

**Experimentelle Untersuchung zu alternativen  
Behandlungsmethoden bei Harnwegsinfektionen**

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Sauermilch, Emmelie geb. Pilger

Gießen 2023

Aus der Klinik für Urologie, Kinderurologie und Andrologie des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. Dr. Thomas Bschiepfer

Gutachter: Prof. Dr. Florian Wagenlehner

Tag der Disputation: 18.12.2023

# Inhalt

1 Einleitung .....	1
1.1 Harnwegsinfektionen .....	1
1.1.1 rezidivierende HWIs .....	3
1.1.2 Erregerspektrum von HWIs .....	3
1.1.2.1 Virulenzfaktoren von <i>E. coli</i> .....	4
1.2 Behandlungsoptionen .....	7
1.2.1 Antibiotika als Standardtherapie .....	7
1.2.2 Akuttherapie mit Ibuprofen .....	7
1.2.3 Akuttherapie mittels Phytotherapeutika: Uva Ursi und Canephron® .....	8
1.3 Prophylaxe von HWIs .....	9
1.3.1 Lebensstilmaßnahmen als Prophylaxe .....	9
1.3.2 Östrogen als Prophylaxe .....	10
1.3.3 Prävention durch Immunstimulation .....	11
1.3.4 Angocin Anti-Infekt N als Prophylaxe .....	11
1.3.5 D-Mannose als Prophylaxe .....	12
1.3.6 Cranberrys als Prophylaxe .....	12
1.3.7 Antibiotika als Prophylaxe .....	13
1.4 Ätherische Öle .....	13
1.4.1 Anwendung / Applikation ätherischer Öle .....	14
1.4.2 Erfahrungstherapeutische Aromatherapie bei HWIs .....	15
1.4.3 Wirkmechanismen ätherischer Öle auf Bakterien .....	16
1.4.4 Entwicklung von Resistenzen gegen ätherische Öle .....	17
1.4.5 Antiinflammatorische Effekte ätherischer Öle: .....	17
1.4.6 Nozizeptive Wirkung ätherischer Öle .....	18
1.5 Zielsetzung .....	19
2 Material und Methoden .....	21
2.1 Material .....	21
2.1.1 Geräte .....	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien .....	21
2.1.3 Chemikalien .....	22
2.1.4 Öle .....	23
2.1.5 Medien .....	23
2.1.5.1 Artifizierter Urin .....	23

2.1.5.2 Schafsblutagarplatten .....	24
2.1.6 Eukaryotische Zellen .....	24
2.2 Methoden .....	24
2.2.1 Arbeiten mit Bakterien.....	24
2.2.2 Umgang mit T24 Zellen .....	26
2.2.3 MTT-Assay.....	27
2.2.4 Wachstumskurven für Bakterien .....	27
2.2.5 Adhärenzassay .....	27
2.2.5.1 Adhärenzassay mit im Transwell System gewachsenen T24-Zellen.....	28
2.2.6 Hefe-Agglutinationsassay.....	30
2.2.7 Zuckernachweis .....	30
2.2.8 Agardiffusionsassay .....	31
2.2.9 Bestimmung der minimalen inhibierenden / bakteriziden Konzentration .....	32
2.2.10 Checkerboard-Assay .....	33
2.2.11 Auswertung der Daten.....	34
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Vorversuche:.....	35
3.1.1 Einfluss von artifiziellm Urin und Zucker auf die Viabilität der Blasenellen.....	35
3.1.2 Ergebnisse des Zuckernachweises .....	35
3.1.3 Identifikation D-Mannose-sensitiver Stämme mittels Hefeagglutinationsassays .....	36
3.1.4 Einfluss der Monosaccharide auf das bakterielle Wachstum .....	37
3.2 Untersuchung der Effektivität verschiedener Zucker bei der Verhinderung der Adhärenz uropathogener Bakterien an Blasenellen.....	38
3.3 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität ätherischer Öle.....	44
3.3.1 Screening verschiedener Öle mittels Agardiffusionstestung auf ihre antimikrobielle Aktivität .....	44
3.3.2 MIC und MBC Bestimmung ätherischer Öle .....	47
3.3.3 Bestimmung der Synergie zwischen Ölen und Antibiotika.....	52
3.4 Inhaltsstoffe ätherischer Öle.....	54
4 Diskussion .....	56
4.1 D-Mannose als alternative Behandlungsmethode weiblicher HWIs .....	56
4.1.1 Wirkungen der Monosaccharide auf Blasenepithelzellen und uropathogene Bakterien.....	56
4.1.2 Adhärenzinhibition durch Monosaccharide.....	57

4.1.2.1 Agglutinationsverhalten unterschiedlicher uropathogener Bakterien.....	59
4.1.3 D-Mannose als Prophylaxe und nicht als Therapie.....	60
4.1.4 D-Mannose in Kombination mit Procyanidin A2 .....	63
4.1.5 Alternative Monosaccharide zu D-Mannose.....	63
4.1.6 Überlegungen zur Glykokalyx von Patientinnen mit rezidivierenden HWIs...	64
4.2 Ätherische Öle als Alternativtherapie.....	66
4.2.1 Wirkung ätherischer Öle gegen uropathogene Bakterien .....	66
4.2.2 Extrahierte Einzelstoffe.....	67
4.2.3 Wirkung ätherischer Öle auf gram-positive Bakterien.....	69
4.2.4 Wirkung ätherischer Öle gegen <i>P. aeruginosa</i> .....	70
4.2.5 Kombinationstherapien .....	71
4.2.6 Bakterielle Resistenzbildung.....	73
4.2.7 Ätherische Öle als Therapeutikum.....	74
4.2.8 Wirkmechanismen ätherischer Öle auf Eukaryoten .....	78
4.2.9 Studiendurchführung mit ätherischen Ölen .....	80
4.3 Schlusswort.....	80
5 Zusammenfassung.....	82
6 Summary .....	83
7 Abkürzungsverzeichnis.....	84
8 Literaturverzeichnis .....	85
9 Anhang.....	99
10 Publikationsverzeichnis.....	120
11 Ehrenwörtliche Erklärung.....	121
12 Danksagung.....	122

# 1 Einleitung

## 1.1 Harnwegsinfektionen

Harnwegsinfektionen (im Weiteren abgekürzt als HWIs), sind Infektionen des oberen und unteren Harntraktes. Bei an HWIs erkrankten PatientInnen liegt eine Entzündungsreaktion auf die Anwesenheit von infektiösen Erregern im Harntrakt vor, die zu klinischen Symptomen führt. Genaue Zahlen zur Häufigkeit von HWI sind unbekannt, da sie oft selbstlimitierend sind und nicht unbedingt einen Arztbesuch erfordern. Weil sie außerdem von verschiedenen Facharztgruppen behandelt werden können, wird die Erfassung ihrer Häufigkeit weiter verkompliziert (Leitlinienprogramm DGU 2017). Die Krankenkasse Barmer GEK bildet die Häufigkeit der Diagnosen HWI mit dem „International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems“ (ICD) Schlüssel N39.0 ab. Für die Jahre 2012 und 2013 wurden alle weiblichen Versicherten im Alter ab 12 bis >100 Jahren abgebildet, welche die Diagnose N39.0 erhielten. Es bekamen 2012 von 4.869.961 versicherten Frauen ab 12 Jahren 341.324 Frauen die Diagnose HWI, 2013 bekamen von 4.876.297 versicherten Frauen ab 12 Jahren 356.774 eine HWI. Dabei zeigt sich eine Zunahme von HWIs mit steigendem Alter. Vor allem zwischen der Gruppe der 60-69 Jährigen und der Gruppe der 70-79 Jährigen zeichnete sich einen Anstieg von ca. 12/100 auf 17/100 weiblichen Versicherten ab (Barmer GEK 2015).

HWIs werden wie oben beschrieben durch eine Entzündungsreaktion auf die Anwesenheit von Bakterien in den Harnwegen ausgelöst. Bei den meisten Harnwegsinfektionen liegt eine ascendierende Infektion vor (Geerlings 2016; Herold 2019). Die Bakterien migrieren von Anus und Vagina in die Urethra und breiten sich von dort in die Blase aus. Eine HWI kann im unteren Harntrakt auftreten und wird dann als Zystitis bezeichnet. Die Symptome sind Schmerzen beim Wasserlassen, imperativer Harndrang, Pollakisurie und Schmerzen oberhalb der Symphyse. Bei einem weiteren Aufstieg der Bakterien in den oberen Harntrakt kann eine Pyelonephritis entstehen. Zusätzlich zu den Symptomen der Zystitis klagen die PatientInnen dann z.B. über Flankenschmerzen, klopfschmerzhaftes Nierenlager und haben Fieber über 38°C (Geerlings 2016; Leitlinienprogramm DGU 2017). Bei einer atypischen Infektion kann es auch zu gastrointestinalen Beschwerden, unklarem Fieber und Kopfschmerzen kommen. Infolge einer HWI entstandene Pyelonephritiden können im weiteren Verlauf auch zur Sepsis führen (Geerlings 2016; Wagenlehner et al. 2011; Herold 2019). Bei der Sepsis handelt es sich um eine generalisierte Entzündungsreaktion des Körpers infolge des Eintritts von Bakterien in die Blutbahn, die zu Multiorganversagen führen kann (Porat und Kesler 2020).

Zur Diagnose einer HWI sind die Anamnese sowie die Gewinnung von Mittelstrahlurin von Bedeutung. Durch die Nutzung des Mittelstrahlurins wird die Verunreinigung durch die umgebende Normalflora minimiert. Wenn mindestens  $10^5$  KBE/ml an Bakterien im Mittelstrahlurin festgestellt werden, spricht man von einer HWI. Bei Vorliegen von klinischen Symptomen einer unkomplizierten Zystitis kann jedoch bereits ab einer Menge von  $10^3$  KBE/ml von einer HWI gesprochen werden. Sind lediglich Bakterien nachweisbar, ohne dass Symptome vorliegen, spricht man von einer asymptomatischen Bakteriurie, die normalerweise nicht behandelt wird. Verkomplizierende Faktoren wie z.B. anatomische Besonderheiten und Differentialdiagnosen sollten ausgeschlossen werden, um gefährliche und/oder therapieresistente Krankheitsverläufe abzuwenden (Leitlinienprogramm DGU 2017).

Zur Pathogenese von HWIs trägt die Schwächung des Immunsystems, Durchnässung und Unterkühlung des Körpers, sexuelle Aktivität (sogenannte Honeymoon Zystitis) (Foxman et al. 2000) und geringe Harnbildung bei einem Mangel an Flüssigkeitszufuhr oder Flüssigkeitsverlusten bei (Hooton et al. 2018; Herold 2019). Als weiterer Risikofaktor gilt ein hohes Alter von Patientinnen, da u.a. im Rahmen der Umstellung des weiblichen Körpers nach der Menopause die Östrogenproduktion von Frauen abnimmt. Dies führt zu einer Atrophie der vaginalen Schleimhaut und zur Änderung des vaginalen pH-Werts (Leitlinienprogramm DGU 2017; Herold 2019; Raz und Stamm 1993). Auch der bei Frauen geringe Abstand von Meatus urethrae externae zum Anus begünstigt die Kolonisation der Blase durch Bakterien. Da die Harnröhre bei Frauen kurz ist, kann es durch eine falsch durchgeführte Reinigung des Intimbereichs und die Nähe der Harnröhrenöffnung zur Analregion zu einer Infektion kommen (Herold 2019).

Zahlen aus den Niederlanden zeigen, dass im Jahr 2014 1656 Frauen und 258 Männer pro 10.000 Einwohner an einer HWI erkrankten. Insgesamt erleiden mehr Frauen als Männer HWIs, Männer im höheren Alter erkranken jedoch häufiger an HWIs als junge Männer (Donker 2014). Bei Männern gelten die längere Harnröhre, das trockenere Umfeld um die Öffnung der Harnröhre und die antibakterielle Aktivität des Prostatasekrets als Schutzfaktor. Durch diese Faktoren ist die Häufigkeit von HWIs bei Männern deutlich niedriger als bei Frauen. HWIs bei jungen Männern werden grundsätzlich als komplizierte HWIs eingestuft (Leitlinienprogramm DGU 2017).

Die Unterscheidung der genannten unkomplizierten und komplizierten Infektionen beruht auf anatomischen und funktionellen Veränderungen, durch die der Krankheitsverlauf beeinflusst werden kann. Unter anatomische Veränderungen fallen hierbei alle Faktoren, die die Transportfähigkeit von Ureter und Urethra beeinflussen wie z.B. Stenosen, Steine oder Schwangerschaft. Alle drei Faktoren führen zu einem erhöhten Druck in den Harnwegen. In der Schwangerschaft kann es durch das Gewicht

des Fötus zu Kompression von Ureter und Urethra kommen, die durch das Gewicht des Fötus begründet werden. Der mit dem Abflussstau einhergehende Druckanstieg im oberen Harntrakt führt dann weiter zur erhöhten Anfälligkeit für HWIs (Leitlinienprogramm DGU 2017; Lee et al. 2019). Schwangere Frauen haben aufgrund dieses Mechanismus ein um 40% erhöhtes Risiko, durch eine unbehandelte asymptomatische Bakteriurie an einer Pyelonephritis zu erkranken (Lee et al. 2019). Funktionelle Veränderungen, die eine HWI begünstigen, sind Produktionsstörungen von Urin durch Niereninsuffizienz oder Entleerungsstörungen. Weiter können Störungen der Immunität wie z.B. bei HIV, Diabetes mellitus oder durch eine Chemotherapie sowie Situationen mit z.B. einliegendem Harnblasenkatheter als verkomplizierende Faktoren wirken (Leitlinienprogramm DGU 2017).

### **1.1.1 rezidivierende HWIs**

Eine unkomplizierte rezidivierende HWI liegt vor, wenn mehr als zwei Infektionen in sechs Monaten auftreten oder mehr als drei in zwölf Monaten (Herold 2019; Piechota 2017). Im Jahr 2013 hatten 328.983 weibliche Versicherte der Barmer GEK ab einem Alter von 12 Jahren eine HWI. Von diesen Versicherten hatten 69,7% eine einzige Diagnose, 17,0% zwei und 6,0% drei Diagnosen. 0,1% hatten mehr als 10 HWI Diagnosen in dem Betrachtungszeitraum von einem Jahr (Barmer GEK 2015). Rezidivierende HWIs reduzieren sowohl durch die körperliche als auch durch die seelische und soziale Belastung die Lebensqualität von Patientinnen. Besonders relevante Themen sind hierbei körperliche Intimität, Sozialkontakte und die Arbeitsfähigkeit im Sinne der eigenen Versorgung und der Versorgung der Familie. Neben diesen psychosozialen Faktoren führen rezidivierende HWIs durch Arztbesuche, Verschreibungen von Medikamenten und diagnostische Tests zu einer finanziellen Belastung des Gesundheitssektors (Flower et al. 2014).

### **1.1.2 Erregerspektrum von HWIs**

Das Erregerspektrum bei unkomplizierten HWIs umfasst zu rund 77% *Escherichia coli*; weiterhin Enterokokken, Staphylokokken, *Klebsiella pneumoniae* und *Proteus mirabilis* mit jeweils unter 5% (Kahlmeter 2003; Leitlinienprogramm DGU 2017; Herold 2019; Naber et al. 2008). Komplizierte HWIs werden zusätzlich durch *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* und Gruppe B Streptokokken ausgelöst (Ronald 2003).

Uropathogene *E. coli* Bakterien (UPEC) kommen häufig aus dem Darm und sind eine genetisch heterogene Gruppe. Sie unterscheiden sich in ihren Fähigkeiten, die Blase oder die Niere zu kolonialisieren und dort zu überdauern (Mulvey 2002), da die Kolonisation der Blase im Fall der Infektion gegen die Abwehrmechanismen des Wirtes

erfolgen muss. Dabei müssen die Bakterien die mechanische Ausspülung während der Miktion, die zelluläre und humorale Immunabwehr und den pH-Wert des Urins sowie die chemische Abwehr in Form von im Urin enthaltenen Ionen überwinden (Lüthje und Brauner 2014; Babikir et al. 2018).

#### **1.1.2.1 Virulenzfaktoren von *E. coli***

UPEC-Stämme unterscheiden sich untereinander im Repertoire und der Expression von Virulenzfaktoren. Durch diese Unterschiede werden das bakterielle Wachstum und die Persistenz im Harntrakt beeinflusst (Wiles et al. 2008). Es wird geschätzt, dass mindestens 90% aller Bakterien, die in der physiologischen Umwelt vorkommen an ihren Untergrund binden und somit in die Lage versetzt werden ortsständig Kolonien zu bilden. Durch diese Adhäsion bleiben die Bakterien auch unter dem Einfluss von hydrodynamischen Scherkräften an Ort und Stelle. Weiter helfen Adhäsionsfaktoren dem Bakterium, seine spezifische ökologische Nische wie z.B. ein bestimmtes Epithelgewebe im Wirt zu finden (Klemm et al. 2010). Die Expression von Adhäsionsmolekülen durch uropathogene *E. coli* ist ein Hauptfaktor, der die Pathogenität dieser Stämme determiniert. Adhäsine oder Fimbrien (Pili), die in der Zellmembran der Bakterien verankert sind, ermöglichen, dass Bakterien an das Urothel binden und nicht durch den Urinfluss mechanisch ausgespült werden können (Mulvey 2002). Zunächst bildet *E. coli* schwache Verbindungen aus, die dann durch die weiteren vorhandenen Adhäsine, die wiederum weitere Epitope binden können, verstärkt werden (Gouin et al. 2009). Im Allgemeinen tragen uropathogene *E. coli* Stämme deutlich mehr Fimbrien als kommensale *E. coli* Bakterien oder nicht pathogene *E. coli* Bakterien aus dem Darm (Subashchandrabose und Mobley 2015). Die bei *E. coli* Bakterien am häufigsten vorkommenden Fimbrien sind Typ-1-Fimbrien (Mulvey 2002). Sie werden von ca. 90% aller bekannten UPEC Stämme und auch von *Salomonella enterica* und *Klebsiella pneumoniae* sowie anderen gram-negativen Bakterien exprimiert (Ribić et al. 2018; Feenstra et al. 2017). Der Typ-1-Pilus von *E. coli* ist aus Fim-Proteineinheiten zusammengesetzt. Über eine Verankerung durch FimD in der äußeren Zellmembran der Bakterienwand ist der Pilus befestigt. Weiter besteht er aus 500 - 3.000 FimA Einheiten, die an der Spitze des Pilus in FimF, FimG und FimH münden (Sihra et al. 2018). Mit ihrer Hilfe kann die Adhäsion an Wirtszellen nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip erfolgen, indem Typ-1-Fimbrien von *E. coli* an das Uroplakin 1a der Superficialzellen der Harnblase andocken (Wu et al. 2009). FimH bindet dabei an Glykoproteine, die D-mannosyliert sind. Dazu gehören Uroplakin 1a der Superficialzellen des Harnblasenurothels, als auch das Tamm-Horsfall Glykoprotein, welches in der Niere gebildet wird und in hoher Konzentration im Urin

vorliegt (Sihra et al. 2018). Bei dem Tamm- Horsfall Protein handelt es sich um ein durch Epithelzellen des distalen Tubulus produziertes Glykoprotein. Es wird auch als Uromodulin bezeichnet (Garimella et al. 2017).

Weiter bindet FimH an  $\beta 1$  und  $\alpha 3$  Integrine (Sihra et al. 2018), Typ I und Typ IV Kollagen, Laminin und Fibronectin. Die FimH Bindung kann auch zu einer Bindung zwischen *E. coli* Bakterien führen und auf diese Weise zur Autoaggregation und Biofilm Bildung beitragen (Mulvey 2002). Neben den Typ-1-Fimbrien können *E. coli* Stämme S- Fimbrien ausbilden. Diese binden an  $\alpha$ -sialyl-2-3- $\beta$ -galaktose. Dieser Rezeptor findet sich auf tubulären Epithelzellen der Niere und auf Uroplakin 3 der Epithelzellen der Blase. Auch die S-Fimbrien können an das Tamm-Horsfall Protein binden (Garimella et al. 2017). Mit Hilfe seiner Flagellen kann *E. coli* gegen den Urinfluss durch die Ureter in die Nieren ascendieren (Lüthje und Brauner 2014). In der Niere kann es dadurch zur Ausbildung von Pyelonephritiden kommen (Fierer et al. 1971; Herold 2019).

Im oberen Harntrakt nutzt *E. coli* zur Adhärenz an Glykolipide mit der Gal $\alpha$ 1-4Gal-Domäne der renalen Epithelzellen zusätzlich P-Fimbrien (Lüthje und Brauner 2014; Sihra et al. 2018). Hierbei handelt es sich um eine dritte untersuchte Art von Fimbrien, die besonders mit dem Krankheitsbild der Pyelonephritis assoziiert sind. Sie sind verantwortlich für die D-Mannose unabhängige Adhäsion an Wirtszellen, da sie an die Rezeptoren binden, die eine Digalactosid Einheit besitzen. P-Fimbrien bestehen aus den verschiedenen Pap-Proteinen PapA, PapK, PapE, PapF und PapG. An der Spitze der Fimbrien ist die Untereinheit PapG lokalisiert, die für die Adhäsion an Galabiose zuständig ist (Ribić et al. 2018).

*E. coli* produziert verschiedene Toxine, die durch Störung der Zellintegrität Zugang zu tiefer liegendem Gewebe und den dort enthaltenen Nährstoffen ermöglichen. Meist führen Toxine entweder direkt oder durch die von ihnen ausgelöste Nekrose zu einer starken Entzündungsreaktion des Wirts (Lüthje und Brauner 2014). Eins der von UPECs gebildeten Toxine ist  $\alpha$ -Hämolyisin (HlyA). 50% der UPEC Isolate kodieren dessen genetische Information und seine Expression ist mit einem erhöhten Infektionsschweregrad assoziiert. HlyA ist ein Kalzium-abhängiges Toxin, das 2 nm weite Poren in der Membran der Wirtszellen erzeugen kann. Dies führt bei hohen Konzentrationen von HlyA zur Lyse der Wirtszellen. Die Blase, in der die Bakterienzellen wachsen, ist sehr arm an Nährstoffen. Daher existiert die Hypothese, dass HlyA vor allem für die Destruktion der Wirtszellen mit dem Ziel der Freisetzung von Nährstoffen und Faktoren wie Eisen, welches elementar für das bakterielle Wachstum ist, nützlich ist. Rund  $\frac{1}{3}$  aller UPEC Isolate kodieren Cytotoxic necrotising

factor 1 (CNF1). Die Toxizität dieses Faktors entsteht durch die Fähigkeit, die Rho Familien GTPasen RhoA, Rac und / oder Cdc42 zu aktivieren. Die Aktivierung der Rho GTPasen führt zur Anregung einiger eukaryotischer Zellfunktionen inklusive der Formierung von Aktin Stress-Fasern, Lammellen, Filopodien, der Induktion des „membrane ruffling“ und der Modulation von inflammatorischen Signalkaskaden (Wiles et al. 2008). Um seinen Einfluss gezielt ausüben zu können, muss CNF1 Zugang zum Zytosol der Wirtszellen erlangen. Dies geschieht, indem es an Laminin Rezeptor Vorstufen auf der Oberfläche der Zielzelle bindet. Dadurch wird die Aufnahme eingeleitet und das Toxin kann im Anschluss an einen endosomalen Transport im Zytosol der Wirtszelle die Rho GTPase Familie stimulieren. Eine anhaltende Aktivierung der Rho GTPase führt zu ihrer Ubiquitinierung und später zur proteasomalen Degradation. Aufgrund dessen ist die durch CNF-1 ausgelöste Rho GTPase- Aktivierung ein temporäres Phänomen. Auch die Zytotoxizität des CNF1 ist in der Rho Aktivität begründet. CNF-1 kann die Apoptose von Blasenepithelzellen fördern, ihre Exfoliation stimulieren und somit den Zugang der Bakterien zu tiefer liegenden Gewebsschichten ermöglichen (Wiles et al. 2008). CNF1 hat auch inhibitorische Effekte auf neutrophile Granulozyten, indem deren Phagozytose und die antimikrobielle Aktivität reduziert werden (Lüthje und Brauner 2014).

Zur Gewinnung des überlebenswichtigen und in der Blase äußerst knappen Eisens regulieren UPECs die Expression von Siderophoren hoch (Terlizzi et al. 2017). Siderophore sind sezernierte Moleküle mit geringem Molekulargewicht und einer hohen Affinität an  $Fe^{3+}$ , welches als Kation unlöslich ist. Bakterien bergen Siderophore, die Eisen gebunden haben, durch Rezeptoren wie den TonB Komplex. Diese Rezeptoren ermöglichen den Transport des Komplexes durch die Bakterienmembran in das Zytosol. Dort wird das Eisen frei gesetzt (Wiles et al. 2008; Terlizzi et al. 2017). Die Begrenzung des Zugangs zu  $Fe^{3+}$ -Ionen durch Proteine wie z.B. Transferrin ist ein Verteidigungsmechanismus des Wirts gegen einwandernde Pathogene. Neben Transferrin wird auch Lipocalin 2 durch aktivierte Neutrophile, die Hauptimmuneffektorzellen, die zu der Infektion im Urogenitaltrakt gerufen werden, exprimiert (Wiles et al. 2008).

In *in vivo* und *in vitro* Studien konnte an Ratten- und Mäuse-Blasen gezeigt werden, dass Blasenepithelzellen UPECs aufnehmen können. UPECs agieren somit auch intrazellulär (Mulvey 2002). Durch die Bindung an  $\beta 1$  und  $\alpha 3$  Integrin können einige Bakterien in die Wirtszelle hinein migrieren (Eto et al. 2007). Es wurden verschiedene Invasionsmechanismen beschrieben. Bakterien können z.B. das Aktin-Zytoskelett sowie Mikrotubuli nutzen, weiterhin können Lipid rafts eine Rolle spielen (Lüthje und

Brauner 2014; Eto et al. 2007). In den Zellen formen die Bakterien sogenannte *intracellular bacterial communities* (IBCs), die vor Immunreaktionen und Antibiotika geschützt sind (Mulvey 2002; Wiles et al. 2008). Es wird angenommen, dass die Bakterien aus den IBCs wieder in die Blase entlassen werden und dabei erneut einen HWI auslösen können (Lüthje und Brauner 2014).

## **1.2 Behandlungsoptionen**

### **1.2.1 Antibiotika als Standardtherapie**

Die Standardtherapie von akuten HWIs ist die Therapie mit Antibiotika. Sie wird bei unkomplizierten HWIs als Kurzzeittherapie durchgeführt. Das Antibiotikum wird hierbei oral verabreicht. Die Auswahl der Antibiotika stellt sich recht komplex dar, weil das individuelle Risiko der PatientInnen, das Erregerspektrum, die Sensitivität des Erregers gegenüber dem Antibiotikum, unerwünschte Arzneimittelwirkungen und die Auswirkungen auf die individuelle Resistenzsituation bezüglich der PatientInnen und der Allgemeinheit beachtet werden müssen. Weiter sollen die Grundprinzipien des Antibiotic Stewardship angewandt werden. Die Leitlinie empfiehlt ÄrztInnen eigene Statistiken über die Resistenzsituation in ihrem geografischen Gebiet zu erstellen oder diese beim Labor abzufragen. Antibiotika der ersten Wahl zur Behandlung der unkomplizierten Zystitis sind Fosfomycin-Trometamol, Nitrofurantoin, Nitroxolin, Pivmecillinam und Trimethoprim. Es liegt bei diesen Antibiotika eine hohe Erregerempfindlichkeit von *E. coli* vor und das Risiko von Kollateralschäden ist nur gering (Leitlinienprogramm DGU 2017). Erhöhte Resistenzraten bei gram-negativen Erregern in Europa wie z.B. *E. coli*, *K. pneumoniae* und *P. aeruginosa* erfordern die Suche nach alternativen Behandlungsmethoden und die sparsame Verwendung von Antibiotika auch in der Behandlung von unkomplizierten HWIs (Bundesministerium für Gesundheit 2020). Es wird angeraten, sich intensiv mit der Wahl der Antibiotikaklassen auseinander zu setzen, da durch optimalen Einsatz die Resistenzbildung insgesamt reduziert werden kann. Neben der Resistenzentwicklung gegen das verwendete Antibiotikum muss immer auch an die Resistenzentwicklung gegen eine andere Antibiotikaklasse, die durch das eingenommene Antibiotikum induziert werden könnte, gedacht werden (Leitlinienprogramm DGU 2017).

### **1.2.2 Akuttherapie mit Ibuprofen**

Eine schmerztherapeutische Behandlung anstelle einer antibiotischen Behandlung bei HWIs zu versuchen ist möglich, da die Wahrscheinlichkeit bei Erkrankung eine spontane Heilung innerhalb einer Woche zu erlangen bei 30-50% liegt und eine auf die Harnblase begrenzte HWI keine lebensbedrohliche Erkrankung darstellt

(Leitlinienprogramm DGU 2017). Ziel der antibiotischen Behandlung von HWIs ist die Eradikation der Bakterien und das Erreichen der Schmerzfreiheit bei den Patientinnen. Eine Möglichkeit der Schmerztherapie ist Ibuprofen. In einer Studie zeigte sich, dass mit Ibuprofen im Vergleich mit Fosfomycin im Hinblick auf die Beschwerdefreiheit der Patientinnen ein signifikanter Anteil der Patientinnen ohne Antibiotika behandelt werden können. Das Risiko bei einer Entzündung mit starken Symptomen eine Pyelonephritis zu entwickeln war allerdings höher. Für Patientinnen mit nur leichten oder mittelgradigen Beschwerden kann die Behandlung mit Ibuprofen unter Beobachtung des Krankheitsprozesses eine Option sein. Als Vorteil erscheint dabei, bei reduzierter Wirksamkeit ein anderes Nebenwirkungsspektrum vergleichen mit Antibiotika. Die häufigsten Nebenwirkungen, die im Beipackzettel aufgeführt werden, sind neben anderen Ulzera, Perforationen und Blutungen des Magen-Darm-Traktes sowie eine Erhöhung des kardiovaskulären Risikos. Diese Nebenwirkungen sind vor allem Abhängig von der Häufigkeit der Einnahme (Leitlinienprogramm DGU 2017; Gágyor et al. 2015; Herold 2019; ALIUD PHARMA GmbH 2021).

### **1.2.3 Akuttherapie mittels Phytotherapeutika: Uva Ursi und Canephron®**

Uva Ursi oder auch die Bärentraube ist ein traditionelles Phytotherapeutikum, das zur Behandlung von Harnwegsinfektionen eingesetzt wird (de Arriba et al. 2013). Es hat durch Hydroquinone (u.a. Arbutin) und Tannine antiseptische und antimikrobielle Eigenschaften gegen uropathogene Bakterien (Thompson Healthcare Inc. 2000). Inhaltsstoffe von Uva Ursi bewirken eine erhöhte Diurese (Beaux et al. 1999) und reichern sich bei oraler Aufnahme im Urin an (Afshar et al. 2018; Kedzia et al. 1975). Bei Anwendung in therapeutischer Dosierung zeigte sich bislang keine Toxizität (de Arriba et al. 2013). In einer randomisierten Studie von Gágyor et al. wird gezeigt, dass die Anwendung von Antibiotika durch eine primäre Anwendung von Uva Ursi um 63,6% reduziert werden kann. In der Studie bekam eine Gruppe 5 Tage lang 3-mal täglich 2 Tabletten mit 105 mg Uva Ursi und die andere Gruppe 3 g Fosfomycin als Einmaldosis. Im Rahmen der Behandlung mit Uva Ursi kam es zu einer stärkeren Belastung der Patientinnen mit Symptomen und einem erhöhten Risiko an einer Pyelonephritis zu erkranken (Gágyor et al. 2021).

Das Fertigarzneimittel Canephron® enthält Tausendgüldenkraut (*Centaurium erythraea*), Liebstöckel Wurzeln (*Levisticum officinalis*) und Rosmarin Blätter (*Rosmarinus officinalis*) 3 x 18 mg in gemahlener Form (Naber 2013; Höller et al. 2021). Belegt ist für Canephron® eine spasmolytische (Höllner et al. 2021; Künstle et al. 2013), diuretische (Höllner et al. 2021; Haloui et al. 2000), antiadhäsive (Höllner et al.

2021; Künstle et al. 2013), antiinflammatorische (Höller et al. 2021; Künstle et al. 2013; Nausch et al. 2019) und antinozizeptive (Höller et al. 2021; Nausch et al. 2019) Wirkung. In klinischen Studien von z.B. Höller et al. und Wagenlehner et al. wird die Wirksamkeit von Canephron zur Behandlung von HWIs gezeigt. Höller et al. fanden heraus, dass bei Frauen, die an einer HWI erkrankten nach einer Verschreibung von Canephron® im Vergleich zu einer antibiotischen Therapie mit Fosfomycin-Tromethamol innerhalb von 1-30 Tagen gleich viele weitere antibiotische Behandlungen folgten. Für die Zeit von 31-365 Tagen war die Notwendigkeit einer zusätzlichen Verschreibung von Antibiotika geringer nach der Gabe von Canephron als nach der Behandlung mit Antibiotika (Höller et al. 2021). Auch Wagenlehner et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von akuten HWIs über 7 Tage mit Canephron® in Form von 2 Tabletten 3 mal täglich vor oder nach den Mahlzeiten der Einmalgabe von 3 g Fosfomycin Trometamol im Bezug auf die Verhinderung weiterer Antibiotikaeinnahmen gleichwertig war (Wagenlehner et al. 2018). Dass Canephron® von Patientinnen gut vertragen wird schreiben auch Ivanov et al. (Ivanov et al. 2015). Als Nebenwirkung sind Hautausschläge (Naber 2013) sowie geringe gastrointestinale Nebenwirkungen (Wagenlehner et al. 2018) durch eine schwächere Beeinflussung des Darmmikrobioms z.B. durch Fosfomycin bekannt (Naber et al. 2017).

### **1.3 Prophylaxe von HWIs**

#### **1.3.1 Lebensstilmaßnahmen als Prophylaxe**

Bei Patientinnen, die zu unkomplizierten Harnwegsinfektionen neigen, sollte eine Aufklärung über Präventivmaßnahmen stattfinden. Globale Maßnahmen, die eine Stärkung des Immunsystems bewirken, sind der Konsum von pflanzenbetonter Kost, regelmäßige sportliche Aktivität und verschiedene psychosoziale Maßnahmen zur Verbesserung der Lebensfreude. Von der aktuellen Leitlinie werden verschiedene beeinflussbare Faktoren, die eine HWI begünstigen genannt: Dort wird eine Trinkmenge von ca. 1,5 L/Tag empfohlen, um antimikrobiell wirksame Substanzen wie das Tamm-Horsfall-Protein nicht zu verdünnen. In einer Studie von 2018 wurde noch gezeigt, dass bei Patientinnen, die eine Trinkmenge unter 1,5 L/Tag hatten, es durch die Erhöhung der normalen Trinkmenge über 1,5 L/Tag zu nur halb so vielen HWIs kommt wie bei der Kontrollgruppe, die ihre normale Trinkmenge beibehält (Hooton et al. 2018). Weiter konnte gezeigt werden, dass ein niedriger Vitamin-D-Spiegel mit rezidivierenden HWIs einher geht. Die Bildung von Vitamin D erhöht die Bildung von antimikrobiellen Peptiden, besonders zu Beginn einer Infektion (Nseir et al. 2013). Hieraus folgt als Maßnahme die Anpassung des Vitamin-D-Spiegels hin in den

normwertigen Bereich (für Serum Vitamin D 25-OH 23-113 nmol/l und Serum Vitamin D 1,25-OH 25-86,5 pg/ml (Herold 2019). Ein Gewichtsverlust sollte bei einem BMI über 30 angestrebt werden, da das Risiko einen HWI zu erleiden bei Betroffenen erhöht ist (Semins et al. 2012). Der Leitlinie zufolge korreliert auch die Rate an sexueller Interaktion mit der Erkrankungshäufigkeit an HWIs (Leitlinienprogramm DGU 2017). Dies wird dadurch begründet, dass die uropathogenen Erreger im Anus bzw. unmittelbar perianalen Bereich lokalisiert wird. Die Kolonisation der Vagina und Blase durch die Bakterien wird von dort aus z.B. im Rahmen des heterosexuellen vaginalen Verkehrs, infolge der mechanischen Einimpfung durch den Penis des Partners vorgenommen (Gyftopoulos et al. 2019). Das Verhalten der Patientinnen rund um den Geschlechtsverkehr hat auch einen Einfluss auf die Neigung derer zu HWIs. Ein besonders signifikanter Zusammenhang ( $p < 0.0001$ ) konnte von Al Demour und Ababneh bezüglich des Urinierens innerhalb von 15 min nach dem Geschlechtsverkehr gezeigt werden. Deshalb wird in der Studie die Unterrichtung der Betroffenen über Hygienemaßnahmen empfohlen (Al Demour und Ababneh 2018). Die Nutzung von spermiziden Gelen, Diaphragmen, Kondomen und Intrauterin-Spiralen erhöht zusätzlich die Rate an HWIs, da die vaginale Flora dadurch verändert wird. Das Verhütungsmittel sollte dem persönlichen Erkrankungsrisiko an HWIs angepasst werden. Die Unterkühlung der Füße erhöht das Risiko einen HWI zu erleiden. Studien zu den Hygienemaßnahmen zeigen widersprüchliche Ergebnisse. Eine Intimhygiene, die das lokale Milieu nicht schädigt, sollte von Betroffenen durchgeführt werden (Leitlinienprogramm DGU 2017).

### **1.3.2 Östrogen als Prophylaxe**

Bei Patientinnen in der Postmenopause kann eine HWI auf einen lokalen Hormonmangel zurückzuführen sein (Leitlinienprogramm DGU 2017). Die vaginale lokale Gabe von Östrogen erhöht die Produktion antimikrobieller Peptide wie z.B. Cathelicidin, es stärkt die Zell-Zell Verbindungen im Urothel durch Hochregulation der mRNA Produktion von z.B. Zona Occludens, Protein 1 und E-cadherin Proteinen und schränkt im Maus Modell die Vermehrung von *E. coli* während der akuten Infektion ein (Lüthje et al. 2013). Weiter stabilisiert eine lokale Behandlung der Scheide mit Östrogenen den vaginalen pH-Wert und die Standortflora wodurch auf diese Weise eine Besiedelung mit uropathogenen Keimen verhindert wird (Leitlinienprogramm DGU 2017). Auf der anderen Seite erhöht Östrogen die Expression von Uroplakin 1a und  $\beta 1$  Integrin, was eine Zunahme von intrazellulären Bakterien begünstigen kann. Diese Effekte des Östrogens bieten eine Erklärung dafür, dass die Östrogenapplikation nach der Menopause eine Reduktion der HWIs bewirkt und junge Frauen trotz des

Östrogens empfänglich für HWIs sind (Lüthje et al. 2013). In einer weiteren klinischen Studie konnte gezeigt werden, dass die vaginale Östrogentherapie von postmenopausalen Frauen mit rezidivierenden HWIs die Häufigkeit der HWIs reduziert (Ferrante et al. 2019).

### **1.3.3 Prävention durch Immunstimulation**

Eine Option zur Verhinderung von HWIs ist die Immunstimulation. Das Ziel ist bei Reinfektion eine schnellere und effektivere Immunantwort des Körpers zu bewirken. Die orale Immunstimulation durch Uro-Vaxom wirkt durch die Induktion Antigen spezifischer Immunreaktionen, polyklonale B-Zell Stimulation sowie der Aktivierung von Makrophagen durch Oberflächenkomponenten der Bakterien. *In vitro* konnte außerdem gezeigt werden, dass OM-89 auch die Produktion von TNF- $\alpha$ , Interleukin 1 (IL-1), Interleukin 2 (IL-2), Interleukin 6 (IL-6) und Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) durch periphere, menschliche, mononukleäre Zellen erhöht (Bessler et al. 2009). Zu diesem Zweck enthält Uro-Vaxom Zellwandbestandteile von 18 uropathogenen *E. coli* Stämmen und wird bereits wirksam bei rezidivierenden HWIs angewandt (Aziminia et al. 2019). Eine weitere Möglichkeit ist die parenterale Immunstimulation durch StroVac. Dieser wird durch 3 Impfungen im Zeitraum von 6 Wochen verabreicht. Nach einem Jahr ist eine Auffrischungsimpfung möglich. Im Impfstoff sind  $10^9$  inaktivierte Erreger enthalten. Es handelt sich um verschiedenen Stämme: *E. coli*, *P. mirabilis*, *P. morganii*, *K. pneumoniae* und *E. faecalis* (Leitlinienprogramm DGU 2017; Bauer und Bessler 2016). Eine weitere Möglichkeit zur Verbesserung der Immunsituation der Patientinnen ist die kutane Immunstimulation durch Akupunktur. Hier zeigt sich eine signifikante Reduktion der rezidivierenden HWIs und eine Reduktion des Restharns um 50% (Leitlinienprogramm DGU 2017; Alraek et al. 2002).

### **1.3.4 Angocin Anti-Infekt N als Prophylaxe**

Angocin Anti-Infekt N ist ein pflanzliches Medizinprodukt, welches als Wirkstoffe 80 mg *Amoraciae rusticanae* Wurzel und 200 mg *Tropaeli majoris* Kräuter beinhaltet. Beide Pflanzenprodukte enthalten Senföle (Alylisothiocyanate, Phenylethylisothiocyanate und Benzylisothiocyanate), die sowohl gegen gram-positive als auch gegen gram-negative Bakterien wirksam sind. Sowohl der additive Effekt der Senföle und das Ausbleiben der Resistenzbildung gegen Isothiocyanate als auch die Ausscheidung der Senföle über die Nieren, und das damit verbundene Erreichen einer hohen Konzentrationen dieser Stoffe vor Ort machen Angocin Anti-Infekt als mögliche Therapiealternative interessant (Albrecht et al. 2007). Angocin Anti- Infekt N kann laut den Leitlinien zur Rezidivprophylaxe mit dem Empfehlungsgrad C, einer „kann Aussage“, erwogen werden (Leitlinienprogramm DGU 2017).

### 1.3.5 D-Mannose als Prophylaxe

D-Mannose ist ein Monosaccharid. Es wird im Darm aufgenommen und vom Körper u.a. zur Glykosylierung von Proteinen genutzt. Hohe Mengen der D-Mannose führen aufgrund von osmotischen Effekten zu Magen-Darm Problemen, weitere Nebenwirkungen sind nicht bekannt. Die Ausscheidung der D-Mannose erfolgt über die Nieren (Sharma et al. 2014). Uropathogene *E. coli* binden über die Typ-1 Fimbrien an D-mannosylierte Proteine des Urothels. FimH der Typ-1 Fimbrien bindet ebenfalls D-Mannose. Ist nun D-Mannose durch die Ausscheidung im Urin vorhanden, bindet es die FimH Proteine der *E. coli*, wodurch diese nicht mehr am Urothel anhaften können. Die Bakterien können dann im Rahmen des Urinflusses bei der Miktation ausgespült werden (Sihra et al. 2018). In einer klinischen Studie wurde gezeigt, dass die Prävention von HWIs durch die regelmäßige Gabe von D-Mannose statistisch signifikant erfolgt. Die Wirkung als Rezidivprophylaxe entspricht der des Antibiotikums Nitrofurantoin, jedoch wird eine deutlich geringere Rate an Nebenwirkungen beobachtet (Kranjčec et al. 2014; Leitlinienprogramm DGU 2017). Den Leitlinien entsprechend kann D-Mannose unter dem Empfehlungsgrad C, einer „kann Aussage“, erwogen werden (Leitlinienprogramm DGU 2017).

### 1.3.6 Cranberrys als Prophylaxe

Cranberrys oder Moosbeeren, im lateinischen als *Vaccinium macrocaropn*, *Vaccinium oxycoccos* und *Vaccinium erythrocarpum* beschrieben, werden bereits seit langem in der Erfahrungsheilkunde zur Behandlung von HWIs genutzt. Die Beeren bestehen zu 88% aus Wasser und zu 12% aus organischen Säuren, Fruktose, Ascorbinsäure, Flavonoiden, Anthocyanidinen, Proanthocyanidinen, Catechinen und Triterpenoiden. Der Wirkmechanismus von Cranberrys in der HWI-Behandlung ist noch nicht vollständig bekannt. Die Hypothese, dass die Cranberry für die Ansäuerung des Urins sorgt, wurde vor mehr als 20 Jahren widerlegt. Die Hauptwirkung schreibt man nun Anthocyanidin und Proanthocyanidin zu (Sihra et al. 2018). *In vitro* Studien konnten zeigen, dass Proanthocyanidin die Adhärenz durch P-Fimbrien beeinflusst und die Mobilität von *P. aeruginosa*, *E. coli* und *P. mirabilis* einschränkt. Ein weiterer enthaltener Wirkstoff ist die D-Fruktose, die ebenso wie D-Mannose, an Typ-1 Fimbrien binden kann. Howell et al. konnten zeigen, dass der Konsum von Cranberrysaft eine stärkere antiadhäsive Wirkung zeigt als andere Lebensmittel, die Proanthocyanidin enthalten (z.B. Apfelsaft, Grüner Tee und dunkle Schokolade). Howell et al. vermuteten, dass dies mit der A-Typ-Bindung im Proanthocyanidin der Cranberry begründet werden kann. Alle anderen Lebensmittel, die in der Studie getestet wurden, wiesen B-Typ-Bindungen auf. Die A-Typ-Verbindungen sind den Rezeptoren auf dem

Urothel ähnlicher als die B-Typ-Verbindungen. Der genaue Mechanismus ist aber unklar (Howell et al. 2005).

Cranberrys können auf verschiedene Art verabreicht werden. Die komplexe Mischung aus bioaktiven Stoffen kann der Patient nur erhalten, wenn die Beere als Ganzes gegessen wird (Sihra et al. 2018). Die Studienlänge bezüglich der Nutzung von Cranberrys als Prophylaxe für wiederkehrende HWIs zeigt sehr uneinheitliche Ergebnisse. Ein Grund dafür ist die Verwendung verschiedener Pflanzenteile in den unterschiedlichen Studien sowie Unterschiede in der aufgenommenen Menge. Das unauffällige Nebenwirkungsprofil, die gute Zugänglichkeit von Cranberryprodukten sowie der Fakt, dass keine Resistenzbildung bekannt ist, macht es zu einer Alternative, an der weiter geforscht wird (Sihra et al. 2018; Howell et al. 2010).

### **1.3.7 Antibiotika als Prophylaxe**

Zur Prophylaxe von rezidivierenden HWIs kann eine Antibiotikatherapie über drei bis sechs Monate, eine postkoitale Einmalgabe oder eine patienteninitiierte Selbsttherapie erwogen werden. Jede Form der Einnahme ist effektiv. Hierzu werden die Antibiotika Nitrofurantoin, Trimethoprim, Cotrimoxazol und Fosfomycin-Trometamol genutzt. Antibiotika weisen jedoch Nebenwirkungen und das Risiko der Resistenzbildungen auf (Leitlinienprogramm DGU 2017). Die Wahl von Antibiotika als Prophylaxe sollte deshalb von der Häufigkeit der Infektion, der Antibiotikasensibilität, der die rezidivierenden HWIs auslösenden Bakterien, dem Leidensdruck der PatientInnen sowie der zu erwartenden Compliance abhängig gemacht werden (Pietruch-Dilanchian und Hooton 2016).

## **1.4 Ätherische Öle**

Für seit dem Mittelalter verwendete ätherische Öle ist bekannt, dass sie antiseptisch wirken, da bakterizide, viruzide und fungizide Wirkungen beschrieben werden (Bakkali et al. 2008; Reichling et al. 2009). Deshalb wurden sie traditionell u.a. zur Einbalsamierung, Lebensmittelkonservierung und auch als Heilmittel genutzt. Für die Verwendung als Heilmittel spielen auch analgetische, sedative, anti-inflammatorische, spasmolytische und lokalanästhetische Wirkungen eine Rolle. Pflanzen produzieren ihre ätherischen Öle auf der einen Seite zum Schutz vor Bakterien, Viren und Pilzen sowie Insekten und Pflanzenfressern, auf der anderen Seite werden Insekten durch den Geruch angezogen. Dies nützt der Verteilung von Pollen und Samen (Bakkali et al. 2008). Ätherische Öle werden traditionell aus botanisch definierten Pflanzen mittels Wasserdampfdestillation oder Expression (bei Zitrusfrüchten) gewonnen und als

„Medikamente“ der Aromatherapie genutzt. Die Aromatherapie wird als Teilbereich der Phytotherapie den Naturheilverfahren zugeordnet. Da ätherische Öle biosynthetisch in Plastiden und dem Cytoplasma hergestellt und in lipophilen Kompartimenten gelagert oder z.B. über Drüsen abgegeben werden, handelt es sich um lipophile Mehrstoffgemische (Steflitsch et al. 2013). Sie können von jedem Pflanzenteil produziert werden. Dabei enthalten die Mischungen 20 - 60 Komponenten in sehr unterschiedlichen Konzentrationen, darunter meist zwei oder drei Stoffe mit hohen Konzentrationen zwischen 20 - 70% und viele andere Stoffe, die nur in Spuren vorhanden sind (Bakkali et al. 2008). De Groot und Schmidt berichteten von bis zu 400 Inhaltsstoffen pro Öl, die mit den richtigen Methoden identifiziert werden konnten (de Groot und Schmidt 2016a). Unterschiede in Ort und Bedingungen des Wachstums der verwendeten Pflanzen beeinflussen die Wirkstoffzusammensetzung der ätherischen Öle. Dies führt u.a. zu Variationen in den Anteilen der Inhaltsstoffe (Steflitsch et al. 2013). Durchgeführte Studien mit ätherischen Ölen wiesen häufig unterschiedliche Ergebnisse auf - möglicherweise aufgrund der beschriebenen Unterschiede in der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der Pflanzen, die durch andere Wachstumsbedingungen oder auch durch mögliche Unterschiede in der Gewinnung und Lagerung bedingt sein konnten (Sakkas und Papadopoulou 2017). In einer Studie wurde gezeigt, dass das ätherische Öl aus *Litsea cubeba* stärker bakterizid war, wenn sein Anteil an Linalool höher war, als wenn der Anteil an 1,8-cineole in der Pflanze höher war. Diese Unterschiede in der Zusammensetzung der Pflanzenstoffe wurden in der Arbeit durch die Unterschiede in der Höhe und der Region begründet, in der die Pflanzen wuchsen (Nguyen et al. 2018).

#### **1.4.1 Anwendung / Applikation ätherischer Öle**

Phytotherapeutika eignen sich in der Regel gut für langfristig unterstützende Therapien wie z.B. Rezidivprophylaxen oder die Behandlung chronischer Krankheiten. Eine Kombination von synthetischen Medikamenten mit Phytotherapeutika ist vom erfahrungsheilkundlichen Standpunkt aus möglich (Steflitsch et al. 2013). Die Applikation der Öle kann traditionell z.B. über die Schleimhäute, die Lunge oder die Haut erfolgen (Steflitsch et al. 2013). Ätherische Öle können durch das Stratum corneum der Haut diffundieren und in tiefere Hautschichten gelangen. Hierfür nutzen sie verschiedene zum Teil unklare Mechanismen, unter anderem können sie offensichtlich auch durch Zellwand und Cytoplasma der Hautzellen hindurch diffundieren (Herman und Herman 2015). 1992 zeigten Jäger et al., dass bereits innerhalb von fünf Minuten nach einer zehnminütigen Massage des Bauches mit lavendelölhaltigem Massageöl, Spuren von Linalool und Linalyl Acetate im Blut

nachgewiesen werden konnten. Das Massageöl bestand aus Lavendelöl und Erdnussöl im Verhältnis 2:98. Nach der Massage wurde das Öl restlos entfernt. Nach 20 min wurden 121 ng/ml Linalool und 100 ng/ml Linalyl Acetat als maximal nachweisbare Konzentration im Blut nachgewiesen. Nach 90 min war bereits der größte Teil des Lavendeöls eliminiert (W. Jäger et al. 1992). Komeh-Nkrumah et al. zeigten, dass durch die topische Applikation tiefer liegende Areale wie die Gelenke erreicht werden konnten, da ätherische Öle, die in einer Creme topisch appliziert wurden, bei Ratten gegen eine induzierte Arthritis wirksam waren. Diese Wirksamkeit konnte anhand von Entzündungsmarkern im Blut und histologischen Bildern belegt werden (Komeh-Nkrumah et al. 2012). Die Inhaltsstoffe ätherischer Öle beeinflussen sich bezüglich ihrer Permeabilität (Wanderung durch die Haut) gegenseitig. Die Einzelapplikation der Stoffe Eugenol, b-Citronellol und Limonen zeigten eine schlechtere Permeabilität als die Kombination aller drei Stoffe oder jeweils von Eugenol und Limonen bzw. von b-Citronellol und Limonen (Schmitt et al. 2009).

#### **1.4.2 Erfahrungstherapeutische Aromatherapie bei HWIs**

Zur komplementären Anwendung von ätherischen Ölen bei HWIs werden Einreibungen, Bauchmassagen oder Sitzbäder genutzt. Als Trägersubstanz für die Öle wird Johanniskraut-Mazerat ölig oder Ringelblumen-Mazerat ölig empfohlen. Bei der Anwendung als Sitzbad wird das Öl auf Meersalz gegeben (Steflitsch et al. 2013). Als Badezusatz werden 5-10 Tropfen ätherische Öle zu einem Becher eines flüssigen Milchproduktes und dann auf Meersalz als Emulgator in ein Vollbad gegeben. Für ein Teilbad wie z.B. Sitz- oder Fußbad werden nur 3-5 Tropfen ätherisches Öl verwendet. Bei einer Einreibung werden 18 Tropfen ätherische Öle in 30 ml fettes Öl gegeben. Die Einreibung kann 1-3-mal täglich stattfinden. Im Falle einer Zystitis werden die folgenden ätherischen Öle traditionell angewandt: Bergamotteöl (*Citrus aurantium* spp. *bergamia*), Cistrosenöl (*Cistus ladanifer*), Eukalyptusöl (*Eucalyptus globulus* et *radiata* et *staigeriana*), Kamille blau Öl (*Matricaria recutita*), Lavendelöl (*Lavandula angustifolia*), Meerkieferöl (*Pinus pinaster*), Melissenöl (*Melissa officinalis*), Muskatellersalbeiöl (*Salvia sclarea*), Niaouliöl (*Melaleuca viridiflora*), Sandelholzöl (*Santalum album*), Schafgarbenöl (*Achillea millefolium*), Thymianöl (*Thymian vulgaris* Ct Thymol et Thujanol), Wacholderöl (*Juniperus communis*) und Zitroneneukalyptusöl (*Eucalyptus citriodora*). Bei Entzündungen der ableitenden Harnwege werden Meerkieferöl (*Pinus pinaster*), Sandelholzöl (*Santalum album*), Schafgarbenöl (*Achillea millefolium*), Kamille blau Öl (*Matricaria recutita*) und Zitronenöl (*Citrus limon*) genutzt (Steflitsch et al. 2013).

HWIs werden traditionell mit einem Gemisch aus Ölen behandelt. Dabei werden hauptsächlich antiinflammatorische Öle mit hauptsächlich antibakteriell wirkenden ätherischen Ölen gemeinsam angewandt. Als kühlende Mischung wird z.B. Eukalyptus globulos Öl, Myrthe Anden Öl und Teebaumöl zusammen auf Meersalz gegeben und im warmen Sitzbad 1-3-mal pro Tag als Therapeutikum verwandt. Für Myrthenöl wird in der Erfahrungsheilkunde u.a. beschrieben, dass es bei Depressionen, Angstzuständen, Unruhe, Panikattacken und Schlafstörungen wirkt. (Diese Wirkungen scheinen mit Blick auf Kapitel 1.1.1, in dem die psychosozialen Auswirkungen rezidivierender HWIs angedeutet werden, als erstrebenswert.) Als wärmende Mischung würde man Kamille blau Öl, Lavendel extra Öl, Sandelholzöl und Damaszener-Rosenöl 10% verwenden. In dieser Mischung werden für Lavendelöl vielseitige Effekte beschrieben. Neben der antibakteriellen und entzündungshemmenden Wirkung, ist besonders die psychogene Wirkung bei Angstzuständen, zur Entspannung, bei Schmerzen und Schlafstörungen, Stress und Unruhe relevant. Auch Sandelholz wird in der Erfahrungsheilkunde neben der antientzündlichen und antibakteriellen Wirkung eine Wirkung bei Angstzuständen, bakteriellen Infektionen, Depression, Schmerzen und Stress sowie Unruhen zugeschrieben. Damaszener-Rosenöl wird erfahrungsheilkundlich u.a. bei Angst, Schmerzen, Schlafstörungen und Depression sowie zur Entspannung verwendet (Steflitsch et al. 2013).

#### **1.4.3 Wirkmechanismen ätherischer Öle auf Bakterien**

Aufgrund der lipophilen Eigenschaft von Einzelbestandteilen ätherischer Öle (z.B. Terpene, Aromaten und Terpenoide) kommt es zur Einlagerung der Öle in die bakterielle Zellmembran und der Passage der Stoffe durch die Zellmembran. Dies stört die Integrität der Zellmembran (Bakkali et al. 2008; Di Pasqua et al. 2007), welche elementar für das Überleben der Bakterien ist. Die Zellmembran dient als Barriere, dank derer Bakterien einen stabilen pH-Wert einstellen und das elektrische Transmembranpotenzial aufbauen können. Diese ermöglichen wiederum den Aufbau eines elektrochemischen Gradientens, durch den Bakterien ATP gewinnen (Booth 1985; Trumppower und Gennis 1994). Bisher getestete ätherische Öle mit einer starken antibakteriellen Wirkung haben häufig einen hohen Gehalt an Phenolen wie Carvacrol, Eugenol und Thymol. Diese Stoffe führen zu strukturellen und funktionellen Störungen der Zellmembran (Sakkas und Papadopoulou 2017; Sikkema et al. 1995). Helander et al. untersuchten den intrazellulären ATP Pool von *E. coli* Bakterien unter der Behandlung mit Carvacrol und Thymol. Es zeigte sich eine Reduktion des intrazellulären ATP Pools und die Zunahme des extrazellulären ATP Pools, aufgrund der disruptiven Aktivität der Phenole an der Membran (Helander et al. 1998). Auch bei

Bestandteilen des Teebaumöls wie Terpinene-4-ol,  $\alpha$ -terpineol und 1,8-cineole sah man, dass die Zellmembranen und Zellwände von Bakterien angegriffen wurden. Die drei Stoffe störten deren Integrität und führten zum Verlust der Osmoseregulation, von Kaliumionen und von zytoplasmatischen Bestandteilen. Der Effekt zeigte sich sowohl bei gram-negativen als auch bei gram-positiven Bakterien (Carson et al. 2002; Cox et al. 2000). Auch für Linalool wurde gezeigt, dass es zu den bekannten Effekten, wie der Veränderung der Zellmorphologie, der Freigabe von Nukleinsäuren, der Abnahme des Membranpotenzials und der Zerstörung der Atmungskette, kam (Liu et al. 2020).

Neben der Einlagerung lipophiler Bestandteile ätherischer Öle konnte die Applikation von ätherischen Ölen, wie Thymol, Eugenol, Carvacrol, Limonen und Zimtaldehyd, auch zu Veränderungen in den Fettsäuren der bakteriellen Zellmembran führen. Die Zunahme von gesättigten Fettsäuren in der Zellmembran erzeugte dabei einen Anstieg der Rigidität mit Folge der Zellyse (Di Pasqua et al. 2007; Cronan 2003).

#### **1.4.4 Entwicklung von Resistenzen gegen ätherische Öle**

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass eine Entwicklung von Resistenzen durch Bakterien gegen ätherische Öle möglich ist (Lang und Buchbauer 2011). So entwickelte *Salmonella enterica* serovar Senftenberg durch die Behandlung mit Linalool Resistenzen gegen dieses, was zu einem Anstieg der MIC um das acht-fache führte. Diese Resistenzentwicklung konnte auch bei Behandlung mit ätherischem Basilikumöl, *Ocimum basilicum* L., das hohe Konzentrationen an Linalool enthält, festgestellt werden (Kalily et al. 2017). Die Adaption der Bakterien an Linalool führte auch zu Kreuzresistenzen gegen die Antibiotika Trimethoprim, Sulfamethoxazol, Piperacillin, Chloramphenicol und Tetracyclin, wobei die MIC Werte um das 2- bis 32-fache anstiegen. Die erhöhte Resistenz gegen die Antibiotika ging einher mit einer veränderten Zusammensetzung der Fettsäuren der bakteriellen Zellmembran, sowie einem reduzierten Influx und einem erhöhten Efflux. Linalool schien dabei ein potentiell Substrat der AcrAB Efflux Pumpe zu sein (Kalily et al. 2016). AcrAB / TolC Efflux Pumpen werden häufig von Salmonellen überexprimiert, was zu einer erhöhten Antibiotikaresistenz gegen Chinolone, Tetracycline, Ampicillin und Chloramphenicol führt. In der Gegenwart von Linalool kam es weiter zu Veränderungen in der Mobilität der Bakterien und zur Bildung größerer Aggregate (Kalily et al. 2017, 2016).

#### **1.4.5 Antiinflammatorische Effekte ätherischer Öle:**

HWIs werden durch eine Entzündungsreaktion auf die Anwesenheit von Bakterien in den Harnwegen symptomatisch (Naber et al. 2017; Herold 2019). Da eine starke Entzündungsreaktion zu Komplikationen führen kann, sollte die Kontrolle dieser angestrebt werden (Leyva-López et al. 2017). Für bereits bekannte

antiinflammatorische Effekte ätherischer Öle werden im Folgenden verschiedene Beispiele genannt. Terpene wie Thymol und Carvacrolacetat aus den mexikanischen Oregano Spezies *L. graveolens*, *L. palmeri* und *H. patens* konnten die durch Lipopolysaccharid-induzierte Sauerstoffradikal- und Stickstoffmonoxid-Produktion in Makrophagen reduzieren. Außerdem inhibierte Oregano – ähnlich zu Aspirin - nicht selektiv die COX-1 und COX-2 Aktivität. Die COX sind Cyclooxygenasen, die am Arachnidonsäurestoffwechsel und somit der Bildung von Prostaglandinen und Thromboxanen beteiligt sind. COX-2 kommt besonders in entzündetem Gewebe vor und bildet dort Prostaglandine, die die Entzündungsreaktion verstärken (Leyva-López et al. 2016; Leyva-López et al. 2017; DocCheck Medical Services GmbH 2020). Die Reduktion proinflammatorischer Cytokine wie TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und IL-6 in Lipopolysaccharid aktivierten humanen Makrophagen war möglich durch ätherisches Öl von *O. majorana*. Hier wurden als anti-entzündliche Hauptwirkstoffe Terpeneol und Sabinen Hydrat identifiziert (Arranz et al. 2015; Leyva-López et al. 2017). Silva et al. zeigten eine antiinflammatorische Wirkung von ätherischem Lavendelöl im Tierexperiment bei Carrageen induzierter Rippenfellentzündung an Ratten und an einem durch Wunderstrauch induzierten Ohrödem bei Mäusen (Silva et al. 2015). Für Linalool wurde eine, ab der Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht, Dosis unabhängige antiinflammatorische Aktivität bei Carrageen induzierten Ohrödemen an Ratten nachgewiesen. Die AutorInnen vermuteten, dass dies durch die Sättigung der an der Entzündungsreaktion beteiligten Rezeptoren, begründet werden konnte. Für Linalylacetat lag dieser Wert bei 64 mg/kg Körpergewicht. Die AutorInnen vermuteten weiter, dass alle ätherischen Öle, die Linalool und Linalylacetat zu einem relevanten Anteil enthalten, antiinflammatorisch wirken (Peana et al. 2002). Akinyemi et al. zeigten, dass ätherische Öle durch orale Applikation im Versuch an Ratten nephroprotektiv und antiinflammatorisch bei Kadmiumvergiftung wirkten (Akinyemi et al. 2018). Bestandteile der Öle wurden dementsprechend bei oraler Applikation aufgenommen und gelangten, infolge eines unklaren Wirkmechanismus in die Niere. Für Ratten zeigte Parke et al., dass oral appliziertes Linalool als Glucuronsäure Konjugat über Urin und Galle ausgeschieden wurde (Parke et al. 1974).

#### **1.4.6 Nozizeptive Wirkung ätherischer Öle**

Unter Nozizeption versteht man die Wahrnehmung von Schmerzen an Sinnesrezeptoren. Die Empfindungen werden durch Noxen ausgelöst und im Gehirn zu Schmerzen verarbeitet. Dabei kann jegliche Sinnesempfindung bei Steigerung ihrer Intensität einen Schmerzreiz auslösen. Ein akuter Schmerzreiz geht meist mit einer

körperlichen Schädigung einher. Diese Schädigung muss aber nicht objektivierbar sein, da die Empfindung von Schmerzen subjektiv ist (Pape et al. 2014).

Silva et al. konnten zeigen, dass ätherisches Lavendelöl die durch Formaldehyd induzierte Nozizeption bei Ratten beeinflusst. Den Ratten wurde zunächst mit den zu testenden Substanzen (ätherischem Lavendelöl, dem Opioid Tramadol oder dem nicht steroidale Antirheumatikum und COX-Inhibitor Indomethacin) behandelt und erhielten eine Stunde danach eine Formalin Injektion. Hierbei zeigte sich, dass Lavendelöl und Tramadol direkt schmerzlindernd wirkten, Indomethacin jedoch erst nach 10 min. Da Lavendelöl eine zu dem Opioid ähnliche Wirkung hatte, stellte die Arbeitsgruppe in ihrer Diskussion die Überlegung an, dass diese beiden über opioide Neurotransmission wirkten. Die Hauptinhaltsstoffe der *Lavendula augustifolia* waren Linalool und Linalylacetat neben 28 weiteren nachgewiesenen Bestandteilen (Silva et al. 2015). In einer Studie von Gedney et al. erhielten gesunde Probanden 5 Tropfen ätherisches Lavendelöl und ätherisches Rosmarinöl oder destilliertes Wasser als Kontrolle zur 10 minütigen Inhalation. Der Wattebausch mit dem ätherischen Öl verblieb weiterhin 25 cm entfernt von der Nase des Probanden, als begonnen wurde, verschiedene Schmerzreize zu setzen. Die messbare Schmerzwahrnehmung (Herzfrequenz, systolischer und diastolischer Blutdruck, Cortisol im Speichel) wurde durch die Inhalation nicht beeinflusst. Die männlichen Versuchspersonen in der Lavendel Gruppe berichteten im Nachhinein, die Schmerzwahrnehmung sei weniger intensiv gewesen, während die Frauen aus der Lavendel Gruppe angaben, der Schmerz sei weniger unangenehm gewesen. Das Lavendelöl beeinflusst in dieser Studie also die Affekte der ProbandInnen und nicht die Schmerzreaktion auf somatischer Ebene (Gedney et al. 2004).

## 1.5 Zielsetzung

60% aller Frauen erkranken in ihrem Leben mindestens einmal an einer symptomatischen HWI. Rezidivierende HWIs sind mit einer Inzidenz von 1% bis 5% bei jungen Frauen ohne sonstige relevante Begleiterkrankungen eine sehr häufige Erkrankung (Leitlinienprogramm DGU 2017) und gehört auch zu den fünf häufigsten nosokomialen Infektionen in Deutschland (Zacher et al. 2019). Die Belastungen der betroffenen Frauen im Alltag und die Beeinträchtigungen in der Lebensführung sind sehr groß (Flower et al. 2014).

Laut der WHO ist die Zunahme der Antibiotikaresistenzen eine der größten Bedrohungen der weltweiten Gesundheit, da sich durch sie bisher gut behandelbare Infektionen wie HWIs zu lebensbedrohlichen Erkrankungen entwickeln können. Aktuell wird diese Problematik auch dadurch verschärft, dass sich zu wenig Arbeitsgruppen

mit der Suche nach neuen antibakteriellen Stoffen beschäftigen (World Health Organization 2018) und das Antibiotikum gleichzeitig die Haupttherapieoption für all diese PatientInnen ist. Aufgrund der hohen Prävalenz von multiresistenten Erregern müssen deutlich mehr Fälle von Therapieversagen erwartet werden und damit an komplizierten Verläufen, wodurch die Kosten, die durch die Erkrankung verursacht werden, ansteigen.

In dieser Arbeit sollen Alternativen zu Antibiotika bei der Prävention von rezidivierenden HWIs untersucht werden. Es erfolgt eine experimentelle Untersuchung der Monosaccharide D-Mannose und D-Fruktose, auch in Kombination mit Procyanidin A2 aus Cranberry. Im zweiten Teil der Arbeit soll die antibakterielle Wirkung einiger ätherischer Öle erforscht werden.

Im ersten Teil der Arbeit wird experimentell die *in vitro* Überprüfung der Wirksamkeit der handelsüblichen Nahrungsergänzungsmittel D-Mannose und D-Fruktose vorgenommen. Hier soll gezeigt werden, ob die Monosaccharide die Bindung von uropathogenen Bakterien an die Glykokalyx der weiblichen Urothelzellen verhindern können und somit sinnvoll in der Prophylaxe von rezidivierenden HWIs eingesetzt werden können. Weiter soll untersucht werden, ob Antibiotika-resistente uropathogene Bakterien ein anderes Bindungsverhalten an D-Mannose und D-Fruktose zeigen als Antibiotika-sensible Bakterien.

Das Ziel des zweiten Teils der Arbeit ist die experimentelle Untersuchung der antimikrobiellen Wirkung einer Auswahl ätherischer Öle gegen Pathogene, die akute HWIs auslösen. Hierzu sollen die minimal inhibierende Konzentration (MIC) und die minimal bakterizide Konzentration (MBC) gegen ein Spektrum von uropathogenen Bakterien ermittelt werden. Weiter soll eine mögliche additive Wirkung von ätherischen Ölen untereinander und in Kombination mit Antibiotika untersucht werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 1: In der Arbeit verwendete Geräte und ihre Bezugsquelle**

Gerät	Firma
Absaugpipette	Integra
Absaugpumpe	Neo Lab
Ausplattierdrehtisch	Schuett bio tec
Bunsenbrenner	WLD-Tec
CO <sub>2</sub> Inkubator MIDI 40	Thermo Scientific
CO <sub>2</sub> Inkubator	Heracell 150
Feinwaage	Kern
Heizmagnetrührer	Roth
Inkubator Inculine	VWR
Kühlschrank 4°C	Liebherr, Bosch
Kühlschrank - 20°C	Liebherr
Inverses Mikroskop	Motic, Olympus
Neubauer Zählkammer 0,100 mm	Optik Labor
Photometer MultiSkan Go	Thermo Scientific
Pipetten µl	VWR
Pipetten ml	Integra
Pipetboy / elektronische Pipettierhilfe	BRAND
Sterilwerkbank	Thermo Fisher Scientific
Vortexer	LLG-Labware, Scientific Industries
Wasserbad	Julabo

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2: In der Arbeit verwendete Verbrauchsmaterialien und ihre Bezugsquelle**

Material	Firma
D-Mannose, D-Fruktose, D-Glukose Kit	Megazyme
Filtropur S 0,2 Filter	Sarstedt
Handschuhe Nitril white	Vasco
Impfeschlingen	Sarstedt
Objektträger	R. Langenbrinck GmbH
Plättchen für Agardiffusionstest	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
serologische Pipetten	Greiner bio one
Pipettenspitzen µl	Sarstedt
Röhrchen, 15 ml	Greiner
Röhrchen, 50 ml	Greiner
Röhrchen, 2 Stopp 14 ml	Greiner bio- one

Reaktionsgefäß 1,5 / 2 ml	Sarstedt
Spritzen, 10 ml	Braun
Well-Platten, 24-Well	Sarstedt; Orange Scientific
Well-Platten, 96-Well	Greiner bio- one
CAMHB-Agar Platten	Becton & Dickinson

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 3: In der Arbeit verwendete Chemikalien und ihre Bezugsquelle**

Chemikalien	Firma
98% Ethanol vergällt	Sigma Aldrich
Ammoniumchlorid	Serva
Ameisensäure 98%	Acros organics
Backhefe, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Lucullus, Trittau
DMEM	Gibco
FKS	Sigma
Fruktose	Galam
Fosfomycin	Tokyo Chemical Industry
Gelantine (Schweinehaut)	Sigma-Aldrich
Glukose	Roquette
Hanks Salzlösung	Sigma
Harnstoff	Sigma-Aldrich
Isopropanol 99,5%	Acros organics
Kaliumchlorid	Serva
Kaliumdihydrogenphosphat	Serva
Kalziumchlorid	Serva
Pivmecillinam	Sigma Aldrich
Rattenschwanz Kollagenlösung	Cell Applications Inc
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Serva
Mannose	Vivatis Pharma
MTT	Calbiochem
Mueller Hinton 2 Agar	BD
Natriumchlorid	VWR Chemicals
Natriumsulfat	VWR Chemicals
Natriumcitrat	Sigma
Natriumoxalat	Merk
Nitrofurantoin	Cayman Chemical Company
PBS ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , pH 7,4	Neo Froxx
Procyanidin A2	Cayman Chemical Company
Rapsöl	Gut & Günstig
RPMI	Gibco
Trypsin	Sigma

## 2.1.4 Öle

**Tabelle 4: In der Arbeit verwendete Öle und die Bezugsquellen**

Öl	Firma
Aprikosenkernöl bio ( <i>Prunus armeniaca</i> , Frankreich)	NCM GmbH, Oberhaching
Cajeput extra <sup>1</sup> ( <i>Melaleuca Leucadendron</i> , Kambodscha)	PRIMAVERA, Mittelberg
Johanniskrautöl ( <i>Hypericum perforatum</i> , Albanien)	La Vita, Kempen
Latschenkiefer <sup>1</sup> ( <i>Pinus Mugo Leaf</i> , Österreich)	PRIMAVERA, Mittelberg
Lavendel fein bio <sup>1</sup> ( <i>Lavandula Angustifolia</i> )	PRIMAVERA, Mittelberg
Lemongrass bio <sup>1</sup> ( <i>Cymbopogon Flexuosus</i> , Nepal)	PRIMAVERA, Mittelberg
Mandarine rot <sup>1</sup> ( <i>Citrus Nobilis</i> , Italien)	PRIMAVERA, Mittelberg
Mandelöl ( <i>Prunus amygdalus dulcis</i> )	La Vita, Kempen
Muskatellersalbei <sup>1</sup> ( <i>Salvia Sclarea</i> , Frankreich)	PRIMAVERA, Mittelberg
Myrthe Anden bio <sup>1</sup> ( <i>Myrtus Communis</i> , Peru)	PRIMAVERA, Mittelberg
Pfefferminze bio <sup>1</sup> ( <i>Mentha piperita</i> , Indien)	PRIMAVERA, Mittelberg
Rosmarin Campher bio <sup>1</sup> ( <i>Rosmarinus officinalis</i> , Spanien)	PRIMAVERA, Mittelberg
Salbei bio <sup>1</sup> ( <i>Salvia officinalis</i> , Bosnien)	PRIMAVERA, Mittelberg
Sesamöl ( <i>Sesam Indicum Seed</i> , China)	TAOASIS, Detmold
Teebaum bio <sup>1</sup> ( <i>Melaleuca alternifolia</i> , Australien)	PRIMAVERA, Mittelberg
Thymian Linalool bio <sup>1</sup> ( <i>Thymus vulgaris</i> c.t. Linalool, Spanien)	PRIMAVERA, Mittelberg
Zedernholz <sup>1</sup> ( <i>Juniperus Mexicana</i> , USA)	Spinnrad, Bad Segeberg
Zitrone bio <sup>1</sup> ( <i>Citrus Limon</i> , Argentinien)	PRIMAVERA, Mittelberg

<sup>1</sup> – ätherisches Öl

## 2.1.5 Medien

### 2.1.5.1 Artifiziereller Urin

Zur Herstellung des Artifizierellen Urins wurden die in Tabelle Nr. 5 aufgeführten Inhaltsstoffe verwendet.

**Tabelle 5: Inhaltsstoffe von artifiziellem Urin**

Inhaltsstoff	Menge in Gramm pro Liter
Kalziumchlorid	0,49
Magnesiumchlorid Hexahydrat	0,65
Natriumchlorid	4,60
Natriumsulfat	2,30
Natriumcitrat	0,65
Natriumoxalat	0,02
Kaliumdihydrogenphosphat	2,8
Kaliumchlorid	1,6
Ammoniumchlorid	1,0

Harnstoff	25,0
Gelatine	5,0

Der pH-Wert des artifiziellen Urins wurde vor der Sterilisation durch Filtration durch einen 0,22 µm Kapsel-Filter auf 6,1 eingestellt. Tryptic soy broth (TSB) wurde separat durch Autoklavieren sterilisiert und dann zum bereits sterilen Rest in der entsprechenden Konzentration von 10 g/l zugefügt (Stickler DJ, Morris NS & Winters C. 1999).

### 2.1.5.2 Schafsblutagarplatten

Zur Herstellung der Schafsblutagarplatten wurde Müller-Hinton Agar mit 5% Schafsblut gemischt und dann in rechteckige Platten gegossen.

### 2.1.6 Eukaryotische Zellen

Die in dieser Arbeit genutzten weiblichen Urothelzellen T24 entstammten der deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur (DSZM).

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

Die Lagerung aller Bakterien erfolgte in Glycerinkulturen in Flüssigstickstoff oder im -80°C Tiefkühlschrank. Zu Beginn jeder Versuchsreihe wurden sie durch Ausstreichen mittels einer Impföse auf eine Müller-Hinton-Agar-Platte übertragen. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C auf der Platte an und wurden ab dem nächsten Tag für 4 Wochen im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Alle 4 Wochen wurden neue Platten ausgestrichen.

**Tabelle 6: Liste aller in der Arbeit verwendeten Bakterien**

Stamm	Sequenztyp	Resistenz	Erhalten von:
Antibiotika sensitive Stämme			
<i>Escherichia coli</i> CHD1	ST93		klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>E. coli</i> CHD3	ST73		klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>E. coli</i> CHD22	ST69		klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>E. coli</i> CHD94	ST131		klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>E. coli</i> UTI89	ST95		Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkultur (DSMZ)
<i>E. coli</i> ATCC25922			American Type Culture Collection (ATCC)

<i>Klebsiella pneumoniae</i> 595WT			Klinisches Isolat, Klinikum St.Elisabeth Straubingen
<i>K. pneumoniae</i> CHD67			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>K. pneumoniae</i> CHD99			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>Proteus Mirabilis</i> CHD72			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>P. mirabilis</i> CHD76			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>Enterobacter cloacae</i> CHD57			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>E. cloacae</i> CHD60			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853			ATCC
<i>P. aeruginosa</i> CHD80			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>P. aeruginosa</i> CHD81			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>Enterococcus faecalis</i> CHD30			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>E. faecalis</i> CHD31			Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> Ho94			Klinisches Isolat, Klinikum St.Elisabeth Straubingen

---

Antibiotika-resistente Stämme

---

<i>E. coli</i> H75	ST131	ESBL/ <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>E. coli</i> CHD16	ST131	ESBL/ <i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-1B</sub>	Klinisches Isolat, UKGM Gießen
<i>E. coli</i> IR3		Carbapenem / <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Klinisches Isolat, Klinikum St.Elisabeth Straubingen
<i>E. coli</i> 1949820		Fluoroquinolone	Klinisches Isolat, Klinikum St.Elisabeth Straubingen
<i>E. coli</i> CDF2	ST131	Colistin / <i>mcr-1</i>	Klinisches Isolat aus Blut; Schweiz; Patrice Nordmann
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705		Carbapenem / <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	ATCC

Die Anlage von Übernachtkulturen der Bakterien erfolgte als ein- oder mehrtägige Übernachtkulturen. Für die Übernachtkulturen für eine Nacht wurden in einem 14 ml Röhrchen mit 2-Positions-Belüftungsstopfen 3 ml artifizieller Urin vorgelegt. Darin wurde mittels einer Impföse eine Bakterienkolonie des gewünschten Bakterienstammes von einer Agar-Platte aus dem Kühlschrank übertragen und gevortext. Die Inkubation des Röhrchens fand über Nacht im Brutschrank bei 37°C stehend statt. Hierbei saß der Deckel in der Belüftungsposition. Um eine Übernachtkultur für eine zweite Nacht zu erstellen, wurde die bereits eine Nacht inkubierte Suspension zunächst gevortext. Dann wurden daraus 15 µl entnommen und diese wurden in ein neues 14 ml Röhrchen mit 3 ml frischem artifiziellem Urin überführt. Das Röhrchen inkubierte erneut eine Nacht bei 37°C stehend mit dem Deckel in Belüftungsposition. Um eine dritte Übernachtkultur anzulegen, fand eine Wiederholung des Prozesses zur Anlage der zweiten Übernachtkultur statt – mit dem Unterschied der Entnahme von 15 µl aus der zweiten Übernachtkultur.

### **2.2.2 Umgang mit T24 Zellen**

Die weiblichen Urothelzellen T24 wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> auf 10 cm Platten mit 10 ml DMEM + 10% FKS gehalten. Alle 2-4 Tage wurden sie gesplittet und auf eine neue Platte aufgebracht oder für die Durchführung eines Versuchs, z.B. des Adhärenz-Assays, auf eine 24-Well Platte übertragen. Die Verdopplungsgeschwindigkeit der Zellen lag bei 24-48 h.

Um die Zellen von der 10 cm Platte abzulösen, wurden sie erst mit 4 ml Hanks-Lösung gewaschen. Darauf folgte die Zugabe von 2 ml Trypsin. Die Zellen inkubierten 20 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Wirkung des Trypsins stoppte anschließend durch die Zugabe von DMEM +10% FKS, da dieses Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> enthielt und diese Ionen die Wirkung des Trypsins blockierten. Durch Auf- und abpipettieren wurden die Zellen mit dem frischen Medium gemischt und anschließend entweder auf 10 cm Platten ausgesät oder genutzt, um eine 24-Well Platte für einen Versuch vorzubereiten. Um die T24 Zellen auf die 24-Well- Platten auszusäen, fand zunächst die Bestimmung der Zellzahl statt. Hierfür wurde die Zellsuspension 1:5 in Medium gemischt und aus dem Gemisch wurden 10 µl auf die Neubauer Zählkammer gegeben. Die Auszählung der Zellzahl erfolgte unter dem Mikroskop mit anschließender Berechnung der Konzentration der Zellen in der Suspension. Die Aussaat der Zellen fand nachfolgend mit einer Konzentration von 5x10<sup>5</sup> Zellen pro Well in einer 24-Well Platte statt. Zur

gleichmäßigen Verteilung der Zellen wurde die Platte vorsichtig geschwenkt und inkubierte dann bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.2.3 MTT-Assay**

Die Durchführung des 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assays diente der Überprüfung der metabolischen Aktivität der T24-Zellen unter bestimmten Bedingungen.

Die Zellen wurden am Vortag mit  $5 \times 10^5$  Zellen/Well in einer 24-Well Platte ausgesät. Am Morgen wurden die Zellen 1x mit Hanks gewaschen und anschließend wurde 500 µl/Well der zu testenden Medien (humaner Urin oder artifizieller Urin +/- 1% D-Mannose/ D-Fruktose oder D-Glukose bzw. artifizieller Urin + ätherisches Öl) oder DMEM + 10% FKS als Kontrolle zu den Zellen gegeben. Darauf folgte nach unterschiedlichen Inkubationszeiten eine mikroskopische Betrachtung der Zellen und anschließend eine Abnahme des Überstands und die Zugabe von 500 µl DMEM + 0,5 mg/ml MTT pro Well. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das MTT-haltige Medium abgenommen und die entstandenen Farbkristalle durch Zugabe von 500 µl/Well Isopropanol + 5% Ameisensäure gelöst. Aus jedem Well wurden je dreimal 100 µl in eine 96-Well Platte überführt und im Photometer die Absorption bei 560 nm gemessen.

### **2.2.4 Wachstumskurven für Bakterien**

Zur Ermittlung der Wachstumskurven der Bakterienstämme wurden Übernachtskulturen der Bakterien 1:100 in 2 ml artifiziellm Urin verdünnt. Weiter erfolgte die Vorlage von 15 µl der 10% D-Mannose/ D-Fruktose oder D-Glukose in die Wells einer 96-Well Platte. In die Kontrollwells (Wachstum ohne Zucker) wurde entsprechend 15 µl Wasser vorgelegt. Anschließend folgte die Zugabe von 135 µl der in artifiziellm Urin verdünnten Bakterienkulturen. Zwei Wells wurden mit 150 µl artifiziellm Urin als negativ Kontrolle präpariert. Die Platte inkubierte bei 37°C und zu den Zeitpunkten 0, 1, 2, 4, 5, 6 und 24 h nach Versuchsbeginn wurde die Absorption bei 600 nm im Photometer gemessen.

### **2.2.5 Adhärenzassay**

Zur Vorbereitung des Adhärenzassays fand 3 Tage vor dem Versuchsbeginn die Aussaat der T24 Zellen mit  $5 \cdot 10^5$  Zellen/Well in einer 24-Well Platte statt. Die Übernachtskultur der Bakterien wurde am Vortag in artifiziellm Urin angesetzt.

Am Versuchstag erfolgte die Beurteilung des Zustands der Zellen unter dem Mikroskop und es wurde geprüft, ob sich in dem Zellrasen keine offenen Stellen befanden. Dann wurden die Zellen einmal mit Hanks-Lösung gewaschen. Ein Well diente zum Zählen,

alle anderen Wells erhielten frisches Medium. Zur Erstellung der 10% Zuckerstocklösungen wurden 100 mg Zucker in 1 ml MQ-Wasser gelöst und durch einen 0,22 µm Filter steril filtriert. Diese Lösung lagerte dann dauerhaft im Kühlschrank. Die Übernachtskultur mit dem entsprechenden Bakterienstamm wurde von ca.  $1 \times 10^9$  KBE/ml auf ca.  $2 \times 10^7$  KBE/ml verdünnt. Hierfür diente eine 1:50 Verdünnung in artifiziellem Urin. Für den Versuch wurde das Medium der Zellen durch 500 µl/Well artifiziellem Urin ausgetauscht. Anschließend wurde D-Mannose oder D-Fruktose in einer Endkonzentration von 1/ 0,1/ 0,01 & 0,001% und D-Glukose in einer Endkonzentration von 1% zu den Zellen gegeben. Zusätzlich wurden 50 µl der vorher verdünnten Bakterienübernachtskulturen zu den Wells gegeben. Auf diese Weise fand die Durchführung des Versuchs immer mit ca.  $1 \times 10^6$  KBE/Well bei ca.  $7 \times 10^5$  Zellen/Well statt, was einer MOI von ungefähr 1 entsprach. Als Kontrolle wurden Zellen mit Bakterien ohne Zugabe von Zuckern infiziert. Zur Bestimmung des Inokulums wurde die verdünnte Bakterien-Übernachtskultur weiter bis  $10^{-4}$  in PBS verdünnt und 50 µl davon auf je zwei Müller-Hinton-Agarplatten ausplattiert. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C und wurden am nächsten Tag ausgezählt. Das so bestimmte Inokulum lag bei allen Versuchen zwischen  $5,8 \times 10^5$  und  $8,325 \times 10^5$  KBE/Well. Die 24-Well Platte wurde geschwenkt und für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend synchronisierte die Infektion durch Zentrifugation der Platte für 3 min bei 600 g. Dann inkubierte die Platte für weitere 30 min. Nach Abschluss der Inkubationszeit wurden die Zellen mikroskopisch betrachtet und 3x mit ca. 300 µl PBS gewaschen, um nicht adhärenente Bakterien zu entfernen. Schwenken der Platten bei jedem Waschschrift diente der Ablösung nicht adhärenenter Bakterien. Es folgte die Zugabe von 200 µl Trypsin pro Well, um die Zellen abzulösen. Nach der Inkubationszeit von 20 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> stoppte die Reaktion durch Zugabe von 300 µl DMEM ab und die 24-Well Platte wurde gevortext. Anschließend wurden die Ansätze auf  $10^{-2}$  bis  $10^{-4}$  in PBS verdünnt und mit je 3 x 20 µl Tropfen auf einer Agar-Platte ausplattiert. Die Agar-Platten inkubierten über Nacht bei 37°C, bevor die Kolonien am nächsten Tag ausgezählt wurden.

Die Beschreibungen verschiedener in der Arbeit vorgenommenen Modifikationen des Essays werden in den Kapiteln 2.2.5.1 bis 2.2.5.3 dargestellt.

### **2.2.5.1 Adhärenzassay mit im Transwell System gewachsenen T24-Zellen**

Um sich der anatomischen Struktur des Blasenepithels anzunähern wurde ein Versuchsansatz auf einem Transwell System gewählt. Das Transwell System ermöglichte die Aussaat der Zellen auf einer semipermeablen Membran mit basolateraler Nährstoffversorgung. Zunächst fand das Coating der oberen Kammer

des Transwell Systems mit 5 µg/cm<sup>2</sup> Kollagen-Lösung statt. Nach Zugabe des Kollagens inkubierte dies 2 h bei 37°C. Im Anschluss folgte die Abnahme überschüssiger Flüssigkeit und das einmalige Waschen der Kammer mit PBS oder Medium. Im nächsten Schritt wurden 1,5 ml Medium in die untere Kammer vorgelegt und die bereits abtrypsinieren und gezählten Zellen mit einer Konzentration von 5,7x10<sup>4</sup> Zellen/Transwell System in die obere Kammer gegeben. Die Zellen inkubierten anschließend bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 7 Tage. Alle 2-3 Tage wurde das Medium gewechselt. In die untere Kammer kamen 1,5 ml und in die obere 0,5 ml Medium. Nach 6 Tagen Inkubation wurde das Medium in der oberen Kammer durch artifiziellen Urin ersetzt. Während der letzten 24 h Inkubationszeit passten sich die Zellen an ihre Umgebung an und näherten sich in ihrer Morphologie möglicherweise natürlichem Urothel an. Zur Überprüfung, ob die 24 h Inkubation mit artifiziellen Urin Auswirkungen auf die Zellviabilität hatte, diente die Durchführung eines MTT Assays.

Zur Untersuchung der Adhärenzinhibierenden Eigenschaft von D-Mannose wurde am Versuchstag frischer artifizieller Urin in die obere Kammer und DMEM in die untere Kammer des Transwell Systems gegeben. 50 µl einer 1:50 verdünnten Bakterienübernachtskultur wurden mit und ohne D-Mannose in die obere Kammer zu den Zellen gegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>, mit Synchronisation der Infektion nach 30 min, wurden die Zellen gewaschen, abtrypsinieren, in PBS verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. In diesem Versuchsmodell wurden die Bakterien *E. coli* CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89 getestet. Die verwendeten D-Mannosekonzentrationen waren 1% und 0,1%.

#### **2.2.5.2 Adhärenzassay mit Abwaschen der adhärenter Bakterien durch D-Mannose**

Die T24-Zellen wurden, wie in 2.2.5 beschrieben, mit den Bakterien mit und ohne D-Mannose infiziert. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen mit 300 µl artifiziellen Urin mit und ohne D-Mannose gewaschen. Anschließend fand die Ablösung der Zellen durch Trypsinbehandlung statt, sowie weiter die Verdünnung in PBS und das Ausplattieren, welches die Zählung adhärenter Bakterien ermöglichte. In diesem Versuchsmodell wurden die Bakterien *E. coli* CHD1, CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89 getestet. Die verwendeten D-Mannosekonzentrationen waren 1% und 0,1%.

#### **2.2.5.3 Testung der Kombination aus D-Mannose und Procyanidin im Adhärenzassay**

In diesem Versuchsansatz wurde die Kombination von D-Mannose mit Procyanidin A2 getestet. Hierbei wurden D-Mannose (1% und 0,1%) und 10 µg/ml Procyanidin A2 allein oder in Kombination zu den T-24-Zellen gegeben. Darüber hinaus gab es keine Veränderungen am Versuchsansatz in Kapitel 2.2.5. Die Bakterienstämme *E. coli* CHD1 und CHD22 wurden zur Versuchsdurchführung gewählt.

### **2.2.6 Hefe-Agglutinationsassay**

Die Durchführung des Hefe-Agglutinationsassays diente der Auswahl von Bakterienstämmen für den Adhärenzassay, da hierbei die Bestimmung D-Mannose-sensitiver Adhärenz möglich war. Typ-1 Pili von z.B. *E. coli* Bakterien binden an D-Mannose- haltige Oberflächenproteine von Epithelzellen. Da auch Hefen solche Oberflächenproteine besitzen, kommt es zur Agglutination bei Zugabe von Bakterien mit Typ-1- Pili Hefepilzen. Durch Zugabe von D-Mannose im Überschuss wird diese Agglutination inhibiert (Eshdat et al. 1982).

Am Vortag wurden Übernachtskulturen der zu testenden Bakterien in artifiziellem Urin angesetzt und am Versuchstag eine 2% Hefesuspension hergestellt. Dies erfolgte durch Lösen von 20 mg handelsübliche Trockenhefe in 1 ml PBS. Die Hefesuspension wurde auf zwei Reaktionsgefäße mit je 500 µl aufgeteilt. In eins der Reaktionsgefäße wurde D-Mannose mit einer Endkonzentration von 10% gegeben. 1 ml der Bakterien Übernachtskultur wurde in ein Reaktionsgefäß überführt und dann 2 min bei 14.000 g zentrifugiert. Nach Abnahme des Überstandes folgte die Aufnahme des Pellets in 1 ml PBS. Ein mit Ethanol gereinigter Objektträger wurde mit je 5 µl 2% Hefesuspension mit oder ohne D-Mannose benetzt. Anschließend wurden 5 µl Bakteriensuspension zur Hefe gegeben und durch Auf- und abpipettieren gemischt. Das Gemisch inkubierte 10 min bei Raumtemperatur. Zum Schluss erfolgte leichtes Schütteln der Objektträger, um die Agglutination optisch besser sichtbar zu machen.

### **2.2.7 Zuckernachweis**

Mittels des D-Mannose/D-Fruktose/D-Glukose Assay Kits von Megazyme wurde die Sortenreinheit der erhaltenen Zucker überprüft. In dem Kit wurden die Zucker D-Mannose, D-Fruktose und D-Glukose von dem Enzym Hexokinase unter Reaktion von ATP (Adenosintriphosphat) zu ADP (Adenosindiphosphat) zu D-Mannose-6-Phosphat, D-Fruktose-6-Phosphat und D-Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Fruktose-6-Phosphat wurde durch zusätzliche Zugabe der Phosphoglucoisomerase (PGI) zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Eine weitere Zugabe von Phosphomannose-isomerase (PMI) wandelte Mannose-6-Phosphat zu Fruktose-6-Phosphat um, welches dann durch PGI wiederrum weiter zu Glukose-6-Phosphat umgewandelt wurde. Mit

Hilfe des Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) oxidierte NADP<sup>+</sup> Glukose-6-Phosphat weiter zu 6-Phosphogluconsäure, wobei NADPH + H<sup>+</sup> entstand. Die Zunahme an NADPH + H<sup>+</sup> konnte durch die Absorption bei 340 nm im Photometer gemessen werden und korreliert mit den Ausgangsmengen an D-Glukose, D-Fruktose und D-Mannose.

Die Durchführung entsprach dem Herstellerprotokoll. Zunächst wurden 10 mg Zucker in 1 ml H<sub>2</sub>O gelöst. Dies wurde 1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt. Der in dem Kit enthaltene Standard enthielt alle drei Zucker ebenfalls in der Konzentration von 0,1 mg/ml. Im 96-Well Format wurden dann in alle Wells 215 µl H<sub>2</sub>O vorgelegt und 30 µl Puffer sowie 30 µl NADP + ATP-Lösung hinzugefügt. 15 µl der Proben wurden in die jeweiligen Wells gegeben. Als negativ Kontrolle diente H<sub>2</sub>O und als positiv Kontrolle der Zuckerstandard aus dem Kit. Die Platte wurde gemischt und 3 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption im Photometer bei 340 nm gemessen (A1). Danach wurden in alle Wells 3 µl Hexokinase-G6PDH gegeben, gemischt und für 5 min inkubiert. Im Anschluss wurde bei 340 nm die Absorption gemessen (A2). Im nächsten Schritt wurde 3 µl PGI in alle Wells hinzugegeben, es wurde gemischt und erneut für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die erneute Messung der Absorption bei 340 nm (A3) und die anschließende Zugabe von 3 µl PMI in alle Wells. Alle Wells wurden gemischt, 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und zum Abschluss wurde die Absorption bei 340 nm gemessen (A4). Die Differenz aus A2-A1 ergibt hierbei den Absorptionswert für Glukose, die Differenz aus A3-A2 für D-Fruktose und A4-A3 für D-Mannose.

### **2.2.8 Agardiffusionsassay**

Die antimikrobielle Aktivität verschiedener ätherischer Öle gegenüber den *E. coli* Stämmen CHD1, CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89 wurde mittels Agardiffusionsassay getestet. Die Übernachtskulturen der Bakterien wurden von 1x10<sup>9</sup> KBE/ml auf 1x10<sup>7</sup> KBE/ml in PBS verdünnt. Von der Verdünnung wurden 100 µl auf eine Agarplatte aufgetragen. Danach wurden Filterpapierplättchen mit einem Durchmesser von 6 mm auf die Agarplatte aufgelegt. Auf jedes Filterpapierplättchen wurden 10 µl ätherisches Öl pur (entspricht 100%), verdünntes ätherisches Öl oder Antibiotikum gegeben. Im Versuch wurden die ätherischen Öle in Rapsöl auf die Konzentrationen 50%, 25% und 12,5% verdünnt und getestet. 10 µg/ml des Antibiotikums Gentamicin wurde als positiv Kontrolle und pures Rapsöl als Negativkontrolle genutzt. Die Agar-Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert und am folgenden Tag wurden zur Auswertung die Durchmesser der Hemmhöfe um die Filterpapierplättchen mit einem Lineal in mm ausgemessen.

### **2.2.9 Bestimmung der minimalen inhibierenden / bakteriziden Konzentration**

Die Bestimmung der MIC sowie der MBC für definierte Substanzen mit definierten Bakterienspezies wurde in dieser Arbeit mittels Mikrodilutionstest durchgeführt. Die MIC ist definiert als die geringste Konzentration eines antimikrobiellen Stoffes, der das sichtbare Wachstum von Bakterien bis zum Endpunkt einer Übernachtinkubation hemmt (Zhang et al. 2014). Die MBC ist die geringste Konzentration, die in der Lage ist, 99,9% der eingesetzten Bakterien abzutöten. Bei der Bestimmung von MIC und MBC für ätherische Öle wird oft anstelle von g/mL eine Angabe in Prozent [%] genutzt, da die Dichte der Öle variiert. Auch die Dichte der in dieser Arbeit verwendeten Öle variiert, wie aus den angehängten Analysezertifikaten zu entnehmen ist. Für das ätherische Cajeputöl wird eine Dichte von 0,914 g/ml, für das ätherische Lemongrassöl eine Dichte von 0,889 g/ml, für das ätherische Teebaumöl eine Dichte von 0,893 g/ml und für das ätherische Thymianöl werden je nach Wachstumsort eine Dichte von 0,862 g/ml sowie 0,867 g/ml angegeben. Um trotzdem eine Vergleichbarkeit der Konzentrationen der Öle und somit eine Vergleichbarkeit ihrer Wirksamkeit herzustellen werden die Angaben bzgl. der Konzentration in dieser Arbeit in Prozent dargestellt, wobei sich die Prozentzahl auf die Menge des Öls im Gemisch bezieht.

Zur Durchführung des Mikrodilutionstests wurden die ätherischen Öle zunächst im Verhältnis 1:1 mit 98%-Ethanol verdünnt. Diese Lösung wurde dann weiter in artifiziellm Urin verdünnt, um eine 10%ige Lösung von ätherischen Ölen im Gemisch zu erhalten - hierbei wurden also 0,0457 g/mL Cajeputöl, 0,04445 g/mL Lemongrassöl, 0,04465 g/mL Teebaumöl und 0,0431 bzw. 0,04335 g/mL als Ausgangskonzentrationen genutzt. Die Bakterienübernachtskultur wurde 1:100 in artifiziellm Urin verdünnt. Eine 96-Well Platte wurde vorbereitet, indem 140 µl artifizieller Urin in alle Wells, außer in die Wells der obersten Reihe, gegeben wurde. In die oberste Reihe wurden 280 µl des 10%igen ätherischen Öls gegeben. Dann wurde für eine serielle 2-fach Verdünnung mithilfe einer Mehrkanalpipette aus jedem Well der ersten Reihe 140 µl entnommen und in die zweite Reihe überführt. Dort wurde das Gemisch durch Auf- und abpipettieren gemischt und wiederum 140 µl in die nächste Reihe überführt. Der Überstand aus der vorletzten Reihe wurde verworfen, so dass sich in jedem Well nur 140 µl artifizieller Urin befand. In der letzten Reihe befand sich artifizieller Urin ohne ätherisches Öl als Kontrolle. Weiter wurden in jedes Well 10 µl der 1:100 verdünnten Bakterienübernachtskultur gegeben (Endkonzentration ~  $6,66 \times 10^5$  KBE/ml). Dabei wurde immer ein Stamm in eine Spalte gegeben. Die 96-Well Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Bakterienwachstum anhand der vom Bakterienwachstum abhängigen Eintrübung für

jedes einzelne Well durch das Photometer bestimmt. Die Messung im Photometer fand bei 600 nm statt.

Anschließend wurden je 3 µl aus allen Wells der 96-Well Platten mittels eines Stempels auf eine Schafsblutagar Platte überführt. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden gewachsene Kolonien durch Fotografieren dokumentiert.

### **2.2.10 Checkerboard-Assay**

Der Checkerboard-Assay wurde durchgeführt, um mögliche synergistische, additive, indifferente oder antagonistische Effekte zwischen verschiedenen ätherischen Ölen und auch ätherischen Ölen und Antibiotika zu untersuchen.

Auf einer 96-Well-Platte wurde in alle Wells mit nur einer zu testenden Substanz 15 µl artifizierlicher Urin vorgelegt. In das Well der negativ Kontrolle kamen 150 µl und in das der positiv Kontrolle 30 µl. Von den zu testenden Substanzen wurden Verdünnungsreihen in Reaktionsgefäßen mit artifiziellem Urin angelegt. Hierbei wurden die Substanzen 10-fach konzentrierter angesetzt, als sie später im Well benötigt wurden, da sie im Well nochmal 1:10 verdünnt wurden. 15 µl der einzelnen Verdünnungen wurden in die jeweiligen Wells gegeben. Dabei Substanz 1 entlang der Abszisse und Substanz 2 entlang der Ordinate. Die Endkonzentrationen im Well betragen bei den Kombinationen von den ätherischen Ölen untereinander für Teebaumöl 1,25-0,02%, für Thymianöl 0,625-0,02% und für Cajeputöl 2,5-0,08%. Für den Checkerboard-Assay in dem die ätherischen Öle mit den Antibiotika kombiniert wurden, wurde 1,25-0,02% Teebaumöl und 0,625-0,02% Thymianöl verwendet. Von den Antibiotika wurden folgende Konzentrationen benutzt: Nitrofurantoin 128-0,5 µg/ml, Fosfomycin 64-2 µg/ml und Pivmecillinam 64-0,125 µg/ml. Bakterien aus einer Übernachtkultur wurden 1:1000 in artifiziellem Urin verdünnt. Daraus wurden 120 µl in alle Wells außer der negativen Kontrolle gegeben. Die Platten wurden bei 37°C inkubiert und nach 24 h bei 600 nm im Photometer gemessen.

Zur Auswertung des Versuchs wurde zunächst die MIC bestimmt. Weiter wurde die FIC, die *fractional inhibitory concentration*, durch Bildung des Quotienten aus MIC der Substanz in Kombination mit der MIC der Substanz allein berechnet. Dann konnte hieraus weiter der FICI, der Fractional inhibitory concentration index, durch Addition von FIC der Substanz A und FIC der Substanz B bestimmt werden.

Abschließend wurden je 3 µl aus allen Wells der 96-Well Platten mittels eines Stempels auf Schafsblutagar Platten überführt. Die Platten inkubierten über Nacht bei 37°C. Am folgenden Tag wurden gewachsene Kolonien durch Fotografieren dokumentiert. Diese Daten dienen der Bestimmung der MBC. Nun konnten analog zur Bestimmung von FIC und FICI auch die FBC und die FBCI bestimmt werden. Hierzu wurde die FBC, die

fractional bactericidal concentration, aus dem Quotienten der MBC der Substanz in Kombination mit der MBC der Substanz allein gebildet. Hieraus konnte der fractional bactericidal concentration index, FBCI, berechnet werden. Dieser wurde durch die Addition von FBC der Substanz A und FBC der Substanz B bestimmt. Bei einem  $FICI/FBCI \leq 0,5$  lag ein Synergismus vor, bei einem  $FBCI > 0,5 - 1$  ein additiver Effekt und bei einem  $FICI/FBCI > 1$  bis  $< 2$  ein indifferenter Effekt. Bei einem  $FICI/FBCI \geq 2$  handelte es sich um einen Antagonismus.

### **2.2.11 Auswertung der Daten**

Alle gesammelten Daten wurden mit Microsoft Office Excel 2007 ausgewertet.

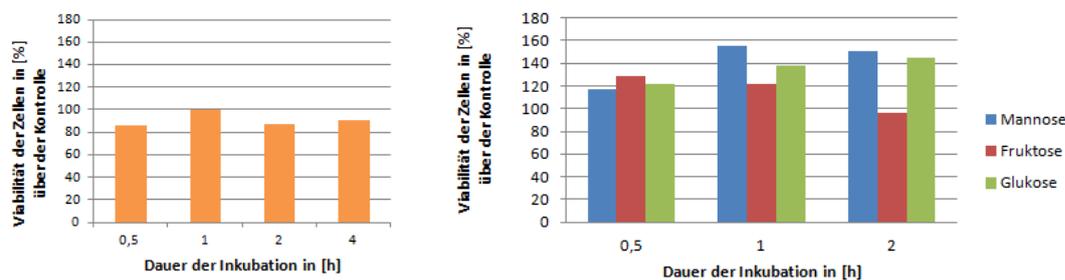
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Vorversuche:

#### 3.1.1 Einfluss von artifiziellem Urin und Zucker auf die Viabilität der Blasenellen

Als Vorversuch wurden MTT-Assays durchgeführt, um die Viabilität der Urothelzellen unter den Versuchsbedingungen zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass die metabolische Aktivität der T24-Zellen nach Behandlung mit artifiziellem Urin während der Inkubationsdauer von 0,5 h – 4 h im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle zwischen 86,4% bis 100% lag (Abb. 1).

Die metabolische Aktivität bei der Behandlung der T24 Blasenellen mit den Monosacchariden D-Mannose und D-Glukose zeigten jeweils einen Anstieg der metabolischen Aktivität der Zellen. Bei der Behandlung mit D-Mannose stieg die Viabilität der Zellen im Vergleich zur Kontrolle von 116,55% nach 30 min auf 150,51% nach 2 h an. Bei D-Glukose lagen die entsprechenden Werte zwischen 122,17% und 145,16%. Für D-Fruktose konnte ein Abfall der metabolischen Aktivität von 128,38% nach 30 min auf 95,89% nach 2 h gemessen werden.



**Abbildung 1: Metabolische Aktivität der T24 Zellen nach Behandlung mit artifiziellem Urin und Monosacchariden.** T24-Zellen wurden für 0,5 – 4h mit artifiziellem Urin (links) und mit D-Mannose, D-Fruktose oder D-Glukose (rechts) behandelt. Die Viabilität wurde anschließend mittels MTT-Assay bestimmt. Zellen in DMEM-Medium ohne artifiziellem Urin ohne Zusatz von Monosacchariden dienten als Kontrolle und entsprechen 100 %.

#### 3.1.2 Ergebnisse des Zuckernachweises

Zum Nachweis der Monosaccharide D-Glukose, D-Fruktose und D-Mannose wurde das Assay Kit von Megazyme genutzt. Die Anwendung des Assays auf die drei bereit gestellten Monosaccharidpulver zeigte keine Kontaminationen mit den jeweils anderen Zuckern. Das D-Mannosepulver enthielt demnach keine messbaren Mengen an D-Fruktose oder D-Glukose. Auch im D-Fruktose- und D-Glukosepulver konnte keiner der beiden anderen Zucker nachgewiesen werden. Somit konnte gezeigt werden, dass es sich bei den verwendeten Monosacchariden jeweils um Reinstoffe handelte.

### 3.1.3 Identifikation D-Mannose-sensitiver Stämme mittels Hefeagglutinationsassays

Um zu bestimmen, welche der genutzten Bakterienstämme Typ-1 Pili exprimierten bzw. eine D-Mannose-abhängige Adhärenz zeigten, wurde ein Hefeagglutinationsassay durchgeführt. Die Stämme *E. coli* CHD3, CHD22, CHD94, UTI89 führten zur Agglutination der Hefe (Tabelle 7). Dies wurde durch die Zugabe von 10% D-Mannose inhibiert. Der Stamm *E. coli* CHD1 zeigte hingegen keine Agglutinationsreaktion. Bezüglich der Agglutinationsreaktionen erwiesen sich keine Unterschiede in Abhängigkeit zur Wachstumsdauer von 1, 2 und 3 Nächten. Bakterien, welche sich in der logarithmischen Wachstumsphase befanden (nach 2 Stunden Inkubation) waren weniger agglutinationsfreudig als Bakterien in der stationären Phase (nach Übernachtinkubation).

*K. pneumoniae* 595 WT zeigte eine Agglutination mit der Hefe, welche nicht durch Zugabe von D-Mannose inhibiert wurde. Diese war somit D-Mannose-unabhängig. Alle anderen getesteten Klebsiellen zeigten keine Agglutination. *P. mirabilis* CHD72 agglutiniert nicht, während CHD76 agglutinierte. *E. cloacae* CHD57 agglutiniert D-Mannose abhängig mit Hefe während *E. cloacae* CHD60 D-Mannose unabhängig agglutinierte. Die getesteten *P. aeruginosa* und *S. saprophyticus* Stämme agglutinieren nicht mit der Hefe. *E. faecalis* CHD31 agglutinierte ebenfalls nicht, während CHD30 D-Mannose unabhängig agglutinierte (Tabelle 7).

**Tabelle 7: Ergebnisse des Hefeagglutinationsassays verschiedener Bakterienstämme, welche über Nacht stehend bei 37°C in artifiziellem Urin inkubiert wurden.**

Stamm	Agglutinationsverhalten:
<b>Antibiotika sensitive Stämme</b>	
<i>E. coli</i> CHD1	Keine Agglutination
<i>E. coli</i> CHD3	Agglutination
<i>E. coli</i> CHD22	Agglutination
<i>E. coli</i> CHD94	Agglutination
<i>E. coli</i> UTI89	Agglutination
<i>E. coli</i> ATCC25922	Agglutination
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 595WT	Mannose unabhängige Agglutination (Aggl. mit und ohne D-Mannose)
<i>K. pneumoniae</i> CHD67	Keine Agglutination
<i>K. pneumoniae</i> CHD99	Keine Agglutination
<i>Proteus mirabilis</i> CHD72	Keine Agglutination
<i>P. mirabilis</i> CHD76	Agglutination
<i>Enterobacter cloacae</i> CHD57	Agglutination
<i>E. cloacae</i> CHD60	Mannose unabhängige Agglutination (Aggl. mit und ohne D-Mannose)

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	Keine Agglutination
<i>P. aeruginosa</i> CHD80	Keine Agglutination
<i>P. aeruginosa</i> CHD81	Keine Agglutination
<i>Enterococcus faecalis</i> CHD30	Mannose unabhängige Agglutination (Aggl. mit und ohne D-Mannose)
<i>E. faecalis</i> CHD31	Keine Agglutination
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> Ho94	Keine Agglutination

---

Antibiotika-resistente Stämme

---

<i>E. coli</i> H75	Keine Agglutination
<i>E. coli</i> CHD16	Agglutination
<i>E. coli</i> IR3	Agglutination
<i>E. coli</i> 1949820	Keine Agglutination
<i>E. coli</i> CDF2	Keine Agglutination
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705	Keine Agglutination
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA2146	Keine Agglutination

### 3.1.4 Einfluss der Monosaccharide auf das bakterielle Wachstum

Die Wachstumskurven der *E. coli* Bakterien in Kombination mit jeweils 1% der Monosaccharide D-Mannose, D-Fruktose und D-Glukose zeigten innerhalb der ersten sechs Stunden, in denen stündlich gemessen wurde, keine Beeinflussung der Wachstumsgeschwindigkeit der Bakterien durch die Zucker (Abb. 2). Da die Bakterien im Versuch nur 1-1,5 h mit dem Zucker in Kontakt kamen, war eine mögliche Beeinflussung in der Messung nach 24 h zu vernachlässigen.

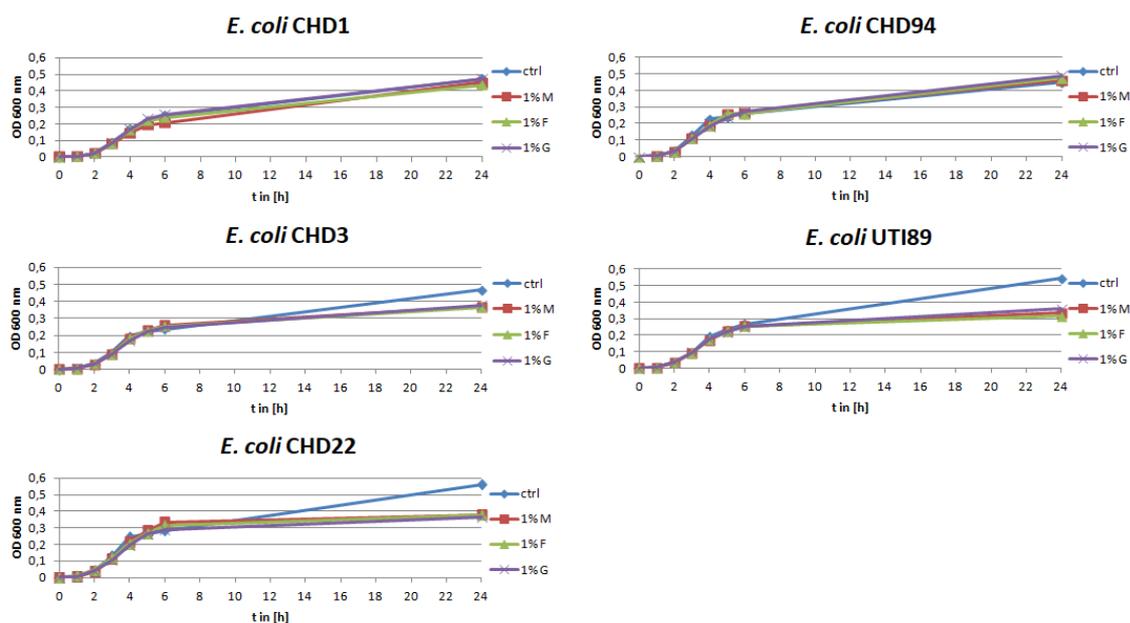


Abbildung 2: Wachstumskurven der Bakterienstämme unter Einfluss von Monosacchariden. *E. coli* CHD1, *E. coli* CHD3, *E. coli* CHD22, *E. coli* CHD94 und *E. coli* UTI89 wurden in der Anwesenheit von jeweils 1% D-Mannose (M), 1% D-Fruktose (F) oder 1% D-Glukose (G) in artifiziellem Urin bei 37°C

inkubiert und die OD bei 600 nm nach 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 und 24 h gemessen. ctrl = Kontrolle ohne Zusatz von Monosacchariden.

### **3.2 Untersuchung der Effektivität verschiedener Zucker bei der Verhinderung der Adhärenz uropathogener Bakterien an Blaszellen**

Die Durchführung der Adhärenzassays diente der Bestimmung der Adhärenz uropathogener Bakterien an Urothelzellen in Anwesenheit verschiedener Zucker.

Hierbei wurden die *E. coli* Stämme CHD1, CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89 mit den Monosacchariden D-Mannose (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%), D-Fruktose (1%, 0,1%, 0,01%, 0,001%) und D-Glukose (1%) getestet. Bei der Durchführung des Adhärenzassays mit einer Infektionszeit von 1 h, einer MOI von ~1 zeigten sich folgende Ergebnisse: Der D-Mannose-insensitive Stamm *E. coli* CHD1 zeigte keine Reduktion der Adhärenz durch die getesteten Monosaccharide. Es gab keine signifikanten Ergebnisse in der Testreihe, da alle Ergebnisse eine sehr große Streuung aufwiesen (Abb. 3).

Der Stamm *E. coli* CHD3 zeigte eine signifikante D-Mannose abhängige Reduktion der Adhärenz bei der D-Mannose Konzentration von 1% ( $p=0,02$ ) genau wie der Stamm *E. coli* CHD94 ( $p=0,01$ ). Die Stämme *E. coli* CHD22 und *E. coli* UTI89 zeigten eine signifikante Reduktion der Adhärenz durch 1% D-Mannose (CHD22  $p<0,0001$ ; UTI89  $p=0,004$ ) und 1% D-Fruktose (CHD22  $p=0,049$ ; UTI89  $p=0,014$ ) (Abb. 4).

Darüber hinaus wurden weitere Arten und verschiedene Stämme uropathogener Bakterien im Adhärenzassay mit der Infektionszeit von 1 h, einer MOI von ~1 und den D-Mannose Konzentrationen von 1%, 0,1%, 0,01%, 0,001% getestet. Bei den Stämmen *K. pneumoniae* CHD67, *K. pneumoniae* CHD99, *S. saprophyticus* Ho94 und *E. cloacae* CHD57 gab es keine signifikanten Unterschiede durch die D-Mannose Behandlung im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 5 und 6).

Weiter wurden Antibiotika-resistente Stämme getestet, um herauszufinden, ob eine Adhärenz der Bakterien mit einer Antibiotikaresistenz in Verbindung steht (Abb. 7). Die Bakterien *E. coli* CHD16 und *E. coli* IR3 zeigten eine signifikante Reduktion der Adhärenz bei Anwendung von 1% D-Mannose (CHD16  $p=0,001$ ; IR3  $p=0,001$ ). Weiter zeigte *E. coli* IR3 auch eine signifikante Reduktion der Adhärenz bei 0,1% D-Mannose ( $p=0,009$ ). *E. coli* H75 und *K. pneumoniae* ATCC BAA1705 zeigten keine signifikante Reduktion der Adhärenz.

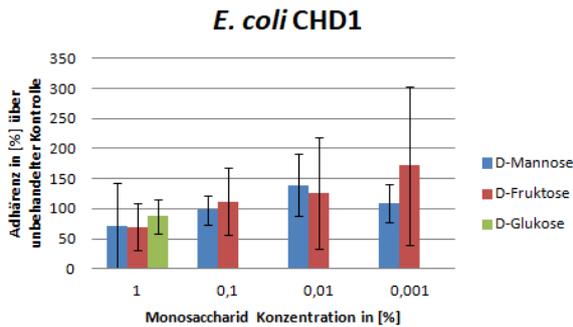


Abbildung 3: Effekt von D-Mannose, D-Fruktose und D-Glukose auf die Adhäsion des Antibiotika-sensitiven, D-Mannose-resistenten *E. coli* Stamm CHD1. T-24 Blasenepithelzellen wurden mit und ohne Zugabe von D-Mannose, D-Fruktose oder D-Glukose mit *E. coli* CHD1 für 1h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, durch Trypsin abgelöst und ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung

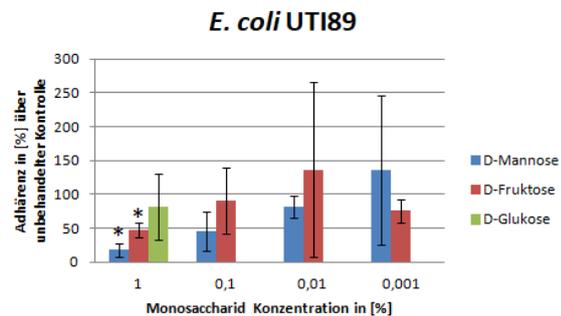
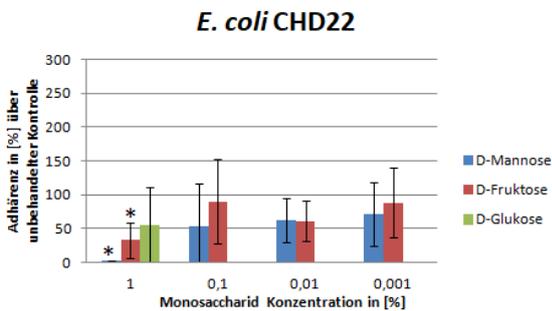
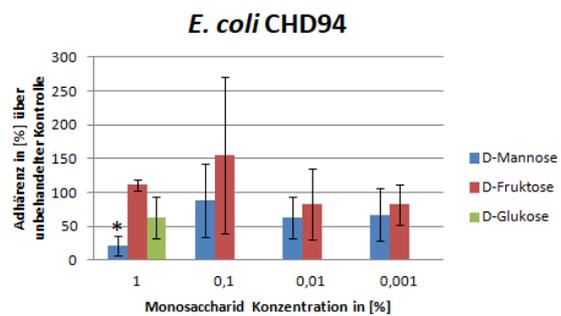
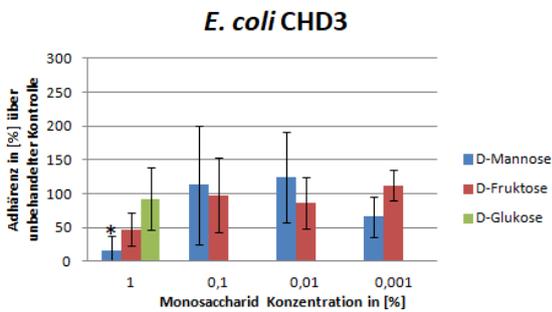


Abbildung 4: Effekt von D-Mannose, D-Fruktose und D-Glukose auf die Adhäsion von Antibiotika-sensitiven, D-Mannose-sensitiven *E. coli* Stämmen CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89. T-24 Blasenepithelzellen wurden mit und ohne Zugabe von D-Mannose, D-Fruktose oder D-Glukose mit verschiedenen *E. coli* Stämmen für 1h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, durch Trypsin abgelöst und ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung \* =  $p < 0.05$  über unbehandelter Kontrolle.

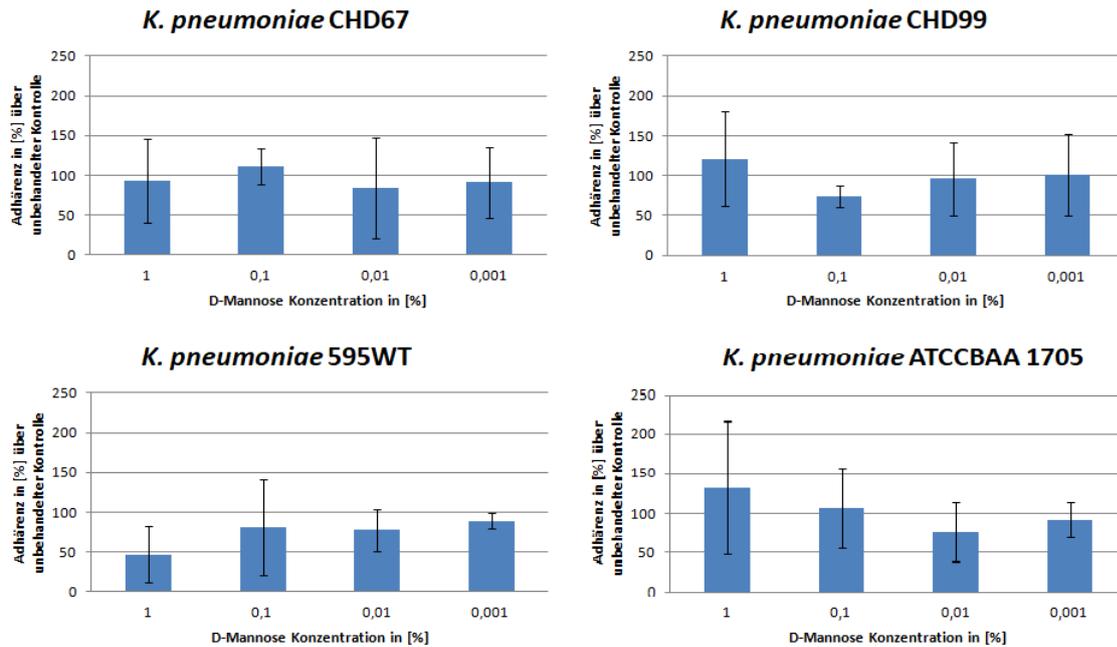


Abbildung 5: Effekt von D-Mannose auf die Adhäsion der Antibiotika-sensitiven, D-Mannose-resistenten *K. pneumoniae* CHD67, *K. pneumoniae* CHD99 und der D-Mannose unabhängig agglutinierenden *K. pneumoniae* 595WT und Antibiotika-resistenten, D-Mannose-resistenten *K. pneumoniae* ATCC BAA1705. T-24 Blasenepithelzellen wurden mit und ohne Zugabe von D-Mannose mit verschiedenen *K. pneumoniae* Stämmen für 1h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, durch Trypsin abgelöst und ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung.

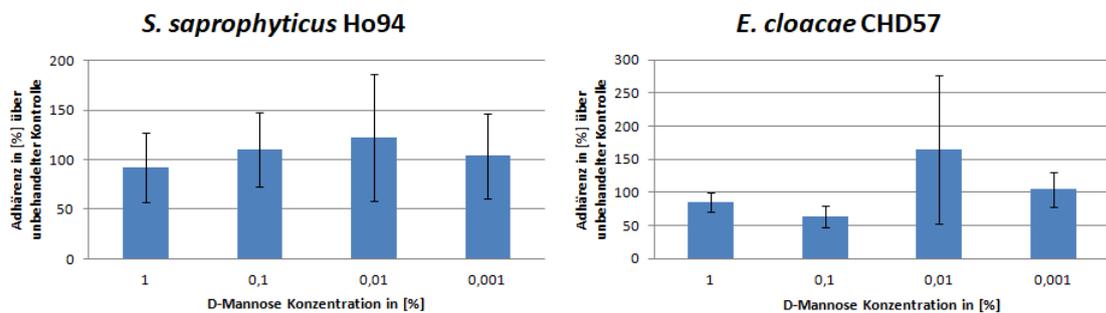
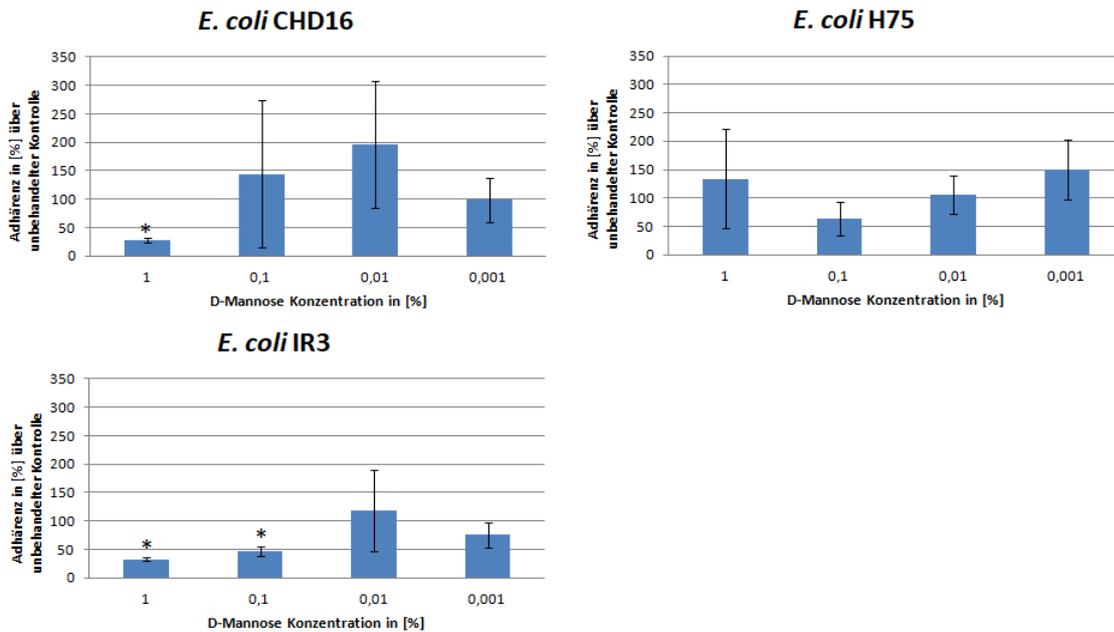


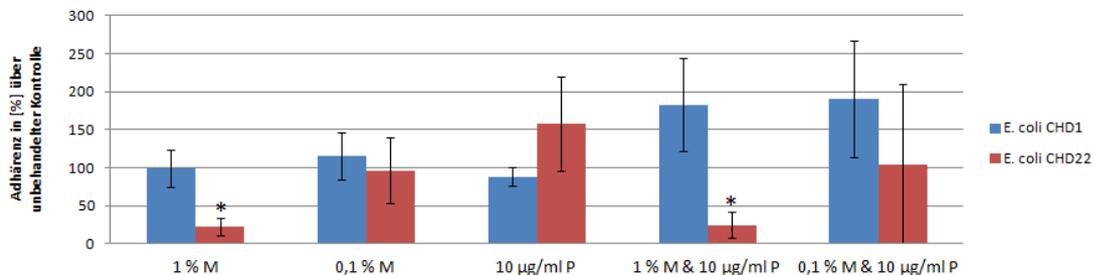
Abbildung 6: Effekt der D-Mannose auf die Adhäsion des Antibiotika-sensitiven, D-Mannose-resistenten *S. saprophyticus* Ho94 und Antibiotika-sensitiven, D-Mannose-sensitiven *E. cloacae* CHD57. T-24 Blasenepithelzellen wurden mit und ohne Zugabe von D-Mannose mit *S. saprophyticus* Ho94 und *E. cloacae* CHD57 für 1h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, durch Trypsin abgelöst und ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung



**Abbildung 7:** Effekt der D-Mannose auf die Adhäsion der Antibiotika-resistenten, D-Mannose-sensitiven *E. coli* Stämme CHD16 *E. coli* IR3 und Antibiotika-resistenten, D-Mannose-resistenten *E. coli* H75. T-24 Blasenepithelzellen wurden mit und ohne Zugabe von D-Mannose mit verschiedenen Antibiotika-resistenten *E. coli* Stämmen für 1h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, durch Trypsin abgelöst und ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung \* =  $p < 0.05$ .

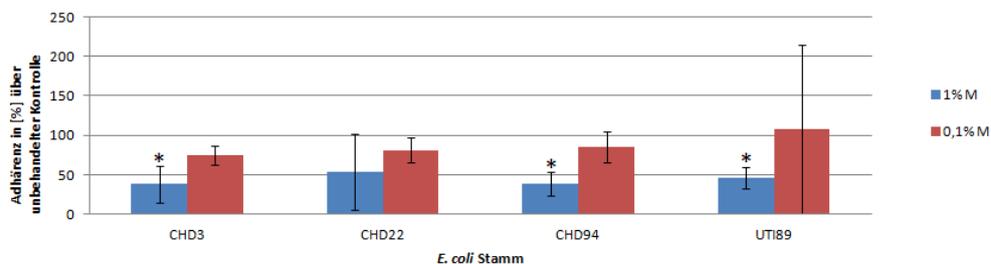
Im weiteren Verlauf wurden verschiedene Modifikationen des Adhärenzassays durchgeführt. Eine Modifikation war die kombinierte Gabe von D-Mannose und Procyanidin A2, dem Wirkstoff, der auch in Cranberry-Präparationen zu finden ist. Es wurden die D-Mannose Konzentrationen 1% und 0,1% und die Procyanidin A2 Menge von 10  $\mu\text{g/ml}$  einzeln und in Kombination mit den D-Mannose Konzentrationen getestet. Zur Durchführung wurden die *E. coli* Stämme CHD1 und CHD22 verwendet. Die Versuche mit *E. coli* CHD22 zeigten für 1% D-Mannose im Mittel eine signifikante Reduktion der Bakterienkonzentration auf 22,1% im Vergleich zur Kontrolle ohne D-Mannose ( $p=0,007$ ). Die Applikation von 0,1% D-Mannose zeigte keine Reduktion der Bakterienmenge im Verhältnis zur Kontrolle. Die Applikation von 10  $\mu\text{g/ml}$  Procyanidin A2 alleine zeigte eine nicht signifikante Erhöhung der Bakterienkonzentration. Die Applikation von 1% D-Mannose in Kombination mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Procyanidin A2 zeigte eine Reduktion der Bakterienzahl auf 25% im Vergleich zur Kontrolle ( $p=0,016$ ). Die Kombination von 10  $\mu\text{g/ml}$  Procyanidin A2 mit 0,1% D-Mannose entsprach im Mittelwert der Kontrolle. Insgesamt zeigte sich durch die Applikation von Procyanidin A2 in Kombination mit D-Mannose bei *E. coli* CHD22 keine Verbesserung der Wirkung im Vergleich mit der alleinigen Applikation von D-Mannose. Die Applikation von

Procyanidin A2 alleine zeigte eine deutliche, aber nicht signifikante Erhöhung der Bakterienlast im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 8). Die Durchführung der Versuche in Kombination mit D-Mannose und Procyanidin A2 mit *E. coli* CHD1 zeigte keine signifikanten Ergebnisse (Abb. 8).



**Abbildung 8: Effekte der Kombination von D-Mannose & Procyanidin A2.** T-24 Blasenepithelzellen wurden mit D-Mannose in Kombination mit Procyanidin A2 auf die Adhäsion zweier Stämme innerhalb 1 h untersucht. Verwendet wurden der Antibiotika-sensitiven und D-Mannose resistente *E. coli* Stamm *E. coli* CHD1 und zum anderen den Antibiotika sensitiven und D-Mannose sensitiven *E. coli* Stamm CHD22. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, durch Trypsin abgelöst und ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung \* =  $p < 0.05$ .

Die zweite Modifikation des Adhärenzassays war die Durchführung des Assays im Transwell System. Hier sollte die Polarisierung der Zellen mit einer stärkeren Ausbildung der Zell-Zell Verbindungen nachgestellt werden. Der Assay wurde mit 1% und 0,1% D-Mannose durchgeführt. In diesem Versuch ist die genaue MOI nicht bekannt, da keine ausreichende Anzahl an Wells zur Verfügung stand, um ein Well zur Bestimmung der MOI zu nutzen. Ausgesät wurden  $5,7 \times 10^4$  Zellen/Transwell System, die 7 Tage lang wuchsen. Die Infektionszeit betrug auch hier 1 h. In der Testung mit den *E. coli* Stämmen CHD3, CHD94 und UTI89 zeigte sich eine signifikante Reduktion der Adhärenz durch 1% D- Mannose (CHD3  $p = 0,01$ ; CHD94  $p = 0,006$ ; UTI89  $p = 0,015$ ). Der Stamm *E. coli* CHD22 zeigte keine signifikante Änderung gegenüber der Kontrolle (Abb. 9).



**Abbildung 9: Effekt der D-Mannose auf die Adhäsion der Antibiotika-sensitiven, D-Mannose-sensitiven *E. coli* Stämme CHD3 *E. coli* CHD22, *E. coli* CHD94 und *E. coli* UTI89 im Transwell System.** T-24 Blasenepithelzellen wurden, nach einer Woche Kultivierung in Transwell Systemen,

mit und ohne Zugabe von D-Mannose mit verschiedenen *E. coli* Stämmen für 1h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, durch Trypsin abgelöst und ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung \*= $p < 0.05$ .

Um herauszufinden, ob die Wirkung der D-Mannose bei Applikation der D-Mannose zum Zeitpunkt der Infektion vergleichbar ist mit der Wirkung von D-Mannose, wenn die Zellen am Ende der Infektionszeit mit D-Mannose haltigem Urin gewaschen werden, wurde der Assay angepasst. Die Anpassung dient der Testung der klinischen Anwendbarkeit der D-Mannose als Behandlung einer akuten Infektion. Hierfür müsste die Voraussetzung erfüllt sein, dass die D-Mannose nicht nur zu einer Reduktion der Bakterienlast führt, wenn sie gleichzeitig mit den Bakterien zu den Zellen gegeben wird, sondern auch dann zu einer Reduktion der Bakterienlast führen kann, wenn die Bakterien bereits an den Urothelzellen adhärirt haben. Um diese Situation im Labor nachzustellen wurde der Versuch so modifiziert, dass der Zeitpunkt der D-Mannose Zugabe angepasst wurde. Dabei gab es drei unterschiedliche Ansätze: 1) D-Mannose wurde parallel mit den Bakterien zur Infektion gegeben, 2) D-Mannose wurde parallel mit den Bakterien zu den Zellen gegeben und die Zellen wurden mit D-Mannosehaltigem Urin gewaschen und 3) die Zellen wurden ohne Zugabe von D-Mannose infiziert und anschließend mit D-Mannosehaltigem Urin gewaschen. Es zeigte sich, dass die gleichzeitige Infektion und D-Mannose Applikation bei allen getesteten Stämmen erfolgreich eine signifikante Reduktion der Bakterienmenge bewirkte (CHD3 1%  $p=0,013$ ; CHD22 1%  $p=0,06$ ; CHD22 0,1%  $p=0,008$ ; CHD94 1%  $p= 0,008$ ; UTI89 1%  $p=0,008$ ; UTI89 0,01%  $p= 0,05\%$ ). Durch die Gabe von D-Mannose bei der Infektion in Kombination mit dem Waschen der Zellen nach Infektion mit D-Mannose konnte eine Reduktion der Bakterienlast gegenüber der Kontrolle erzielt werden (CHD3 1%  $p=0,003$ ; CHD22 1%  $p=0,008$ ; CHD22 0,1%  $p=0,022$ ; CHD94 1%  $p= 0,05$ ; UTI89 1%  $p=0,013$ ) (Abb. 10). Insgesamt zeigten sich sehr ähnliche Ergebnisse durch die Gabe von D-Mannose bei Infektion mit und ohne Waschen der Zellen mit D-Mannose (vgl. die Mittelwerte ohne Waschen und mit Waschen bei 1% D-Mannose: CHD3 26,67 und 21,23; CHD22 15,07 und 16,85; CHD94 53,64 und 48,26; UTI89 16,97 und 21,23). Für *E. coli* CHD3 und CHD94 liegen die Mittelwerte des Waschens mit D-Mannose im Verhältnis zur Kontrolle etwas über den Mittelwerten des Waschens ohne D-Mannose. Dies ist für *E. coli* CHD22 und UTI89 genau umgekehrt (Abb. 10). Hieraus lassen sich keine signifikanten Unterschiede ableiten. Es scheint, als habe zusätzliches Waschen der Zellen mit D-Mannose keinen Vorteil. Das Waschen der Zellen mit D-Mannose nach Infektion ohne parallele D-Mannose Vorbehandlung führte zu keiner signifikanten Reduktion der adhärenter Bakterien gegenüber der Kontrolle (Abb. 10).

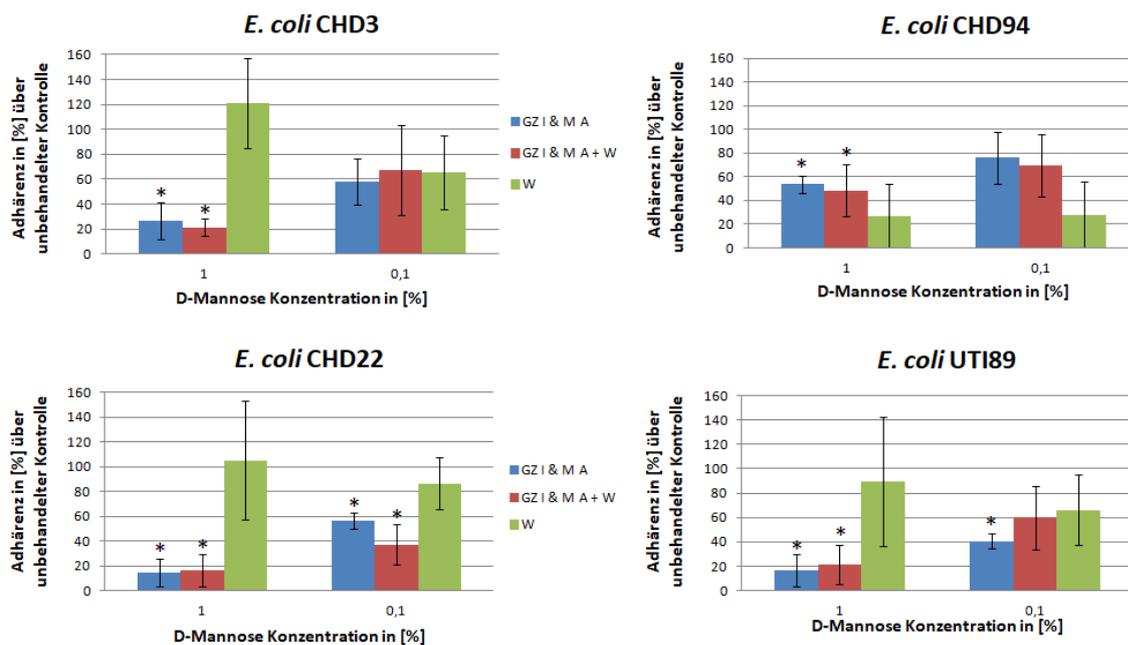


Abbildung 10: Effekt der D-Mannose auf die Adhäsion der Antibiotika-sensitiven, D-Mannose-sensitiven *E. coli* Stämme CHD3, *E. coli* CHD22, *E. coli* CHD94 und *E. coli* UTI89. T-24 Blasenepithelzellen wurden mit und ohne Zugabe von D-Mannose mit verschiedenen *E. coli* Stämmen infiziert. D-Mannose wurde in zwei Ansätzen gleichzeitig mit den Bakterien zu den T-24 Blasenepithelzellen gegeben und dann nach 1 h entweder mit artifiziellem Urin oder mit D-Mannose haltigem artifiziellem Urin abgewaschen. Im dritten Ansatz wurden die Zellen ohne D-Mannose inkubiert und nur mit artifiziellem Urin abgewaschen. Im artifiziellem Urin waren 1% oder 0,1% D-Mannose. Anschließend wurden die Zellen durch Trypsin abgelöst und ausplattiert, um die Anzahl adhärenter Bakterien zu bestimmen. Gezeigt werden Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung \* =  $p < 0.05$ . (GZ I & M A = gleichzeitige Infektion und D-Mannose Applikation; GZ I & M A + W = gleichzeitige Infektion und D-Mannose Applikation sowie Waschen mit D-Mannose, W = Waschen mit D-Mannose)

### 3.3 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität ätherischer Öle

#### 3.3.1 Screening verschiedener Öle mittels Agardiffusionstestung auf ihre antimikrobielle Aktivität

Im Agardiffusionsassay wurden 18 ätherische Öle in den Konzentrationen 100%, 50%, 25% und 12,5% auf ihre antibakteriellen Wirkungen gegen die Stämme *E. coli* CHD1, CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89 getestet (Tabelle 8). Das ätherische Lavendelöl zeigte für *E. coli* CHD1 und *E. coli* UTI89 in allen gemessenen Konzentrationen keinen Hemmhof. Für *E. coli* CHD3 und *E. coli* CHD94 entstand nur bei Applikation von 100% Lavendelöl ein Hemmhof von 9 mm. *E. coli* CHD22 zeigte bei der Applikation von 100% Lavendelöl einen Hemmhof von 8,5 mm Durchmesser und bei 50% Lavendelöl 7,5 mm. Ätherisches Thymianöl zeigte für *E. coli* CHD1 bei der Applikation von 100% einen Hemmhof von 27 mm, bei 50% 13 mm, bei 25% 8 mm und bei 12,5% 0 mm. *E. coli* CHD3 zeigte bei 100% Thymianöl 28,5 mm, bei 50% 12,5 mm, bei 25% 9 mm und bei 12,5% 0 mm. *E. coli* CHD22 zeigte bei der Applikation von 100% Thymianöl einen

Hemmhof von 20 mm, bei 50% 12,5 mm, bei 25% 8 mm und bei 12,5% 0 mm. *E. coli* CHD94 zeigte bei der Applikation von 100% Thymianöl einen Hemmhof von 19 mm, bei 50% 12 mm, bei 25% 9 mm und bei 12,5% 0 mm. *E. coli* UTI89 zeigte bei der Applikation von 100% Thymianöl einen Hemmhof von 22 mm, bei 50% 11,5 mm, bei 25% 8 mm und bei 12,5% 0 mm. Ätherisches Salbeiöl zeigte für *E. coli* CHD1 und CHD22 bei der Applikation von 100% Salbeiöl einen Hemmhof von 10 mm, während *E. coli* CHD3, CHD94 und UTI89 bei 100% Salbeiöl einen Hemmhof von 9 mm zeigten. Bei der Applikation von 50% Salbeiöl zeigten die *E. coli* Stämme CHD3, CHD22 und CHD94 einen Hemmhof von 8 mm. Die *E. coli* Stämme CHD1 und UTI89 zeigten bei 50% Salbeiöl keinen Hemmhof mehr. Weiter zeigten sich in den Konzentrationen 25% und 12,5% Salbeiöl keine Hemmhöfe. Ätherisches Pfefferminzöl zeigte bei *E. coli* CHD1 in der Anwendung in der Konzentration 100% einen Hemmhof von 24 mm und bei 50% einen Hemmhof von 11 mm. Bei der Behandlung mit den niedrigeren Konzentrationen des Pfefferminzöls von 25% und 12,5% entstand kein Hemmhof mehr. *E. coli* CHD 3 zeigte bei Behandlung mit 100% Pfefferminzöl einen Hemmhof von 19 mm, *E. coli* CHD22 21 mm, *E. coli* CHD94 9 mm und der Stamm *E. coli* 89 zeigte 10 mm. Bei der Behandlung der Stämme *E. coli* CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89 mit 25% und 12,5% Pfefferminzöl entstanden keine Hemmhöfe. Ätherisches Teebaumöl zeigte seine Wirkung in den Konzentrationen 100% und 50% Öl, in den Konzentrationen 25% und 12,5% zeigten sich bei allen getesteten Bakterienstämmen keine Hemmhöfe. Der *E. coli* Stamm CHD1 zeigte bei der Behandlung mit 100% Teebaumöl einen Hemmhof von 18 mm und bei 50% Öl einen Hemmhof von 11 mm. *E. coli* CHD3 und *E. coli* CHD22 zeigten bei der Konzentration 100% Teebaumöl Hemmhöfe von 16 mm und bei der Konzentration 50% Hemmhöfe von 10 mm. *E. coli* CHD94 und *E. coli* UTI89 zeigten bei der Konzentration 100% Teebaumöl Hemmhöfe von 16,5 mm und bei der Konzentration 50% Hemmhöfe von 10 mm. Ätherisches Lemongrassöl zeigte bei dem *E. coli* Stamm CHD1 bei der Applikation von 100% Öl einen Hemmhof von 16 mm, bei 50% Öl einen Hemmhof von 10 mm und bei 25% Öl einen Hemmhof von 8 mm. Bei dem *E. coli* Stamm CHD3 zeigte sich bei 100% Lemongrassöl ein Hemmhof von 15,5 mm, bei 50% 13 mm und bei 25% 9 mm. Die Stämme *E. coli* CHD22, CHD94 und UTI89 zeigten bei der Applikation von 100% ätherischem Lemongrassöl einen Hemmhof von 10 mm und bei den Konzentrationen 50%, 25% keinen Hemmhof. Lemongrassöl zeigte bei allen getesteten Stämmen keine Wirkung bei der Applikation von 12,5% Öl. Ätherisches Myrthenöl zeigte nur bei dem Stamm *E. coli* CHD1 in der Konzentration 100% Öl einen Hemmhof von 8 mm. Ätherisches Rosmarinöl zeigte nur in der Applikation von 100% Öl eine Wirkung. Hier entstanden Hemmhöfe, die bei *E. coli* CHD1 9 mm, bei *E. coli* CHD3 9,5 mm und bei

den *E. coli* Stämmen CHD22, CHD94 und UTI89 8 mm zeigten. Als positiv Kontrolle wurden 10 µg/ml Gentamycin verwendet. Hier ergaben sich für *E. coli* CHD1 ein Hemmhof von 33 mm und für die *E. coli* Stämme CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89 Hemmhöfe von 30 mm. Zusätzlich wurde Rapsöl als Verdünnungsmittel der ätherischen Öle getestet. Dies zeigte keine eigene antibakterielle Aktivität (Tabelle 8). Darüber hinaus wurden Aprikosenöl, Mandelöl, Sesamöl, ätherisches Muskatellasalbeiöl, Johanniskrautöl, ätherisches Latschenkieferöl, ätherisches Zederöl und ätherisches Mandarinenöl getestet. Durch diese Öle hat sich bei allen getesteten *E. coli* Stämmen kein Hemmhof gebildet.

**Tabelle 8: Ergebnisse des Agardiffusionstests. Verschiedene ätherische Öle wurden auf Filterpapiere aufgetragen, welche auf einer mit Bakterienstämmen bestrichenen Agar Platte positioniert wurden. Nach über Nacht Inkubation bei 37°C wurden die Hemmhöfe in mm ausgemessen.**

	<i>E. coli</i> CHD1	<i>E. coli</i> CHD3	<i>E. coli</i> CHD22	<i>E. coli</i> CHD94	<i>E. coli</i> UTI89
<b>Lavendelöl</b>					
100%	0	9	8,5	9	0
50%	0	0	7,5	0	0
25%	0	0	0	0	0
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Thymianöl</b>					
100%	27	28,5	20	19	22
50%	13	12,5	12,5	12	11,5
25%	8	9	8	9	8
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Salbeiöl</b>					
100%	10	9	10	9	9
50%	0	8	8	8	0
25%	0	0	0	0	0
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Pfefferminzöl</b>					
100%	24	19	21	9	10
50%	11	0	0	0	0
25%	0	0	0	0	0
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Teebaumöl</b>					
100%	18	16	16	16,5	16,5
50%	11	10	10	10	10
25%	0	0	0	0	0
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Lemongrassöl</b>					
100%	16	15,5	10	10	10
50%	10	13	0	0	0

25%	8	9	0	0	0
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Myrthenöl</b>					
100%	8	0	0	0	0
50%	0	0	0	0	0
25%	0	0	0	0	0
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Rosmarinöl</b>					
100%	9	9,5	8	8	8
50%	0	0	0	0	0
25%	0	0	0	0	0
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Cajeputöl</b>					
100%	12	11	9	10	10
50%	0	0	0	0	0
25%	0	0	0	0	0
12,5%	0	0	0	0	0
<b>Gentamycin</b>					
10 µg/ml	33	30	30	30	30
<b>Rapsöl</b>					
100%	0	0	0	0	0

### 3.3.2 MIC und MBC Bestimmung ätherischer Öle

Zur genaueren Bestimmung der Aktivität ausgewählter Öle wurden MIC/MBC Bestimmungen gegenüber einem Panel verschiedener uropathogener Stämme durchgeführt. Für diese Testungen wurden ätherisches Thymianöl, Teebaumöl, Lemongrassöl und Cajeputöl verwendet, da sie die vielversprechendsten Ergebnisse im Agardiffusionsassay zeigten. Thymianöl zeigte bei den Konzentrationen 100%, 50% und 25% Hemmhöfe, Teebaumöl bei den Konzentrationen von 100% und 50%, Lemongrassöl bei 100%, 50% und bei *E. coli* CHD1 und CHD3 auch bei 25% antibakterielle Aktivität. Cajeputöl zeigte nur bei 100% einen Hemmhof (Tabelle 8).

Die Testungen mit ätherischem Teebaumöl zeigten folgende Ergebnisse (Tabelle 9): MIC und MBC aller getesteten *E. coli* Stämme lagen bei 0,31%. Für *K. pneumoniae* lag die MIC zwischen 0,31% - 0,63%. Die Werte für die MBC stimmten mit der MIC überein. Bei *P. mirabilis* lagen die gemessenen MIC Werte bei 1,25%. Die MBC variierte von 1,25%-2,5%. *E. cloacae* zeigte eine MIC von 0,16% - 0,31%. Die MBC variierte zwischen 0,31% und 0,63%. Die getesteten *P. aeruginosa* Stämme zeigten eine höhere MIC als die anderen Stämme zwischen 2,5% - 10%. Die MBC lag bei 5% - 10%. Die MIC von *E. faecalis* lag bei 2,5% und entsprach damit der MBC. *S. saprophyticus* zeigte bei MIC und MBC den Wert 0,31%. Die Antibiotika-resistenten *E. coli* Stämme wiesen überwiegend eine MIC von 0,63% auf. Der *E. coli* Stamm CDF2

hatte die MIC 0,31%. Die MBC lag für alle Antibiotika-resistenten *E. coli* Stämme zwischen 0,16% - 0,63%. Die getesteten Antibiotika-resistenten *K. pneumoniae* Stämme zeigten im Experiment eine MIC zwischen 0,63% - 1,25%. Die MBC entsprach der MIC (Tabelle 9).

**Tabelle 9: Median (Range) MIC und MBC-Werte von ätherischem Teebaumöl für verschiedene Bakterien in artifiziellem Urin**

<b>Antibiotika sensitive Stämme</b>	<b>MIC [%]</b>	<b>MBC [%]</b>
<i>E. coli</i> CHD1	<b>0,31</b> (0,31-1,25)	<b>0,31</b> (0,31-1,25)
<i>E. coli</i> CHD3	<b>0,31</b> (0,63-0,31)	<b>0,31</b> (0,31-1,25)
<i>E. coli</i> CHD22	<b>0,31</b> (0,63-0,31)	<b>0,31</b> (0,31-0,63)
<i>E. coli</i> CHD94	<b>0,31</b> (0,31)	<b>0,31</b> (0,31)
<i>E. coli</i> UTI89	<b>0,31</b> (0,63-0,31)	<b>0,31</b> (0,31-0,63)
<i>E. coli</i> ATCC25922	<b>0,31</b> (0,31-0,63)	<b>0,31</b> (0,31-0,63)
<i>K. pneumoniae</i> 595WT	<b>0,31</b> (0,31-0,63)	<b>0,31</b> (0,31-0,63)
<i>K. pneumoniae</i> CHD67	<b>0,31</b> (0,31)	<b>0,31</b> (0,31)
<i>K. pneumoniae</i> CHD99	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>0,63</b> (0,63-1,25)
<i>P. mirabilis</i> CHD72	<b>1,25</b> (0,63-1,25)	<b>1,25</b> (1,25-2,5)
<i>P. mirabilis</i> CHD76	<b>1,25</b> (1,25)	<b>1,25</b> (1,25-2,5)
<i>E. cloacae</i> CHD57	<b>0,31</b> (0,31)	<b>0,63</b> (0,31-1,25)
<i>E. cloacae</i> CHD60	<b>0,16</b> (0,16-0,31)	<b>0,31</b> (0,16- 0,63)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<b>2,5</b> (0,31-5)	<b>10</b> (0,63-10)
<i>P. aeruginosa</i> CHD80	<b>5</b> (2,5-5)	<b>5</b> (2,5-10)
<i>P. aeruginosa</i> CHD81	<b>10</b> (2,5-10)	<b>10</b> (5-10)
<i>E. faecalis</i> CHD30	<b>2,5</b> (2,5)	<b>2,5</b> (1,25-2,5)
<i>E. faecalis</i> CHD31	<b>2,5</b> (2,5)	<b>2,5</b> (2,5-5)
<i>S. saprophyticus</i> Ho94	<b>0,31</b> (0,31-0,63)	<b>0,31</b> (0,16-0,31)
<b>Antibiotika-resistente Stämme</b>		
<i>E. coli</i> H75	<b>0,63</b> (0,63-2,5)	<b>0,63</b> (0,63-2,5)
<i>E. coli</i> CHD16	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>0,63</b> (0,63-1,25)
<i>E. coli</i> IR3	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>0,63</b> (0,63-2,5)
<i>E. coli</i> 1949820	<b>0,63</b> (0,16-0,63)	<b>0,16</b> (0,16-0,63)
<i>E. coli</i> CDF2	<b>0,31</b> (0,16-0,31)	<b>0,31</b> (0,16-0,31)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705	<b>0,63</b> (0,31-0,63)	<b>0,63</b> (0,31-0,63)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA2146	<b>1,25</b> (1,25)	<b>1,25</b> (1,25-2,5)

Das ätherische Lemongrass Öl zeigte für die getesteten *E. coli* Stämme MIC und MBC Werte zwischen 0,63% - 5%. Zwei der getesteten *K. pneumoniae* Stämme zeigten eine MIC von 0,63%. Die MBC lag bei diesen zwischen 0,63% - 1,25%. Der dritte getestete *K. pneumoniae* Stamm CHD99 zeigte eine MIC von 10% und eine MBC von 10%. *P. mirabilis* hatte eine MIC zwischen 0,31% - 0,63%. Die MBC betrug 1,25%. Die getesteten *E. cloacae* Stämme zeigten unterschiedliche Ergebnisse. Der Stamm

CHD57 hatte eine MIC von 5%, während der Stamm CHD60 eine MIC von 0,63% in der Behandlung mit Lemongrass zeigte. Die MBCs entsprachen der jeweiligen MIC. *P. aeruginosa* zeigte eine MIC zwischen 3,75% – 5%. Die MBC lag bei 5% - 10%. Die *E. faecalis* Stämme zeigten eine MIC zwischen 0,31% - 1,25. Die MBC entsprach diesen Werten. Der getestete *S. saprophyticus* Stamm zeigte sowohl bei der MIC als auch bei der MBC 0,16%. Die Antibiotika-resistenten *E. coli* Stämme lagen mit der MIC zwischen 0,31% - 5%. Die MBC entspricht der MIC. Die antibiotikaresistenten *K. pneumoniae* Stämme lagen mit MIC und MBC zwischen 5% - 10% (Tabelle 10).

**Tabelle 10: Median (Range) MIC und MBC-Werte von ätherischem Lemongrassöl für verschiedene Bakterien in artifiziellem Urin**

<b>Antibiotika sensitive Stämme</b>	<b>MIC [%]</b>	<b>MBC [%]</b>
<i>E. coli</i> CHD1	<b>5</b> (0,31-10)	<b>0,63</b> (0,31-2,5)
<i>E. coli</i> CHD3	<b>0,63</b> (0,16-0,63)	<b>2,5</b> (0,16-2,5)
<i>E. coli</i> CHD22	<b>5</b> (0,63-5)	<b>5</b> (1,25-5)
<i>E. coli</i> CHD94	<b>5</b> (0,63-5)	<b>5</b> (1,25-5)
<i>E. coli</i> UTI89	<b>5</b> (0,16-5)	<b>5</b> (0,31-5)
<i>E. coli</i> ATCC25922	<b>2,5</b> (2,5-5)	<b>5</b> (2,5-5)
<i>K. pneumoniae</i> 595WT	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>0,63</b> (0,63)
<i>K. pneumoniae</i> CHD67	<b>0,63</b> (0,31-1,25)	<b>1,25</b> (0,63-5)
<i>K. pneumoniae</i> CHD99	<b>10</b> (5-10)	<b>10</b> (10)
<i>P. mirabilis</i> CHD72	<b>0,32</b> (0,32-1,25)	<b>1,25</b> (0,63-1,25)
<i>P. mirabilis</i> CHD76	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>1,25</b> (1,25)
<i>E. cloacae</i> CHD57	<b>5</b> (5)	<b>5</b> (5-10)
<i>E. cloacae</i> CHD60	<b>0,63</b> (0,31-1,25)	<b>0,63</b> (0,31-2,5)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<b>5</b> (0,16-5)	<b>5</b> (0,16-10)
<i>P. aeruginosa</i> CHD80	<b>3,75</b> (2,5->10)	<b>10</b> (10)
<i>P. aeruginosa</i> CHD81	<b>5</b> (5-10)	<b>10</b> (10)
<i>E. faecalis</i> CHD30	<b>0,63</b> (0,31-1,25)	<b>0,31</b> (0,31-1,25)
<i>E. faecalis</i> CHD31	<b>0,31</b> (0,31- 0,63)	<b>0,31</b> (0,31-0,63)
<i>S. saprophyticus</i> Ho94	<b>0,16</b> (0,16)	<b>0,16</b> (0,16)
<b>Antibiotika-resistente Stämme</b>	<b>MIC [%]</b>	<b>MBC [%]</b>
<i>E. coli</i> H75	<b>5</b> (5)	<b>5</b> (5)
<i>E. coli</i> CHD16	<b>2,5</b> (2,5-5)	<b>5</b> (5)
<i>E. coli</i> IR3	<b>0,31</b> (0,16- 0,63)	<b>0,31</b> (0,31-0,63)
<i>E. coli</i> 1949820	<b>5</b> (5-10)	<b>5</b> (5-10)
<i>E. coli</i> CDF2	<b>0,31</b> (0,13-2,5)	<b>0,31</b> (0,31)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705	<b>5</b> (2,5-5)	<b>5</b> (5)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA2146	<b>10</b> (5-10)	<b>10</b> (10)

Die Testung des ätherischen Thymianöls ergab für die Antibiotika-sensitiven *E. coli* Stämme eine MIC zwischen 0,16% - 0,31% mit MBC im gleichen Bereich. Die MIC von

*K. pneumoniae* lag zwischen 0,31% - 5%, die MBC zwischen 0,31% - 10%. Für die getesteten *P. mirabilis* Stämme lag die MIC bei 0,63% und die MBC zwischen 0,63% - 1,25%. Die MIC und die MBC der *E. cloacae* Stämme lagen zwischen 0,16% - 0,31%. Für *P. aeruginosa* zeigten sich Werte zwischen 2,5% - 10% bei der MIC und die MBC betrug 10%. *E. faecalis* hatte eine MIC zwischen 0,94% – 1,25% und eine MBC zwischen 0,94% - 1,56%. Für *S. saprophyticus* lagen alle Werte bei 0,31%. Die Antibiotika-resistenten *E. coli* Stämme zeigten eine MIC zwischen 0,16% – 0,94% und auch die gleiche MBC. Die Antibiotika-resistenten *K. pneumoniae* Stämme wiesen eine MIC von 1,25% - 5% und eine MIC von 2,5% - 10% auf (Tabelle 11).

**Tabelle 11: Median (Range) MIC und MBC-Werte von ätherischem Thymianöl für verschiedene Bakterien in artifiziellem Urin**

<b>Antibiotika sensitive Stämme</b>	<b>MIC [%]</b>	<b>MBC [%]</b>
<i>E. coli</i> CHD1	<b>0,31</b> (0,16- 0,63)	<b>0,31</b> (0,31-1,25)
<i>E. coli</i> CHD3	<b>0,31</b> (0,16-0,63)	<b>0,16</b> (0,16-0,63)
<i>E. coli</i> CHD22	<b>0,31</b> (0,16-1,25)	<b>0,31</b> (0,31-1,25)
<i>E. coli</i> CHD94	<b>0,31</b> (0,31-1,25)	<b>0,31</b> (0,31-1,25)
<i>E. coli</i> UTI89	<b>0,16</b> (0,16- 0,63)	<b>0,16</b> (0,16-0,63)
<i>E. coli</i> ATCC25922	<b>0,31</b> (0,31)	<b>0,31</b> (0,31-0,63)
<i>K. pneumoniae</i> 595WT	<b>0,47</b> (<0,16- 0,63)	<b>0,31</b> (0,16- 0,63)
<i>K. pneumoniae</i> CHD67	<b>0,31</b> (<0,16-0,31)	<b>0,31</b> (0,16-0,31)
<i>K. pneumoniae</i> CHD99	<b>5</b> (0,63- 5)	<b>10</b> (10)
<i>P. mirabilis</i> CHD72	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>0,63</b> (0,63-1,25)
<i>P. mirabilis</i> CHD76	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>1,25</b> (0,63-5)
<i>E. cloacae</i> CHD57	<b>0,31</b> (0,31-0,63)	<b>0,31</b> (0,31- 0,63)
<i>E. cloacae</i> CHD60	<b>0,16</b> (0,16)	<b>0,16</b> (0,16)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<b>2,5</b> (1,25-5)	<b>10</b> (0,16-10)
<i>P. aeruginosa</i> CHD80	<b>5</b> (5)	<b>10</b> (10)
<i>P. aeruginosa</i> CHD81	<b>10</b> (10)	<b>10</b> (10->10)
<i>E. faecalis</i> CHD30	<b>1,25</b> (0,63-1,25)	<b>0,94</b> (0,63-1,25)
<i>E. faecalis</i> CHD31	<b>0,94</b> (0,63-1,25)	<b>1,56</b> (0,63-2,5)
<i>S. saprophyticus</i> Ho94	<b>0,31</b> (0,31)	<b>0,31</b> (0,31)
<b>Antibiotika-resistente Stämme</b>	<b>MIC [%]</b>	<b>MBC [%]</b>
<i>E. coli</i> H75	<b>0,63</b> (0,31-0,63)	<b>0,94</b> (0,31-2,5)
<i>E. coli</i> CHD16	<b>0,94</b> (0,31-1,25)	<b>0,94</b> (2,5-0,31)
<i>E. coli</i> IR3	<b>0,47</b> (0,31-0,63)	<b>0,63</b> (0,31-2,5)
<i>E. coli</i> 1949820	<b>0,63</b> (0,31-1,25)	<b>0,63</b> (1,25-0,63)
<i>E. coli</i> CDF2	<b>0,16</b> (0,16-0,31)	<b>0,16</b> (0,16-0,31)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705	<b>1,25</b> (1,25)	<b>2,5</b> (1,25-2,5)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA2146	<b>5</b> (5)	<b>10</b> (10)

In der Testung des ätherischen Cajeputöls zeigten sich für die Antibiotika-sensitiven *E. coli* Stämme MIC- und MBC-Werte zwischen 0,63% - 2,5%. Zwei *K. pneumoniae* Stämme lagen bezüglich MIC und MBC bei 0,63%. Der dritte Stamm (CHD99) erforderte höhere Konzentrationen zwischen 5% - 10%. *P. mirabilis* zeigte MIC Werte zwischen 1,25% - 5% und MBC Werte zwischen 2,5% - 10%. Die MIC Werte der *E. cloacae* Stämme lagen zwischen 0,63% - 5% und die MBC Werte zwischen 1,25% - 10%. Für *P. aeruginosa* zeigten sich MIC Werte zwischen 5% - 10% und ein MBC Wert von 10%. *E. faecalis* MIC Werte wurden auf 1,88% - 2,5% bestimmt und die MBC Werte auf 1,25% - 2,5%. *S. saprophyticus* zeigte für MIC und MBC 0,31%. Die Antibiotika-resistenten *E. coli* Stämme zeigten eine MIC zwischen 0,31% - 2,81% und eine MBC zwischen 0,31% - 10%. Die Antibiotika-resistenten *K. pneumoniae* Stämme hatten eine MIC zwischen 2,5% - 5% und eine MBC zwischen 5% - 10% (Tabelle 12).

**Tabelle 12: Median (Range) MIC und MBC-Werte von ätherischem Cajeputöl für verschiedene Bakterien in artifiziellem Urin**

<b>Antibiotika sensitive Stämme</b>	<b>MIC [%]</b>	<b>MBC [%]</b>
<i>E. coli</i> CHD1	<b>0,63</b> (0,63-2,5)	<b>0,63</b> (0,63-2,5)
<i>E. coli</i> CHD3	<b>0,63</b> (0,63-2,5)	<b>0,63</b> (0,63-5)
<i>E. coli</i> CHD22	<b>0,63</b> (0,63-2,5)	<b>0,63</b> (0,63-5)
<i>E. coli</i> CHD94	<b>1,25</b> (0,63-5)	<b>1,25</b> (0,63-5)
<i>E. coli</i> UTI89	<b>1,25</b> (1,25-5)	<b>1,25</b> (1,25-5)
<i>E. coli</i> ATCC25922	<b>2,5</b> (1,25-2,5)	<b>2,5</b> (1,25-2,5)
<i>K. pneumoniae</i> 595WT	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>0,63</b> (0,63-1,25)
<i>K. pneumoniae</i> CHD67	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>0,63</b> (0,63- 1,25)
<i>K. pneumoniae</i> CHD99	<b>5</b> (5->10)	<b>10</b> (10)
<i>P. mirabilis</i> CHD72	<b>5</b> (0,63-5)	<b>10</b> (1,25-10)
<i>P. mirabilis</i> CHD76	<b>1,25</b> (0,63-2,5)	<b>2,5</b> (1,25-5)
<i>E. cloacae</i> CHD57	<b>5</b> (5->10)	<b>10</b> (10)
<i>E. cloacae</i> CHD60	<b>0,63</b> (0,63-1,25)	<b>1,25</b> (0,63-2,5)
<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<b>5</b> (5-10)	<b>10</b> (10)
<i>P. aeruginosa</i> CHD80	<b>5</b> (5- >10)	<b>10</b> (10)
<i>P. aeruginosa</i> CHD81	<b>10</b> (5-10)	<b>10</b> (10->10)
<i>E. faecalis</i> CHD30	<b>1,88</b> (0,63->10)	<b>1,25</b> (0,31-1,25)
<i>E. faecalis</i> CHD31	<b>2,5</b> (1,25->10)	<b>2,5</b> (1,25-2,5)
<i>S. saprophyticus</i> Ho94	<b>0,31</b> (0,31-0,63)	<b>0,31</b> (0,31-1,25)
<b>Antibiotika-resistente Stämme</b>	<b>MIC [%]</b>	<b>MBC [%]</b>
<i>E. coli</i> H75	<b>1,25</b> (1,25-5)	<b>2,5</b> (1,25-2,5)
<i>E. coli</i> CHD16	<b>2,5</b> (0,63-5)	<b>2,5</b> (0,63-5)
<i>E. coli</i> IR3	<b>1,25</b> (0,31-5)	<b>0,63</b> (0,31-0,63)
<i>E. coli</i> 1949820	<b>2,81</b> (0,625->10)	<b>10</b> (5-10)
<i>E. coli</i> CDF2	<b>0,31</b> (0,31-1,25)	<b>0,31</b> (0,31-1,25)

<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA1705	5 (2,5-5)	5 (2,5-10)
<i>K. pneumoniae</i> ATCC BAA2146	2,5 (2,5-5)	10 (10->10)

### 3.3.3 Bestimmung der Synergie zwischen Ölen und Antibiotika

Um Synergien zwischen den ätherischen Ölen Teebaumöl, Thymianöl und Cajepütöl zu bestimmen, wurden diese Öle in Kombination im Checkerboard-Assay untersucht. Das Experiment wurde mit dem Antibiotika-sensitiven *E. coli* Stamm CHD94 und dem Antibiotika-resistenten Stamm *E. coli* CHD16 durchgeführt. Bei den Kombinationen von Teebaumöl und Thymianöl zeigte sich für den *E. coli* Stamm CHD94 eine FICI von 0,38. Bei der Kombination von Teebaumöl und Cajepütöl konnte eine FICI von 0,5 berechnet werden. Bei diesen beiden Kombinationen handelt es sich um Synergien. Für Cajepütöl und Thymianöl wurde die FICI 0,75 bestimmt. Für diese FICI und zwei der FICIs des Stamms *E. coli* CHD16 unter Behandlung durch die Kombinationen Teebaumöl - Thymianöl (FICI 0,56) und Teebaumöl - Cajepütöl (FICI 1) zeigten sich additive Effekte. Die Kombination Cajepütöl und Thymianöl appliziert an *E. coli* Stamm CHD16 zeigte mit der FICI von 2 einen indifferenten Effekt (Tabelle 13).

**Tabelle 13: Median MIC ätherischer Öle alleine und in Kombination mit anderen ätherischen Ölen in artifiziellem Urin sowie Median FICI (Tee – Teebaumöl, Thy – Thymianöl, Caj – Cajepütöl)**

Kombination	MIC [%] allein		MIC [%] in Kombination		FICI	<i>E. coli</i> Stamm
	1	2	1	2		
Tee (1) + Thy (2)	0,625	0,625	0,16	0,313	0,38	CHD94
Tee (1) + Caj(2)	0,313	5	0,078	1,25	0,5	CHD94
Caj (1) + Thy (2)	5	0,625	1,25	0,625	0,75	CHD94
Tee (1) + Thy (2)	0,625	0,313	0,313	0,039	0,56	CHD16
Tee (1) + Caj (2)	0,625	1,25	0,313	0,625	1	CHD16
Caj (1) + Thy (2)	2,5	0,31	1,25	0,31	2	CHD16

Im Weiteren wurden die MBC sowie die FBCI bestimmt. Hier zeigten sich synergistische Effekte für den *E. coli* Stamm CHD94 in der Kombination von Teebaumöl und Thymianöl. Additive Effekte zeigten sich für die Kombinationen Teebaumöl und Cajepütöl bei *E. coli* CHD94, Teebaumöl und Thymianöl sowie Teebaumöl und Cajepütöl bei dem Antibiotika-resistenten *E. coli* Stamm CHD16. Die Kombination von Cajepütöl mit Thymianöl zeigte sowohl für *E. coli* CHD94 als auch für *E. coli* CHD16 indifferente Effekte an (Tabelle 14).

**Tabelle 14: Median MBC ätherischer Öle alleine und in Kombination mit anderen ätherischen Ölen in artifiziellem Urin sowie Median FBCI (Tee – Teebaumöl, Thy – Thymianöl, Caj – Cajepütöl)**

Kombination	MBC [%] allein		MBC [%] in Kombination		FBCI	<i>E. coli</i> Stamm
	1	2	1	2		
Tee (1) + Thy (2)	0,625	0,625	0,156	0,156	0,38	CHD94
Tee (1) + Caj (2)	0,625	5	0,313	0,156	0,53	CHD94

Caj (1) + Thy (2)	5	0,63	5	0,63	2	CHD94
Tee (1) + Thy (2)	0,625	0,313	0,313	0,078	0,63	CHD16
Tee (1) + Caj (2)	0,625	2,5	0,31	1,25	1	CHD16
Caj (1) + Thy (2)	2,5	0,31	1,25	0,31	2	CHD16

Zum Schluss wurde die FICI der ätherischen Öle in Kombination mit verschiedenen Antibiotika bestimmt. Hierbei zeigte sich, dass die ätherischen Öle Thymianöl und Teebaumöl in Kombination mit Nitrofurantoin bei Applikation mit dem *E. coli* Stamm CHD94 eine additive Wirkung hatten. Die Kombination von Thymian und Pivmecillinam zeigte bei beiden *E. coli* Stämmen additive Effekte, genau wie die Kombination von Teebaumöl und Pivmecillinam. Die Kombination von Thymianöl und Fosfomycin zeigte bei *E. coli* CHD94 additive Effekte. Die Kombination von Teebaumöl und Fosfomycin zeigte diese bei *E. coli* CHD16 (Tabelle 15).

**Tabelle 15: Median MIC des ätherischen Öls / Antibiotikums alleine und in Kombination und Median der FICI**

Kombination	MIC allein*		MIC in Kombination*		FICI	<i>E. coli</i> Stamm
	1	2	1	2		
Thy (1) + Nitro (2)	0,63	4	0,31	2	0,99	CHD94
Tee (1) + Nitro (2)	0,63	32	0,31	16	0,99	CHD94
Thy (1) + Piv (2)	0,63	8	0,31	1	0,74	CHD94
Thy (1) + Piv (2)	0,63	128	0,31	32	0,57	CHD16
Tee (1) + Piv (2)	0,63	8	0,31	1	0,62	CHD94
Tee (1) + Piv (2)	0,63	128	0,31	32	0,74	CHD16
Thy (1) + Fos (2)	0,63	32	0,63	8	0,74	CHD94
Tee (1) + Fos (2)	0,63	32	0,31	16	0,99	CHD16

Tee – Teebaumöl, Thy – Thymianöl, Nitro – Nitrofurantoin, Piv – Pivmecillinam, Fos – Fosfomycin, \* MIC der ätherischen Öle dargestellt in [%], die der Antibiotika in [µg/ml]

Abschließend wurde die FBCI der Kombinationen aus den ätherischen Ölen Teebaumöl und Thymianöl bestimmt. Thymian wirkte in Kombination mit Nitrofurantoin additiv gegen den *E. coli* Stamm CHD94. Teebaumöl und Pivmecillinam sowie Thymianöl und Pivmecillinam wirkten auch bei *E. coli* Stamm CHD94 additiv. Die Additive Wirkung von Thymianöl und Pivmecillinam zeigte sich darüber hinaus bei *E. coli* Stamm CHD16. Thymianöl und Fosfomycin zeigten sowohl bei *E. coli* CHD94 als auch bei *E. coli* CHD16 additive Effekte, genau wie die Kombination von Teebaumöl und Fosfomycin bei *E. coli* CHD16 (Tabelle 16).

**Tabelle 16: Median MBC des ätherischen Öls / Antibiotikums alleine, in Kombination und Median der FBCI:**

Kombination	MBC allein*		MBC in Kombination*		FBCI	<i>E. coli</i> Stamm
	1	2	1	2		
Thy (1) + Nitro (2)	0,63	8	0,31	2	0,74	CHD94
Tee (1) + Piv (2)	0,63	8	0,31	2	0,74	CHD94
Thy (1) + Piv (2)	0,63	8	0,31	2	0,76	CHD94

Thy (1) + Piv (2)	0,63	128	0,31	8	0,57	CHD16
Thy (1) + Fos (2)	0,63	32	0,63	16	0,75	CHD94
Thy (1) + Fos (2)	0,63	128	0,31	32	0,77	CHD16
Tee (1) + Fos (2)	0,63	128	0,16	64	0,75	CHD16

Tee – Teebaumöl, Thy – Thymianöl, Nitro – Nitrofurantoin, Piv – Pivmecillinam, Fos – Fosfomycin,  
\* MBC der ätherischen Öl dargestellt in [%], die der Antibiotika in [µg/ml]

### 3.4 Inhaltsstoffe ätherischer Öle

Tabelle 17: Chemische Zusammensetzung der ätherischen Öle Cajeputöl, Lemongrassöl, Teebaumöl und Thymianöl angegeben in [%] (analysiert durch Gaschromatographie, durchgeführt mit GC-FID-MS Perkin Elmer Clarus 500 using column DB5-MS. 60 m x 0.25 mm x 0.25 µm). Die Zertifikate wurden durch den Hersteller PRIMAVERA LIFE GmbH zur Verfügung gestellt. Fett markiert sind jeweils die zwei Inhaltsstoffe pro Öl, die am häufigsten in dem Öl vorkommen. Weitere Angaben siehe Analysenzertifikate der Öle im Anhang.

	Cajeputöl [%]	Lemongrassöl [%]	Teebaumöl [%]	Thymianöl [%]
Limonen	5,26	1,67	0,85	3,04
Linalool	2,69	1,19 – 1,39	0,06	<b>44,56</b>
1,8-Cineol	<b>64,13</b>		2,08	0,56
α-Pinene	1,76		2,52	3,53
α-Terpinene	0,23		9,49	4,04
α-Terpineol	<b>11,43</b>		2,81	1,74
β-Myrcene	1,23		0,84	8,86
β -Pinene	1,27		0,71	0,66
γ-Terpinene	0,74		<b>20,26</b>	6,87
p-Cymene	0,37		2,63	3,67
β -Caryophyllene	1,21	0,66 – 1,85		
Geraniol	0,26	0,83 – 7,82		
d-Cadinene		0,27 - 0,31	1,18	
Camphene		1,12 – 2,71		0,54
Citronellol + Nerol		0,22		<0,01
α-Phellandrene			0,44	0,52
β -Phellandrene			0,85	0,46
c-p-Menth-2-en-1-ol			0,27	1,44
Terpinene-4-ol			<b>40,39</b>	<b>10,51</b>
t-p-Menth-2-en-1-ol			0,20	0,18
α-Guaiol	0,66			
α-Humulene	0,8			
α-Selinene	0,88			
α-Ylangene	0,18			
Benzaldehyd	0,13			
β -Eudesmol	0,46			
β -Selinene	1,29			
d-Terpineol	0,24			
Eugenol	0,04			
Terpinen-4-ol	0,78			
1-Decanal		0,15 – 0,24		
4-Nonanone		1,37		
6-Methyl-5-heptene-2-one		1,46 – 2,95		
Caryophyllene oxide		0,46 – 0,51		
c-b-Ocimene		0,6		
C-Isoeugenol		0,14		
Citronellal		0,48 – 0,54		
Citronellol		0,39		
Eugenol + α-Cubebene		0,04		
Exo-Isocitral		0,44 – 0,66		
γ -Cadinene		1,08 – 1,26		
Geranial		<b>36,45 – 43,38</b>		
Geranyl acetate		0,20 – 4,03		

	Cajeputöl [%]	Lemongrassöl [%]	Teebaumöl [%]	Thymianöl [%]
Isogeranial		1,86 – 2,81		
Isoneral		1,13 – 1,80		
Limonen + c-b-Ocimene		0,93		
Neral		<b>28,49 – 33,88</b>		
Nerol		0,2		
Photocitral A		n.n. ; 0,34		
t-Isoeugenol		0,13		
Allo-Aromadendrene			0,55	
Aromadendrene			1,33	
α-Thujene			0,91	
Globulol			0,29	
Ledene + Bicyclogermacrene			0,79	
Methyleugenol			0,05	
Sabinene			0,28	
t-b-Caryophyllene			0,42	
Terpinolene			3,62	
β -Caryophyllene				0,61
Borneol				1,61
Camphor				0,51
c-Dihydrocarvone				0,19
c-Sabinene hydrate + c-Linalool oxide				1,18
Hotrienol				1,44
Laevo-b-Pinene				<0,01
Linalyl acetate				0,46
m-Thymol				0,83
Sabinene + 1-Octen-3-ol				1,12
Terpinelene + t-Linalool oxide				1,19

Anhand der von Primavera bereitgestellten Daten waren die Hauptinhaltsstoffe der getesteten Öle bekannt. Im Cajeputöl war der Hauptbestandteil mit 64,13% 1,8-Cineol gefolgt von 11,43% α-Terpineol. Für Lemongrassöl waren die Hauptbestandteile Geranial mit 36,45% - 43,38% und Neral mit 28,49% - 33,88%. Teebaumöl enthielt als Hauptbestandteil 40,39% Terpinene-4-ol und 20,26% γ-Terpinene. Die Hauptbestandteile von Thymian waren 44,56% Linalool sowie 10,51% Terpinene-4-ol. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass bei unterschiedlichen Chargen wie z.B. bei Cajeputöl genau gleiche Konzentrationen der Inhaltsstoffe gemessen werden konnten oder aber auch wie bei Lemongrassöl sehr unterschiedliche Konzentrationen im Öl vorkommen können – trotz gleichem Anbau, gleichem Herkunftsland und gleichem Verfahren zur Gewinnung der Öle. Hier entsteht ein Spannungsfeld für die/den TherapeutIn, da die Wirkung der Öle von ihrer Zusammensetzung abhängig ist und somit nicht immer genau die gleiche Wirkung erwartet werden kann (Nguyen et al. 2018). Die hier dargestellten Chargen entsprechen nicht unbedingt den für diese Arbeit verwendeten Chargen.

## 4 Diskussion

### 4.1 D-Mannose als alternative Behandlungsmethode weiblicher HWIs

Aufgrund der weltweiten Zunahme von Antibiotikaresistenzen ist die Notwendigkeit alternativer Behandlungsstrategien bei unterschiedlichsten Infektionen, darunter auch HWIs durch uropathogene Bakterien, (World Health Organization 2018) von zunehmender Bedeutung. Ein möglicher therapeutischer Ansatz könnte die Hemmung einzelner Virulenzfaktoren uropathogener Bakterien sein. Ein wissenschaftlich bereits gut erforschter Ansatz zur Reduktion der Virulenz ist die Absättigung bakterieller Fimbrien, die zur Adhärenz nach dem Schlüssel-Schloss Prinzip am Urothel dienen und bei der Infektion des Wirts häufig entscheidend sind (Mulvey 2002). Dabei handelt es sich im Konkreten z.B. um die Adhäsion des FimH Proteins aus Typ-1-Fimbrien von *E. coli* an das Uroplakin 1a der Superficialzellen der Blase (Wu et al. 2009). Das Uroplakin 1a enthält D-mannosylierte Glykoproteine, die für eine erfolgreiche Verbindung zwischen Bakterium und Urothel relevant sind. Die Absättigung der bakteriellen Fimbrien kann deshalb auch durch Monosaccharide wie D-Mannose erfolgen (Sihra et al. 2018). Diesem Gedankengang folgend wurde konkret untersucht, ob sich die Monosaccharide D-Mannose und D-Fruktose *in vitro* als Rezeptoranaloga von Molekülen der Glykokalyx von weiblichen T24 Urothelzellen eignen.

#### 4.1.1 Wirkungen der Monosaccharide auf Blasenepithelzellen und uropathogene Bakterien

Zunächst wurde untersucht, welche Auswirkungen die Applikation der Monosaccharide auf Blasenepithelzellen und auf uropathogene Bakterien zeigte. Anhand einer MTT Testung konnte gezeigt werden, dass die T24-Blasenepithelzellen in ihrem Metabolismus durch die applizierten Monosaccharide D-Mannose und D-Glukose mit einer geringen Verbesserung ihrer Viabilität reagierten, während die Applikation von D-Fruktose zu einer geringen Verschlechterung der Viabilität führte. Bezogen auf die orale Applikation der D-Mannose mit Aufnahme im Darm und Ausscheidung über die Niere (Davis und Freeze 2001) muss damit von keiner negativen Beeinflussung der Urothelzellen ausgegangen werden.

Die Bestimmung von Wachstumskurven der *E. coli* Stämme CHD1, CHD3, CHD22, CHD94 und UTI89 konnte zeigen, dass das Bakterienwachstum in artifiziellem Urin im Zeitraum von 6 h nicht durch die Zugabe der Monosaccharide D-Mannose, D-Fruktose und D-Glukose in den Konzentrationen von jeweils 1% beeinflusst wurde. Nach 24 h war das Wachstum unter Exposition von Monosacchariden bei drei der getesteten Stämme leicht reduziert gegenüber dem der Kontrolle. Dies ist als positiv zu bewerten,

da eine positive Beeinflussung des bakteriellen Wachstums eine erhöhte Bakterienlast für die Patientinnen bedeuten würde. Michaels et al. zeigten, dass die Exposition von *E. coli* in sterilisiertem Urin mit 10% D-Mannose oder 10% D-Glukose bei 37°C im Zeitraum von 24 h die Bakterienanzahl insignifikant erhöhte. Dies legt nahe, dass es sich um eine dosisabhängige, sehr leichte und möglicherweise zu vernachlässigende Wachstumsbeschleunigung handelt (Michaels et al. 1983). Scribano et al. testeten 4 Monosaccharide und konnten zeigen, dass eine D-Mannose Konzentration bis zu 10% den geringsten Einfluss auf das bakterielle Wachstum hatte. D-Fruktose wird etwas besser als D-Mannose und D-Glukose am besten metabolisiert (Scribano et al. 2020). Die Studienlage deckt sich diesbezüglich mit den Ergebnissen in dieser Arbeit. Wie sich D-Mannose im Urin dauerhaft auf das Bakterienwachstum auswirkt, vor allem in der Blase, in der sonst ein besonders nährstoffarmes Milieu herrscht, (Wiles et al. 2008) sollte in weiteren, vor allem klinischen Studien beobachtet werden.

#### **4.1.2 Adhärenz-inhibition durch Monosaccharide**

Zur Klärung des möglichen Wirkspektrums der D-Mannose wurden mithilfe des Hefeagglutinationsassays D-Mannose sensitive Bakterienstämme identifiziert. Dabei agglutinierten mit Typ-1-Fimbrien ausgestattete Bakterienstämme mit *Saccharomyces cerevisiae* (Mirelman et al. 1980). Diese Bindung konnte bei Agglutination von D-Mannose sensitiven Fimbrien durch Zugabe dieser inhibiert werden und diente somit als Indikator für Typ-1-Fimbrien oder andere D-Mannose sensitive Fimbrien. Es agglutinierten 7 der 11 in dieser Arbeit getesteten *E. coli* Stämme mit der Hefe. Mirelman et al. untersuchten eine höhere Zahl an Bakterien aus PatientInnenisolaten und konnten zeigen, dass 54 von 118 getesteten *E. coli* Stämme mit Hefe agglutinierten (Mirelman et al. 1980). Die Agglutination ist auch bei Mirelman et al. von jedem Bakterium einzeln abhängig und nicht für alle Bakterien einer Art gleich.

Die Ergebnisse aus dem Hefeagglutinationsassay dienten der Auswahl der Bakterienstämme für den Adhärenzassay. Dort wurde überprüft, ob sich das Agglutinationsverhalten mit der Hefe und die Inhibition der Bindung durch die D-Mannose auf die Bindung an die Blasenepithelzellen übertragen lässt und wie stark sich die Bakterienlast durch das Vorkommen von D-Mannose und D-Fruktose zum Zeitpunkt der Infektion im Urin reduzierte. Im Adhärenzassay wurde deutlich, dass das Adhäsionsverhalten der Bakterien durch D-Mannose an weibliche T24 Blasenepithelzellen beeinflusst werden konnte. Signifikante Ergebnisse, die eine Inhibition der Bindung der Bakterien an die Urothelzellen anzeigten, ergaben sich vor allem in der Testung mit 1% D-Mannose. Die stärkste Reduktion konnte für den *E. coli* Stamm CHD22 bei Applikation von 1% D-Mannose auf 22,1% gegenüber der Kontrolle

beobachtet werden. Auch die *E. coli* Stämme CHD3, CHD94, UTI89 und CHD16 zeigten Reduktionen der Bakterienmenge um 15,89% - 28,16% im Verhältnis zur Kontrolle. In einer Studie an Ratten wurden  $10^5$  bis  $10^9$  KBE / 0,1 ml *E. coli* Bakterien zusammen mit D-Mannose als Suspension in den Konzentrationen 2,5% und 10% in die Blase gespritzt (Michaels et al. 1983). Es zeigte sich eine signifikante Inhibition der Adhärenz von *E. coli* durch 2,5% D-Mannose. Dieser Effekt war bei 10% D-Mannose verstärkt. Weiter zeigte sich auch eine Abhängigkeit von der zu Beginn in die Blase applizierten Bakterienmenge sowie der Dauer der Therapie. Desto mehr Bakterien appliziert wurden, desto länger brauchten die Ratten unter Therapie mit D-Mannose, bis sie die Bakterienkonzentrationen der Kontrolltiere unterschritten. Der Effekt wird also als dosisabhängig beschrieben. Höhere Dosen D-Mannose haben einen stärkeren Effekt (Michaels et al. 1983). Dies stimmt mit den Ergebnissen unserer Arbeit überein. Scribano et al. vermuten, dass es bei einem Urin Volumen von 800-2000 ml/Tag und einer Einnahme von 2-3 g D-Mannose zu D-Mannose Konzentrationen von 0,1-0,25% im Urin kommen könnte (Scribano et al. 2020). Als Folge der Ergebnisse in dieser Arbeit, die zeigen, dass bei gleichzeitiger Applikation mit den Bakterien bereits Konzentrationen von 0,1% D-Mannose wirksam die Zahl der an Zellen gebundenen Bakterien reduzieren kann, ergibt sich eine mögliche Indikation für D-Mannose als Prophylaxe bei rezidivierenden Infektionen. Besonders bei niedrigen Bakterienkonzentrationen könnte diese geringe Dosis einen prophylaktischen Effekt haben und die Adhärenz geringer Bakterienmengen verhindern, noch bevor diese eine Konzentration von  $10^3$  -  $10^5$  KBE/ml erreichen und eine symptomatische HWI auslösen. Anstatt den Ansatz zu verfolgen, die D-Mannose Konzentration zu erhöhen, erscheint es sinnvoll, bei weiteren *in vitro* Versuchen die Bakterienmenge zu reduzieren und zu beobachten, wie viele Bakterien eine realistisch *in vivo* in der Blase zu erwartende Konzentration an D-Mannose an der Adhärenz hindern kann. Für den Fall, dass keine D-Mannose Konzentrationen von 0,1% - 1% im Urin erreicht werden können, wäre bei geringer Bakterienlast ( $<7 \times 10^5$  KBE/ml) möglicherweise trotzdem eine sehr gute Wirkung zu erwarten.

Unter der Annahme einer möglichen klinischen Verwendung von D-Mannose zur Prophylaxe von HWIs stellen sich somit pharmakokinetische Fragen. So gibt es bisher nur vereinzelte Studien, die die Menge an oral eingenommener D-Mannose im Urin quantifizieren. In einer Studie von Metha et al. mit gesunden Probandinnen und einer sehr kleinen Stichprobe von  $n=2$  zeigte sich, dass bei gesunden Frauen physiologisch eine bestimmte Menge an D-Mannose im Urin gemessen werden kann (zwischen 230  $\mu\text{mol/L}$  - 710  $\mu\text{mol/L}$ ). Diese Konzentration unterliegt hohen Tagesschwankungen von  $62 \mu\text{mol/L} \pm 33 \mu\text{mol/L}$ . Und auch von Schwankungen bei einer einzelnen Probandin

von 8  $\mu\text{mol/L}$  – 450  $\mu\text{mol/L}$  wird berichtet. Die Frage, die sich hieraus stellt, ist, ob Frauen mit dauerhaft geringeren Konzentrationen an D-Mannose im Urin möglicherweise eher zu rezidivierenden HWIs neigen als Frauen mit hohen D-Mannose Konzentrationen. Deshalb wurden in dieser Studie weitere 8 Frauen mit rezidivierenden HWIs auf ihre D-Mannose Konzentration im Urin hin untersucht. Hier zeigte sich, dass die durchschnittliche D-Mannose Konzentration bei  $151 \mu\text{mol/L} \pm 138 \mu\text{mol/L}$  lag. Die Dissoziationskonstante des FimH Rezeptors und der D-Mannose lag bei  $2,3 \mu\text{mol/L}$  (Bouckaert et al. 2005). Durch die Einnahme von 2 g D-Mannose konnte in der Studie bei  $n=2$  keine Erhöhung der D-Mannose Konzentration im Urin beobachtet werden. Da die Probandinnen jedoch bereits hohe Level an D-Mannose im Urin aufwiesen, weisen die AutorInnen darauf hin, dass sich dies bei Probandinnen mit geringeren Konzentrationen anders auswirken könnte (Mehta et al. 2018). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Konzentration von 1% bis minimal 0,1% D-Mannose im Urin erreicht werden sollte, um eine signifikante Reduktion der Adhäsion bei einer Bakterienzahl von  $ca\ 7 \times 10^5$  KBE/ml zu erzielen. Dies entspricht einer Konzentration von  $55,5 \mu\text{mol/L}$  bzw. bei 0,1% D-Mannose  $5,5 \mu\text{mol/L}$ . Dies überschreitet die von Bouckaert et al. bestimmte Dissoziationskonstante des FimH Rezeptors. Ob diese Konzentration im Urin erreicht werden kann und welche Rolle die natürliche D-Mannose Ausscheidung spielt, muss durch weitere und größer angelegte pharmakokinetische Studien geklärt werden.

#### **4.1.2.1 Agglutinationsverhalten unterschiedlicher uropathogener Bakterien**

Die Fähigkeit zur Agglutination mit Hefe und auch die Sensitivität auf D-Mannose scheint weiter unabhängig von Antibiotikaresistenzen zu sein. So zeigte auch der ESBL-positive Stamm *E. coli* CHD16 und der Carbapenem-resistente *E. coli* IR3 eine Agglutination, welche durch Zugabe von D-Mannose inhibiert wurde. Auch im Adhärenzassay zeigten diese Stämme bei Applikation von 1% D-Mannose eine signifikante Reduktion der Adhärenz (*E. coli* CHD16  $p < 0,001$  *E. coli* IR3  $p < 0,0005$ ). Der *E. coli* Stamm IR3 zeigte eine Reduktion der Bakterienlast auf 46,90% der Kontrolle sogar bei 0,1% D-Mannose ( $p < 0,009$ ). Antibiotikaresistenzen müssen also nicht zwangsläufig auch mit Resistenzen gegen D-Mannose einhergehen. Demnach könnte D-Mannose auch bei Patientinnen versucht werden, die an rezidivierenden HWIs mit antibiotikaresistenten Erregern leiden. Da es bei den Betroffenen aufgrund der Antibiotikaresistenzen der Erreger meist weniger antibiotische Alternativen (Leitlinienprogramm DGU 2017) gibt, sollte dieser Ansatz weiter verfolgt werden.

In dieser Arbeit wurden neben *E. coli* auch andere uropathogene Bakterienarten im Hefeagglutinationsassay untersucht. So konnte gezeigt werden, dass z.B. *P. mirabilis*

und *E. cloacae* eine D-Mannose abhängige Agglutination der Hefe verursachten. Insgesamt agglutinierten nur 2 von 15 getesteten nicht-*E. coli* Bakterienstämmen D-Mannose konzentrationsabhängig. Da mittels Adhärenzassay *P. mirabilis* und *E. cloacae* nicht weiter untersucht wurden, muss weiter geprüft werden, ob die Prophylaxe mit D-Mannose über *E. coli* hinaus auch bei HWIs mit anderen Bakteriengruppen angewandt werden kann. 4 von 5 der in dieser Arbeit untersuchten *K. pneumoniae* Stämme agglutinierten nicht mit Hefe. Mirelman et al. konnte jedoch zeigen, dass 15 der 16 von der Arbeitsgruppe getesteten *K. pneumoniae* Stämme mit Hefe agglutinierten. Diese waren jedoch nicht sensitiv auf die Applikation von Methyl  $\alpha$ -D-mannosiden. Dieser Effekt fiel auch in dieser Arbeit auf, anhand des Stamms *K. pneumoniae* 595WT. *K. pneumoniae* 595WT zeigte die Agglutination mit Hefe sowohl mit als auch ohne D-Mannose. Auch die Stämme *E. cloacae* CHD60 und *E. faecalis* CHD30 zeigten diese D-Mannose unabhängige Agglutination mit Hefe. Durch den Versuch konnte gezeigt werden, dass nicht alle Bakterien, die mit Hefe agglutinieren auch durch die Zugabe von D-Mannose in hoher Konzentration in der Bindung inhibiert werden können. Hier liegen vermutlich alternative Fimbrien vor, die nicht D-Mannose binden, sondern für die Hefeagglutination andere Oberflächenproteine nutzen. Weiter zeigt Mirelman et al., dass unterschiedliche Bakterien eine unterschiedlich starke Agglutination der Hefe verursachen. Dies impliziert, dass auch die Bindung an das Wirtsgewebe bei verschiedenen uropathogenen Stämmen unterschiedlich stark ausgeprägt sein kann und D-Mannose hier unterschiedlich potent intervenieren könnte. Um einer unwirksamen Prophylaxe vorzugreifen, empfiehlt es sich möglicherweise vor der Gabe von D-Mannose eine Sensitivitätstestung der isolierten uropathogenen Bakterien, aus der vorhergehenden Infektion, im einfach durchzuführenden Hefeagglutinationsassay durchzuführen.

#### **4.1.3 D-Mannose als Prophylaxe und nicht als Therapie**

Die These, dass die Therapie mit D-Mannose als Therapie bei einmaligen akuten HWIs, mit akut bestehender Symptomatik und somit bereits gebundenen UPECs sinnvoll anwendbar ist, wurde getestet, indem T24 Zellen mit bereits gebundenen *E. colis* mit D-Mannose-haltigem Urin gewaschen wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass hierbei keine signifikante Reduktion der Anzahl adhärenter Bakterien erzielt werden konnte. Dies lässt darauf schließen, dass die Bindung der Fimbrien, sobald sie einmal stattgefunden hat, durch D-Mannose, in den hier getesteten Konzentrationen, nicht gelöst werden konnte. Möglicherweise wurde die zur Dissoziation von FimH und D-Mannose nötige Konzentration nicht erreicht. Dies muss weiter untersucht werden. Außerdem könnte der sog. „stick and roll“ Mechanismus zum Tragen gekommen sein.

Beim „stick and roll“ Mechanismus wird durch einen Anstieg der Scherkräfte die Bindungskraft von *E. coli* Bakterien erhöht, die über Typ-1-Fimbrien an D-Mannosehaltige Oberflächen binden. Durch eine Reduktion der Scherkräfte lösen sich die Bindungen wieder. Dabei kommt es bei sehr leichten Scherkräften sogar zu einem Rollen der *E. coli* Bakterien über die Zelloberfläche (Thomas et al. 2004). Dies würde bedeuten, dass in dem hier durchgeführten Versuchsmodell die bereits gebundenen *E. coli* aufgrund des erhöhten Scherstress durch das Abwaschen mit D-Mannose eine geringere Dissoziationskonstante haben. Die Bindungen wurden also fester. Aus diesem Versuch abgeleitet, wäre D-Mannose nicht zur Akuttherapie spontaner Zystitiden geeignet, da der Behandlungsbeginn bei einer akuten Infektion immer erst nach dem Binden der Bakterien an das Urothel wäre. Eine Lösung dieser Bindung durch die Exposition mit D-Mannose konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden.

Weiter gibt es verschiedene Argumente, die für die Nutzung von D-Mannose als Prophylaxe sprechen. Bei einigen Patientinnen, die unter rezidivierenden Harnwegsinfektionen leiden, kommt es zur Bildung sogenannter ICBs, *intracellular bacterial communities*. Dies sind *E. coli* Bakterien, die in die Urothelzellen hinein migrieren und sich dort, innerhalb einer polysaccharidreichen Matrix und umgeben von einer schützenden Schale von Uroplakinen, vermehren (Anderson et al. 2003; Lühje und Brauner 2014). Auf diese Weise sind die Bakterien vor dem Immunsystem und auch vor Antibiotika geschützt. Für betroffene Patientinnen könnte die Prophylaxe mit D-Mannose sehr sinnvoll sein, da immer wieder aus den ICBs heraustretende Bakterien direkt an die D-Mannose binden würden und effektiver aus der Blase herausgespült würden. Auch bei häufigen Reinfektionen durch Bakterien aus Vulva, Vagina und Anus kann die D-Mannose die Besiedlung von Bakterien mit D-Mannosebindenden Fimbrien sowohl an den vaginalen Schleimhautzellen (Schaeffer et al. 1984) als auch an den Urothelzellen vermindern. Nach Ofek et al. gibt es auch *E. coli* Stämme, die die Fähigkeit, mannosylierte Proteine zu binden, nur zu bestimmten Zeitpunkten ausprägen, da sie z.B. bei der Infektion für das Bakterium sehr nützlich ist, darüber hinaus aber keinen Nutzen bringt (Ofek et al. 1981). Die Expression des Typ-1-Pilus ist abhängig von Signalen aus der Umwelt - im Falle einer HWI wäre das u.a. der saure pH-Wert (Terlizzi et al. 2017). Dies unterstützt auch die These, dass die D-Mannose vor allem zur Rezidivprophylaxe verwendet werden sollte. Gerade zu Beginn der Invasion exprimieren Bakterien nach Ofek et al. die Fimbrien. Wenn ein Infekt schon lange besteht, kann durch die Gabe der D-Mannose vermutlich nur die weitere Ausbreitung des Infekts an der Oberfläche vermieden werden. Die Bakterien, die sich vor längerer Zeit in der Blase eingenistet haben, würden dann nach Ofek et al. vermutlich keine Fimbrien mehr exprimieren.

Auch erste klinische Studien deuten darauf hin, dass D-Mannose als wirksame Prophylaxe bei rezidivierenden HWIs wirkt. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass innerhalb von sechs Monaten der Anteil an Patientinnen, die an einem HWI erkrankten, signifikant von 45% auf 24% durch Einnahme von 2 g D-Mannose mit 140 mg Procyanidin, Ursolsäure, Vitamin A, C und D sowie Zink anstelle von 240 mg Procyanidin pro Tag reduziert werden konnte. Die krankheitsfreie Zeit erhöhte sich von 79 auf 95 Tage (Salinas-Casado et al. 2018). Eine andere Studie zeigte, dass nach urodynamischen Untersuchungen ein Präparat mit D-Mannose in Kombination mit N-Acetylcystein und Morinda Citrifolia (Nonibaum) im Vergleich mit 400 mg/Tag Prulifloxacin, einem Antibiotikum der Klasse der Fluorchinolone, gleich gut wirksam war. Die AutorInnen schlagen die Mischung mit D-Mannose als alternatives prophylaktisches Therapeutikum nach urodynamischen Untersuchungen der Patientinnen vor (Palleschi et al. 2017). Bei Kranjčec et al. wurde gezeigt, dass D-Mannose als Prophylaxe bei einer Einnahme von 2 g pro Tag mit 50 mg Nitrofurantoin als Prophylaktikum vergleichbar wirkte. Alle Patientinnen erhielten bei symptomatischem HWI zunächst 7 Tage lang Ciprofloxacin. In der Kontrollgruppe ohne Prophylaxe kam es innerhalb von 30 Tagen nach Therapiebeginn bei 62 von 103 Patientinnen zu HWIs. In der Nitrofurantoin Gruppe erkrankten 21 von 103 Patientinnen. Bei D-Mannose betrug die Zahl an erkrankten Patientinnen nur 15 von 100. Insgesamt beschreiben die AutorInnen die Wirkung der D-Mannose als gleichwertig verglichen mit der von Nitrofurantoin (Kranjčec et al. 2014). Ein weiterer Aspekt, der D-Mannose zu einer attraktiven Prophylaxe macht, ist, dass in *in vivo* Studien, unter anderem mit Mäusen, bisher keine Nebenwirkungen von D-Mannose gezeigt wurden (Davis und Freeze 2001). Salinas-Casado et al. berichten, dass die orale Applikation von 2 g D-Mannose pro Tag Diarrhö verursachen kann (Salinas-Casado et al. 2018). Hierbei handelt es sich insgesamt um deutlich geringere Nebenwirkungen, als durch eine dauerhafte Einnahme von Antibiotika verursacht werden könnten (Leitlinienprogramm DGU 2017). Weiter ist auch, anders als bei Antibiotika (Leitlinienprogramm DGU 2017), keine Resistenzbildung zu erwarten, da bereits gezeigt werden konnte, dass UPECs ohne Typ-1-Fimbrien ihre Fähigkeit zur Invasion in Blasenepithelzellen und damit einen wichtigen Pathogenitätsfaktor nahezu gänzlich einbüßen und auch ihre Fähigkeit zur Bindung an Epithelzellen um ca. 50% reduziert ist (Hung et al. 2002; Mulvey 2002; Martinez et al. 2000). Die Typ 1 Pili werden von ca. 90% aller bekannten UPEC Stämme und auch anderen gram-negativen Bakterien exprimiert (Ribić et al. 2018; Feenstra et al. 2017). Trotzdem gibt es auch einige uropathogene Bakterien, die keine Bindung im Hefeagglutinationsassay eingegangen sind. Deshalb empfiehlt es sich vor jedem prophylaktischen Einsatz von

D-Mannose einen Hefeagglutinationsassay durchzuführen. So würden Patientinnen eine personalisierte Therapie erhalten. Eine Veränderung der FimH Proteine ist durch längerfristige Exposition der UPECs laut Scribano et al. nicht zu erwarten. Die Bindungskapazität veränderte sich nicht und die Rezeptoren konnten nach Beendigung der D-Mannose Exposition wieder an mannosylierte Proteine binden (Scribano et al. 2020). Eine mögliche Resistenzbildung aufgrund unbekannter Mechanismen sollte bei Durchführung weiterer Studien jedoch immer beachtet werden.

#### **4.1.4 D-Mannose in Kombination mit Procyanidin A2**

In Kombination mit 10 µg/ml Procyanidin A2, dem Bestandteil, der als anti-adhäsiver Wirkstoff der Cranberry vermutet wird (Sihra et al. 2018), konnte keine Verbesserung der Wirkung von D-Mannose beobachtet werden. *In vitro* Studien belegen jedoch die Wirkung des Procyanidins auf Adhärenz und Mobilität verschiedener Bakterienstämme. Hier bleibt zu beachten, dass Procyanidin A2 auf die Adhärenz der P-Fimbrien wirkt und nicht auf die der Typ-1-Fimbrien, die die D-Mannose binden (Howell et al. 2005). Die P-Fimbrien dienen vor allem der Bindung von Epitopen in der Niere (Sihra et al. 2018; Lüthje und Brauner 2014). Eine Kombination beider Adhäsions-inhibierender Substanzen scheint jedoch bei Blasen­zellen keine additive Wirkung zu haben.

#### **4.1.5 Alternative Monosaccharide zu D-Mannose**

Neben D-Mannose wurde in dieser Arbeit auch eine anti-adhäsive Wirkung durch D-Fruktose, jedoch nicht durch D-Glukose, gezeigt. Es wurde bereits in anderen Arbeiten untersucht, wie stark verschiedene Monosaccharide an das FimH Protein binden. D-Glukose bindet 4000fach schwächer an FimH als D-Mannose, mit einer Dissoziationskonstante von 9,24 mM. Fruktose bindet mit einer Dissoziationskonstante von 31 µM. Trotzdem ist dies immer noch 15 fach schwächer als die Bindung von D-Mannose. Die verschiedenartige Bindungsaffinität zwischen den Monosacchariden und FimH kommt durch die Interaktion der OH-Gruppen über Wasserstoffbrückenbindungen mit der Lektindomäne, der Bindungsstelle des FimH Proteins, zustande (Bouckaert et al. 2005; Hung et al. 2002). Dies stimmt mit den Daten aus dieser Arbeit überein. Bei den *E. coli* Stämmen CHD3 und CHD94 zeigte sich die signifikante Wirkung ausschließlich bei D-Mannose, während bei *E. coli* CHD22 und *E. coli* UTI89 auch bei D-Fruktose eine signifikante Wirkung erzielt werden konnte. Diese Wirkung war allerdings bei CHD22 ~ 12 fach und bei UTI89 ~ 2,6 fach schwächer.

Andere Arbeitsgruppen untersuchten anti-adhäsive Wirkungen modifizierter D-Mannose Moleküle. Gouin et al. konnten zeigen, dass bestimmte multimere heptyl Mannoside eine 650-fache höhere Affinität zu den FimH Bindungsstellen haben als D-

Mannose und neben der Reduktion der Adhäsion auch die Bildung von Biofilmen reduzierten. Zusätzlich wurden weitere vielversprechende und potente Moleküle gefunden (Gouin et al. 2009). Neben den potenteren Mannosiden wurden multifunktionale Moleküle gesucht, die mehrere Adhäsine auf einmal absättigten (Zalewska-Piątek und Piątek 2019). Hier muss untersucht werden, ob die synthetischen Moleküle gut am Wirkungsort platziert werden können und welche Nebenwirkungen sie aufweisen. Außerdem wäre es möglich, Versuche mit einer Mischung verschiedener Monosaccharide durchzuführen, um herauszufinden, ob sich dadurch die Effektivität der Intervention erhöht. Dies wäre aufgrund der Verschiedenheit der Fimbrien (Klemm et al. 2010) anzunehmen.

#### **4.1.6 Überlegungen zur Glykokalyx von Patientinnen mit rezidivierenden HWIs**

Beim Urothel handelt es sich um spezialisiertes Epithel. Es kleidet den Harntrakt aus und spielt eine wichtige Rolle als Barriere zwischen dem hochosmolaren Urin und den Zellen der Harnwege. Die adäquate Funktion des Urothels ist unter anderem abhängig von der korrekten Funktion der Uroplakine. Diese Uroplakine wirken an den Zell-Zell Verbindungen zwischen Urothelzellen mit und befinden sich in der obersten Zellschicht (Kałnik-Prastowska et al. 2014). Das FimH Protein des Typ-1-Pilus von *E. coli* kann die stark mannosylierten Glykane des Uroplakin 1a in der Blase oder des Tamm-Horsfall Proteins aus der Niere binden (Sihra et al. 2018). Kałnik-Prastowska et al. gehen davon aus, dass die korrekte Glykosylierung der Uroplakine wichtig für ihre Funktion sei. Eine Störung ihrer Faltung könnte evtl eine HWI begünstigen, da durch die Änderung der Konfirmation akut eine bessere Bindung von Bakterien ermöglicht wird (Kałnik-Prastowska et al. 2014). Eine Veränderung der Glykosylierung in den Urothelzellen von Patientinnen mit rezidivierenden HWIs wäre demnach möglich. Darüber hinaus kommt es auch im Falle von neoplastischen Veränderungen an der Zellmembran verschiedener Zellreihen zu Veränderungen in der Glykokalyx (Dall'Olio et al. 2012). In dieser Arbeit wurden zur Durchführung des Adhärenzassays T24-Blasenepithelzellen verwendet. Hierbei handelt es sich um Krebszellen, also neoplastische Zellen, die genutzt wurden, da sie immortalisiert sind und sich unbegrenzt fortpflanzen können. Dass im Laufe der onkogenen Transformation einer Zelle eine Veränderung der zur Glykosylierung verwandten Zuckerketten auf der Zelloberfläche stattfinden kann, ist bekannt. Im Vergleich der benignen HCV29 Ureterepithelzellen mit den malignen T24 Blasenepithelzellen offenbarte sich, dass die HCV29 Zellen mehr Glykoproteine vom „high-mannose“ Typ produzieren als die T24 Zellen (Przybyło et al. 2005). Es ist deshalb gut möglich, dass sich Unterschiede in der Glykosylierung dieser Zellen zu gesunden Zellen oder Zellen von Patientinnen mit

HWIs finden lassen und dass die Bakterien ein anderes Bindungsverhalten an die T24 Zellen zeigen als an gesunde Urothelzellen oder Urothelzellen von Patientinnen mit HWIs. Aufgrund der beschriebenen Unterschiede zwischen den *in vitro* Ansätzen und der *in vivo* Situation, sowie Variabilitäten zwischen einzelnen Frauen kann es theoretisch zu abweichenden Ergebnissen in der *in vivo* Therapie kommen. In dieser Arbeit wurde der Versuch unternommen, der *in vivo* Situation im Urothel näher zu kommen, indem neben den 24-Well Platten ein Transwell System genutzt wurde. Im Gegensatz zu den normalen 24-Well Platten, lag im Transwell System eine basolaterale Nährstoffversorgung der T24 Zellen beim Anwachsen und auch bei der Versuchsdurchführung vor. Apikal wurde 24 h vor Versuchsdurchführung artifizieller Urin appliziert, um eine verbesserte Polarisierung der Zellen zu ermöglichen. Im Transwell System konnte jedoch keine veränderte Adhärenzinhibition gezeigt werden. Insgesamt braucht es weitere Untersuchungen zur Glykokalyx von Patientinnen mit HWIs und dem Bindungsverhalten von Bakterien an diese.

## 4.2 Ätherische Öle als Alternativtherapie

Aufgrund der zunehmenden Prävalenz von Antibiotikaresistenzen, auch bei UPECs, ist die Suche nach alternativen antibakteriellen Stoffen notwendig (World Health Organization 2018). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden traditionell angewandte ätherische Öle auf ihre Wirksamkeit gegen uropathogene Keime untersucht, da es sinnvoll erscheint, bereits bekannte und häufig genutzte Therapeutika weiter zu untersuchen. Durch neues Wissen über Wirkmechanismen und Wirkweisen können neue Möglichkeiten des Einsatzes sichtbar werden und möglicherweise die Situation von PatientInnen mit HWIs verbessert werden.

### 4.2.1 Wirkung ätherischer Öle gegen uropathogene Bakterien

Mittels Agardiffusionsassay wurden 14 ätherische Öle und 4 fette Öle auf ihre antibakterielle Wirksamkeit gegenüber 5 verschiedenen *E. coli* Stämmen gescreent. Hierbei zeigten die ätherischen Öle Thymianöl, Teebaumöl, Lemongrassöl und Cajeputöl, übereinstimmend mit den Daten von Patterson et al., die beste Wirkung. Sowohl bei Patterson et al. als auch in dieser Arbeit entstanden bei der Applikation von 100% Thymianöl auf *E. coli* Stämme Hemmhöfe zwischen 19 – 28,5 mm, für 100% Teebaumöl lagen die Hemmhöfe in dieser Arbeit bei 10 – 16 mm, während Patterson et al. Hemmhöfe einen Durchmesser von 9,4 mm maßen (Patterson et al. 2019). Im nächsten Schritt wurde die antibakterielle Aktivität von den ätherischen Ölen Cajeputöl, Lemongrassöl, Teebaumöl und Thymianöl durch MIC und MBC-Bestimmungen gegenüber einem großen Spektrum uropathogener Bakterien weiter untersucht. Die Daten dieser Arbeit zeigten, dass Thymian- und Teebaumöl insgesamt wirksamer gegen die getesteten Bakterien waren als Lemongrass- und Cajeputöl. Dies erkennt man z.B. an dem *E. coli* Bakterium UT189, das für Thymianöl MIC und MBC von 0,16% zeigt, für Teebaumöl MIC und MBC von 0,31%, für Cajeputöl MIC und MBC von 1,25% und für Lemongrass MIC und MBC von 5%. Die Ergebnisse dieser Arbeit für Teebaumöl werden durch verschiedene weitere Stellen bestätigt. Xiao et al. erhielten für *E. coli* UT189 zu dieser Arbeit vergleichbare MBC Werte (0,31-0,63%) bei Applikation von Teebaumöl (Xiao et al. 2019). Sakkas et al. erzielte eine Reduktion von MIC und MBC auf unter 1 (vgl. diese Arbeit 0,63%) bei der Applikation von Teebaumöl auf ESBL-positive *E. coli* Stämme aus Patientenisolaten. Die Arbeitsgruppe untersuchte weiter *K. pneumoniae* Stämme und auch hier zeigten sich für die Anwendung von Teebaumöl ähnliche Ergebnisse (hier MIC und MBC 0,63 - 1,25%) (Sakkas et al. 2016). MIC und MBC von Thymianöl bei Applikation auf ESBL positive *E. coli* waren bei Sakkas et al. doppelt so hoch wie in dieser Arbeit (0,63 - 0,94%). Die Ergebnisse für ätherisches Thymianöl bei der Applikation auf *K. pneumoniae* glichen sich zum Teil und zum Teil unterschieden sie sich um das 10 Fache (Sakkas et al.

2016). Für Lemongrass zeigte sich in dieser Arbeit eine 10 fach geringere Wirkung als bei Xiao et al. (Xiao et al. 2019). Durch die Daten von Sakkas et al. und Xiao et al. bestätigt sich insgesamt ein Teil der in dieser Arbeit erzielten MIC und MBC Werte. Generell fällt auf, dass sich bei Bakterien einer Gattung in der Testung der MIC und MBC teilweise unterschiedliche Werte ergaben. Dies zeigt, dass die Wirkung der ätherischen Öle für unterschiedliche Subpopulationen in einer Gattung unterschiedlich sein kann. Eine mögliche Begründung wären abweichende genetische Ausstattungen verschiedener Serotypen. Unterschiede in den Ergebnissen dieser Arbeit und anderer Arbeiten können wiederum durch verschiedene Faktoren zustande kommen. Zum einen werden auch hier verschiedene Subspezies der Bakterienstämme miteinander verglichen und zum anderen lassen sich nicht immer genau dieselben Ergebnisse mit dem Öl aus der gleichen botanisch definierten Pflanze gewinnen, da die Zusammensetzungen der Öle aufgrund von verschiedenen Faktoren variieren (siehe Kapitel 1.4).

#### **4.2.2 Extrahierte Einzelstoffe**

Jedes ätherische Öl besteht aus vielen Einzelstoffen. Dass alle Einzelstoffe ihr eigenes Wirkprofil haben, zeigten u.a. Ojeda-Sana et al. Sie vermuteten, dass die antibakterielle Aktivität von ätherischem Rosmarinöl auf einen der Hauptinhaltsstoffe zurückzuführen sei:  $\alpha$ -pinene, 1,8-cineol, Kampfer oder Borneol. In den Experimenten konnte dann aber gezeigt werden, dass verschiedene Bestandteile des Öls unterschiedlich wirkten.  $\alpha$ -pinene konnte alle getesteten Bakterienstämme (gram-positiv: *S. aureus* und *E. faecalis* und gram-negativ: *E. coli* und *K. pneumoniae*) im Wachstum inhibieren, während das enthaltene Kampfer und Borneol nur bei gram-positiven Bakterien (*S. aureus* und *E. faecalis*) wirkte. 1,8-cineol inhibierte die getesteten gram-negativen Stämme (*E. coli* und *K. pneumoniae*) (Ojeda-Sana et al. 2013). Insgesamt waren die in dieser Arbeit untersuchten ätherischen Öle von Thymian und Teebaum effektiver in ihrer Wirkung gegen die Bakterien als Lemongrass und Cajeput. Wenn man den Gedankengang verfolgt, dass dies durch enthaltene Einzelstoffe begründet werden kann, fällt auf, dass sowohl Teebaumöl als auch Thymianöl höhere Konzentrationen von Terpinene-4-ol aufweisen (Teebaum 40,39% und Thymian 10,51%). In der Literatur sind für Terpinene-4-ol bereits antibakterielle Wirkungen beschrieben (Zhang et al. 2018). Im Teebaumöl wurden von Carson und Riley die Stoffe Terpinene-4-ol, Linalool und 4-Terpineol gegen *E. coli* als antibakteriell identifiziert (Carson und Riley 1995). Weiter kamen in den in dieser Arbeit verwendeten Ölen a-Phellandrene, b-Phellandrene, c-p-Menth-2-en-1-ol und t-p-Menth-2-en-1-ol in Konzentrationen von  $\leq 1,44\%$  vor. Linalool kam im Thymianöl mit 44,6% vor, während

es in den anderen drei getesteten Ölen nur in geringen Konzentrationen von 0,06% in Teebaumöl, 1,19% - 1,39% in Lemongrassöl und 2,69% in Cajeputöl vorkam. Für Thymianöl und Linalool wurde gezeigt, dass es den Plasmidtransfer zwischen *E. coli* inhibiert. Dies könnte die Pathogenität von *E. coli* reduzieren, da die Virulenzfaktoren von *E. coli* auf diese Weise weitergegeben werden können (Skalicka-Woźniak et al. 2018). Weiter wurde anhand von *P. aeruginosa* gezeigt, dass Linalool die Membranpermeabilität erhöhen kann, zum Ausfluss von Nukleinsäuren beiträgt und die Membranintegrität sowie den elektrischen Gradienten zerstören kann. Dies alles führt zum Tod der Bakterien (Liu et al. 2020). Möglicherweise sind die Stoffe Terpinene-4-ol und Linalool in Kombination aber auch einzeln effektiver in der Bekämpfung der Bakterien als 1,8-cineol, das mit 64,13% im Cajeputöl den Hauptbestandteil ausmacht und Neral und Geranial aus dem Lemongrassöl. Dies könnte bei einer einzelstofflichen Betrachtung der Öle die gefundenen Unterschiede der MICs und MBCs erklären. Carson et al. konnten 2002 zeigen, dass der Effekt von reinem 1,8-cineol, dem Hauptbestandteil des Cajeputöl, vor allem auf dem Angriff der Zellmembran beruht (Carson et al. 2002). Es bewirke die Permeabilisierung der Zellmembran, sodass andere Stoffe, die stärker bakterizid seien, besser wirken könnten. Stärker bakterizid und weniger zellwandpermeabilisierend waren andere Stoffe wie Terpinene-4-ol und  $\alpha$ -Terpineol (Carson et al. 2002). Die getesteten Kombinationen von Cajeputöl mit Teebaumöl und Thymianöl, die diese Stoffe enthalten, waren additiv in ihrer Wirkung an *E. coli* CHD94, während die Kombination am ESBL<sup>+</sup> *E. coli* CHD16 eine indifferente Wirkung zeigte. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass weiter untersucht werden sollte, ob die Kombination des zellwandpermeabilisierenden 1,8 Cineol mit Linalool und Terpinene-4-ol oder  $\gamma$ -Terpinene eine stärkere additive Wirkung hervorbringt. Herman et al. untersuchten die Kombination von Linalool mit ätherischen Ölen auf additive, synergistische oder antagonistische Effekte. Es zeigte sich, dass die Kombination von *Syzygium aromaticum* Öl, Öl des Gewürznelkenbaums, mit Linalool synergistisch gegen *P. aeruginosa* und *Aspergillus brasiliensis* war. Weitere additive Effekte zeigten sich aus der Kombination von *S. aromaticum* und Linalool gegen *S. aureus*, *E. coli* und *Candida albicans*. Auch die Aktivität von ätherischem Thymianöl gegen *P. aeruginosa* durch Zugabe von Linalool wurde erhöht. In den getesteten Kombinationen zeigten sich aber auch einige Kombinationen, bei denen keine Interaktion zustande kam oder Kombinationen, bei denen antagonistische Effekte beobachtet werden konnten (Herman und Tambor 2016). Iten et al. untersuchten die Hauptbestandteile des ätherischen *T. vulgaris* Öls: Carvacrol, Linalool und Thymol. In einem Versuch konnte gezeigt werden, dass Linalool und Carvacrol oder Linalool und Thymol in Kombination jeweils einen synergistischen Effekt gegen *K. pneumoniae* aufwiesen (Iten et al. 2009).

Häufig zeigte sich, dass die Wirkung der Öle auf der Mischung der Substanzen beruht und die Testung der ätherischen Öle mit herausgezogenen Einzelstoffen einen geringeren Effekt aufwies (Lang und Buchbauer 2011; Iten et al. 2009). Dies deutet darauf hin, dass ungenutztes Potential in der Kombination von ätherischen Ölen mit Einzelstoffen anderer Öle oder der Kombination verschiedener Einzelstoffe liegt. Jede einzelne Kombination sollte bei der Suche zunächst *in vitro* untersucht werden, da keine Rückschlüsse von bereits bekannten Daten auf nicht untersuchte Pflanzenstoffe gezogen werden können. Andernfalls könnte eine antagonistische Wirkung an PatientInnen riskiert werden.

#### **4.2.3 Wirkung ätherischer Öle auf gram-positive Bakterien**

Cox et al. betrachteten gram-positive und gram-negative Bakterien im Bezug auf ihre Sensibilität gegen ätherisches Teebaumöl. Die Zellwand des gram-positiven *S. aureus* lysierte bei Behandlung mit ätherischem Teebaumöl langsamer als die des gram-negativen *E. coli*. Der gemessene Efflux von K<sup>+</sup>-Ionen aus *S. aureus* betrug nach 30 min nur 20%, während sich der von *E. coli* zu diesem Zeitpunkt auf über 90% belief (Cox et al. 2000). In dieser Arbeit wurden fast ausschließlich gram-negative Bakterienstämme getestet - außer *S. saprophyticus* Ho94, *E. faecalis* CHD30 und *E. faecalis* CHD31. In den Versuchen konnten mit Cox et al. insofern korrespondierende Ergebnisse abgebildet werden, dass die Wirkung der Öle sich abhängig von dem Gramfärbverhalten der Bakterien unterschied. *S. saprophyticus* Ho94 zeigte sich sensibel gegen alle getesteten ätherischen Öle mit MIC und MBC zwischen 0,16% - 0,31%. Im Gegensatz zu den anderen getesteten gram-negativen Bakterien, welche in den meisten Fällen höhere Dosen des Lemongrassöls tolerierten, war *S. saprophyticus* ähnlich sensitiv gegenüber allen 4 Ölen. Für die beiden *E. faecalis* Stämme wurden in dieser Arbeit MIC und MBC Werte zwischen 0,31 – 2,5% gemessen. Die *E. faecalis* Stämme zeigten, anders als die meisten getesteten *E. coli* Stämme, die höchste Sensibilität gegenüber Lemongrassöl und eine geringere Sensibilität gegenüber dem, bei den *E. coli* Stämmen potenter wirkenden, Teebaum- und Thymianöl. In einer Untersuchung von Patterson et al. wurden ätherisches Lemongrassöl und Thymianöl als sehr effektiv gegen gram-positive Bakterien beschrieben (Patterson et al. 2019). Dies entspricht den Ergebnissen dieser Arbeit für ätherisches Lemongrassöl. Weiter zeigte sich bezüglich des Lemongrassöls, dass auch bei manchen der getesteten gram-negativen Stämme durch Applikation von Lemongrass recht niedrige MIC und MBC Werte auftraten. Insgesamt zeigte sich jedoch der Trend, dass höhere Konzentrationen ätherischer Öle nötig waren (MIC und MBCs zwischen 5 - 10%), um eine bakterizide oder bakteriostatische Wirkung durch Lemongrassöl bei gram-

negativen Stämmen herbeizuführen, als bei gram-positiven Stämmen. Bei Thymianöl zeigen die beiden gram-positiven Stämme unterschiedliche Ergebnisse. *S. saprophyticus* ist mit MIC/MBC von 0,16% sensibel gegen Thymianöl in geringer Menge, während *E. faecalis* Konzentrationen um 1% zur bakteriziden Wirkung braucht. Lang und Buchbauer schreiben in einem Review, dass gram-positive Bakterien meist sensitiver gegen ätherische Öle seien als gram-negative Bakterien. Sie begründen dies mit den hydrophilen Bereichen der äußeren Zellmembran der gram-negativen Bakterien. Die hydrophoben Bestandteile der ätherischen Öle können nicht direkt in die Bakterienzelle eindringen. Bei gram-positiven Bakterien können die hydrophoben Bestandteile der ätherischen Öle direkt in das Bakterium eindringen und z.B. zur Ruptur der Zellmembran, der Blockierung von Enzymsystemen und dem Anstieg der Ionenpermeabilität führen (Lang und Buchbauer 2011). Diese Schlussfolgerungen wurden bei Lang und Buchbauer anhand der ätherischen Öle *Cunila Mill* (Sandri et al. 2007) oder *Zataria Multiflora* (Saei-Dehkordi et al. 2010) gezogen. Die in dieser Arbeit untersuchten Öle zeigen jedoch teilweise andere Ergebnisse. Für *S. saprophyticus* zeigte sich eine hohe Sensitivität gegenüber den applizierten Ölen. Bei den *E. faecalis* Stämmen entstand ein gemischtes Bild, dass mehr mit den Ergebnissen von Cox et al. korrespondiert. Vor allem von Teebaumöl, das auch Cox et al. verwandt hat, braucht es eine höhere letale Dosis bei den gram-positiven *E. faecalis* Stämmen. Alles in allem scheint kein finaler Rückschluss auf die zu erwartende Wirkung ätherischer Öle anhand der Färbeeigenschaften der bakteriellen Zellwand möglich zu sein. Ob eine generelle Antwort der Frage, ob ätherische Öle gegen gram-negative oder gram-positive Bakterien besser wirken, gefunden werden kann, ist fraglich. Die Wirkmechanismen müssen vermutlich für verschiedene Einzelstoffe und Öle einzeln untersucht werden. Es erscheint möglich, dass manche Öle oberflächenaktive Stoffe beinhalten oder dass ihre Wirkung durch einige der chemischen Substanzen, die nur in Spuren enthalten sind, z.B. im Sinne von Emulgatoren, vermittelt werden und es dann zur stärkeren Wirkung des spezifischen Öls an gram-negativen als an gram-positiven Bakterien kommt.

#### **4.2.4 Wirkung ätherischer Öle gegen *P. aeruginosa***

Das in dieser Arbeit untersuchte Teebaumöl wirkt in der MIC und MBC Testung sehr potent bakterio-statisch und bakterizid gegen die meisten Bakterienstämme. Einzig in der Wirkung gegen die *P. aeruginosa* Stämme liegt der Median der MIC zwischen 2,5 – 10% und der Median der MBC zwischen 5 – 10% ätherischem Teebaumöl. Hier zeigen sich zwar bakterizide Wirkungen des Teebaumöls aber diese bedürfen der Applikation des Öls in einer hohen Konzentration. Auch für die anderen 3 getesteten Öle zeigte

sich, dass hohe Konzentrationen von mindestens 2,5% angewandt werden mussten. Papadopoulus et al. zeigten bei 30 verschiedenen *P. aeruginosa* Stämmen in der Behandlung mit ätherischem Teebaumöl MIC und MBC Werte von 4% (Papadopoulos et al. 2006). Dies passt zu den in dieser Arbeit gewonnenen Werten. Longbottom et al. haben gezeigt, dass die erhöhte Resistenz von *P. aeruginosa* gegen Teebaumöl in der für ätherische Öle undurchlässigen äußeren Zellmembran begründet liegt (Longbottom et al. 2004). Carsol et al. bestätigten dies durch die Behandlung der Bakterien mit Membran-permeabilisierenden Stoffen. Nach der Behandlung reagierten die Bakterien deutlich empfindlicher auf die Applikation von Teebaumöl (Carson et al. 2006). Weiter wird vermutet, dass *P. aeruginosa* eine Effluxpumpe für antibakterielle Substanzen aus ätherischen Ölen besitzt, deren Funktion abhängig von der für das Bakterium verfügbaren Energie in Form von ATP ist (Longbottom et al. 2004). Die, im Gegensatz zu den anderen getesteten Bakterien, geringe Wirksamkeit des Thymianöls gegen *P. aeruginosa* (MIC/MBC Werte: 2,5 – 10%), beruht wahrscheinlich darauf, dass die Hauptbestandteile des Thymianöls, Linalool und  $\alpha$ -Terpineol, keine Wirksamkeit gegen *P. aeruginosa* zeigen (Carson & Riley 1995). Als wirksam gegen *P. aeruginosa* zeigte sich bei Patterson et al. ätherisches Zimtrindenöl. Diese Wirkung wurde als unabhängig von Antibiotika Resistenzen gegen Carbapeneme beschrieben (Patterson et al. 2019). Eine Therapie von HWIs, die durch *P. aeruginosa* verursacht wurde, mit den in dieser Arbeit getesteten ätherischen Ölen zu versuchen, erscheint aktuell nicht besonders erfolgsversprechend. Da *P. aeruginosa* nur selten unkomplizierte HWIs verursacht, ist das Bakterium, anders als *E. coli*, welches ca 80% der unkomplizierten HWIs verursacht, nicht im direkten Fokus bei der Suche nach alternativen Therapien. Weitere Forschung mit der Prüfung der Aktivität ätherischer Öle und der Überprüfung der antibakteriellen Aktivität, wie z.B. von ätherischem Zimtrindenöl, sollte erfolgen.

#### **4.2.5 Kombinationstherapien**

Das Mischen von ätherischen Ölen oder Einzelstoffe der Öle kann zu additiven oder synergistischen Effekten führen. Beim Rosmarinöl ist  $\alpha$ -pinene unspezifisch in seiner wachstumsinhibierenden Wirkung, während Camphor und Borneol gegen gram-positive Bakterien und 1,8-cineol gegen gram-negative Bakterien wirken (Ojeda-Sana et al. 2013). Durch die Kombination der vier Stoffe entstand in dem Fall des Rosmarins ein breiteres, weniger spezifisches Wirkspektrum. In dieser Arbeit wurden Kombinationen ätherischer Öle im Checkerboard Assay untersucht. Hier zeigten sich synergistische Aktivitäten für Teebaumöl und Thymianöl, durch die es zur Erhöhung ihrer antimikrobiellen Aktivitäten kam. Möglicherweise kann dies durch die Addition der Hauptinhaltsstoffe begründet werden. So enthält Teebaumöl eine hohe Konzentration

von Terpinene-4-ol: 40,39%, Thymian hingegen nur 10,51%. Thymian besitzt eine hohe Konzentration an Linalool, 44,56%, aus dem Teebaumöl nur zu 0,06% besteht. Welche Wirkung die Kombination dieser Bestandteile als Einzelstoffe hat, könnte zur Prüfung dieser These untersucht werden. Darüber hinaus ist es auch möglich, dass nach Carson et al. Interaktionen geringer Stoffmengen die Wirkung hervorrufen und/oder sich die Stoffgemische unbekannter Mechanismen zur Wirkung bedienen (Carson et al. 2002). Semeniuc et al. untersuchten auch Zweier-Kombinationen ätherischer Öle gegen *E. coli* (Petersilie, Liebstöckel, Basilikum jeweils mit Thymian). Es zeigte sich, dass die Kombination von Thymianöl mit den anderen drei Pflanzenstoffen zu einer Reduktion der antibakteriellen Aktivität des Thymianöls führte (Semeniuc et al. 2017). Aufgrund dieser möglichen negativen Effekte sollte jede neue Kombination zunächst *in vitro* auf ihre Wirkung hin untersucht werden. Weiter müssen Kombinationen, die für die Therapie von HWIs vorgesehen werden, auf ihre olfaktorische Wirkung auf PatientInnen hin untersucht werden.

Da die Kombination ätherischer Öle mit einer antibiotischen Behandlung die Therapie von HWIs möglicherweise effizienter gestalten könnte, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch Kombinationen von ätherischen Ölen mit etablierten Antibiotika untersucht. Hier zeigten sich additive Effekte von Fosfomycin oder Pivmecillinam mit Teebaumöl oder Thymianöl. Die stärksten additive Effekte waren für Thymianöl und Pivmecillinam in der Anwendung gegen *E. coli* CHD16 (FICI & FBCI 0,57) nachweisbar. Vor kurzem wurde gezeigt, dass das ätherische Öl von *Pelargonium graveolens* synergistisch mit Ciprofloxacin gegen Fluoroquinolone-resistente uropathogene *K. pneumoniae* und *P. mirabilis* Stämme wirkt (Malik et al. 2011). Aelenai et al. untersuchten ätherisches Korianderöl mit einem Gehalt von 70,11% Linalool. Korianderöl und Linalool zeigten synergistische Effekte in der Interaktion mit Oxacillin, Amoxicillin, Gentamycin, Ciprofloxacin und Tetracyclinen gegen gram-positive und gram-negative Bakterien (Aelenei et al. 2019). Die synergistische Wirkung zwischen ätherischen Ölen und Antibiotika könnte neben der eigenen antimikrobiellen Aktivität auch darin begründet liegen, dass die Wirkung der Antibiotika verbessert bzw. die Resistenz gegen diese reduziert wird. So wurde für sekundäre Pflanzenmetabolite wie Resveratrol und Pyrethrine gezeigt, dass sie inhibierend auf Efflux Pumpen wirken, welche von Bakterien genutzt werden um eindringende Antibiotika wieder zu entfernen (Tegos et al. 2002).

#### 4.2.6 Bakterielle Resistenzbildung

Sehr relevant ist die Frage nach der Resistenzentwicklung gegen ätherische Öle durch Bakterien. Es ist möglich, dass der chemische Verteidigungsmechanismus der Pflanze z.B. gegen Bakterien evolutorisch darauf beruht, dass eine Kombination antibiotischer Stoffe produziert wird, gegen die ein einfach strukturierter Resistenzmechanismus pathogener Bakterien wirkungslos ist (Longbottom et al. 2004). Resistenzen gegen ätherische Öle werden beschrieben, gegen die Öle als Stoffgemische (Lang und Buchbauer 2011) und auch gegen Einzelbestandteile wie Linalool (Kalily et al. 2017). Hammer et al. untersuchten die gram-positiven Stämme *S. aureus*, *S. epidermidis* und *E. faecalis* auf die Entwicklung von Resistenzen durch die Applikation von Teebaumöl und dem Antibiotikum Rifampicin. Es zeigte sich, dass die Frequenz der Resistenzbildung nach Applikation von Teebaumöl  $<10^{-9}$  war, während die Frequenz der Resistenzbildung für Rifampicin zwischen  $10^{-7}$  -  $10^{-8}$  lag. Für *S. aureus* lag diese Frequenz höher. Somit scheint es unwahrscheinlich, dass Mikroorganismen „single-step“ Mutationen erlangen und dadurch resistent gegen Teebaumöl werden. Hammer et al. weisen weiter darauf hin, dass dies durch die ca. 100 verschiedenen Inhaltsstoffe des Teebaumöls begründet werden kann. Wenn jede antimikrobielle Komponente einen geringfügig unterschiedlichen Mechanismus nutzt, wäre es für die Bakterien notwendig mehrere Mutationen zur selben Zeit zu erlangen, um die Angriffstrategien des Teebaumöls unschädlich zu machen. Insgesamt ist das Risiko der Resistenzentwicklung dadurch stark reduziert. Durch die Exposition der Bakterien gegenüber subinhibitorischen Konzentrationen des Teebaumöls könnte es jedoch zur Entwicklung von multistep Resistenzen kommen (Hammer et al. 2008).

In der Therapie mit ätherischen Ölen und Antibiotika ist es möglich, dass es zu Kreuzresistenzen kommt. McMahon et al. zeigten 2006, dass u.a. *E. coli* nach 72 h Inkubation mit 0,25% ätherischem Teebaumöl, einer subletalen Konzentration, eine reduzierte Sensitivität gegenüber einer Reihe von klinisch relevanten Antibiotika zeigten. *E. coli* zeigte um mehr als 4-fach erhöhte MICs für 6 der 10 getesteten Antibiotika. Für die Abnahme der Antibiotikasensitivität zählen McMahon et al. mögliche Gründe auf: Zum einen könnte es sich um eine Selektion von Teebaumöl-resistenten Subpopulationen handeln. Außerdem könnte es z.B. zur Hochregulation der *mar* Efflux Pumpe gekommen sein (Moken et al. 1997). Diese Efflux Pumpe wird durch das *marA* Gen codiert. Moken et al. konnten anhand von ätherischem Kieferöl, welches häufig in Reinigungsmitteln eingesetzt wird, zeigen, dass *E. coli*, die gegen Kieferöl resistent waren, auch gegen Tetracycline, Ampicillin und Chloramphenicol resistent waren. Dabei exprimierten diese *E. coli* das *marA* Gen. Auch andersherum wurde gezeigt, dass *E. coli*, die gegen die genannten Antibiotika resistent waren, auch

gegen Kieferöl Resistenzen zeigten (Moken et al. 1997). Neben der Verwendung von Kieferöl in Reinigungsmitteln gibt es zahlreiche weitere alltägliche Verwendungen von Pflanzenstoffen. Kalily et al. weist darauf hin, dass in Zukunft ein weiterer Anstieg in der Nutzung von synthetischem Linalool im Bereich der Kosmetik, Reinigungsmittel und Lebensmittelindustrie zu erwarten ist. Diese Mengen könnten möglicherweise bereits zu einem Anstieg der Antibiotikaresistenzen und Allergien führen. Kalily et al. zeigte, dass Bakterien, die bereits gegen den Einzelstoff Linalool Resistenzen entwickelten, auch Resistenzen gegen verschiedene Antibiotika hatten, die mit Veränderungen am Bakterium einhergingen (Kalily et al. 2017). Im alltäglichen Leben ist jeder Mensch Linalool ausgesetzt, da es sich um einen natürlichen Inhaltsstoff vieler Lebensmittel handelt und es in vielen Fertiglernsmitteln verwendet wird. Aktuell wird für Europa die orale Exposition von Linalool durch Fertiglernsmittel mit 72 µg/kg/d eingeschätzt. Die Aufnahme durch natürliche Quellen wird als genauso hoch eingeschätzt. Dies führt pro Tag zu einer Aufnahme von 140 µg/kg Linalool (Linalool. 2002). Somit hat sich die Aufnahme von Linalool durch Lebensmittel verdoppelt, wenn sie auch noch in einem sehr niedrigen Zahlenbereich liegt.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *E. coli* Stämme mit verschiedenen Antibiotikaresistenzen genauso sensibel auf die ätherischen Öle Teebaumöl und Thymianöl reagieren können, wie die antibiotikasensitiven *E. coli* Stämme. Es scheint damit so, dass bei den für diese Arbeit getesteten Bakterien keine Kreuzresistenzen zwischen Antibiotika und ätherischen Ölen vorlagen und dass Unterschiede in der Wirkung der Öle durch Unterschiede zwischen den Spezies verursacht wurden. Insgesamt scheinen Antibiotikaresistenzen entsprechend den Ergebnissen dieser Arbeit nicht zwangsläufig mit der Sensibilität von Bakterien gegen ätherische Öle zusammenzuhängen. Trotzdem gibt es aber, wie oben im Text dargestellt, Kreuzresistenzen zwischen Stoffen aus ätherischen Ölen und Antibiotika.

#### **4.2.7 Ätherische Öle als Therapeutikum**

Immer wieder stellt sich die Frage, ob man ätherische Öle als Stoffgemisch oder lieber als Einzelstoff applizieren sollte. Argumente für synthetische Einzelstoffe wären z.B. die bessere Steuerbarkeit durch bekannte Stoffmengen infolge der kontrollierten Synthese und auch eine höhere Verfügbarkeit. Weiter ergeben sich neue Applikationsformen z.B. als Tablette. Auf der anderen Seite berichtet die Erfahrungsheilkunde von weniger Resistenzbildung aufgrund der Vielzahl von Stoffen im Stoffgemisch und sieht den Beweis dafür darin, dass die Öle den Pflanzen seit vielen Millionen Jahren effektiv zur Abwehr dienen. Weiter möchte die Erfahrungsheilkunde nicht auf mögliche synergistische und additive Effekte der Einzelstoffe im Öl verzichten und legt großen

Wert auf die ganzheitliche Wirkung der Öle, die auch durch den angenehmen Duft begründet wird (Steflitsch et al. 2013).

Die aktuellen Empfehlungen zur Anwendung von ätherischen Ölen bei HWIs sind im Sitzbad oder als Massage (Steflitsch et al. 2013). Da es zur traditionellen Anwendung von ätherischen Ölen nur wenig Studien gibt, kann bisher keine Aussage darüber getroffen werden, ob und wie die ätherischen Öle bei Applikation im Sitzbad in die Blase gelangen. Darüber hinaus ist unklar, ob die Konzentrationen, die damit erreicht werden könnten, bakterizid wirken. Laut der hier vorliegenden Daten müssen Konzentrationen von mindestens 0,31% Teebaumöl für eine bakterizide Wirkung erreicht werden. Nach erfahrungsmedizinischen Rezepten würde als kühlende Mischung z.B. Eukalyptus globulos, Myrthe Anden und Teebaum zusammen auf Meersalz gegeben und im warmen Sitzbad 1-3-mal pro Tag als Therapeutikum verwendet. Als wärmende Mischung dienen Kamille blau, Lavendel extra, Sandelholz und Rosedamanzener 10% (Steflitsch et al. 2013). Bei der Applikation im Sitzbad ist nicht klar, auf welche Weise die erfahrungstherapeutisch berichtete Wirkung entsteht. Von den in der kühlenden Mischung verwendeten ätherischen Ölen zeigte im für diese Arbeit durchgeführten Agardiffusionsassay, außer dem genauer untersuchten Teebaumöl, dass Myrthenöl nur bei *E. coli* Stamm CHD1 in der Konzentration 100% einen leicht bakteriziden Effekt aufwies. Aus der wärmenden Mischung wurde nur Lavendelöl getestet. Dieses zeigte in der Konzentration 100% einen leichten bakteriziden Effekt. Aufgrund der Verfügbarkeit konnte Sandelholz, Kamille blau und Eukalyptus globulos nicht getestet werden. Die erfahrungstherapeutische Herangehensweise sollte bezüglich ihrer Wirksamkeit in *in vivo* Studien untersucht werden.

Da es sich bei HWIs, wie in der Einleitung unter 1.1 beschrieben, um eine entzündliche Reaktion auf Bakterien handelt (Herold 2019; Naber et al. 2017), sollte in der Therapie der HWIs auch die Kontrolle der Entzündungsreaktion angestrebt werden. Erfahrungsheilkundlich wird darüber viel berichtet (Steflitsch et al. 2013), aber auch aktuelle Studien beschreiben die Regulation der Entzündungsreaktion durch ätherische Öle. Durch ätherische Öle kann die Produktion von Sauerstoffradikalen gehemmt, die COX-1 und COX-2 Aktivität inhibiert und die Produktion von TNF- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  und IL-6 reduziert werden. All diese Faktoren sind an der Verstärkung der Entzündungsreaktion beteiligt (Leyva-López et al. 2016) (Leyva-López et al. 2017) (Arranz et al. 2015) (Leyva-López et al. 2017). Für Linalool, Lavendelöl und Linalylacetat wurden signifikante anti-entzündliche Effekte berichtet (Silva et al. 2015) und der Rückschluss gezogen, dass alle ätherischen Öle, die Linalool und Linalylacetat zu einem relevanten Anteil enthalten, antiinflammatorisch wirken (Peana et al. 2002).

Dies könnte auch die erfahrungsmedizinische Verwendung von Lavendelöl im Sitzbad erklären, wobei Lavendelöl nicht besonders antibakteriell wirkt. Generell betrachtet die Erfahrungsheilkunde die bakterizide Wirkung der ätherischen Öle nur als einen Teil des therapeutischen Potentials. Die Symptome von HWIs sind Schmerzen beim Wasserlassen, imperativer Harndrang, Pollakisurie und Schmerzen oberhalb der Symphyse (Leitlinienprogramm DGU 2017). Dies führt vor allem bei rezidivierenden HWIs sowohl durch die körperliche als auch durch die seelische und soziale Belastung zur Reduktion der Lebensqualität von Patientinnen (Flower et al. 2014). Die psychische Belastung kann sich als Depression, Angst, Hilflosigkeit und Hoffnungslosigkeit niederschlagen. Die körperlichen Symptome wie z.B. der imperative Harndrang und die erhöhte Frequenz des Harndrangs können unter anderem zu Schlafstörungen führen. Durch die Gesamtbelastung des Organismus Mensch wird die Copingfähigkeit, also die Fähigkeit zur Bewältigung schwieriger Situationen, reduziert (Meijlink 2017). In dieser Arbeit war es experimentell nur möglich, einen Teil der Wirkung ätherischer Öle zu untersuchen, da die Versuche *in vitro* durchgeführt wurden. Inwieweit spezifische Symptome einer HWI durch ätherische Öle gelindert werden können, war nicht Gegenstand dieser Arbeit. Für die Erfahrungsheilkunde spielen allerdings die anderen Wirkungen eine große Rolle:

Einer der Wirkmechanismen wird durch den intensiven Geruch der ätherischen Öle ausgelöst. Über den Geruch ausgelöste Reize dringen sehr schnell tief ins Gehirn vor (Steflitsch et al. 2013). Aus der Regio olfactoria erreicht bereits das zweite nachgeschaltete Neuron Cortexareale ohne Umschaltung über ein Ganglion oder Einschaltung des Thalamus. Außerdem projiziert die Stria olfactoria den Geruchsreiz in den sog. Paläokortex, einen sehr alten Hirnrindenabschnitt, in dem die Eindrücke direkt bewusst verarbeitet werden. Durch die Projektion auf Neurone des hier lokalisierten limbischen Systems kommt es zu einer starken emotionalen Einfärbung von Geruchseindrücken (Michael Schünke 2015). Diese emotionale Reaktion der Behandelten kann den Therapieerfolg beeinflussen und auch Inhalt der Therapie sein (Steflitsch et al. 2013). Eine Modulation der Schmerzverarbeitung durch ätherische Öle kann über 2 Wege stattfinden. Zum einen durch die Projektion auf den Hypothalamus und die Auslösung von vegetativen Reaktionen (Michael Schünke 2015) und zum anderen durch das Eindringen der ätherischen Öle über die Haut ins Blut. Bestandteile der Öle können aufgrund ihrer molekularen Struktur die Blut-Hirn-Schranke überwinden. Im Fall des ätherischen Lavendelöls z.B. wirkt Linalylacetat im zentralen Nervensystem narkotisierend und Linalool sedierend (Cavanagh und Wilkinson 2002) (Steflitsch et al. 2013). Silva et al. berichten von einer Opioid ähnlichen Neurotransmission durch Lavendelöl (Silva et al. 2015), während Gedney et al. eine

affektiv veränderte Schmerzverarbeitung darstellt (Gedney et al. 2004). Um die psychische Belastung von PatientInnen mit HWIs zu reduzieren wird traditionell ätherisches Lavendelöl verwandt (Steflitsch et al. 2013). Bei Karadag et al. wurde gezeigt, dass ätherisches Lavendelöl, das auf einen Wattebausch getropft durch PatientInnen mit koronarer Herzkrankheit (KHK), die auf einer Intensivstation lagen, inhaliert wurde, die Schlafqualität signifikant verbesserte (Karadag et al. 2017). Der Schlaf wird dabei induziert, indem Lavendel am limbischen System – besonders in der Amygdala - die Produktion von  $\gamma$ - Aminobuttersäure (GABA) fördert. Darüber hinaus wird der sedative Effekt durch Inhibition der Acetylcholin Ausschüttung verstärkt (Cavanagh und Wilkinson 2002). Mit einer Mischung aus ätherischem Lavendelöl, ätherischem Öl aus römischer Kamille und ätherischem Neroliöl im Verhältnis 6:2:0,5 konnte eine signifikante Reduktion der Angst der Patienten, eine Verbesserung der Schlafqualität und eine Stabilisation des Blutdrucks durch Reduktion des Stresses bei Patienten, die mit KHK auf der Intensivstation lagen erreicht werden (Cho et al. 2013). Diese anxiolytische Wirkung des Lavendelöls wird von Karadag et al. bestätigt (Karadag et al. 2017). In weiteren Studien sollte untersucht werden, ob sich diese berichteten Wirkungen auf die Schmerzverarbeitung und die psychische Situation der PatientInnen auch bei HWIs zeigen. Möglicherweise werden PatientInnen durch das Lavendelöl, welches ein traditioneller Bestandteil der aromatherapeutischen Therapie bei HWIs ist (Steflitsch et al. 2013), in der Bewältigung der HWIs entsprechend der Darstellung aus der Erfahrungsheilkunde unterstützt.

Aufgrund bekannter nephroprotektiver Effekte von ätherischen Ölen bei oraler Applikation (Akinyemi et al. 2018) sollte diese Anwendungsform weiter untersucht werden. Oral aufgenommenes Linalool wird auf seinem Weg in die Niere und von dort in den Urin in ein Glukuronsäurekonjugat umgewandelt (Parke et al. 1974). Hier sollte untersucht werden, inwieweit die Glukuronidierung und Konjugation die bakterizide Aktivität der Bestandteile der Öle beeinflussen. Fraglich ist auch, wie die ätherischen Öle z.B. im Urin ankommen. Sie bilden vermutlich nicht mehr das applizierte Stoffgemisch ab, um das es sich bei der Einnahme handelte, sondern kommen, wie am Beispiel Linalool sichtbar, als durch den menschlichen Metabolismus veränderte Einzelstoffe vor. Da es sich bei einigen Pflanzen wie z.B. Thymian um Gewürze handelt, muss nicht grundsätzlich von einer Gefahr für die PatientInnen bei oraler Applikation ausgegangen werden. In konzentrierter Form werden einige Öle als Küchengewürz verwendet und sind somit auch weitgehend unbedenklich. Bei der Untersuchung der Öle sollte jedoch immer auf mögliche auftretende Nebenwirkungen geachtet werden.

Ätherische Öle sollten weiter auf Nebenwirkungen hin untersucht werden, da es durch die regelmäßige Applikation von ätherischen Ölen möglich ist, Allergien zu induzieren oder infolge einer bereits bestehenden Allergie, auch gegen Kreuzallergene oder Öle mit ähnlichen Inhaltsstoffen (aus Nahrungsmitteln oder Kosmetika), allergische Reaktionen auszulösen. Der Kontakt zu den Ölen kann auch in Form von Nahrungsmitteln oder Kosmetika stattgefunden haben (de Groot und Schmidt 2016b, 2016c; Crawford et al. 2004; Nardelli et al. 2009; Waranya Boonchai et al. 2007; Smit et al. 1993). Für TherapeutInnen gilt grundsätzlich die Empfehlung, Handschuhe im Umgang mit den Ölen zu tragen und eine Allergie-Anamnese durchzuführen sowie achtsam im Umgang mit den ätherischen Ölen zu sein und die Öle nicht pur oder hochkonzentriert auf die Haut zu geben (de Groot und Schmidt 2016b; Steflitsch et al. 2013). Da in dieser Arbeit bei 43 Stämmen bereits Konzentrationen von 0,16 - 0,63% Teebaumöl ausreichten, um eine bakterizide Wirkung zu erzielen und nur bei 8 Stämmen Konzentrationen von  $\geq 1,25\%$  nötig waren, um eine bakterizide Wirkung zu erreichen, scheint die Applikation reiner Öle nicht notwendig zu sein. Welche allergenen Stoffe in Teebaumöl, Thymianöl, Cajeputöl und Lemongrassöl enthalten sind, kann aus den Herstellerzertifikaten der ätherischen Öle im Anhang entnommen werden.

#### **4.2.8 Wirkmechanismen ätherischer Öle auf Eukaryoten**

Da ätherische Öle durch die Zellmembran von Eukaryoten hindurch diffundieren konnten, (Bakkali et al. 2008; Di Pasqua et al. 2007) muss untersucht werden, welche Wirkung die Öle im Zellinneren haben. Teebaumöl z.B. wirkte bei Exposition auf humane Fibroblasten in Konzentrationen von mehr als 100  $\mu\text{g/ml}$  und bei einer Dauer der Exposition von mehr als 1 h zytotoxisch. Eine Applikation von mehr als 300  $\mu\text{g/ml}$  Teebaumöl führte zu einer schnellen Abnahme der Zellviabilität. Die Toxizität nahm nach einer Stunde jedoch nicht weiter zu (Söderberg et al. 1996). Die Arbeitsgruppe um Homeyer et al. berichtete, dass eine Viabilitätsrate von 90% der *in vitro* angezüchteten Fibroblasten bei Behandlung mit 0,1 - 1% ätherischem Teebaumöl beobachtet wurde. Bei der Inkubation mit 10% ätherischem Teebaumöl reduzierte sich diese Rate auf 50%. Homeyer et al. untersuchten weiter *ex vivo* Gewebe aus Schweinehaut. Hier erwiesen sich Konzentrationen von über 50% ätherischem Teebaumöl als toxisch mit Absinken der Zellviabilität auf 34% nach 24 h. Dabei nahm die Toxizität auch mit der Zeit zu. Auf Konzentrationen von 0,1 - 25% ätherisches Teebaumöl reagierte das Gewebe über 24 h mit einer Zellviabilität von 79 - 84%. Aufgrund der Daten gehen Söderberg et al. davon aus, dass es Parallelen zwischen der antibakteriellen Aktivität von ätherischen Ölen und der der zytotoxischen Aktivität

geben könnte, da beide Effekte durch membranassoziierte Reaktionen begründet werden (Söderberg et al. 1996). Aufgrund der *ex vivo* Versuche von Homeyer et al. stellen die AutorInnen die Hypothese auf, dass die *in vitro* dargestellte Zytotoxizität möglicherweise deutlich stärker ist als die *in vivo* zu erwartende Zytotoxizität. Trotzdem könnte die Zytotoxizität ein limitierender Faktor für die Anwendung ätherischer Öle z.B. auf verletzter Haut oder bei Wundheilungsstörungen sein (Homeyer et al. 2015).

Eine Untersuchung von ätherischen Ölen aus schwarzem Pfeffer konnte zeigen, dass durch ätherische Öle die Regulation von Genen humaner Hautzellen beeinflusst werden kann. Dabei kann es sowohl zur Reduktion als auch zur Steigerung der Genexpression kommen (Han et al. 2018). Ramadan et al. untersuchten die Wirkung von ätherischem Teebaumöl auf Krebszelllinien der Haut. Sowohl bei Zellen des malignen Melanoms als auch bei Plattenepithelkarzinomzellen zeigte sich eine Beeinflussung der Apoptose regulierenden Gene *p53*, *bax* und *bcl-2*. Die Expression der proapoptotischen Gene *p53* und *bax* wurden hochreguliert, während die Expression des antiapoptotischen Gens *bcl-2* herunterreguliert wurde (Ramadan et al. 2019). Assmann et al. konnten diese Ergebnisse an Brustkrebszellen bestätigen. Hier zeigte sich, dass 300 µg/ml ätherisches Teebaumöl die Anzahl an Tumorzellen in frühen Apoptosestadien erhöhte. Die Wirkung des Teebaumöls wurde hier mit dem Chemotherapeutikum Bleomycin als gleichwertig beschrieben. Assmann et al. untersuchten weiter, welche Wirkung die gleiche Dosis von 300 µg/ml auf gesunde Fibroblasten und gesunde mononukleäre Blutzellen hatte. Hier zeigte sich, dass diese Dosis nicht zytotoxisch wirkte. Ätherisches Teebaumöl konnte die Zellproliferation von Fibroblasten nach 72 h sogar induzieren. Dies spricht gegen zytotoxische Effekte auf gesunde Zellen (Assmann et al. 2018). In weiteren Studien könnte man probatorisch und angelehnt an die Krebsforschung untersuchen, ob sich die dargestellte Unterscheidung der Wirkung der Öle von kranken Zellen und gesunden Zellen auf Urothelzellen der Blase während einer Harnwegsinfektion übertragen lässt. Bezüglich der PatientInnen mit HWIs stellt sich konkret die Frage, ob die Wirkung von z.B. Teebaumöl auf die körpereigenen Zellen abhängig von einem Befall der Zellen mit Bakterien oder der intrazellulären „Pods“ Bildung anders ist als auf gesunde Blasenepithelzellen.

Insgesamt bleibt zu erforschen, ob sich die Wirkung der Öle als ganzes oder der Einzelstoffe auf eukaryotische Zellen unterscheidet. Prashar et al. zeigten, dass Lavendelöl in *in vitro* Versuchen ab einer Konzentration von 0,25% zytotoxisch auf Endothelzellen und Fibroblasten wirkt. Der Bestandteil Linalylacetat zeigte eine höhere Zytotoxizität, während die Zytotoxizität von Linalool der des gesamten Öls entsprach (Prashar et al. 2004). Hier könnte eine modulierende Wirkung des gesamten

Öls oder einer der Inhaltsstoffe auf die Toxizität des Linalylacetats angenommen werden. Auch solche Effekte sollten bei der weiteren Forschung beachtet werden.

#### **4.2.9 Studiendurchführung mit ätherischen Ölen**

In Ermangelung eines adäquaten Placebos ist es kompliziert, eine doppelblinde Studie zur Wirksamkeit ätherischer Öle zu konzipieren. Am Geruch der flüchtigen Duftstoffe erkennen die Menschen die Stoffe sofort (Sibbritt et al. 2014) (Adams 2007) und die Geruchsstoffe machen einen Teil der erfahrungstherapeutisch berichteten Wirkung aus. Um die erfahrungstherapeutisch berichtete Wirkung zu überprüfen, könnte weitere Forschung mit von HWIs betroffenen PatientInnen im Sitzbad mit verschiedenen Ölkombinationen oder nur einzelnen Ölen durchgeführt werden, da die dargelegte Komplexität eines Individuums mit Faktoren wie Nozizeption und Coping im Labor nicht abbildbar ist. Zur Auswertung dieser Versuche sollten neben der Bakterienlast im Urin auch die Wirkung durch die Öle auf die Entzündungsreaktion z.B. über die Messung bekannter Entzündungsparameter wie Interleukin-6 und C-reaktives Protein erhoben werden. Das Schmerzlevel der PatientInnen könnte über eine Schmerzskala abgebildet und durch ein strukturiertes Interview könnte die Wirkung der Ölkombination auf die psychologische Situation der PatientInnen nachvollzogen werden. Die Verbesserung der subjektiv von den PatientInnen empfundenen Belastung würde auch eine Verbesserung der Gesamtsituation der PatientInnen bewirken, die von den Leitlinien bereits als Präventivmaßnahme empfohlen wird (Leitlinienprogramm DGU 2017). Eine relevante Verbesserung der Gesamtsituation könnte dann bei schwieriger Abbildbarkeit des Sitzbads im stationären Alltag zur privaten und eigenständigen Prävention oder niedrigschwelligen, häuslichen Therapie der PatientInnen bereits bei Auftreten leichter Symptome empfohlen werden.

#### **4.3 Schlusswort**

Insgesamt wurden in dieser Arbeit zwei unterschiedliche Arten von Therapeutika aus verschiedenen Traditionen untersucht. Auf der einen Seite steht das Nahrungsergänzungsmittel D-Mannose, welches in weiteren klinischen Studien untersucht werden muss. Möglicherweise kann auch eine, für jede Patientin individuelle, Sensitivitätstestung analog zu dem in dieser Arbeit verwendeten Hefeagglutinationsassay etabliert werden. Auf der anderen Seite wurden ätherische Öle untersucht. Diese sind vom Wirkmechanismus her sehr komplex und bedürfen daher noch einiger Forschung, bevor sie vollständig verstanden werden. Die Wirkung der Öle auf Zellebene muss genau so aufgeklärt werden wie die Wirkung auf den Organismus. Möglicherweise finden sich dann zu den erfahrungstherapeutisch überlieferten Befunden weitere fundierte Erläuterungen der Wirkweise. Dies alles sollte

mit dem Ziel geschehen, PatientInnen mit rezidivierenden HWI eine personalisierte Therapie anbieten zu können.

## 5 Zusammenfassung

Aufgrund der zunehmenden Resistenzen von uropathogenen Bakterien gegen Antibiotika (World Health Organization 2018) beschäftigt sich diese Arbeit mit der *in vitro* Untersuchung möglicher alternativer Wirkstoffe in der Behandlung von HWIs. Uropathogene Bakterien adhären häufig mit Typ-1-Pili an mannosylierten Proteinen der Gylkokalyx von Blasenepithelzellen (Mulvey 2002) (Feenstra et al. 2017) (Ribić et al. 2018) (Sihra et al. 2018). Durch Applikation der Monosaccharide D-Mannose und D-Fruktose kann die Adhärenz verschiedener uropathogener *Escherichia coli* Bakterien (UPECs) an weibliche T24 Blasenepithelzellen durch die Zugabe von 0,1% und 1% D-Mannose oder 1% D-Fruktose reduziert werden. D-Mannose zeigte eine stärkere und zuverlässigere Reduktion der Bindung von den Bakterien als D-Fruktose. Die Wirkung von D-Mannose und D-Fruktose ist unabhängig von Antibiotikaresistenzen und abhängig von der Expression der Typ-1-Pili der Bakterien. Eine bereits erfolgte Bindung im Rahmen der Infektion der UPECs an die Blaszellen konnte durch 1% D-Mannose nicht wieder gelöst werden. Deshalb scheint sich eine Behandlung mit D-Mannose und / oder D-Fruktose zur Prophylaxe, aber nicht zur Therapie von HWIs anzubieten. Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass D-Mannose und / oder D-Fruktose ein vielversprechendes Prophylaktikum bei rezidivierenden HWIs sein könnten. Zur Verifizierung dieser Ergebnisse und vor allem der Wirksamkeit *in vivo* muss weitere Forschung betrieben werden.

Neben der Wirkung der Monosaccharide wurden verschiedene ätherische Öle auf ihre antimikrobielle Wirkung hin untersucht. Im Agardiffusionsassay zeigten die folgenden Öle antimikrobielle Wirksamkeit: Lavendelöl, Thymianöl, Salbeiöl, Pfefferminzöl, Teebaumöl, Lemongrassöl, Myrthenöl, Rosmarinöl und Cajeputöl. Zur genaueren Betrachtung der antimikrobiellen Wirkung der ätherischen Öle Teebaumöl, Thymianöl, Lemongrassöl und Cajeputöl wurden MIC und MBC an verschiedenen Bakterienstämmen bestimmt. Teebaumöl und Thymianöl wirkten meist in geringeren Konzentrationen als Lemongrassöl und Cajeputöl gegen verschiedene gram-negative und gram-positive uropathogene Keime. Hierbei waren die Öle auch wirksam gegen antibiotikaresistente Stämme. Des Weiteren wirkten Thymian- und Teebaumöl synergistisch. Additive Effekte zeigten sich ebenfalls bei der Kombination von Teebaumöl und Thymianöl mit dem Antibiotikum Pivmecillinam. Daraus folgt, dass ätherische Öle, auch in Kombination mit Antibiotika, aufgrund ihrer antimikrobiellen Eigenschaften eine mögliche Behandlungsalternative gegen HWIs darstellen könnten und deshalb zukünftig weiter beforscht werden sollten.

## 6 Summary

Because of the raising number of resistances against antibiotics of uropathogenic bacteria (World Health Organization 2018) this thesis aimed to examine alternative treatment options of urinary tract infections (UTI). Uropathogenic bacteria frequently adhere with type-1-pili to mannosylated proteins in the glycocalyx of bladder epithelial cells (Mulvey 2002; Feenstra et al. 2017; Ribić et al. 2018; Sihra et al. 2018). Application of 0.1% - 1% D-mannose or 1% D-fructose, reduced the adherence of different uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains to female T24 bladder epithelial cells. D-mannose showed stronger and more reliable reduction of bound bacteria compared to D-fructose. The effect of D-mannose and D-fructose was independent of antibiotic resistances and dependent of the expression of type-1-pili by the bacteria. Once bound to the bladder cells UPECs could no longer be detached by 1% D-mannose. Thus, D-mannose and / or D-fructose may be possible drugs for prophylaxis but not for treatment of UTIs. All together it was shown that D-mannose and / or D-fructose can be a promising prophylactic strategy for recurrent UTI. However, more research is necessary to verify these findings and to prove effectiveness *in vivo*.

Besides the analysis of the effects of monosaccharides, essential oils were analyzed for their antimicrobial effects. In agar dilution assays the following oils showed antimicrobial potential: lavender oil, thyme oil, sage oil, peppermint oil, tea tree oil, lemongrass oil, myrtle oil, rosemary oil and cajuput oil. For a more detailed research of the effectivity, MIC and MBC of the essential oils tea tree oil, thyme oil, lemongrass oil and cajuput oil were defined. Tea tree oil and thyme oil were more effective against gram-negative and gram-positive uropathogens as lemongrass and cajuput oil. Furthermore, the essential oils were also effective against antibiotic resistant strains. Synergistic activity of tea tree oil and thyme oil were observed. In addition, additive effects were shown by combining tea tree oil or thyme oil with the antibiotic pivmecillinam. The application of essential oils as main treatment or in combination with antibiotics in case of acute UTI could be a possible alternative therapy of UTI due to their antimicrobial characteristics and should be further investigated.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
AU	Artifizieller Urin
Abb.	Abbildung
Caj.	Ätherisches Cajeputöl
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
FBC	Fractional bactericidal concentration (englisch) – Fraktionierte bakterizide Konzentration
FBCI	Fractional bactericidal concentration index (englisch) – Index der fraktionierten bakteriziden Konzentration
FIC	Fractional inhibitory concentration (englisch) – Fraktionierte inhibitorische Konzentration
FICI	Fractional inhibitory concentration index (englisch) – Index der fraktionierten inhibitorischen Konzentration
FKS	Fötale Kälberserum
Fosfo.	Fosfomycin
HWI	Harnwegsinfektion
ICB	Intracellular bacterial communities
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IFN $\alpha$	Interferon- $\alpha$
KBE	Kolonie bildende Einheit
Lem.	Ätherisches Lemongrassöl
MBC	Minimal bactericidal concentration (englisch) – Minimale bakterizide Konzentration (MBK)
MIC	Minimal inhibitory concentration (englisch) – Minimale Hemmkonzentration (MHK)
Nitro.	Nitrofurantoin
Nr.	Nummer
PBS	phosphate-buffered saline
Piv.	Pivmecillinam
rHWI	rezidivierende Harnwegsinfektion
RT	Raumtemperatur
Tee.	Ätherisches Teebaumöl
Thy.	Ätherisches Thymianöl
u.a.	Unter anderem
UTI	Urinary tract infection (engl.)
UPEC	Uropathogener <i>E. coli</i>

## 8 Literaturverzeichnis

Adams, Jon (2007): *Researching complementary and alternative medicine*. London: Routledge. Online verfügbar unter <http://site.ebrary.com/lib/alltitles/docDetail.action?docID=10155688>.

Aelenei, P.; Rimbu, C. M.; Guguianu, E.; Dimitriu, G.; Aprotosoiaie, A. C.; Brebu, M. et al. (2019): Coriander essential oil and linalool - interactions with antibiotics against Gram-positive and Gram-negative bacteria. In: *Letters in Applied Microbiology* 68 (2), S. 156–164.

Afshar, Kambiz; Fleischmann, Nina; Schmiemann, Guido; Bleidorn, Jutta; Hummers-Pradier, Eva; Friede, Tim et al. (2018): Reducing antibiotic use for uncomplicated urinary tract infection in general practice by treatment with uva-ursi (REGATTA) – a double-blind, randomized, controlled comparative effectiveness trial. In: *BMC Complementary and Alternative Medicine* 18, S. 2–8.

Akinyemi, A. J.; Faboya, O. L.; Paul, A. A.; Olayide, I.; Faboya, O. A.; Oluwasola, T. A. (2018): Nephroprotective Effect of Essential Oils from Ginger (*Zingiber officinale*) and Turmeric (*Curcuma longa*) Rhizomes against Cadmium-induced Nephrotoxicity in Rats. In: *Journal of oleo science* 67 (10), S. 1339–1345.

Al Demour, Saddam; Ababneh, Mera A. (2018): Evaluation of Behavioral and Susceptibility Patterns in Premenopausal Women with Recurrent Urinary Tract Infections: A Case Control Study. In: *Urologia internationalis* 100 (1), S. 31–36.

Albrecht, Uwe; Goos, Karl-Heinz; Schneider, Berthold (2007): A randomised, double-blind, placebo-controlled trial of a herbal medicinal product containing *Tropaeoli majoris herba* (Nasturtium) and *Armoraciae rusticanae radix* (Horseradish) for the prophylactic treatment of patients with chronically recurrent lower urinary tract infections. In: *Current medical research and opinion* 23 (10), S. 2415–2422.

ALIUD PHARMA GmbH (2021): Original Beipackzettel von IBUPROFEN AL 400 Filmtabletten. Online verfügbar unter [http://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/Pdr\\_for\\_Herbal\\_Medicines.pdf](http://naturalingredient.org/wp/wp-content/uploads/Pdr_for_Herbal_Medicines.pdf), zuletzt aktualisiert am 28.07.2021+02:00, zuletzt geprüft am 15.12.2022.657Z.

Alraek, Terje; Fosli Soedal, Liv Inger; Fagerheim, Siri Urnes; Digranes, Asbjörn; Baerheim, Anders (2002): Acupuncture treatment in the prevention of uncomplicated recurrent lower urinary tract infections in adult women. In: *American Journal of Public Health* 92 (10), S. 1609–1611. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6587870/pdf/COD-80-101.pdf>.

Anderson, G. G.; Palermo, J. J.; Schilling, J. D.; Roth, R.; Heuser, J.; Hultgren, S. J. (2003): Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. In: *Science (New York, N.Y.)* 301 (5629).

Arranz, E.; Jaime, L.; López de las Hazas, M. C.; Reglero, G.; Santoyo, S. (2015): Supercritical fluid extraction as an alternative process to obtain essential oils with anti-inflammatory properties from marjoram and sweet basil. In: *Industrial Crops and Products* 67, S. 121–129.

Assmann, C. E.; Cadoná, F. C.; Bonadiman, B. d. S. R.; Dornelles, E. B.; Trevisan, G.; da Cruz, I. B. M. (2018): Tea tree oil presents in vitro antitumor activity on breast cancer cells without cytotoxic effects on fibroblasts and on peripheral blood mononuclear cells. In: *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie* 103, S. 1253–1261.

Aziminia, Nikoo; Hadjipavlou, Marios; Philippou, Yiannis; Pandian, Shivkumar S.; Malde, Sachin; Hammadeh, Mohamed Y. (2019): Vaccines for the prevention of recurrent urinary tract infections: a systematic review. In: *BJU international* 123 (5), S. 753–768.

Babikir, Ibrahim H.; Abugroun, Elsir A.; Bilal, Naser Eldin; Alghasham, Abdullah Ali; Abdalla, Elmuataz Elmansi; Adam, Ishag (2018): The impact of cathelicidin, the human antimicrobial peptide LL-37 in urinary tract infections. In: *BMC infectious diseases* 18 (1), S. 1–8.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. (2008): Biological effects of essential oils--a review. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 46 (2), S. 446–475.

Barmer GEK (2015): Arzneimittelreport 2015. Unter Mitarbeit von Claudia Barth, Angela Fritsch, Friederike Höfel, Daniela Stahn, Sarah Volz. Hg. v. Gerd Glaeske und Christel Schicktanz. Siegburg (Band 32). Online verfügbar unter [2015https://www.barmer.de/blob/37954/60143006d7108440f02512a6a80fcaea/data/pdf-arzneimittelreport-2015.pdf](https://www.barmer.de/blob/37954/60143006d7108440f02512a6a80fcaea/data/pdf-arzneimittelreport-2015.pdf), zuletzt geprüft am 20.10.2019.

Bauer, H. W.; Bessler, W. G. (2016): Nicht antibiotische Strategien zur Rezidivprophylaxe von unkomplizierten Harnwegsinfektionen der Frau. In: *Aktuelle Urologie* 47 (3), S. 214–219.

Beaux, D.; Fleurentin, J.; Mortier, F. (1999): Effect of extracts of *Orthosiphon stamineus* benth, *Hieracium pilosella* L., *Sambucus nigra* L. and *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) spreng. in rats. In: *Phytotherapy Research* 13 (3), S. 222–225.

Bessler, Wolfgang G.; Puce, Karola; vor dem Esche, Ulrich; Kirschning, Carsten; Huber, Maria (2009): Immunomodulating Effects of OM-89, a Bacterial Extract from *Escherichia coli*, in Murine and Human Leukocytes. In: *Arzneimittelforschung*, S. 571–577.

Booth, I. R. (1985): Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. In: *Microbiological Reviews* 49 (4), S. 359–378. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3912654/>.

Bouckaert, Julie; Berglund, Jenny; Schembri, Mark; De Genst, Erwin; Cools, Lieve; Wuhrer, Manfred et al. (2005): Receptor binding studies disclose a novel class of high-affinity inhibitors of the *Escherichia coli* FimH adhesin. In: *Molecular microbiology* 55 (2), S. 441–455.

Bundesministerium für Gesundheit (2020): DART 2020 – Antibiotika-Resistenzen bekämpfen zum Wohl von Mensch und Tier.

- Carson, C. F.; Hammer, K. A.; Riley, T. V. (2006): *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil: a review of antimicrobial and other medicinal properties. In: *Clinical Microbiology Reviews* 19 (1), S. 50–62.
- Carson, C. F.; Riley, T. V. (1995): Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. In: *The Journal of applied bacteriology* 78 (3), 264-269.
- Carson, Christine F.; Mee, Brian J.; Riley, Thomas V. (2002): Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46 (6), S. 1914–1920.
- Cavanagh, H. M. A.; Wilkinson, J. M. (2002): Biological Activities of Lavender Essential Oil. In: *Phytotherapy research : PTR* 16 (4), S. 301–308.
- Cho, Mi-Yeon; Min, Eun Sil; Hur, Myung-Haeng; Lee, Myeong Soo (2013): Effects of Aromatherapy on the Anxiety, Vital Signs, and Sleep Quality of Percutaneous Coronary Intervention Patients in Intensive Care Units. In: *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*, S. 1–6.
- Cox, S. D.; Mann, C. M.; Markham, J. L.; Bell, H. C.; Gustafson, J. E.; Warmington, J. R.; Wyllie, S. G. (2000): The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). In: *Journal of Applied Microbiology* 88 (1), S. 170–175.
- Crawford, Glen H.; Katz, Kenneth A.; Ellis, Elliot; James, William D. (2004): Use of aromatherapy products and increased risk of hand dermatitis in massage therapists. In: *Archives of dermatology* 140 (8), S. 991–996.
- Cronan, J. E. (2003): Bacterial membrane lipids: where do we stand? In: *Annual review of microbiology* 57, S. 203–224.
- Dall'Olio, Fabio; Malagolini, Nadia; Trinchera, Marco; Chiricolo, Mariella (2012): Mechanisms of cancer-associated glycosylation changes. In: *Frontiers in Bioscience* 17, S. 670–699.
- Davis, Joseph A.; Freeze, Hudson H. (2001): Studies of mannose metabolism and effects of long-term mannose ingestion in the mouse. In: *Biochimica et Biophysica Acta* 1528, S. 116–126.
- de Arriba, S. G.; Naser, B.; Nolte, K. U. (2013): Risk assessment of free hydroquinone derived from *Arctostaphylos Uva-ursi folium* herbal preparations. In: *International journal of toxicology* 32 (6), S. 442–453.
- de Groot, A. C.; Schmidt, E. (2016a): Essential Oils, Part III: Chemical Composition. In: *Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug* 27 (4), S. 161–169.
- de Groot, A. C.; Schmidt, E. (2016b): Essential Oils, Part IV: Contact Allergy. In: *Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug* 27 (4), S. 170–175.

de Groot, A. C.; Schmidt, E. (2016c): Essential Oils, Part V: Peppermint Oil, Lavender Oil, and Lemongrass Oil. In: *Dermatitis : contact, atopic, occupational, drug* 27 (6), S. 325–332.

Di Pasqua, R.; Betts, G.; Hoskins, N.; Edwards, M.; Ercolini, D.; Mauriello, G. (2007): Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 55 (12), S. 4863–4870.

DocCheck Medical Services GmbH (2020): Cyclooxygenase - DocCheck Flexikon. Hg. v. Frank Antwerpes. DocCheck Medical Services GmbH. Online verfügbar unter <https://flexikon.doccheck.com/de/Cyclooxygenase>, zuletzt aktualisiert am 13.10.2020, zuletzt geprüft am 13.10.2020.

Donker, G. A. (2014): Primary Care Database. In: *Sentinel Practices*, S. 1–195. Online verfügbar unter [https://www.nivel.nl/sites/default/files/bestanden/Peilstations\\_2014\\_Engels.pdf](https://www.nivel.nl/sites/default/files/bestanden/Peilstations_2014_Engels.pdf), zuletzt geprüft am 20.10.2019.

Eshdat, Yuval; Speth, Volker; Jann, Klaus (1982): Participation of Pili and Cell Wall Adhesin in the Yeast Agglutination Activity of Escherichia Coli. In: *Infection and Immunity* 34 (3), S. 980–986.

Eto, Danelle S.; Jones, Tiffani A.; Sundsbak, Jamie L.; Mulvey, Matthew A. (2007): Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic Escherichia coli. In: *PLoS pathogens* 3 (7), 0949-0961.

Feenstra, T.; Thøgersen, M. S.; Wieser, E.; Peschel, A.; Ball, M. J.; Brandes, R. et al. (2017): Adhesion of Escherichia coli under flow conditions reveals potential novel effects of FimH mutations. In: *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 36 (3), S. 467–478.

Ferrante, Kimberly L.; Wasenda, Erika J.; Jung, Carrie E.; Adams-Piper, Emily R.; Lukacz, Emily S. (2019): Vaginal Estrogen for the Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection in Postmenopausal Women: A Randomized Clinical Trial. In: *Female pelvic medicine & reconstructive surgery* 00 (00), S. 1–6.

Fierer, Joshua; Talner, Lee; Braude, Abraham I. (1971): Bacteremia in the Pathogenesis of Retrograde E coli Pyelonephritis in the Rat. In: *The American Journal of Pathology* 64 (2), S. 443. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2047565/>.

Flower, Andrew; Bishop, Felicity L.; Lewith, George (2014): How Women Manage Recurrent Urinary Tract Infections: An Analysis of Postings on a Popular Web Forum. In: *BMC Family Practice* (15), S. 1–8. Online verfügbar unter <https://bmcfampract.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2296-15-162>, zuletzt geprüft am 23.03.2020.

Foxman, Betsy; Gillespie, Brenda; Koopman, James; Zhang, Lixin; Palin, Karen; Tallman, Patricia et al. (2000): Risk Factors for Second Urinary Tract Infection among College Women. In: *American Journal of Epidemiology* 151 (12), S. 1194–1205.

Gágyor, I.; Hummers, E.; Schmiemann, G.; Friede, T.; Pfeiffer, S.; Afshar, K.; Bleidorn, J. (2021): Herbal treatment with uva ursi extract versus fosfomycin in women with uncomplicated urinary tract infection in primary care: a randomized controlled trial. In: *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 27 (10), S. 1441–1447.

Gágyor, Ildikó; Bleidorn, Jutta; Kochen, Michael M.; Schmiemann, Guido; Wegscheider, Karl; Hummers-Pradier, Eva (2015): Ibuprofen versus fosfomycin for uncomplicated urinary tract infection in women: randomised controlled trial. In: *BMJ (Clinical research ed.)* 351, 1-11.

Garimella, Pranav S.; Bartz, Traci M.; Ix, Joachim H.; Chonchol, Michel; Shlipak, Michael G.; Devarajan, Prasad et al. (2017): Urinary Uromodulin and Risk of Urinary Tract Infections: The Cardiovascular Health Study. In: *American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation* 69 (6), S. 744–751.

Gedney, J. J.; Glover, T. L.; Fillingim, R. B. (2004): Sensory and Affective Pain Aiscrimination After Inhalation of Essential Oils. In: *Psychosomatic medicine* 66 (4), S. 599–606.

Geerlings, S. E. (2016): Clinical Presentations and Epidemiology of Urinary Tract Infections. In: *Microbiology spectrum* 4 (5).

Gouin, Sébastien G.; Wellens, Adinda; Bouckaert, Julie; Kovensky, José (2009): Synthetic multimeric heptyl mannosides as potent antiadhesives of uropathogenic Escherichia coli. In: *ChemMedChem* 4 (5), S. 749–755.

Gyftopoulos, Kostis; Matkaris, Miltos; Vourda, Aikaterini; Sakellaropoulos, George (2019): Clinical implications of the anatomical position of the urethra meatus in women with recurrent post-coital cystitis: a case-control study. In: *International urogynecology journal* 30 (8), S. 1351–1357.

Haloui, Mounsiif; Louedec, Liliane; Michel, Jean-Baptiste; Lyoussi, Badiia (2000): Experimental diuretic effects of Rosmarinus officinalis and Centaurium erythraea. In: *Journal of ethnopharmacology* 71 (3), S. 465–472.

Hammer, K. A.; Carson, C. F.; Riley, T. V. (2008): Frequencies of resistance to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and rifampicin in Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis and Enterococcus faecalis. In: *International journal of antimicrobial agents* 32 (2), S. 170–173.

Han, X.; Beaumont, C.; Rodriguez, D.; Bahr, T. (2018): Black pepper (Piper nigrum) essential oil demonstrates tissue remodeling and metabolism modulating potential in human cells. In: *Phytotherapy research : PTR* 32 (9), S. 1–5.

Helander, Ilkka M.; Alakomi, Hanna-Leena; Latva-Kala, Kyösti; Mattila-Sandholm, Tiina; Pol, Irene; Smid, Eddy J. et al. (1998): Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 46 (9), S. 3590–3595.

- Herman, A.; Herman, A. P. (2015): Essential oils and their constituents as skin penetration enhancer for transdermal drug delivery: a review. In: *The Journal of pharmacy and pharmacology* 67 (4), S. 1–13.
- Herman, A.; Tambor, K. (2016): Linalool Affects the Antimicrobial Efficacy of Essential Oils. In: *Current microbiology* 72 (2), S. 1–8.
- Herold (Hg.) (2019): Innere Medizin. Köln.
- Höller, Martina; Steindl, Hubert; Abramov-Sommariva, Dimitri; Wagenlehner, Florian; Naber, Kurt G.; Kostev, Karel (2021): Treatment of Urinary Tract Infections with Canephron® in Germany: A Retrospective Database Analysis. In: *Antibiotics* 10 (6), S. 1–11.
- Homeyer, D. C.; Sanchez, C. J.; Mende, K.; Beckius, M. L.; Murray, C. K.; Wenke, J. C.; Akers, K. S. (2015): In vitro activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on filamentous fungi and toxicity to human cells. In: *Medical mycology* 53 (3), S. 285–294.
- Hooton, Thomas M.; Vecchio, Mariacristina; Iroz, Alison; Tack, Ivan; Dornic, Quentin; Seksek, Isabelle; Lotan, Yair (2018): Effect of Increased Daily Water Intake in Premenopausal Women With Recurrent Urinary Tract Infections: A Randomized Clinical Trial. In: *JAMA Internal Medicine* 178 (11), S. 1509.
- Howell, Amy B.; Botto, Henry; Combescure, Christophe; Blanc-Potard, Anne-Béatrice; Gausa, Lluís; Matsumoto, Tetsuro et al. (2010): Dosage effect on uropathogenic *Escherichia coli* anti-adhesion activity in urine following consumption of cranberry powder standardized for proanthocyanidin content: a multicentric randomized double blind study. In: *BMC infectious diseases* 10, S. 1–11.
- Howell, Amy B.; Reed, Jess D.; Krueger, Christian G.; Winterbottom, Ranee; Cunningham, David G.; Leahy, Marge (2005): A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. In: *Phytochemistry* 66 (18), S. 2281–2291.
- Hung, Chia-Suei; Bouckaert, Julie; Hung, Danielle; Pinkner, Jerome; Widberg, Charlotte; DeFusco, Anthony et al. (2002): Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. In: *Molecular microbiology* 44 (4), S. 903–915. Online verfügbar unter <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-2958.2002.02915.x>, zuletzt geprüft am 18.12.2020.847Z.
- Iten, F.; Saller, R.; Abel, G.; Reichling, J. (2009): Additive antimicrobial effects of the active components of the essential oil of *Thymus vulgaris*--chemotype carvacrol. In: *Planta medica* 75 (11), S. 1231–1236.
- Ivanov, Dmitry; Abramov-Sommariva, Dimitri; Moritz, Kathrin; Eskötter, Herbert; Kostinenko, Tatyana; Martynyuk, Liliya et al. (2015): An open label, non-controlled, multicentre, interventional trial to investigate the safety and efficacy of Canephron® N in the management of uncomplicated urinary tract infections (uUTIs). In: *Clin Phytosci* 1 (1), S. 1–11.

Kahlmeter, G. (2003): An international survey of the antimicrobial susceptibility of pathogens from uncomplicated urinary tract infections: the ECO.SENS Project. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 51 (1), S. 69–76.

Kalily, Emmanuel; Hollander, Amit; Korin, Ben; Cymerman, Itamar; Yaron, Sima (2016): Mechanisms of resistance to linalool in *Salmonella* Senftenberg and their role in survival on basil. In: *Environ Microbiol* 18 (11), S. 3673–3688.

Kalily, Emmanuel; Hollander, Amit; Korin, Ben; Cymerman, Itamar; Yaron, Sima (2017): Adaptation of *Salmonella enterica* Serovar Senftenberg to Linalool and Its Association with Antibiotic Resistance and Environmental Persistence. In: *Applied and Environmental Microbiology* 83 (10), S. 1–17.

Karadag, Ezgi; Samancioglu, Sevgin; Ozden, Dilek; Bakir, Ercan (2017): Effects of Aromatherapy on Sleep Quality and Anxiety of Patients. In: *Nursing in critical care* 22 (2), S. 105–112.

Kątnik-Prastowska, Iwona; Lis, Jolanta; Matejuk, Agata (2014): Glycosylation of uroplakins. Implications for bladder physiopathology. In: *Glycoconjugate journal* 31 (9), S. 623–636.

Kedzia, B.; Wrociński, T.; Mrugasiewicz, K.; Gorecki, P.; Grzewińska, H. (1975): [Antibacterial action of urine containing products of arbutin metabolism]. In: *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia* 27 (3), S. 305–314. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/240095/>.

Klemm, Per; Vejborg, Rebecca Munk; Hancock, Viktoria (2010): Prevention of bacterial adhesion. In: *Applied microbiology and biotechnology* 88 (2), S. 451–459.

Komeh-Nkrumah, S. A.; Nanjundaiah, S. M.; Rajaiah, R.; Yu, H.; Moudgil, K. D. (2012): Topical dermal application of essential oils attenuates the severity of adjuvant arthritis in Lewis rats. In: *Phytotherapy research : PTR* 26 (1), S. 1–13.

Kranjčec, Bojana; Papeš, Dino; Altarac, Silvio (2014): D-mannose powder for prophylaxis of recurrent urinary tract infections in women: a randomized clinical trial. In: *World journal of urology* 32 (1), S. 79–84.

Künstle, G.; Brenneis, C.; Haunschild, J. (2013): 671 Efficacy of Canephron® N against bacterial adhesion, inflammation and bladder hyperactivity. In: *European Urology Supplements* 12 (1), e671.

Lang, Gudrun; Buchbauer, Gerhard (2011): A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. In: *Flavour and Fragrance Journal* 27 (1), S. 13–39.

Lee, Anne Cc; Mullany, Luke C.; Koffi, Alain K.; Rafiqullah, Iftexhar; Khanam, Rasheda; Folger, Lian V. et al. (2019): Urinary tract infections in pregnancy in a rural population of Bangladesh: population-based prevalence, risk factors, etiology, and antibiotic resistance. In: *BMC pregnancy and childbirth* 20 (1), S. 1–11.

Leitlinienprogramm DGU (2017): 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. Online verfügbar unter [http://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/043-](http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/043-), zuletzt aktualisiert am 2017, zuletzt geprüft am 20.10.2019.

Leyva-López, Nayely; Gutiérrez-Grijalva, Erick P.; Vazquez-Olivo, Gabriela; Heredia, J. Basilio (2017): Essential Oils of Oregano: Biological Activity beyond Their Antimicrobial Properties. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 22 (6), S. 1–24.

Leyva-López, Nayely; Nair, Vimal; Bang, Woo Young; Cisneros-Zevallos, Luis; Heredia, J. Basilio (2016): Protective role of terpenes and polyphenols from three species of Oregano (*Lippia graveolens*, *Lippia palmeri* and *Hedeoma patens*) on the suppression of lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. In: *Journal of ethnopharmacology* 187, S. 302–312.

Linalool. OECD SIDS initial assessment report for SIAM 14 (2002). Paris, France.

Liu, Xue; Cai, Jiabin; Chen, Haiming; Zhong, Qiuping; Hou, Yaqi; Chen, Weijun; Chen, Wenxue (2020): Antibacterial activity and mechanism of linalool against *Pseudomonas aeruginosa*. In: *Microbial Pathogenesis* 141, S. 103980.

Longbottom, Chelsea J.; Carson, Christine F.; Hammer, Katherine A.; Mee, Brian J.; Riley, Thomas V. (2004): Tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* to *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil is associated with the outer membrane and energy-dependent cellular processes. In: *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 54 (2), S. 386–392.

Lüthje, Petra; Brauner, Annelie (2014): Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. In: *Advances in microbial physiology* 65, S. 337–372.

Lüthje, Petra; Brauner, Hanna; Ramos, Nubia L.; Övregaard, Amanda; Gläser, Regine; Linden Hirschberg, Angelica et al. (2013): Estrogen Supports Urothelial Defense Mechanisms. In: *Science Translational Medicine* 5 (190), S. 1–10.

Malik, Tripti; Singh, Padma; Pant, Shailja; Chauhan, Nirpendra; Lohani, Hema (2011): Potentiation of Antimicrobial Activity of Ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* Essential Oil against Selected Uropathogens. In: *Phytotherapy Research* (25), S. 1225–1228.

Martinez, Juan J.; Mulvey, Matthew A.; Schilling, Joel D.; Pinkner, Jerome S.; Hultgren, Scott J. (2000): Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. In: *The EMBO Journal* 19 (12), S. 2803–2812.

Mehta, Iti; Zimmern, Philippe; Reitzer, Larry (2018): Enzymatic assay of D-mannose from urine. In: *Bioanalysis* 10 (23), S. 1947–1954.

Meijlink, Jane M. (2017): Bladder Pain: the Patient Perspective. In: *Urologia* 84 (Suppl 1), S. 5–7.

Michael Schünke (Hg.) (2015): Prometheus. LernAtlas der Anatomie. Kopf, Hals und Neuroanatomie. Unter Mitarbeit von Michael Schünke, Erik Schulte, Udo Schumacher, Markus Voll, Karl Wesker. 4. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.

- Michaels, E. K.; Chmiel, J. S.; Plotkin, B. J.; Schaeffer, A. J. (1983): Effect of D-Mannose and D-Glucose on Escherichia coli Bacteriuria in Rats. In: *Urological Research*, S. 97–102.
- Mirelman, David; Altmann, Gideon; Eshdat, Yuval (1980): Screening of Bacterial Isolates for Mannose - Specific Lectin Activity by Agglutination of Yeasts. In: *Journal of Clinical Microbiology* 11 (4), S. 328–331.
- Moken, M. C.; McMurry, L. M.; Levy, S. B. (1997): Selection of multiple-antibiotic-resistant (mar) mutants of Escherichia coli by using the disinfectant pine oil: roles of the mar and acrAB loci. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 41 (12), S. 2770–2772.
- Mulvey, Matthew A. (2002): Adhesion and entry of uropathogenic Escherichia coli. In: *Cellular Microbiology* (4), S. 257–271.
- Naber, K. G.; Schito, G.; Botto, H.; Palou, J.; Mazzei, T. (2008): Surveillance study in Europe and Brazil on clinical aspects and Antimicrobial Resistance Epidemiology in Females with Cystitis (ARESC): implications for empiric therapy. In: *European urology* 54 (5), S. 1164–1175.
- Naber, Kurt G. (2013): Efficacy and safety of the phytotherapeutic drug Canephron® N in prevention and treatment of urogenital and gestational disease: review of clinical experience in Eastern Europe and Central Asia. In: *Research and reports in urology* 5, S. 39–46.
- Naber, Kurt G.; Kogan, Mikhail; Wagenlehner, Florian M. E.; Siener, Roswitha; Gessner, André (2017): How the microbiome is influenced by the therapy of urological diseases: standard versus alternative approaches. In: *Clin Phytosci* 3 (1), S. 1–4.
- Nardelli, A.; D'Hooghe, E.; Drieghe, J.; Dooms, M.; Goossens, A. (2009): Allergic contact dermatitis from fragrance components in specific topical pharmaceutical products in Belgium. In: *Contact dermatitis* 60 (6), S. 303–313.
- Nausch, Bernhard; Pace, Simona; Pein, Helmut; Koeberle, Andreas; Rossi, Antonietta; Künstle, Gerald; Werz, Oliver (2019): The standardized herbal combination BNO 2103 contained in Canephron® N alleviates inflammatory pain in experimental cystitis and prostatitis. In: *Phytomedicine* 60, S. 152987.
- Nguyen, H. V.; Meile, J.-C.; Lebrun, M.; Caruso, D.; Chu-Ky, S.; Sarter, S. (2018): Litsea cubeba leaf essential oil from Vietnam: chemical diversity and its impacts on antibacterial activity. In: *Letters in Applied Microbiology* 66 (3), S. 207–214.
- Nseir, William; Taha, Muhamad; Nemarny, Hytam; Mograbi, Julnar (2013): The association between serum levels of vitamin D and recurrent urinary tract infections in premenopausal women. In: *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases* 17 (12), e1121-4.
- Ofek, I.; Mosek, A.; Sharon, N. (1981): Mannose-specific adherence of Escherichia coli freshly excreted in the urine of patients with urinary tract infections, and of isolates subcultured from the infected urine. In: *Infection and Immunity* 34 (3), S. 708–711.

- Ojeda-Sana, Adriana M.; van Baren, Catalina M.; Elechosa, Miguel A.; Juárez, Miguel A.; Moreno, Silvia (2013): New insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and their main components. In: *Food Control* 31 (1), S. 189–195.
- Palleschi, G.; Carbone, A.; Zanello, P. P.; Mele, R.; Leto, A.; Fuschi, A. et al. (2017): Prospective study to compare antibiotics versus the association of N-acetylcysteine, D-mannose and Morinda citrifolia fruit extract in preventing urinary tract infections in patients submitted to urodynamic investigation. In: *Archivio italiano di urologia, andrologia : organo ufficiale [di] Societa italiana di ecografia urologica e nefrologica* 89 (1), S. 45–50.
- Papadopoulos, Chelsea J.; Carson, Christine F.; Hammer, Katherine A.; Riley, Thomas V. (2006): Susceptibility of pseudomonads to Melaleuca alternifolia (tea tree) oil and components. In: *J Antimicrob Chemother* 58 (2), S. 449–451.
- Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagl, Stefan (Hg.) (2014): Physiologie. Unter Mitarbeit von Bernhard Brenner, Gerhard Burckhardt, Andreas Draguhn, Heimo Ehmke, Ulf Eysel, Joachim Fandrey et al. 7. Aufl. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag.
- Parke, Dennis V.; Rahman, Kh. M. Quddusur; Walker, Ronald (1974): Effect of Linalool on Hepatic Drug-Metabolizing Enzymes in the Rat. In: *Biochem Soc Trans* 2 (4), S. 615–618.
- Patterson, J. E.; McElmeel, L.; Wiederhold, N. P. (2019): In Vitro Activity of Essential Oils Against Gram-Positive and Gram-Negative Clinical Isolates, Including Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. In: *Open forum infectious diseases* 6 (12), S. 1–4.
- Peana, A. T.; D'Aquila, P. S.; Panin, F.; Serra, G.; Pippia, P.; Moretti, M. D. (2002): Anti-inflammatory activity of linalool and linalyl acetate constituents of essential oils. In: *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 9 (8), S. 721–726.
- Piechota, H.J. (2017): Rezidivierende Harnwegsinfektionen der Frau. In: *Gynäkologische Praxis* (41), S. 23–31, zuletzt geprüft am 15.12.2022.
- Pietrucha-Dilanchian, Paula; Hooton, Thomas M. (2016): Diagnosis, Treatment, and Prevention of Urinary Tract Infection. In: *Microbiology spectrum*, S. 1–20.
- Porat, Avital; Kesler, Stuart (2020): Urosepsis. In: Avital Porat und Stuart Kesler (Hg.): StatPearls [Internet]: StatPearls Publishing. Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482344/>.
- Prashar, A.; Locke, I. C.; Evans, C. S. (2004): Cytotoxicity of lavender oil and its major components to human skin cells. In: *Cell Proliferation* 37 (3), S. 221–229.
- Przybyło, M.; Lityńska, A.; Pocheć, E. (2005): Different adhesion and migration properties of human HCV29 non-malignant urothelial and T24 bladder cancer cells: role of glycosylation. In: *Biochimie* 87 (2), S. 133–142.

Ramadan, M. A.; Shawkey, A. E.; Rabeh, M. A.; Abdellatif, A. O. (2019): Expression of P53, BAX, and BCL-2 in human malignant melanoma and squamous cell carcinoma cells after tea tree oil treatment in vitro. In: *Cytotechnology* 71 (1), S. 461–473.

Raz, R.; Stamm, W. E. (1993): A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. In: *The New England journal of medicine* 329 (11), S. 753–756.

Reichling, J.; Schnitzler, P.; Suschke, U.; Saller, R. (2009): Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties--an overview. In: *Forschende Komplementarmedizin (2006)* 16 (2), S. 79–90.

Ribić, Rosana; Meštrović, Tomislav; Neuberg, Marijana; Kozina, Goran (2018): Effective anti-adhesives of uropathogenic Escherichia coli. In: *Acta pharmaceutica (Zagreb, Croatia)* 68 (1), S. 1–18.

Ronald, Allan (2003): The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. In: *Disease-a-month : DM* 49 (2), S. 71–82.

Saei-Dehkordi, S. S.; Tajik, H.; Moradi, M.; Khalighi-Sigaroodi, F. (2010): Chemical composition of essential oils in *Zataria multiflora* Boiss. from different parts of Iran and their radical scavenging and antimicrobial activity. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 48 (6), S. 1562–1567.

Sakkas, H.; Gousia, P.; Economou, V.; Sakkas, V.; Petsios, S.; Papadopoulou, C. (2016): In vitro antimicrobial activity of five essential oils on multidrug resistant Gram-negative clinical isolates. In: *Journal of intercultural ethnopharmacology* 5 (3), S. 212–218.

Sakkas, Hercules; Papadopoulou, Chrissanthy (2017): Antimicrobial Activity of Basil, Oregano, and Thyme Essential Oils. In: *Journal of microbiology and biotechnology* 27 (3), S. 429–438.

Salinas-Casado, J.; Méndez-Rubio, S.; Esteban-Fuertes, M.; Gómez-Rodríguez, A.; Vírseda-Chamorro, M.; Luján-Galán, M.; Rituman, G. (2018): [Efficacy and safety of D-mannose (2 g), 24h prolonged release, associated with Proanthocyanidin (PAC), versus isolate PAC, in the management of a series of women with recurrent urinary infections]. In: *Archivos españoles de urología* 71 (2), S. 169–177. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29521263/>.

Sandri, I. G.; Zacaria, J.; Fracaro, F.; Delamare, A. P.L.; Echeverrigaray, S. (2007): Antimicrobial activity of the essential oils of Brazilian species of the genus *Cunila* against foodborne pathogens and spoiling bacteria. In: *Food Chemistry* 103 (3), S. 823–828.

Schaeffer, Anthony J.; Chmiel, Joan S.; Duncan, James L.; Falkowski, Walter S. (1984): Mannose-Sensitive Adherence of Escherichia Coli to Epithelial Cells from Women with Recurrent Urinary Tract Infections. In: *Journal of Urology* 131 (5), S. 906–910.

- Schmitt, Sonja; Schaefer, Ulrich F.; Doebler, Leonhard; Reichling, Jürgen (2009): Cooperative Interaction of Monoterpenes and Phenylpropanoids on the in vitro Human Skin Permeation of Complex Composed Essential Oils. In: *Planta Med* 75 (13), S. 1381–1385.
- Scribano, D.; Sarshar, M.; Prezioso, C.; Lucarelli, M.; Angeloni, A.; Zagaglia, C. et al. (2020): d-Mannose Treatment neither Affects Uropathogenic Escherichia coli Properties nor Induces Stable FimH Modifications. In: *Molecules (Basel, Switzerland)* 25 (2), S. 1–14.
- Semeniuc, C. A.; Pop, C. R.; Rotar, A. M. (2017): Antibacterial activity and interactions of plant essential oil combinations against Gram-positive and Gram-negative bacteria. In: *Journal of food and drug analysis* 25 (2), S. 1–6.
- Semins, Michelle J.; Shore, Andrew D.; Makary, Martin A.; Weiner, Jonathan; Matlaga, Brian R. (2012): The impact of obesity on urinary tract infection risk. In: *Urology* 79 (2), S. 266–269.
- Sharma, Vandana; Ichikawa, Mie; Freeze, Hudson H. (2014): Mannose metabolism: more than meets the eye. In: *Biochemical and biophysical research communications* 453 (2), S. 220–228.
- Sibbritt, D. W.; Catling, C. J.; Adams, J.; Shaw, A. J.; Homer, C. S. (2014): The Self-Prescribed Use of Aromatherapy Oils by Pregnant Women. In: *Women and birth : journal of the Australian College of Midwives* 27 (1), S. 41–45.
- Sihra, Néha; Goodman, Anna; Zakri, Rhana; Sahai, Arun; Malde, Sachin (2018): Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. In: *Nature reviews. Urology* 15 (12), S. 750–776.
- Sikkema, Jan; De Bont, Jan A.M.; Poolman, Bert (1995): Mechanisms of Membrane Toxicity of Hydrocarbons. In: *Microbiological Reviews* 59 (2), S. 201–222.
- Silva, G. L.; Luft, C.; Lunardelli, A.; Amaral, R. H.; Melo, D. A.; Donadio, M. V. et al. (2015): Antioxidant, analgesic and anti-inflammatory effects of lavender essential oil. In: *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 87 (2 Suppl), S. 1397–1408.
- Skalicka-Woźniak, K.; Walasek, M.; Aljarba, T. M.; Stapleton, P.; Gibbons, S.; Xiao, J.; Łuszczki, J. J. (2018): The anticonvulsant and anti-plasmid conjugation potential of *Thymus vulgaris* chemistry: An in vivo murine and in vitro study. In: *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* 120, S. 472–478.
- Smit, H. A.; Burdorf, A.; Coenraads, P. J. (1993): Prevalence of hand dermatitis in different occupations. In: *International journal of epidemiology* 22 (2), S. 288–293.
- Söderberg, T. A.; Johansson, A.; Gref, R. (1996): Toxic effects of some conifer resin acids and tea tree oil on human epithelial and fibroblast cells. In: *Toxicology* 107 (2), S. 99–109.
- Stefflitsch, Wolfgang; Wolz, Dietmar; Buchbauer, Gerhard (Hg.) (2013): Aromatherapie in Wissenschaft und Praxis. 1. Aufl. Wiggensbach: Stadelmann Verlag.

- Stickler DJ, Morris NS & Winters C. (1999): Simple physical model to study formation and physiology of biofilms on urethral catheters. In: *Methods Enzymol* 310, S. 494–501.
- Subashchandrabose, Sargurunathan; Mobley, Harry L. T. (2015): Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic Escherichia coli. In: *Microbiology spectrum* 3 (4).
- Tegos, G.; Stermitz, F. R.; Lomovskaya, O.; Lewis, K. (2002): Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy* 46 (10), S. 3133–3141.
- Terlizzi, Maria E.; Gribaudo, Giorgio; Maffei, Massimo E. (2017): UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. In: *Frontiers in microbiology* 8, S. 1–23.
- Thomas, W. E.; Nilsson, L. M.; Forero, M.; Sokurenko, E. V.; Vogel, V. (2004): Shear-dependent 'stick-and-roll' adhesion of type 1 fimbriated Escherichia coli. In: *Molecular microbiology* 53 (5).
- Thompson Healthcare Inc. (Hg.) (2000): PDR for herbal medicines. 2., rev. ed. Montvale, N.J.: Medical Economics Co, zuletzt geprüft am 15.12.2022.
- Trumpower, Bernard L.; Gennis, Robert B. (1994): Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. In: *Annual review of biochemistry* 63, S. 675–716.
- W. Jäger; G. Buchbauer; L. Jirovetz; M. Fritzer (1992): Percutaneous absorption of lavender oil from a massage oil. In: *Medicine Journal of the society of cosmetic chemists* (43), S. 49–54.
- Wagenlehner, F. M.; Pilatz, A.; Weidner, W. (2011): Urosepsis--from the view of the urologist. In: *International journal of antimicrobial agents* 38 Suppl, S. 51–57.
- Wagenlehner, Florian M.; Abramov-Sommariva, Dimitri; Höller, Martina; Steindl, Hubert; Naber, Kurt G. (2018): 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. In: *UIN* 101 (3), S. 327–336.
- Waranya Boonchai; Pacharee Iamtharachai; Patcharee Sunthonpalin (2007): Occupational allergic contact dermatitis from essential oils in aromatherapists. In: *Contact dermatitis* 56 (3), S. 181–182.
- Wiles, Travis J.; Kulesus, Richard R.; Mulvey, Matthew A. (2008): Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. In: *Experimental and molecular pathology* 85 (1), S. 1–20.
- World Health Organization (2018): Central Asian and Eastern European Surveillance of Antimicrobial Resistance. Annual report 2018.

Wu, Xue-Ru; Kong, Xiang-Peng; Pellicer, Angel; Kreibich, Gert; Sun, Tung-Tien (2009): Uroplakins in urothelial biology, function, and disease. In: *Kidney international* 75 (11), S. 1153–1165.

Xiao, S.; Cui, P.; Shi, W.; Zhang, Y. (2019): Identification of essential oils with strong activity against stationary phase uropathogenic *Escherichia coli*. In: *Discovery medicine* 28 (154), S. 179–188. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31926578/>.

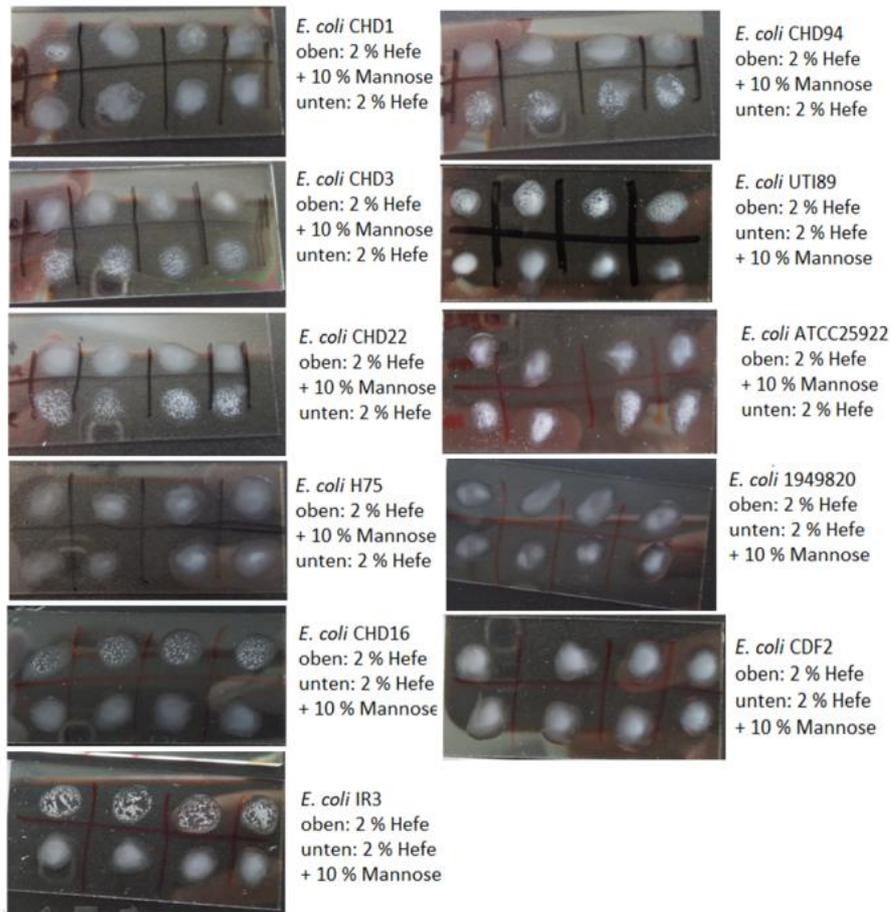
Zacher, Benedikt; Haller, Sebastian; Willrich, Niklas; Walter, Jan; Abu Sin, Muna; Cassini, Alessandro et al. (2019): Application of a new methodology and R package reveals a high burden of healthcare-associated infections (HAI) in Germany compared to the average in the European Union/European Economic Area, 2011 to 2012. In: *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin* 24 (46), S. 1–11.

Zalewska-Piątek, Beata Maria; Piątek, Rafał Janusz (2019): Alternative treatment approaches of urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* strains. In: *Acta biochimica Polonica* 66 (2), S. 129–138.

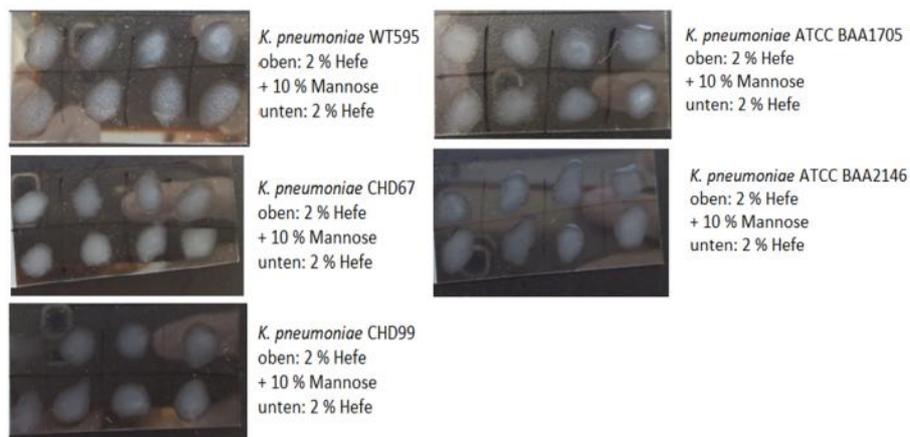
Zhang, Wen; Wang, Chenyin; Tam, Kin Y. (2014): Predicting the minimal inhibitory concentration of fluoroquinolones for *Escherichia coli* using an accumulation model. In: *Bio-medical materials and engineering* 24 (6), S. 3745–3751.

Zhang, Y.; Feng, R.; Li, L.; Zhou, X.; Li, Z.; Jia, R. et al. (2018): The Antibacterial Mechanism of Terpinen-4-ol Against *Streptococcus agalactiae*. In: *Current microbiology* 75 (9), S. 1–7.

## 9 Anhang



**Abbildung 11: Exemplarische Ergebnisse des Hefeagglutinationsassays der verwendeten *E. coli* Stämme. Die Übernacht statisch gewachsenen Bakterien ( $\sim 1 \times 10^9$  KBE/mL) wurden mit einer 2%igen Hefelösung mit/ohne 10% D-Mannose gemischt und für 10 min bei RT inkubiert.**



**Abbildung 12: Exemplarische Ergebnisse des Hefeagglutinationsassays der verwendeten *K. pneumoniae* Stämme; Übernacht statisch gewachsene Bakterien ( $\sim 1 \times 10^9$  KBE/mL)**

wurden mit einer 2%igen Hefelösung mit/ohne 10% D-Mannose gemischt und für 10 min bei RT inkubiert.

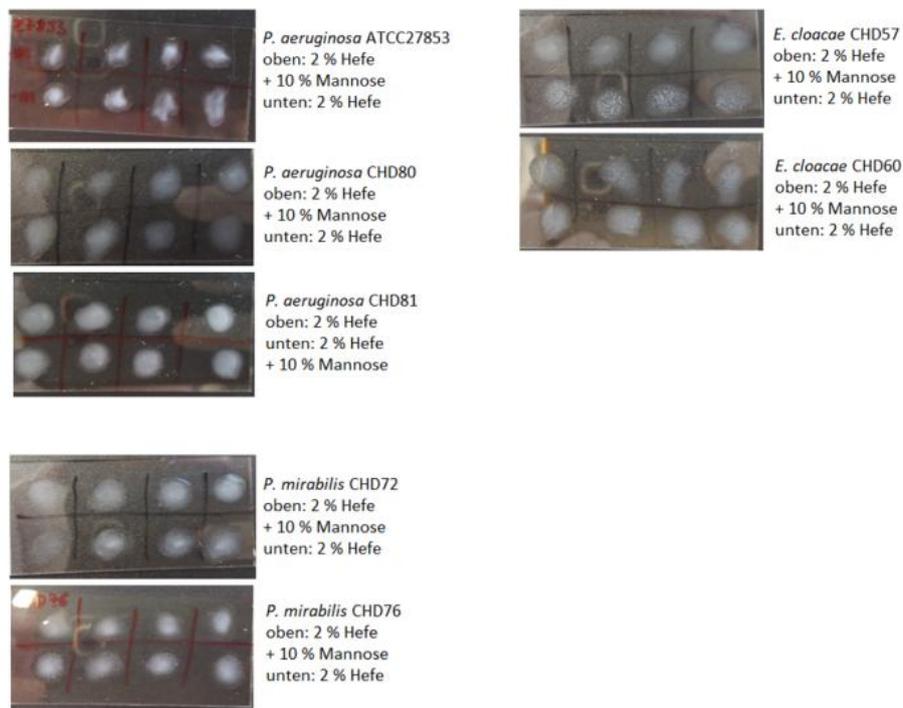


Abbildung 13: Exemplarische Ergebnisse des Hefeagglutinationsassays der übrigen verwendeten gram-negativen Stämme *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* und *E. cloacae*; Übernacht statisch gewachsene Bakterien ( $\sim 1 \times 10^9$  KBE/mL) wurden mit einer 2%igen Hefelösung mit/ohne 10% D-Mannose gemischt und für 10 min bei RT inkubiert.

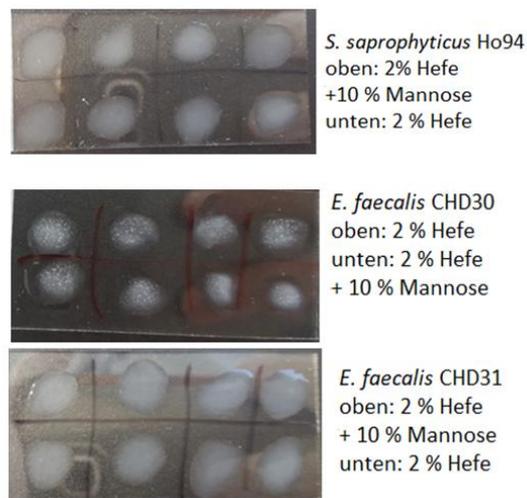
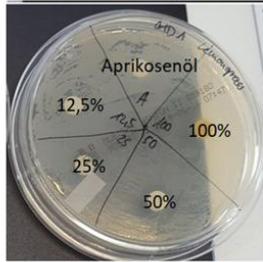
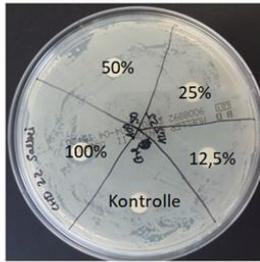


Abbildung 14: Exemplarische Ergebnisse des Hefeagglutinationsassays der verwendeten gram-positiven Stämme *E. faecalis* und *S. saprophyticus*; Übernacht statisch gewachsene Bakterien ( $\sim 1 \times 10^9$  KBE/mL) wurden mit einer 2%igen Hefelösung mit/ohne 10% D-Mannose gemischt und für 10 min bei RT inkubiert.

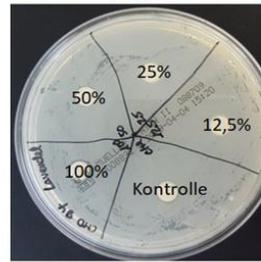
*E. coli* CHD1 mit ätherischem Lemongrassöl und Aprikosenöl



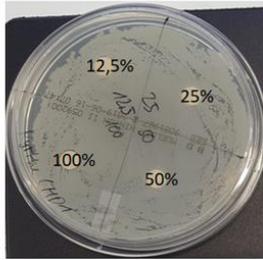
*E. coli* CHD22 mit ätherischem Salbeiöl, Rapsöl als Kontrolle



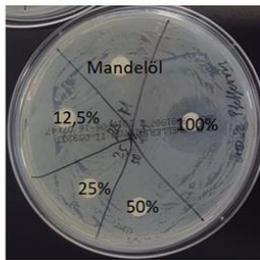
*E. coli* CHD94 mit ätherischem Lavendelöl, Rapsöl als Kontrolle



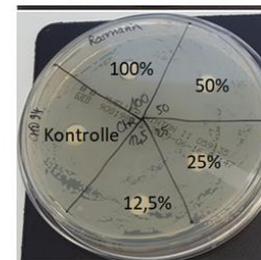
*E. coli* CHD1 mit ätherischem Myrtheöl



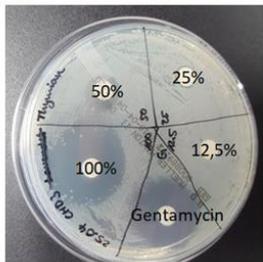
*E. coli* CHD22 mit ätherischem Pfefferminzöl und Mandelöl



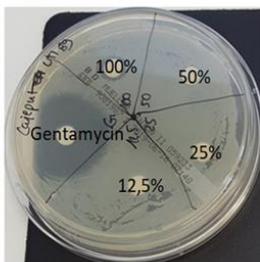
*E. coli* CHD94 mit ätherischem Rosmarinöl, Rapsöl als Kontrolle



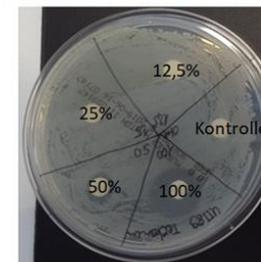
*E. coli* CHD3 mit ätherischem Thymianöl und Gentamycin



*E. coli* UT189 mit ätherischem Cajeputöl und Gentamycin



*E. coli* UT189 mit ätherischem Teebaumöl, Rapsöl als Kontrolle



**Abbildung 15:** Im Agardiffusionsassay wurde die antimikrobielle Aktivität ätherischer Öle gegenüber den *E. coli* Stämmen CHD1, CHD3, CHD22, CHD94 und UT189 gemessen. Nach Auftragung der Bakterien auf die Agarplatte wurden Filterpapierplättchen aufgelegt und mit dem bestimmten Öl betropft. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C konnte am folgenden Tag der Hemmhof um das Filterpapierplättchen ausgemessen werden.



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

Cajeputöl extra Wildsammlung /

Cajeput oil extra wild harvesting

### Allgemeine Angaben / General information

Produktname Product name	Cajeputöl extra, Wildsammlung Cajeput oil extra, wild harvesting
Herkunftsland Country of origin	Kambodscha Cambodia
Artikel-Nr. Article-No.	A 0220
Chargen-Nr. Batch-No.	00284C27
Herstellung Production	Gewinnung des ätherischen Öls durch Wasserdampfdestillation der Blätter und Zweigspitzen von Melaleuca leucadendron L. var. Cajaputi; 100 % naturrein. Essential oil obtained by steam distillation of the leaves and tops of Melaleuca leucadendron L. var. cajaputi; 100 % pure.
Anbau Cultivation	Wildsammlung wild harvesting
INCI	Melaleuca Leucadendron Cajaputi Oil
CAS-Nr.	85480-37-1
EINECS-Nr.	287-316-4
Lagerungsbedingungen Storage information	Kühl, trocken, vor Licht geschützt und dicht verschlossen lagern. Keep cool, dry, protected from light and container tightly closed.

### Untersuchungsparameter / Test parameters

Untersuchungszeitraum start / end date of analysis	28.09.2018 – 25.10.2018
---	-------------------------

Parameter Parameter	Methode Method	Spezifikation Specification	Ergebnis Result
Aussehen Appearance	organoleptisch organoleptic	farblos-gelb colourless-yellow	entspricht conform
Geruch Odour	organoleptisch organoleptic	charakteristisch characteristic	entspricht conform
Dichte (20°C) in g/cm <sup>3</sup> Density (20°C) in g/cm <sup>3</sup>	nach / according to DIN EN ISO 15212-1	0,890 – 0,930	0.914
Peroxidzahl in meq O <sub>2</sub> /kg Peroxide value in meq O <sub>2</sub> /kg	nach / according to DGF-C-VI 6a	< 20,00	11.06



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

Cajeputöl extra Wildsammlung /

Cajeput oil extra wild harvesting

### Chromatographische Analysebedingungen / Chromatographic analysis conditions

Analysegerät Instrument	Perkin Elmer Clarus 500 GC / FID / MS
Säule Column	5% Diphenyl + 95% Dimethylpolysiloxan

### Chromatographisches Profil / Chromatographic profile

Komponenten / Components	%
a-Pinene	1.76
Benzaldehyd	0.13
b-Pinene	1.27
b-Myrcene	1.23
a-Terpinene	0.23
p-Cymene	0.37
<b>Limonen*</b>	<b>5.26</b>
1,8-Cineol	64.13
g-Terpinene	0.74
<b>Linalool*</b>	<b>2.69</b>
d-Terpineol	0.24
Terpinen-4-ol	0.78
a-Terpineol	11.43
<b>Geraniol*</b>	<b>0.26</b>
<b>Eugenol*</b>	<b>0.04</b>
a-Ylangene	0.18
b-Caryophyllene	1.21
a-Humulene	0.8
b-Selinene	1.29
a-Selinene	0.88
a-Guaiol	0.66
b-Eudesmol	0.46

\* nach Kosmetikrichtlinie Nr. 1223/2009 zu kennzeichnende allergene Riechstoffe/  
labelling of sensitizer according to the Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

### Cajeputöl extra Wildsammlung / Cajeput oil extra wild harvesting

#### Bestätigung / Confirmation

In Übereinstimmung mit der VERORDNUNG (EG) Nr. 1223/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 30.11.2009 über kosmetische Produkte bestätigen wir für dieses Öl:

- keinen Einsatz von Substanzen, die gemäß Teil 3 des Anhangs VI der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 als CMR-Stoffe (karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch) der Kategorie 1A oder 1B oder 2 eingestuft sind
- keine Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)
- es ist pflanzlichen Ursprungs und enthält keine tierischen Bestandteile (deshalb keine Gefahr durch BSE/TSE)
- keine Durchführung von Tierversuchen gemäß Artikel 18

According to the REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30.11.2009 for cosmetic products we confirm for this oil:

- no use of substances classified as carcinogens, mutagens and substances toxic to reproduction [CMR's] of the category 1A or 1B or 2 in part 3 of annex VI of REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16.12.2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006
- no use of genetically modified organism (GMO)
- it is plant-derived and does not contain any animal-derived materials (therefor no risk of BSE/TSE)
- no animal-testing according to article 18

Dieses Dokument ist ohne Unterschrift gültig  
This document is valid without signature

Oy-Mittelberg, 16.10.2019



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

Cajeputöl extra Wildsammlung /

Cajeput oil extra wild harvesting

### Allgemeine Angaben / General information

Produktname Product name	Cajeputöl extra, Wildsammlung Cajeput oil extra, wild harvesting
Herkunftsland Country of origin	Kambodscha Cambodia
Artikel-Nr. Article-No.	A 0220
Chargen-Nr. Batch-No.	00012A27
Herstellung Production	Gewinnung des ätherischen Öls durch Wasserdampfdestillation der Blätter und Zweigspitzen von Melaleuca leucadendron L. var. Cajaputi; 100 % naturrein. Essential oil obtained by steam distillation of the leaves and tops of Melaleuca leucadendron L. var. cajaputi; 100 % pure.
Anbau Cultivation	Wildsammlung wild harvesting
INCI	Melaleuca Leucadendron Cajaputi Oil
CAS-Nr.	85480-37-1
EINECS-Nr.	287-316-4
Lagerungsbedingungen Storage information	Kühl, trocken, vor Licht geschützt und dicht verschlossen lagern. Keep cool, dry, protected from light and container tightly closed.

### Untersuchungsparameter / Test parameters

Untersuchungszeitraum start / end date of analysis	28.09.2018 – 25.10.2018
---	-------------------------

Parameter Parameter	Methode Method	Spezifikation Specification	Ergebnis Result
Aussehen Appearance	organoleptisch organoleptic	farblos-gelb colourless-yellow	entspricht conform
Geruch Odour	organoleptisch organoleptic	charakteristisch characteristic	entspricht conform
Dichte [20°C] in g/cm <sup>3</sup> Density [20°C] in g/cm <sup>3</sup>	nach / according to DIN EN ISO 15212-1	0,890 – 0,930	0.914
Peroxidzahl in meq O <sub>2</sub> /kg Peroxide value in meq O <sub>2</sub> /kg	nach / according to DGF-C-VI 6a	< 20,00	11.06



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

Cajeputöl extra Wildsammlung /

Cajeput oil extra wild harvesting

### Chromatographische Analysebedingungen / Chromatographic analysis conditions

Analysegerät Instrument	Perkin Elmer Clarus 500 GC / FID / MS
Säule Column	5% Diphenyl + 95% Dimethylpolysiloxan

### Chromatographisches Profil / Chromatographic profile

Komponenten / Components	%
a-Pinene	1.76
Benzaldehyd	0.13
b-Pinene	1.27
b-Myrcene	1.23
a-Terpinene	0.23
p-Cymene	0.37
<b>Limonen*</b>	<b>5.26</b>
1,8-Cineol	64.13
g-Terpinene	0.74
<b>Linalool*</b>	<b>2.69</b>
d-Terpineol	0.24
Terpinen-4-ol	0.78
a-Terpineol	11.43
<b>Geraniol*</b>	<b>0.26</b>
<b>Eugenol*</b>	<b>0.04</b>
a-Ylangene	0.18
b-Caryophyllene	1.21
a-Humulene	0.8
b-Selinene	1.29
a-Selinene	0.88
a-Guaiol	0.66
b-Eudesmol	0.46

\* nach Kosmetikrichtlinie Nr. 1223/2009 zu kennzeichnende allergene Riechstoffe/  
labelling of sensitizer according to the Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

Cajeputöl extra Wildsammlung /

Cajeput oil extra wild harvesting

### Bestätigung / Confirmation

In Übereinstimmung mit der VERORDNUNG (EG) Nr. 1223/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 30.11.2009 über kosmetische Produkte bestätigen wir für dieses Öl:

- keinen Einsatz von Substanzen, die gemäß Teil 3 des Anhangs VI der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 als CMR-Stoffe (karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch) der Kategorie 1A oder 1B oder 2 eingestuft sind
- keine Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)
- es ist pflanzlichen Ursprungs und enthält keine tierischen Bestandteile (deshalb keine Gefahr durch BSE/TSE)
- keine Durchführung von Tierversuchen gemäß Artikel 18

According to the REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30.11.2009 for cosmetic products we confirm for this oil:

- no use of substances classified as carcinogens, mutagens and substances toxic to reproduction [CMR's] of the category 1A or 1B or 2 in part 3 of annex VI of REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16.12.2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006
- no use of genetically modified organism (GMO)
- it is plant-derived and does not contain any animal-derived materials (therefor no risk of BSE/TSE)
- no animal-testing according to article 18

Dieses Dokument ist ohne Unterschrift gültig  
This document is valid without signature

Oy-Mittelberg, 20.03.2019



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

### Lemongrassöl\* bio / Lemongrass oil\* org

#### Allgemeine Angaben / General information

Produktname Product name	Lemongrassöl* bio Lemongrass oil* org
Herkunftsland Country of origin	Nepal
Artikel-Nr. Article-No.	A 0981
Chargen-Nr. Batch-No.	00536M26
Herstellung Production	Gewinnung des ätherischen Öls durch Wasserdampfdestillation der frisch geschnittenen und leicht getrockneten Gräser von <i>Cymbopogon flexuosus</i> ; 100 % naturrein. Essential oil obtained by steam distillation of the freshly cut and slightly dried grass of <i>Cymbopogon flexuosus</i> ; 100 % pure.
Anbau Cultivation	* = kontrolliert biologischer Anbau * = organic cultivation
INCI	Cymbopogon Flexuosus Oil
CAS-Nr.	91844-92-7
EINECS-Nr.	295-161-9
Lagerungsbedingungen Storage information	Kühl, trocken, vor Licht geschützt und dicht verschlossen lagern. Keep cool, dry, protected from light and container tightly closed.

#### Untersuchungsparameter / Test parameters

Untersuchungszeitraum start / end date of analysis	30.08.2018 – 04.09.2018
---	-------------------------

Parameter Parameter	Methode Method	Spezifikation Specification	Ergebnis Result
Aussehen Appearance	organoleptisch organoleptic	gelb yellow	entspricht conform
Geruch Odour	organoleptisch organoleptic	charakteristisch characteristic	entspricht conform
Dichte (20°C) in g/cm <sup>3</sup> Density (20°C) in g/cm <sup>3</sup>	nach / according to DIN EN ISO 15212-1	0,880 – 0,910	0,889



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

Lemongrassöl\* bio / Lemongrass oil\* org

### Chromatographische Analysebedingungen / Chromatographic analysis conditions

Analysegerät Instrument	Perkin Elmer Clarus 500 GC / FID / MS
Säule Column	5% Diphenyl + 95% Dimethylpolysiloxan

### Chromatographisches Profil / Chromatographic profile

Komponenten / Components	%
Camphene	2,71
6-Methyl-5-heptene-2-one	1,46
Limonene* + c-b-Ocimene	0,93
4-Nonanone	1,37
<b>Linalool*</b>	<b>1,19</b>
exo-Isocitral	0,66
Citronellal	0,48
Photocitral A	n.n.
Isoneral	1,80
Isogeranial	2,81
1-Decanal	0,24
<b>Citronellol* + Nerol</b>	<b>0,22</b>
<b>Neral*</b>	<b>33,88</b>
<b>Geraniol*</b>	<b>0,83</b>
<b>Geranial*</b>	<b>43,38</b>
<b>Eugenol* + a-Cubebene</b>	<b>0,04</b>
Geranyl acetate	0,20
b-Caryophyllene	0,66
<b>t-Isoeugenol*</b>	<b>0,13</b>
g-Cadinene	1,26
d-Cadinene	0,31
Caryophyllene oxide	0,46

\* nach Kosmetikrichtlinie Nr. 1223/2009 zu kennzeichnende allergene Riechstoffe/  
labelling of sensitizer according to the Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

Lemongrassöl\* bio / Lemongrass oil\* org

### Bestätigung / Confirmation

In Übereinstimmung mit der VERORDNUNG (EG) Nr. 1223/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 30.11.2009 über kosmetische Produkte bestätigen wir für dieses Öl:

- keinen Einsatz von Substanzen, die gemäß Teil 3 des Anhangs VI der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 als CMR-Stoffe (karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch) der Kategorie 1A oder 1B oder 2 eingestuft sind
- keine Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)
- es ist pflanzlichen Ursprungs und enthält keine tierischen Bestandteile (deshalb keine Gefahr durch BSE/TSE)
- keine Durchführung von Tierversuchen gemäß Artikel 18

According to the REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30.11.2009 for cosmetic products we confirm for this oil:

- no use of substances classified as carcinogens, mutagens and substances toxic to reproduction (CMR's) of the category 1A or 1B or 2 in part 3 of annex VI of REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16.12.2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006
- no use of genetically modified organism (GMO)
- it is plant-derived and does not contain any animal-derived materials (therefor no risk of BSE/TSE)
- no animal-testing according to article 18

Dieses Dokument ist ohne Unterschrift gültig  
This document is valid without signature

Oy-Mittelberg, 15.04.2019



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

### Lemongrassöl\* bio / Lemongrass oil\* org

#### Allgemeine Angaben / General information

Produktname Product name	Lemongrassöl* bio Lemongrass oil* org
Herkunftsland Country of origin	Nepal
Artikel-Nr. Article-No.	A 0981
Chargen-Nr. Batch-No.	00290E27
Herstellung Production	Gewinnung des ätherischen Öls durch Wasserdampfdestillation der frisch geschnittenen und leicht getrockneten Gräser von Cymbopogon flexuosus; 100 % naturrein. Essential oil obtained by steam distillation of the freshly cut and slightly dried grass of Cymbopogon flexuosus; 100 % pure.
Anbau Cultivation	* = kontrolliert biologischer Anbau * = organic cultivation
INCI	Cymbopogon Flexuosus Oil
CAS-Nr.	91844-92-7
EINECS-Nr.	295-161-9
Lagerungsbedingungen Storage information	Kühl, trocken, vor Licht geschützt und dicht verschlossen lagern. Keep cool, dry, protected from light and container tightly closed.

#### Untersuchungsparameter / Test parameters

Untersuchungszeitraum start / end date of analysis	05.10.2018 – 26.10.2018
---	-------------------------

Parameter Parameter	Methode Method	Spezifikation Specification	Ergebnis Result
Aussehen Appearance	organoleptisch organoleptic	gelb yellow	entspricht conform
Geruch Odour	organoleptisch organoleptic	charakteristisch characteristic	entspricht conform
Dichte (20°C) in g/cm <sup>3</sup> Density (20°C) in g/cm <sup>3</sup>	nach / according to DIN EN ISO 15212-1	0.880 – 0.910	0.889
Peroxidzahl in meq O <sub>2</sub> /kg Peroxide value in meq O <sub>2</sub> /kg	nach / according to DGF-C-VI 6a	< 20,00	6.00



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

### Lemongrassöl\* bio / Lemongrass oil\* org

#### Chromatographische Analysebedingungen / Chromatographic analysis conditions

Analysegerät Instrument	Perkin Elmer Clarus 500 GC / FID / MS
Säule Column	5% Diphenyl + 95% Dimethylpolysiloxan

#### Chromatographisches Profil / Chromatographic profile

Komponenten / Components	%
Camphene	1.12
6-Methyl-5-heptene-2-one	2.95
Limonene*	1.67
c-b-Ocimene	0.6
<b>Linalool*</b>	<b>1.39</b>
exo-Isocitral	0.44
Citronellal	0.54
Photocitral A	0.34
Isoneral	1.13
Isogeranial	1.86
1-Decanal	0.15
<b>Citronellol*</b>	<b>0.39</b>
Nerol	0.2
<b>Neral*</b>	<b>28.49</b>
<b>Geraniol*</b>	<b>7.82</b>
<b>Geranial*</b>	<b>36.45</b>
Geranyl acetate	4.03
b-Caryophyllene	1.85
<b>c-Isoeugenol*</b>	<b>0.14</b>
g-Cadinene	1.08
d-Cadinene	0.27
Caryophyllene oxide	0.51

\* nach Kosmetikrichtlinie Nr. 1223/2009 zu kennzeichnende allergene Riechstoffe/  
labelling of sensitizer according to the Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS

### Lemongrassöl\* bio / Lemongrass oil\* org

#### Bestätigung / Confirmation

In Übereinstimmung mit der VERORDNUNG (EG) Nr. 1223/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 30.11.2009 über kosmetische Produkte bestätigen wir für dieses Öl:

- keinen Einsatz von Substanzen, die gemäß Teil 3 des Anhangs VI der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 als CMR-Stoffe (karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch) der Kategorie 1A oder 1B oder 2 eingestuft sind
- keine Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)
- es ist pflanzlichen Ursprungs und enthält keine tierischen Bestandteile (deshalb keine Gefahr durch BSE/TSE)
- keine Durchführung von Tierversuchen gemäß Artikel 18

According to the REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30.11.2009 for cosmetic products we confirm for this oil:

- no use of substances classified as carcinogens, mutagens and substances toxic to reproduction [CMR's] of the category 1A or 1B or 2 in part 3 of annex VI of REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16.12.2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006
- no use of genetically modified organism (GMO)
- it is plant-derived and does not contain any animal-derived materials (therefor no risk of BSE/TSE)
- no animal-testing according to article 18

Dieses Dokument ist ohne Unterschrift gültig  
This document is valid without signature

Oy-Mittelberg, 04.11.2019



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS Teebaumöl bio / Tea tree oil org.

### Allgemeine Angaben / General information

Produktname Product name	Teebaumöl bio Tea tree oil org.
Herkunftsland Country of origin	Australien Australia
Artikel-Nr. Article-No.	A 1901
Chargen-Nr. Batch-No.	00040D27
Herstellung Production	Gewinnung des ätherischen Öls durch Wasserdampfdestillation der Blätter von Melaleuca alternifolia; 100 % naturrein. Essential oil obtained by steam distillation of the leaves of Melaleuca alternifolia; 100 % pure.
Anbau Cultivation	kontrolliert biologischer Anbau organic cultivation
INCI	Melaleuca Alternifolia Leaf Oil
CAS-Nr.	85085-48-9 / 8022-72-8 / 68647-73-4
EINECS-Nr.	285-377-1 / - / -
Lagerungsbedingungen Storage information	Kühl, trocken, vor Licht geschützt und dicht verschlossen lagern. Keep cool, dry, protected from light and container tightly closed.

### Untersuchungsparameter / Test parameters

Untersuchungszeitraum start / end date of analysis	06.03.2019 – 12.03.2019
---	-------------------------

Parameter Parameter	Methode Method	Spezifikation Specification	Ergebnis Result
Aussehen Appearance	organoleptisch organoleptic	farblos colourless	entspricht conform
Geruch Odour	organoleptisch organoleptic	charakteristisch characteristic	entspricht conform
Dichte (20°C) in g/cm <sup>3</sup> Density (20°C) in g/cm <sup>3</sup>	nach / according to DIN EN ISO 15212-1	0.880 – 0.910	0.893
Peroxidzahl in meq O <sub>2</sub> /kg Peroxide value in meq O <sub>2</sub> /kg	nach / according to DGF-C-VI 6a	< 20.00	9.3



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS Teebaumöl bio / Tea tree oil org.

### Chromatographische Analysebedingungen / Chromatographic analysis conditions

Analysegerät Instrument	Perkin Elmer Clarus 500 GC / FID / MS
Säule Column	5% Diphenyl + 95% Dimethylpolysiloxan

### Chromatographisches Profil / Chromatographic profile

Komponenten / Components	%
a-Thujene	0.91
a-Pinene	2.52
Sabinene	0.28
b-Pinene	0.71
b-Myrcene	0.84
a-Phellandrene	0.44
a-Terpinene	9.49
p-Cymene	2.63
<b>Limonene *</b>	<b>0.85</b>
b-Phellandrene	0.85
1,8-Cineol	2.08
g-Terpinene	20.26
Terpinolene	3.62
Linalool	0.06
c-p-Menth-2-en-1-ol	0.27
t-p-Menth-2-en-1-ol	0.20
Terpinene-4-ol	40.39
a-Terpineol	2.81
<b>Methyleugenol *</b>	<b>0.05</b>
t-b-Caryophyllene	0.42
Aromadendrene	1.33
Allo-Aromadendrene	0.55
Ledene + Bicyclogermacrene	0.79
d-Cadinene	1.18
Globulol	0.29

\* nach Kosmetikrichtlinie Nr. 1223/2009 zu kennzeichnende allergene Riechstoffe/  
labelling of sensitizer according to the Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS Teebaumöl\* bio / Tea tree oil\* org

### Bestätigung / Confirmation

In Übereinstimmung mit der VERORDNUNG (EG) Nr. 1223/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 30.11.2009 über kosmetische Produkte bestätigen wir für dieses Öl:

- keinen Einsatz von Substanzen, die gemäß Teil 3 des Anhangs VI der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 als CMR-Stoffe (karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch) der Kategorie 1A oder 1B oder 2 eingestuft sind
- keine Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)
- es ist pflanzlichen Ursprungs und enthält keine tierischen Bestandteile (deshalb keine Gefahr durch BSE/TSE)
- keine Durchführung von Tierversuchen gemäß Artikel 18

According to the REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30.11.2009 for cosmetic products we confirm for this oil:

- no use of substances classified as carcinogens, mutagens and substances toxic to reproduction [CMR's] of the category 1A or 1B or 2 in part 3 of annex VI of REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16.12.2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006
- no use of genetically modified organism (GMO)
- it is plant-derived and does not contain any animal-derived materials (therefor no risk of BSE/TSE)
- no animal-testing according to article 18

Dieses Dokument ist ohne Unterschrift gültig  
This document is valid without signature

Oy-Mittelberg, 10.10.2019



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS Thymianöl Linalool\* bio / Thyme oil linalool\* org

### Allgemeine Angaben / General information

Produktname Product name	Thymianöl Linalool* bio Thyme oil linalool* org
Herkunftsland Country of origin	Spanien Spain
Artikel-Nr. Article-No.	A 2280
Chargen-Nr. Batch-No.	00146J26
Herstellung Production	Gewinnung des ätherischen Öls durch Wasserdampfdestillation des blühenden Krautes von <i>Thymus vulgaris</i> c.t. linalool; 100 % naturrein. Essential oil obtained by steam distillation of the blooming herbs from <i>Thymus vulgaris</i> c.t. linalool; 100 % pure.
Anbau Cultivation	* = kontrolliert biologischer Anbau * = organic cultivation
INCI	<i>Thymus vulgaris</i> oil
CAS-Nr.	84929-51-1
EINECS-Nr.	284-535-7
Lagerungsbedingungen Storage information	Kühl, trocken, vor Licht geschützt und dicht verschlossen lagern. Keep cool, dry, protected from light and container tightly closed.

### Untersuchungsparameter / Test parameters

Untersuchungszeitraum start / end date of analysis	07.08.2018 – 04.09.2018
---	-------------------------

Parameter Parameter	Methode Method	Spezifikation Specification	Ergebnis Result
Aussehen Appearance	organoleptisch organoleptic	hellgelb pale yellow	entspricht conform
Geruch Odour	organoleptisch organoleptic	charakteristisch characteristic	entspricht conform
Dichte [20°C] in g/cm <sup>3</sup> Density [20°C] in g/cm <sup>3</sup>	nach / according to DIN EN ISO 15212-1	0,860 – 0,890	0,867



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS Thymianöl Linalool\* bio / Thyme oil linalool\* org

### Chromatographische Analysebedingungen / Chromatographic analysis conditions

Analysegerät Instrument	Perkin Elmer Clarus 500 GC / FID / MS
Säule Column	5% Diphenyl + 95% Dimethylpolysiloxan

### Chromatographisches Profil / Chromatographic profile

Komponenten / Components	%
laevo-b-Pinene	< 0,01
a-Pinene	3,53
Camphene	0,54
Sabinene + 1-Octen-3-ol	1,12
b-Pinene	0,66
b-Myrcene	8,86
a-Phellandrene	0,52
a-Terpinene	4,04
p-Cymene	3,67
<b>Limonene*</b>	<b>3,04</b>
b-Phellandrene	0,46
1,8-Cineol	0,56
g-Terpinene	6,87
c-Sabinene hydrate + c-Linalool oxide	1,18
Terpinolene + t-Linalool oxide	1,19
<b>Linalool*</b>	<b>44,56</b>
Hotrienol	1,44
c-p-Menth-2-en-1-ol	0,18
t-p-Menth-2-en-1-ol	0,18
Camphor	0,51
Borneol	1,61
Terpinene-4-ol	10,51
a-Terpineol	1,74
c-Dihydrocarvone	0,19
<b>Citronellol* + Nerol</b>	<b>&lt; 0,01</b>
Linalyl acetate	0,46
m-Thymol	0,83
b-Caryophyllene	0,61

\* nach Kosmetikrichtlinie Nr. 1223/2009 zu kennzeichnende allergene Riechstoffe/  
labelling of sensitizer according to the Regulation (EC) No 1223/2009 on cosmetic products



PRIMAVERA®

## ANALYSENZERTIFIKAT / CERTIFICATE of ANALYSIS Thymianöl Linalool\* bio / Thyme oil linalool\* org

### Bestätigung / Confirmation

In Übereinstimmung mit der VERORDNUNG (EG) Nr. 1223/2009 DES EUROPÄISCHEN PARLAMENTS UND DES RATES vom 30.11.2009 über kosmetische Produkte bestätigen wir für dieses Öl:

- keinen Einsatz von Substanzen, die gemäß Teil 3 des Anhangs VI der Verordnung (EG) Nr. 1272/2008 als CMR-Stoffe (karzinogen, mutagen, reproduktionstoxisch) der Kategorie 1A oder 1B oder 2 eingestuft sind
- keine Verwendung von gentechnisch veränderten Organismen (GVO)
- es ist pflanzlichen Ursprungs und enthält keine tierischen Bestandteile (deshalb keine Gefahr durch BSE/TSE)
- keine Durchführung von Tierversuchen gemäß Artikel 18

According to the REGULATION (EC) No 1223/2009 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 30.11.2009 for cosmetic products we confirm for this oil:

- no use of substances classified as carcinogens, mutagens and substances toxic to reproduction (CMR's) of the category 1A or 1B or 2 in part 3 of annex VI of REGULATION (EC) No 1272/2008 OF THE EUROPEAN PARLIAMENT AND OF THE COUNCIL of 16.12.2008 on classification, labelling and packaging of substances and mixtures, amending and repealing Directives 67/548/EEC and 1999/45/EC, and amending Regulation (EC) No 1907/2006
- no use of genetically modified organism (GMO)
- it is plant-derived and does not contain any animal-derived materials (therefor no risk of BSE/TSE)
- no animal-testing according to article 18

Dieses Dokument ist ohne Unterschrift gültig  
This document is valid without signature

Oy-Mittelberg, 05.11.2018

## 10 Publikationsverzeichnis

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Loose, Maria; Pilger, Emmelie; Wagenlehner, Florian (2020): Anti-Bacterial Effects of Essential Oils against Uropathogenic Bacteria. In: Antibiotics (Basel); 9 (6): 358.

## 11 Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. 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

## 12 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Florian Wagenlehner für die Bereitstellung des interessanten Themas und die Ermöglichung dieser Doktorarbeit. Als Doktorvater waren Sie jederzeit ansprechbar und haben mir wertvolles und konstruktives Feedback gegeben. Ein weiterer großer Dank gilt Frau Dr. Maria Loose für die exzellente Betreuung während der Arbeit. Von Dir durfte ich die Methoden lernen sowie wissenschaftliches Arbeiten und Denken. Auch die Anregungen im Laufe der Überarbeitung dieser Dissertation waren sehr wertvoll und lehrreich. Die Betreuung durch Dich war die Beste, die jemand haben kann.

Des Weiteren möchte ich mich bei David Dippel und dem Team der urologischen Andrologie für die gute Zusammenarbeit im Labor, die stetige Unterstützung sowie die Tipps & Tricks bedanken.

Ich bedanke mich bei meiner Familie, ihr habt mich geformt, begleitet und immer bedingungslos unterstützt. Vielen Dank an meine Eltern, für die finanzielle Unterstützung, die Studium und Promotion ermöglicht haben. Mit eurer Erziehung habt ihr mich weltoffen, mutig und selbstständig gemacht. Vielen Dank an meine liebenden Großeltern, ihr seid für mich ein Hafen und bietet Beratung erster Klasse.

Vielen Dank an meinen Ehemann Hani Sauermilch. Du bist jeden Tag da, immer, und liebst mich. Das ist wunderschön.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken. Pia Reeß und Lennard Mehkiffer, ihr wart meine Insel im Medizinstudium. Wer wäre ich nur ohne euch? Julian Mathes und Annika Klöpping meine Diskussionsgruppe über Gott und die Welt und meine 4 Mädchen Hanna Rössner, Jule vom Bruch, Helena Lüdecke und Lea Deichmann, ihr zeigt mir andere Teile der Welt ehrlich und echt. Und auch an viele weitere tolle Menschen, die ihr in meinem Leben seid und es bereichert.

