Mannose oder des Placebos ihre Blase entleeren. Dieser ab 18 Uhr bis zur Präparateinnahme ausgeschiedene Urin wurde separat als Baseline-Urinfraktion (-2 bis 0 Stunden-Fraktion) gesammelt. Die Baseline-Fraktion diente als unbehandelte Kontrolle für die Durchführung des Adhäsionshemmungstest sowie zur Messung der physiologischen D-Mannose-Grundkonzentration und der Kreatininkonzentration im Urin.

Innerhalb der zwölf Stunden nach Einnahme des Prüfpräparates wurden drei Urinfraktionen über jeweils vier Stunden gesammelt. Diese wurden entsprechend in je einem separaten Behältnis zusammengetragen, damit für jede Fraktion einzeln die D-Mannose- und Kreatininkonzentration bestimmt werden konnte. Exemplarisch z.B. für die erste Probandin waren Fraktion eins von 20 Uhr bis 00:00 Uhr (0 bis 4 Stunden-Fraktion), Fraktion zwei von 00:00 Uhr bis 4 Uhr (4 bis 8 Stunden-Fraktion) und

Fraktion drei von 4 Uhr bis 8 Uhr (8 bis 12 Stunden-Fraktion). Die weiteren Probandinnen folgten im fünfminütigen Zeitabstand. Am Ende jeder Sammelperiode wurden die Probandinnen von der Studienassistentin zur abschließenden Urinabgabe des betreffenden Zeitraums aufgefordert. Die gesammelten Fraktionen wurden in Aliquots aufgeteilt und dann bei unter  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Das Volumen aller gesammelten Urinfraktionen sowie der daraus entnommenen Anteile wurde genau gemessen und dokumentiert. Die Aliquots dienten der Bestimmung der D-Mannosekonzentration, der Beurteilung des inhibitorischen Effekts auf die adhäsiven Eigenschaften der UPECs, zur Bestimmung der Kreatininkonzentration und -clearance, sowie als Backup-Proben.

Der erste Beobachtungszeitraum (Phase I) endete an Tag eins mit einem gemeinsamen standardisierten Frühstück um 9 Uhr. Bis zum standardisierten Mittagessen um 13 Uhr sowie rechtzeitig bis zum Start des zweiten Beobachtungszeitraum um 18 Uhr konnte die Prüfstelle, unter Einhaltung der Maßgaben der Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme, verlassen werden.

Der zweite Beobachtungszeitraum (Phase II) startete an Tag eins erneut um 18 Uhr und war vom Ablauf identisch zum ersten. Der klinische Teil der Studie endete nach einem gemeinsamen standardisierten Frühstück und anschließender persönlicher Abschlussuntersuchung durch den Prüfarzt. Hierbei wurde von jeder Probandin, als auch vom Prüfarzt, ein Verträglichkeits-Fragebogen ausgefüllt. Bewertet wurde von null (sehr schlechte Verträglichkeit) bis zehn (sehr gute Verträglichkeit).

Die Einnahme der Flüssigkeitsmengen war für jeden Zeitraum vorgegeben. Eine Übersicht hierzu zeigt Tabelle eins.

**Tab. 1: Zeitplan des Studienablaufs beginnend mit der Aufnahmeperiode wie im „Clinical Study Protocol“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH festgehalten <sup>46</sup> (exemplarisch für die erste Probandin)**

Tag	Zeit	Supervision vor Ort	Studienprozedur	Wassereinnahme	Kumulierte Gesamtmenge
0	18 Uhr	X	Standardisiertes Abendessen	ca. 330 ml (in der ersten Stunde)	330 ml
	18-20 Uhr	X	Sammlung der Baseline Urinfraktion		
	20 Uhr	X	Einnahme des Prüfpräparats	200 ml	530 ml

Material und Methoden

	20 – 00 Uhr	X	Sammlung der ersten 4-Stunden Urinfraktion	ca. 330 ml (in den ersten 2 Stunden)	860 ml
1	00 – 04 Uhr	X	Sammlung der zweiten 4-Stunden Urinfraktion	ca. 330 ml (in den ersten 2 Stunden)	1190 ml
	04 – 08 Uhr	X	Sammlung der dritten 4-Stunden Urinfraktion	ca. 330 ml (in den ersten 2 Stunden)	1520 ml (innerhalb von 14 Stunden)
	08 – 09 Uhr	X	Verbleib und Überwachung in der Prüfstelle	-	Zurückgesetzt auf 0
	09 Uhr	X	Standardisiertes Frühstück	ca. 200 ml	200 ml
	Post Frühstück – 13 Uhr	O	Keine Überwachung, Prüfstelle kann verlassen werden	ca. 200 ml	400 ml
	13 Uhr	X	Standardisiertes Mittagessen	ca. 200 ml	600 ml
	1	Post Mittagessen – 18 Uhr	O	Keine Überwachung, Prüfstelle kann verlassen werden	ca. 330 ml
18 Uhr		X	Standardisiertes Abendessen	ca. 330 ml (in der ersten Stunde)	1260 ml
18 – 20 Uhr		X	Sammlung der Baseline Urinfraktion		
20 Uhr		X	Einnahme des Prüfpräparats	ca. 200 ml	1460 ml
20 – 00 Uhr		X	Sammlung der ersten 4-Stunden Urinfraktion	ca. 330 ml (in den ersten 2 Stunden)	1790 ml
2	00 – 04 Uhr	X	Sammlung der zweiten 4-Stunden Urinfraktion	ca. 330 ml (in den ersten 2 Stunden)	2120 ml
	04 – 08 Uhr	X	Sammlung der dritten 4-Stunden Urinfraktion	ca. 330 ml (in den ersten 2 Stunden)	2450 ml (innerhalb von 24 Stunden)
	08 – 09 Uhr	X	Verbleib und Überwachung in der Prüfstelle	Keine Beschränkung der Flüssigkeitseinnahme	
	09 Uhr	X	Standardisiertes Frühstück		
	Post Frühstück	X	Finale körperliche Untersuchung & Bewertung der Verträglichkeit		

Bestimmung der Mannose-Konzentration in den Urinproben

Die entsprechenden dafür vorgesehenen Aliquots wurden im Verlauf der Studie zum Fraunhofer-Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie (IME), Institutsteil Translationale Medizin und Pharmakologie (TMP) nach Frankfurt am Main verschickt.

Die dortige Diagnostik fand unter der Leitung von Herrn Dr. R. G. statt. Es wurde die Bestimmung der D-Mannose-Konzentration im Urin in allen Proben mittels einer Methode durchgeführt, die gemäß entsprechender EMA-Richtlinie validiert ist <sup>16</sup>. Bei der verwendeten Methode handelte es sich um eine Kopplung der Flüssigchromatographie mit einer Massenspektrometrie (high performance liquid chromatography, HPLC – Massenspektrometrie, MS). Die Flüssigkeitschromatographie dient der Auftrennung eines Stoffgemischs in seine Einzelteile. Anschließend kann durch die Massenspektrometrie ein Analysat identifiziert und quantifiziert werden <sup>81</sup>.

#### Ex-vivo Bestimmung der anti-adhäsiven Aktivität der Laborproben

Die anti-adhäsiven Eigenschaften wurden für die Kontrollurinfraktion (-2 bis 0 Stunden) und eine der drei 4-Stunden-Fractionen bestimmt, die innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Einnahme an zwei aufeinanderfolgenden Tagen gesammelt wurden. Somit insgesamt vier Urinfraktionen. Die zu untersuchende 4-Stunden-Fraktion wurde für jede Probandin unter Berücksichtigung der vorher Bestimmten maximalen D-Mannose-Konzentration im Urin ausgewählt. Alle Experimente wurden verblindet durchgeführt. Im Labor gab es keine Informationen darüber, welche Probandin das D-Mannose- oder das Placebopräparat erhalten hatte. Über die im Urin gemessene D-Mannose-Konzentration war ebenfalls nichts bekannt. Jede der vier Urinfraktionen einer Probandin wurde pro Versuchsansatz mit den vier ausgewählten *E. coli* Stämmen in Triplikaten gemessen. Es wurden zwei unabhängige Versuchsansätze für jede Probandin durchgeführt, sodass jede Urinfraktion insgesamt mit  $n = 6$  gemessen wurde.

#### Ablauf eines Versuchsansatzes:

Wie im Laborbericht<sup>39</sup> beschrieben wurden weibliche T24-Harnblasenepithelzellen in DMEM Medium mit 10 % fötalem Rinderserum in einer befeuchteten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C gezüchtet. Einen Tag vor der Durchführung des Adhärenztests wurden  $5 \times 10^5$  Zellen/Well auf eine 24-Well-Platte ausgesät.

Um die Expression von Pili des Typs 1 zu erhöhen, wurden die Bakterien vor dem Versuchstag über zwei Nächte stehend bei 37 °C in künstlichem Urin verdünnt und kultiviert. Künstlicher Urin wurde nach *STICKLER et al.* hergestellt <sup>70</sup>.

Für den Adhärenztest wurden die D-Mannose-sensitiven Stämme *E. coli* UTI89 (Zystitis-Stamm aus dem DSMZ), CHD22 und CHD94 (klinische Isolate) verwendet. Als D-Mannose-resistenter Stamm wurde *E. coli* CHD17 (klinisches Isolat) ausgewählt.

**Tab. 2: Übersicht über die verwendeten *E. coli* Stämme; Es wurden geeignete Bakterien aus einer Stammsammlung der Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen von Patientinnen mit (rezidivierenden) HWI isoliert. Die Stämme CHD22, CHD94 und CHD17 waren klinische Stämme aus eben genannter Klinik. Der uropathogene Stamm UTI89 ist ein human-Isolat von einer Frau mit unkomplizierter Zystitis und wurde vom DSMZ bezogen.**

Sequenz-Typ	Stamm	beschriebene Antibiotikaresistenz	Herkunft
95	UTI89	-	DSMZ
69	CHD22	-	klinisches Isolat
131	CHD94	-	klinisches Isolat
38	CHD17	ESBL	klinisches Isolat

Am Tag der Infektion wurde ein Well der ausplattierten T24-Zellen zur Quantifizierung der Zellen verwendet. Hierfür diente eine Neubauer-Zählkammer. Der Überstand der Zellen wurde vor Zugabe der Urinproben verworfen.

Die bakteriellen Übernachtskulturen wurden in PBS 1:10000 verdünnt und mit einer Multiplicity of Infection (MOI), also einem Verhältnis von Bakterien zu Zellen von 0,01 zu den T24-Zellen gegeben. Hierzu wurden je 50 µl der verdünnten Bakterien zu den jeweiligen Wells pipettiert. Siehe hierzu das Pipettierschema in Tabelle 2 - 4. Die mit D-Mannose versetzten Zellen der internen Kontrolle wurden mit *E. coli* CHD22 infiziert.

Die Urinproben wurden in einem Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und anschließend fünf Minuten lang bei 3200 g zentrifugiert, um größere Ausfällungen zu entfernen. Anschließend wurden die Urinproben mit einem 0,22-µm-Filter steril filtriert und 500 µl zu den jeweiligen Wells hinzugegeben. Als interne Kontrolle wurde 50 µl 1 %-ige D-Mannose in ein Well mit 500 µl der Kontrollurinfraktion vor der Prüfpräparateinnahme an Tag null hinzugefügt.

**Tab. 3: 24-Well Platte 1**

CHD22	CHD22	CHD22	CHD22	CHD22	CHD22
UTI89	UTI89	UTI89	UTI89	UTI89	UTI89
CHD94	CHD94	CHD94	CHD94	CHD94	CHD94
CHD17	CHD17	CHD17	CHD17	CHD17	CHD17

**Tab. 4: 24-Well Platte 2**

CHD22	CHD22	CHD22	CHD22	CHD22	CHD22
UTI89	UTI89	UTI89	UTI89	UTI89	UTI89
CHD94	CHD94	CHD94	CHD94	CHD94	CHD94
CHD17	CHD17	CHD17	CHD17	CHD17	CHD17

**Tab. 5: 24-Well Platte 3; Diese diente lediglich der Zählung der Zellen in der Neubauer-Zählkammer als auch einer internen Kontrolle.**

Interne ctrl					
Zellen zählen					

**Legende**

Tag 0 Fraktion 0	Tag 0 Fraktion1/2/3	Tag 1 Fraktion1/2/3	Tag 1 Fraktion1/2/3
------------------	---------------------	---------------------	---------------------

Der weitere Ablauf wurde wie im Laborbericht beschrieben durchgeführt <sup>39</sup>.

„Die Platten wurden 30 Minuten lang bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurden die Platten drei Minuten lang bei 600 g zentrifugiert und anschließend weitere 30 Minuten lang bebrütet. Zur Entfernung nicht angehefteter Bakterien wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden anschließend durch Zugabe von 200 µl 0,05 % Trypsin für 20 Minuten abgelöst, in PBS seriell verdünnt und auf CAMHB-Agarplatten zur Quantifizierung der adhären KBE ausplattiert. Die Agarplatten

wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und die Kolonien am folgenden Tag ausgezählt.“

### 2.2.6 Statistische Analyse

Wie beschrieben fand die statistische Konzeption und Auswertung durch den Sponsor in Zusammenarbeit mit den genannten Statistikern statt. Die Berechnungen wurden mit der SAS-Software SAS® system (Version 9.4) durchgeführt und folgendermaßen im „Study Report“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH festgehalten<sup>45</sup>. „Binäre, kategoriale und ordinale Parameter wurden durch absolute und prozentuale Zahlen zusammengefasst. Numerische Daten wurden mit Standardstatistiken zusammengefasst (d. h. Anzahl der verfügbaren Daten, Mittelwert, Standardabweichung, Minimum, Median, Maximum sowie unteres und oberes Quartil).

Die Urin-Kreatininkonzentration wurde für jede gesammelte Urinfraktion bestimmt. Anhand dieser wurde eine Normierung der in der Urinfraktion bestimmten D-Mannose-Konzentration bestimmt. Die Berechnung der normierten Daten erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Normierte D – Mannose Konzentration} = \frac{\text{D – Mannose Konzentration}}{\text{Kreatininkonzentration}}$$

Die 12-Stunden-Kreatinin-Clearance wurde für den Zeitraum von 20 Uhr an Tag null bis acht Uhr an Tag eins berechnet. Die Berechnung erfolgte für jede Probandin anhand der Standardformel<sup>22</sup>. Grundlage hierfür waren die bestimmten Volumina und Kreatininkonzentrationen der drei Urinfraktionen sowie die ermittelten Ergebnisse der Plasmakreatininkonzentrationen im Blut und die jeweilige Körperoberfläche<sup>50</sup> der Probandin.

$$\text{Kreatininclearance} = \frac{\text{Urin – Kreatininkonzentration} \times \text{Urinvolumen}}{\text{Plasma – Kreatininkonzentration} \times \text{Sammelzeit}} \times \frac{1,73}{\text{Körperoberfläche}}$$

$$\text{Körperoberfläche in m}^2 = \sqrt{\frac{\text{Körpergröße in cm} \times \text{Körpergewicht in kg}}{3600}} \text{ „}$$

### Analysepopulationen

Sicherheitsanalysesatz (SAS): Der Sicherheitsanalysesatz besteht aus allen randomisierten Probandinnen, die mindestens einmal mit dem Prüfpräparat behandelt wurden.

Vollständiger Analysesatz (FAS): Der vollständige Analysesatz besteht aus allen randomisierten Probandinnen mit mindestens einer Wirksamkeitsdokumentation nach der Baseline-Prozedur.

Alle Zielanalysen wurden mit dem FAS durchgeführt, und alle Sicherheitsauswertungen basierten auf dem SAS.

### Zielanalysen

Der primäre Zielendpunkt (D-Mannose-Konzentration im Urin) wurde anhand der nicht normierten und normierten Daten der FAS-Population bewertet. Die Analyse wurde nichtparametrisch mit geeigneten Punktschätzern und Konfidenzintervallen durchgeführt. Der Vergleich der Gruppen erfolgte mit dem Wilcoxon-2-Stichprobentest.

Als Maß zur Unterscheidung der Untersuchungsgruppen wurde die Mann-Whitney-Statistik ( $MWS = P(X > Y)$ ) herangezogen. Die Definition der MWS ist die Wahrscheinlichkeit, dass eine zufällig ausgewählte Probandin aus der Verum-Gruppe höhere D-Mannose-Werte aufwies als eine zufällig ausgewählte Probandin aus der Placebo-Gruppe. Hierbei entspricht eine MWS von 0,5, dass die Probandin unter beiden Behandlungsbedingungen gleich gut abschneidet. Eine MWS von größer als 0,5 weist auf höhere Werte bei der D-Mannose-Behandlung hin. Je dichter die MWS bei 1 liegt, desto zuverlässiger ist der Nachweis <sup>12</sup>.

Die MWS als Maß für die Relevanz der Gruppenunterschiede kann mit folgenden Benchmarks angegeben werden: 0,71 große Überlegenheit ; 0,64 mittlere Überlegenheit ; 0,56 kleine Überlegenheit ; 0,5 Gleichheit ; 0,44 kleine Unterlegenheit ; 0,36 mittlere Unterlegenheit; 0,29 große Unterlegenheit.

Mit Hilfe der MWS können die Null- und Alternativhypothese für den Vergleich der D-Mannose-Gruppe (X) mit der Placebo-Gruppe (Y) entsprechend formuliert werden (Überlegenheit):

Nullhypothese  $H_0: P(X > Y) \leq 0,5$  und Alternativhypothese  $H_A: P(X > Y) > 0,5$ .

Der gruppenweise Vergleich von Ausgangsmerkmalen wie z.B. demografische und anamnestische Variablen wurden deskriptiv beschrieben ohne statistische Tests durchzuführen.

Der sekundäre Zielendpunkt (*in-vitro*-Haftung, bestimmt als Funktion der D-Mannose-Konzentration im Urin) wurde ebenfalls mit den Daten der FAS-Population bewertet.

Anhand von Rohdaten (Koloniebildende Einheiten pro Well im Vergleich mit Kontrollwerten) und durch Bildung von Verhältnissen (nach Präparateinnahme / vor Präparateinnahme) wurden explorative Analysen durchgeführt, um geeignete Punktschätzer mit entsprechenden 95%-Konfidenzintervallen zu ermitteln und die Behandlungsgruppen miteinander zu vergleichen. Die angelegte Statistik ist nichtparametrisch.

### Sicherheitsanalysen

Im „Clinical Study Protocol“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH wurde beschrieben, wie beim Auftreten von unerwünschten Ereignissen (UEs) zu handeln ist <sup>46</sup>. Anhand der primären System-Organ-Klasse (SOC) und der vom Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) bevorzugten Begriffe, sollten diese kategorisiert werden. Die SOC und Begriffe sind im MedDRA-Wörterbuch kodiert <sup>34</sup>. Bei Auftreten von schwerwiegenden unerwünschten Ereignissen sollten diese in einer gesonderten Tabelle aufgeführt werden. Es traten keine unerwünschten Ereignisse auf.

## 3 Ergebnisse

In der durchgeführten Studie wurden 25 Probandinnen in die Analyse eingeschlossen. Bei zwei zeitversetzten Studienwochenenden wurde die erste Probandin am 11. März 2020 aufgenommen und die letzte Probandin beendete die Studie am 10. Mai 2020.

Bei einer Probandin (1-01) wurde nach der Studienteilnahme festgestellt, dass ein Einschlusskriterium verletzt wurde. Hierbei handelte es sich um die bakterielle Belastung des Urins ( $KBE < 10^3/ml$ ) am Tag des Screenings. Die Teilnehmerin wurde zunächst durch eine weitere Probandin (1-32) am zweiten Studienwochenende ersetzt, dann aber letztlich mit in die Auswertung aufgenommen. Hierdurch betrug die Probandinnenanzahl der Placebo-Gruppe 13 anstatt der geplanten 12.

Alle Teilnehmerinnen haben die Studie erfolgreich abgeschlossen und konnten ausgewertet werden. Bei der Durchführung wurden keine schwerwiegenden Abweichungen vom geplanten Protokoll aufgezeichnet. Alle Probandinnen konnten in das Safety Analysis Set (SAS) und in das Full Analysis Set (FAS) aufgenommen werden.

Die in diesem Kapitel folgenden Tabellen und grafischen Abbildungen zum primären und sekundären Endpunkt sind aus dem „Clinical Study Report“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH entnommen bzw. adaptiert <sup>45</sup>.

### 3.1 Demografische Daten und grundlegende Merkmale

Das Probandinnenalter betrug zwischen 20 und 29 Jahren. In der Verum-Gruppe lag das Alter im Mittel bei  $25,0 \pm 2,52$  Jahren. In der Placebogruppe zeigte sich ein Alter von  $24,2 \pm 2,74$  Jahren (arithmetisches Mittel  $\pm$  Standardabweichung). Die folgende Tabelle 6 zeigt das Alter in Jahren, das Körpergewicht in kg und die Körpergröße in cm nach Behandlungsgruppen getrennt:

**Tab. 6: Alter, Körpergröße und Gewicht am Tag des Screenings** <sup>45</sup>

Variable	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
Alter [Jahre]	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	25,0 ( 2,52)	24,2 ( 2,74)	24,6 ( 2,61)
	Min-Max	21 - 29	20 - 29	20 - 29
	Median	25,0	24,0	24,0
	Q1-Q3	23,0 – 27,0	23,0 – 27,0	23,0 – 27,0
Körpergröße [cm]	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	166,8 ( 5,04)	166,2 ( 5,10)	166,5 ( 4,98)
	Min-Max	160 - 179	159 - 174	159 - 179
	Median	165	167	165
	Q1-Q3	163,5 – 169,0	163,0 – 170,0	163,0 – 170,0
Körpergewicht [kg]	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	66,8 ( 13,81)	61,2 ( 6,43)	63,9 ( 10,78)
	Min-Max	49,4 – 104,4	50,6 – 70,9	49,4 – 104,4
	Median	63,5	59,0	62,7
	Q1-Q3	60,0 – 71,1	57,7 – 65,0	57,9 – 68,4

Bei allen Probandinnen wurde während der Screeningvisite eine körperliche Untersuchung mit Bestimmung der Vitalwerte durchgeführt.

Die Körpertemperatur, der Blutdruck, als auch die Herzfrequenz von Tag -2 sind in der folgenden Tabelle 7 zusammengefasst.

Die genannten Merkmale zeigten bei Studienbeginn (Tag des Screenings) und bei der Abschlussuntersuchung (Tag 2) keine Veränderung, die zu einem signifikanten Gruppenunterschied führten.

**Tab. 7: Körpertemperatur, Herzfrequenz und Blutdruck am Tag des Screenings** <sup>45</sup>

Variable	Statistik	Substanz A 2 g D- Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
Körpertemperatur[°C]	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	36,9 ( 0,32)	36,8 ( 0,26)	36,9 ( 0,28)
	Min-Max	36,4 – 37,4	36,4 – 37,3	36,4 – 37,4
	Median	36,9	36,9	36,9
	Q1-Q3	36,6 – 37,2	36,6 – 36,9	36,6 – 37,1

Variable	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
Herzfrequenz [bpm]	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	84,2 ( 13,23)	80,0 ( 11,06)	82,0 ( 12,08)
	Min-Max	64 - 103	65 - 105	64 - 105
	Median	83,5	76,0	79,0
	Q1-Q3	73,5 – 95,5	74,0 – 85,0	74,0 – 91,0
Systolischer RR [mmHg]	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	125,4 ( 11,87)	123,4 ( 14,73)	124,4 ( 13,20)
	Min-Max	102 - 142	103 - 155	102 - 155
	Median	129,0	122,0	123,0
	Q1-Q3	121,0 – 133,0	114,0 – 128,0	120,0 – 131,0
Diastolischer RR [mmHg]	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	82,5 ( 12,94)	78,2 ( 12,07)	80,3 ( 12,42)
	Min-Max	67 - 105	66 - 111	66 - 111
	Median	82,0	75,0	75,0
	Q1-Q3	71,0 – 93,0	72,0 – 82,0	72,0 – 84,0

Die Tests auf Leukozyten im Urin sowie die Schwangerschaftstests waren bei allen Probandinnen negativ.

Die Ergebnisse des ACSS-Fragebogen sind in Tabelle 8 dargestellt. Bei 92% aller Probandinnen lag der Wert am Tag des Screenings bei 0. Am Randomisierungstag war dies bei 96 % der Teilnehmerinnen der Fall.

**Tab. 8: Acute cystitis symptom score <sup>45</sup>**

		Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
	ACSS-Ergebnis	N (%)	N (%)	N (%)
Tag -2 - Screening	0	12 (100,0%)	11 ( 84,6%)	23 ( 92,0%)
	1	0 ( 0,0%)	1 ( 7,7%)	1 ( 4,0%)
	3	0 ( 0,0%)	1 ( 7,7%)	1 ( 4,0%)
	Insgesamt	12 (100,0%)	13 (100,0%)	25 (100,0%)
Tag 0 - Randomisierung	0	12 (100,0%)	12 ( 92,3%)	24 ( 96,0%)
	1	0 ( 0,0%)	1 ( 7,7%)	1 ( 4,0%)
	Insgesamt	12 (100,0%)	13 (100,0%)	25 (100,0%)

Aufgrund der maximalen Kapazität des Messbechers von 500 ml wurden die Probandinnen mit ungenauen Urinvolumenmessungen (einzelne Urinabgabe während einer Sammelperiode mit einem Volumen >500 ml) nicht in die Berechnung der zusammenfassenden Statistik in der folgenden Tabelle 9 einbezogen. Folgende Daten fehlen:

-2-0 Stunden aufgrund eines Volumen > 500 ml bei den Probandinnen 1-12 (A), 1-14 (B),

0-4 Stunden aufgrund eines Volumen > 500 ml bei Probandin 1-12 (A),

4-8 Stunden aufgrund eines Volumen > 500 ml bei Probandin 1-12 (A),

8-12 Stunden aufgrund eines Volumen > 500 ml bei den Probandinnen: 1-12 (A), 1-13 (A), 1-14 (B), 1-23 (A)

**Tab. 9: Urinvolumina [ml] während der vordefinierten Fraktionen von Beobachtungszeitraum 1** <sup>45</sup>

Phase I Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
-2 - 0 Stunden	N	11	12	23
	Mittelwert (SD)	436,8 (206,18)	453,3 (129,22)	445,4 (166,56)
	Min-Max	270 - 980	240 - 690	240 - 980
	Median	380,0	445,0	410,0
	Q1-Q3	285,0 – 450,0	380,0 – 500,0	340,0 – 500,0
	Fehlt	1	1	2
0 - 4 Stunden	n	11	13	24
	Mittelwert (SD)	640,0 (162,03)	698,5 (163,11)	671,7 (161,81)
	Min-Max	355 - 890	400 - 945	355 - 945
	Median	650,0	720,0	652,5
	Q1-Q3	500,0 – 760,0	590,0 – 800,0	575,0 – 792,5
	Fehlt	1	0	1
4 - 8 Stunden	n	11	13	24
	Mittelwert (SD)	387,3 ( 98,29)	418,5 (188,72)	404,2 (151,77)
	Min-Max	150 - 510	240 - 1000	150 - 1000
	Median	400,0	360,0	380,0
	Q1-Q3	340,0 – 430,0	350,0 – 425,0	345,0 – 427,5
	Fehlt	1	0	1

Phase I Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D- Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
8 - 12 Stunden	n	9	12	21
	Mittelwert (SD)	312,2 (122,86)	468,8 (105,32)	401,7 (135,79)
	Min-Max	80 - 500	320 - 660	80 - 660
	Median	290,0	450,0	400,0
	Q1-Q3	260,0 – 370,0	395,0 – 527,5	320,0 – 450,0
	Fehlt	3	1	4

Die Kreatininwerte des Urins vor der Einnahme des Prüfpräparates und der Urinfraktionen 1 bis 3 für den ersten Beobachtungszeitraum sind in der folgenden Tabelle 10 zusammengefasst.

**Tab. 10: Kreatininwerte [mg/l] im Urin der vordefinierten Fraktionen von Beobachtungszeitraum 1<sup>45</sup>**

Phase I Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D- Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
-2 - 0 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	379,5 (178,30)	322,5 (102,83)	349,8 (143,89)
	Min-Max	157 - 840	192 - 477	157 - 840
	Median	363,5	297,0	348,0
	Q1-Q3	276,5 – 414,5	226,0 – 389,0	242,0 – 401,0
0 - 4 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	308,9 (104,79)	271,7 (110,08)	289,6 (107,01)
	Min-Max	153 - 562	148 - 528	148 - 562
	Median	304,5	260,0	290,0
	Q1-Q3	252,5 – 352,0	194,0 – 305,0	195,0 – 321,0
4 - 8 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	510,9 (235,92)	502,1 (170,14)	506,3 (200,01)
	Min-Max	316 - 1136	257 - 951	257 - 1136
	Median	422,5	521,0	469,0
	Q1-Q3	360,5 – 553,5	418,0 – 537,0	367,0 – 537,0
8 - 12 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	607,2 (409,26)	389,6 ( 75,75)	494,0 (303,22)
	Min-Max	313 - 1803	280 - 540	280 - 1803
	Median	507,0	389,0	419,0

Phase I Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D- Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
	Q1-Q3	338,5 – 670,0	333,0 – 429,0	333,0 – 538,0

Während des zweiten Beobachtungszeitraums konnten alle vorliegenden Urinvolumenmessungen in die Berechnung der Statistik einbezogen werden. Diese sind in der folgenden Tabelle 11 dargestellt.

**Tab. 11: Urinvolumina [ml] während der vordefinierten Fraktionen von Beobachtungszeitraum 2 <sup>45</sup>**

Phase II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
-2 - 0 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	265,8 (120,41)	294,2 (132,44)	280,6 (125,00)
	Min-Max	80 - 450	120 - 480	80 - 480
	Median	265,0	300,0	300,0
	Q1-Q3	185,0 – 340,0	160,0 – 400,0	160,0 – 370,0
0 - 4 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	577,5 (236,72)	565,8 ( 95,06)	571,4 (173,89)
	Min-Max	265 - 940	430 - 765	265 - 940
	Median	592,5	570,0	570,0
	Q1-Q3	325,0 – 740,0	490,0 – 605,0	480,0 – 670,0
4 - 8 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	380,4 ( 63,08)	402,7 ( 92,07)	392,0 ( 78,69)
	Min-Max	290 - 495	250 - 550	250 - 550
	Median	380,0	400,0	400,0
	Q1-Q3	335,0 – 405,0	320,0 – 475,0	320,0 – 450,0
8 - 12 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	395,4 (106,40)	498,8 (155,81)	449,2 (141,80)
	Min-Max	240 - 600	230 - 855	230 - 855
	Median	377,5	480,0	420,0
	Q1-Q3	320,0 – 470,0	410,0 – 540,0	375,0 – 530,0

Die Kreatininwerte des Urins vor der Einnahme des Prüfpräparates und der Urinfraktionen 1 bis 3 für den zweiten Beobachtungszeitraum sind in der folgenden Tabelle 12 zusammengefasst.

**Tab. 12: Kreatininwerte [mg/l] im Urin der vordefinierten Fraktionen von Beobachtungszeitraum 2<sup>45</sup>**

Phase II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
-2 - 0 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	708,0 (361,54)	673,2 (326,68)	689,9 (337,02)
	Min-Max	312 - 1629	275 - 1256	275 - 1629
	Median	591,0	625,0	598,0
	Q1-Q3	515,5 – 734,0	391,0 – 936,0	417,0 – 828,0
0 - 4 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	400,0 (186,50)	304,4 ( 66,50)	350,3 (143,28)
	Min-Max	189 - 738	182 - 437	182 - 738
	Median	341,5	313,0	315,0
	Q1-Q3	244,5 – 549,5	259,0 – 328,0	259,0 – 393,0
4 - 8 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	489,6 (102,13)	470,5 (173,15)	479,7 (140,94)
	Min-Max	376 - 667	278 - 910	278 - 910
	Median	461,0	405,0	423,0
	Q1-Q3	404,5 – 581,0	348,0 – 579,0	381,0 – 579,0
8 - 12 Stunden	n	12	13	25
	Mittelwert (SD)	466,2 (117,21)	353,9 ( 72,48)	407,8 (110,45)
	Min-Max	305 - 673	261 - 470	261 - 673
	Median	418,0	336,0	402,0
	Q1-Q3	379,0 – 553,5	296,0 – 427,0	322,0 – 439,0

### 3.2 Darstellung des primären Zielendpunkts

Die primäre Endpunktvariable war die Quantifizierung der maximalen D-Mannose-Konzentration im Urin innerhalb der ersten zwölf Stunden nach Einnahme von 2 g oraler D-Mannose im Vergleich zu Placebo. Diese wurde in einer Baseline-Messung sowie in drei Urinproben (null bis vier, vier bis acht und acht bis 12 Stunden) nach der Einnahme an zwei aufeinander folgenden Tagen (Phase I bzw. Phase II) bestimmt.

Bei vielen Messungen zeigte sich der Wert unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze (lower limit of quantification, LLOQ). In der Placebogruppe trat diese Beobachtung wesentlich häufiger auf als in der Verumgruppe. Bei der Auswertung der Daten wurden diese Messwerte entsprechend auf Null gesetzt. Der analytische Vergleich der

Häufigkeit zwischen den Einnahmegruppen wurde mit einem nicht-parametrischen Ansatz (Wilcoxon-2-Stichprobentest) durchgeführt. Aufgrund des häufigen Auftretens der LLOQ-Messungen wurde der Median als am ehesten geeigneter Punktschätzer vorgesehen. Der Median besitzt bei der hier vorliegenden Stichprobe eine höhere Robustheit, da er weniger empfindlich gegen Ausreißer ist<sup>38</sup>. Die Ausreißer sind die Messungen bei denen sich der Wert unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze zeigte.

Die Relevanz der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit dem Mann-Whitney-Überlegenheitsmaß (MWS) und seinem einseitigen 97,5%-Konfidenzintervall als entsprechende Effektgröße quantifiziert.

### ***3.2.1 D-Mannose-Konzentration im Urin in Phase I***

#### ***D-Mannose-Konzentration ohne Normierung:***

Deskriptive Statistiken (n, Mittelwert, SD, Median und Spannweite) werden in der folgenden Tabelle 13 nach Behandlungsgruppen und Zeit für den ersten Beobachtungszeitraum dargestellt.

Die höchste mittlere gemessene D-Mannose-Konzentration wurde mit 3,56 µg/ml in Fraktion eins (0 - 4 Stunden nach der Einnahme) festgestellt und der Mittelwert nahm von der ersten bis zur letzten Fraktion ab. In der zweiten Fraktion betrug die mittlere D-Mannose-Konzentration 3,03 µg/ml und in der dritten Fraktion 1,54 µg/ml. In der Kontrollgruppe (Placebo) konnte keine Veränderung der D-Mannose-Konzentration festgestellt werden. Die Werte lagen über alle Fraktionen hinweg zwischen 0 und 3,11 µg/ml.

Der Vergleich der Verhältnisse (Baseline-Urinfractionen zu den Beobachtungsurinfractionen) in Bezug auf den Median zeigte in der D-Mannose-Gruppe in der zweiten Urinfraction den höchsten Wert. Dieser maximale Medianwert betrug 1,73 µg/ml. In den Baseline-Fractionen war der Median in beiden Untersuchungsgruppen null. In Fraktion eins der Verum-Gruppe betrug der Median 1,18 µg/ml. Im Vergleich hierzu wurde bei der Placebo-Gruppe in jeder Urinfraction ein Median von null beobachtet.

Die D-Mannose-Konzentration im Urin war in der D-Mannose-Gruppe im Vergleich zu Placebo höher. Für die Fraktionen eins und zwei konnte hierbei eine große Überlegenheit (Fraktion 1: MWS = 0,788, Fraktion 2: MWS = 0,811) und für Fraktion

drei (Fraktion 3: MWS = 0,667) eine mittlere Überlegenheit gemäß MWS gezeigt werden. Alle gezeigten Überlegenheiten waren mehr als relevant nach den angegebenen Benchmarks.

Zusätzlich wurde die Überlegenheit für die Fraktionen eins und zwei für die untere Grenze des 95 % CI nachgewiesen (Fraktion 1: Untere Grenze 95% CI von MWS = 0,560 > 0,5 und P=0,0034, bzw. Fraktion 2: Untere Grenze 95% CI von MWS = 0,595 und P=0,0028).

**Tab. 13: Phase I: D-Mannose-Konzentration im Urin [ $\mu\text{g/ml}$ ] <sup>45</sup>**

Phase I Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS 95% CI Wilcoxon-Test
-2 bis 0 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,61 ( 1,122)	0,24 ( 0,863)	0,576923
	95% CI	[-0,102; 1,324]	[-0,282; 0,760]	[0,337; 0,817]
	Min-Max	0 – 2,87	0 – 3,11	P = 0,4574
	<b>Median</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 0,98	0,00 – 0,00	
	Volumen <LLOQ	9 (75,0%)	12 (92,3%)	
0 bis 4 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	3,56 ( 5,390)	0,19 ( 0,691)	0,788462
	95% CI	[ 0,130; 6,980]	[-0,226; 0,609]	[ 0,560; 1,017]
	Min-Max	0 – 16,86	0 – 2,49	P = 0,0034
	<b>Median</b>	<b>1,18</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 4,90	0,00 – 0,00	
	Volumen <LLOQ	4 (33,3%)	12 (92,3%)	
4 bis 8 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	3,03 ( 4,008)	0,31 ( 0,840)	0,810897
	95% CI	[ 0,487; 5,580]	[-0,198; 0,818]	[0,595; 1,027]
	Min-Max	0 – 11,98	0 – 2,91	P = 0,0028
	<b>Median</b>	<b>1,73</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,52 – 3,04	0,00 – 0,00	
	Volumen <LLOQ	3 (25,0%)	11 (84,6%)	
8 bis 12 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	1,54 ( 2,515)	0,22 ( 0,810)	0,666667
	95% CI	[-0,057; 3,139]	[-0,265; 0,714]	[0,429; 0,905]
	Min-Max	0 – 7,84	0 – 2,92	P = 0,0682

Phase I Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS 95% CI Wilcoxon-Test
	<b>Median</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 2,25	0,00 – 0,00	
	Volumen <LLOQ	7 (58,3%)	12 (92,3%)	

Abbildung 3 stellt die Unterschiede für den ersten Beobachtungszeitraum in einer Graphik dar. Die mit rot dargestellten Ergebnisse zeigen die Daten der D-Mannose-Gruppe. Die Kurven mit den enthaltenen Punkten stellen den Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichung während des Untersuchungszeitraum dar. Der Median der jeweiligen Fraktion wird mit den Quadraten dargestellt. Hierbei wird aufgrund der großen Anzahlen der Nullen (<LLOQ) der Unterschied zwischen den Gruppen deutlich.

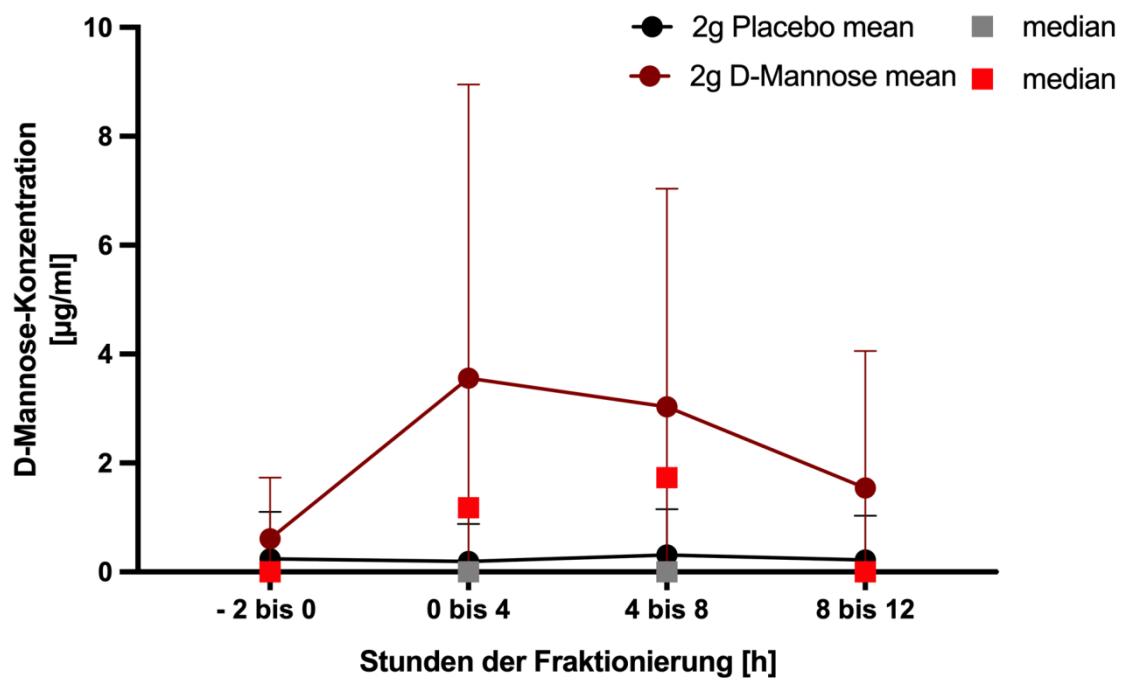


Abb. 3: Phase I: D-Mannose-Konzentration [µg/ml] - ohne Normierung im Zeitverlauf

#### D-Mannose-Konzentration mit Normierung auf Kreatinin im Urin:

In einem zweiten Schritt wurden alle D-Mannose-Konzentrationen auf die individuellen Urin-Kreatinin-Konzentrationen normiert. Die Ergebnisse der normierten Daten beeinflussten jedoch nicht die Auswahl der Urinfraktionen, welche für den Adhärenzassay verwendet wurden. Hierfür wurden die Urinfraktionen der nicht

normierten Daten mit der maximalen D-Mannose-Konzentration im Urin ausgewählt. Durch die Normierung der Daten sollte die Varianz der Messergebnisse verringert sowie die Vergleichbarkeit der Ergebnisse verbessert werden. Letztlich hatten die Ergebnisse der normierten Daten keinen Einfluss auf die Interpretation, da die Resultate vergleichbar waren.

Der maximale Medianwert der D-Mannose-Gruppe wurde ebenfalls in Fraktion eins und zwei beobachtet und stellte sich in den Baseline-Fraktionen beider Untersuchungsgruppen, als auch allen Fraktionen der Placebo-Gruppe, mit null dar.

Tabelle 14 enthält deskriptive Statistiken (n, Mittelwert, SD, Median und Spannweite) für die Vor- und Nachmessungen der Phase I in beiden Behandlungsgruppen mit den dazugehörigen Ergebnissen des Wilcoxon-2-Stichprobentests.

**Tab. 14: Phase I: D-Mannose-Konzentration im Urin [ $\mu\text{g/ml}$ ] normiert auf Kreatinin im Urin <sup>45</sup>**

Phase I Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS 95% CI Wilcoxon-Test
-2 bis 0 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,003 (0,0048)	0,001 (0,0040)	0,576923
	95% CI	[-,0005; 0,0056]	[-,0013; 0,0035]	[0,337; 0,817]
	Min-Max	0 – 0,0134	0 – 0,0143	P = 0,4574
	<b>Median</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,004	0,000 – 0,000	
	Volumen <LLOQ	9 (75,0%)	12 (92,3%)	
0 - bis 4 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,017 (0,0323)	0,001 (0,0027)	0,788462
	95% CI	[-,0039; 0,0371]	[-,0009; 0,0023]	[0,560; 1,017]
	Min-Max	0 – 0,1102	0 – 0,0096	P = 0,0034
	<b>Median</b>	<b>0,004</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,016	0,000 – 0,000	
	Volumen <LLOQ	4 (33,3%)	12 (92,3%)	
4 bis 8 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,007 (0,0094)	0,001 (0,0022)	0,817308
	95% CI	[0,0007; 0,0126]	[-,0006; 0,0020]	[0,602; 1,033]
	Min-Max	0 – 0,0259	0 – 0,0079	P = 0,0022
	<b>Median</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,001 – 0,008	0,000 – 0,000	

Phase I Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS 95% CI Wilcoxon-Test
	Volumen <LLOQ	3 (25,0%)	11 (84,6%)	
8 bis 12 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,002 (0,0029)	0,001 (0,0026)	0,660256
	95% CI	[0,0000; 0,0037]	[-,0008; 0,0023]	[0,420; 0,900]
	Min-Max	0 – 0,0092	0 – 0,0092	P = 0,0924
	<b>Median</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,003	0,000 – 0,000	
	Volumen <LLOQ	7 (58,3%)	12 (92,3%)	

Abbildung 4 zeigt die Unterschiede der normierten Daten graphisch. Dargestellt sind der Verlauf der Mittelwerte sowie der Mediane. In rot sind die Ergebnisse der D-Mannose-Gruppe gezeigt. In schwarz und grau die Ergebnisse der Placebo-Gruppe. Die Kurven mit den enthaltenen Punkten stellen den Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichung dar. Der Median der jeweiligen Fraktion wird mit den Quadraten dargestellt.

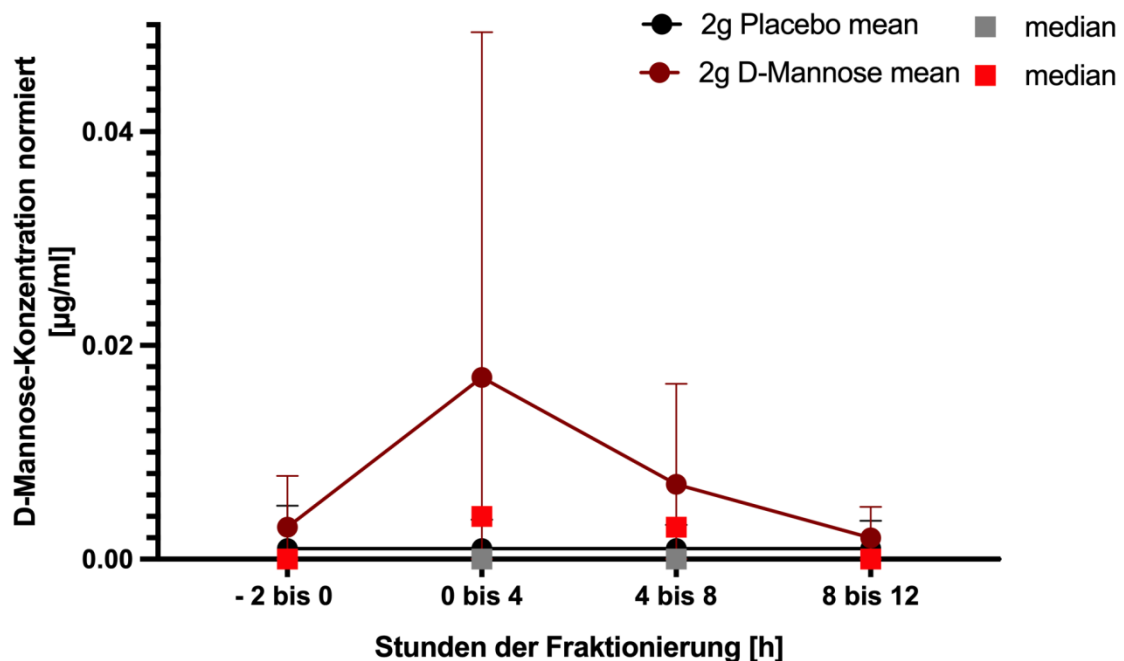


Abb. 4: Phase I: D-Mannose-Konzentration [µg/ml] - mit Normierung im Zeitverlauf

### 3.2.2 D-Mannose-Konzentration im Urin in Phase II

#### D-Mannose-Konzentration ohne Normierung:

Für den zweiten Beobachtungszeitraum sind die deskriptiven Statistiken (n, Mittelwert, SD, Median und Spannweite) in der folgenden Tabelle 15 nach Behandlungsgruppen und Zeit dargestellt.

Der maximale Medianwert der D-Mannose-Gruppe wurde mit 1,54 µg/ml in Fraktion eins beobachtet, der zweithöchste Medianwert mit 1,39 µg/ml in Fraktion zwei. In der Placebo-Gruppe wurde ausschließlich ein Medianwert von null gesehen.

Die D-Mannose-Konzentration im Urin war in der D-Mannose-Gruppe im Vergleich zu Placebo höher. Für die Fraktionen eins und zwei konnte hierbei auch in Phase II eine große Überlegenheit (Fraktion 1: MWS = 0,788; Fraktion 2: MWS = 0,769) und für Fraktion drei (Fraktion 3: MWS = 0,615) eine kleine bis mittlere Überlegenheit gemäß MWS gezeigt werden. Alle gezeigten Überlegenheiten waren mehr als relevant nach den angegebenen Benchmarks.

Darüber hinaus ist die Überlegenheit der D-Mannose-Gruppe im Vergleich zu Placebo für die Fraktionen eins und zwei für die untere Grenze des 95 % CI nachgewiesen (Fraktion 1: Untere Grenze 95% CI von MWS = 0,560 > 0,5, P = 0,0034 bzw. Fraktion 2: Untere Grenze 95% CI von MWS = 0,546 > 0,5, P = 0,009).

**Tab. 15: Phase II: D-Mannose-Konzentration im Urin [µg/ml] <sup>45</sup>**

Phase II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS 95% CI Wilcoxon-Test
-2 bis 0 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	1,93 ( 2,603)	1,40 ( 2,862)	0,557692
	95% CI	[ 0,279; 3,587]	[-0,331; 3,128]	[0,319; 0,796]
	Min-Max	0 – 6,86	0 – 10,55	P = 0,6233
	<b>Median</b>	<b>0,54</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 3,84	0,00 – 1,36	
	Volumen <LLOQ	6 (50,0%)	7 (53,8%)	
0 - bis 4 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	3,95 ( 6,189)	0,27 ( 0,971)	0,788462
	95% CI	[ 0,019; 7,883]	[-0,317; 0,856]	[ 0,560; 1,017]
	Min-Max	0 – 16,94	0 – 3,5	P = 0,0034

Phase II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS 95% CI Wilcoxon-Test
	<b>Median</b>	<b>1,54</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 3,68	0,00 – 0,00	
	Volumen <LLOQ	4 (33,3%)	12 (92,3%)	
4 bis 8 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	2,13 ( 2,672)	0,32 ( 0,847)	0,769231
	95% CI	[ 0,430; 3,826]	[-0,196; 0,828]	[0,546; 0,992]
	Min-Max	0 - 8,76	0 – 2,91	P = 0,0090
	<b>Median</b>	<b>1,39</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 3,22	0,00 – 0,00	
	Volumen <LLOQ	4 (33,3%)	11 (84,6%)	
8 bis 12 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,88 ( 1,356)	0,33 ( 1,173)	0,615385
	95% CI	[ 0,014; 1,737]	[-0,384; 1,034]	[0,374; 0,857]
	Min-Max	0 – 3,43	0 – 4,23	P = 0,2571
	<b>Median</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 2,16	0,00 – 0,00	
	Volumen <LLOQ	8 (66,7%)	12 (92,3%)	

Abbildung 5 stellt die Unterschiede für den zweiten Beobachtungszeitraum in einer Graphik dar. Die mit rot dargestellten Ergebnisse zeigen die Daten der D-Mannose-Gruppe. Die Kurven mit den enthaltenen Punkten stellen den Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichung während des Untersuchungszeitraum dar. Die mit schwarz und grau dargestellten Ergebnisse zeigen die Daten der Placebo-Gruppe. Der Median der jeweiligen Fraktion wird mit den Quadraten dargestellt.

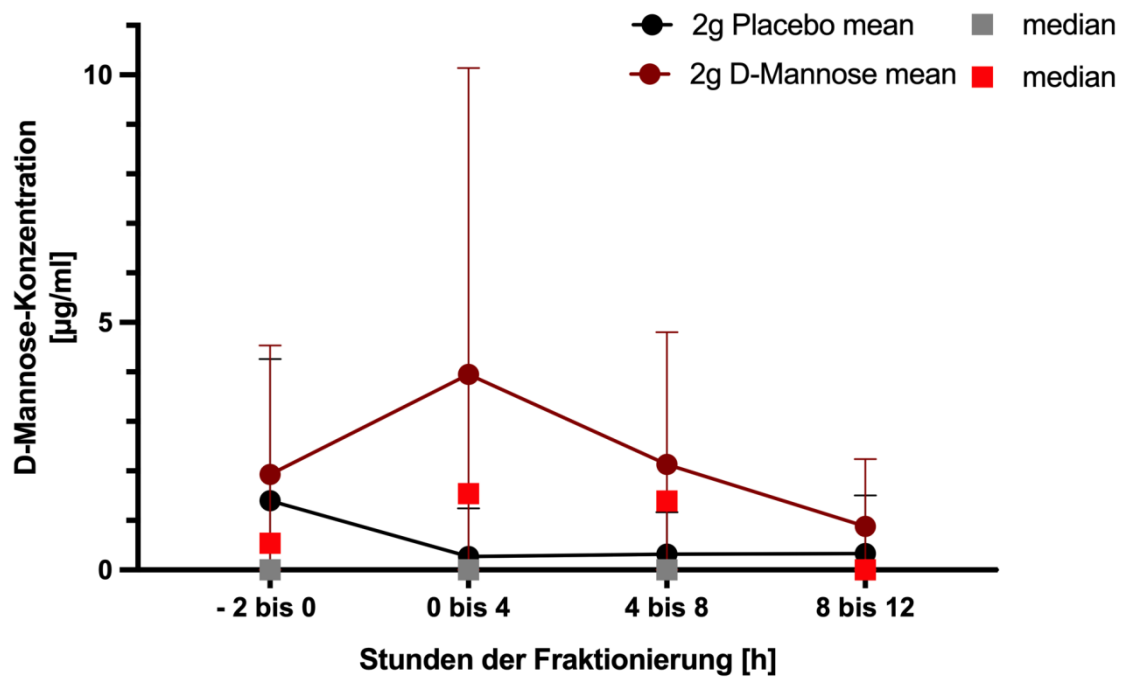


Abb. 5: Phase II: D-Mannose-Konzentration [µg/ml] - ohne Normierung im Zeitverlauf

D-Mannose-Konzentration mit Normierung auf Kreatinin im Urin:

Die D-Mannose-Konzentrationen des zweiten Beobachtungszeitraums wurden ebenfalls auf die individuellen Kreatinin-Konzentrationen im Urin normiert. Der maximale Medianwert der D-Mannose-Gruppe wurde in Fraktion eins beobachtet. In den weiteren Fraktionen kam es zu einer Abnahme. In der Placebo-Gruppe war der Median in allen Fraktionen null.

Tabelle 16 enthält die zugehörigen deskriptiven Statistiken (n, Mittelwert, SD, Median und Spannweite) von Phase II in beiden Behandlungsgruppen.

Tab. 16: Phase II: D-Mannose-Konzentration im Urin [µg/ml] normiert auf Kreatinin im Urin <sup>45</sup>

Phase II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS CI Wilcoxon-Test
-2 bis 0 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,003 (0,0044)	0,002 (0,0046)	0,551282
	95% CI	[0,0001; 0,0057]	[-,0008; 0,0047]	[0,314; 0,789]
	Min-Max	0 – 0,0105	0 – 0,0169	P = 0,6646
	<b>Median</b>	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,006	0,000 – 0,002	

Phase II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS CI Wilcoxon-Test
	Volumen <LLOQ	6 (50,0%)	7 (53,8%)	
0 - bis 4 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,013 (0,0257)	0,001 (0,0032)	0,788462
	95% CI	[-,0037; 0,0290]	[-,0010; 0,0028]	[ 0,560; 1,017]
	Min-Max	0 – 0,0896	0 – 0,0114	P = 0,0034
	<b>Median</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,011	0,000 – 0,000	
	Volumen <LLOQ	4 (33,3%)	12 (92,3%)	
4 bis 8 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,005 (0,0063)	0,001 (0,0021)	0,775641
	95% CI	[0,0007; 0,0087]	[-,0006; 0,0019]	[0,553; 0,999]
	Min-Max	0 – 0,0188	0 – 0,0074	P = 0,0073
	<b>Median</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,007	0,000 – 0,000	
	Volumen <LLOQ	4 (33,3%)	11 (84,6%)	
8 bis 12 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,002 (0,0031)	0,001 (0,0034)	0,615385
	95% CI	[-,0000; 0,0039]	[-,0011; 0,0030]	[0,374; 0,857]
	Min-Max	0 – 0,0075	0 – 0,0124	P = 0,2248
	<b>Median</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,005	0,000 – 0,000	
	Volumen <LLOQ	8 (66,7%)	12 (92,3%)	

Abbildung 6 zeigt die Unterschiede der normierten Daten graphisch. Dargestellt sind der Verlauf der Mittelwerte sowie der Mediane. In rot sind die Ergebnisse der D-Mannose-Gruppe gezeigt. In schwarz und grau die Ergebnisse der Placebo-Gruppe. Die Kurven mit den enthaltenen Punkten stellen den Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichung dar. Der Median der jeweiligen Fraktion wird mit den Quadraten dargestellt.

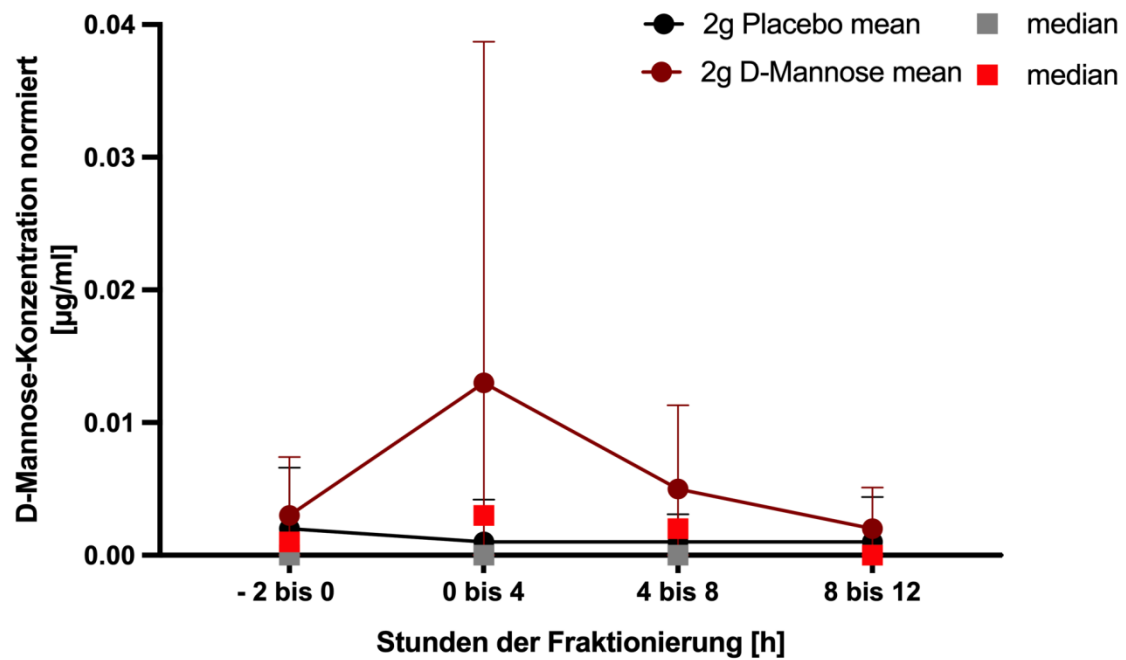


Abb. 6: Phase II: D-Mannose-Konzentration [µg/ml] - mit Normierung im Zeitverlauf

### 3.2.3 Zusammenlegung der D-Mannose-Konzentrationen im Urin von Phase I und II

#### D-Mannose-Konzentration ohne Normierung:

In Phase I und II waren die Ergebnisse der Analysen ähnlich. Die Zusammenlegung (Pooling) der Konzentrationen der D-Mannose-Werte von beiden Untersuchungszeiträumen sollte den Vergleich zwischen den Einnahmegruppen weiter verdeutlichen.

Deskriptive Statistiken (n, Mittelwert, s.d., Median und Spannweite) wurden in der folgenden Tabelle 17 nach Behandlungsgruppen und Zeit dargestellt.

In Urinfraktion eins konnte in der D-Mannose-Gruppe ein kombinierter maximaler Medianwert von 1,62 µg/ml gezeigt werden. In den weiteren Urinfraktionen war dieser abnehmend mit 1,36 µg/ml in der zweiten und null in der dritten Fraktion. In der Placebo-Gruppe waren die Medianwerte durchgehend bei null geblieben.

Die D-Mannose-Konzentration im Urin war in der D-Mannose-Gruppe im Vergleich zu Placebo höher. Für die Fraktionen eins und zwei konnte eine große Überlegenheit (Fraktion 1: MWS = 0,827; Fraktion 2: MWS = 0,840) und für Fraktion drei (Fraktion 3: MWS = 0,667) eine mittlere Überlegenheit gemäß MWS gezeigt werden.

Tab. 17: Phase I und II gepoolt: D-Mannose-Konzentration im Urin [ $\mu\text{g/ml}$ ] <sup>45</sup>

Phase I+II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS CI Wilcoxon-Test
-2 bis 0 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	1,27 (1,819)	0,82 (1,849)	0,557692
	95% CI	[ 0,117; 2,428]	[-0,299; 1,936]	[0,319; 0,796]
	Min-Max	0 – 4,41	0 – 6,83	P = 0,6233
	<b>Median</b>	<b>0,27</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 2,64	0,00 – 0,68	
0 - bis 4 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	3,75 (5,540)	0,23 (0,831)	0,826923
	95% CI	[ 0,233; 7,273]	[-0,272; 0,732]	[0,604; 1,050]
	Min-Max	0 – 16,9	0 – 2,995	P = 0,0012
	<b>Median</b>	<b>1,62</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,25 – 4,89	0,00 – 0,00	
4 bis 8 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	2,58 (3,268)	0,31 (0,844)	0,839744
	95% CI	[ 0,504; 4,657]	[-0,197; 0,823]	[ 0,630; 1,049]
	Min-Max	0 – 10,37	0 – 2,91	P = 0,0014
	<b>Median</b>	<b>1,36</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,65 – 3,13	0,00 – 0,00	
8 bis 12 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	1,21 (1,879)	0,28 (0,992)	0,666667
	95% CI	[ 0,015; 2,402]	[-0,324; 0,874]	[0,429; 0,905]
	Min-Max	0 – 5,3	0 – 3,575	P = 0,0682
	<b>Median</b>	<b>0,00</b>	<b>0,00</b>	
	Q1-Q3	0,00 – 2,20	0,00 – 0,00	

Abbildung 7 stellt die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen für die gepoolten Ergebnisse in einer Graphik dar. Die mit rot dargestellten Ergebnisse zeigen die Daten der D-Mannose-Gruppe. Die Kurven mit den enthaltenen Punkten stellen den Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichung dar. Die mit schwarz und grau dargestellten Ergebnisse zeigen die Daten der Placebo-Gruppe. Der Median der jeweiligen Fraktion wird mit den Quadraten dargestellt.

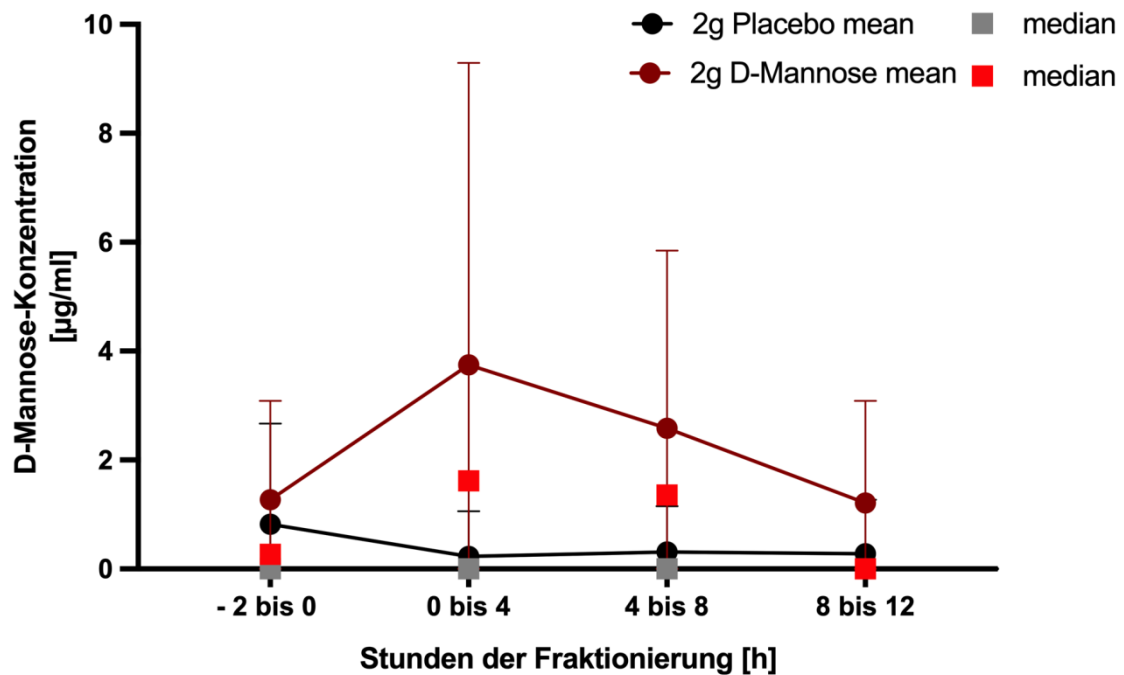


Abb. 7: Phase I und II gepoolt: D-Mannose-Konzentration [µg/ml] - ohne Normierung im Zeitverlauf

D-Mannose-Konzentration mit Normierung auf Kreatinin im Urin:

Deskriptive Statistiken (n, Mittelwert, SD, Median und Spannweite) wurden in der folgenden Tabelle 18 nach Behandlungsgruppen und Zeit dargestellt.

Die Ergebnisse sind vergleichbar mit den Ergebnissen der D-Mannose-Konzentration ohne Normierung.

Tab. 18: Phase I und II gepoolt: D-Mannose-Konzentration im Urin [µg/ml] normiert auf Kreatinin im Urin <sup>45</sup>

Phase I+II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS CI Wilcoxon-Test
-2 bis 0 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,003 (0,0046)	0,002 (0,0043)	0,551282
	95% CI	[-,0001; 0,0056]	[-,0010; 0,0041]	[0,314; 0,789]
	Min-Max	0 – 0,0119	0 – 0,0156	P = 0,6646
	<b>Median</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,005	0,000 – 0,001	
0 - bis 4 Stunden	n	12	13	

Phase I+II Fraktion	Statistik	Substanz A 2 g D-Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	MWS CI Wilcoxon-Test
	Mittelwert (SD)	0,015 (0,0288)	0,001 (0,0029)	0,826923
	95% CI	[-,0037; 0,0329]	[-,0010; 0,0026]	[0,604; 1,050]
	Min-Max	0 – 0,0999	0 – 0,0105	P = 0,0012
	<b>Median</b>	<b>0,003</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,001 – 0,016	0,000 – 0,000	
4 bis 8 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,006 (0,0077)	0,001 (0,0021)	0,852564
	95% CI	[0,0008; 0,0106]	[-,0006; 0,0020]	[0,646; 1,059]
	Min-Max	0 – 0,0222	0 – 0,0077	P = 0,0008
	<b>Median</b>	<b>0,002</b>	<b>0,000</b>	
8 bis 12 Stunden	n	12	13	
	Mittelwert (SD)	0,002 (0,0029)	0,001 (0,0030)	0,653846
	95% CI	[0,0000; 0,0038]	[-,0010; 0,0026]	[0,411; 0,896]
	Min-Max	0 – 0,0079	0 – 0,0108	P = 0,1166
	<b>Median</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	
	Q1-Q3	0,000 – 0,004	0,000 – 0,000	

Abbildung 8 zeigt die Unterschiede der normierten Daten graphisch. Dargestellt sind der Verlauf der Mittelwerte sowie der Mediane. In rot sind die Ergebnisse der D-Mannose-Gruppe gezeigt. In schwarz und grau die Ergebnisse der Placebo-Gruppe. Die Kurven mit den enthaltenen Punkten stellen den Verlauf der Mittelwerte mit Standardabweichung dar. Der Median der jeweiligen Fraktion wird mit den Quadraten dargestellt.

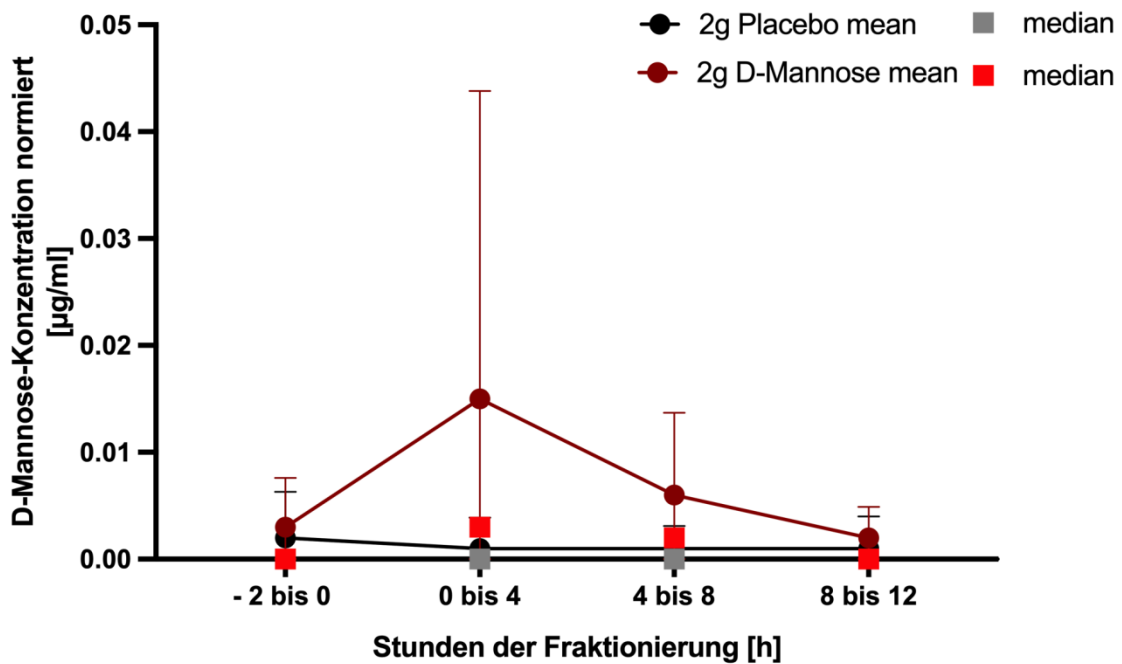


Abb. 8: Phase I und II gepoolt: D-Mannose-Konzentration [µg/ml] - mit Normierung im Zeitverlauf

### 3.3 Darstellung des sekundären Zielendpunkts

Es wurde die Anzahl der KBE/Well in Gegenwart der o.g. Bakterien gemessen. Die Messungen wurden für die Baseline-Fraktion und die jeweilige Urinfraktion nach Einnahme des Prüfpräparats mit der maximalen D-Mannose-Konzentration durchgeführt. Hieraus wurden intraindividuelle Verhältnisse der Anzahl von KBE/Well nach der Behandlung zu den Werten der Anzahl von KBE/Well vor Einnahme gebildet. Die Verhältnisse wurden als Adhäsion bezeichnet. Durch den vermuteten Wirkmechanismus von D-Mannose wurde davon ausgegangen, dass die Adhäsion der Bakterien an die Zellen durch eine höhere Konzentration von D-Mannose vermindert sei. Die Verhältnisse sollten entsprechend die Verminderung der Adhäsion beschreiben und wurden aus den Mittelwerten von sechs Wiederholungen berechnet. Anschließend wurden aus den bereits beschriebenen Gründen Mediane aus den sechs Wiederholungen gebildet.

Aufgrund der häufigen Messungen der D-Mannose-Konzentration unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze und der in der Auswertung auf null gesetzten Messwerte, wurden die Ergebnisse der KBE/Well Werte geclustert. Diese Einteilung erfolgte anhand der Konzentration der D-Mannose. Es wurden zwei Cluster verwendet: 1.: D-Mannose-Konzentrationen  $< 5 \mu\text{g/ml}$  und 2.: D-Mannose-Konzentrationen  $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ . Da die D-

Mannose-Konzentrationen in allen Urinproben der Placebogruppe unter 5 µg/ml lagen, konnten die Verhältnisse nur für das Cluster < 5 µg/ml berechnet werden. Bei der D-Mannose-Gruppe konnten auch Verhältnisse für die Kategorie von Konzentrationen  $\geq 5$  µg/ml gebildet werden. Aus diesen Daten sollte die Funktion der D-Mannose betrachtet werden. Die Baseline-Fraktionen ausgenommen, gab es im ersten Beobachtungszeitraum in der Verum-Gruppe drei Probandinnen mit Werten von  $\geq 5$  µg/ml sowie sechs Probandinnen mit Werten  $> 0 - < 5$  µg/ml und drei Probandinnen mit Werten von null. Im zweiten Beobachtungszeitraum waren es in gleicher Reihenfolge drei, fünf und vier Probandinnen. In der Placebo-Gruppe hatten jeweils elf Teilnehmerinnen in beiden Phasen einen Wert unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze sowie zwei Probandinnen einen Wert von  $> 0 - < 5$  µg/ml. Tabelle 19 gibt einen Überblick über die für den Adhärenzassay verwendeten Urinfraktionen. Ausgewählt wurden die Fraktionen mit der jeweils höchsten D-Mannose-Konzentration. Zur Bewertung der Daten wurde eine explorative Auswertung ohne die Anwendung von Signifikanztests durchgeführt.

Die Adhäsionswerte konnten allerdings nicht für alle Fraktionen der Probandinnen bestimmt werden, da sich die T24-Zellen nach einer Stunde Inkubation mit den Urinproben von den Wells lösten. Dies war für Probandin 1-21 für alle Fraktionen sowie für die Probandinnen 1-03, 1-07 und 1-16 für die Baseline-Fraktion für Phase II der Fall.

**Tab. 19: Urinfraktionen der jeweiligen Probandinnen, welche für den Adhäsionshemmungstest verwendet wurden. Ausgewählt wurden die Fraktionen mit der jeweils höchsten D-Mannose-Konzentration (Verum-Gruppe grün hinterlegt, modifiziert aus dem „Laborbericht“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH entnommen)<sup>39</sup>**

Random-Nummer/ Probandennummer	Urinfraktionen, die für den Ex-vivo/In-vitro-Adhäsionshemmungstest verwendet wurden			
	Phase I		Phase II	
A001/ 1-01	0	1	0	1
A002/ 1-02*	0	1	0	2
A003/ 1-03	0	1	0	1
A004/ 1-16*	0	1	0	1
A005/ 1-05	0	2	0	1
A006/ 1-06*	0	2	0	1
A007/ 1-07*	0	1	0	1
A008/ 1-15	0	1	0	2

A009/ 1-14	0	1	0	1
A010/ 1-13*	0	2	0	1
A011/ 1-11	0	3	0	3
A012/ 1-12*	0	1	0	2
A013/ 1-17*	0	3	0	1
A014/ 1-18	0	1	0	1
A015/ 1-19*	0	2	0	1
A016/ 1-20	0	2	0	2
A017/ 1-21*	0	3	0	1
A018/ 1-22	0	1	0	2
A019/ 1-23*	0	2	0	1
A020/ 1-24	0	2	0	2
A021/ 1-29	0	1	0	1
A022/ 1-33	0	2	0	1
A023/ 1-25*	0	1	0	1
A024/ 1-38*	0	2	0	1
B001/ 1-32	0	2	0	1

Urinfraktionen: 0 – vor Einnahme, 1 – 0-4h post Einnahme, 2 – 4-8h post Einnahme, 3 – 8-12h post Einnahme; \* - D-Mannose-Gruppe

### 3.3.1 *In-vitro*-Adhäsionshemmung der verwendeten UPECs

Zu den verwendeten D-Mannose-sensitiven Stämmen gehören *E. coli* CHD22, UTI89 und CHD94. Die folgenden Tabellen 20 bis 23 geben einen Überblick über die Ergebnisse der Mediane und Verhältnisse vor und nach Einnahme des Prüfpräparats für beide Phasen. Tabelle 24 stellt die Ergebnisse für den verwendeten D-Mannose-resistenten Stamm *E. coli* CHD17 dar.

**Tab. 20: *E. coli* CHD22**

Phase	Untersuchungsgruppe	Median (KBE/Well)	D-Mannose cluster [µg/ml]	Median der Verhältnisse vor/nach
Beobachtungszeitraum I	D-Mannose	Baseline: 932	0 - 5 (n=8)	1,12
		Post-Einnahme: 924	5 - 17	0,83

Ergebnisse

			(n=3)	
	Placebo	Baseline: 763 Post-Einnahme: 1014	0 - 5 (n=13)	1,03
Beobachtungszeitraum II	D-Mannose	Baseline: 796 Post-Einnahme: 982	0 - 5 (n=6)	1,26
			5-17 (n=3)	1,39
	Placebo	Baseline: 857 Post-Einnahme: 932	0 - 5 (n=12)	1,05

**Tab. 21: *E. coli* UTI89**

Phase	Untersuchungsgruppe	Median (KBE/Well)	D-Mannose cluster [µg/ml]	Median der Verhältnisse vor/nach
Beobachtungszeitraum I	D-Mannose	Baseline: 1336 Post-Einnahme: 1351	0 - 5 (n=8)	1,08
			5 - 17 (n=3)	0,75
	Placebo	Baseline: 1307 Post-Einnahme: 1346	0 - 5 (n=13)	0,95
Beobachtungszeitraum II	D-Mannose	Baseline: 1124 Post-Einnahme: 1592	0 - 5 (n=6)	1,21
			5-17 (n=3)	1,15
	Placebo	Baseline: 1144 Post-Einnahme: 1403	0 - 5 (n=12)	1,14

Tab. 22: *E. coli* CHD94

Phase	Untersuchungsgruppe	Median (KBE/Well)	D-Mannose cluster [µg/ml]	Median der Verhältnisse vor/nach
Beobachtungszeitraum I	D-Mannose	Baseline: 757	0 - 5 (n=8)	1,15
		Post-Einnahme: 851	5 - 17 (n=3)	0,91
	Placebo	Baseline: 796 Post-Einnahme: 882	0 - 5 (n=13)	1,00
Beobachtungszeitraum II	D-Mannose	Baseline: 625	0 - 5 (n=6)	1,21
		Post-Einnahme: 785	5-17 (n=3)	1,49
	Placebo	Baseline: 708 Post-Einnahme: 832	0 - 5 (n=12)	1,11

Tab. 23: *E. coli* CHD17

Phase	Untersuchungsgruppe	Median (KBE/Well)	D-Mannose cluster [µg/ml]	Median der Verhältnisse vor/nach
Beobachtungszeitraum I	D-Mannose	Baseline: 99	0 - 5 (n=8)	0,97
		Post-Einnahme: 83	5 - 17 (n=3)	1,14
	Placebo	Baseline: 118 Post-Einnahme: 113	0 - 5 (n=13)	0,78
Beobachtungszeitraum II	D-Mannose	Baseline: 74	0 - 5 (n=6)	1,00
		Post-Einnahme: 974	5-17 (n=3)	0,82

	Placebo	Baseline: 105 Post-Einnahme: 107	0 – 5 (n=12)	1,19
--	---------	-------------------------------------	-----------------	------

Eine intern durchgeführte Kontrolle mit *E. coli* CHD22 bestätigte die Fähigkeit von D-Mannose, die bakterielle Adhäsion zu vermindern. Durch Zugabe von 50 µl 1 % D-Mannose zu Urinproben von Tag null vor Einnahme des Prüfpräparats zeigte sich eine Reduktion von 54 % zur 100 %.

Bei den D-Mannose sensitiven UPECs zeigten sich bei der Verum-Gruppe konstante und ähnliche Ergebnisse für den ersten Beobachtungszeitraum und dem zweiten Cluster mit D-Mannose-Konzentrationen  $\geq 5$  µg/ml. Die Mediane nach der Einnahme lagen bei 0,83 ; 0,75 und 0,91. Hieraus lässt sich eine Adhäsionshemmung von 83 %, 75 %, bzw. 91 % ableiten. Diese Ergebnisse der drei D-Mannose sensitiven *E. coli* von Phase I wurden gemittelt, sodass eine mediane Verringerung der Adhäsion von 17 % beobachtet werden konnte. Zur Veranschaulichung siehe hierzu Tabelle 24.

Für den zweiten Beobachtungszeitraum zeigten sich die Ergebnisse insgesamt uneinheitlich sowie vor allem different zu Phase I. Hierbei waren die Verhältnisse für das zweite Cluster zwischen 1,15 – 1,49. Es konnte keine Verringerung der Adhäsion beobachtet werden. Die Verhältnisse für das Cluster  $> 0 - < 5$  µg/ml lagen zwischen 1,08 – 1,15 für Phase I und 1,21 – 1,26 für Phase II.

**Tab. 24: Adhäsionswirkung der D-Mannose sensitiven UPECs für Phase I und Cluster 2**

UPEC	Adhäsionsverhältnisse für den 1. Beobachtungszeitraum & 2. Cluster
<i>E. coli</i> CHD22	0,83
<i>E. coli</i> UTI89	0,75
<i>E. coli</i> CHD94	0,91
Median	0,83

In der Placebogruppe konnten nur D-Mannose-Werte  $< 5$  µg/ml bewertet werden. Der Median des Adhäsionsverhältnisses ergab für beide Behandlungstage Werte  $> 100\%$ .

Bei dem D-Mannose-resistenten UPEC *E. coli* CHD17 zeigten sich die KBE/Well-Werte im Vergleich insgesamt ca. um den Faktor 10 verringert. Dieses Bakterium exprimiert keine (funktionellen) Typ-1-Pili, weshalb ein Anheften an die Blasenepithelzellen nur teilweise erfolgt. Bei der Placebo-Gruppe lagen die Verhältnisse bei 0,78 (Phase I) und 1,19 (Phase II). In der Verum-Gruppe waren die Verhältnisse für das Cluster  $> 0 - < 5 \mu\text{g/ml}$  zwischen 0,97 für Phase I und 1,00 für Phase II. Im zweiten Cluster präsentierten sich die Verhältnisse bei 1,14 für Phase I und 0,82 für Phase II.

## 3.4 Ergebnisse der Sicherheitskriterien

### 3.4.1 *Unerwünschte Ereignisse*

Unerwünschte Ereignisse wurden bei der Studie keine vermeldet.

### 3.4.2 *Behandlungsabbrüche und -unterbrechungen*

Alle Probandinnen haben die Studie ordnungsgemäß beendet. Die abschließende Untersuchung durch den Prüfarzt an Tag zwei wurde bei allen Teilnehmerinnen regelrecht durchgeführt. Hierbei wurde die Bewertung der Verträglichkeit mit Hilfe eines standardisierten Fragebogen vor Abschluss der Studie erfasst.

### 3.4.3 *Bewertung der Verträglichkeit des Prüfpräparats*

Die Verträglichkeitsbewertung durch die Probandinnen und den Prüfarzt erfolgte anhand einer 11-stufigen visuellen Analogskala. Diese reichte von 0 = "sehr schlecht" bis 10 = "sehr gut".

Die Verträglichkeit wurde durch 24 Probandinnen mit 10 und durch eine Probandin aus der Placebogruppe mit 9 angegeben. Der Prüfarzt bewertete die Verträglichkeit für alle Teilnehmerinnen mit 10. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 25.

**Tab. 25: Bewertung der Verträglichkeit anhand einer VAS-Skala von 0 bis 10 <sup>45</sup>**

		Substanz A 2 g D- Mannose (N = 12)	Substanz B 2 g Placebo (N = 13)	Insgesamt (N = 25)
	Ergebnis	N (%)	N (%)	N (%)
Probandin	9	0 ( 0.0%)	1 ( 7.7%)	1 ( 4.0%)
	10	12 (100.0%)	12 ( 92.3%)	24 ( 96.0%)
	Insgesamt	12 (100.0%)	13 (100.0%)	25 (100.0%)
Prüfarzt	10	12 (100.0%)	13 (100.0%)	25 (100.0%)

## 4 Diskussion

HWI sind ein erhebliches medizinisches Problem, da sie zu den häufigsten bakteriellen Infektionen weltweit zählen<sup>77</sup>. Die höchste Inzidenz von HWI liegt zwischen 15 und 35 Jahren. Dabei sind Frauen bis zu 40-mal häufiger betroffen als Männer<sup>19, 44, 78</sup>. Häufig sind HWI auch bei älteren Frauen. Insgesamt haben ca. 50 % aller Frauen mindestens einmal in Ihrem Leben eine HWI und jede dritte Frau erhält deshalb eine antibiotische Therapie<sup>19, 44</sup>. Grundsätzlich werden HWI anhand der Symptomatik sowie der Schwere der Infektion systematisch eingeteilt. Eine besondere klinische Problematik ergibt sich aus der hohen Rezidivrate der HWI. Dies bedingt einen hohen Verbrauch von Antibiotika und führt zu einer Zunahme von Resistenzen gegenüber den häufig eingesetzten Antibiotikaklassen<sup>77</sup>. Die Zunahme von Antibiotikaresistenzen stellt ein globales Problem dar und bedroht die Behandlungen von Infektionen insgesamt. Daher ist es notwendig alternative Behandlungsmethoden vor allem für die unkomplizierten HWI zu entwickeln. Das Keimspektrum der HWI ist variabel, allerdings ist der häufigste Erreger *E. coli*<sup>20</sup>. Sowohl *E. coli* als auch andere Erreger der HWI haben spezielle Pili und die Adhäsion mit diesen an das Urothel ist ein wichtiger Mechanismus bei der Pathogenese der HWI. *E. coli* bindet mittels Typ-1-Pili mit der Proteinuntereinheit FimH an Mannoseeinheiten der Uroplakine der Deckzellenschicht der Harnblase<sup>37, 49</sup>. An diesen Pathomechanismus setzt die Therapie bzw. die Prophylaxe der HWI mit D-Mannose an. Die Hypothese ist, dass oral zugeführte D-Mannose ins Blut aufgenommen und ein bestimmter Anteil über den Urin ausgeschieden wird. Ausreichend hohe Mengen an freier D-Mannose im Urin antagonisieren FimH und binden an die Typ-1-Pili der Erreger. Hierdurch wird die Anheftung an das Urothel blockiert und die Mannose-Bakterien-Komplexe können bei der Miktion ausgeschieden werden. Daher kommt es zu einer Absenkung der intravesikalen Bakterienlast<sup>11, 33, 43, 54, 59, 79, 82</sup>. Diese Eigenschaft trägt dazu bei, die Virulenz der Erreger zu verringern und spricht für die Verwendung von D-Mannose zur Reduktion des Risikos eines erneuten Auftretens von HWI.

In klinischen Studien gab es bereits Hinweise, dass die orale Applikation von D-Mannose bei der Behandlung einer unkomplizierten HWI zur Besserung der Symptome beitragen kann. Teilweise zeigte sich hierbei auch die Tendenz zur Wirksamkeit bei der Akuttherapie<sup>15, 56, 74</sup>. Die Verträglichkeit war hierbei nicht beeinträchtigt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Einnahme oraler D-Mannose die Häufigkeit von

rezidivierenden HWI reduzieren kann und dabei einer antibiotischen Standardprophylaxe nicht unterlegen ist <sup>36</sup>. Basierend auf diesen Daten wurde die unterstützende Einnahme von D-Mannose bereits in der deutschen S3-Leitlinie - Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten – als Maßnahme zur Senkung des Risikos von HWI-Rezidiven in der Gruppe der Frauen etabliert, die aufgrund ihrer Anamnese ein hohes Risikoprofil tragen <sup>78</sup>.

Allerdings gibt es bisher keine exakten Daten zur Konzentration der D-Mannose im Urin nach erfolgter oraler Gabe. Auch die Kinetik der Konzentration im Urin ist unbekannt. Studien zur Urinausscheidung von oral aufgenommener D-Mannose liegen nur in einem geringen Ausmaß vor, sodass es nicht möglich ist ein entsprechendes Verhältnis zu beschreiben <sup>28,47</sup>.

Die hier vorliegende Studie sollte nun diese Wissenslücke schließen und die biologische Plausibilität belegen. Die Urinausscheidung eines D-Mannose-Nahrungsergänzungsmittels nach der oralen Einnahme von Einzeldosen von 2 g D-Mannose wurde bewertet und in drei Fraktionen quantifiziert. Der Gesamtansatz der vorliegenden Studie zielte somit darauf ab, pharmakologische Evidenz zu erbringen, wie hoch die Ausscheidung von D-Mannose im Urin ist und wie dadurch die bakterielle Adhäsion an Uroepithelzellen in einem *ex-vivo* Setting reduziert werden kann.

Als Dosierung wurde für die vorliegende Studie 2 g D-Mannose an zwei aufeinanderfolgenden Untersuchungstagen ausgewählt. Bei der Auswahl der Dosierung fungierte die Studie von *KRANJČEC et al.* als Vorbild, welche ebenfalls 2 g orale D-Mannose untersuchte. Diese Studie wurde im Jahr 2014 veröffentlicht. Weitere Studien, welche ebenfalls D-Mannose als Einzelprodukt im Zusammenhang mit rezidivierenden HWI untersuchten sind *PORRU et al.* 2014, *DOMENICI et al.* 2016 sowie *PHÉ et al.* 2017 <sup>15, 36, 55, 56</sup>. Die in diesen Untersuchungen eingesetzten Gesamtdosen pro Tag unterschieden sich. Sie variierten zwischen 3 g (aufgeteilt in 2 Dosen à 1,5 g oder 3 Dosen à 1 g) bis 2 g (Einzeldosis). Die Verträglichkeit der Substanz war gut. Im Rahmen der Studie von *KRANJČEC et al.* war das Auftreten von Nebenwirkungen in der D-Mannose-Gruppe deutlich geringer als in der Gruppe, die ein Antibiotikum zur Prophylaxe eingenommen hatten. Unerwünschte Nebenwirkungen bei der D-Mannose-Gruppe waren vor allem Diarrhoen und traten bei lediglich 7,8 % der Teilnehmerinnen auf. Höhere Dosierungen wurden bei *WOOD* und *CAHILL* und in der Studie von

*ALTON et al.* untersucht. Bei der Untersuchung von *WOOD* und *CAHILL* wurden 0,5 g/kg Körpergewicht (KG) (entspricht einer Einzeldosis von 30 g bei einem 60 kg schweren Probanden) orale D-Mannose verabreicht <sup>80</sup>. In der Folge wurden bei einem Teilnehmer deutliche Bauchkrämpfe mit Diarrhoen festgestellt. Bei der Studie von *ALTON et al.* wurden bei oraler Dosierung von 0,2 g/kg KG (entspricht einer Einzeldosis von 12 g bei einem 60 kg schweren Probanden) bei etwa der Hälfte der Probanden gastrointestinale Nebenwirkungen beobachtet. Hierzu gehörten Diarrhoen und Flatulenzen ca. 1-2 Stunden nach der Einnahme <sup>3</sup>. Bei einer Reduzierung der Dosierung auf 0,15 g/kg KG traten ähnliche Symptome nur noch bei etwa 10 % der Teilnehmer auf.

Die gewählte Dosierung von 2 g D-Mannose entspricht 0,03 g/kg KG bei einer 60 kg schweren Person. Hierbei wurde die Auftretenswahrscheinlichkeit für gastrointestinale Nebenwirkungen als gering eingestuft. Bei den Studienteilnehmerinnen lag das Körpergewicht am Tag des Screenings im Mittel bei 63,9 kg  $\pm$  10,78, sodass das Risiko für unerwünschte Ereignisse niedrig eingeschätzt wurde. Diese Einschätzung deckt sich mit den Ergebnissen, da keinerlei unerwünschte Ereignisse gemeldet wurden und die Studie von allen Probandinnen regelrecht beendet werden konnte. Auch die abschließende körperliche Untersuchung an Tag zwei zeigte keine signifikanten Gruppenunterschiede bei den Vitalwerten im Vergleich zu den Merkmalen (Körpergewicht, Körpertemperatur, Herzfrequenz und Blutdruck) vor Beginn der Studie. Das Ergebnis der sehr hohen Verträglichkeit des Prüfpräparats anhand einer 11-stufigen visuellen Analogskala durch die Studienteilnehmerinnen, als auch durch den Prüfarzt, bestätigt die Auswahl der Dosierung von 2 g. Insgesamt lässt sich hieraus ableiten, dass D-Mannose in der Dosierung von 2 g ein sicheres und gut verträgliches Nahrungsergänzungsmittel ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden 25 gesunde Frauen in die Studie eingeschlossen, um mindestens 12 auswertbare Probandinnen für jede Behandlungsgruppe zu rekrutieren. Die Akquirierung der freiwilligen Probandinnen erfolgte nach dem im Methodenteil beschriebenen Schema. Im Vergleich zu den vier genannten klinischen Arbeiten wurde die hier durchgeführte Studie mit gesunden Probandinnen absolviert. Dies wurde durch die strengen Ein- und Ausschlusskriterien gewährleistet. Vor allem das zweifache Ausfüllen des ACSS am Screeningtag, als auch am Randomisierungstag, sollte den gesunden Status der eingeschlossenen Frauen bestätigen. Der validierte ACSS-Fragebogen hat sich als geeignetes Instrument für die Diagnostik und die von Patienten

berichteten Ergebnisse in klinischen Studien zur Untersuchung verschiedener Behandlungsmodalitäten von unkomplizierten HWI etabliert <sup>1, 2</sup>. Die Probandinnen bestätigten ihre Symptomfreiheit durch niedrige Ergebnisse im ACSS.

Auf eine formale Berechnung des Stichprobenumfangs wurde verzichtet. Die gewählte Anzahl an Teilnehmerinnen wurde als ausreichend angesehen, um das Ziel dieser Sondierungsstudie zu erreichen. Da eine biologische Plausibilität einer relevanten Adhäsionswirkung nach oraler Einnahme von D-Mannose erbracht werden sollte, wurde diese Vorgehensweise als gerechtfertigt angesehen. In den klinischen Studien von *PORRU et al.* (n = 60), *KRANJČEC et al.* (n = 308), *DOMENICI et al.* (n = 43) und *PHÉ et al.* (n = 22) waren die Teilnehmerzahlen im Vergleich tendenziell eher höher, bzw. knapp darunter. Nur bei der Untersuchung von *KRANJČEC et al.* mit 308 Patientinnen war die Anzahl deutlich höher. In diesen Wirksamkeitsstudien wurden jedoch kranke Personen untersucht. Die hier vorliegende Studie hat einen anderen Ansatz mit gesunden Probandinnen, sodass sich die Teilnehmeranzahl nicht gänzlich vergleichen lässt.

Von einer methodisch hochwertigen Qualität der durchgeführten Studie kann ausgegangen werden <sup>64</sup>. Der Sponsor der Studie hat die CRO AKP mit der Durchführung und Überwachung der Studie beauftragt. AKP hat in Abstimmung mit dem Sponsor ein klinisches Studienprotokoll erstellt, in dem relevante Richtlinien, auch für die beteiligten Personen und Firmen der Studiendurchführung, festgehalten wurden. Während und nach Durchführung der Studie fanden durch AKP Monitorvisiten statt. Diese dienten der Einhaltung und Überwachung der im Studienprotokoll festgelegten Vorgaben. Vor Studienstart wurde sichergestellt, dass alle geplanten Mitwirkenden über eine ausreichende Qualifikation und entsprechende gültige GCP-Zertifikate verfügten. Das gewählte Studiendesign mit dem doppel-blinden, randomisierten und Placebo-kontrollierten Charakter trägt ebenfalls zur hohen Qualität dieser Studie bei.

Der primäre Zielendpunkt war neben der Verträglichkeit des Prüfpräparats, die Placebo-kontrollierte Quantifizierung der D-Mannose-Konzentration im Urin. Der exakte Ablauf der Urinsammelphasen wurde bereits beschrieben. Die Überprüfung der Therapietreue wurde durch die vom Sponsor beauftragte CRO AKP und das durchführende Studienzentrum jederzeit gewährleistet.

Als Kontrollurinfraktion vor Einnahme des Prüfpräparats diente die Sammelphase von minus zwei bis null Stunden. Hierbei zeigte sich für den ersten Beobachtungszeitraum eine mittlere Urinmenge von 445,4 ml ( $\pm 166.56$ ), im Vergleich zu 280,6 ml ( $\pm 125$ ) für den zweiten Beobachtungszeitraum. Diese Tatsache passt zu den Aussagen der Probandinnen, dass die Trinkmengenbeschränkung zwischen den Untersuchungstagen als teilweise knapp bemessen beurteilt wurde. Dies führt zu der Annahme, dass die Baseline-Fraktion von Phase II höher konzentriert war als die anderen Urinfraktionen und wird im Rahmen der Einordnung der Adhäsionsversuche noch eine Rolle spielen. Die Flüssigkeitsaufnahme vor Beginn der Untersuchung am Tag der Randomisierung wurde nicht erfasst und war deshalb unbekannt. Da die Studie abends startete und folglich erst ab diesem Zeitpunkt die Trinkmenge vorgegeben wurde, kann nicht eingeordnet werden, inwiefern sich die Trinkmenge vor Beginn der Studie auf die Konzentration der Baseline-Fraktion von Phase I ausgewirkt hat. Die allgemeinen Ergebnisse der Urinvolumina wurden weiterhin deskriptiv und ohne statistische Signifikanztests dargestellt.

Bei der Konzentrationsbestimmung von D-Mannose zeigte sich in einzelnen Urinfraktionen ein Wert unterhalb der unteren Bestimmungsgrenze von 1  $\mu\text{g/ml}$ . Häufiger wurde diese Tatsache in der Placebo-Gruppe festgestellt. Diesbezüglich waren die Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen während der Baseline-Urinfraktion am geringsten. In Phase I gab es neun (75 %) Probandinnen in der Verum-Gruppe, während es in der Placebo-Gruppe zwölf (92.3%) Frauen mit einem LLOQ in der Baseline-Urinfraktion gab. In Phase II war der Unterschied mit sechs (50 %, Verum-Gruppe) und sieben (53,8 %, Placebo-Gruppe) Teilnehmerinnen bei der Baseline-Urinfraktion zueinander noch geringer. Dies lässt einerseits darauf schließen, dass endogen höchstens eine geringe Ausscheidung von D-Mannose stattfindet, als auch andererseits, dass die eingenommene D-Mannose von Tag null nach 24 Stunden größtenteils ausgeschieden ist. In den Baseline-Urinfraktionen konnte für beide Untersuchungstage dementsprechend auch kein signifikanter Unterschied der D-Mannose-Konzentration zwischen den Einnahmegruppen ausgemacht werden.

In den wenigen vorhandenen Studien zum Nachweis von D-Mannose im Urin gab es erste Ergebnisse von *HARDING et al.* im Jahr 1933<sup>28</sup>. Hier wurde das Verhalten der Blutzuckerkurve nach Verabreichung von verschiedenen Kohlenhydraten untersucht. Mannose wurde in einer Dosis von 25 g oder 50 g verabreicht und konnte damals nicht im Blut nachgewiesen werden. Ein Anstieg des Blutzuckers wurde daraufhin jedoch

nicht festgestellt. Die Autoren erschlossen sich allerdings trotz des fehlenden Plasmanachweises eine Resorption, da sie geringe Mengen von Mannose im Urin fanden. Außerdem gingen sie davon aus, dass die Verwertung der Mannose mindestens gleich oder höher als ihre Absorptionsrate sein muss.

*WOOD* und *CAHILL* untersuchten 1963 die Verwertung von Mannose beim Menschen indem sie 0,5 g/kg KG intravenös verabreichten<sup>80</sup>. Es zeigte sich, dass der Prozentsatz der verabreichten Mannose, welcher mit dem Urin ausgeschieden wurde, relativ konstant war und im Mittel 20 % der infundierten Menge betrug. Der Anstieg der Blutplasma Spiegelkonzentration von Mannose war bei der parenteralen Applikation wesentlich höher im Vergleich zur enteralen Absorption. Dementsprechend wurden auch höhere Konzentrationen im Urin gefunden. Die intravenös verabreichte Mannose wurde proportional zur Glukose verstoffwechselt und zog keine Insulinausschüttung nach sich. Eine signifikante aktive Rückresorption durch die Niere konnte hierbei ebenfalls nicht festgestellt werden.

Neuere Untersuchungen hierzu gibt es von *GREMPER et al.* In der Studie konnte nachgewiesen werden, dass der sodium-glucose-linked-transporter-5 (SGLT-5) spezifisch in der Niere lokalisiert ist und als natriumabhängiger Monosaccharid-Transporter fungiert. Untersucht wurde die Substratspezifität des Transporters für die Monosaccharide Mannose, Fruktose, Glukose und Galaktose. Die höchste Affinität und entsprechende Transportrate konnte für Mannose nachgewiesen werden. Die Daten dieser Studie lassen vermuten, dass SGLT-5 als spezifischer Transporter in der Niere die Ausscheidung und Rückresorption von Mannose reguliert<sup>26</sup>.

Im Jahr 1997 untersuchten *ALTON et al.* die Mannosekonzentration im Blut bei unterschiedlicher oraler Dosierung von 0,07 g/kg KG bis 0,21 g/kg KG<sup>3</sup>. Abhängig von der Dosis wurde ein Konzentrationsmaximum nach ca. ein bis zwei Stunden registriert. Innerhalb von fünf bis sechs weiteren Stunden sank der Mannosespiegel im Blut wieder auf den Basalwert zurück. Die Halbwertszeit betrug dabei ca. vier Stunden. Die Ausscheidung im Urin wurde nicht untersucht.

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigten in der Verum-Gruppe für Phase I, Phase II als auch für die Zusammenlegung der beiden Phasen einen Anstieg der D-Mannose-Konzentration im Urin gegenüber der Baseline-Fraktion. Die höchste mediane Konzentration in Phase I wurde in Fraktion zwei gemessen. Bei der zweiten Phase lag

die maximale mediane Konzentration in Fraktion eins. Gegenüber der Placebo-Gruppe konnte mittels der MWS eine relevante Überlegenheit nachgewiesen werden.

Die oben beschriebenen Arbeiten sind mit den Ergebnissen dieser Studie nicht eins zu eins zu vergleichen. Entweder wurde die D-Mannose-Konzentration im Urin nicht exakt bestimmt oder die Dosierungen differierten ziemlich ausgeprägt. Auch die Applikationsform war nicht immer dieselbe. Die Ausscheidungskinetik scheint jedoch ähnlich, da innerhalb der ersten vier, bzw. ersten acht Stunden nach der Einnahme die höchste mediane Konzentration gemessen werden konnte. Vor allem bei der Darstellung der gepoolten Analyse konnte dieser Verlauf mit anschließend wieder abnehmender Konzentration gezeigt werden. Dieses Ergebnis war den Erwartungen entsprechend. Auffällig zeigte sich jedoch, dass die D-Mannose-Konzentrationen in den Urinfraktionen eins bis drei der vorliegenden Untersuchung auch in der Verum-Gruppe häufig unterhalb der unteren Nachweisgrenze lag. Für den ersten Beobachtungszeitraum waren dies im Verlauf der Fraktionen je vier, drei und sieben Probandinnen und für den zweiten Beobachtungszeitraum je vier, vier und acht Teilnehmerinnen. Diesbezüglich lässt sich diskutieren ob der von *GREMPLE* *et al.* untersuchte Mechanismus eine Rolle spielt <sup>26</sup>. Da der SGLT-5 spezifisch in der Niere lokalisiert wurde und die höchste Affinität zum Monosaccharid Mannose zeigte, könnte es zu einer erhöhten Rückresorption der Mannose gekommen sein <sup>26</sup>. Entsprechend wurde im ausgeschiedenen Urin weniger Mannose festgestellt. Weiterhin stellt sich die Frage, inwiefern die enterale Absorptionsrate von Bedeutung ist und ob bzw. wie hoch der Teil der Mannose ist, der durch den Stuhl ausgeschieden wird. Hier lässt sich diskutieren, ob es bereits intestinal zu einer Adhäsion der D-Mannose an UPECs kommt und dadurch bereits in die Pathogenese von HWI eingegriffen werden könnte. Interessant hierzu sind Untersuchungen die von *SHARMA et al.* durchgeführt wurden <sup>66</sup>. In einem Tiermodell konnte zumindest gezeigt werden, dass sich durch die Zugabe von D-Mannose zur Nahrung, das Darmmikrobiom verändern kann und es zu einer Zunahme von vermutlich präventiv tätigen Bakterien kommt. Die Studie wurde zwar nicht hinsichtlich Prävention von HWI betrachtet, jedoch könnte ein präventiv wirkendes Darmmikrobiom mit einer verringerten Anzahl von UPECs, im Sinne der beschriebenen Pathogenese, im längerfristigen Verlauf auch eine geringere Aszension von Uropathogenen bedeuten.

Der sekundäre Zielendpunkt war die *ex-vivo* gewonnenen Urinproben in einem *in-vitro* Adhäsionshemmungstest mit UPECs und Harnblasenepithelzellen zu testen um hierbei die antiadhäsiven Eigenschaften zwischen den Behandlungsgruppen zu vergleichen. Aufgrund der Ergebnisse der D-Mannose-Konzentrationen in den einzelnen Urinfraktionen erfolgte die Bewertung des Adhärenzassays durch Bildung von intraindividuellen Verhältnissen. Die Anzahl von KBE/Well nach der Behandlung zu den Werten der Anzahl von KBE/Well vor Einnahme des Prüfpräparats wurde betrachtet. Diese Verhältnisse stellten die Adhäsionshemmung dar und durch Clusterung der D-Mannose-Konzentration konnte hierbei ein eindeutiger Trend zu einer stärkeren Adhäsionshemmung bei höheren D-Mannose-Konzentrationen gezeigt werden.

Zur Vorbereitung auf diese Studie wurden *in-vitro* Messungen zur Adhäsionsverringerng bei verschiedenen D-Mannose-Konzentrationen durchgeführt. Die Urinproben der Probandinnen aus der hier vorliegenden Studie, welche für die Adhärenzversuche verwendet wurden, hatten eine D-Mannose-Konzentration von 22-23  $\mu\text{M}$ . Dieses Ergebnis liegt unterhalb der zuvor bestimmten Konzentrationen, welche für eine signifikante Adhäsionsverringerng benötigt wurden<sup>45</sup>. Bei der internen Kontrolle wurde die generelle Fähigkeit von D-Mannose, eine Adhäsion von Bakterien zu vermindern, ebenfalls bestätigt. Durch Bildung der intraindividuellen Verhältnisse zwischen den Nachbehandlungs-KBE/Well-Werten und den Ausgangs-KBE/Well-Werten sollte die Adhäsion dargestellt werden. Es wurde davon ausgegangen, dass die Adhäsion der Bakterien an die Zellen durch eine höhere D-Mannose-Konzentration herabgesetzt sei. Die Ergebnisse der Verhältnisse der KBE/Well-Werte wurden anhand ihrer Konzentration der D-Mannose in der jeweiligen Urinfraktion geclustert. Die zwei Cluster bestanden aus Konzentrationen  $> 0 - < 5 \mu\text{g/ml}$  sowie Konzentrationen  $\geq 5 \mu\text{g/ml}$ . Unterschieden wurde zusätzlich bei den verwendeten UPECs zwischen D-Mannose-sensitiven Stämmen und einem D-Mannose-resistenten Stamm. Insgesamt waren die Ergebnisse eher inkonstant und konnten nicht für jeden Behandlungstag vergleichbare Daten zeigen. Bei der Placebogruppe konnten nur Verhältnisse für das erste Cluster gebildet werden und der Median lag für beide Behandlungstage mit einer Ausnahme (*E. coli* CHD17, Phase I) über einem Wert von 100 %. Eine Tendenz zu konstanten Ergebnissen konnte innerhalb der Verum-Gruppe, jedoch nur für Phase I und das zweite Cluster sowie den D-Mannose sensitiven Stämmen, festgestellt werden. Im Mittel ließ sich hierbei ein Verhältnis von 0,83 ableiten, was eine mediane

Adhäsionsverringerng von 17 % bedeutet. Bei diesem zweiten Cluster lag die mittlere D-Mannose-Konzentration bei 11,87 µg/ml, entsprechend 66 µM und wurde lediglich durch drei Urinproben gebildet. Diese eindeutige Tendenz der Adhäsionsverringerng sollte ggf. durch eine höhere Anzahl von Proben weiter überprüft werden. Für den zweiten Beobachtungszeitraum konnten keine einheitlichen Ergebnisse festgestellt werden. Möglicherweise spielte hier eine höhere Konzentrierung der Baseline-Fraktion der zweiten Phase eine Rolle. Das Urinvolumen der zweiten Phase war im Vergleich zu Phase I geringer und der Urinkreatininwert im Vergleich erhöht. Zur besseren Übersicht sind die einzelnen Mittelwerte der Baseline-Urinfraktionen für beide Phasen an dieser Stelle nochmals gemeinsam dargestellt. Die Daten von Tabelle 26 lassen auf eine höhere Konzentrierung der zweiten Baseline-Urinfraktion schließen.

**Tab. 26: Zusammenfassende Übersicht der Mittelwerte der Urinvolumina [ml] und Kreatininwerte [mg/l] im Urin der Baseline-Fraktionen für alle Probandinnen**

	Phase I	Phase II
Urinvolumen [ml]	445,4	280,6
Urinkreatininwert [mg/l]	349,8	689,9

Hieraus ergibt sich ein höherer Harnstoff- und Salzgehalt mit einer erhöhten Osmolarität. Dies könnte die Adhäsion der Bakterien beeinflusst und herabgesetzt haben. In diesem Zusammenhang lässt sich auf mögliche Einflüsse der Expression von Typ-1-Pili eingehen. Die Expression variiert in Phasen, wobei reversibel eine Phase-ON mit Hochregulierung und Zunahme der Typ-1-Pili sowie eine Phase-OFF mit Herunterregulierung und Verlust der Typ-1-Pili unterschieden wird<sup>62</sup>. Das Umschalten der Phasen wird auch durch äußere Einflüsse bestimmt, wodurch sich Veränderungen in der Transkriptionsrate und der entsprechenden Regulierung der Typ-1-Pili ergeben. In anatomischen Regionen in denen es eine hohe Anzahl an Mannoserezeptoren gibt, findet in den UPEC-Zellen entsprechend der Pathogenese eine Hochregulierung der Typ-1-Pili statt<sup>62</sup>. Wenn nun in der Baseline-Urinfraktion von Phase II von einer erhöhten Osmolarität ausgegangen wird, würde dies in einer verminderten Expressionsrate der Typ-1-Pili münden. Untersuchungen hierzu zeigten zumindest, dass bei einer erhöhten Osmolarität die Expression in Richtung der Phase-OFF reguliert wird<sup>63</sup>. Das Resultat wäre eine Tendenz zum Verlust der Typ-1-Pili. Andererseits kann eine

erhöhte Salzkonzentration für die Epithelzellen zusätzlich auch toxisch gewirkt haben<sup>48</sup>. Zumindest war bei drei der Teilnehmerinnen die Baseline-Fraktion der zweiten Phase nicht auswertbar, da sich die Epithelzellen von den Wells abgelöst hatten. Letztlich resultierten durch diese beiden Tatsachen möglicherweise falsch niedrige KBE/Well-Werte in der Baseline-Fraktion der zweiten Phase, sodass es nur zu einer angeblichen Adhärenzzunahme in den zu vergleichenden Nachbehandlungsproben gekommen ist.

Die generelle Fähigkeit von D-Mannose zur Hemmung der Adhäsion wurde in verschiedenen Studien vorgestellt<sup>54, 59</sup>. In Tierversuchen bei Meerschweinchen zeigte selbst eine geringe Konzentration von  $< 20 \mu\text{g/ml}$  an freier Mannose im Urin eine Hemmung der Pili vermittelten bakteriellen Adhäsion an das Harnwegsepithel<sup>72</sup>.

Insgesamt gilt es sicherlich als generelles Problem inwiefern eine *in-vitro* Studie, in diesem Fall der Teil des Adhäsionsassays, auf die realistische Situation *in-vivo* übertragen werden kann. Beispielsweise wurden im Rahmen der Laborversuche nur die T24-Harnblasenepithelzellen als alleinige Zellart verwendet. Dabei handelt es sich um Tumorzellen, welche sich von der Oberflächenzusammensetzung her von einem Epithel, welches zu HWI neigt, unterscheiden kann. Zumindest zeigten Daten von *MAALOUF et.al*, dass der Mannosegehalt auf der Epitheloberfläche bei Blasentumorzellen im Vergleich zu Nicht-Tumorzellen erhöht ist. Folglich zeigten UPECs eine bevorzugte Bindung an Blasentumorzellen<sup>41</sup>. Die Tatsache, dass nur diese eine Zellart verwendet wurde und dass das Vorliegen eines Blasentumors im Kontext der Zielgruppe der 15 bis 35 jährigen Frauen unwahrscheinlich und nicht relevant ist, kann als Nachteil der Methodik angesehen werden. Wie im Methodenteil beschrieben wurden die Bakterien zwei Nächte vor Versuchsdurchführung bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  in künstlichem Urin kultiviert. Ziel hiervon war die Expression der Typ-1-Pili zu erhöhen. Hierbei lässt sich diskutieren, dass diese Tatsachen von der physiologischen Situation beim Menschen abweichen. Einerseits fehlen in künstlichem Urin antimikrobielle Substanzen wie Tamm-Horsfall Protein und andererseits werden gezielt Bedingungen geschaffen um die Expression der Typ-1-Pili zu erhöhen. Eine weitere Unterscheidung des Modells zur realistischen Situation bei der Bewertung der Adhäsionsversuche sollte auch der *in-vitro* fehlende Spüleffekt einnehmen, welcher *in-vivo* durch einen vermehrten Urinfluss gewährleistet wird und wodurch die Exfoliation des Urothels unterstützt wird. Letztlich wurden nur vier *E. coli* Stämme bei den Adhäsionsversuchen verwendet, sodass hier noch weitere aus dieser Gattung untersucht werden sollten. Allerdings wäre es im Verlauf sicher interessant auch weitere uropathogene Erreger und

ihr Adhäsionsverhalten bei der Verwendung von D-Mannose im Rahmen der Pathogenese von HWI zu erforschen. Zu nennen ist hier beispielsweise *K. pneumoniae*, welcher ebenfalls als Virulenzfaktor über Typ-1-Pili zur Adhäsion am Urothel verfügt. Insgesamt ist der Nutzen von D-Mannose zur Prophylaxe, als auch zum Teil zur Akuttherapie, von HWI in den vorangegangenen klinischen Studien nachgewiesen worden. Bei der Verwendung der D-Mannose zur therapeutischen Anwendung eines akuten Infekts wurde in der Initialphase allerdings ein anderes Dosierungsschema als in der vorliegenden Arbeit verwendet. Dies waren zu Beginn 3 g täglich, teilweise gefolgt von einer unterschiedlichen Erhaltungsdosis. Der Nutzen bei der Prophylaxe beruht ggf. auch auf der insgesamt längeren Einnahmedauer von teilweise bis zu einem halben Jahr wie bei *KRANJČEC et al.* Hierdurch könnte der Prozess der Etablierung einer Infektion bei Rezidiven durchbrochen werden, indem die Bildung von IBCs verhindert wird und sich somit auch keine intrazellulären Reservoirs in tieferen Zellschichten ausbilden können. *CUSUMANO et al.* konnten diese Tendenz in einem präklinischen Mausmodell bereits nachweisen<sup>13</sup>.

Abschließend ist zu sagen, dass sich das Nahrungsergänzungsmittel D-Mannose auch in dieser Studie als sicher und gut verträglich bewiesen hat. Die Kinetik der Ausscheidung im Urin nach oraler Einnahme von 2 g zeigte sich vor allem in den ersten vier bis acht Stunden danach erhöht. Dies spricht für die allgemeine Empfehlung der Einnahme vor dem zu Bett gehen. Damit kann sich, besonders in Phasen in denen keine Miktion und somit auch kein aktiver Spüleffekt stattfindet, die Mannose zur Prophylaxe im Urin anreichern.

In klinischen Studien wurde die Wirksamkeit von D-Mannose bei der Rezidivreduktion von HWI bereits teilweise überprüft. In der vorliegenden Arbeit sollte vorrangig die biologische Plausibilität einer oralen D-Mannose Einnahme untersucht werden, indem die ausgeschiedene Menge im Urin über einen Zeitraum von zwölf Stunden nach Einnahme in drei Fraktionen und an zwei aufeinander folgenden Tagen gemessen wurde und im Weiteren, ob im Anschluss eine relevante Adhäsionswirkung bei einem *in-vitro* Adhäsionsassay gesehen werden kann. Eine Adhäsionsverringerung zeigte sich nur in Tendenz bei wenigen Proben. Möglicherweise lässt sich der hier gewählte *in-vitro* Versuchsaufbau, trotz der *in-vivo* gewonnenen Urinproben, nicht vollkommen auf die reale Situation beim Menschen übertragen. Abschließend erscheint durch die

Einordnung der Ergebnisse die orale Einnahme von D-Mannose aber biologisch plausibel zu sein. Letztlich sollten weitere randomisiert kontrollierte Studien zu oral eingenommener D-Mannose zur Rezidivprophylaxe und im weiteren Verlauf auch zur Wirksamkeit in der Akutbehandlung von HWI durchgeführt werden. Dem Ziel durch alternative Behandlungsmöglichkeiten den Antibiotikaverbrauch zu senken, sollte weiterhin ein hoher Stellenwert eingeräumt werden.

## 5 Zusammenfassung

Harnwegsinfektionen (HWI) zählen zu den häufigsten bakteriellen Erkrankungen weltweit. Dabei unterscheidet sich die Geschlechterverteilung erheblich und es wird bei ca. 50 % aller Frauen einmal im Leben eine Zystitis diagnostiziert. Der häufigste Erreger von HWI ist *E. coli*. Häufig werden zur Therapie Antibiotika eingesetzt. Da weltweit zunehmende Resistenzraten von *E. coli* gegenüber häufig verwendeten Antibiotika zu beobachten sind, entsteht der Bedarf, alternative Behandlungsmöglichkeiten in der Prävention von HWI-Rezidiven zu etablieren. D-Mannose kann durch seine anti-adhäsiven Eigenschaften entscheidend in die Pathogenese bei HWI eingreifen und zeigte in klinischen Studien bereits vielversprechende Ergebnisse bei der Reduktion der Rezidivrate von HWI.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Bewertung und Quantifizierung der Ausscheidung von oral verabreichter D-Mannose über den Urin bei gesunden Frauen. Anschließend wurde *in-vitro* der Effekt der erhaltenen Urinproben auf die adhäsiven Eigenschaften von UPECs überprüft. Die Studie wurde randomisiert-, doppelblind- und Placebo-kontrolliert durchgeführt.

Der Urin von 25 Probandinnen wurde zwei Stunden vor und über einen Zeitraum von zwölf Stunden nach Einnahme des Prüfpräparats an zwei Tagen hintereinander in Fraktionen gesammelt. Es zeigte sich eine signifikant erhöhte D-Mannose-Konzentration im Urin der Verum-Gruppe verglichen mit Placebo. Jedoch variierten die Ergebnisse der einzelnen Probandinnen stark. Die Verträglichkeit der Einnahme, inklusive Verstoffwechslung, wurde als sicher und gut bewertet. Die Ergebnisse der Adhäsionsversuche zeigten sich uneinheitlich. Allerdings konnte in einer Bewertung eine konstante Tendenz zur Verringerung der bakteriellen Adhäsion an die verwendeten Urothelzellen gezeigt werden.

Abschließend lässt sich feststellen, dass die Ausscheidung von oral zugeführter D-Mannose in den ersten vier bis acht Stunden nach Einnahme im Urin erhöht war und sich die Durchführung der *in-vitro* Adhäsionsversuche vermutlich nicht vollkommen auf die *in-vivo* Situation übertragen lässt.

Zusammenfassend bestätigt die vorliegende Arbeit die biologische Plausibilität einer oralen D-Mannose Einnahme als alternative Behandlungsmethode bei HWI.

## 6 Summary

Urinary tract infections (UTIs) are among the most common bacterial diseases worldwide. The gender distribution differs considerably and around 50% of all women are diagnosed with cystitis at some point in their lives. The most common pathogen causing UTIs is *E. coli*. Antibiotics are often used for treatment. As resistance rates of *E. coli* to commonly used antibiotics are increasing worldwide, there is a need to establish alternative treatment options in the prevention of UTI recurrences. Due to its anti-adhesive properties, D-mannose can intervene decisively in the pathogenesis of UTIs and has already shown promising results in clinical studies in reducing the recurrence rate of UTIs.

The aim of the present study was to evaluate and quantify the excretion of orally administered D-mannose via urine in healthy women. Subsequently, the effect of the urine samples obtained on the adhesive properties of UPECs was tested *in vitro*. The study was randomized, double-blind and placebo-controlled.

The urine of 25 test subjects was collected in fractions two hours before and over a period of twelve hours after ingestion of the test preparation on two consecutive days. There was a significantly increased D-mannose concentration in the urine of the verum group compared to placebo. However, the results of the individual test subjects varied greatly. The tolerability of the intake, including metabolism, was assessed as safe and good. The results of the adhesion tests were inconsistent. However, one evaluation showed a constant tendency towards a reduction in bacterial adhesion to the urothelial cells used.

In conclusion, the excretion of orally administered D-mannose in the urine was increased in the first four to eight hours after ingestion and the performance of the *in-vitro* adhesion tests can probably not be fully transferred to the *in-vivo* situation.

In summary, the present study confirms the biological plausibility of oral D-mannose intake as an alternative therapeutic strategy for UTI.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
ABS	Antibiotic-Stewardship
ABU	asymptomatischen Bakteriurie
ACSS	Acute Cystitis Symptom Score
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
AKP	Arbeitskreis klinische Prüfungen GmbH in Freiburg
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen medizinischen Fachgesellschaften
BFS	Biomedizinischen Forschungszentrum Seltersberg
CAMHB	Cation-Adjusted Mueller–Hinton Broth
CI	Konfidenzintervall
CL	Konfidenzlevel
CRO	Contract Research Organisation
DART	Deutschen Antibiotika-Resistenzstrategie
DMSZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	Escherichia coli
E. faecalis	Enterococcus faecalis
E. faecium	Enterococcus faecium
ECA	Enterbacteriaceae-common-Antigen
EG	Europäischen Gemeinschaft
EMA	European Medicines Agency
ESIU	Europäische Sektion für Infektionen in der Urologie
ExPEC	extraintestinal pathogene Escherichia coli
FAS	Full Analysis Set

g	Gramm
GCP	Good Clinical Practice
GPIU	Global Prevalence Study of Infections in Urology
HPLC	high performance liquid chromatography
HWI	Harnwegsinfektion(en)
IBCs	intracellular bacterial communities
IME	Institut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie
K. pneumonia	Klebsiella pneumonia
KBE	Kolonie bildende Einheiten
Kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KKS	Koordinierungszentrum für Klinische Studien
LLOQ	lower limit of quantification
M.	Musculus
MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities
mg	Miligramm
ml	Mililiter
MOI	Multiplicity of Infection
MRSA	methicillinresistente <i>S. aureus</i>
MS	Massenspektrometrie
MWS	Mann-Whitney-Statistik
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
P. mirabilis	Proteus mirabilis
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
Pic	protein involved in intestinal colonization
QIRs	quiescent intracellular reservoirs
rHWI	rezidivierende Harnwegsinfektion(en)

S. aureus	Staphylococcus aureus
S. agalactiae	Streptococcus agalactiae
SAS	Safety Analysis Set
Sat	secreted autotransporter toxin
SD	Standardabweichung
SGLT-5	sodium-glucose-linked-transporter-5
SOFA	sequential organ failure assessment
Spp.	Spezies
SUEs	Schwerwiegende unerwünschte Ereignisse
TLR	Toll-like-Rezeptoren
TMP	Translationale Medizin und Pharmakologie
Tsh	temperature-sensitive hemagglutinin
UEs	Unerwünschte Ereignisse
UPEC	uropathogene E. coli
UTIs	Urinary tract infections
VRE	vancomycinresistenter Enterococcus
WAAAR	World Alliance Against Antibiotic Resistance
WHO	World Health Organisation
µg	Mikrogramm
µl	Mikroiliter
µM	Mikromolar

## 8 Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1: D-Mannose in der Fischer-Projektion. Das am weitesten von der Aldehydgruppe entfernte asymmetrische Kohlenstoffatom fünf hat die OH-Gruppe nach rechts (D).</b> .....	18
<b>Abb. 2: Etikett der Prüfpräparate (Verum und Placebo)</b> .....	32
<b>Abb. 3: Phase I: D-Mannose-Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>] - ohne Normierung im Zeitverlauf</b> .....	50
<b>Abb. 4: Phase I: D-Mannose-Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>] - mit Normierung im Zeitverlauf</b> .....	52
<b>Abb. 5: Phase II: D-Mannose-Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>] - ohne Normierung im Zeitverlauf</b> .....	55
<b>Abb. 6: Phase II: D-Mannose-Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>] - mit Normierung im Zeitverlauf</b> .....	57
<b>Abb. 7: Phase I und II gepoolt: D-Mannose-Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>] - ohne Normierung im Zeitverlauf</b> .....	59
<b>Abb. 8: Phase I und II gepoolt: D-Mannose-Konzentration [<math>\mu\text{g}/\text{ml}</math>] - mit Normierung im Zeitverlauf</b> .....	61

## 9 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1: Zeitplan des Studienablaufs beginnend mit der Aufnahmeperiode wie im „Clinical Study Protocol“ des Sponsors MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH festgehalten .....</b>	<b>33</b>
<b>Tab. 2: Übersicht über die verwendeten <i>E. coli</i> Stämme.....</b>	<b>36</b>
<b>Tab. 3: 24-Well Platte 1.....</b>	<b>37</b>
<b>Tab. 4: 24-Well Platte 2.....</b>	<b>37</b>
<b>Tab. 5: 24-Well Platte 3.....</b>	<b>37</b>
<b>Tab. 6: Alter, Körpergröße und Gewicht am Tag des Screenings.....</b>	<b>42</b>
<b>Tab. 7: Körpertemperatur, Herzfrequenz und Blutdruck am Tag des Screenings.....</b>	<b>42</b>
<b>Tab. 8: Acute cystitis symptom score.....</b>	<b>43</b>
<b>Tab. 9: Urinvolumina [ml] während der vordefinierten Fraktionen von Beobachtungszeitraum 1.....</b>	<b>44</b>
<b>Tab. 10: Kreatininwerte [mg/l] im Urin der vordefinierten Fraktionen von Beobachtungszeitraum 1.....</b>	<b>45</b>
<b>Tab. 11: Urinvolumina [ml] während der vordefinierten Fraktionen von Beobachtungszeitraum 2.....</b>	<b>46</b>
<b>Tab. 12: Kreatininwerte [mg/l] im Urin der vordefinierten Fraktionen von Beobachtungszeitraum 2.....</b>	<b>47</b>
<b>Tab. 13: Phase I: D-Mannose-Konzentration im Urin [<math>\mu\text{g/ml}</math>].....</b>	<b>49</b>
<b>Tab. 14: Phase I: D-Mannose-Konzentration im Urin [<math>\mu\text{g/ml}</math>] normiert auf Kreatinin im Urin.....</b>	<b>51</b>
<b>Tab. 15: Phase II: D-Mannose-Konzentration im Urin [<math>\mu\text{g/ml}</math>].....</b>	<b>53</b>
<b>Tab. 16: Phase II: D-Mannose-Konzentration im Urin [<math>\mu\text{g/ml}</math>] normiert auf Kreatinin im Urin.....</b>	<b>55</b>
<b>Tab. 17: Phase I und II gepoolt: D-Mannose-Konzentration im Urin [<math>\mu\text{g/ml}</math>].....</b>	<b>58</b>
<b>Tab. 18: Phase I und II gepoolt: D-Mannose-Konzentration im Urin [<math>\mu\text{g/ml}</math>] normiert auf Kreatinin im Urin .....</b>	<b>59</b>

<b>Tab. 19: Urinfraktionen der jeweiligen Probandinnen, welche für den Adhäsionshemmungstest verwendet wurden</b> .....	62
<b>Tab. 20: <i>E. coli</i> CHD22</b> .....	63
<b>Tab. 21: <i>E. coli</i> UTI89</b> .....	64
<b>Tab. 22: <i>E. coli</i> CHD94</b> .....	65
<b>Tab. 23: <i>E. coli</i> CHD17</b> .....	65
<b>Tab. 24: Adhäsionswirkung der D-Mannose sensitiven UPECs für Phase I und Cluster 2</b> .....	66
<b>Tab. 25: Bewertung der Verträglichkeit anhand einer VAS-Skala von 0 bis 10 ...</b>	68
<b>Tab. 26: Zusammenfassende Übersicht der Mittelwerte der Urinvolumina [ml] und Kreatininwerte [mg/l] im Urin der Baseline-Fraktionen für alle Probandinnen</b> .....	77

## 10 Literaturverzeichnis

1. Alidjanov J. F., Pilatz A., Abdufattaev U. A., Wiltink J., Weidner W., Naber K. G., Wagenlehner F. Neuer Fragebogen zur deutschen Validierung des „Acute Cystitis Symptom Score“. *Der Urologe*; 56: 364-366; 2017.
2. Alidjanov Jakhongir F., Overesch Andre, Abramov-Sommariva Dimitri, Hoeller Martina, Steindl Hubert, Wagenlehner Florian M., Naber Kurt G. Acute Cystitis Symptom Score questionnaire for measuring patient-reported outcomes in women with acute uncomplicated cystitis: Clinical validation as part of a phase III trial comparing antibiotic and nonantibiotic therapy. *Investig Clin Urol*; 61: 498-507; 2020.
3. Alton G., Kjaergaard S., Etchison J. R., Skovby F., Freeze H. H. Oral ingestion of mannose elevates blood mannose levels: a first step toward a potential therapy for carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *Biochem Mol Med*; 60: 127-133; 1997.
4. Aune A., Alraek T., LiHua H., Baerheim A. Acupuncture in the prophylaxis of recurrent lower urinary tract infection in adult women. *Scand J Prim Health Care*; 16: 37-39; 1998.
5. Baerheim A., Laerum E. Symptomatic lower urinary tract infection induced by cooling of the feet. A controlled experimental trial. *Scand J Prim Health Care*; 10: 157-160; 1992.
6. Bauer H. W., Rahlfs V. W., Lauener P. A., Blessmann G. S. Prevention of recurrent urinary tract infections with immuno-active E. coli fractions: a meta-analysis of five placebo-controlled double-blind studies. *Int J Antimicrob Agents*; 19: 451-456; 2002.
7. Beerepoot M. A., Geerlings S. E., van Haarst E. P., van Charante N. M., ter Riet G. Nonantibiotic prophylaxis for recurrent urinary tract infections: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Urol*; 190: 1981-1989; 2013.
8. Bonkat G., Bartoletti R.R., Bruyère, F. et. al. EAU Guidelines on Urological Infections Edn. *presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2020 ISBN 978-94-92671-07-3*
9. Bundesgesundheitsministerium. DART 2020 - Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier, [https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3\\_Downloads/D/DART\\_2020/BMG\\_DART\\_2020\\_Bericht\\_dt.pdf](https://www.bundesgesundheitsministerium.de/fileadmin/Dateien/3_Downloads/D/DART_2020/BMG_DART_2020_Bericht_dt.pdf) (Zugriff am 05.10.2022).
10. Carlet J., members of the Waaar. World alliance against antibiotic resistance: The WAAAR declaration against antibiotic resistance. *Med Intensiva*; 39: 34-39; 2015.
11. Chen S. L., Hung C. S., Pinkner J. S., Walker J. N., Cusumano C. K., Li Z., Bouckaert J., Gordon J. I., Hultgren S. J. Positive selection identifies an in vivo role for FimH during urinary tract infection in addition to mannose binding. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 106: 22439-22444; 2009.
12. Colditz G. A., Miller J. N., Mosteller F. Measuring gain in the evaluation of medical technology. The probability of a better outcome. *Int J Technol Assess Health Care*; 4: 637-642; 1988.

13. Cusumano C. K., Pinkner J. S., Han Z., Greene S. E., Ford B. A., Crowley J. R., Henderson J. P., Janetka J. W., Hultgren S. J. Treatment and prevention of urinary tract infection with orally active FimH inhibitors. *Sci Transl Med*; 3: 109ra115; 2011.
14. de With K., Kern W. Leitlinienprogramm DGI: Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Strategien zur Sicherung rationaler Antibiotika-Anwendung im Krankenhaus. Langversion, AWMF Registernummer 092/001 – update 2018, [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/092-0011\\_S3\\_Strategien-zur-Sicherung-rationaler-Antibiotika-Anwendung-im-Krankenhaus\\_2020-02.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/092-0011_S3_Strategien-zur-Sicherung-rationaler-Antibiotika-Anwendung-im-Krankenhaus_2020-02.pdf) (Zugriff am: 05.10.2022).
15. Domenici L., Monti M., Bracchi C., Giorgini M., Colagiovanni V., Muzii L., Benedetti Panici P. D-mannose: a promising support for acute urinary tract infections in women. A pilot study. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*; 20: 2920-2925; 2016.
16. EMA. Ausschuss für Humanarzneimittel. Leitfaden zur Validierung bioanalytischer Methoden. 21 July 2011. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009 Rev. 1 Corr. 2
17. Eto D. S., Jones T. A., Sundsbak J. L., Mulvey M. A. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. *PLoS Pathog*; 3: e100; 2007.
18. Fassel D., Wagenlehner F. [What to do about recurrent urinary tract infections]. *Aktuelle Urol*: 2021.
19. Fihn S. D. Clinical practice. Acute uncomplicated urinary tract infection in women. *N Engl J Med*; 349: 259-266; 2003.
20. Flores-Mireles A. L., Walker J. N., Caparon M., Hultgren S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol*; 13: 269-284; 2015.
21. Garenaux A., Caza M., Dozois C. M. The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic Escherichia coli. *Vet Microbiol*; 153: 89-98; 2011.
22. Geisel J. Formeln und Scores, [https://www.uniklinikum-saarland.de/de/einrichtungen/kliniken\\_institute/zentrallabor/formeln\\_und\\_scores/kreatin\\_in\\_clearance](https://www.uniklinikum-saarland.de/de/einrichtungen/kliniken_institute/zentrallabor/formeln_und_scores/kreatin_in_clearance) (Zugriff am 20.08.2022). *Universitätsklinikum des Saarlandes und Medizinische Fakultät der Universität des Saarlandes*.
23. Giesen L. G., Cousins G., Dimitrov B. D., van de Laar F. A., Fahey T. Predicting acute uncomplicated urinary tract infection in women: a systematic review of the diagnostic accuracy of symptoms and signs. *BMC Fam Pract*; 11: 78; 2010.
24. Godaly G., Ambite I., Svanborg C. Innate immunity and genetic determinants of urinary tract infection susceptibility. *Curr Opin Infect Dis*; 28: 88-96; 2015.
25. Goff D. A., Kullar R., Goldstein E. J. C., Gilchrist M., Nathwani D., Cheng A. C., Cairns K. A., Escandon-Vargas K., Villegas M. V., Brink A., van den Bergh D., Mendelson M. A global call from five countries to collaborate in antibiotic stewardship: united we succeed, divided we might fail. *Lancet Infect Dis*; 17: e56-e63; 2017.
26. Grempler R., Augustin R., Froehner S., Hildebrandt T., Simon E., Mark M., Eickelmann P. Functional characterisation of human SGLT-5 as a novel kidney-specific sodium-dependent sugar transporter. *FEBS Lett*; 586: 248-253; 2012.
27. Hannan T. J., Totsika M., Mansfield K. J., Moore K. H., Schembri M. A., Hultgren S. J. Host-pathogen checkpoints and population bottlenecks in persistent and

- intracellular uropathogenic *Escherichia coli* bladder infection. *FEMS Microbiol Rev*; 36: 616-648; 2012.
28. Harding V. J., Nicholson T. F., Armstrong A. R. Cutaneous blood-sugar curves after the administration of fructose, mannose and xylose. *Biochem J*; 27: 2035-2042; 1933.
29. Hautmann R., Gschwend J. E. Urologie. 5. Auflage. Berlin: *Springer* 2014.
30. Herold G. Innere Medizin 2016. Köln: *Gerd Herold Verlag* 2016, pp 621-627.
31. Hof H., Dörries R. Duale Reihe Medizinische Mikrobiologie. 5. vollständig überarbeitete. Auflage. Stuttgart: *Georg Thieme Verlag* 2014.
32. Hooton T. M., Vecchio M., Iroz A., Tack I., Dornic Q., Seksek I., Lotan Y. Effect of Increased Daily Water Intake in Premenopausal Women With Recurrent Urinary Tract Infections: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Intern Med*; 178: 1509-1515; 2018.
33. Hung C. S., Bouckaert J., Hung D., Pinkner J., Widberg C., DeFusco A., Auguste C. G., Strouse R., Langermann S., Waksman G., Hultgren S. J. Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol*; 44: 903-915; 2002.
34. ICH. Medizinisches Wörterbuch für Aktivitäten im Rahmen der Arzneimittelzulassung (MedDRA®). Leitfaden MedDRA Version 23.0. 2020.
35. Kontiokari T., Laitinen J., Jarvi L., Pokka T., Sundqvist K., Uhari M. Dietary factors protecting women from urinary tract infection. *Am J Clin Nutr*; 77: 600-604; 2003.
36. Kranjcec B., Papes D., Altarac S. D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: a randomized clinical trial. *World J Urol*; 32: 79-84; 2014.
37. Lane M. C., Mobley H. L. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int*; 72: 19-25; 2007.
38. Lange S., Bender R. [Median or mean?]. *Dtsch Med Wochenschr*; 132 Suppl 1: e1-2; 2007.
39. Loose M. Wagenlehner F. MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH. Report: In vitro D-mannose-binding Study (report no.: URI2021001). Gießen 2021.
40. Lüllmann-Rauch R. Taschenlehrbuch Histologie. 4. Auflage. Stuttgart: *Georg Thieme Verlag*; 108-109, 486-487; 2012.
41. Maalouf N., Gur C., Yutkin V., Scaiewicz V., Mandelboim O., Bachrach G. High mannose level in bladder cancer enhances type 1 fimbria-mediated attachment of uropathogenic *E. coli*. *Front Cell Infect Microbiol*; 12: 968739; 2022.
42. Magistro G., Marcon J., Beck V., Herlemann A., Stief C. G., Gratzke C. [Current Aspects on the Pathogenesis of Urinary Tract Infections]. *Aktuelle Urol*; 47: 203-209; 2016.
43. Mandal P., Kapil A., Goswami K., Das B., Dwivedi S. N. Uropathogenic *Escherichia coli* causing urinary tract infections. *Indian J Med Res*; 114: 207-211; 2001.
44. McLaughlin S. P., Carson C. C. Urinary tract infections in women. *Med Clin North Am*; 88: 417-429; 2004.

45. MCM. Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH. Clinical Study Report: MCMK0119. Köln 2022.
46. MCM. Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH. Study protocol: MCMK0119. Köln 2019.
47. Mehta I., Zimmern P., Reitzer L. Enzymatic assay of D-mannose from urine. *Bioanalysis*; 10: 1947-1954; 2018.
48. Michea L., Ferguson D. R., Peters E. M., Andrews P. M., Kirby M. R., Burg M. B. Cell cycle delay and apoptosis are induced by high salt and urea in renal medullary cells. *Am J Physiol Renal Physiol*; 278: F209-218; 2000.
49. Mossman K. L., Mian M. F., Lauzon N. M., Gyles C. L., Lichty B., Mackenzie R., Gill N., Ashkar A. A. Cutting edge: FimH adhesin of type 1 fimbriae is a novel TLR4 ligand. *J Immunol*; 181: 6702-6706; 2008.
50. Mosteller R. D. Simplified calculation of body-surface area. *N Engl J Med*; 317: 1098; 1987.
51. Naber K. G., Cho Y. H., Matsumoto T., Schaeffer A. J. Immunoactive prophylaxis of recurrent urinary tract infections: a meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*; 33: 111-119; 2009.
52. Nicolle L. E., Bradley S., Colgan R., Rice J. C., Schaeffer A., Hooton T. M., Infectious Diseases Society of America, American Society of Nephrology, American Geriatric Society. Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis*; 40: 643-654; 2005.
53. Nielubowicz G. R., Mobley H. L. Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol*; 7: 430-441; 2010.
54. Ofek I., Mirelman D., Sharon N. Adherence of *Escherichia coli* to human mucosal cells mediated by mannose receptors. *Nature*; 265: 623-625; 1977.
55. Phe V., Pakzad M., Haslam C., Gonzales G., Curtis C., Porter B., Chataway J., Panicker J. N. Open label feasibility study evaluating D-mannose combined with home-based monitoring of suspected urinary tract infections in patients with multiple sclerosis. *Neurourol Urodyn*; 36: 1770-1775; 2017.
56. Porru D, Parmigiani A, Tinelli C, Barletta D, Choussos D, Di Franco C, Bobbi V, Bassi S, Miller O, Gardella B, Nappi RE, Spinillo A, Rovereto B. Oral D-mannose in recurrent urinary tract infections in women: a pilot study. *Journal of Clinical Urology*; 7: 208-213; 2014.
57. Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R. Duale Reihe Biochemie. 3. Auflage. Stuttgart: *Georg Thieme Verlag*; 34-39; 2012.
58. Schaeffer A. J., Amundsen S. K., Jones J. M. Effect of carbohydrates on adherence of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect Immun*; 30: 531-537; 1980.
59. Schaeffer A. J., Amundsen S. K., Schmidt L. N. Adherence of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect Immun*; 24: 753-759; 1979.
60. Scholes D., Hooton T. M., Roberts P. L., Stapleton A. E., Gupta K., Stamm W. E. Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. *J Infect Dis*; 182: 1177-1182; 2000.

61. Schünke M., Schulte E., Schumacher U., Voll M., Wesker K. Prometheus Lernatlas der Anatomie - Innere Organe. 3. Auflage. Stuttgart: *Georg Thieme Verlag*; 294-295; 2012.
62. Schwan W. R. Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J Clin Infect Dis*; 1: 17-25; 2011.
63. Schwan W. R., Lee J. L., Lenard F. A., Matthews B. T., Beck M. T. Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*; 70: 1391-1402; 2002.
64. Selbmann H. K., Meisner C. Wie beurteilt man die Qualität klinisch-therapeutischer Studien? *Der Anaesthesist*; 49: 738-742; 2000.
65. Shallcross L. J., Davies S. C. The World Health Assembly resolution on antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*; 69: 2883-2885; 2014.
66. Sharma V., Smolin J., Nayak J., Ayala J. E., Scott D. A., Peterson S. N., Freeze H. H. Mannose Alters Gut Microbiome, Prevents Diet-Induced Obesity, and Improves Host Metabolism. *Cell Rep*; 24: 3087-3098; 2018.
67. Singer M., Deutschman C. S., Seymour C. W., Shankar-Hari M., Annane D., Bauer M., Bellomo R., Bernard G. R., Chiche J. D., Coopersmith C. M., Hotchkiss R. S., Levy M. M., Marshall J. C., Martin G. S., Opal S. M., Rubenfeld G. D., van der Poll T., Vincent J. L., Angus D. C. The Third International Consensus Definitions for Sepsis and Septic Shock (Sepsis-3). *JAMA*; 315: 801-810; 2016.
68. Sivick K. E., Mobley H. L. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect Immun*; 78: 568-585; 2010.
69. Song J., Abraham S. N. TLR-mediated immune responses in the urinary tract. *Curr Opin Microbiol*; 11: 66-73; 2008.
70. Stickler D. J., Morris N. S., Winters C. Simple physical model to study formation and physiology of biofilms on urethral catheters. *Methods Enzymol*; 310: 494-501; 1999.
71. Tandogdu Z., Cek M., Wagenlehner F., Naber K., Tenke P., van Ostrum E., Johansen T. B. Resistance patterns of nosocomial urinary tract infections in urology departments: 8-year results of the global prevalence of infections in urology study. *World J Urol*; 32: 791-801; 2014.
72. Toyota S., Fukushi Y., Katoh S., Orikasa S., Suzuki Y. [Anti-bacterial defense mechanism of the urinary bladder. Role of mannose in urine]. *Nihon Hinyokika Gakkai Zasshi*; 80: 1816-1823; 1989.
73. Vahlensieck W., Bauer H. W., Piechota H. J., Ludwig M., Wagenlehner F. [Prophylaxis of recurrent urinary tract infections]. *Urologe A*; 53: 1468-1475; 2014.
74. Wagenlehner F., Lorenz H., Ewald O., Gerke P. Why d-Mannose May Be as Efficient as Antibiotics in the Treatment of Acute Uncomplicated Lower Urinary Tract Infections-Preliminary Considerations and Conclusions from a Non-Interventional Study. *Antibiotics (Basel)*; 11: 2022.
75. Wagenlehner F. M., Abramov-Sommariva D., Holler M., Steindl H., Naber K. G. Non-Antibiotic Herbal Therapy (BNO 1045) versus Antibiotic Therapy (Fosfomycin Trometamol) for the Treatment of Acute Lower Uncomplicated Urinary Tract Infections in Women: A Double-Blind, Parallel-Group, Randomized, Multicentre, Non-Inferiority Phase III Trial. *Urol Int*; 101: 327-336; 2018.

76. Wagenlehner F. M., Pilatz A., Naber K., Weidner W. [Urinary tract infections]. *Aktuelle Urol*; 45: 135-145; quiz 146; 2014.
77. Wagenlehner F. M., Pilatz A., Weidner W., Magistro G. [Antibiotic resistance and their significance in urogenital infections: new aspects]. *Urologe A*; 53: 1452-1457; 2014.
78. Wagenlehner F. M., Schmiemann G. Leitlinienprogramm DGU: Interdisziplinäre S3 Leitlinie: Epidemiologie, Diagnostik, Therapie, Prävention und Management unkomplizierter, bakterieller, ambulant erworbener Harnwegsinfektionen bei erwachsenen Patienten. Langversion 1.1-2, 2017 AWMF Registernummer: 043/044, [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043044l\\_S3\\_Harnwegsinfektionen.pdf](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043044l_S3_Harnwegsinfektionen.pdf) (Zugriff am: 17.02.21).
79. Wellens A., Garofalo C., Nguyen H., Van Gerven N., Slattegard R., Hernalsteens J. P., Wyns L., Oscarson S., De Greve H., Hultgren S., Bouckaert J. Intervening with urinary tract infections using anti-adhesives based on the crystal structure of the FimH-oligomannose-3 complex. *PLoS One*; 3: e2040; 2008.
80. Wood F. C., Jr., Cahill G. F., Jr. Mannose Utilization in Man. *J Clin Invest*; 42: 1300-1312; 1963.
81. Zhou B., Xiao J. F., Tuli L., Ransom H. W. LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst*; 8: 470-481; 2012.
82. Zhou G., Mo W. J., Sebbel P., Min G., Neubert T. A., Glockshuber R., Wu X. R., Sun T. T., Kong X. P. Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci*; 114: 4095-4103; 2001.

# 11 Anhang

## 11.1 Votum Ethik-Kommission

JUSTUS-LIEBIG



UNIVERSITÄT  
GIESSEN

FACHBEREICH 11

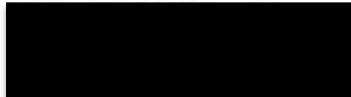


MEDIZIN

Ethik-Kommission, Klinikstr. 29 (Alte Chirurgie), D-35385 Gießen

Prof. Dr. Florian Wagenlehner  
Poliklinik und Klinik für Urologie, Kinderurologie und  
Andrologie  
Klinikstr. 33  
35385 Gießen

nachr.:



**ETHIK-KOMMISSION**  
des FB Medizin

Vorsitzender: Prof. Dr. H. Tillmanns

Klinikstr. 29 (Alte Chirurgie)  
D -35385 Gießen

Tel.: (0641)99-42470

Fax: (0641)99-42479

E-Mail: [ethik.kommission@pharma.med.uni-giessen.de](mailto:ethik.kommission@pharma.med.uni-giessen.de)

Gießen, den 5. März 2020

Dr. Kr./

**Votum der Ethik-Kommission AZ 214/19**

Sehr geehrter Herr Prof.Dr. Wagenlehner,

das Projekt [AZ 214/19: *Assessment of the urinary excretion of a D-mannose food supplement in healthy women with a subsequent in vitro evaluation of the effect of the obtained urine samples on adhesive properties of UPECs - Prospective, single center, double-blind, randomized, placebo-controlled study. Studiencode: MCMK0119*] wurde in der Sitzung der Ethikkommission am 28.11.19 begutachtet (Vortrag Herr Prof. Dr. Florian Wagenlehner).

Mit Schreiben vom 14.Januar 2020 erhielten Sie das Votum mit Kritikpunkten bezüglich der Patienteninformation und -Einwilligung.

Mit email vom 05.03.2020 sandte uns die Fa. AKP die revidierte Fassung der Patienteninformation und -Einwilligungserklärung V 1.1 vom 12.02.2020. Mit gleichem Schreiben wurden die finale Bestätigung über die Probandenversicherung (AXA Police-Nr. 50224001213 sowie die neuen Versicherungsbedingungen eingereicht.

Nach Durchsicht der Unterlagen bestehen seitens der Ethikkommission nunmehr keine Einwände gegen die Durchführung. Wir wünschen gutes Gelingen und bitten um Zusendung eines Abschlußberichtes zu gegebener Zeit..

Mit freundlichen Grüßen

Prof. Dr. H. Tillmanns  
Vorsitzender der Ethik-Kommission

## 11.2 Einwilligungserklärung

Einwilligungserklärung

Prüfplancode: MCMK0119

**Prüfstelle:** Klinik und Poliklinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie  
Rudolf-Buchheim-Straße 7  
35392 Gießen  
Tel.: +49 641 98544501

**Prüfer:** Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner

**Eine prospektive, monozentrische, doppelblinde, randomisierte, Placebo-kontrollierte Studie zur Erfassung der Ausscheidung eines D-Mannose-enthaltenden Nahrungsergänzungsmittel über den Urin in gesunden Frauen mit anschließender in vitro Evaluierung des Effekts der erhaltenen Urinproben auf die adhäsiven Eigenschaften von UPECs**

**Prüfplancode: MCMK0119**

### Einwilligungserklärung

.....  
Name der Probandin in Druckbuchstaben

geb. am .....

Teilnehmer-Nr. ....

Ich bin in einem persönlichen Gespräch durch den Prüfer

.....  
Name des Prüfers

ausführlich und verständlich über das Prüfpräparat sowie über Wesen, Bedeutung, Risiken und Tragweite der Studie aufgeklärt worden. Ich habe darüber hinaus den Text der Probandeninformation sowie die hier nachfolgend abgedruckte Datenschutzerklärung gelesen und verstanden. Ich hatte die Gelegenheit, mit dem Prüfer über die Durchführung der Studie zu sprechen. Alle meine Fragen wurden zufrieden stellend beantwortet.

Möglichkeit zur Dokumentation zusätzlicher Fragen seitens der Probandin oder sonstiger Aspekte des Aufklärungsgesprächs:

---

---

---

---

---

Ich hatte ausreichend Zeit, mich zu entscheiden.

Mir ist bekannt, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen meine Einwilligung zur Teilnahme an der Studie zurückziehen kann (mündlich oder schriftlich), ohne dass mir irgendwelche Nachteile entstehen.

**Hiermit möchten wir Sie über die in der Datenschutz-Grundverordnung (= DS-GVO) festgelegten Rechte informieren (Artikel 12 ff. DS-GVO):**

**Rechtsgrundlage**

Die Rechtsgrundlage zur Verarbeitung der Sie betreffenden personenbezogenen Daten bilden bei klinischen Studien (einschließlich klinischer Prüfungen) Ihre freiwillige schriftliche Einwilligung gemäß DS-GVO sowie der Deklaration von Helsinki (Erklärung des Weltärztebundes zu den ethischen Grundsätzen für die medizinische Forschung am Menschen) und der Leitlinie für Gute Klinische Praxis.

**Bezüglich Ihrer Daten haben Sie folgende Rechte (Artikel 13 ff. DS-GVO):**

**Recht auf Auskunft**

Sie haben das Recht auf Auskunft über die Sie betreffenden personenbezogenen Daten, die im Rahmen der klinischen Studie erhoben, verarbeitet oder ggf. an Dritte übermittelt werden (Aushändigen einer *kostenfreien* Kopie) (Artikel 15 DS-GVO).

**Recht auf Berichtigung**

Sie haben das Recht Sie betreffende unrichtige personenbezogene Daten berichtigen zu lassen (Artikel 16 und 19 DS-GVO).

**Recht auf Löschung**

Sie haben das Recht auf Löschung Sie betreffender personenbezogener Daten, z.B. wenn diese Daten für den Zweck, für den sie erhoben wurden, nicht mehr notwendig sind oder Sie Ihre Einwilligung widerrufen, auf die sich die Verarbeitung Ihrer Daten stützt. Die Rechtmäßigkeit der aufgrund der Einwilligung bis zum Widerruf erfolgten Verarbeitung wird hiervon nicht berührt." (Artikel 7, 17 und 19 DS-GVO).

**Recht auf Einschränkung der Verarbeitung**

Unter bestimmten Voraussetzungen haben Sie das Recht, die Einschränkung der Verarbeitung zu verlangen, d.h. die Daten dürfen nur gespeichert, aber nicht verarbeitet werden. Dies müssen Sie beantragen. Wenden Sie sich hierzu bitte an Ihren Prüfer oder an den Datenschutzbeauftragten des Prüfzentrums (Artikel 18 und 19 DS-GVO).

**Im Falle der Berichtigung, Löschung, Einschränkung der Verarbeitung** werden zudem all jene benachrichtigt, die Ihre Daten erhalten haben (Artikel 17 Absatz 2 und Artikel 19 DS-GVO).

**Recht auf Datenübertragbarkeit**

Sie haben das Recht, die Sie betreffenden personenbezogenen Daten, die Sie dem Verantwortlichen für die klinische Studie bereitgestellt haben, zu erhalten. Damit können Sie beantragen, dass diese Daten entweder Ihnen oder, soweit technisch möglich, einer anderen von Ihnen benannten Stelle übermittelt werden (Artikel 20 DS-GVO).

**Widerspruchsrecht**

Sie haben das Recht, bei Vorliegen von Gründen, die sich aus Ihrer besonderen Situation ergeben, jederzeit gegen konkrete Entscheidungen oder Maßnahmen zur Verarbeitung der Sie betreffenden personenbezogenen Daten Widerspruch einzulegen (Artikel 21 DS-GVO). Eine solche Verarbeitung findet anschließend grundsätzlich nicht mehr statt.

**Einwilligung zur Verarbeitung personenbezogener Daten und Recht auf Widerruf dieser Einwilligung**

Die Verarbeitung Ihrer personenbezogenen Daten ist mit Ihrer Einwilligung rechtmäßig (Artikel 6 DS-GVO). Sie haben das Recht, Ihre Einwilligung zur Verarbeitung personenbezogener Daten jederzeit zu widerrufen. Die Rechtmäßigkeit der aufgrund der Einwilligung bis zum Widerruf erfolgten Verarbeitung wird hiervon nicht berührt (Artikel 7 Absatz 3 DS-GVO).

**Benachrichtigung bei Verletzung des Schutzes personenbezogener Daten („Datenschutzpannen“)**

Hat eine Verletzung des Schutzes personenbezogener Daten voraussichtlich ein hohes Risiko für Ihre persönlichen Rechte und Freiheiten zur Folge, so werden Sie unverzüglich benachrichtigt (Artikel 34 DS-GVO).

**Möchten Sie eines dieser Rechte in Anspruch nehmen, wenden Sie sich bitte an** Ihren Prüfer oder an den Datenschutzbeauftragten Ihres Prüfzentrums. Außerdem haben Sie das **Recht, Beschwerde bei der/den Aufsichtsbehörde/n einzulegen**, wenn Sie der Ansicht sind, dass die Verarbeitung der Sie betreffenden personenbezogenen Daten gegen die DS-GVO verstößt (**siehe Kontaktdaten**).

**Kontaktdaten****Datenschutz: Kontaktdaten Prüfzentrum**

Datenschutzbeauftragte/r		Datenschutz-Aufsichtsbehörde	
ggf. Name:	Datenschutzbeauftragter der Justus-Liebig Universität Gießen	Name:	Der Hessische Datenschutzbeauftragte
Adresse:	Ludwigstraße 23 35390 Gießen	Adresse:	Gustav-Stresemann-Ring 1 65189 Wiesbaden
Telefon:	0641-99 12230	Telefon:	0611-140 80
E-Mail:	datenschutz@uni-giessen.de	E-Mail:	poststelle@datenschutz.hessen.de

**Datenschutz: Kontaktdaten des Sponsors/der Studienleitung der Studie**

Datenschutzbeauftragte/r		Datenschutz-Aufsichtsbehörde	
Name:	[REDACTED]	Name:	Landesbeauftragte für Datenschutz und Informationsfreiheit Nordrhein-Westfalen
Adresse:	[REDACTED]	Adresse:	[REDACTED]
Telefon:	[REDACTED]	Telefon:	[REDACTED]
E-Mail:	[REDACTED]	E-Mail:	[REDACTED]

Für die Datenverarbeitung Verantwortliche/r	
ggf. Name	MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH
Adresse:	Gereonsmühlengasse 1-11 50670 Köln
Telefon:	[REDACTED]
E-Mail	[REDACTED]

**Datenschutz:**

Mir ist bekannt, dass bei dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere medizinische Befunde über mich erhoben, gespeichert und ausgewertet werden sollen. Die Verwendung der Daten erfolgt nach gesetzlichen Bestimmungen und setzt vor der Teilnahme an der Studie folgende freiwillig abgegebene Einwilligungserklärung voraus, das heißt ohne die nachfolgende Einwilligung kann ich nicht an der Studie teilnehmen.

1. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass im Rahmen dieser Studie personenbezogene Daten, insbesondere Angaben über meine Gesundheit und meine ethnische Herkunft, über mich erhoben und in Papierform sowie auf elektronischen Datenträgern bei dem mich behandelnden Arzt aufgezeichnet werden. Soweit erforderlich, dürfen die erhobenen Daten pseudonymisiert (verschlüsselt) weitergegeben werden:
  - a) an MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH, Gereonsmühlengasse 1-11, 50670 Köln, den Sponsor oder eine von diesem beauftragte Stelle zum Zwecke der wissenschaftlichen Auswertung,
  - b) im Falle eines Antrags auf Zulassung: an den Antragsteller und die für die Zulassung zuständige Behörde Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte,
  - c) im Falle unerwünschter Ereignisse: MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH (*Sponsor*), an die jeweils zuständige Ethik-Kommission und die zuständige Bundesoberbehörde (Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte), sowie von dieser an die Europäische Datenbank.
2. Außerdem erkläre ich mich damit einverstanden, dass autorisierte und zur Verschwiegenheit verpflichtete Beauftragte des Sponsors sowie die zuständigen Überwachungsbehörden in meine beim Prüfer vorhandenen personenbezogenen Daten, insbesondere meine Gesundheitsdaten,

Einsicht nehmen, soweit dies für die Überprüfung der ordnungsgemäßen Durchführung der Studie notwendig ist. Für diese Maßnahme entbinde ich den Prüfer von der ärztlichen Schweigepflicht.

3. Ich erkläre mich damit einverstanden, dass meine Daten nach Beendigung oder Abbruch der Studie mindestens zehn Jahre aufbewahrt werden. Die Speicherung der pseudonymisierten Daten erfolgt bei der an MCM Klosterfrau Vertriebsgesellschaft mbH (Gereonsmühlengasse 1-11, 50670 Köln). Danach werden meine personenbezogenen Daten gelöscht, soweit nicht gesetzliche, satzungsmäßige oder vertragliche Aufbewahrungsfristen entgegenstehen.
4. Des Weiteren erkläre ich mein Einverständnis für die Weitergabe der erhobenen Daten in anonymisierter Form zur wissenschaftlichen Veröffentlichung der Forschungsergebnisse unter Beachtung der datenschutzrechtlichen Bestimmungen.
5. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit und ohne Angabe von Gründen die Teilnahme an der Studie und meine Zustimmung zur Verwendung meiner Daten, gegenüber der oben genannten Klinik beenden kann, ohne dass mir dadurch Nachteile entstehen. Ein Widerruf hat keinen Einfluss auf meine etwaige weitere ärztliche Behandlung.
6. Im Falle des Widerrufs kann ich entscheiden, ob meine bereits erhobenen Daten gelöscht werden müssen, oder in anonymisierter Form weiterverwendet werden dürfen, sofern gesetzliche Bestimmungen einer Löschung meiner Daten nicht entgegenstehen.  
Ich bin mir bewusst, dass im Falle einer anonymisierten Speicherung meiner Daten deren Löschung auf meinen Wunsch nicht möglich ist.
7. Ich bin darüber aufgeklärt worden, dass ich jederzeit die Teilnahme an der Studie beenden kann. Die Einwilligung zur Erhebung und Verarbeitung meiner personenbezogenen Daten, insbesondere der Angaben über meine Gesundheit, ist jedoch unwiderruflich. Ich weiß, dass im Falle eines Widerrufs zur Teilnahme an der Studie die bis zu diesem Zeitpunkt gespeicherten Daten weiterhin verwendet werden dürfen, soweit dies erforderlich ist, um
  - a) Wirkungen der zu prüfenden Substanz festzustellen,
  - b) sicherzustellen, dass meine schutzwürdigen Interessen nicht beeinträchtigt werden,
  - c) der Pflicht zur Vorlage vollständiger Zulassungsunterlagen zu genügen.
8. Durch den Widerruf der Einwilligung wird die Rechtmäßigkeit der aufgrund der Einwilligung bis zum Widerruf erfolgten Verarbeitung nicht berührt. D.h., dass die Datenverarbeitung bis zu einem Widerruf rechtmäßig bleibt.
9. Ich bin über folgende gesetzliche Regelung informiert: Falls ich meine Einwilligung, an der Studie teilzunehmen, widerrufe, müssen alle Stellen, die meine personenbezogenen Daten, insbesondere Gesundheitsdaten, gespeichert haben, unverzüglich prüfen, inwieweit die gespeicherten Daten für die in Nr. 7 a) bis c) genannten Zwecke noch erforderlich sind. Nicht mehr benötigte Daten sind unverzüglich zu löschen.
10. Ich bin damit einverstanden, dass Gesundheitsdaten bei mitbehandelnden Ärzten erhoben oder eingesehen werden, soweit dies für die ordnungsgemäße Durchführung und Überwachung der Studie notwendig ist. Insoweit entbinde ich diese Ärzte von der Schweigepflicht.

Ich wurde über meine Datenschutzrechte informiert und habe die datenschutzrechtlichen Informationen im Rahmen der Probandeninformation erhalten.

Unterschrift der Probandin:

\_\_\_\_\_  
Ort, Datum (von Probandin selbst einzutragen)

\_\_\_\_\_  
Unterschrift (Vor- und Nachname)



# 11.3 Acute Cystitis Symptom Score

## ACSS-Fragebogen

### Erstvorstellung (Diagnose) – Teil A

Uhrzeit:      UU:      MM Datum der Untersuchung:    /    /    (Tag/Monat/Jahr)

Bitte geben Sie an, ob Sie unten genannte Symptome innerhalb der letzten 24 Stunden bemerkt haben, und bewerten Sie bitte deren Intensität (nur eine Antwort für jedes einzelne Symptom)

		0	1	2	3
Typische Symptome	1 Häufiges Wasserlassen mit geringen Urinportionen (wiederholte WC-Besuche)	<input type="checkbox"/> Nein <i>bis 4-mal täglich</i>	<input type="checkbox"/> Ja, etwas öfter als sonst <i>5-6-mal täglich</i>	<input type="checkbox"/> Ja, merklich öfter <i>7-8-mal täglich</i>	<input type="checkbox"/> Ja, sehr oft <i>9-10-mal täglich</i>
	2 Starker, unwillkürlicher Harndrang	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
	3 Schmerzen und Brennen beim Wasserlassen	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
	4 Gefühl einer unvollständigen Harnblasenentleerung	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
	5 Schmerzen oder Beschwerden (unangenehmes Druckgefühl) im Unterbauch oder Beckenbereich	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
	6 Sichtbares Blut im Urin	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
<b>Gesamtpunktzahl =</b>					<b>Punkte</b>
Differentialdiagnose	7 Schmerzen in der Lendengegend (Flanke)*	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
	8 Neuer oder zunehmender Ausfluss aus der Scheide	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
	9 Eitriger Ausfluss aus der Harnröhre (unabhängig vom Wasserlassen)	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
	10 Erhöhte Körpertemperatur (über 37,5°C) / Schüttelfrost	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja, wenig	<input type="checkbox"/> Ja, mäßig	<input type="checkbox"/> Ja, stark
	Wenn Sie Temperatur gemessen haben, geben Sie diese bitte an * oft einseitig (auf einer Seite)	≤37,5 °C	37,6-37,9 °C	38,0-38,9 °C	≥39,0 °C
<b>Gesamtpunktzahl =</b>					<b>Punkte</b>
Lebensqualität	11 Bitte geben Sie an, wie stark ausgeprägt die durch die oben genannten Symptome hervorgerufenen Beschwerden innerhalb der letzten 24 Stunden waren (wählen Sie bitte nur <u>eine</u> am ehesten zutreffende Antwort):				
	<input type="checkbox"/> 0 Keine Beschwerden (keine Symptome, fühle mich wie immer) <input type="checkbox"/> 1 Geringe Beschwerden (fühle mich etwas unwohl als sonst) <input type="checkbox"/> 2 Starke Beschwerden (fühle mich merklich schlechter als sonst) <input type="checkbox"/> 3 Sehr starke Beschwerden (fühle mich schrecklich)				
	12 Bitte geben Sie an, wie weit die oben genannten Symptome Ihre alltägliche Aktivität / Leistungsfähigkeit innerhalb der letzten 24 Stunden beeinträchtigt haben (wählen Sie bitte nur <u>eine</u> am ehesten zutreffende Antwort):				
	<input type="checkbox"/> 0 Überhaupt nicht beeinträchtigt (arbeite wie an gewöhnlichen Tagen, ohne Beschwerden) <input type="checkbox"/> 1 Ein wenig beeinträchtigt (wegen der Symptome arbeite ich etwas weniger) <input type="checkbox"/> 2 Bedeutend beeinträchtigt (alltägliche Arbeit ist anstrengend geworden) <input type="checkbox"/> 3 Stark beeinträchtigt (ich kann praktisch nicht arbeiten)				
Begleitumstände	13 Bitte geben Sie an, wie weit die oben genannten Symptome Ihre gesellschaftlichen Aktivitäten (Besuche machen, sich mit Freunden treffen usw.) innerhalb der letzten 24 Stunden beeinträchtigt haben (wählen Sie bitte nur <u>eine</u> am ehesten zutreffende Antwort):				
	<input type="checkbox"/> 0 Überhaupt nicht beeinträchtigt (es hat sich nichts geändert, ich lebe so wie vorher) <input type="checkbox"/> 1 Ein wenig beeinträchtigt (eine geringe Reduzierung der Aktivität) <input type="checkbox"/> 2 Bedeutend beeinträchtigt (viel weniger aktiv, bleibe mehr zu Hause) <input type="checkbox"/> 3 Stark beeinträchtigt (schrecklich, kann das Haus praktisch nicht verlassen)				
	<b>Gesamtpunktzahl =</b>				
Begleitumstände	14 Bitte geben Sie an, ob zum Zeitpunkt des Ausfüllens des Fragebogens bei Ihnen folgendes zutrifft:				
	Menstruation (Regel)?	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja		
	Prämenstruelle Beschwerden (Beschwerden in der Zeit vor der Regel)?	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja		
	Klimakterisches Syndrom (Beschwerden in den Wechseljahren)?	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja		
	Schwangerschaft?	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja		
Zuckerkrankheit?	<input type="checkbox"/> Nein	<input type="checkbox"/> Ja			



Bitte vergessen Sie nicht, den ausgefüllten Fragebogen Ihrem Arzt zurückzugeben.

Wir danken Ihnen für Ihre Mitarbeit!



## 12 Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

## 13 Danksagung

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich zu jederzeit und während allen Phasen bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater *Prof. Dr. Florian Wagenlehner* für die Bereitstellung des Themas und der Möglichkeit der Durchführung und Anfertigung dieser Arbeit in seiner Abteilung. Weiterhin möchte ich mich für die langjährige Unterstützung und angenehme Kommunikation im Austausch über diese Dissertation bedanken.

Ich bedanke mich bei den Mitarbeitern *Dr. Gerke* und *Dr. Seibel* des Sponsors Klosterfrau für die hilfreichen Kommentare und das mehrfache Korrekturlesen.

Ein großer Dank gilt *Dr. Maria Loose* sowie *Mareike Buch-Heberling* für die Betreuung, Unterstützung und Motivation sowie die Hilfsbereitschaft bei allen Fragen und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei meinem Schwiegervater *Prof. Dr. Peter Klußmann* und meiner Schwester *Dr. Selina Jorch*, dass sie mich fachlich und technisch immer wieder unterstützt haben.

Meinen ehemaligen und aktuellen Kolleginnen und Kollegen und meinen Freunden danke ich für die große Hilfe und Motivation während dieser Zeit sowie den fachlichen Austausch und ihre freundschaftliche Unterstützung.

Meinem Bruder Jonathan danke ich für seine vielfältige Unterstützung und den Austausch über diese Arbeit. Meiner Schwester Sarah danke ich für ihre allgemeine Unterstützung.

Bei meinen Eltern und Großeltern bedanke ich mich, dass sie mir das Studium ermöglicht haben und mich fortwährend in allen Lebensphasen begleiten.

Als letztes gilt der größte Dank meiner Frau Leona und meiner Tochter Eugénie für die intensiven Diskussionen und die unermüdliche Motivation bei der Entstehung dieser Dissertation. Ich danke euch für euer Vertrauen und eure Wertschätzung für mich.

## 14 Lebenslauf

Der Inhalt wurde aus Datenschutzgründen entfernt.