

Modifikation der Antibiotikaresistenzen klinisch relevanter pathogener  
Bakterienarten durch pflanzliche Naturstoffe

**Dissertation**

zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Sebastian Schmidt

Berlin 2018

Erstgutachter: Prof. Dr. Matthias F. Melzig

Zweitgutachter: Prof. Dr. Stefan Bereswill

Tag der Disputation: 25. März 2019

# Inhaltsverzeichnis

Danksagung.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
1 Einleitung.....	1
1.1 Antibiotika .....	1
1.1.1 Antibiotikaresistenzen in der Humanmedizin .....	1
1.1.2 Antibiotikaresistenzen in der Veterinärmedizin .....	4
1.2 Adjuvantien.....	6
1.2.1 Einteilung der Adjuvantien .....	6
1.2.2 Pflanzliche Adjuvantien.....	7
1.2.3 Pflanzliche Extrakte.....	8
1.2.4 Saponine .....	11
1.3 klinisch relevante pathogene Bakterienarten .....	16
1.3.1 Enterokokken.....	16
1.3.1.1 Antibiotische Therapie .....	20
1.3.1.1.1 Ampicillin bei Enterokokkeninfektionen .....	20
1.3.1.1.2 Vancomycin bei Enterokokkeninfektionen .....	22
1.3.1.1.3 Gentamicin bei Enterokokkeninfektionen .....	23
1.3.1.1.4 Imipenem bei Enterokokkeninfektionen.....	26
1.3.2 Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) .....	26
1.3.2.1 Antibiotische Therapie .....	27
1.3.2.1.1 Ampicillin bei Infektionen mit MRSA.....	27
1.3.2.1.2 Gentamicin bei Infektionen mit MRSA.....	27
1.3.2.1.3 Imipenem bei Infektionen mit MRSA.....	27

1.3.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	27
1.3.3.1	Antibiotische Therapie .....	30
1.3.3.1.1	Piperacillin bzw. Ampicillin bei Infektionen mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	30
1.3.3.1.2	Gentamicin bei Infektionen mit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	31
1.3.4	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	31
1.3.4.1	Antibiotische Therapie .....	32
1.4	Analyse der Antibiotikaempfindlichkeit .....	32
1.5	Zielsetzung .....	34
2	Methode .....	35
2.1	Herstellung der Trockenextrakte.....	35
2.2	Mikrodilutionsverfahren .....	35
2.3	Bestimmung der antibakteriellen Aktivität .....	36
2.4	Checkerboard-Verfahren .....	36
3	Materialien .....	38
3.1	Antibiotika .....	38
3.2	Saponine .....	38
3.3	Medien, weitere Chemikalien .....	39
3.4	Rohdrogen .....	39
3.5	Bakterien.....	40
3.6	Verbrauchsmaterialien .....	46
3.7	Geräte .....	46

4	Ergebnisse und Diskussion .....	48
4.1	Antibakterielle Wirkung der Pflanzenextrakte gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Enterococcus faecium</i> und <i>Staphylococcus aureus</i> .....	48
4.2	Enterokokken.....	51
4.2.1	Synergistisch wirkende Kombinationen von Ampicillin mit Naturstoffen gegen <i>Enterococcus faecium</i> .....	52
4.2.2	Synergistisch wirkende Kombinationen von Vancomycin mit Naturstoffen gegen <i>Enterococcus faecium</i> .....	63
4.2.3	Synergistisch wirkende Kombinationen von Gentamicin mit Naturstoffen gegen <i>Enterococcus faecium</i> .....	65
4.2.4	Synergistisch wirkende Kombinationen von Imipenem mit Naturstoffen gegen <i>Enterococcus faecium</i> .....	78
4.3	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) .....	79
4.3.1	Synergistisch wirkende Kombinationen von Ampicillin mit Naturstoffen gegen MRSA.....	80
4.3.2	Synergistisch wirkende Kombinationen von Gentamicin mit Naturstoffen gegen MRSA.....	81
4.3.3	Synergistisch wirkende Kombinationen von Imipnem mit Naturstoffen gegen MRSA.....	82
4.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	83
4.4.1	Synergistisch wirkende Kombinationen von Ampicillin bzw. Piperacillin mit Naturstoffen gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	86
4.4.2	Synergistisch wirkende Kombinationen von Gentamicin mit Naturstoffen gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	88
4.4.3	Synergistisch wirkende Kombinationen von Vancomycin mit Naturstoffen gegen <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	89
4.5	<i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	91
5	Zusammenfassende Diskussion.....	92

6	Fazit .....	95
7	Literatur .....	97
8	Tabellenverzeichnis .....	116
9	Abbildungsverzeichnis .....	117
10	Zusammenfassung .....	120
11	Publikationsverzeichnis .....	122
12	Anhang.....	123
	12.1 Tabellen .....	123
	12.2 Abbildungen.....	127

## Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Melzig, Direktor des Instituts für Pharmazie an der Freien Universität Berlin, bedanke ich mich für die Übertragung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit diese Arbeit unter seiner Leitung durchzuführen. Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Bereswill, dem stellvertretenden Direktor des Instituts für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie an der Charité Universitätsmedizin Berlin, der als Zweitgutachter meine Promotion betreute.

Ihnen beiden danke ich herzlich für die hilfreichen Anregungen und die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Bei Herrn PD Dr. Heimesaat und allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Heimesaat/Bereswill am Institut für Mikrobiologie und Infektionsimmunologie an der Charité Universitätsmedizin Berlin bedanke ich mich nicht nur für die fachliche Unterstützung, sondern auch dafür, dass sie mir jederzeit Hilfe aller Art zuteil werden ließen.

Mein besonderer Dank für die finanzielle Unterstützung der Forschungsarbeit gilt den Firmen Saluvet und Wala und der Annelore und Prof. Pfeiffer Stiftung.

Für die Bereitstellung von Untersuchungsmaterialien danke ich der Arbeitsgemeinschaft unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Kiss am Department of Pharmacognosy and Molecular Basis of Phytotherapy der Medical University of Warsaw.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie, besonders bei meiner Freundin und meinen Kindern, für die Unterstützung und das Verständnis während der Promotion, sowie die Korrekturarbeiten bedanken.

## Abkürzungsverzeichnis

AME	Aminoglykoside modifizierende Enzyme
ARS	Antibiotika-Resistenz-Surveillance
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
ESBL	Extended-Spectrum- $\beta$ -Laktamasen
ESCMID	European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FICI	Fractional inhibitory concentration index
KBE	Kolonie bildende Einheiten
KPC	<i>Klebsiella-pneumoniae</i> -Carbapenemase
KRINKO	Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention
MBK	minimal bakterizide Konzentration
MHK	minimal hemmende Konzentration
MLST-ST	Multi Locus Sequenz Typisierung – Sequenz Typ
MMK	minimal modulierende Konzentration
MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i>
RKI	Robert Koch Institut
RND	Resistance-Nodulation-Division
TCM	traditionelle chinesische Medizin
VISA	Vancomycin-intermediate <i>Staphylococcus aureus</i>
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
WHO	World Health Organization

# 1 Einleitung

## 1.1 Antibiotika

### 1.1.1 Antibiotikaresistenzen

Einer der größten Fortschritte in der Medizin ist die Behandlung von Infektionen mit antimikrobiellen Substanzen, den Antibiotika, die heute neben der chemisch-synthetischen Herstellung meist aus Pilzen und Bakterien isoliert werden. Ihre Entdeckung begann um die Wende vom 19. zum 20. Jahrhundert und 1910 kam, u.a. durch Paul Ehrlich, mit Salvarsan das erste Antibiotikum als Medikament auf den Markt. Eingesetzt wurde das synthetische Arsphenamin gegen *Treponema pallidum*, den kurz zuvor entdeckten Erreger der Syphilis. Für Paul Ehrlich waren Antibiotika vor allem synthetisch hergestellte Substanzen. Er prägte den Begriff des Chemotherapeutikums, das nach seiner Rezeptortheorie eine große Affinität zu Strukturen des Erregers besaß, aber nur eine geringe zu denen des Wirtes (Brunner *et al.* 1966, Aktories *et al.* 2005). Die Therapie von Infektionskrankheiten wurde danach vor allem durch die Entdeckung der Sulfonamide und Penicilline in der Mitte des 20. Jahrhunderts revolutioniert. Durch weitere, später entwickelte Antibiotikagruppen wurde die Letalität von Infektionskrankheiten enorm reduziert. Alexander Flemming der 1928 das Penicillin in einer Kultur des Pilzes *Penicillium notatum* entdeckte, erkannte die Problematik von Antibiotikaresistenzen schon früh. Am Ende seiner Rede anlässlich der Verleihung des Nobelpreises für die Entdeckung des Penicillins 1945 warnte er: „There may be a danger, though, in underdosage. It is not difficult to make microbes resistant to penicillin in the laboratory by exposing them to concentrations not sufficient to kill them, and the same thing has occasionally happened in the body. The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant.“(Flemming 1945).

Die Entstehung von Antibiotikaresistenzen stellt einen natürlichen evolutionären Prozess dar. So war nicht überraschend, dass auf jede Einführung eines neuen Antibiotikums - in einem gewissen zeitlichen Abstand - Resistenzen auftraten (World Health Organization 2014). Ihren Ursprung haben diese Resistenzen meist in Bakterien der Bodenflora. Die Verbreitung erfolgt durch vertikalen Gentransfer über klonale Ausbreitung resistenter Stämme, aber auch durch den horizontalen Gentransfer auf vorher empfindliche Mikroorganismen durch Transformation, Transduktion und Transfektion. Im Rahmen der Koevolution mit Mikroorganismen, die in ihrem Stoffwechsel antibiotische Substanzen

produzieren, haben Antibiotika-sensitive Bakterien Strategien entwickelt, die sie selbst vor diesen Stoffen schützen. Aber auch andere Mikroorganismen des gleichen Ökosystems, die natürlicherweise resistent gegen antibiotische Substanzen sind, gehören zu dem Reservoir Antibiotika-resistenter Bakterien in der belebten Natur. Die molekularen Mechanismen, die Resistenzen gegenüber den Antibiotika vermitteln, können auf verschiedenen Veränderungen in den Mikroorganismen beruhen: 1) Sie können den Wirkort betreffen und dort z.B. die Bindungsaffinität der antibiotischen Substanz reduzieren; 2) Die Aufnahmebedingungen für Antibiotika in Zellen können sich ändern; 3) Es kann z.B. durch Effluxmechanismen, auch zum verstärkten Transport der Substanz aus der Zelle heraus kommen; oder 4) die Antibiotika können in der Zelle chemisch so modifiziert werden, dass die toxische Wirkung unterdrückt wird. Weiterhin ist – neben der Verminderung der Aufnahme durch die Zellmembranen - auch die Bildung von Enzymen möglich, welche durch die Ausbildung alternativer Stoffwechselwege die Wirkung des Antibiotikums aufheben (Witte 2008). Insbesondere diejenigen Bakterienspezies, die zu den sogenannte „ESKAPE“-Erregern gezählt werden (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* und Enterobacter-Spezies), lösen Besorgnis aus. Sie sind für einen großen Teil der weltweit verbreiteten Antibiotikaresistenzen verantwortlich und entziehen sich der antibiotischen Behandlung durch multiple Resistenzmechanismen (Basseti *et al.* 2003, Boucher *et al.* 2009). Erwähnt werden diese multiresistenten Gattungen und Arten auch auf der Liste der WHO für diejenigen 12 Erreger, die aufgrund ihrer Resistenzen als größte Gefährdung der Gesundheit gelten - und bei denen die Entwicklung neuer Therapiestrategien am dringendsten geboten ist (Abb. 1).

# WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics

## Priority 1: CRITICAL

- *Acinetobacter baumannii*, carbapenem-resistant
- *Pseudomonas aeruginosa*, carbapenem-resistant
- *Enterobacteriaceae*, carbapenem-resistant, ESBL-producing

## Priority 2: HIGH

- *Enterococcus faecium*, vancomycin-resistant
- *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant, vancomycin-intermediate and resistant
- *Helicobacter pylori*, clarithromycin-resistant
- *Campylobacter* spp., fluoroquinolone-resistant
- *Salmonellae*, fluoroquinolone-resistant
- *Neisseria gonorrhoeae*, cephalosporin-resistant, fluoroquinolone-resistant

## Priority 3: MEDIUM

- *Streptococcus pneumoniae*, penicillin-non-susceptible
- *Haemophilus influenzae*, ampicillin-resistant
- *Shigella* spp., fluoroquinolone-resistant

**Abb. 1:** WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics (World Health Organization 2017).

Die Ausbreitung der Antibiotikaresistenzen sind ursächlich auf den Selektionsdruck zurückzuführen, der durch den weitverbreiteten Gebrauch und Missbrauch der Antibiotika an Mensch und Tier entsteht. Die Folge ist, dass aktuell weltweit etwa die Hälfte der Infektionen, die im klinischen Umfeld erworben werden, durch multiresistente Erreger verursacht sind. Da die erfolgreiche Therapie dieser Erkrankungen dadurch erschwert wird, steigen Mortalität, Krankheitsdauer und damit die Kosten im gesamten Gesundheitswesen. Der Anstieg multipler Resistenz gegenüber Antibiotika nimmt auch Einfluss auf die Tiergesundheit - wodurch Folgen für die Lebensmittelproduktion entstehen (World Health Organization 2014). Diese Situation wird durch den Mangel an neuen Antibiotika weiter eskaliert. Bedingt ist dies zum Teil durch ökonomische Gründe, da der Preis von Antibiotika als gering eingeschätzt wird und die Anwendung nur kurze Zeiträume betrifft (Wright 2016).

### 1.1.2 Antibiotikaresistenzen in der Veterinärmedizin

Resistenzen gegenüber antimikrobiellen Therapien stellen nicht nur den humanmedizinischen Bereich vor neue Herausforderungen, auch in der Veterinärmedizin nimmt die Bedeutung dieser Problematik aktuell zu. Betroffen sind fast alle Formen der Tierhaltung, insbesondere der Bereich der Nutztierhaltung, darunter auch die Aquakultur, die für die Verbreitung Antibiotika-resistenter Bakterien von besonders großer Bedeutung ist. Aber auch die Haltung von Heimtieren oder die Haltung von Tieren zu sportlichen Zwecken stellen keine Ausnahmen dar. Die Verwendung von Antibiotika im Veterinärbereich dient verschiedenen Zwecken, einerseits zur Behandlung von Infektionskrankheiten, in der Nutztierhaltung sind dies vor allem Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes, der Atemwege, der Haut oder anderer innerer Organe - sowie Mastitiden. Ein wesentlicher Anteil des Antibiotikaverbrauches in der Nutztierhaltung entfällt jedoch auf den niedrigdosierten Einsatz zur Prävention von Infektionskrankheiten bedingt durch den intensiven Kontakt zwischen den Tieren aufgrund der hochintensiven Produktionsweise und zur Wachstumsbeschleunigung beziehungsweise besseren Futtermittelverwertung (Teuber 2001). Bewirkt wird diese durch eine Verschiebung im Mengenverhältnis der Bakterienpopulationen innerhalb der Darmflora des Nutztiers. Der Anteil derjenigen Bakterien, die den Phyla der Firmicutes angehören, steigt zu Lasten des Anteils der Bacteroidetes. Im Gegensatz zu den Vertretern der Bacteroidetes sind die Firmicutes in der Lage eigentlich nicht verdaubare Bestandteile des Futters, die Ballaststoffe, enzymatisch zu spalten und in resorbierbare Zucker und Fettsäuren umzuwandeln (Ley *et al.* 2006).

Bedenken bestehen in erster Linie hinsichtlich des niedrigdosierten und kontinuierlichen Gebrauchs von Antibiotika als Mastförderer. Er wird als eine wesentliche Ursache der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen auch im humanmedizinischen Bereich angesehen, da die meisten in der Tierhaltung eingesetzten Antibiotikaklassen auch beim Menschen Verwendung finden. Der am besten dokumentierte Zusammenhang zwischen dem Einsatz eines Antibiotikums in der Tiermast und der Verbreitung von Resistenzen betrifft das Glykopeptid Avopracin, welches seit Mitte der 1970er Jahre als Wachstumsbeschleuniger verwendet wird. Spätestens seit den frühen 1990er Jahren gilt die Kausalität zwischen dem Gebrauch von Avoparcin und dem Auftreten von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium* Stämmen (VRE) in der Tiermast als evident. Inzwischen werden Nutztiere als relevantes Reservoir für VRE-Infektionen beim Menschen angesehen. Übertragungswege der Resistenz gegenüber diesem, vor allem bei Enterokokkeninfektionen wichtigen Reserveantibiotikums, sind der direkte Kontakt zwischen Mensch und Tier in der Produktion, sowie der Konsum von tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln. Nachgewiesen wurden Vancomycin-resistente Enterokokken u.a. in Käse, Fleischprodukten und Salat. Das Auftreten auch in pflanzlichen Lebensmitteln ist vermutlich auf die Düngung mit belasteten Abwässern aus der Nutztierhaltung in der Agrarwirtschaft zurückzuführen.

Dem Beispiel einiger skandinavischer Länder folgend, wurde die Verwendung von Avopracin in der Tiermast im April 1997 in der gesamten europäischen Gemeinschaft untersagt. Nach diesem gesetzlichen Verbot folgte ein Rückgang des Vorkommens von Vancomycin-resistenten Enterokokken in der Nutztierhaltung. Dennoch zeigte sich eine sehr lange Persistenz von VRE in Betrieben in denen Avopracin eingesetzt wurde. Bedingt ist dieser Umstand vermutlich dadurch, dass durch die langwierige Verwendung des Antibiotikums ein Mangel an Glykopeptid-empfindlichen Enterokokken bestand die zur Rekolonisierung des Tierbestandes hätten dienen können. Auffällig war der relativ langsame Rückgang des Auftretens von VRE in der Schweinemast nach Verbot der Verwendung von Avopracin, vermutlich aufgrund der Plasmid-basierten Verknüpfung von Resistenzen gegenüber Glykopeptiden und Makroliden. Erst nachdem auch der Wachstumsförderer Tylosin vom Markt verschwand, sanken die VRE-Raten im vergleichbaren Ausmaß (Boerlin *et al.* 2013, Robredo *et al.* 2000, Teuber 2001).

Mit der Zunahme von Behandlungen in veterinärmedizinischen Kliniken nehmen auch die Probleme mit nosokomialen Infektionen durch multiresistenten bakteriellen Erregern zu. Dies betrifft vor allem Infektionen mit Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) bei Pferden. Die Ähnlichkeiten zum humanmedizinischen Bereich insbesondere in der Intensivmedizin sind auffallend. So steigt das Auftreten von Resistenzen mit der intensiven Verwendung von Antibiotika. Die Verwendung von im Körper verbleibenden Vorrichtungen und chirurgische Eingriffe stellen ein hohes Risiko für Folgeinfektionen dar und multiresistente Erreger sind wie im Krankenhaus auch in Veterinärkliniken weit verbreitet. Weitere multiresistente nosokomiale Erreger sind neben MRSA, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Salmonella enterica*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* und Enterokokken. Antibiotikaresistenzen im veterinärmedizinischen Bereich sind von besonderer Bedeutung, da der Einsatz von neu entwickelten Antibiotika nicht auf die Humanmedizin beschränkt bleiben wird und die Entwicklung von Antibiotika nur für den Veterinärbereich aus ökonomischen Gründen unwahrscheinlich erscheint. Somit wird das Spektrum der vorhandenen Antibiotika vermutlich nicht wesentlich erweitert werden, was hinsichtlich steigender Resistenzraten und dem Auftreten neuer Resistenzen bedenklich ist (Boerlin *et al.* 2013).

## 1.2 Adjuvantien

### 1.2.1 Einteilung der Adjuvantien

Lösungen für die eingangs geschilderte Resistenzproblematik in der Human- und Tiermedizin sind neben Maßnahmen, die vor der Infektionsentstehung schützen, die Entwicklung neuer antiinfektiver Substanzen, die Kombinationen mehrerer Antibiotika oder die Kombination von Antibiotika mit Adjuvantien. Das Konzept der kombinierten Gabe von Antibiotika und Adjuvantien leitet sich von der Kombinationstherapie mit mehreren Antibiotika ab. Diese erfolgreiche Strategie zur Resistenzvermeidung und –umgehung basiert auf synergistischen Wechselwirkungen und ermöglicht die Behandlung vieler therapieresistenter Infektionen. Die Adjuvantien selbst weisen meist keine oder nur eine geringe antibakterielle Aktivität auf, sie können aber die Auswirkungen von Resistenzmechanismen minimieren oder gänzlich aufheben. Damit wird die antibakterielle Aktivität des Antibiotikums, welche durch die Resistenz verringert ist, erhöht und die Infektion wird im günstigsten Fall durch Kombination des Adjuvans mit dem entsprechenden Antibiotikum wieder therapierbar (Wright 2016).

Die Adjuvantien werden in zwei Klassen eingeteilt. Adjuvantien der Klasse 1 wirken an bakteriellen Zielstrukturen und können weiter in Adjuvantien der Klassen 1 a und 1 b unterschieden werden. Die Adjuvantien der Klasse 1 a wirken direkt gegen aktive Resistenzmechanismen des Erregers wie z.B. inaktivierende Enzyme, Efflux-Systeme oder veränderte Zielstrukturen, die sich vor allem durch horizontalen Gentransfer verbreiten. Die einzigen Adjuvantien, die klinische Verwendung finden, die  $\beta$ -Laktamaseinhibitoren, gehören in diese Kategorie. Die Adjuvantien der Klasse 1 b wirken gegen passive intrinsische Resistenzmechanismen wie verringerte Membranpermeabilität oder Biofilmbildung, die sich durch vertikalen Gentransfer verbreiten. Die zweite Klasse der Adjuvantien wirkt nicht direkt auf Bakterien ein, sondern steigern die immunologische Abwehr des Wirtes (Wright 2016).

Adjuvantien, die Resistenzmechanismen klinisch bedeutender Erreger gegen Antibiotika inhibieren, tragen auch zur Eindämmung der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen bei, da die Resistenzentwicklung gegenüber zwei Wirkstoffen mit unterschiedlichen Zielstrukturen im Bakterium deutlich erschwert ist. Weiterhin können bei Kombinationstherapien die Antibiotikadosen im Vergleich zur Monotherapie gesenkt werden. Dadurch verringern sich unerwünschte Arzneimittelwirkungen sowie die Kosten der Therapie. Der Einsatz von Antibiotika mit gravierenden unerwünschten Wirkungen, die nur aufgrund der Resistenzlage Verwendung finden, wie zum Beispiel das nephro- und neurotoxische Colistin das bei Infektionen mit panresistenten *Pseudomonas aeruginosa* verwendet

wird, kann durch Kombination von First-line-Antibiotika mit Adjuvantien umgangen werden. Auch besteht die Möglichkeit das Wirkspektrum von Antibiotika mit Adjuvantien so zu erweitern, dass dadurch neue Therapieoptionen für die Behandlung von Infektionen mit multiresistenten Erregern eröffnet werden (Rather *et al.* 2013, Chung *et al.* 2011, Hacıoglu *et al.* 2017, Aktories *et al.*, 2005).

### 1.2.2 Pflanzliche Adjuvantien

Pflanzen produzieren eine Vielzahl von sekundären Inhaltsstoffen von denen ein bedeutender Teil der direkten Abwehr von mikrobiellen Angriffen dient. Die antimikrobiellen Mechanismen dieser Moleküle unterscheiden sich meist von denjenigen mikrobiellen Ursprungs von denen sich die meisten Antibiotika ableiten. Die Vielfalt an potentiell nutzbaren Substanzen sowie der Umstand, dass diese Stoffe im Rahmen der Evolution einer Selektion unterlagen, lassen pflanzliche sekundäre Inhaltsstoffe als vielversprechende Kandidaten für die Suche nach Adjuvantien erscheinen (Gibbons 2008). Vergleichbar zur evolutionär bedingten Entstehung von Antibiotikaresistenzen durch die Konfrontation eines Organismus mit dem Antibiotikum wäre genauso eine evolutionäre Anpassung der Pflanzen an die Resistenzmechanismen denkbar. Ein Beispiel für eine solche Anpassung ist in *Berberis fremontii* zu finden. Das antibakterielle Alkaloid Berberin, welches von dieser Art produziert wird, ist ein Substrat der Effluxpumpe NorA von *Staphylococcus aureus*. Von dieser wird es aus der Bakterienzelle befördert und damit in seiner Wirksamkeit eingeschränkt. Das ebenso in dieser Art vorkommende 5'-Methoxyhydnocarpin erwies sich als Inhibitor der NorA-Effluxpumpe und trug so in einer synergistischen Weise zur antibakteriellen Wirkung des Berberin bei (Stermitz *et al.* 1999). Denkbar ist nicht nur eine direkte Anpassung der Pflanzen an Resistenzmechanismen von Mikroorganismen, die sie selbst bedrohen, sondern auch eine koevolutionäre Anpassung an Resistenzen von Erregern, die Organismen bedrohen, die in einem symbiotischen Verhältnis zu der Pflanzenart stehen.

Die Vielzahl an Pflanzen, die in der traditionellen Medizin in der ganzen Welt und seit langer Zeit bei Infektionskrankheiten Verwendung finden, ist ein weiterer Grund für die Suche nach Adjuvantien in Pflanzen (Brantner *et al.* 1994). Viele Pflanzen bzw. deren Inhaltsstoffe, die in dieser Arbeit untersucht wurden, dienten traditionell zur Wundbehandlung und Bekämpfung von Wundinfektionen (siehe 1.2.3 und 1.2.4).

Insbesondere phenolische Substanzen, die aufgrund ihrer antioxidativen Eigenschaften viele verschiedene pharmakologische Wirkungen zeigen und ein weites antimikrobielles Wirkspektrum

aufweisen, sind erfolgsversprechende Kandidaten unter denen bereits viele synergistisch wirkende Kombinationspartner von Antibiotika gefunden wurden (Saavedra *et al.* 2010).

### 1.2.3 Pflanzliche Extrakte

Für die Untersuchung wurden Extrakte von Pflanzen ausgewählt deren traditionelle Verwendung bei der Wundbehandlung belegt ist. Neben der Unterstützung der Wundheilung basiert ihre lokale Anwendung auf einer Bekämpfung von Wundinfektionen bzw. deren Verhinderung. Außer direkt antimikrobiell wirkenden Inhaltsstoffen ist auch das Vorkommen von Substanzen möglich, die die körpereigene Abwehr von Infektionserregern unterstützen wie z.B. die Glycyrrhizinsäure aus *Glycyrrhiza glabra* (siehe unten). Von größerer Bedeutung für die Thematik dieser Arbeit sind jedoch Inhaltsstoffe, die zu einer Potenzierung der Wirkung von antibakteriellen Substanzen führen, wie dies beim Beispiel des 5'-Methoxyhydnocarpin von *Berberis fremontii* der Fall ist (siehe 1.2.2). Diese Stoffe weisen selbst oft keine oder nur eine geringe antibakterielle Wirkung auf. Pflanzen von denen im Rahmen dieser Arbeit methanolische oder wässrige Extrakte untersucht wurden, werden im Folgenden kurz dargestellt. Falls auch einzelne Inhaltsstoffe dieser Pflanzen analysiert wurden, werden diese in Klammern genannt.

#### **Gemeine Schafgarbe (Asteraceae, *Achillea millefolium* L., Chlorogensäure, Kaffeesäure)**

Das Schafgarbenkraut enthält u.a. Sesquiterpenlaktone, Polyacetylene, Flavonoide und wenig ätherisches Öl (Hänsel & Sticher 2007). Das in der Antike *herba militaris* genannte Kraut, welches oft im Gepäck der Soldaten zu finden war, diente zur Behandlung von Wunden und zur Blutstillung in Form von Salben oder durch direktes Auftragen der Rohdroge. Die Gattungsbezeichnung *Achillea* leitet sich von der Erwähnung in der Ilias vom Homer ab, in dieser heilt Achilles die Wunden des Königs Telephus mit einer Wundaufgabe aus Schafgarbenkraut (European Medicines Agency 2011, Applequist & Moerman 2011).

### **Echte Bärentraube (Ericaceae, *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., Ursolsäure)**

Die Bärentraube ist ein niedrig wachsender Strauch, der in höheren Lagen in der gesamten nördlichen Hemisphäre verbreitet ist. Pharmazeutische Verwendung finden die Blätter, die einen hohen Gehalt an Phenolglucosiden v.a. Arbutin 5 bis 15 %, und Gerbstoffen aufweisen. Außerdem kommen noch Triterpene u.a. Ursolsäure und Flavonoide vor. Das Arbutin wird durch  $\beta$ -Glucosidasen der bakteriellen Darmflora in das antibakterielle Hydrochinon überführt welches nach Resorption und Glucuronidierung oder Sulfatierung renal exkretiert wird, um danach in den Harnwegen von Glycosidasen oder Arylsulfatasen wieder zum Hydrochinon umgewandelt zu werden. Auf dieser Grundlage basiert die weit verbreitete Verwendung bei entzündlichen Erkrankungen der ableitenden Harnwege (Hänsel & Sticher 2007, Teuscher *et al.* 2004). Der im antiken Rom tätige Arzt Galen (2./3. Jahrhundert) nutze die Blätter zur Wundbehandlung und Blutstillung (Castelman 2001).

### **Isländisches Moos (Parmeliaceae, *Cetraria islandica* (L.) Ach.)**

Diese bodenbewohnende Flechte kommt zirkumpolar in Mittel- und Hochgebirgen vor und wird wegen ihres hohen Gehaltes an Schleimstoffen vorwiegend gegen Reizhusten und Appetitlosigkeit eingesetzt. In den getrockneten Thalli sind auch 2 - 3 % Flechtensäuren enthalten, die antimikrobielle Aktivitäten mit einem breiten Wirkspektrum entfalten (Wichtl 2009, Hänsel & Sticher 2007). Traditionell wird Isländisch Moos äußerlich bei schlecht heilenden Wunden verwendet. In der türkischen Volksmedizin dient es als Hämostyptikum (Malhotra *et al.* 2008, Gülcin *et al.* 2002).

**Spitzwegerich (Plantaginaceae, *Plantago lanceolata* L., Chlorogensäure, Kaffeesäure, Ursolsäure)**

Der Spitzwegerich wurde ausgehend von Europa in der ganzen Welt verbreitet (Samuelsen 2000). Die Blätter werden aufgrund ihrer Schleimstoffe sowie ihrer antimikrobiellen und antiinflammatorischen Eigenschaften bei Katarrhen der oberen Luftwege eingesetzt. Weiterhin enthalten sie Phenylethanoide und Iridoidglykoside (Hänsel & Sticher 2007). Seit der Antike ist die Verwendung zur Wundheilung bekannt. Dioscurides empfahl sie zum Beispiel bei Bisswunden durch Hunde (Samuelsen 2000).

**Echter Thymian (Lamiaceae, *Thymus vulgaris* L., Thymol, Ursolsäure, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Rosmarinsäure)**

Der in Mittel- und Südeuropa heimische Halbstrauch wird bei Katarrhen der oberen Luftwege und zur Symptombehandlung bei Bronchitis und Keuchhusten verwendet. Neben dem ätherischen Öl, welches hauptsächlich aus Thymol und Carvacrol besteht, enthält das Thymiankraut u.a. Phenolcarbonsäuren, Triterpene und Flavonoide (Wichtl 2009, Hänsel & Sticher 2007). In der Türkei wird das ätherische Öl zur Behandlung von Brandwunden verwendet (Dursun *et al.* 2003).

**Echtes Süßholz (Fabaceae, *Glycyrrhiza glabra* L., Glycyrrhizinsäure, Uralsaponin T und F, Licoricesaponin A3, B2, E2 und G2, 22-Acetylglycyrrhizin)**

Die Süßholzwurzel enthält 4 bis 20 % Triterpensaponine, von denen Glycyrrhizinsäure die Hauptkomponente darstellt (Hänsel & Sticher 2007). Das Ursprungsgebiet des Echten Süßholz liegt in Südeuropa, sowie Südwest- und Zentralasien (Davis & Morris 1991). Die Nutzung als Heilpflanze kann bis zu den Anfängen der Geschichtsschreibung zurückverfolgt werden und ist in vielen Kulturen verbreitet. Die häufigsten Anwendungen betreffen Katarrhe der Atemwege, Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes sowie die Heilungsförderung von Geschwüren (Fiore *et al.* 2005, Shibata 2000). Verschiedene Teile der Pflanze wurden auch zur Wundheilung genutzt, so empfehlen Theophrastus

und Dioscorides die Wurzel zur Wundbehandlung (Davis & Morris 1991, Shibata 2000). Auch Ibn Sina, bekannter unter seinem lateinischen Namen Avicenna, erwähnt die wundheilungsfördernden Eigenschaften und Robert Lovell (ca. 1630 – 1690) empfiehlt die Anwendung als Heilmittel für „grüne Wunden“ (Davis & Morris 1991, Fiore *et al.* 2005, Shibata 2000). In der Volksmedizin Nordisraels dienen die Blätter der Pflanze zur Wundheilung (Dafni *et al.* 1984). Irani *et al.* stellten fest, dass diese einen stärkeren antibakteriellen Effekt ausüben als die Wurzel (Irani *et al.* 2010). In aryurvedischen Texten ist die Anwendung bei infizierten Wunden und Erysipel beschrieben (Biswas & Mukherjee 2003). Ein Grund für diese historische Verwendung könnte die erhöhte Induktion von antimikrobiellen Peptiden, wie z.B.  $\beta$ -Defensine, durch Glycyrrhizinsäure sein, welche in Keratinozyten produziert werden, die Brandwunden umgeben und dadurch eigentlich eine geringere Produktion aufweisen (Yoshida *et al.* 2010). Ein weiterer Grund könnte auch die verstärkte Gewebeneubildung beim Wundheilungsprozess sein (Biswas & Mukherjee 2003). Im asiatischen Raum ist Süßholz als Heilpflanze seit der Antike bekannt und es ist bei weitem die wichtigste Droge in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM). Es kommt in nahezu 60 % aller Verschreibungen in der TCM vor und spielt eine einzigartige Rolle als „guide drug“ in den Rezepturen, welche sie harmonisieren soll und zur Modifizierung der Wirkung anderer Bestandteile dient. Sie zeigt verschiedene Eigenschaften, so kann sie die Wirkung anderer Komponenten verstärken, indem sie deren Löslichkeit erhöht oder deren toxische Eigenschaften reduziert. Weiterhin beeinflusst sie den Geschmack und verstärkt die Synergie zwischen den, in der „Yin-Yang“-Theorie klassifizierten, sogenannten „kalten“ und „warmen“ Drogen (Wang *et al.* 2013).

#### **1.2.4 Saponine**

Aufgrund von synergistischen Wirkungen einiger Saponine aus *Glycyrrhiza glabra* mit einem Antibiotikum wurden auch Saponine aus anderen Pflanzen untersucht, die traditionell zu medizinischen Zwecken verwendet wurden. Im Folgenden werden die Pflanzen kurz dargestellt.

#### **Gewöhnliche Rosskastanie (*Sapindaceae*, *Aesculus hippocastanum* L., $\beta$ -Aescin)**

Die ursprünglich aus Westindien stammende Gemeine Rosskastanie hat sich weltweit verbreitet. Die Samen des 25 bis 30 m hohen Baumes sind mit 3 bis 6 % reich an Triterpensaponinen. Traditionell wurden sie u.a. bei Erkrankungen des Venensystems, gegen Hämorrhoiden und zur äußerlichen

Behandlung als Antiseptikum bei Geschwüren und gangränösen Wunden angewendet (European Medicines Agency 2009, Hänsel & Sticher 2007). Für einen Teil der Saponinfraktion, dem  $\beta$ -Aescin, wurde eine antiphlogistische und antiödematöse Wirkung nachgewiesen (Hänsel & Sticher 2007).

#### **Gemeiner Efeu (Araliaceae, *Hedera helix* L., $\alpha$ -Hederin und Hederacosid C)**

Die Blätter der kletternden Holzpflanze enthalten 4 bis 5 % zumeist bisdesmosidische Triterpensaponine und werden aufgrund ihrer expektorierenden und sekretolytischen Wirkung bei Katarrhen der oberen Luftwege eingesetzt (Hänsel & Sticher 2007). Die Saponinfraktion besteht zum größten Teil aus dem Bisdesmosid Hederacosid C aus dem, nach Abspaltung einer Zuckerkette, das Monodesmosid  $\alpha$ -Hederin entsteht.

#### **Echte Schlüsselblume (Primulaceae, *Primula veris* L., Primulasaponin I)**

Die in ganz Europa und Asien verbreitete Echte Schlüsselblume enthält in ihren unterirdischen Teilen 3 bis 10 % Triterpensaponine vom Oleanan-Typ mit Primulasaponin I als Hauptkomponente. Wie die Efeublätter wird die Primelwurzel wegen ihrer expektorierenden und sekretolytischen Wirkung bei Katarrhen der oberen Luftwege angewendet (Hänsel & Sticher 2007).

#### **Indischer Wassernabel (Mackinlayaceae, *Centella asiatica* (L.) Urban, Asiaticosid,**

#### **Asiaticosid A und B)**

Der in vielen wasserreichen tropischen und subtropischen Regionen von Südostasien über Südafrika bis Südamerika beheimatete Indische Wassernabel *Centella asiatica* gehört zur Familie der Apiaceen. Im Kraut sind 1 bis 8 % Triterpensaponine und freie Triterpensäuren enthalten. Hauptinhaltsstoffe der Triterpensaponinfraktion sind meist Asiaticosid, Asiaticosid A sowie Asiaticosid B. Dies sind

monodesmosidische Acylglykoside, da die Zuckerkette nicht wie bei den meisten Saponinen mit der Hydroxygruppe in Position 3 verknüpft ist, sondern esterglykosidisch mit der Carboxylgruppe. Die Zuckerkette ist bei allen drei Komponenten identisch. Die Grundkörper der dazu gehörenden Sapogenine gehören dem Ursan-Typ und Oleanan-Typ an. Die Zusammensetzung und der Gehalt der Triterpene können je nach Herkunft stark variieren (Hänsel & Sticher 2007, Blaschek 2007). Das Kraut von *Centella asiatica* wird in der Volksmedizin schon seit langer Zeit für eine Vielzahl von Indikationen eingesetzt. Es ist eine der wichtigsten Heilpflanzen im Ayurveda und gilt dort, wie in der traditionellen chinesischen Medizin, als verjüngend und lebensverlängernd (Rätsch, C. & Müller-Ebeling, C., 2003, Emboden 1985). Häufig verwendet wird es bei verschiedenen Hautkrankheiten, sowie zur Verbesserung der Wundheilung, insbesondere bei Brandwunden. Die vielfach belegte Verbesserung der Wundheilung ist auf ein Einwirken der Asiaticoside, bzw. von deren Aglyka, an verschiedenen Punkten des Wundheilungsprozesses zurückzuführen (Jamil *et al.* 2007). Dies führt u.a. zu einer erhöhten Kollagensynthese, Angiogenese und Epithelisierung in der Wunde (Shukla *et al.* 1999, Wu *et al.* 2012, Kimura *et al.* 2008, Lee *et al.*, 2012). Auf Madagaskar wurde das Kraut als Adjuvans bei der Behandlung lepröser Wunden angewendet. Es unterstützt die Zerstörung der Wachshülle von *Mycobacterium leprae* und steigert dadurch die Empfindlichkeit des Erregers gegenüber Antituberkulotika. Nach Oxidation der Asiaticoside zu Oxyasiaticosiden kommt es auch zu einer direkten antituberkulösen Wirkung (Emboden 1985). In Indien wird das Kraut auch zur Behandlung der Syphilis eingesetzt. Des Weiteren wurden ulkus-protective, antiphlogistische, antibakterielle, fungizide, antidepressive und sedative Wirkungen festgestellt. Aufgrund der venentonsierenden Wirkung werden die Extrakte bei chronisch-venöser Insuffizienz eingesetzt (Jamil *et al.* 2007, Blaschek 2007, Hänsel & Sticher 2007, Dingermann *et al.* 2004, Wichtl 2009, Dash *et al.* 2011).

### ***Cussonia bancoensis* Aubrév. & Pellegr. (Araliaceae, Zemoside A)**

*Cussonia bancoensis* ist ein mittelgroßer Baum aus der Familie der Araliaceen, der in meist dichten, feuchten Waldgebieten von der Elfenbeinküste bis Nigeria vorkommt (Tapondjou *et al.* 2003a). Die in der Baumrinde neben freien Triterpensäuren vorhandenen monodesmosidischen Triterpensaponine leiten sich von der 23-Hydroxyursolsäure ab. Darunter ist auch das Acylglykosid Zemoside A (Tapondjou *et al.* 2003b). Die 23-Hydroxyursolsäure zeigte in Untersuchungen antinozizeptive und antiphlogistische Wirkungen (Tapondjou *et al.* 2003a, Shin *et al.* 2004) und hemmte das Wachstum von HeLa-Zellen durch Induktion der Apoptose über eine Aktivierung von Caspasen (Takaya *et al.*

2009). In der nigerianischen Volksmedizin wird gegen Schwindel und Unfruchtbarkeit bei Frauen ein Dekokt aus der Baumrinde verwendet (Tapondjou *et al.* 2003a). In der traditionellen Medizin wird *Cussonia bancoensis* auch aufgrund von analgetischen und antiphlogistischen Eigenschaften sowie bei der Behandlung von Wunden, gynäkologischen Erkrankungen und sexuell übertragbaren Krankheiten eingesetzt (de Villiers *et al.* 2010).

### **Afrikanisches Traumkraut (Fabaceae, *Entada rheedii* Spreng., Rheediinoside A und B)**

*Entada rheedii* ist eine holzige Schlingpflanze, die im ganzen tropischen Afrika und in Südostasien verbreitet ist (Nzowa *et al.* 2010). Sie gehört zur Familie der Fabaceen und enthält in ihren Samenkernen die Triterpensaponine Rheediinoside A, B, C und D. Die bisdesmosidischen Acylglykoside vom Oleanantyp leiten sich vom Grundkörper der Entagensäure ab (Nzowa *et al.* 2010, Sugimoto *et al.* 2011). Rheediinoside A und B erwiesen sich in Untersuchungen als antioxidativ und zytotoxisch gegenüber zwei Krebszelllinien, wobei Rheediinoside B in beiden Fällen die stärkeren Effekte zeigte (Nzowa *et al.* 2010). In der Volksmedizin wird eine Salbe aus den Samen äußerlich gegen Ikterus eingesetzt. Eine Paste, die aus der ganzen Pflanze zubereitet wird, dient zur Behandlung bei Knochenschmerzen und in Thailand wird die Pflanze auch gegen Bauchschmerzen verwendet (Nzowa *et al.* 2010, Sugimoto *et al.* 2012, Uprety *et al.* 2010).

### ***Terminalia arjuna* (Roxb.) Wight & Arn. (Combretaceae, Arjunglucosid I)**

*Terminalia arjuna* ist ein 20 bis 30 m hoher Baum aus der Familie der Combretaceen verbreitet in Indien, Burma und Sri Lanka (Biswas *et al.* 2011, Singh *et al.* 2002). In der Baumrinde kommen verschiedene Triterpensaponine vom Ursan- und Oleanan-Typ vor, darunter auch das Acylglycosid Arjunglucosid I vom Oleanan-Typ (Singh *et al.* 2002, Wang *et al.* 2010). In der traditionellen Heilkunde wird die Baumrinde schon seit vedischen Zeiten (1500 bis 500 v. Chr.) gegen Herzbeschwerden eingesetzt (Singh *et al.* 2002) und es konnten für die Arjunolsäure auch kardioprotektive Wirkungen nachgewiesen werden (Sumitra *et al.* 2001). Die Baumrinde ist eine wichtige Zutat bei vielen ayurvedischen Zubereitungen, sie zeigt u.a. antipyretische, adstringierende und hypolipidämische Eigenschaften und wird bei gastroenteralen Beschwerden angewendet (Mandal *et al.* 2013, Wang *et*

al. 2010, Biswas *et al.* 2011). An Wundmodellen führten Extrakte aus der Baumrinde zu einer erhöhten Epithelisierung (Chaudhari & Mengi 2006).

### ***Terminalia ivorensis* A. Chev. (Combretaceae, Sericoside, Ivorenoside C)**

Arten der Gattung *Terminalia* aus der Familie der Combretaceen sind in Zentralafrika weit verbreitet und werden umfangreich in der traditionellen Medizin Afrikas verwendet (Ponou *et al.* 2011, Ponou *et al.* 2010). Der vor allem zur Holzgewinnung genutzte, bis 60 m hoch wachsende Baum *Terminalia ivorensis* ist in den tropischen Wäldern von Guinea bis Kamerun heimisch (Blaschek 2007). Unter den in der Rinde vorkommenden Saponinen vom Oleanan-Typ dominiert das Sericosid. Außerdem kommen die Ivorenoside A, B und C vor, wobei es sich bei Ivorenosid A und B um Dimere und bei Ivorenosid C um ein Monomer handelt (Ponou *et al.* 2010). Extrakte aus der Baumrinde erwiesen sich als antiphlogistisch (Iwu & Anyanwu 1982) und wirksam gegen *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans* (Ouattara *et al.* 2013, Coulibaly *et al.* 2010), *Plasmodium falciparum* (Annan *et al.* 2012) und *Trypanosoma brucei* (Adewunmi *et al.* 2001, Adelodun *et al.* 2013). Die Baumrinde wird in der traditionellen Medizin oft in der Form eines Dekoktes gegen eine Vielzahl von Beschwerden eingesetzt, so u.a. zur Wundheilung bei Hauterkrankungen wie Candidiasis, Geschwüren aber auch gegen Hämorrhoiden, rheumatische Erkrankungen, Malaria, Gelbfieber, Diarrhoe und Gastroenteritis (Blaschek 2007, Ponou *et al.* 2011, Coulibaly *et al.* 2010, Ouattara *et al.* 2013, Annan *et al.* 2012).

### **Karitébaum (*Vitellaria paradoxa* C.F.Gaertn. (syn. *Butyrospermum parkii*), Sapotaceae, Parkioside B)**

Der bis zu 14 m hochwachsende Baum *Vitellaria paradoxa* stammt aus der Familie der Sapotaceen und wird im tropischen Afrika vor allem zur Gewinnung der Samen kultiviert (Tapondjou *et al.* 2011, Blaschek 2007). Die nur in der Wurzelrinde vorkommenden Triterpensaponine (Ogunwanda *et al.* 2001) wurden als Parkioside A, B, C und Androseptosid A identifiziert (Tapondjou *et al.* 2011). Die Parkioside sind bisdesmosidische Acylglykoside, die sich von der Oleanolsäure ableiten. Parkiosid B erwies sich bei *in vitro*-Untersuchungen als antioxidativ und zytotoxisch gegenüber verschiedenen Krebszelllinien. Auch Parkioside A zeigte, wenn auch schwächer, zytotoxische Wirkungen (Tapondjou *et al.* 2011). Aus den fettsäurehaltigen Fruchtkernen des Baumes wird die Sheabutter gewonnen, die

volksmedizinisch gegen Unfruchtbarkeit bei Frauen und zur Behandlung von Wunden, Krätze, Geschwüren und angeschwollenen Nasenschleimhäuten verwendet wird (Tapondjou *et al.* 2011, Ogunwanda *et al.* 2001). Ein Dekokt aus den Blättern wird bei Malaria und die Wurzelrinde zur Behandlung von Magengeschwüren eingesetzt. In der Elfenbeinküste werden die Samen zusammen mit anderen Pflanzen gegen die Schlafkrankheit und zur Wundheilung benutzt (Ogunwanda *et al.* 2001).

### **1.3 Klinisch relevante pathogene Bakterienarten**

Wundinfektionen zählen zu den häufigsten nosokomialen Infektionen, betroffen sind vor allem ältere, immunsupprimierte oder an Diabetes mellitus erkrankte Patienten. Bei ungünstigem Verlauf kann es zu einer Sepsis kommen, die insbesondere bei Beteiligung von antibiotikaresistenten Erregern eine hohe Letalität aufweist. Am häufigsten werden Wundinfektionen mit antibiotikaresistenten Bakterien, neben *Escherichia coli*, von den im Folgenden beschriebenen Arten verursacht (European Centre for Disease Prevention and Control 2017).

#### **1.3.1 Enterokokken**

Enterokokken als eigenständige Gattung bestehen erst seit 1984. Davor wurden sie zu den fäkalen Streptokokken gezählt. Schon in den 1930er Jahren wurde vorgeschlagen sie als besondere Gruppe innerhalb der Streptokokken zu betrachten, da sie im Gegensatz zu den übrigen Streptokokken bestimmte Charakteristika aufweisen. Dazu gehört, dass sie bei Temperaturen zwischen 10 °C und 45 °C wachsen, NaCl-Konzentrationen von 6,5 % sowie einen pH-Wert von 9,6 tolerieren, eine thermische Behandlung von 60 °C für 30 min überstehen und Aesculin in Anwesenheit von Galle spalten können. Aber erst molekulargenetische Untersuchungen führten zur Abgrenzung von den Streptokokken und zur Einführung der Gattung *Enterococcus* (Werner *et al.* 2008). Es sind grampositive, fakultativ anaerobe Kokken die einzeln, paarweise oder in kurzkettigen Formationen auftreten (Wendt *et al.* 1998) und ihr Hauptreservoir im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier haben. Im menschlichen Darm kommen sie mit einer Prävalenz von 97 % vor (Murray 1990), verkörpern aber zusammen mit den *Enterobacteriaceae* nur rund 1 % der Dickdarmflora (Klare *et al.* 2012). Bedingt durch ihre bemerkenswerte Toleranz gegenüber verschiedensten Umweltbedingungen, u.a. sind sie gegenüber Austrocknung resistent und überleben auf abiotischen Oberflächen, findet man sie auf einem großen Spektrum von Untersuchungsmaterialien, wie z.B. im

Boden, im Wasser, auf Pflanzen, auf Staub sowie auf tierischen und pflanzlichen Lebensmitteln (Klare *et al.* 2012, Wendt *et al.* 1998). Ihre Virulenz ist im Vergleich zu anderen bedeutenden Pathogenen als gering einzuschätzen, daher galten sie lange als apathogen, zählen aber heute zu den opportunistischen Erregern (Fisher & Phillips 2009). Seit der zweiten Hälfte der 1970er Jahre treten sie als Verursacher nosokomialer Infektionen auf. Das Vorkommen in klinischen Isolaten geschah im zeitlichen Zusammenhang mit dem gestiegenen Einsatz von Drittgenerations-Cephalosporinen gegenüber denen die Enterokokken eine intrinsische Resistenz besitzen, die sogenannte Enterokokkenlücke der Cephalosporine. Aber auch ihre intrinsische Resistenz gegenüber anderen Antibiotika sowie die Fähigkeit Resistenzen gegenüber fast allen anderen gegen Enterokokken verwendeten Antibiotika zu erwerben oder durch Mutationen auszubilden, ermöglichten ihr Überleben in klinischer Umgebung (Tab. 1) (Cetinkaya *et al.* 2000). Intrinsische Resistenz bezieht sich auf Resistenzmechanismen, die charakteristisch für eine Spezies sind und bei allen beziehungsweise fast allen Vertretern einer Art vorkommen. Die diesen Mechanismen zugrundeliegenden genetischen Informationen sind auf chromosomalen Elementen lokalisiert und können somit nicht zwischen verschiedenen Arten übertragen werden. Ihre Verbreitung geschieht durch klonale Ausbreitung resistenter Stämme. Im Gegensatz dazu sind erworbene Resistenzmechanismen entweder auf mobilen genetischen Elementen kodiert, wie Plasmiden oder Transposonen und ermöglichen so auch einen horizontalen Gentransfer zwischen verschiedenen Spezies oder beruhen auf Mutationen im Genom (Murray 1990). Da Enterokokken mit einer relativ hohen Anzahl von mobilen genetischen Elementen wie Plasmiden und Transposonen ausgestattet sind, teilweise mit einem weiten Empfängerspektrum im grampositiven Bereich, und ihr Hauptreservoir der Intestinaltrakt von Mensch und Tier ist, liegt es nahe, dass sie als bedeutendes Reservoir genetischer Informationen für andere grampositive Bakterien dienen vergleichbar mit der Rolle, die *Escherichia coli* im gramnegativen Bereich zukommt (Clewell 1990). Hinsichtlich der Verbreitung von Antibiotikaresistenzen besitzt daher diese Gattung vor allem in Anbetracht des Ausmaßes der Multiresistenz eine große Bedeutung. So ist besonders die Gefahr der Übertragung von Resistenzmechanismen gegenüber Reserveantibiotika auf andere Arten besorgniserregend. Ein Beispiel hierfür ist die seit 2002 in den USA nachgewiesene Übertragung des von *Enterococcus faecium* stammenden VanA-Gens auf *Staphylococcus aureus*, das die bisher zuverlässige Therapie von MRSA mit Vancomycin gefährdet (Périchon & Courvalin 2009). Mittlerweile ist dieses Ereignis auch in anderen Teilen der Welt zu beobachten (Saadat *et al.* 2014).

**Tab. 1:** Antibiotikaresistenzen von Enterokokken (Werner *et al.* 2008)

intrinsische Resistenzen	erworbene Resistenzen
Cephalosporine	Tetracycline
Monobactame	Makrolide
Isoxazolylpenicilline	Aminoglykoside (high level)
Aminoglykoside (low level)	Chloramphenicol
Licosamide ( <i>E. faecalis</i> )	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
Streptogramine ( <i>E. faecalis</i> )	Fluorchinolone
Mupirocin ( <i>E. faecalis</i> )	Glykopeptide (vor allem <i>E. faecium</i> )
Vancomycin (low level; <i>E. gallinarum</i> , <i>E. casseliflavus</i> )	Ampicillin (vor allem <i>E. faecium</i> )
	Streptogramine ( <i>E. faecium</i> )
	Oxazolidinone (Linezolid)
	Glycylcycline (Tigecyclin)
	Lipopeptide (Daptomycin)

Von den über 35 in die Gattung *Enterococcus* eingeteilten Arten besitzen im Wesentlichen *Enterococcus faecalis* und *Enterococcus faecium* klinische Bedeutung im humanmedizinischen Bereich. Während *Enterococcus faecalis* als deutlich virulenter gilt und mit einem Anteil von ungefähr 90 % an den klinischen Enterokokkenisolaten in mitteleuropäischen Krankenhäusern bis zum Ende der 1990er Jahre als deutlich verbreiteter galt, glich sich das Verhältnis der beiden Arten kontinuierlich an, so dass im Jahre 2010 der Anteil von *Enterococcus faecium* bei 41,4 % lag. Diese Verschiebung des Verhältnisses beider Arten liegt vermutlich darin begründet, dass Resistenzen gegenüber Antibiotika hauptsächlich bei *E. faecium* verbreitet sind und in den letzten Jahrzehnten stark zugenommen haben. Der im klinischen Bereich herrschende Selektionsdruck aufgrund des Einsatzes von Antibiotika sowie die Anwesenheit von immungeschwächten bzw. immunsupprimierten Patienten begünstigte die Verschiebung des Verhältnisses zu *E. faecium* trotz der geringeren Pathopotenzen im Vergleich zu *E. faecalis*. Beide Arten bilden die zweit- bis dritthäufigste Ursache für nosokomiale Infektionen mit einem Schwerpunkt auf katheterassoziierten Harnwegsinfektionen und Bakteriämien. Sie lösen aber auch Wundinfektionen, vor allem im Abdominalbereich und oft polymikrobiell verursacht, sowie Peritonitiden und Meningitiden aus, hier vor allem bei Neugeborenen und nach neurochirurgischen Eingriffen (Klare *et al.* 2012, Wendt *et al.* 1998, Knappe 2003). Bei den postoperativen Wundinfektionen lag ihr Anteil in 13 europäischen Ländern im Jahre 2013 und 2014 bei 15,2 % nach *Staphylococcus aureus* (17,0 %) und *Escherichia coli* (16,9 %) (European Centre for Disease Prevention and Control 2017a). Seit fast einem Jahrhundert sind Enterokokken als Erreger schwerwiegender Endokarditiden bekannt (Cetinkaya *et al.* 2000). Ein wesentlicher Virulenzfaktor hierfür ist die Fähigkeit von *Enterococcus faecalis* sich an Herzklappen anzuheften. Auch an Nierenepithelzellen besitzt diese Art eine gute Haftfähigkeit (Wendt *et al.* 1998), weshalb sie nach *Escherichia coli* (26,0 %) für 18,0 %

aller auf Intensivstationen erworbener Harnwegsinfektionen verantwortlich ist (2015, Daten aus 10 europäischen Ländern) (European Centre for Disease Prevention and Control 2017b). Folge einer Infektion des Urogenitaltraktes kann die Ausbildung einer schwerwiegenden Enterokokkensepsis sein, die Gesamtmortalitätsraten von 28 bis 58 % aufweist (Klare *et al.* 2012).

Betroffen von nosokomialen Infektionen sind meist Patienten mit Grunderkrankungen, Immunsuppression, ältere Patienten sowie Früh- und Neugeborene. Aufgrund des durch den medizinischen Fortschritt steigenden Durchschnittsalters der Patientenpopulationen und damit zusammenhängender Multimorbidität sowie des Anstiegs an invasiven Behandlungsmöglichkeiten vergrößert sich die Zahl der Risikopatienten für Enterokokkeninfektionen in den industriell entwickelten Teilen der Erde (Klare *et al.* 2012).

Zur Behandlung von leichten Enterokokkeninfektionen wie z.B. Harnwegsinfekten dient als Standardtherapeutikum Ampicillin oder andere Vertreter aus der Gruppe der Penicilline wie Amoxicillin oder Acylureidopenicilline. Auch bei schwereren invasiven Infektionen mit *Enterococcus faecalis* kommt Ampicillin zum Einsatz. Handelt es sich um schwerwiegendere Infektionen wie eine Endokarditis oder Meningitis wird eine Kombination aus Penicillinen und Aminoglykosiden, wie Gentamicin oder Streptomycin, verwendet. Hierbei dient der membranschädigende Effekt des Penicillins dazu die intrazelluläre Konzentration und damit die Wirksamkeit des Aminoglykosids zu erhöhen. Bei dieser Kombination ist aber eine längere Therapiedauer nötig und die Toxizität ist ungleich höher. Tritt eine hochgradige Resistenz gegenüber Aminoglykosiden auf, versagt auch der synergistische Effekt dieser Kombination und die nächste Therapieoption ist der Einsatz des Reserveantibiotikums Vancomycin. Jedoch sind die Einsatzmöglichkeiten durch die Verbreitung Vancomycin-resistenter Enterokokken eingeschränkt. Möglich wäre noch der Einsatz von Teicoplanin, ein weiteres Glykopeptidantibiotikum, wenn sichergestellt ist, dass eine Vancomycinresistenz von VanB-Typ vorliegt und somit keine Kreuzresistenz zu Teicoplanin besteht. Ist dies nicht der Fall, verbleiben als Reserveantibiotika nur noch Quinupristin/Dalfopristin, Linezolid, Tigecyclin oder Daptomycin. Allerdings ist Quinupristin oder Dalfopristin nicht wirksam gegen *Enterococcus faecalis* und es ist auch schon die nosokomiale Ausbreitung von resistenten Stämmen beschrieben worden. Die Resistenzen gegen Linezolid sind im Gegensatz zu MRSA keine Ausnahme mehr, sie treten schon nach wenigen Therapietagen auf und bleiben auch ohne Selektionsdruck weiter bestehen. Erste Enterokokkenisolate, die sich als resistent gegenüber Tigecyclin erweisen, sind beschrieben, aber zurzeit noch sehr selten. Die Wirksamkeit von Daptomycin wird in der Literatur u.a. wegen hoher Eiweißbindung kontrovers diskutiert. Die Unempfindlichkeit in Einzelfällen ist nachgewiesen. In einzelnen Fallberichten sind auch Therapien mit weiteren Kombinationen von zwei bis drei

verschiedenen Antibiotika zum Teil mit Chloramphenicol beschrieben. Ihre Wirksamkeit ist jedoch nicht zuverlässig, so dass immer eine *in vitro*-Testung notwendig bleibt (Cetinkaya *et al.* 2000, Robert Koch Institut 2013, Klare *et al.* 2012, Wendt *et al.* 1998, Werner *et al.* 2008).

### **1.3.1.1 Antibiotische Therapie**

Eine durch Enterokokken verursachte Sepsis wird nach den Leitlinien u.a. mit Acylpenicillinen wie Ampicillin behandelt. Aufgrund der hohen Ampicillin-Resistenzraten bei *Enterococcus faecium* wird bei Infektionen mit diesem Erreger meist das Glykopeptid Vancomycin eingesetzt. Neben weiteren Monotherapien mit Acylaminopenicillinen, Linezolid, Daptomycin oder Tigecyclin werden auch Kombinationen von Aminopenicillinen oder Glykopeptiden mit Aminoglykosiden angewendet (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2018). Aus diesem Grund wurden neben Ampicillin und Vancomycin auch Gentamicin untersucht. Es ist das am häufigsten verschriebene Antibiotikum zur lokalen Anwendung und wird auch in verschiedenen Wundaufgaben eingesetzt (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. 2012).

#### **1.3.1.1.1 Ampicillin bei Enterokokkeninfektionen**

Das zu den Aminopenicillinen gehörende Ampicillin ist ein  $\beta$ -Laktamantibiotikum mit erweitertem Wirkspektrum, das im Gegensatz zu Penicillin G auch gegen Enterokokken wirksam ist. Wie bei allen  $\beta$ -Laktamantibiotika sind die Angriffsorte die bakteriellen Peptidoglykansynthetasen auch Penicillin-bindende Proteine genannt, eine heterogene Gruppe von Enzymen, die unterschiedliche Bedeutung für das Bakterienwachstum besitzen. Hauptsächlich fungieren sie als Transpeptidasen beim Aufbau der bakteriellen Zellwand, indem sie die Glykanstränge durch kurze Peptidbrücken quer vernetzen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der  $\beta$ -Laktame mit einem Element der Mureinvorstufe, dem Dipeptid D-Alanyl-D-alanin, welches Teil des Substrates der Transpeptidasen ist, kommt es zur Anlagerung des Antibiotikums an das Enzym. Unter Spaltung des  $\beta$ -Laktamringes findet eine Acetylierung des Enzyms in seinem aktiven Zentrum statt, was zu seiner irreversiblen Hemmung führt. Aus dem daraus folgenden fehlerhaften Aufbau des für die Stabilität der Bakterienzelle verantwortlichen Peptidoglykangerüsts resultieren sphärische oder filamentöse Deformierungen der Bakterienzelle, wodurch Mechanismen zur Reparatur in Gang gesetzt werden und es zum Wachstumsstopp der Bakterien kommt. Aufgrund des osmotischen Druckes in der Zelle können die Deformierungen bis zur Ausstülpung und dem Zerreißen der Cytoplasmamembran führen und damit kann es zur Lyse der Bakterien kommen (Aktories *et al.* 2005). Verstärkt wird dieser Vorgang durch die Induktion von autokatalytischen Enzymen, den Autolysinen, aufgrund der verminderten Quervernetzung (Fuchs 2007).

Der Wirkort der  $\beta$ -Laktame liegt zwischen der bakteriellen Zellwand und der Cytoplasmamembran. Um dorthin zu gelangen, müssen sie bei grampositiven Bakterien das Mureingerüst, bestehend aus relativ dicken Peptidoglykan-Teichonsäure-Schichten, durchdringen. Während Ampicillin die Fähigkeit besitzt gut die Zellwand gramnegativer Bakterien zu penetrieren, ist das Penetrationsvermögen für grampositive Keime eher gering (Aktories *et al.*, 2005).

Dass die Therapie von Enterokokkeninfektionen gewisse Schwierigkeiten mit sich bringt, wurde schon in den 1950er Jahren erkannt. Es stellte sich heraus, dass die Behandlung von Endokarditiden mit Penicillin zu deutlich geringeren Erfolgsraten führte, wenn diese durch Enterokokken verursacht wurden, im Vergleich mit denjenigen, die durch Streptokokken bedingt waren. Eine geringe Empfindlichkeit gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika ist eine Eigenschaft, die auf die gesamte Gattung *Enterococcus* zutrifft. So ist die Empfindlichkeit gegenüber Penicillin bei *Enterococcus faecalis* zehn bis hundertfach geringer als bei den meisten Vertretern der Streptokokken, jedoch mit MHK-Werten zwischen 1 bis 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  für Penicillin oder Ampicillin noch im therapeutisch realisierbaren Bereich. Demgegenüber sind Infektionen mit *Enterococcus faecium* bei durchschnittlichen MHK-Werten zwischen 16 und 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nicht mehr mit  $\beta$ -Laktamantibiotika behandelbar. Der hier zugrunde liegende Mechanismus ist die Produktion von Penicillin-bindenden Proteinen v.a. PBP5 mit einer geringen Affinität zu  $\beta$ -Laktamen, so dass diese Chemotherapeutika nicht mehr die Synthese von Peptidoglycanen im ausreichenden Maße hemmen können. Es treten auch hochresistente Isolate auf, die eine MHK von 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oder mehr aufweisen. Als Ursache wurde eine höhere Enzymproduktion oder veränderte Proteinsequenzen vermutet, wodurch höhere Konzentrationen von Ampicillin für die Inhibition notwendig sind. Die Produktion von  $\beta$ -Laktamasen in geringem Ausmaß ist für *E. faecalis* und *E. faecium* beschrieben, aber das Vorkommen ist bisher auf die USA beschränkt, wo sie einen eigenen klonalen Komplex bilden. Kodiert werden sie durch das Gen *blaZ* welches höchstwahrscheinlich von *Staphylococcus aureus* stammt, jedoch ist die Expression deutlich geringer als bei den Staphylokokken und sie ist auch nicht wie bei diesen induzierbar, sondern konstitutiv. Ihr Nachweis ist daher abhängig von der Stärke des Inoculums. Dies führt insbesondere beim Agardiffusionstest oft zu falsch negativen Ergebnissen (Cetinkaya *et al.* 2000, Werner *et al.* 2008, Miller *et al.* 2014). Die Ampicillinresistenzraten in Deutschland für Isolate aus Blutkulturen betragen im stationären Bereich 93–98 % (2008-2016) und im ambulanten Bereich 68-82 % (2008-2011) (Robert Koch-Institut 2016, Klare *et al.* 2012). Bei *Enterococcus-faecium*-Isolaten von Milchrindern mit Mastitis scheint eine Ampicillin-Resistenz nicht aufzutreten (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2016, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2017).

### 1.3.1.1.2 Vancomycin bei Enterokokkeninfektionen

Die Glykopeptidantibiotika Vancomycin und Teicoplanin sind eine wichtige therapeutische Reserve bei Infektionen mit multiresistenten *Staphylococcus aureus* oder Enterokokken, wie Endokarditiden, Septikämien, Infektionen der Knochen und an implantierten Fremdkörpern (z.B. Prothesen oder Venenkatheter). Auch bei Pneumokokken-Meningitis sowie peroral bei pseudomembranöser Enterocolitis durch *Clostridium difficile* oder Staphylokokken-Enterokolitis werden sie verwendet. Bei peroraler Gabe werden sie nicht resorbiert und wirken somit nur im Darmlumen. Eingesetzt werden sie nur gegen grampositive Erreger, da sie durch ihre Hydrophilie nicht in der Lage sind die äußere Membran gramnegativer Bakterien zu durchdringen, um an ihren Wirkort zu gelangen. Darüber hinaus bestehen auch Unterschiede in der Zellwandsynthese zwischen grampositiven und gramnegativen Bakterien. Der Wirkort ist die intrazelluläre Seite der Zellwand, wo sie die Bindungsstellen der Bausteine (*N*-Acetylglucosamin, *N*-Acetylmuraminsäure) für die Quervernetzung blockieren, indem sie mit den C-terminalen D-Alanyl-D-Alanin-Gruppen des Muramylpentapeptids einen Komplex bilden. Dadurch verhindern sie die Elongation und Quervernetzung und damit den Peptidoglykanaufbau der Zellwand. Weiterhin beeinflusst Vancomycin die Membranpermeabilität und die RNA-Synthese (Aktorics *et al.* 2005, Teuscher *et al.* 2004).

Enterokokken, die sich als resistent gegenüber Vancomycin erwiesen, wurden zeitgleich in Großbritannien und Frankreich erstmals 1988 in klinischer Umgebung nachgewiesen (Balmer 2012). Die erworbene Glykopeptidresistenz bei Enterokokken ist hauptsächlich auf *Enterococcus faecium* beschränkt. Die Resistenzraten bei *Enterococcus faecalis* liegen meist unter 1 % (Robert Koch-Institut 2013, Klare *et al.* 2012). Eingeteilt wird die Glykopeptidresistenz nach dem Gen für die Ligase, die für die Verknüpfung der Aminosäuren des C-terminalen Endes des Muramylpentapeptids verantwortlich ist. Es sind acht Varianten beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer Expression, der Lokalisation der genetischen Information, der betroffenen Arten und des Ausmaßes der Resistenz unterscheiden (Werner *et al.* 2008). Klinische Bedeutung besitzen nur die Resistenzen vom VanA- und VanB-Typ, die zu den erworbenen Glykopeptidresistenzen gehören und im Wesentlichen bei *E. faecium* auftreten. Diese Resistenzen sind durch Glykopeptide, Bacitracin, Colistin und Robenidin induzierbar (Cetinkaya *et al.* 2000), wodurch es zu einer alternativen Peptidoglykansynthese kommt, bei der die Pentapeptidseitenkette nicht wie bei Glykopeptid-sensiblen Enterokokken mit einem Alanin endet, sondern mit einem Laktat. Durch das im Vergleich zum Alanin fehlende Wasserstoffatom, welches eine Brückenbindung mit dem Glykopeptid ausbilden würde, ist die Bindungsaffinität vom Vancomycin um den Faktor 1000 verringert (Werner *et al.* 2008, Balmer 2012). Am weitesten verbreitet ist die Glykopeptidresistenz vom VanA-Typ, bei der vier Enzyme für die Synthese alternativer Zellwandgrundbausteine eine Rolle spielen (Werner *et al.* 2008). Sie bewirkt eine hochgradige

Resistenz gegenüber Vancomycin mit MHK-Werten zwischen 16 und >1000 µg/mL und eine Kreuzresistenz zu Teicoplanin. Das VanA-Gen liegt im Transposon Tn 1546, das auf Plasmiden mit meist sehr engem Wirtsbereich lokalisiert ist. Es existieren auch Plasmide mit breitem Wirtsbereich, die eine Übertragung auf andere gram-positive Erreger ermöglichen, z.B. VanA auf MRSA oder VanB auf *Streptococcus bovis* (Balmer 2012, Robert Koch-Institut 2013, Klare *et al.* 2012). Besonders die Übertragung der Vancomycinresistenz auf MRSA ist besorgniserregend, da der Einsatz des bisher gut wirkenden Reserveantibiotikums Vancomycin gefährdet wird. Bisher ist das Auftreten Vancomycin-resistenter MRSA-Isolate auf die Vereinigten Staaten beschränkt (Walters *et al.* 2015). Die VanB-Gencluster sind oft chromosomal kodiert und nur teilweise übertragbar. Sie führen zu einer mäßigen bis hochgradigen Vancomycinresistenz mit minimalen Hemmkonzentrationen von 4 bis 32 µg/mL, teilweise auch bis 1000 µg/mL. Induziert wird diese Resistenz nur von Vancomycin, nicht von Teicoplanin (Werner *et al.* 2008). Bei den chromosomal kodierten Resistenztypen VanC<sub>1</sub>/C<sub>2</sub>, die bei *E. gallinarum* bzw. *E. casseliflavus* vorkommen, wird nur eine mäßige Vancomycinresistenz (MHK: 2 – 32 µg/mL) ohne Kreuzresistenz zu Teicoplanin vermittelt. Das geringere Ausmaß der Resistenz ist bedingt durch eine Verknüpfung mit einem endständigen Serin in der Pentapeptidseitenkette, welches im Vergleich zu einem Laktat Vancomycin an der Bindungsstelle nicht so effektiv blockiert (Klare *et al.* 2012). Die Resistenzraten von klinischen Isolaten aus Blutkulturen in Deutschland stiegen von 6,8 % in 2008 auf 12,0 % in 2016 und liegen damit im europäischen Durchschnitt von 11,8 % (Robert Koch-Institut 2016, European Centre for Disease Prevention and Control 2016). In Europa sind die Glykopeptidresistenzraten unterschiedlich, sie reichen von keinem aufgetretenden Isolat bis zu einem Anteil von 46,3 % mit einem Schwerpunkt in Ost-, Nordwest- und Mitteleuropa. Insbesondere Länder mit hohen Raten berichten von einem signifikanten Anstieg in den letzten vier Jahren (European Centre for Disease Prevention and Control 2016). Bei Untersuchungen der Erreger von Mastitis bei Milchrindern wurden keine Glykopeptidresistenzen festgestellt (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2017).

#### **1.3.1.1.3 Gentamicin bei Enterokokkeninfektionen**

Das durch verschiedene *Micromonospora*-Arten gebildete Gentamicin aus der Klasse der Aminoglykoside ist ein Gemisch von 16 strukturell sehr ähnlichen Sulfatverbindungen. Parenteral wird es in Kombination mit β-Laktamantibiotika bei schweren systemischen Infektionen wie Endokarditiden oder Septikämien durch gramnegativen Erreger v.a. *Pseudomonas aeruginosa* sowie durch einige grampositive Erreger u.a. Staphylokokken und Enterokokken verwendet. Lokal wird es bei Infektionen am Auge, infizierten Wunden, Verbrennungen sowie Knochen- und Weichteilinfektionen eingesetzt. Aminoglykoside binden an die 30S-Untereinheiten der Ribosomen, was zu Fehlablesungen der m-RNA und damit zur Bildung funktionsuntüchtiger Proteine führt. So entstandene falsch aufgebaute

Transport- und Membranproteine verursachen Poren in der Membran, wodurch deutlich mehr Aminoglykoside in die Zelle gelangen. Durch die hohen Aminoglykosidkonzentrationen wird die Bildung funktionsfähiger Initiationskomplexe verhindert, was das Absterben der Zelle zur Folge hat (Teuscher *et al.* 2004, Aktories *et al.* 2005). Andere Antibiotika, welche die Proteinsynthese an den Ribosomen stören, wirken meist bakteriostatisch. Daher wird als Grund für die konzentrationsabhängige Bakterizidie der Aminoglykoside auch die zuvor erwähnte Porenbildung in der Membran angesehen, die mit einem Verlust von Ionen und einem Ladungsaustausch einhergeht (Draker *et al.* 2003). Neben der geringen therapeutischen Breite schränkt vor allem das nephro- und ototoxische Potential des Gentamicins die Verwendung ein. Die allergene Potenz ist eher gering, daher wird es oft in Trägermaterialien verwendet (z.B. Knochenzement). Das Ausmaß der Resorption durch die intakte Haut ist aufgrund der Hydrophilie eher gering (Aktories *et al.* 2005).

Bei der Aufnahme von Aminoglykosiden in die Bakterienzelle können drei Phasen unterschieden werden, eine initiale Ionenbindung an die Membran gefolgt von zwei energieabhängigen Prozessen. Die Bindung an die Membran erfolgt bei grampositiven Bakterien durch die Interaktion mit Teichonsäure, ähnlich wie bei gramnegativen Bakterien mit Lipopolysacchariden. Die Geschwindigkeit der zweiten Phasen ist abhängig von der extrazellulären Aminoglykosidkonzentration und wird bei Konzentrationen über 30 µg/mL übersprungen. Die Kinetik der schnelleren dritten Phase verläuft linear (Taber *et al.* 1987).

Die Resistenzmechanismen der Enterokokken gegen Aminoglykoside werden in zwei Kategorien eingeteilt. Zum einen die intrinsische, chromosomal vermittelte Resistenz auch als low-level Resistenz bezeichnet, die zu MHK-Werten zwischen 2 und 32 µg/mL führt, sowie die plasmidvermittelte Hochresistenz bzw. high-level Resistenz, für die Grenzwerte von >128 µg/ml oder >500 µg/mL gelten. Als gut therapierbar gelten Keime mit einer MHK von ≤1 µg/mL (Aktories *et al.* 2005, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018). Bei den beiden klinisch relevanten Enterokokkenspezies wird die intrinsische Resistenz durch unterschiedliche Mechanismen vermittelt. *Enterococcus faecalis* zeigt ein durch Mutationen, die den Elektronentransport betreffen, verringertes Penetrationsvermögen von Gentamicin, dessen aktiver Transport durch die Membran einen energieabhängigen Prozess darstellt (Draker *et al.* 2003, Aslangul *et al.* 2006). Die intrinsische Resistenz von *Enterococcus faecium* beruht auf der Expressierung eines modifizierenden Enzyms. Die Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme (AME) sind substratspezifisch, das bedeutet, dass nicht alle Aminoglykoside durch ein bestimmtes Enzym verändert werden. Daher besteht bei den Aminoglykosiden nur partielle Kreuzresistenz zwischen den einzelnen Vertretern (Aktories *et al.* 2005). Die negativ geladene Oberfläche der Enzyme bindet an die positiv geladene aktive Seite der

Aminoglykoside, die dann acetyliert, phosphoryliert oder adenyliert werden. Die dadurch entstehende sterische Hinderung verringert die Bindungsfähigkeit an den ribosomalen Zielstrukturen (Miller *et al.* 2014). Gegenüber Gentamicin wird die Resistenz bei *E. faecium* durch das freie Aminogruppen acetylierende Enzym Aminoglykoside 6'-N-Acetyltransferase (AAC(6')-II) vermittelt, welches auch für die Resistenz gegen Tobramycin, Nefilmicin, Amikacin und Kanamycin verantwortlich ist. Es gehört zur größten Gruppe der Aminoglykosid-modifizierenden Enzyme, der GCN5 zugehörigen N-Acetyltransferase (GNAT) Superfamilie. Die Subfamilie AAC(6') deren Vertreter zum größten Teil auf Plasmiden und Transposonen kodiert sind, wird bis auf zwei Ausnahmen nur in gramnegativen Erregern exprimiert (AAC(6')-II bei Enterokokken, AAC(6')-APH(2'')) bei Enterokokken und Staphylokokken). Aufgrund der chromosomalen Kodierung und der relativ geringen Effektivität der Detoxifizierung von Aminoglykosiden besitzt dieses Enzym vermutlich noch weitere Funktionen (Draker *et al.* 2003). Die Hochresistenz gegenüber Aminoglykosiden wird bei beiden Arten durch die Expressierung von Enzymen hervorgerufen, die entweder gegen Streptomycin oder andere Aminoglykoside wirken. Es treten auch kombinierte Hochresistenzen mit mehreren Enzymen gegenüber Streptomycin und anderen Aminoglykosiden auf. Das Vorhandensein einer Hochresistenz führt dazu, dass die synergistische Wirkung der kombinierten Gabe von Ampicillin und Gentamicin therapeutisch nicht mehr erfolgreich ist (Robert Koch-Institut 2010). Bei *E. faecium* ist die Hochresistenz durch vier verschiedene Enzyme bedingt, die nur einzeln auftreten. Mit Abstand die größte Bedeutung besitzt das bifunktionelle Enzym ACC(6')-Ie/APH(2')-Ia, welches alle Aminoglykoside modifiziert bis auf Streptomycin. Bei den anderen drei Enzymen handelt es sich um die Phosphotransferasen APH(2')-Ic (Gentamicin, Tobramycin; MHK: 256 – 384 µg/mL), APH(2')-Id (nur bei VRE; MHK: ≥2000 µg/mL) und APH(2')-Ib (alle Aminoglykoside außer Streptomycin und Amikacin) (Miller *et al.* 2014). *Enterococcus faecium* mit Vancomycinresistenz von VanB-Typ weist meist den MLST-ST 192 (Multi Locus Sequenz Typisierung – Sequenz-Typ) auf, der vergleichsweise selten Gentamicin-hochresistent ist (Robert Koch-Institut 2013). Eine enzymatische Inaktivierung der Aminoglykoside nach der zweiten Aufnahmephase erschwert den Übergang in die dritte Phase, für deren Eintritt eine vorherige ribosomale Bindung mit daraus folgender Porenentstehung notwendig ist (Taber *et al.* 1987).

Die Raten an Gentamicin-hochresistenten *Enterococcus-faecium*-Isolaten aus Blutkulturen in Deutschland sind rückläufig, sie sanken von 43,8 % im Jahre 2008 auf 18,4 % in 2016 (Robert Koch-Institut 2016). In der EU lagen sie 2016 zwischen 9,8 % und 78,7 % für die einzelnen Länder (European Centre for Disease Prevention and Control 2016). *Enterococcus-faecalis*-Isolate aus Blutkulturen mit Gentamicin-Hochresistenz wiesen in Deutschland zwischen 2008 und 2016 relativ stabile Raten von 27,7 % bis 41,1 % auf und in den europäischen Ländern lagen sie zwischen 12,5 % und 56,3 % (Robert Koch-Institut 2016, European Centre for Disease Prevention and Control 2016). Als Grenze für die

Hochresistenz galt bei diesen Untersuchungen eine MHK von über 500 µg/mL. Durch Enterokokken verursachte Mastitis bei Milchrindern ist meist durch *Enterococcus faecium* oder *Enterococcus faecalis* bedingt. Während bei *Enterococcus-faecium*-Isolaten die MHK-Werte mit 4 bis 8 µg/mL im sensiblen bzw. intermediären Bereich liegen, weisen *Enterococcus-faecalis*-Isolate (meist 8 bis 16 µg/mL) Resistenzraten von ungefähr 60 % auf. Gentamicin-Hochresistenz trat nur bei *Enterococcus-faecalis*-Isolaten mit Raten unter 5 % auf (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2016, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2017).

#### **1.3.1.1.4 Imipenem bei Enterokokkeninfektionen**

Imipenem besitzt wie alle Carbapeneme eine hohe Wirksamkeit gegen ein breites Erregerspektrum (Aktories *et al.* 2005). Die Aufnahme in die Bakterienzelle erfolgt durch einen spezifischen Kanal, der zum Transport von essentiellen Aminosäuren dient (Teuscher *et al.* 2004). Zur Wirkung von β-Laktamantibiotika und ihrer Resistenzmechanismen bei Enterokokken siehe 1.3.1.1.1. Verwendet wird dieses Reserveantibiotikum nur parenteral bei lebensbedrohlichen Infektionen bzw. Mischinfektionen in den Harnwegen, den Atemwegen oder dem Bauchraum (Aktories *et al.* 2005). Als Imipenem-resistent gelten Isolate mit MHK-Werten über 8 µg/mL, Sensibilität besteht bei ≤4 µg/mL (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018).

#### **1.3.2 Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)**

Der in traubenförmigen Gruppen vorkommende grampositive, fakultativ anaerobe *Staphylococcus aureus* kann Weichteilinfektionen, Enterokolitis, Bakteriurie, Osteomyelitis, Pneumonien, Karditiden, Meningitiden, Septikämien und Arthritis auslösen (Jensen & Lyon 2009). Die ersten Antibiotika-resistenten Isolate von *Staphylococcus aureus* wurden 1942 entdeckt. Sie exprimierten eine chromosomal kodierte β-Laktamase (*blaZ*), die zur Resistenz gegenüber allen Penicillinen führt. Mitte des 20. Jahrhunderts wurde dann das β-Laktamase-stabile Methicillin entwickelt und erfolgreich bei *S.-aureus*-Infektionen eingesetzt. Aber schon ein Jahr nach Einführung fand man Isolate mit Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA), die auch Resistenz gegenüber Cephalosporinen und Carbapenemen zeigten. Die erworbene Methicillinresistenz ist im *mecA*-Gen kodiert und führt zur Produktion von modifizierten Penicillin-bindenden Proteinen (PBP2a) mit geringerer Affinität zu β-Laktamen. Das Auftreten von MRSA war lange auf den Krankenhausbereich beschränkt, aber in den letzten Jahren kam es zum gehäuften Auftreten im ambulanten und auch im Nutztierbereich. Infektionen mit MRSA werden hauptsächlich mit Vancomycin oder Teicoplanin behandelt. Deshalb löste das vereinzelte Vorkommen von VISA-Isolaten (Vancomycin-intermediäre *Staphylococcus aureus*) durch Übertragung von VanA-Genen von *Enterococcus faecium* Besorgnis aus. *S. aureus* kann auch noch weitere erworbene Resistenzen zum Beispiel gegen Ciprofloxacin, Clindamycin, Tetracyclin

oder Erythromycin aufweisen (Xia *et al.* 2013). Die Aminoglykosidresistenz wird wie bei den Enterokokken über Aminoglykosid-modifizierende Enzyme (AME) vermittelt, diese können Acetyltransferasen, Adenyltransferasen oder Phosphotransferasen sein (Jensen & Lyon 2009). Die Methicillinresistenzraten in der EU sind in den letzten Jahren leicht rückläufig und lagen 2016 bei 13.7 % (European Centre for Disease Prevention and Control 2016).

### **1.3.2.1 Antibiotische Therapie**

Eine durch *Staphylococcus aureus* ausgelöste Sepsis wird durch Kombinationstherapien mit Cephalosporinen oder Isoxazolylpenicillinen behandelt (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2018). Hier wurde das Breitspektrumpenicillin Ampicillin gewählt, um auch einen Einfluss der Naturstoffe auf die  $\beta$ -Laktamasen zu erfassen. Gentamicin wurde aus den unter 1.3.1.1.3 genannten Gründen untersucht.

#### **1.3.2.1.1 Ampicillin bei Infektionen mit MRSA**

Zur Wirkung von  $\beta$ -Laktamantibiotika bei grampositiven Erregern siehe 1.3.1.1.1. Die Kombination von Ampicillin und Extrakten wurde am Patientenisolat MRSA Nr. 28 untersucht, die MHK liegt bei 8 bis 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

#### **1.3.2.1.2 Gentamicin bei Infektionen mit MRSA**

Zur Wirkung von Aminoglykosiden bei grampositiven Erregern siehe 1.3.1.1.3. Untersucht wurden die Wechselwirkung zwischen Gentamicin und Extrakten am Patientenisolat MRSA Nr. 29 mit einer MHK von 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Isolate mit einer MHK  $\geq 1$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  gelten als resistent (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018).

#### **1.3.2.1.3 Imipenem bei Infektionen mit MRSA**

Zur Wirkung von  $\beta$ -Laktamantibiotika bei grampositiven Erregern siehe 1.3.1.1.1. Carbapeneme sind weitgehend  $\beta$ -Laktamasestabil. Die Resistenz wird durch die Exprimierung veränderter Penicillinbindender Proteine (PBP) verursacht. Wechselwirkung mit Imipenem wurde am Patientenisolat MRSA Nr. 25 untersucht, die MHK für Imipenem liegt bei 8 bis 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

### **1.3.3 *Pseudomonas aeruginosa***

Die Entdeckung des gramnegativen Stäbchenbakteriums begann in der Mitte des 19. Jahrhunderts. Die durch seine Pigmente entstehende blau-grüne Verfärbung von Wunden und Wundauflagen führten zu seiner Identifizierung (Lister *et al.* 2009). Es ist ein genügsamer, ubiquitär vorkommender Boden- und Wasserkeim, welcher auch den Intestinaltrakt von Mensch und Tier besiedelt und in der Lage ist auf

einer Vielzahl von natürlichen und künstlichen Oberflächen zu überleben, wenn genug Feuchtigkeit vorhanden ist. Sein Wirtsspektrum weist eine große Bandbreite an Tieren und Pflanzen auf und als opportunistischer Erreger verursacht er oft nosokomiale Infektionen bei immungeschwächten und älteren Patienten sowie bei Säuglingen. Meist ist die Infektion mit das Immunsystem schwächenden Grunderkrankungen wie Neutropenien, schweren Verbrennungen oder zystischer Fibrose assoziiert (Robert Koch-Institut 2002, Gellatly & Hancock 2013, Breidenstein *et al.* 2011). Infektionen betreffen meist die Lunge, Wunden, die Harnwege, das Ohr, das Auge und die Haut oder sind systemisch. Durch das häufige Auftreten von neuen und die Verbreitung bestehender Antibiotikaresistenzen sind die Therapieoptionen stark eingeschränkt, dadurch sind Pseudomonasinfektionen mit einer hohen Morbidität und Mortalität assoziiert (Gellatly & Hancock 2013). Die Therapie erfolgt außer bei Otitis externa meist als Kombinationstherapie aus Cephalosporinen, Piperacillin/Tazobactam oder Carbapenemen zusammen mit Aminoglykosiden, Fluorchinolonen oder Fosfomycin (Aktories *et al.* 2005). Wegen der Vielzahl von Resistenzen und der geringen Verfügbarkeit an neuen Therapiemöglichkeiten muss teilweise auf ältere Mittel wie Colistin zurückgegriffen werden, welche aufgrund ihrer toxischen Wirkungen eigentlich nicht mehr angewendet wurden. Bei den Antibiotikaresistenzen stehen vor allem die intrinsischen Resistenzmechanismen im Vordergrund, die die Empfindlichkeit gegenüber vielen Antibiotika reduzieren. Zum einen sind dies die konstitutiv exprimierte Effluxpumpen MexAB-OprM und MexXY-OprM, die zur Familie der resistance-nodulation-cell division (RND) Effluxpumpen gehören und einen großen Substratbereich besitzen. Zusammen vermitteln sie die Resistenz gegen  $\beta$ -Laktame, Chloramphenicol, Fluorchinolone, Makrolide, Novobicin, Sulfonamide, Tetracycline, Trimethoprim und Aminoglykoside. Vier weitere Arten von Effluxpumpen dieser Familie wurden in *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert. Zum anderen ist dies die im periplasmatischen Raum lokalisierte  $\beta$ -Laktamase AmpC deren kontinuierliche Expression mit einer geringen Intensität erfolgt, welche jedoch bei Induktion durch subinhibitorische  $\beta$ -Laktamkonzentrationen erhöht wird (Gellatly & Hancock 2013). Die aus diesen Mechanismen folgende Resistenz wird durch den bedeutendsten intrinsischen Mechanismus, die geringe Permeabilität der äußeren Membran wesentlich verstärkt. Die Permeabilität ist 12 bis 100-mal geringer verglichen mit der der äußeren Membran von *Escherichia coli*. Sie führt zu einem Ausschluss von vielen hydrophilen Antibiotika aufgrund deren Größe, da die Anzahl von großen Porinen, vor allem dem am häufigsten vorkommenden Porin OprF, relativ gering ist und die übrigen Porine (u.a. OprD, OprB) durch ihre geringe Größe den Durchtritt vieler Moleküle durch die wassergefüllten Kanäle verhindern. Weitere Aufnahmemechanismen in die Bakterienzelle sind die Diffusion hydrophober Moleküle und die selbst vermittelte Aufnahme polykationischer Moleküle wie Aminoglykoside, Colistin oder antimikrobieller Peptide. Sie verdrängen Kalzium- und Magnesiumionen, die als quervernetzende Stabilisatoren der Lipopolysaccharide fungieren. Daraufhin kommt es zu lokalen Störungen der

Membranintegrität, welche die Passage durch die Membran ermöglichen. Resistenzen gegen diesen Aufnahmemechanismus entstehen durch die Verknüpfung des Lipid A des Lipopolysaccharides mit 4-Aminoarabinose (Breidenstein *et al.* 2011). Durch horizontalen Gentransfer erworbene Resistenzen betreffen vor allem  $\beta$ -Laktame und Aminoglykoside. Zu ihnen gehören die Carbapenemase der Klasse B, die Metallo- $\beta$ -Laktamase vor allem die Varianten VIM und IMP, die alle  $\beta$ -Laktame bis auf die Monobactame hydrolysieren, sowie die Carbapenemase der Klasse A (u.a. GES-2, KPC-2) und D (u.a. OXA-40, OXA-198). Auch die ebenfalls Penicilline und Cephalosporine hemmende extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) wurden in *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen (Juan *et al.* 2013, Breidenstein *et al.* 2011). Die Resistenz gegenüber Aminoglykosiden wird u.a. durch Aminoglykosid-modifizierende Enzyme vermittelt deren genetische Information durch Plasmide übertragen wird (Henrichfreise *et al.* 2007). Weitere erworbene Resistenzmechanismen sind durch Mutationen bedingt wie Modifizierung der Zielstrukturen von Quinolonen oder Aminoglykosiden, Überexpression von Effluxpumpen oder Veränderungen an Porinen der äußeren Membran, wie z.B. am OprD. Durch diese Mutation wird zusammen mit der Aktivität von AmpC und unter Beteiligung von Effluxpumpen Resistenz gegenüber Carbapenemen hervorgerufen. Der Funktionsverlust vom OprD führt zu einer höheren Toleranz gegenüber widrigen Umweltbedingungen, wie dem sauren Milieu des Magens und erhöhter Zytotoxizität gegen Phagozyten. Dadurch kommt es zu einer verstärkten Kolonisation des Wirtes (Skurnik *et al.* 2013, Juan *et al.* 2013, Riera *et al.* 2011). Die Therapieresistenz von Infektionen wird auch durch die Bildung von Biofilmen verstärkt, die zum einen eine Barriere für den Weg des Antibiotikums zur Bakterienzelle darstellen und zum anderen die Konzentrationen von extrazellulär sekretierten Enzymen in der Nähe des Bakteriums hochhalten (Breidenstein *et al.* 2011).

Das Resistenzmuster eines *Pseudomonas-aeruginosa*-Isolates lässt sich mit dem für extensiv- oder panresistente gramnegative Stäbchenbakterien entwickelten MRGN-Schema von der Kommission für Krankenhaushygiene und Infektionsprävention (KRINKO) beim Robert Koch-Institut (RKI) charakterisieren. Die Einteilung erfolgt nach der Resistenz gegenüber vier Klassen primär bakterizid wirkender Therapeutika, die bei schweren Infektionen eingesetzt werden (Acylureidopenicilline, Cephalosporine der 3. und 4. Generation, Carbapeneme und Fluorchinolone). Wenn im Falle von *Pseudomonas aeruginosa* Resistenz gegen Vertreter von drei dieser Antibiotikaklassen besteht, liegt ein 3MRGN-Typ vor. Ist das Isolat gegen Vertreter aller vier Klassen resistent, wird es als 4MRGN-Typ bezeichnet (Robert Koch-Institut 2012).

Zur Untersuchung der folgenden Kombinationen diente das Patientenisolat PA Nr. 289, dass aus Tracheobronchialsekret gewonnen wurde, Metallo- $\beta$ -Laktamase-negativ ist und zum 4MRGN-Typ gehört. Die Kombinationen mit Imipenem wurden zusätzlich am Porindefekten (OprD) Isolat PA

Nr. 323 untersucht, welches resistent gegenüber Imipenem und Meropenem ist. Für die Wechselwirkung zwischen Piperacillin und verschiedenen Extrakten diente zusätzlich zu PA Nr. 289, PA Nr. 288 (Metallo- $\beta$ -Laktamase-positiv, 4MRGN-Typ), PA Nr. 264 (Metallo- $\beta$ -Laktamase-negativ, ESBL-positiv, 3MRGN-Typ), PA Nr. 241 (Metallo- $\beta$ -Laktamase-positiv Typ VIM-2, ESBL-positiv), PA Nr. 242 (Metallo- $\beta$ -Laktamase-negativ), sowie PA Nr. 309 und PA Nr. 311 (beide 3MRGN-Typ).

### **1.3.3.1 Antibiotische Therapie**

Die durch *Pseudomonas aeruginosa* verursachte Sepsis besitzt von allen Sepsisformen die höchste Letalität. Therapiert wird sie, wenn keine Carbapenem-Resistenz vorliegt, durch Kombination verschiedener Antibiotika, entweder einem Cephalosporin der Gruppe 3b/4, einer Acylaminopenicillin-Inhibitorkombination oder einem Carbapenem der Gruppe 1 in Verbindung mit Fluorchinolonen, Fosfomycin oder einem Aminoglykosid (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2018). Deshalb wurden die Wechselwirkungen der Naturstoffe mit dem Acylaminopenicillin Piperacillin, dem Carbapenem der Gruppe 1 Imipenem und dem Aminoglykosid Gentamicin analysiert.

#### **1.3.3.1.1 Piperacillin bzw. Ampicillin bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa***

Zum Wirkmechanismus von  $\beta$ -Laktamantibiotika siehe 1.3.1.1.1. Die Durchlässigkeit der Membran gramnegativer Stäbchenbakterien für  $\beta$ -Laktame ist variabel und hängt von der Anzahl und Funktion von Porinen in der äußeren Membran ab. Bei bestehendem Selektionsdruck wird die Entwicklung von Mutanten mit verringerter Membranpermeabilität begünstigt. Während bei grampositiven Erregern z.B. bei *Staphylococcus aureus* die Resistenz durch  $\beta$ -Laktamasen nach dem Alles-oder-nichts-Prinzip funktioniert, das heißt, wenn  $\beta$ -Laktamasen exprimiert werden, besteht auch Resistenz, existieren bei gramnegativen Erregern graduelle Abstufungen. Aufgrund dessen können hohe Dosen noch wirksam sein. Ein weiterer Unterschied besteht im Akkumulationsort der  $\beta$ -Laktamasen. Grampositive Bakterien entlassen diese ins umgebende Milieu, gramnegative Bakterien konzentrieren diese sehr effektiv im periplasmatischen Raum. Das Aminopenicillin Ampicillin durchdringt im Gegensatz zu grampositiven Keimen gut die Zellwand gramnegativer Keime, besitzt aber nur eine geringe Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa*, im Gegensatz zum Acylureidopenicillin Piperacillin, welches für die Therapie verwendet wird (Aktories *et al.* 2005). Die vermehrte Produktion von chromosomal kodierten AmpC- $\beta$ -Laktamasen ist der bedeutendste Resistenzmechanismus gegen Acylureidopenicilline, aber auch die vermehrte Produktion der Effluxpumpe MexXY-OprM trägt zur Resistenz bei (Henrichfreise *et al.* 2007). Piperacillinresistenz besteht ab einer MHK von 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018). Die Resistenzraten von klinischen Isolaten für Piperacillin in

Deutschland lagen 2016 bei 15,5 % und im europäischen Durchschnitt für Piperacillin/Tazobactam bei 16,3 % (Robert Koch-Institut 2016, European Centre for Disease Prevention and Control 2016).

#### **1.3.3.1.2 Gentamicin bei Infektionen mit *Pseudomonas aeruginosa***

Zum Wirkmechanismus von Gentamicin siehe 1.3.1.1.3 und zum Durchtritt durch die äußere Membran siehe 1.3.3. Nachdem die äußere Membran überwunden ist, geht das Gentamicin im periplasmatischen Raum in seine protonierte Form über und diffundiert bei hohem Potentialgefälle, welches nur bei oxidativer Energiegewinnung und hoher Stoffwechselaktivität besteht, die Cytoplasmamembran (Aktories *et al.*, 2005). Der einzige intrinsische Mechanismus, der die Resistenz gegen Aminoglykoside vermittelt, ist die Effluxpumpe MexXY-OprM, deren vermehrte Produktion eine Hochresistenz zur Folge hat. Zu einer Hochresistenz führen auch Aminoglykosid-modifizierende Enzyme, zu ihrem Wirkmechanismus siehe 1.3.1.1.3. Es sind oft mehrere verschiedene Enzyme bei einem Isolat vorhanden, die zum größten Teil zu den Acyltransferasen gehören. Welche Enzymarten vorherrschen, ist meist von der geographischen Herkunft des Isolates abhängig (Henrichfreise *et al.* 2007, Aghazadeh *et al.* 2013, Shahid & Malik 2005). Weitere Resistenzmechanismen sind Permeabilitätsveränderungen, Zielstrukturveränderungen und die Modifikation von Lipid A des Lipopolysaccharids (Gellatly & Hancock 2013). Als Gentamicin-resistent gilt ein Isolat ab einer MHK von 8 µg/mL (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018). Gegenüber Gentamicin lagen die Resistenzraten von klinischen Isolaten in Deutschland 2016 bei 7,1 % und im europäischen Durchschnitt für Aminoglykoside bei 10,0 % (Robert Koch-Institut 2016, European Centre for Disease Prevention and Control 2016).

#### **1.3.4 *Klebsiella pneumoniae***

Der im Gastrointestinaltrakt von Mensch und Tier vorkommende opportunistische Erreger ist für ungefähr ein Drittel aller Infektionen mit gramnegativen Bakterien verantwortlich. Dazu gehören u.a. Infektionen der ableitenden Harnwege und der Lunge, Septikämien, Endokarditiden und Wundinfektionen. Die Resistenz gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika wird im Wesentlichen über verschiedene  $\beta$ -Laktamasen vermittelt. *K. pneumoniae* zählt zu den wichtigsten Trägern von ESBL bei nosokomialen Ausbrüchen. Die über horizontalen Gentransfer verbreitete Resistenz nimmt weltweit dramatisch zu und erreicht Anteile von bis zu 30 % an ESBL-produzierenden Bakterien in der Gesamtpopulation. Ebenso besteht bei diesem Erreger auch eine plasmidvermittelte Resistenz durch  $\beta$ -Laktamasen von AmpC-Typ. Die größte Bedeutung kommt den Carbapenemasen zu, die auch die Wirkung der Carbapeneme einschränken, welche wichtige Reserveantibiotika bei Infektionen mit ESBL-produzierenden *K. pneumoniae* sind. Neben der *K. pneumoniae* Carbapenemase (KPC), die oft auch Resistenzen gegen  $\beta$ -Laktamaseinhibitoren zeigt, kommen auch Metallo- $\beta$ -Laktamasen (IMP,

VIM, NDM) und andere nicht-Metallo- $\beta$ -Laktamasen (OXA-48) vor. Mehrere dieser Carbapenemasen könnten in einem Isolat vorkommen, teilweise sind Isolate beschrieben, die alle diese Enzyme exprimieren (Navon-Venezia *et al.* 2017). Der Einsatz von Carbapenemen führte nicht nur zu enzymatischen Resistenzmechanismen. Ebenso tragen auch Veränderungen in der äußeren Membran zur Carbapenemresistenz bei, wie der Verlust der zahlenmäßig bedeutendsten Porine OmpK35 und OmpK36, die als Aufnahmekanäle für die Carbapeneme dienen (Stein *et al.* 2015). Aminoglykosidresistenz entsteht durch die Exprimierung von adenylierenden, acetylierenden und phosphorylierenden Enzymen. Es kommen nicht nur Aminoglykosid-modifizierende Enzyme vor, sondern auch 16S rRNA Methylase, welche die Bindungsstellen der Aminoglykoside an den Ribosomen verändert und damit zu hochresistenten Isolaten führt. Weitere chromosomal vermittelte Resistenzmechanismen gegen Aminoglykoside betreffen Veränderungen der Membranpermeabilität, u.a. durch den Verlust am Porin KpnO und am Effluxpumpensystem (Navon-Venezia *et al.* 2017).

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Extrakten und Antibiotika diente das Patientenisolat KP Nr. 245, welches eine Carbapenemase von OXA-48-Typ exprimiert. Wechselwirkungen mit Imipenem wurden zusätzlich mit KP Nr. 320 durchgeführt. Dieses Isolat weist einen Porinverlust von OmpK35 und OmpK36 auf und produziert  $\beta$ -Laktamasen vom Typ CTX-M-15, TEM-1, OXA-1 und SHV-1.

#### **1.3.4.1 Antibiotische Therapie**

Ist eine Sepsis durch *Klebsellia pneumoniae* verursacht, wird eine antibiotische Monotherapie mit Aminopenicillin-, oder Acylaminopenicillin-Inhibitorkombinationen, Cephalosporinen der Gruppe 3a/3b/4, Fluorchinolonen der Gruppe 2/3 oder Carbapenemen durchgeführt (Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V. 2018). Aufgrund dessen wurden u.a. das Aminopenicillin Ampicillin und das Carbapenem Imipenem untersucht.

### **1.4 Analyse der Antibiotikaempfindlichkeit**

Die Empfindlichkeitsprüfung ist eine routinemäßig angewendete phänotypische *in vitro*-Methode zur Feststellung der Sensibilität eines Bakteriums gegenüber einem Antibiotikum mit dem Ziel unwirksame Therapien zu vermeiden. Der Therapieerfolg kann durch diese Methode jedoch nicht sicher vorhergesagt werden, da viele pharmakodynamische und pharmakokinetische Parameter der Antibiotikawirkung nicht berücksichtigt werden. Hauptsächlich werden zwei Verfahren eingesetzt, die Agardiffusionsmethode und das Mikrodilutionsverfahren. Bei der Agardiffusionsmethode wird die Diffusion eines Antibiotikums durch eine Agarschicht von einem bestimmten Punkt aus genutzt, um

einen Konzentrationsgradienten herzustellen. Abhängig von der Konzentration im Agar tritt Bakterienwachstum auf. Quantifiziert wird die Wirkung über die Größe des entstehenden Hemmhofs, in dem kein Wachstum stattfindet. Zu diesem Verfahren gehört auch der E-Test, bei dem das Antibiotikum nicht punktförmig aufgetragen wird, sondern mit einem Papierstreifen ein schon vorhandener Konzentrationsgradient auf den Agar aufgebracht wird. Das Wachstum an diesem Papierstreifen dient zur Bestimmung der Antibiotikaempfindlichkeit. Beim Mikrodilutionsverfahren werden geometrische Verdünnungsreihen des Antibiotikums in flüssigem Medium mit Bakterien beimpft (Rodloff *et al.* 2008, Clinical and Laboratory Standards Institute 2012). Die Quantifizierung erfolgt hier über die minimal bakterizide Konzentration (MBK) oder die minimale Hemmkonzentration (MHK). Die MBK ist diejenige Konzentration, bei der alle Bakterien abgetötet werden. Sie dient vor allem der Charakterisierung der Interaktion zwischen Bakterium und antibakterieller Substanz. Um die therapeutischen Optionen abzuschätzen, wird die MHK untersucht, die Konzentration bei der kein Bakterienwachstum mehr stattfindet. Zur standardisierten Beurteilung wird die MHK oder der Hemmhofdurchmesser anhand von Grenzwerten in drei Kategorien eingeteilt (International Organization for Standardization 2006):

- Sensibel (s): Als sensibel gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er *in vitro* von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen therapeutischen Erfolgswahrscheinlichkeit assoziiert ist.
  
- Intermediär (i): Als intermediär gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er *in vitro* von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einem unsicheren therapeutischen Ergebnis assoziiert ist.
  
- Resistent (r): Als resistent gegen ein bestimmtes Antibiotikum wird ein Bakterienstamm dann bezeichnet, wenn er *in vitro* von einer Konzentration dieses Wirkstoffs inhibiert wird, die mit einer hohen Wahrscheinlichkeit des Therapieversagens assoziiert ist.

Es existieren verschiedene Organisationen, die auf Basis vieler Daten Grenzwerte mit teilweise unterschiedlichen Ergebnissen ermitteln. Daher hat die European Society for Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) eine Arbeitsgruppe eingerichtet (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, EUCAST), die die Grenzwerte auf europäischer Ebene harmonisiert (Rodloff *et al.* 2008). Die in dieser Arbeit untersuchten Bakterienisolate wurden mithilfe dieser Grenzwerte charakterisiert.

## 1.5 Zielsetzung

Das Ziel der Promotion ist die Identifizierung von Resistenz-modifizierenden Naturstoffen im Hinblick auf die Antibiotikaresistenz von Erregern welche Wund-, Haut- und Weichteilinfektionen verursachen. Beabsichtigt ist, durch eine Kombination solcher Resistenz-modifizierenden Adjuvantien mit Antibiotika die Therapierbarkeit dieser Infektionsarten mit den Standardantibiotika wiederherzustellen, welche durch die zunehmende Verbreitung von Antibiotikaresistenzen in vielen Fällen nicht mehr gegeben ist. Somit kann eine Anwendung von Reserveantibiotika vermieden werden. Dies trägt zur Erhaltung der Wirksamkeit der Reserveantibiotika bei, weil sie dadurch seltener angewendet werden müssen und somit die Gefahr einer Resistenzentstehung abnimmt. Der Großteil der hier untersuchten Erreger weist nicht nur Resistenzen gegenüber den für die jeweilige Bakterienart angewendeten Standardantibiotika auf, sondern auch gegenüber den Reserveantibiotika. Aufgrund dessen beinhalten die Analysen auch Wechselwirkungen zwischen Naturstoffen und Reserveantibiotika.

Analysiert wurden die Wechselwirkungen zwischen Antibiotikum und Naturstoff an vier verschiedenen Bakterienarten, die Resistenzen gegenüber den jeweiligen Standardantibiotika bzw. auch den Reserveantibiotika aufweisen und zu den häufigsten Erregern von Wundinfektionen zählen. Die verwendeten Antibiotika richten sich im Wesentlichen nach den für die genannten Bakterienarten eingesetzten Standard- und Reserveantibiotika, sie umfassen: Piperacillin, Ampicillin, Imipenem, Vancomycin und Gentamicin.

Bei den untersuchten Naturstoffen handelte es sich um methanolische und wässrige Trockenextrakte von folgenden Pflanzenteilen, die in der Traditionellen Europäischen Medizin zur Wundbehandlung angewendet wurden: *Lythrum salicaria*, *Salvia officinalis*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Thymus vulgaris*, *Cetraria islandica*, *Achillea millefolium*, *Solidago virgaurea*, *Plantago lanceolata* und *Glycyrrhiza glabra*. Zeigten die Ergebnisse eine Resistenz-modifizierende Wirkung, wurden zum Teil auch Einzelkomponenten dieser Extrakte analysiert.

## 2 Methoden

### 2.1 Herstellung der Trockenextrakte

Für die Extrakterstellung wurden die getrockneten Pflanzenteile in einer Drogenmühle zerkleinert. Nach Siebung (Siebgröße 4) wurden zu große Bestandteile erneut mit Hilfe der Drogenmühle zerkleinert. Für die Mazeration wurden die Pflanzenteile im Verhältnis 1:10 mit Lösungsmittel versetzt und zur Steigerung der Extraktausbeute im Ultraschallbad 30 Minuten extrahiert. Als Extraktionsmittel dienten Methanol oder Wasser und die Mazeration wurde zweimal durchgeführt. Um ungelöste Bestandteile abzutrennen, wurde nach Filtration das Filtrat zentrifugiert und der Überstand mit Hilfe eines Sterilfilter (Porengröße 0,22 µm) filtriert. Die Filtrate beider Extraktionsdurchgänge wurden vereinigt und im Rotationsverdampfer bei 50 °C unter verringertem Druck bis zur Trockene eingengt. Die Trockenextrakte wurden dicht verschlossen bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Licht gelagert.

### 2.2 Mikrodilutionsverfahren

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Mikrodilutionsverfahren wurden 96 well-Mikrotiterplatten verwendet. Als Medium diente cation-adjusted Mueller-Hinton Medium, welches auch zur Empfindlichkeitstestung von Antibiotika empfohlen wird. Die Konzentrationen der Antibiotika lagen zwischen 0,0005 µg/mL und 131072,0000 µg/mL, die der Extrakte zwischen 0,1250 µg/mL und 65536,0000 µg/mL und die der Substanzen zwischen 0,0039 µM und 32768,0000 µM. Das Testvolumen lag bei 100 µL, vorbereitete Mikrotiterplatten ohne Inokulum wurden bei – 80 °C für höchstens zwei Wochen aufbewahrt. Das Inokulum enthielt  $5 \times 10^6$  KBE/mL, dazu wurde eine Bakteriensuspension mit einer Absorption zwischen 0,08 und 0,10 bei 600 nm hergestellt und 1 : 20 verdünnt. Nach Applizierung von 10 µL Inokulum führte dies zu einer Bakterienkonzentration von  $5 \times 10^5$  KBE/mL im Testvolumen. Die Mikrotiterplatten wurden unter aeroben Bedingungen mit 5 % CO<sub>2</sub> bei 37 °C für 20 Stunden inkubiert, Mikrotiterplatten mit Vancomycin wurden für 24 Stunden inkubiert (Clinical and Laboratory Standards Institute 2012). Als Negativkontrolle dienten 90 µL Medium plus Inokulum, als Positivkontrolle 90 µL einer 0,4 % (v/v) Peressigsäurelösung in demineralisiertem Wasser plus

Inokulum und für die Sterilkontrolle 100  $\mu\text{L}$  Medium. Die Sterilität von Extrakten und Substanzen wurde überprüft, indem ein Volumen von 100  $\mu\text{L}$  der Lösung auf einer Columbiablut-Agarplatte ausplattiert und wie oben beschrieben inkubiert wurde.

## **2.3 Bestimmung der antibakteriellen Aktivität**

Die Bestimmung der antibakteriellen Aktivität von Extrakten, isolierten Substanzen und Antibiotika erfolgte mit dem Mikrodilutionsverfahren. Dabei wurden die Vorgaben des Clinical and Laboratory Standards Institute für die Empfindlichkeitstestung von Antibiotika berücksichtigt (Clinical and Laboratory Standards Institute 2012). Der Grad der antibakteriellen Aktivität wurde mit Hilfe der minimalen Hemmkonzentration (MHK) quantifiziert. Dabei wird diejenige Konzentration eines Stoffes, bei der mit dem Auge keine Trübung, also kein Bakterienwachstum, mehr sichtbar ist, als MHK bezeichnet. In dieser Arbeit wurde das Bakterienwachstum mit Hilfe eines Plattenphotometers bei 620 nm detektiert. Als Bakterienwachstum wurde ein Absorptionsanstieg von mindestens 0,02 über der Absorption der Sterilkontrolle definiert. Da Lösungen mit hohen Substanzkonzentrationen oder Extraktlösungen die Absorption erhöhen, wurde in diesen Fällen als Vergleich eine zusätzliche Verdünnungsreihe hergestellt, in die statt des Inokulums 10  $\mu\text{L}$  Medium pipettiert wurden. Auch in diesen Fällen galt als Grenze für Bakterienwachstum eine Absorptionserhöhung von mindestens 0,02 verglichen mit der Kontrolle. Die Einordnung der Empfindlichkeit eines Isolates gegenüber einem Antibiotikum in die Kategorien resistent, intermediär und sensibel erfolgte anhand der Grenzwerte des European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), wenn diese vorhanden waren.

## **2.4 Checkerboard-Verfahren**

Die Wechselwirkung zwischen einem Antibiotikum und einem Extrakt bzw. einer Substanz wurde mit den Kategorien synergistisch, indifferent und antagonistisch definiert. Dazu diente das Checkerboard-Verfahren, bei dem die Testsubstanz in unterschiedlichen Konzentrationen jeweils einer Verdünnungsreihe des zu untersuchenden Antibiotikums auf einer 96 well-Mikrotiterplatte zugesetzt wurde (Pillai & Moellering 2005). Nach Inkubation und Auswertung - wie oben beschrieben - wurden zuerst die fraktionierten inhibitorischen Konzentrationen (FIC) und danach der fraktionierte inhibitorische Konzentrationsindex (FICI) wie folgt berechnet:

FIC Testsubstanz ( $FIC_a$ ) = MHK der Testsubstanz in Kombination / MHK der Testsubstanz allein

FIC Antibiotikum ( $FIC_b$ ) = MHK des Antibiotikums in Kombination / MHK des Antibiotikums allein

$$FICI = FIC_a + FIC_b$$

Ein FICI  $\leq 0,5$  ist ein Nachweis für Synergie, ein Wert zwischen  $>0,5$  und  $4,0$  bedeutet Indifferenz und bei  $>4,0$  besteht eine antagonistische Interaktion (Odds 2003).

Bevor eine komplette Checkerboard-Mikrotiterplatte für eine bestimmte Kombination pipettiert wurde, fand eine Voruntersuchung statt. Nach Bestimmung der antibakteriellen Aktivitäten des Antibiotikums und der Testsubstanz wurden drei kurze Verdünnungsreihen des Antibiotikums über vier bis fünf Verdünnungsstufen mit einem Viertel der MHK der Testsubstanz versetzt. Die Verdünnungsreihe des Antibiotikums wurde so gewählt, dass die höchste Antibiotikakonzentration der MHK des Antibiotikums entsprach. Zeigte sich eine Veränderung der Antibiotikaempfindlichkeit in Anwesenheit der Testsubstanz, folgte die fünfmalige Untersuchung mithilfe der Checkerboard-Mikrotiterplatte. Der Vorversuch wurde bei einem Viertel der MHK der Testsubstanz durchgeführt, da eine FICI  $\leq 0,5$  ausgeschlossen ist, wenn sich bei dieser Konzentration keine Veränderung zeigt.

### 3 Materialien

#### 3.1 Antibiotika

Ampicillin	Roth BBL
Aztreonam	Alpha Aesar
Gentamicinsulfat	PanReac AppliChem
Imipenem	Molekula
Piperacillin	Cayman Chemical Company
Vancomycin	Eberth

#### 3.2 Saponine

$\beta$ -Aescin	MERCK
Aescinum purissimum	Leipziger Arzneimittelwerk
Arjunglucoside 1	Isolationsprodukt aus AG Melzig
Asiaticosid	Isolationsprodukt aus AG Melzig
Asiaticosid A+B	Isolationsprodukt aus AG Melzig
Glycyrrhizinsäure	Roth
Hederacosid C	Roth
$\alpha$ -Hederin	Roth
Ivorenoside C	Isolationsprodukt aus AG Melzig
Parkioside B	Isolationsprodukt aus AG Melzig
Primulasaponin 1	AG Melzig
Rheediinoside A	Isolationsprodukt aus AG Melzig

Rheediinoside B	Isolationsprodukt aus AG Melzig
Sericoside	Isolationsprodukt aus AG Melzig
Zemoside A	Isolationsprodukt aus AG Melzig

### 3.3 Medien, weitere Chemikalien

Chlorogensäure	Roth
Kaffeesäure	Cayman Chemicals
Methanol, 100 %	VWR Chemicals
Rosmarinsäure	Cayman Chemicals
Rutin	Roth
Thymol	Sigma-Aldrich
Urolithin A	AG Kiss, Warschauer Medizinische Universität
Ursolsäure	Sigma-Aldrich
Mueller Hinton II Broth (Cation-Adjusted)	BD
Peressigsäure, 38-40 %	MERCK

### 3.4 Rohdrogen

Lichen islandicus	( <i>Cetraria islandica</i> L.)	Alfred Galke GmbH
Liquiritiae radix	( <i>Glycyrrhiza glabra</i> L.)	Alfred Galke GmbH
Lythri herba	( <i>Lythrum salicaria</i> L.)	Alfred Galke GmbH
Millefolii herba	( <i>Achillea millefolium</i> L.)	Alfred Galke GmbH
Plantaginis lanceolatae folium	( <i>Plantago lanceolata</i> L.)	Alfred Galke GmbH
Salviae officinalis folium	( <i>Salvia officinalis</i> L.)	Alfred Galke GmbH

Solidaginis virgaureae herba	( <i>Solidago virgaurea</i> L.)	Alfred Galke GmbH
Thymi herba	( <i>Thymus vulgaris</i> L.)	Alfred Galke GmbH
Uvae ursi folium	( <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> L.)	Alfred Galke GmbH

### 3.5 Bakterien

<i>Enterococcus faecium</i> BM4147	Stammsammlung Institut für Mikrobiologie und Infektionimmunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 5	Patientenisolat WV18630, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 6	Patientenisolat My5692, Charité Neurologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 7	Patientenisolat My5702, Charité Tumormedizin
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 8	Patientenisolat My5692, Medical Park Klinik Neurologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 9	Patientenisolat My5635, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 10	Patientenisolat My5682, Charité Tumormedizin
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 11	Patientenisolat My6031, Charité Hämatologie/Onkologie

<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 12	Patientenisolat My6075, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 13	Patientenisolat My6424, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 14	Patientenisolat My6473, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 16	Patientenisolat My6576, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 17	Patientenisolat My6986, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 18	Patientenisolat My6977, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 19	Patientenisolat My7019, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 20	Patientenisolat My7335, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 21	Patientenisolat My7336, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 22	Patientenisolat My7360, Charité Nephrologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 23	Patientenisolat My274, Charité Chirurgie

<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 24	Patientenisolat My284, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 25	Patientenisolat My348, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 26	Patientenisolat My306, Charité Nephrologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 27	Patientenisolat My318, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 28	Patientenisolat My321, Medical Park Klinik Neurologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 29	Patientenisolat My279, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 30	Patientenisolat My507, Charité Unfallchirurgie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 31	Patientenisolat My942, Charité Nephrologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 32	Patientenisolat My943, Charité Neurologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 33	Patientenisolat My1103, Evangelisches Geriatrizentrum Berlin
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 34	Patientenisolat My1079, Charité Hämatologie/Onkologie

<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 35	Patientenisolat My1111, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 36	Patientenisolat My1047, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 37	Patientenisolat My1023, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 38	Patientenisolat My1022, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 39	Patientenisolat My1004, Charité Nephrologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 40	Patientenisolat My1023 Keim 1, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 41	Patientenisolat My1023, Keim 2, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 42	Patientenisolat My1795, Charité Innere Infektiologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 43	Patientenisolat My1804, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 44	Patientenisolat My1807, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 45	Patientenisolat My1896, Charité Hämatologie/Onkologie

<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 46	Patientenisolat My1943, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 47	Patientenisolat My2202, Charité Nephrologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 48	Patientenisolat My2222, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 49	Patientenisolat My2324, Keim 1, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 50	Patientenisolat My2324, Keim 2, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 51	Patientenisolat My2433, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 52	Patientenisolat My2449, Charité Radioonkologie
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 53	Patientenisolat My2351, Charité Innere Medizin
<i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 54	Patientenisolat My2433, Charité Hämatologie/Onkologie
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Stammsammlung Institut für Mikrobiologie und Infektionimmunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin

<i>Enterococcus gallinarum</i>	Stammsammlung Institut für Mikrobiologie und Infektionimmunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Stammsammlung Institut für Mikrobiologie und Infektionimmunologie, Charité – Universitätsmedizin Berlin
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP Nr. 245	NRZ-00002, NRZ Bochum
<i>Klebsiella pneumoniae</i> KP Nr. 320	RKI-Nr. 84/14, RKI Wernigerode
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 241	NRZ-00425, NRZ Bochum
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 242	NRZ-01058, NRZ Bochum
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 264	Patientenisolat My6107 Charité Anästhesiologie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 288	Patientenisolat MV17857 Charité Anästhesiologie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 289	Patientenisolat MV17775 Charité Innere Medizin
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 309	Patientenisolat My2226, Keim 1, Charité Pädiatrie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 311	Patientenisolat My2226, Keim 2, Charité Pädiatrie
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 323	API: 9207002, Biomerieux

*Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 324

API: 9208009,  
Biomerieux

*Staphylococcus aureus* MRSA Nr. 25

Patientenisolat MV05384,  
Charité Innere Medizin

*Staphylococcus aureus* MRSA Nr. 28

Patientenisolat MV05033,  
Charité Unfallchirurgie

*Staphylococcus aureus* MRSA Nr. 29

Patientenisolat MV05662,  
Charité Unfallchirurgie

*Staphylococcus aureus* MRSA Nr. 38

Patientenisolat MV07309,  
Charité Dermatologie

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

Columbia-Agarplatten mit Schafblut plus

Oxoid Deutschland GmbH

Mikrotiterplatten, PS, 96 wells

Sarstedt

Stammhaltungssystem für Mikroorganismen CRYOANKTM

Mast Diagnostica

Sterilfilter, 0,22 µm, PVDF, steril

Clearpoint

### 3.7 Geräte

Analysenwaage R160 P

Sartorius research

BioPhotometer (600 nm)

Eppendorf

Drogenmühle

IKA-Werke

Eppendorf Brutschrank BB 16

Heraeus Instruments

Elektronische Pipette pipetus®

Hirschmann Laborgeräte

Kühlschrank

Bosch ecomonic

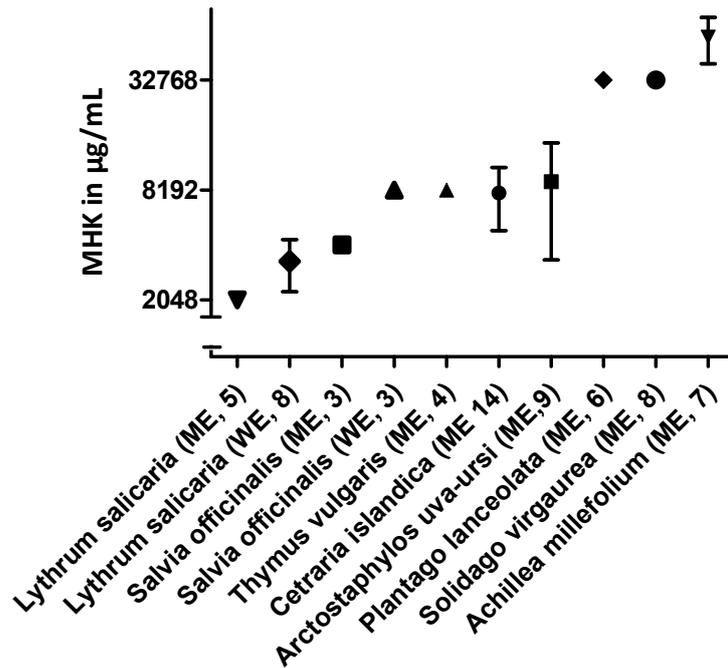
Laminar-Flow Sicherheitswerkbank MSC-II-48	Heraeus Instruments
Mikroliterpipetten 0,5-10 µl, 50-200 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Reference
Photometer (620 nm)	Tecan Spectra
Rotationsverdampfer, Rotavapor R-114	Büchi Labortechnik
Sieb (Siebgröße 4)	
Tiefkühlschrank (-20°C) GS 3002	Liebherr
Tiefkühlschrank (-86 °C) U570 Premium	New Brunswick Scientific
Tiefkühlschrank (-80°C) MDF-792	Sanyo
Transferpette-8 20-200 µL	Brand
Ultraschallbad, Sonorex RK100	Bandelin
Vakuumpumpe	Vacuubrand
Vortex-Mixer Lab dancer	VWR

## 4 Ergebnisse und Diskussion

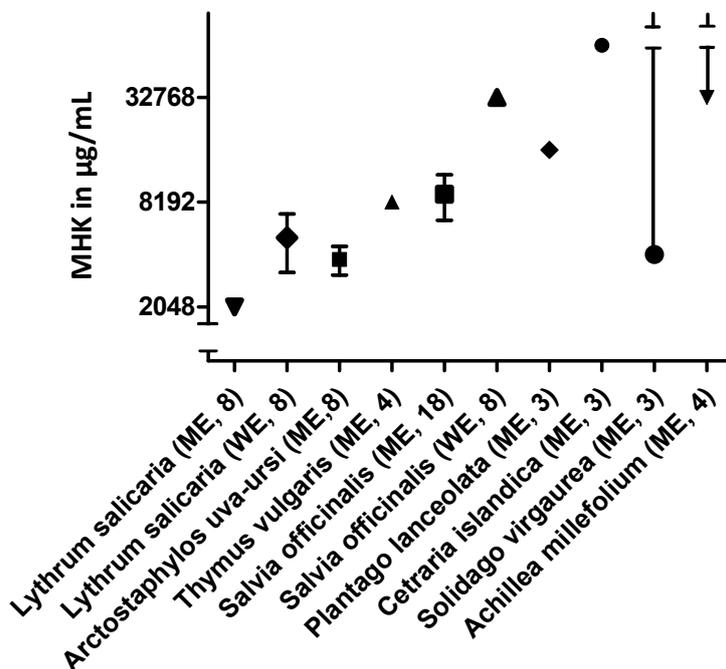
### 4.1 Antibakterielle Wirkungen der Pflanzenextrakte gegen *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* und *Staphylococcus aureus*

Bei den untersuchten gramnegativen Bakterienarten *Pseudomonas aeruginosa* (Abb. 2) und *Klebsiella pneumoniae* (Abb. 3) zeigten die methanolischen und wässrigen Extrakte eine geringere Aktivität im Vergleich zu den grampositiven Erregern *Enterococcus faecium* (Abb. 4) und *Staphylococcus aureus* (Abb. 5). Grund dafür ist vermutlich die Existenz der äußeren Membran bei den gramnegativen Bakterien, die für einen Ausschluss vor allem hydrophiler Substanzen sorgt. Von den untersuchten Extrakten waren die methanolischen den wässrigen in ihrer Wirkung meist überlegen. Die MHK-Werte waren entweder gleich oder um ein bis drei Verdünnungsstufen niedriger. Die stärkste Wirksamkeit bei den beiden grampositiven Bakterienarten *Enterococcus faecium* und *Staphylococcus aureus* zeigte mit MHK-Werten von 128 bzw. 256 µg/mL der methanolische Extrakt von *Cetraria islandica*. Verantwortlich dafür dürften vor allem die antibakteriellen Flechtensäuren sein, die zu 2 bis 3 % in den getrockneten Thalli vorkommen (Lauterwein *et al.* 1995, Nishanth *et al.* 2014). Verglichen mit den anderen Extrakten wies auch der methanolische Extrakt von *Salvia officinalis* mit ungefähr 512 µg/mL bei den Enterokokken und 256 µg/mL bei den Staphylokokken relativ niedrige MHK-Werte auf. Die MHK-Werte der übrigen Extrakte lagen bei den Enterokokken zwischen 1024 und 32768 µg/mL und bei den Staphylokokken zwischen 512 und 4096 µg/mL, wobei für den methanolischen Extrakt von *Solidago virgaurea* bei *Staphylococcus aureus* ein Wert von  $\geq 2048$  µg/mL ermittelt wurde.

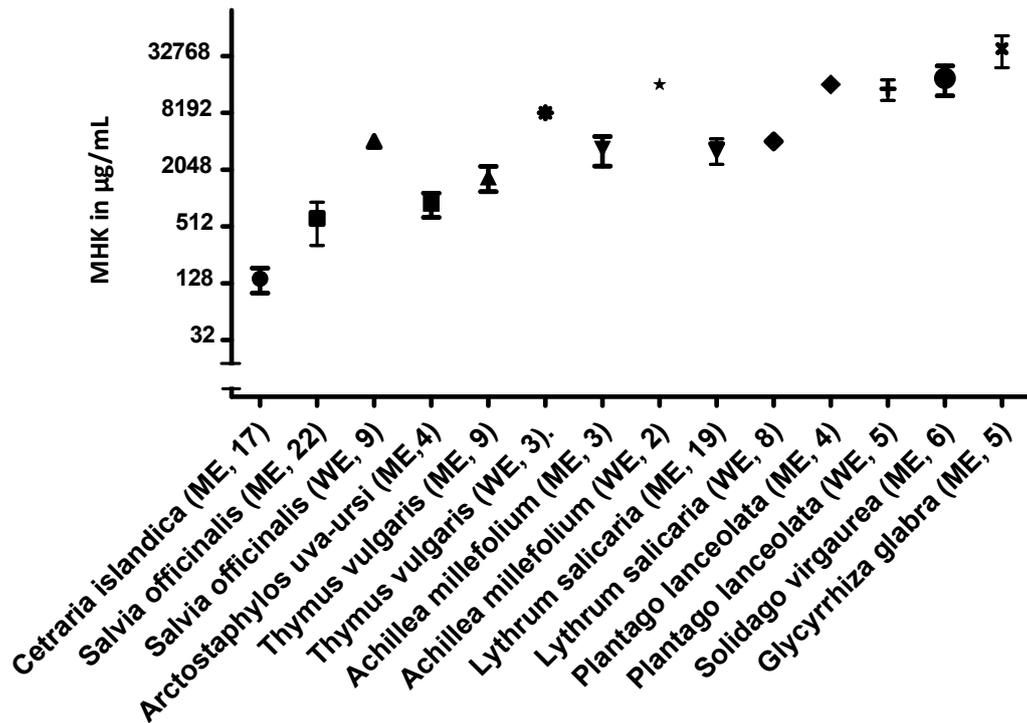
Dieser, bei den grampositiven Erregern besonders gut wirksame Extrakt, hemmte das Wachstum der gramnegativen Bakterienarten kaum. Die niedrigsten MHK-Werte erreichte bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae* der methanolische Extrakt von *Lythrum salicaria* mit 2048 µg/mL. Aber auch die methanolischen Extrakte aus *Salvia officinalis* bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Arctostaphylos uva-ursi* bei *Klebsiella pneumoniae*, beide mit einer MHK von 4096 µg/mL, wirkten stärker als die übrigen Extrakte deren MHK-Werte zwischen 8192 und 65536 µg/mL lagen. Die antibakteriellen Aktivitäten der verwendeten Einzelsubstanzen sind in der Tabelle 1 zusammengefasst (Anhang Tab. 1).



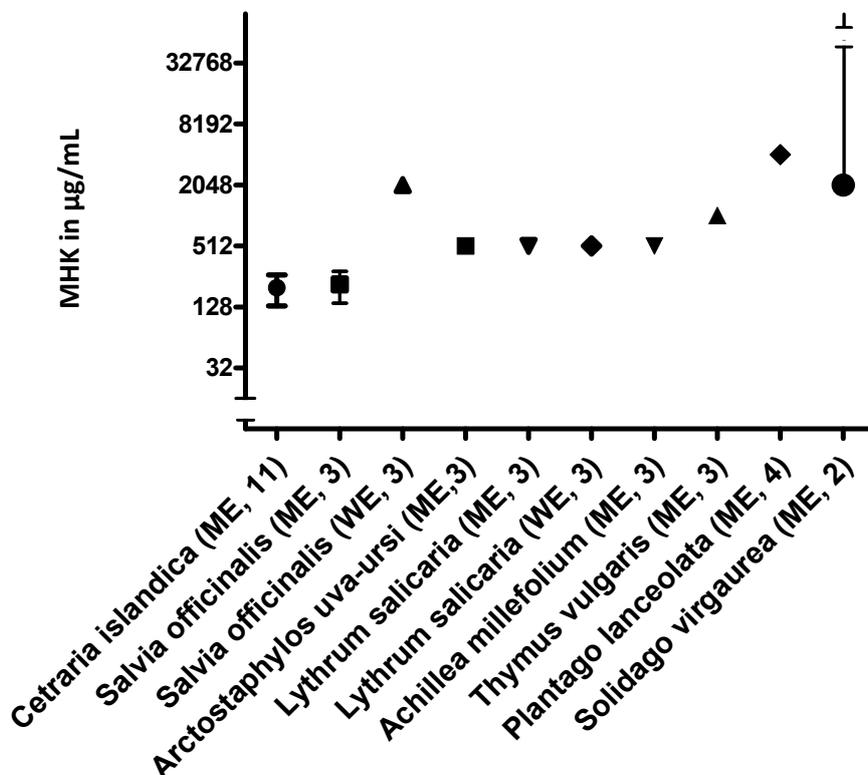
**Abb. 2:** Minimale Hemmkonzentration (MHK) acht methanolischer (ME) und zwei wässriger Extrakte (WE) bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289 im Mikrodilutionsverfahren. Anzahl der Versuchsdurchführung in Klammern. Mittelwert ± Standardabweichung.



**Abb. 3:** MHK acht methanolischer (ME) und zwei wässriger Extrakte (WE) bei *Klebsiella pneumoniae* KP Nr. 245. Anzahl der Versuchsdurchführung in Klammern. Mittelwert ± Standardabweichung.



**Abb. 4:** MHK neun methanolischer (ME) und fünf wässriger Extrakte (WE) bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Anzahl der Versuchsdurchführung in Klammern. Mittelwert ± Standardabweichung.



**Abb. 5:** MHK acht methanolischer (ME) und zwei wässriger Extrakte (WE) bei *Staphylococcus aureus* MRSA Nr. 29. Anzahl der Versuchsdurchführung in Klammern. Mittelwert ± Standardabweichung.

## 4.2 Enterokokken

Die Resistenz-modifizierenden Eigenschaften von Naturstoffen wurden an Enterokokken analysiert, weil diese über ein breites Spektrum an Resistenzen gegenüber vielen klinisch verwendeten Antibiotika verfügen (Tab. 1). Sie sind die zweit- bis dritthäufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen und häufig an Wundinfektionen beteiligt (Wendt *et al.* 1998). Diese sind im Gegensatz zu anderen Infektionsarten einer äußerlichen Therapie zugänglich, wodurch es möglich ist wesentlich höhere Konzentrationen des Adjuvants am Wirkort zu erreichen. Zur Analyse der Antibiotika-Naturstoff-Kombinationen diente der Referenzstamm *Enterococcus faecium* BM 4147, weil diese Art neben der Resistenz gegenüber dem Standardantibiotikum Ampicillin auch Resistenzen gegenüber dem Reserveantibiotikum Vancomycin zeigt, im Gegensatz zu der ebenfalls klinisch bedeutsamen Art *Enterococcus faecalis*, bei der Resistenzen gegen Vancomycin seltener vorkommen (Klare *et al.* 2012). In Tabelle 2 und 3 sind die FICI-Werte der verschiedenen Antibiotika-Naturstoff-Kombinationen bei *Enterococcus faecium* dargestellt.

**Tab. 2:** FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) und wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei *Enterococcus faecium* BM 4147 (FICI  $\leq 0,5$  synergistisch, FICI  $>0,5- 4,0$  indifferent, FICI  $>4,0$  antagonistisch (Odds 2003). Mittelwert von fünf Versuchen, n/c: kein Effekt bei  $\frac{1}{4}$  der MHK (Extrakt)).

	<i>Achillea millefolium</i> ME	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> ME	<i>Cetraria islandica</i> ME	<i>Glycyrrhiza glabra</i> ME	<i>Lythrum salicaria</i> ME	<i>Lythrum salicaria</i> WE
Ampicillin	n/c	<b>0,10</b>	n/c		<b>0,05</b>	n/c
Vancomycin	n/c	n/c	n/c		<b>0,26</b>	n/c
Gentamicin	<b>0,07</b>	n/c	<b>0,05</b>	<b>0,10</b>	n/c	n/c
Aztreonam	n/c	n/c	n/c		1,00	2,00
Imipenem	n/c	n/c	<b>0.26</b>		n/c	

**Tab. 3:** FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) und wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei *Enterococcus faecium* BM 4147 (FICI  $\leq 0,5$  synergistisch, FICI  $>0,5- 4,0$  indifferent, FICI  $>4,0$  antagonistisch (Odds 2003). Mittelwert von fünf Versuchen, n/c: kein Effekt bei  $\frac{1}{4}$  der MHK (Extrakt)).

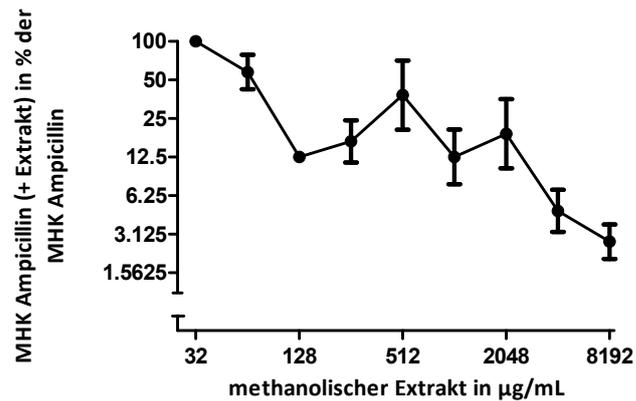
	<i>Plantago lanceolata</i> ME	<i>Salvia officinalis</i> ME	<i>Salvia officinalis</i> WE	<i>Solidago virgaurea</i> ME	<i>Thymus vulgaris</i> ME
Ampicillin	n/c	n/c	n/c	<b>0,03</b>	<b>0,31</b>
Vancomycin	n/c	<b>0,06</b>	0,59	1,00	n/c
Gentamicin	<b>0,30</b>	<b>0,19</b>	1,40	<b>0,05</b>	<b>0,31</b>
Aztreonam	n/c	n/c	n/c	1,00	n/c
Imipenem	<b>0,04</b>	n/c		n/c	<b>0,45</b>

#### 4.2.1 Synergistisch wirkende Kombinationen von Ampicillin mit Naturstoffen gegen *Enterococcus faecium*

Ampicillin ist das Standardtherapeutikum bei Enterokokkeninfektionen. Angewendet wird es sowohl bei leichten Infektionen wie z.B. Harnwegsinfekten, aber auch bei schweren Infektionen wie Endokarditiden, dann oft in Kombination mit weiteren Antibiotika wie Vancomycin oder Gentamicin. Die Ampicillinresistenz ist besonders bei *E. faecium* stark verbreitet. Die Resistenzraten im stationären Bereich liegen bei über 90 % und bei über 60 % im ambulanten Bereich (Klare et al. 2012). Ampicillinresistente *E.-faecium*-Isolate exprimieren Penicillin-bindende Proteine, die eine geringere Affinität zu Ampicillin zeigen, wodurch die MHK meist bei über 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  liegt (Cetinkaya et al. 2000). Zur Untersuchung des Einflusses von Pflanzenextrakten bzw. Einzelstoffen auf die Ampicillinresistenz von *Enterococcus faecium* diente das Isolat BM 4147. Dabei handelt es sich um ein mittlerweile als Referenzstamm verwendetes klinisches Isolat das 1986 aus dem Fäzes eines Leukämiepatienten gewonnen wurde. Das Isolat weist eine Vancomycinresistenz vom VanA-Typ auf, obwohl beim Patienten zuvor keine Behandlung mit Vancomycin stattfand, allerdings befand sich der Patient auf einer Station auf der Vancomycin verwendet wurde (Leclercq et al. 1988). Die MHK für Ampicillin liegt bei 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anhang Tab. 2) und ist damit nach den Kriterien der EUCAST im intermediären Bereich, Sensibilität besteht bei einer MHK  $\leq 4 \mu\text{g}/\text{mL}$  und ab 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  beginnt der resistente Bereich (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018).

Von den acht untersuchten methanolischen Extrakten zeigten die Extrakte der oberirdischen Pflanzenteile von *Solidago virgaurea*, *Lythrum salicaria* und *Thymus vulgaris* sowie der Extrakt aus den Blättern von *Arctostaphylos uva-ursi* synergistische Wirkungen in Kombination mit Ampicillin (Tab. 2, 3). Der Extrakt von *Solidago virgaurea* zeigte mit einem FICI-Wert von 0,03 die stärkste Synergie und

die antibakterielle Aktivität war mit einer MHK von 16384 µg/mL niedriger als bei allen anderen untersuchten Extrakten, mit Ausnahme des Extraktes von *Plantago lanceolata*, der eine vergleichbare antibakterielle Wirksamkeit aufwies (Abb. 4). Eine Extraktkonzentration von *Solidago virgaurea* von 8192 µg/mL verringerte die MHK von Ampicillin von 8 µg/mL auf 0,125 – 0,250 µg/mL. Um die Sensibilität gegenüber Ampicillin zu erhöhen, waren Extraktkonzentrationen von mindestens 64 µg/mL notwendig (Abb. 6).

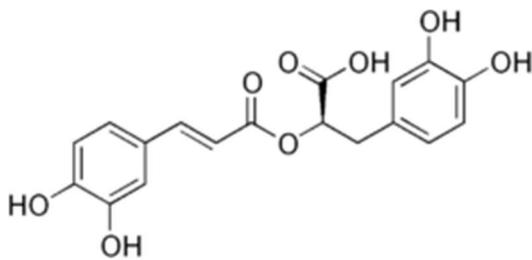


**Abb. 6:** Einfluss von *Solidago virgaurea* auf die MHK von Ampicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 0,25 µg/mL; FICI: 0,03. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

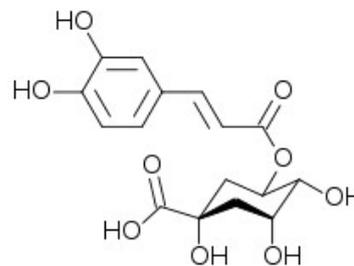
Zur Identifizierung der für diesen Effekt verantwortlichen Einzelkomponenten wurden die Wechselwirkungen zwischen Ampicillin und drei Polyphenolsäuren und einem Flavonoid untersucht. Der Gehalt an Polyphenolsäuren der oberirdischen Pflanzenteile ist abhängig vom Untersuchungszeitpunkt und dem Standort der Pflanze. Er liegt bei ungefähr 400 mg/100 g kann aber bis zu 1200 mg/100 g erreichen (European Medicines Agency 2008, Roslon *et al.* 2014). Die Fraktion der Polyphenolsäuren besteht im Wesentlichen aus Rosmarinsäure, Chlorogensäure, Kaffeesäure, Salicylsäure, p-Hydroxybenzoesäure, p-Cumarsäure, Protocatechusäure, Gentisinsäure, Ferulasäure und Sinapinsäure. Der Gehalt an Rosmarinsäure ist mit durchschnittlich 577,52 mg/100 g doppelt so hoch wie der an Chlorogensäure mit durchschnittlich 267,03 mg/100 g (Roslon *et al.* 2014).

Hinsichtlich der Wechselwirkung mit Ampicillin wurden die Polyphenolsäuren Rosmarinsäure (Abb. 7), Chlorogensäure (Abb. 8) und Kaffeesäure (Abb. 9) überprüft. Die antibakterielle Aktivität gegenüber dem Referenzstamm *Enterococcus faecium* BM 4147 war mit einer MHK von 8192 µM für Chlorogensäure und Kaffeesäure gleich stark, die MHK für Rosmarinsäure lag oberhalb von 2775 µM (Anhang Tab. 1). Diese Werte liegen, verglichen mit Angaben aus der Literatur, für *Enterococcus faecalis* deutlich höher. So hat Özçelik *et al.* (Özçelik *et al.* 2017) an einem Referenzstamm (ATCC

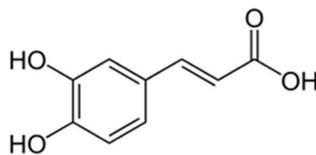
29212) MHK-Werte von 23  $\mu\text{M}$  (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) für Chlorogensäure und 44  $\mu\text{M}$  (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) für Kaffeesäure und an einem klinischen Isolat für Chlorogensäure 361  $\mu\text{M}$  (128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) und für Kaffeesäure 710  $\mu\text{M}$  (128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) ermittelt. Rungsimakan *et al.* bestimmte an dem Referenzstamm ATCC 775 für Kaffeesäure einen Wert von 100  $\mu\text{M}$  und für Rosmarinsäure 200  $\mu\text{M}$  (Rungsimakan & Rowan 2014). Weitere Werte aus der Literatur für Rosmarinsäure sind >355  $\mu\text{M}$  (128  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) an ATCC 29212 (Kubínová *et al.* 2014) und >1110  $\mu\text{M}$  (400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) an ATCC 4082 (Bernardes *et al.* 2010). Eine mögliche Erklärung für die höheren MHK-Werte bei *Enterococcus faecium* im Gegensatz zu *Enterococcus faecalis* wäre das höhere Ausmaß an Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotikaklassen, die teilweise auf Permeabilitätsveränderungen der Bakterienmembran beruhen.



**Abb. 7:** Rosmarinsäure

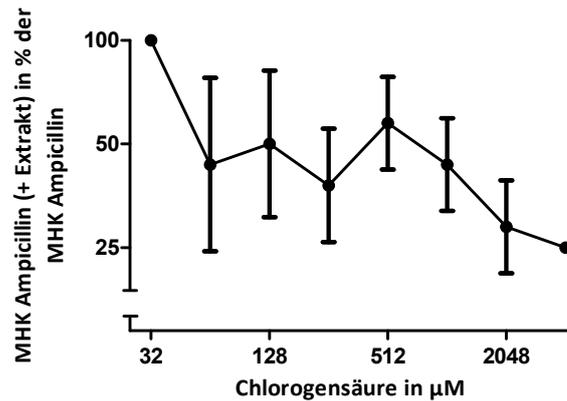


**Abb. 8:** Chlorogensäure

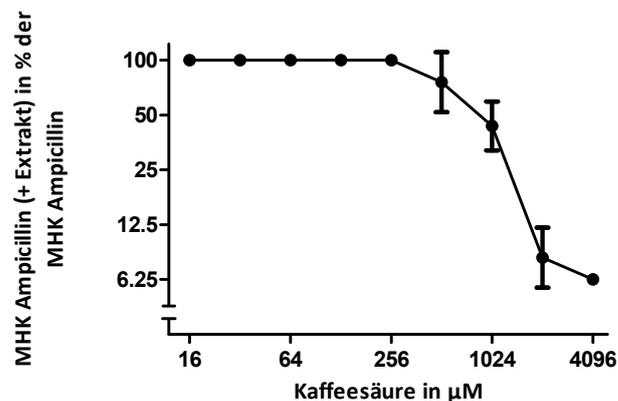


**Abb. 9:** Kaffeesäure

Alle drei untersuchten Polyphenolsäuren erhöhten die Empfindlichkeit von *Enterococcus faecium* gegenüber Ampicillin. Rosmarinsäure und Chlorogensäure führten bei Konzentrationen von 2775  $\mu\text{M}$  bzw. 2048  $\mu\text{M}$  zur Reduktion der MHK für Ampicillin von 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  zu 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Abb. 10), während Kaffeesäure die MHK bei 2048  $\mu\text{M}$  auf 0,5 bis 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  verringerte (Abb. 11). Chlorogensäure führte schon bei 64  $\mu\text{M}$  zu Veränderungen, bei der Kaffeesäure waren dafür Konzentrationen von 512  $\mu\text{M}$  notwendig. Obwohl die Rosmarinsäure über zwei *ortho*-Diphenolgruppen verfügt, während Chlorogensäure und Kaffeesäure nur eine aufweisen, ist sie in Bezug zur Wechselwirkung mit Ampicillin nicht stärker wirksam als diese, vielmehr ist die Kaffeesäure der Rosmarinsäure in ihrer Wirkung überlegen.

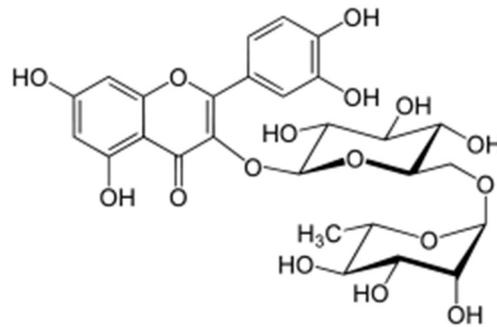


**Abb. 10:** Einfluss von Chlorogensäure auf die MHK von Ampicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FICI: 0,26. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



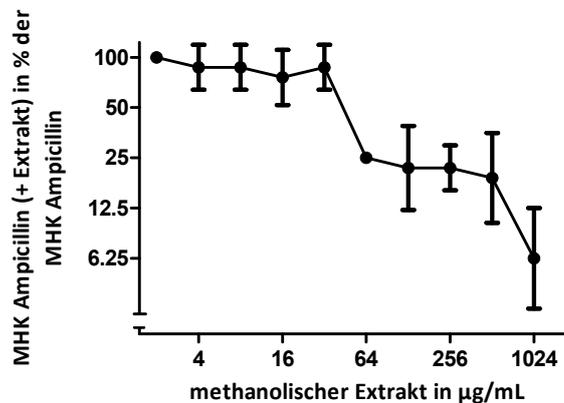
**Abb. 11:** Einfluss von Kaffeesäure auf die MHK von Ampicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FICI: 0,16. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Das Flavonoid Rutin (Abb. 12), ein Glycosid des Quercetin mit dem Disaccharid Rutinose mit einem Gehalt in der Droge von 0,8 % (Wagner & Bladt 1996), wurde in der Konzentration 328  $\mu\text{M}$  untersucht und führte weder zu einer Wachstumshemmung noch erhöhte es die Empfindlichkeit gegenüber Ampicillin. Polyphenolsäuren sind zumindest teilweise für die synergistischen Wirkungen zwischen dem methanolischen Extrakt von *Solidago virgaurea* und Ampicillin auf *Enterococcus faecium* verantwortlich. Diese Aktivität ist nicht auf nur einen Vertreter der Polyphenolsäuren beschränkt und es erscheint wahrscheinlich, dass auch noch weitere Einzelkomponenten dieser Fraktion, die nicht untersucht wurden, an der Gesamtwirkung beteiligt sind.



**Abb. 12:** Rutin

Eine ausgeprägte Synergie mit Ampicillin zeigte sich außerdem bei dem Extrakt von *Arctostaphylos uva-ursi* (FICI: 0,10) (Abb. 13). Die antibakterielle Aktivität des Bärentraubenextraktes lag bei einer MHK von 2048  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Abb. 4). Bei 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  betrug die Empfindlichkeitssteigerung von Ampicillin drei bis fünf Verdünnungsstufen, eine Verringerung der MHK von 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 0,25 – 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die geringste Konzentration, bei der sich zuverlässig Veränderungen zeigten, war 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



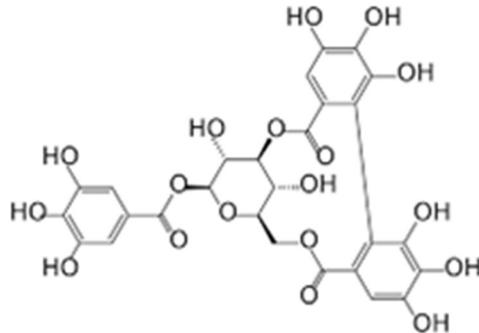
**Abb. 13:** Einfluss von *Arctostaphylos uva-ursi* auf die MHK von Ampicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 0,25 – 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FICI: 0,10. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Die antibakterielle Wirkung von Extrakten von *Arctostaphylos uva-ursi* auf unterschiedliche Bakterienarten ist vielfach nachgewiesen (European Medicines Agency 2012). Im Agardiffusionstest mit *Enterococcus faecalis* entfaltete der ethanolische Extrakt eine vergleichbare Wirkung wie Streptomycin. Berücksichtigen sollte man hier jedoch die relative geringe Aktivität der Aminoglykoside aufgrund der intrinsischen Resistenz der Enterokokken (Holopainen *et al.* 1988). Das Ausmaß der antibakteriellen Aktivität eines Extraktes von Bärentraubenblättern hängt im hohen Maße von der

Zusammensetzung des Extraktionsmittels ab, so sinkt diese mit steigendem Ethanolgehalt und geringer werdendem Wasseranteil (European Medicines Agency 2012). Dykes *et al.* haben den Einfluss eines ethanolischen Extraktes auf die Oberflächenhydrophobizität einer Vielzahl von Bakterien nachgewiesen, es kam zu Erhöhungen und Verringerungen der Hydrophobizität. Ein Referenzstamm von *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) zeigte mit einer Steigerung der Anheftung an Xylol um 66,79 % den stärksten Effekt (Dykes *et al.* 2003). Annuk *et al.* vermuten, dass der Einfluss auf die Oberflächenhydrophobizität durch die in den Bärentraubenblättern enthaltenen Tannine vermittelt wird (Annuk *et al.* 1999). Da die Oberflächenhydrophobizität mit einer Steigerung der Pathogenität durch erleichtertes Eindringen der Bakterien in die Wirtszellen in Verbindung gebracht wird, ist dieser Umstand insbesondere durch den breiten Einsatz von Bärentraubenblättern bei Harnwegsinfektionen äußerst bemerkenswert, da *Enterococcus faecalis* der am zweithäufigsten isolierte Erreger bei Harnwegsinfektionen ist. Auch beim häufigsten Erreger *Escherichia coli* kam es zu einer Steigerung der Oberflächenhydrophobizität um 20,35 %. Aufgrund der Komplexität der Beziehung zwischen Wirt und Krankheitserreger sollte der Einfluss der Oberflächenhydrophobizität noch weiter untersucht werden, bevor hieraus Schlussfolgerungen für die therapeutische Praxis gezogen werden (Dykes *et al.* 2003, Knappe 2003). Eine erhöhte Oberflächenhydrophobizität kann auch zu einer verringerten Pathogenität führen, zum Beispiel wenn das Penetrationsverhalten durch Schleimhautschichten eine Rolle spielt (Annuk *et al.* 1999). Des Weiteren ist auch eine Überlagerung dieses Umstandes durch die relativ starken antibakteriellen Effekte des Extraktes denkbar. Diese werden im Wesentlichen durch das Hydrochinonderivat Arbutin vermittelt, ein Glykosid des antibakteriell wirkenden Hydrochinons. Die Wirkung von Arbutin ist damit direkt von der  $\beta$ -Glucosidaseaktivität der betreffenden Bakterienart abhängig. In einer Untersuchung von Jahodář *et al.* bei verschiedenen Erregern von Harnwegsinfektionen weist *Enterococcus faecalis* eine der höchsten Enzymaktivitäten auf. Die minimalen Hemmkonzentrationen für Arbutin bei den untersuchten Erregern lagen zwischen 4 und 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (European Medicines Agency 2012).

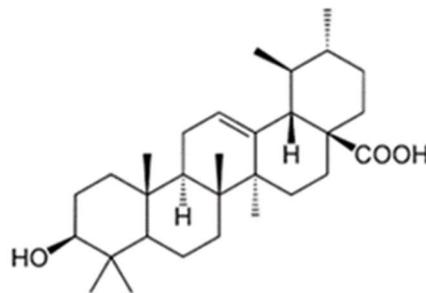
Ursache für die Sensibilitätssteigerung gegenüber Ampicillin in Gegenwart des Bärentraubenblätterextraktes könnte eine verstärkte Penetration des lipophilen Antibiotikums ( $\log P = 1,35$ ) (Sangster 1987) in die Bakterienzelle aufgrund der erhöhten Oberflächenhydrophobizität sein. Die Gerbstoffe der Bärentraubenblätter sind vermutlich noch für einen weiteren Wirkmechanismus verantwortlich. Das mit 0,05 % in den Blättern enthaltene Ellagitannin Corilagin (Abb. 14) erwies sich als synergistisch wirksam in Kombination mit dem  $\beta$ -Laktam Oxacillin bei MRSA-Isolaten. Die Resistenz dieser Isolate gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika beruht auf der Produktion von Penicillin-bindenden Proteinen, in diesem Fall PBP2', die eine deutlich verringerte Bindungsaffinität zu  $\beta$ -Laktamen besitzen. Das Corilagin hemmt wahrscheinlich die Aktivität der PBP2' und da die Resistenz der Enterokokken

gegenüber  $\beta$ -Laktamantibiotika im Wesentlichen durch eine verringerte Bindungsaffinität der Penicillin-bindenden Proteine hervorgerufen wird, ist hier ein ähnlicher Wirkmechanismus denkbar (Shimizu *et al.* 2001, Blaschek 2007).

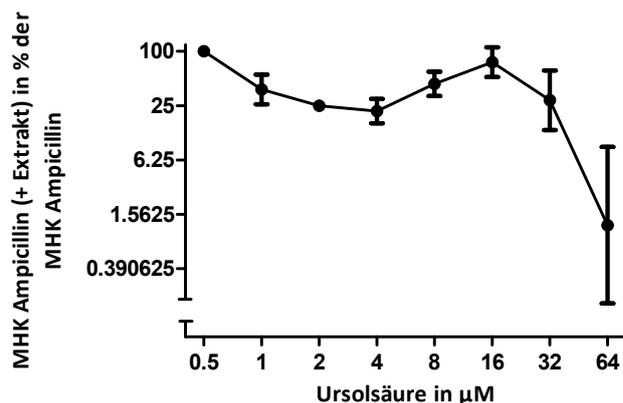


**Abb. 14:** Corilagin

Neben den Gerbstoffen trägt auch die in den Bärentraubenblättern mit 0,4 bis 0,75 % enthaltene Triterpensäure Ursolsäure (Abb. 15) zu der synergistischen Wirkung bei (Blaschek 2007). Sie steigerte ab Konzentrationen von 1  $\mu$ M die Ampicillinempfindlichkeit von *Enterococcus faecium* und führte bei 64  $\mu$ M zu einer Reduktion der MHK von 8  $\mu$ g/mL auf 0,016 – 2  $\mu$ g/mL (FICI= 0,07) (Abb. 16). Die antibakterielle Wirkung der Ursolsäure war mit einer MHK von 128  $\mu$ M verglichen mit den anderen untersuchten Einzelkomponenten relativ stark (Anhang Tab. 1).



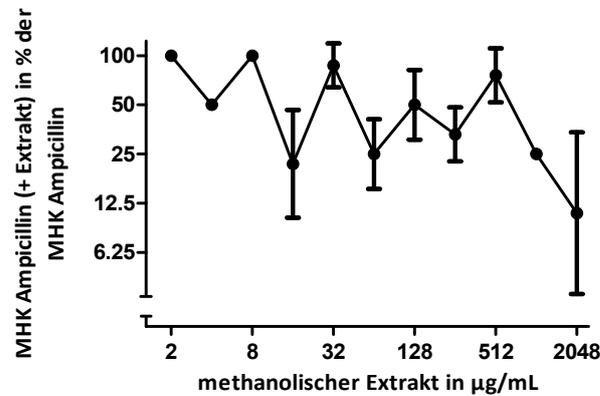
**Abb. 15:** Ursolsäure



**Abb. 16:** Einfluss von *Ursolsäure* auf die MHK von Ampicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 2 - 0,016 µg/mL; FICI: 0,07. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

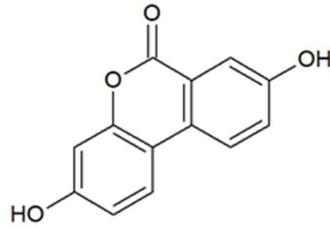
Der methanolische Extrakt von *Lythrum salicaria* zeigte ebenso eine ausgeprägte Synergie mit Ampicillin auf *Enterococcus faecium* (FICI= 0,05), während der wässrige Extrakt die MHK von Ampicillin nicht beeinflusste. Die antibakteriellen Aktivitäten des methanolischen wie des wässrigen Extraktes waren mit einer MHK von 4096 µg/mL eher schwach ausgeprägt (Abb. 4). Daten bezüglich der Wirkung von *Lythrum salicaria* auf Enterokokken waren in der Literatur nicht zu finden, nachgewiesen ist die antibakterielle Wirkung unter anderem auf *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*. Im Wesentlichen scheint dafür der Gehalt an Vescalagin, ein C-glykosidisches Ellagitannin mit dem höchsten Anteil an der Ellagitannin-Fraktion dieser an Ellagitanninen reichen Droge verantwortlich zu sein (Becker *et al.* 2005; Piwowarski *et al.* 2015). Obwohl die antibakterielle Aktivität deutlich schwächer als beim Bärentraubenblätterextrakt war, ist die Empfindlichkeitssteigerung gegenüber Ampicillin von 8 µg/mL zu Werten zwischen 0,25 und 2 µg/mL bei der höchsten untersuchten Konzentration und die geringste Extraktkonzentration, bei der sich Veränderungen zeigten (32 µg/mL), ähnlich (Abb. 17). Als Ursache der synergistischen Wirkung des Extraktes ist auch hier ein Einfluss der Tannine auf die Oberflächenhydrophobizität denkbar, jedoch zeigte der wässrige Extrakt keine Wirkung. Aufgrund der Wasserlöslichkeit der Ellagitannine, bedingt durch die Anzahl der Biarylbindungen (Quideau 2009), sind sie auch im wässrigen Extrakt vorhanden. Obwohl im Extrakt verschiedene Tannine vorkommen, jedoch kein Corilagin, ist ein ähnlicher Wirkmechanismus wie bei Corilagin unwahrscheinlich, denn im Gegensatz zum Bärentraubenblätterextrakt fehlt hier die synergistische Wirkung mit Ampicillin bei MRSA (Tab. 5). Eine Rolle in der synergistischen Gesamtwirkung des Extraktes spielen die bereits oben erwähnten untersuchten Einzelkomponenten Kaffeesäure, Chlorogensäure und Ursolsäure, die alle in dieser Pflanzenart vorkommen. Obwohl die Chlorogensäure aufgrund ihrer, wenn auch schwach ausgeprägten, Hydrophilie im wässrigen Extrakt im nennenswerten Ausmaß vorhanden sein sollte, reichte die Konzentration nicht für eine

Beeinflussung der Ampicillin-MHK aus. Die fehlende Wirksamkeit des wässrigen Extraktes liegt vermutlich an der Abwesenheit lipophiler Inhaltsstoffe wie z.B. Steroide, Triterpene, Phthalate oder Coumarine (Piwowarski *et al.* 2015).

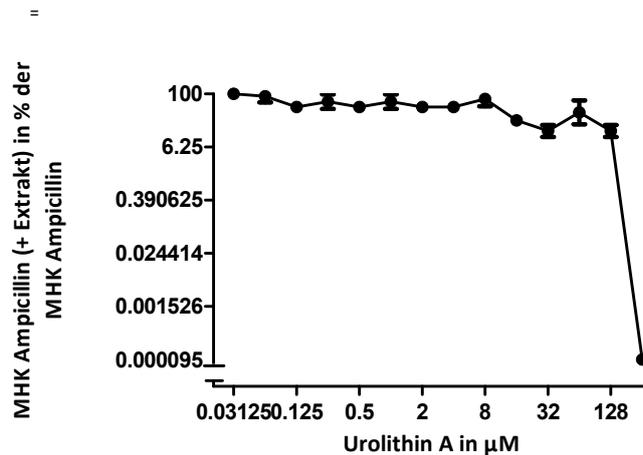


**Abb. 17:** Einfluss von *Lythrum salicaria* auf die MHK von Ampicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 0,25 - 2 µg/mL; FICI: 0,05. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Des Weiteren wurde mit Urolithin A (Abb. 18) eine Substanz untersucht die nicht in den verwendeten Extrakten vorkommt, jedoch ein Metabolit der Ellagitannine ist. Das Dibenzopyran-6-on-Derivat wird von Bakterien der Darmflora gebildet und zeigt eine gute Bioverfügbarkeit. Nach der Einnahme Ellagitannin-reicher Lebensmittel wie z.B. mit Eichenholz gelagerter Rotwein, Granatapfelsaft, Walnüsse, Mandeln, Haselnüsse, Erdbeeren oder Himbeeren sind Urolithine in mikromolaren Konzentrationen in Blut und Urin nachweisbar. Sie weisen antiinflammatorische und stark antioxidative Eigenschaften auf und führten auch in dieser Untersuchung zu einer Empfindlichkeitssteigerung von *Enterococcus faecium* gegenüber Ampicillin (FICI=  $\leq 0.0002$ ) (Abb. 19) (Piwowarski *et al.* 2014). Schon Konzentrationen von 0,125 µM führten zur Verschiebung der Ampicillin-MHK um eine Verdünnungsstufe. Aufgrund der Löslichkeit im Medium war die höchste untersuchte Konzentration 256 µM, diese senkte die MHK von Ampicillin im bemerkenswerten Ausmaß von 8 µg/mL auf  $\leq 0,000008$  µg/mL. Eine Inhibition des Bakterienwachstums ohne Antibiotikum konnte bei 256 µM Urolithin A nicht festgestellt werden. Mit 16 µM Urolithin A wurde die MHK auf 2 µg/mL gesenkt, eine Konzentration die vergleichbar ist mit der Blutkonzentration einiger Probanden nach Einnahme von Granatapfelsaft über fünf Tage (bis zu 18,6 µM, Gesamturoolithingehalt) (Cerde *et al.* 2004).



**Abb. 18:** Urolithin A



**Abb. 19:** Einfluss von Urolithin A auf die MHK von Ampicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf  $<0.000008 \mu\text{g/mL}$ ; FICI:  $<0.0002$ . Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Verglichen mit den bisher genannten Extrakten weist der methanolische Extrakt aus den oberirdischen Teilen von *Thymus vulgaris* nur eine relativ schwache Synergie mit Ampicillin auf (FICI= 0,31) (Anhang Abb. 1). Veränderungen der Ampicillin-MHK traten ab Konzentrationen von  $64 \mu\text{g/mL}$  auf und in der höchsten Konzentration von  $512 \mu\text{g/mL}$  wurde die MHK von 8 auf  $2 \mu\text{g/mL}$  gesenkt. Der methanolische Extrakt inhibierte das Wachstum von *Enterococcus faecium* ab  $2048 \mu\text{g/mL}$  während beim wässrigen Extrakt  $8192 \mu\text{g/mL}$  erforderlich waren (Abb. 4). Angaben zur antimikrobiellen Wirkung von Extrakten des Thymiankrauts sind in der Literatur selten zu finden. De Olivera *et al.* stellten bei  $50 \mu\text{g/mL}$  noch keine Wachstumshemmung von *Enterococcus faecalis* fest während Essawi *et al.* im Agardiffusionstest ähnliche Ergebnisse hinsichtlich der Wachstumshemmung von *Enterococcus faecalis* für den Dichlormethan-Methanol-Extrakt wie für den wässrigen Extrakt erhielten (de Olivera *et al.* 2017, Essawi & Srour 2000). Die antimikrobielle Wirkung des ätherischen Öles ist deutlich besser untersucht, MHK-Werte für klinische Isolate von *Enterococcus faecium* reichen von  $0,25 - 0,75 \mu\text{L/mL}$  (Sienkiewicz *et al.* 2012) bis  $0,5 - 1,0 \%$  (v/v) (Nelson 1997). Die stärkere Wachstumshemmung des methanolischen Extraktes im Vergleich zum wässrigen Extrakt könnte auf den höheren Gehalt des methanolischen Extraktes an ätherischem Öl, trotz Einengung im

Rotationsverdampfer, zurückzuführen sein. Das ätherische Öl von *Thymus vulgaris* besteht zu 30 bis 70 % aus dem Monoterpen Thymol (Hänsel & Sticher 2007). Neben Carvacrol und Menthol eine Komponente von ätherischen Ölen, die mit die stärksten antibakteriellen Wirkungen zeigt (Soković *et al.* 2007). Beim hier untersuchten Stamm *Enterococcus faecium* BM 4147 lag die MHK von Thymol bei 2,00 mM und damit unter den minimalen Hemmkonzentrationen bei *Enterococcus faecalis* mit 512 µg/mL (3,41 mM) von Veras *et al.* und 1000 – 1200 µg/mL (6,66 – 7,99 mM) von Gutiérrez-Fernández *et al.* (Veras *et al.* 2017, Gutiérrez-Fernández *et al.* 2013). Das antibakterielle Carvacrol, ein Konstitutionsisomer des Thymols, ist im ätherischen Öl des Thymiankrautes mit 3 bis 15 % geringer konzentriert, wirkt jedoch synergistisch in Kombination mit Thymol (Hänsel & Sticher 2007, Gutiérrez-Fernández *et al.* 2013). Ebenso potenziert p-Cymene mit einem Gehalt von 16 – 19 % die antibakterielle Wirkung von Carvacrol, selbst weist es jedoch keine antibakterielle Wirkung auf (Hyldgaard *et al.* 2012, Melo *et al.* 2015). Bei Konzentrationen von 499 µM rief Thymol keine Veränderung der MHK für Ampicillin hervor, ein für den Nachweis der Synergie notwendigen FICI von  $\leq 0,5$  ist damit ausgeschlossen. Zur Wechselwirkung des methanolischen Extraktes mit Ampicillin tragen die im Thymiankraut enthaltenden Phenolsäuren Kaffeesäure, Chlorogensäure und Rosmarinsäure sowie das Triterpen Ursolsäure bei (Hänsel & Sticher 2007).

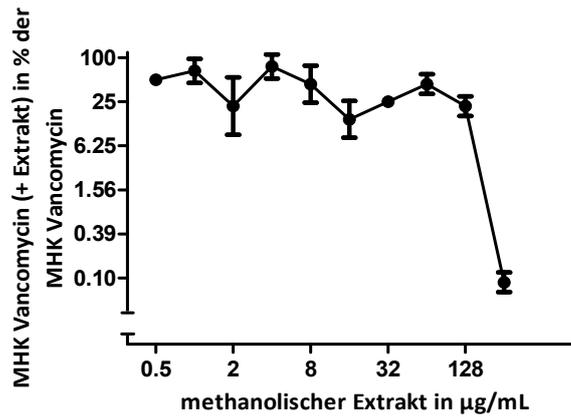
Die anderen untersuchten Extrakte beeinflussten nicht die MHK von Amicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147 (Tab. 2, 3), trotz des Gehaltes an Chlorogensäure in *Plantago lanceolata* und an Rosmarinsäure in *Salvia officinalis* (Beara *et al.* 2012, Generalic *et al.* 2012).

Hacioglu *et al.* konnten an einem sensiblen klinischen Isolat von *Enterococcus faecalis* die Synergie zwischen Ampicillin und einem wässrigen Auszug von Granatapfelblüten (*Punica granatum* L.) nachweisen (FICI = 0,5). Am ebenfalls Ampicillin-sensiblen Referenzstamm *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 trat jedoch bei dieser Kombination keine Synergie mehr auf (FICI = 0,7) (Hacioglu *et al.* 2017). Das in den Früchten und Blättern vorkommende Corilagin, von dem die Resistenz-modifizierende Wirkung belegt ist, wurde in den Blüten nicht nachgewiesen (Rahimi *et al.* 2012, Wu & Tian 2017). Der methanolische Extrakt der Rinde von *Azelia africana* zeigte synergistische Wirkungen mit Ampicillin bei *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (Aiyegoro *et al.* 2011). Für Stoffe anderen Ursprungs ergab die Literaturrecherche kaum synergistische Kombinationen, abgesehen von anderen Antibiotika oder  $\beta$ -Laktamaseinhibitoren bei den wenig verbreiteten  $\beta$ -Laktamase-positiven *Enterococcus-faecalis*-Isolaten (Hoellman *et al.* 1998). Nur ein antimikrobielles Peptid von *Bacillus amyloliquefaciens* zeigte an drei Ampicillin-resistenten *Enterococcus-faecium*-Isolaten Synergie mit Ampicillin (FICI = 0,093 – 0,312) (Regmi *et al.* 2017).

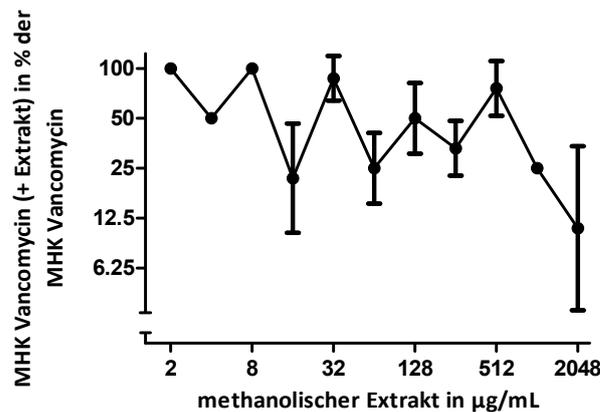
#### 4.2.2 Synergistisch wirkende Kombinationen von Vancomycin mit Naturstoffen gegen *Enterococcus faecium*

Vancomycin ist ein wichtiges Reserveantibiotikum bei lebensbedrohlichen Enterokokkeninfektionen wie Endokarditiden oder Septikämien. Resistenzen gegen dieses Antibiotikum beruhen auf Zielstrukturveränderungen, wodurch die Bindungsaffinität des Vancomycins stark reduziert wird. Von den beiden klinisch bedeutenden Arten *E. faecalis* und *E. faecium* kommen Vancomycinresistenzen fast nur bei *E. faecium* mit Resistenzraten von ungefähr 12 % vor (European Centre for Disease Prevention and Control 2016). Die Kombination von Extrakten und Vancomycin wurde an *Enterococcus faecium* BM 4147 durchgeführt, der eine Resistenz von VanA-Typ besitzt und eine MHK von 512 µg/mL aufweist. Als resistent gelten Isolate mit MHK-Werten oberhalb von 4 µg/mL, Sensibilität liegt vor bei ≤4 µg/mL (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018).

Von den acht untersuchten methanolischen Extrakten kam es bei *Salvia officinalis* (FICI: 0,06) (Abb. 20) und *Lythrum salicaria* (FICI: 0,26) (Abb. 21) zu synergistischen Wechselwirkungen mit Vancomycin. Um die Vancomycinresistenz aufzuheben, waren bei *Salvia officinalis* Konzentrationen von 256 µg/mL erforderlich, die zu einer MHK von 0,5 µg/mL führten. Schon ab einer Extraktkonzentration von 0,5 µg/mL traten Veränderungen der Vancomycin-MHK auf. Der wässrige Extrakt zeigte statt einer Synergie nur additive Wirkungen und verringerte die Vancomycin-MHK auf 32 bis 64 µg/mL (FICI: 0,59) (Tab. 3) Die antibakterielle Wirkung des Salbeiblätterextraktes war mit einer MHK von 512 bis 1024 µg/mL nach Isländisch Moos die zweitstärkste von den neun untersuchten Extrakten (Abb. 4). Sie ist ähnlich wie die von Horiuchi *et al.* ermittelte Aktivität eines Acetonextraktes bei VRE (MHK: 256 - 512 µg/mL). Die antibakterielle Wirkung des wässrigen Extraktes war mit einer MHK von 4096 µg/mL schwächer ausgeprägt. Wirksame Komponenten sind neben dem ätherischen Öl (MHK: 3,42 µg/mL bei *E. faecalis*) auch die enthaltene Oleanolsäure (MHK: 8 µg/mL bei *E. faecium*) (Horiuchi *et al.* 2007, Pierozan *et al.* 2009). Der Extrakt von *Lythrum salicaria* war nicht in der Lage die Resistenz gegenüber Vancomycin aufzuheben. Bei der Hälfte der MHK des Extraktes (2048 µg/mL) reduzierte sich die Vancomycin-MHK auf Werte zwischen 16 und 128 µg/mL. Der wässrige Extrakt von *Lythrum salicaria* zeigte keine Beeinflussung der Vancomycin-MHK.



**Abb. 20:** Einfluss von *Salvia officinalis* auf die MHK von Vancomycin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 512 auf 0,5 µg/mL; FICI: 0,06. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



**Abb. 21:** Einfluss von *Lythrum salicaria* auf die MHK von Vancomycin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 512 auf 16 - 128 µg/mL; FICI: 0,26. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Auch andere Stoffe pflanzlicher Herkunft führen zu Wechselwirkungen mit Vancomycin an Enterokokken. Diaz *et al.* wiesen eine erhöhte antibakterielle Aktivität der Kombination von Vancomycin und Isothiocyanaten bei *E. faecalis* nach (Diaz *et al.* 2012). Synergien zwischen dem synthetischen Saponin HSM-1 und Vancomycin wurden an *Enterococcus faecalis* von Cirioni *et al.* nachgewiesen. In einem Wundmodell an Mäusen, infiziert mit *Enterococcus faecalis*, wurde die Überlegenheit einer kombinierten Gabe von intraperitoneal appliziertem Vancomycin und topisch verabreichtem HSM-1 gegenüber der alleinigen Gabe von Antibiotikum bzw. Saponin nachgewiesen (Cirioni *et al.* 2011).

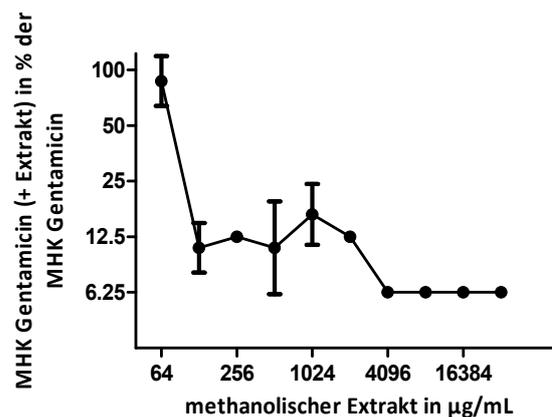
#### 4.2.3 Synergistisch wirkende Kombinationen von Gentamicin mit Naturstoffen gegen

##### *Enterococcus spp.*

Gentamicin wird nur in Kombination mit  $\beta$ -Laktamen parenteral bei schweren systemischen Enterokokkeninfektionen eingesetzt. *Enterococcus faecium* besitzt eine intrinsische low-level Resistenz gegen Aminoglykoside und kann zusätzlich eine high-level Resistenz durch Transfektion erwerben. In beiden Fällen besteht der Resistenzmechanismus in der Exprimierung Aminoglykosid-modifizierender Enzyme. Gentamicin ist das am häufigsten verschriebene Lokalantibiotikum und es wird lokal außer bei Infektionen am Auge, Verbrennungen und Weichteilinfektionen auch bei infizierten Wunden verwendet (Aktories *et al.* 2005). Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit die Wechselwirkungen zwischen Gentamicin und Naturstoffen bei den Wundinfektionen verursachenden Enterokokken analysiert. Extrakte von neun verschiedenen Pflanzenarten wurden in Kombination mit Gentamicin am Isolat BM 4147 (*Enterococcus faecium*) untersucht. Das Isolat zeigte eine MHK für Gentamicin von 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Da eine Monotherapie mit Gentamicin bei Enterokokkeninfektionen bedingt durch die intrinsische Resistenz nicht erfolgt, veröffentlicht die EUCAST klinische Grenzwerte nur für die Hochresistenz gegenüber Gentamicin (MHK:  $>128 \mu\text{g}/\text{mL}$ ), die relevant bei der Kombinationstherapie von  $\beta$ -Laktamen und Aminoglykosiden sind (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018). Der speziesunabhängige pharmakokinetisch-pharmakodynamische Grenzwert von Gentamicin für Sensibilität beträgt  $\leq 2 \mu\text{g}/\text{mL}$ , bezogen auf eine intravenöse Gabe von 3 bis 4,5 mg/kg/d (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018). Bei sieben von neun untersuchten Extrakten zeigte sich eine synergistische Wirkung mit Gentamicin (Tab. 2, 3).

Der methanolische Extrakt der Wurzeln von *Glycyrrhiza glabra* wies mit einer MHK von 32786  $\mu\text{g}/\text{mL}$  nur eine schwache Hemmung des Wachstums von *Enterococcus faecium* BM 4147 und dem klinischen Isolat VRE Nr. 24 auf (Abb. 4). Das Gentamicin-hochresistente klinische Isolat VRE Nr. 5 reagierte mit einem MHK-Wert von 8192  $\mu\text{g}/\text{mL}$  empfindlicher auf den Extrakt. Die Angaben in der Literatur zur MHK für *Enterococcus faecalis* reichen von 0,625 mg/mL bis zu 5 mg/mL für einen ethanolischen Extrakt (Güldas *et al.* 2016, Irani *et al.* 2010). Die wirksamen Bestandteile sind vor allem Arylcoumarine mit MHK-Werten von 8 bis 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (*Enterococcus faecium*), sowie Isoflavonoide und Coumestane (Eerundbayaer *et al.* 2014, Irani *et al.* 2010). Die enthaltenen Saponine spielen hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung auf Enterokokken nur eine untergeordnete Rolle, so lag die MHK eines aufgereinigten Saponinextraktes aus der Süßholzwurzel für *Enterococcus faecalis* bei 6,3 mg/mL (Abbasoglu & Türköz 1995). Die MHK-Werte von neun Vertretern der Saponinfraktion inklusive der Hauptkomponente Glycyrrhizinsäure sind in Tabelle 1 dargestellt (Anhang Tab. 1).

In Kombination mit Gentamicin führte der methanolische Extrakt von *Glycyrrhiza glabra* zu einer starken synergistischen Wirkung bei Isolaten von *Enterococcus faecium*, die eine low-level Resistenz gegenüber Gentamicin zeigen. Die FICI-Werte waren bei 0,07 (VRE Nr. 24) und bei 0,10 (BM 4147) (Abb. 22). Ab Konzentrationen von 4096 µg/mL lag die Gentamicin-MHK von VRE Nr. 24 bei  $\leq 1$  µg/mL. Bei einem Isolat mit einer high-level Resistenz ergab sich keine synergistische Wirkung (FICI: 1,33).



**Abb. 22:** Einfluss von *Glycyrrhiza glabra* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* VRE Nr. 24. Maximale Reduktion der MHK von 16 auf  $< 2$  µg/mL; FICI: 0,07. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

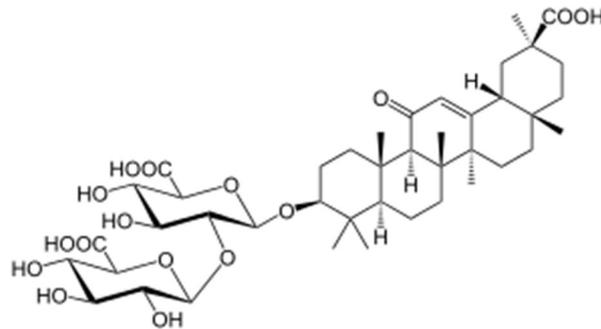
Die Süßholzwurzel enthält 4 bis 20 % Triterpensaponine. Zur Bestimmung ihrer Rolle bei der Wirkung des methanolischen Extraktes wurden neun Saponine aus dieser Fraktion genauer untersucht. Saponine sind Glykoside deren hydrophiler Zuckeranteil mit einem lipophilen Triterpen, Steroid oder Steroidalkaloid, dem Sapogenin verbunden ist. Die daraus resultierende amphiphile Eigenschaft der Saponine ist für eine Vielzahl ihrer Wirkungen verantwortlich, unter anderem wirken sie expektorierend, antiödematös, entzündungshemmend, antiviral, antimikrobiell, antitumoral, immunmodulierend, hepatoprotektiv, antioxidativ und blutzuckersenkend. Produziert werden sie von Pflanzen, niederen Meerestieren und Bakterien. Sie sind bei außerordentlich vielen Pflanzenarten verbreitet und kommen, verglichen mit anderen sekundären Pflanzenstoffen, teilweise in sehr hohen Konzentrationen von bis zu 30 % vor (Hänsel & Sticher 2007). Aufgrund der antibakteriellen und fungiziden Wirkung und des oft bitteren Geschmacks vieler Saponine ist ihre ökologische Funktion als Abwehrstoff für die Pflanze naheliegend (Wolters 1968, Favel *et al.* 1994). Extrakte saponinführender Pflanzen inhibieren grampositive Bakterien meist im stärkeren Ausmaß als gramnegative (Abbasoglu & Türköz 1995). Dies liegt zum einen am unterschiedlichen Zellwandaufbau, da gramnegative Erreger mit einer zusätzlichen äußeren Membran ausgestattet sind, welche die Penetration durch die Zellwand erschwert. Zum anderen vermuten Hassan *et al.* als möglichen Grund die verstärkte Expressierung von Glucosidasen in gramnegativen Bakterien, welche die Saponine zu deren unwirksamen Aglykonen

abbauen würden (Hassan *et al.* 2010). Im Gegensatz dazu wies Acebey-Castellon *et al.* die antibiotische Wirkung einiger Sapogenine auf grampositive Kokken nach, während diese bei gramnegativen Bakterien keinen Effekt zeigten (Acebey-Castellon *et al.* 2010). Die antibakterielle Wirkung kann auch erst nach Abspaltung des Zuckerrestes auftreten, so übt Arjunglucosid I in einer Konzentration von 512 µg/mL keinen Effekt auf das Wachstum von *Enterococcus faecalis* aus, während das entsprechende Aglykon Arjungenin eine MHK von 64 µg/mL aufweist (Gossan *et al.* 2016). Saponine können zum Teil sehr starke antibakterielle Wirkungen auf Enterokokken ausüben. Das synthetische Saponin HSM-1 zeigt bei Patientenisolaten mit Vancomycin-sensiblen und Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecalis* minimale Hemmkonzentrationen von 2 – 32 µg/mL (Cirioni *et al.* 2011). Einen ähnlich starken antibiotischen Effekt an Patientenisolaten mit *Enterococcus faecalis* wiesen die Elasticoside aus *Ficus elastica* mit einer MHK von 30 µg/mL auf (Mbosso *et al.* 2012). Verschiedene aus Saponinen von *Symplocos lancifolia* gewonnene Sapogenine führten bei *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 zu minimalen Hemmkonzentrationen von 16 – 128 µg/mL (Acebey-Castellon *et al.* 2010). Antibiotische Untersuchungen des Sapogenins Medicagendäure aus Saponinen von *Medicago sp.* an den *Enterococcus-faecalis*-Stämme ATCC 29212 und ATCC 19433 ergaben minimale Hemmkonzentrationen von 32,5 – 50 µg/mL (Avato *et al.* 2006).

Die hier untersuchten neun Saponine zeigten zum größten Teil sehr schwache bzw. keine inhibierende Wirkung auf das Wachstum von *Enterococcus faecium* (Anhang Tab. 1). Bei Uralsaponin T, Uralsaponin F, Licoricesaponin G2, Licoricesaponin E2 und 22-Acetylglycyrrhizin trat bei 1 mg/mL keine Hemmung des Wachstums des Patientenisolates VRE Nr. 22 auf. Die Glycyrrhizinsäure zeigte bei 51 Patientenisolaten mit *Enterococcus faecium* und *Enterococcus faecium* BM 4147 MHK-Werte zwischen 4,8 mM (4 mg/mL) und 9,5 mM (8 mg/mL), wobei kein Unterschied zwischen Vancomycin-sensiblen und Vancomycin-resistenten *Enterococcus-faecium*-Isolaten auftrat. *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 wurde bei 9,5 mM und *E. gallinarum* und *E. casseliflavus* bei 4,8 mM im Wachstum gehemmt. Die Saponine Licoricesaponin B2 und A3 hemmten bei 1 mg/mL (1236 µM bzw. 1015 µM) vollständig das Wachstum des Patientenisolates VRE Nr. 22. Damit wirkten sie deutlich stärker antibakteriell als Glycyrrhizinsäure mit einer MHK von 4762 µM bei diesem Isolat.

Die Hauptkomponente der Saponinfraktion von *Glycyrrhiza glabra* ist Glycyrrizin mit einem Anteil von 2 bis 15 % in der Süßholzwurzel, ein Gemisch aus Ammonium- und Calciumsalzen der Glycyrrhizinsäure (Abb. 23), ein Monodesmosid, welches aus dem Aglykon Glycyrrhetinsäure und aus zwei Molekülen Glucuronsäure besteht. Sie ist fünfzigmal süßer als Zucker und zeigt antivirale, entzündungshemmende, antidiabetische, hepatoprotektive, immunmodulierende und

krebshemmende Eigenschaften (Robert Koch-Institut 2013, Asl & Hosseinzadeh 2008, Wang *et al.* 2013).

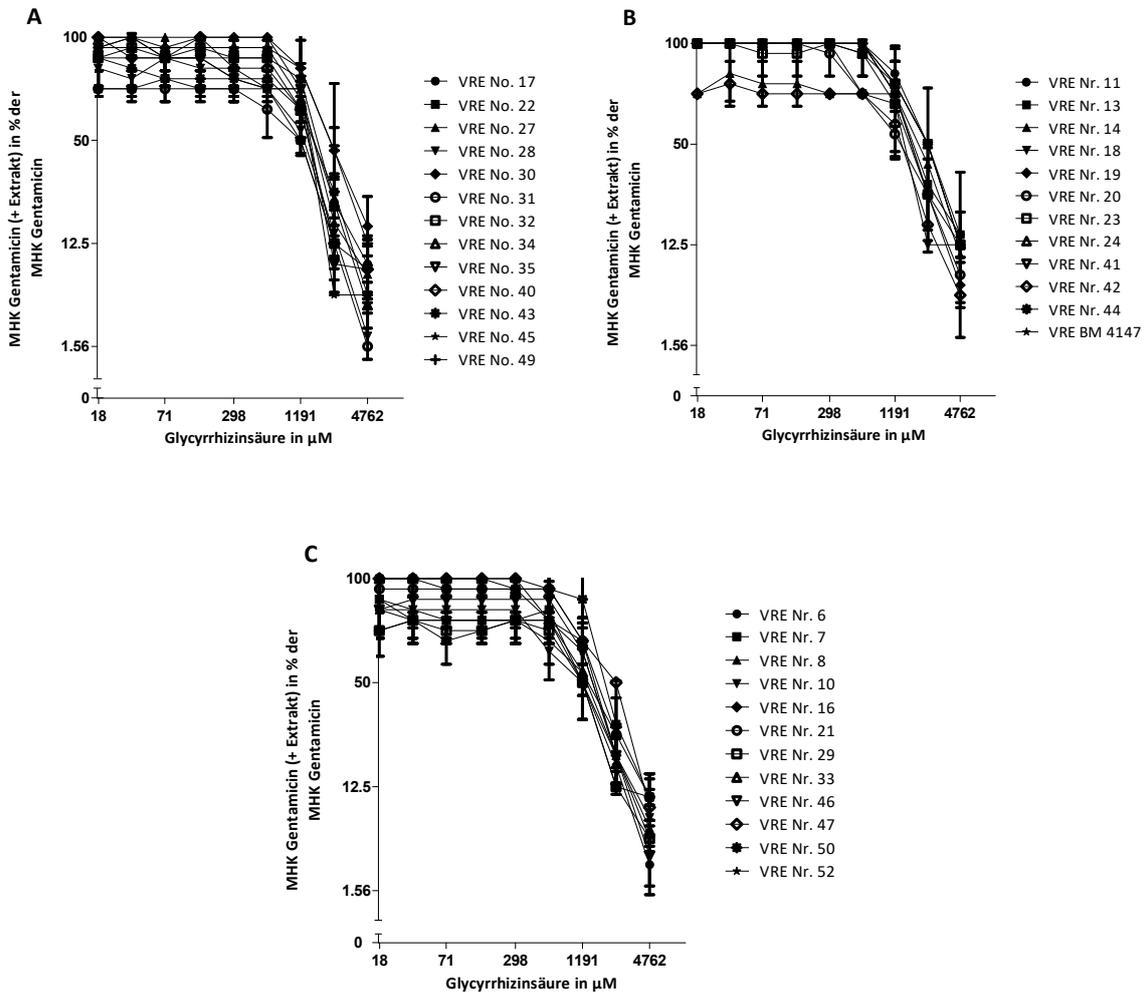


**Abb. 23:** Glycyrrhizinsäure

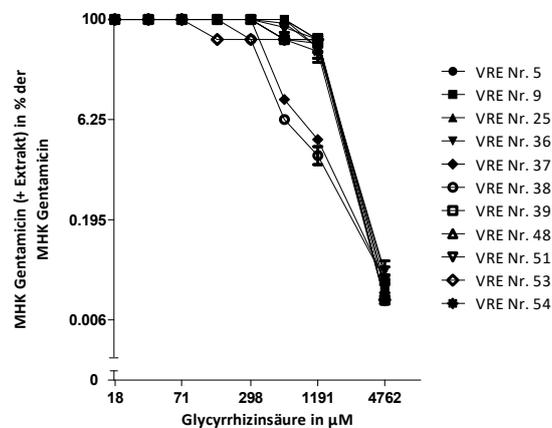
Eine starke synergistische Wirkung zwischen Gentamicin und Glycyrrhizinsäure wurde an *Enterococcus faecium* BM 4147 und 51 klinischen Isolaten von *Enterococcus faecium* nachgewiesen. Von den klinischen Isolaten zeigten 40 Isolate eine low-level Resistenz gegenüber Gentamicin mit MHK-Werten von 4 bis 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und 37 von ihnen waren auch resistent gegenüber dem Reserveantibiotikum Vancomycin. Elf Isolate wiesen eine high-level Resistenz gegenüber Gentamicin auf, sie stellten ihr Wachstum erst bei 131072  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Gentamicin ein und waren ebenfalls Vancomycin-resistent. Der Effekt von Glycyrrhizinsäure auf die Empfindlichkeit gegenüber Gentamicin war dosisabhängig, er führte bei 21 Isolaten mit low-level Resistenz schon bei 18  $\mu\text{M}$  zu einer Reduktion der MHK von Gentamicin um 50 %. Bei den übrigen 19 Isolaten mit low-level Resistenz waren dazu Konzentrationen von 595 bis 1191  $\mu\text{M}$  notwendig (Abb. 24 A – C, Tab. 4). Die MHK von Gentamicin konnte bei diesen Isolaten von 4 bis 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf Werte zwischen 0,125 und 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  gesenkt werden. Die Isolate mit high-level Resistenz verringerten ihre Gentamicin-MHK bei Konzentrationen zwischen 149 und 1191  $\mu\text{M}$  (Abb. 25). Die Kombination von Gentamicin und 4762  $\mu\text{M}$  Glycyrrhizinsäure reduzierte die MHK von ursprünglich 131072  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 8 bzw. 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Auch drei weitere Enterokokkenarten zeigten diese synergistische Wirkung in einem vergleichbaren Ausmaß (Abb. 26). Bei dem *Enterococcus faecalis*-Referenzstamm ATCC 29212 sank die MHK von 16 auf 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Die Isolate von *Enterococcus casseliflavus* und *Enterococcus gallinarum* wiesen mit 1 bzw. 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  eine geringere MHK für Gentamicin auf als die Isolate von *E. faecium* oder *E. faecalis*. Hier reduzierte sich die MHK in Kombination auf 0,0625  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bzw. 0,1250  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

**Tab. 4:** FICI der Wechselwirkung zwischen Gentamicin und Glycyrrhizinsäure bei Enterokokken (FICI  $\leq 0,5$  synergistisch, FICI  $>0,5-4,0$  indifferent, FICI  $>4$  antagonistisch (Odds 2003). Ergebnis von fünf Versuchen, n: Anzahl der Isolate).

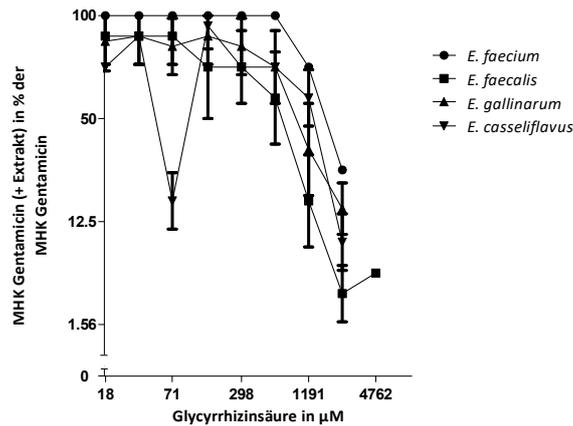
	n	FICI	
		Spannbreite	Median
VRE mit low-level Gentamicinresistenz			
<i>Enterococcus faecium</i>	37	0,018 – 0,375	0,143
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0,019 – 0,094	0,063
<i>Enterococcus gallinarum</i>	1	0,066 – 0,375	0,188
VRE mit high-level Gentamicinresistenz			
<i>Enterococcus faecium</i>	11	0,016 - $\leq 0,5$	0,063
VRE mit low-level Gentamicinresistenz			
<i>Enterococcus faecium</i>	3	0,033 – 0,375	0,064
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	1	0,035 – 0,066	0,066



**Abb. 24:** Einfluss von Glycyrrhizinsäure auf die MHK von Gentamicin von Vancomycin-resistenten *Enterococcus faecium*. **A** 13 Isolate MHK: 16 - 32 µg/mL, **B** 12 Isolate MHK: 16 µg/mL, **C** 12 Isolate MHK: 4 - 16 µg/mL BM 4147. FICI: 0,018 - 0,375. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

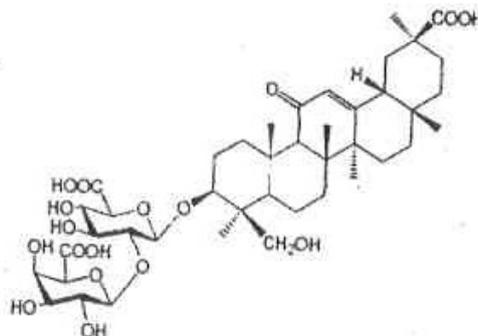


**Abb. 25:** Einfluss von Glycyrrhizinsäure auf die MHK von Gentamicin von 11 Isolaten von Gentamicin-hochresistenten *Enterococcus faecium*. MHK: 131072 µg/mL. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

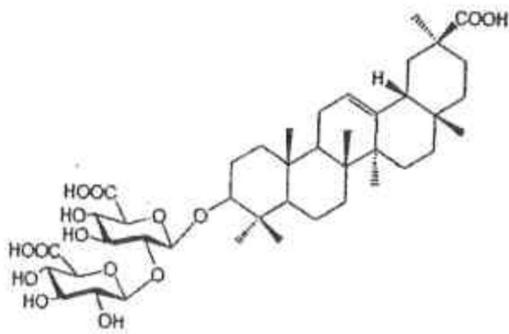


**Abb. 26:** Einfluss von Glycyrrhizinsäure auf die MHK von Gentamicin bei verschiedenen Enterokokkenarten. *E. faecium* BM 4147 MHK: 16 µg/mL, *E. faecalis* ATCC 29212 MHK: 16 µg/mL, *E. gallinarum* MHK: 2 µg/mL, *E. casseliflavus* MHK: 1 µg/mL. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

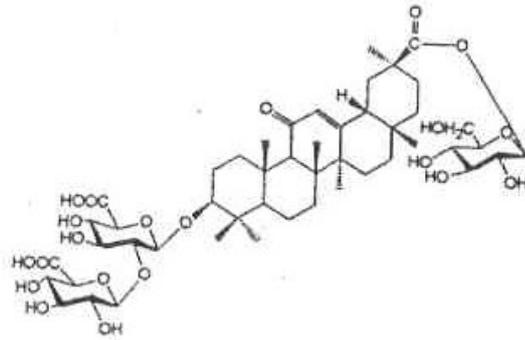
Die Untersuchung von acht weiteren Vertretern der Saponinfraktion von *Glycyrrhiza glabra* ergab nur beim Uralsaponin N (Abb. 27) eine Reduktion der Gentamicin-MHK bei dem klinischen Isolat VRE Nr. 22 mit *Enterococcus faecium* (low-level Gentamicinresistenz, Vancomycin-resistent) von 32 µg/mL auf 4 bis 8 µg/mL bei einer Saponinkonzentration von 1 mg/mL vergleichbar zum Effekt von Glycyrrhizinsäure in dieser Konzentration. Die Saponine Uralsaponin T, Uralsaponin F, Licoricesaponin G2, Licoricesaponin E2 und 22-Acetylglycyrrhizin veränderten bei 1 mg/mL nicht die Sensibilität gegenüber Gentamicin. Da die Saponine Licoricesaponin B2 und A3 (Abb. 28, 29) bei 1 mg/mL (1236 µM bzw. 1015 µM) das Wachstum vollständig hemmten, fand eine Untersuchung dieser Saponine in Kombination mit Gentamicin aufgrund der zur Verfügung stehenden Substanzmengen nicht statt.



**Abb. 27:** Uralsaponin N



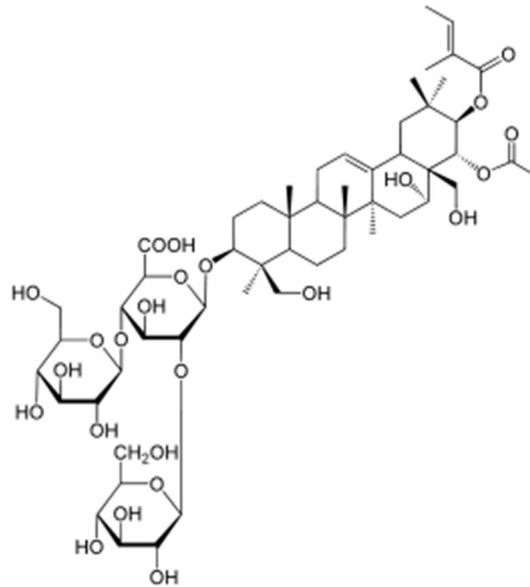
**Abb. 28:** Licoricesaponin B2



**Abb. 29:** Licoricesaponin A3

Zur Prüfung, ob noch weitere Saponine mit Gentamicin eine synergistische Wirkung bei Enterokokken zeigen, wurden vier Saponine aus Arzneipflanzen der traditionellen europäischen Medizin untersucht.

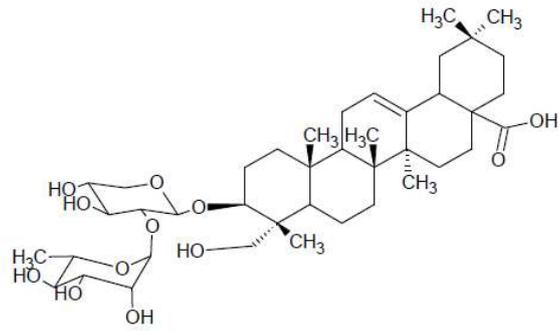
Das in den Rosskastaniensamen vorkommende  $\beta$ -Aescin (*Aesculus hippocastanum*) (Abb. 30) ist ein Mischkristallisat aus mehr als 30 monodesmosidischen Glykosiden, welches den in Wasser schwer löslichen Anteil der Triterpensaponin-Fraktion darstellt (Teuscher *et al.* 2004, Hänsel & Sticher 2007). Es hemmte bis zu einer Konzentration von 16384  $\mu$ M nicht das Wachstum von *Enterococcus faecium* BM 4147, die MHK war somit  $\geq 32768$   $\mu$ M (Anhang Tab. 1). In der Literatur waren Daten zur antibakteriellen Wirkung von  $\beta$ -Aescin nicht zu finden. Ein aufgereinigter Saponinextrakt aus *Aesculus hippocastanum*, mit dem Hauptinhaltsstoff  $\beta$ -Aescin zeigte eine MHK von 6,3 mg/mL bei *Enterococcus faecalis* (Abbasoglu & Türköz 1995). Wie mit Glycyrrhizinsäure trat auch bei  $\beta$ -Aescin eine synergistische Wechselwirkung mit Gentamicin bei *Enterococcus faecium* BM 4147 auf, der FICI betrug  $\leq 0,26$  und war damit vergleichbar mit der Wirkung von Glycyrrhizinsäure (FICI: 0,29) bei diesem Isolat. Durch Glycyrrhizinsäure sank die Gentamicin-MHK auf 0,5 bis 2,0  $\mu$ g/mL und mit  $\beta$ -Aescin auf 2  $\mu$ g/mL, aber  $\beta$ -Aescin erhöhte die Sensibilität gegenüber Gentamicin schon ab Konzentrationen von 128  $\mu$ M, während dafür bei der Glycyrrhizinsäure 1191  $\mu$ M notwendig waren (Anhang Abb. 2). Neben dem Referenzstamm *Enterococcus faecium* BM 4147 wurde die Kombination von Gentamicin und 1000  $\mu$ g/mL (884  $\mu$ M)  $\beta$ -Aescin auch an zehn Patientenisolaten mit low-level-Resistenz gegenüber Gentamicin und an zwei Patientenisolaten mit high-level-Resistenz untersucht. Die beiden Isolate mit high-level-Resistenz (MHK: 131072  $\mu$ g/mL) wiesen auch mit 884  $\mu$ M  $\beta$ -Aescin eine Gentamicin-MHK von  $>500$   $\mu$ g/mL auf. Der Konzentrationsbereich von 512 bis 65536  $\mu$ g/mL Gentamicin wurde nicht untersucht. Bei den zehn Patientenisolaten mit Gentamicin-MHK-Werten zwischen 8 und 16  $\mu$ g/mL reduzierte sich die MHK auf 1 bis 2  $\mu$ g/mL mit 884  $\mu$ M  $\beta$ -Aescin (Anhang Tab. 6).



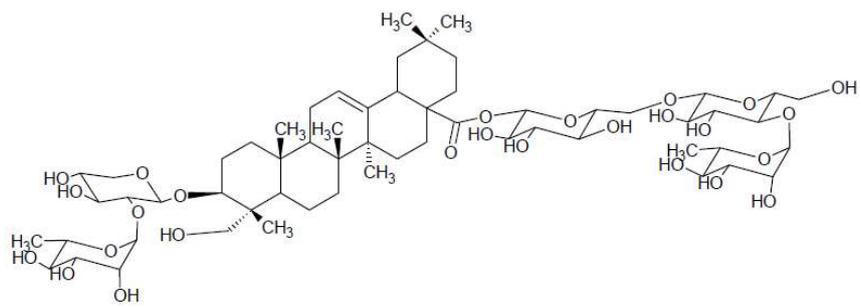
**Abb. 30:**  $\beta$ -Aescin

Die Saponine  $\alpha$ -Hederin (Abb. 31) und Hederacosid C (Abb. 32) aus den Blättern von *Hedera helix* wurden an einem Patientenisolat untersucht. Eine Inhibition des Wachstums der Patientenisolat fand bei 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (533  $\mu\text{M}$ )  $\alpha$ -Hederin und 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (819  $\mu\text{M}$ ) Hederacosid C nicht statt, die MHK für Gentamicin sank von 8 auf 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bei VRE Nr. 7 mit 533  $\mu\text{M}$   $\alpha$ -Hederin und auf 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bei VRE Nr. 6 mit 819  $\mu\text{M}$  Hederacosid C. Primulasaponin 1 (Abb. 33) aus der Wurzel von *Primula veris* reduzierte bei 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (181  $\mu\text{M}$ ) die Gentamicin-MHK von 8 auf 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bei VRE Nr. 6, eine vollständige Hemmung des Wachstums ohne Gentamicin fand bei dieser Konzentration nicht statt (Anhang Tab. 1). Angaben zur antibakteriellen Wirkung dieser Saponine auf Enterokokken waren in der Literatur nicht zu finden.

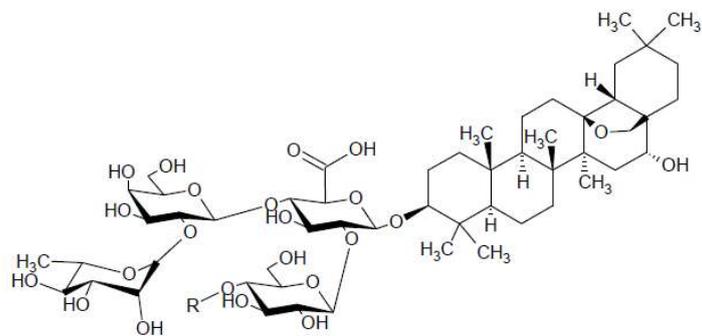
Auch acht Saponine aus nichteuropäischen traditionellen Heilpflanzen waren der Glycyrrhizinsäure nicht überlegen. Die Saponine Parkioside B (Abb. 34) von *Vitellaria paradoxa*, Zemoside A (Abb. 35) von *Cussonia bancoensis*, Rheediinoside A und B (Abb. 36) von *Entada rheedii*, Arjunglucosid I (Abb. 37) von *Terminalia arjuna* sowie Sericoside (Abb. 38) und Ivorenoside C (Abb. 39) von *Terminalia ivorensis* wurden in einer Konzentration von 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  mit 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Gentamicin an den *Enterococcus-faecium*-Isolaten VRE Nr. 5, 9, 25 mit high-level Gentamicinresistenz getestet. Eine Wachstumshemmung trat bei dieser Konzentration bei keinem der acht Saponine auf (Anhang Tab. 1). Von keinem der drei Isolate konnte mit diesen Saponinen die Gentamicin-MHK von 131072  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf  $\leq 500$   $\mu\text{g}/\text{mL}$  gesenkt werden. Das Arjunglucosid I zeigte auch bei Gossan *et al.* bei 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  keine Inhibition des Wachstums von *Enterococcus faecium*, jedoch hemmte das entsprechende Aglykon Arjungenin das Wachstum bei 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Gossan *et al.* 2016).



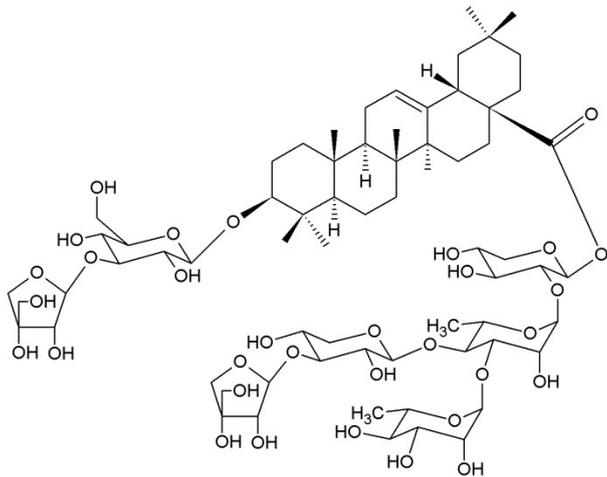
**Abb. 31:**  $\alpha$ -Hederin



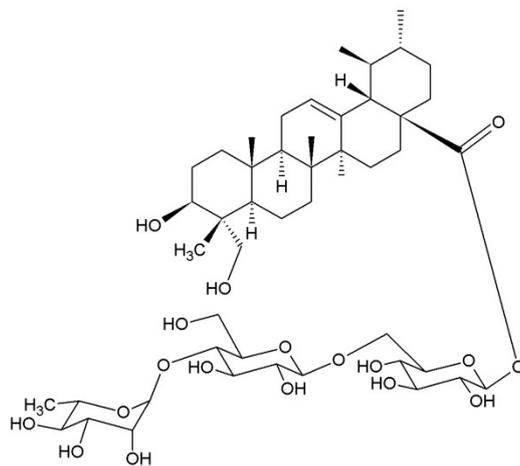
**Abb. 32:** Hederacosid C



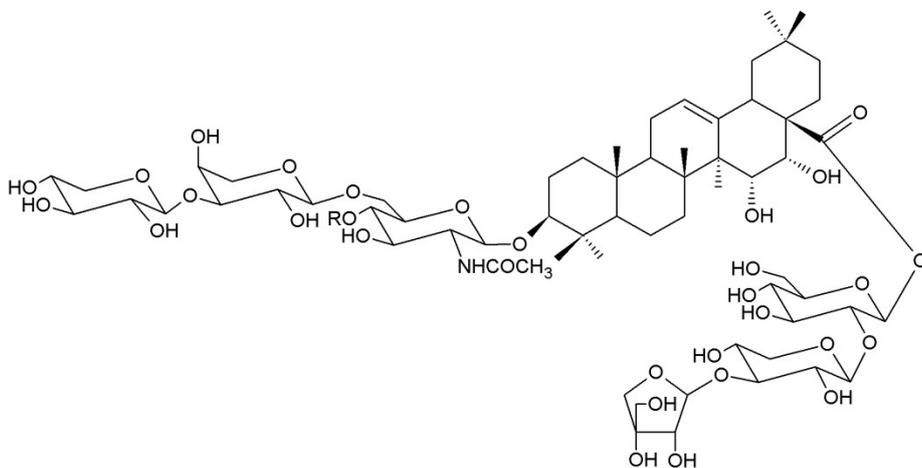
**Abb. 33:** Primulasaponin 1



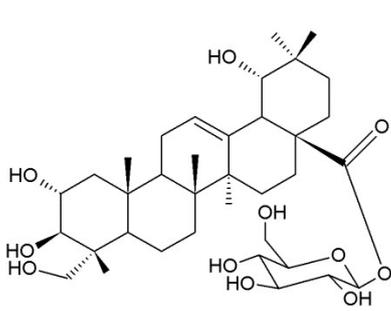
**Abb. 34:** Parkioside B



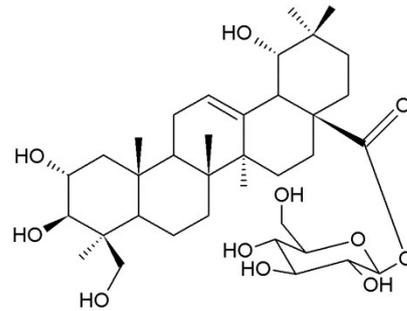
**Abb. 35:** Zemoside A



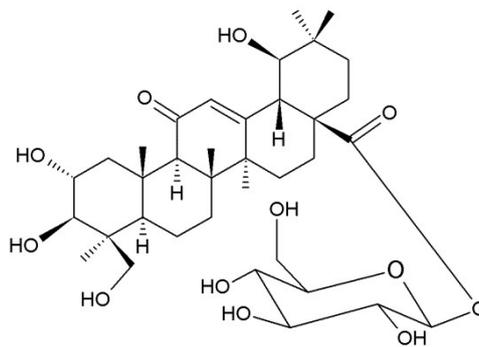
**Abb. 36:** Rheediinose A (R: H) und B (R: Glc)



**Abb. 37:** Arjunglucosid I

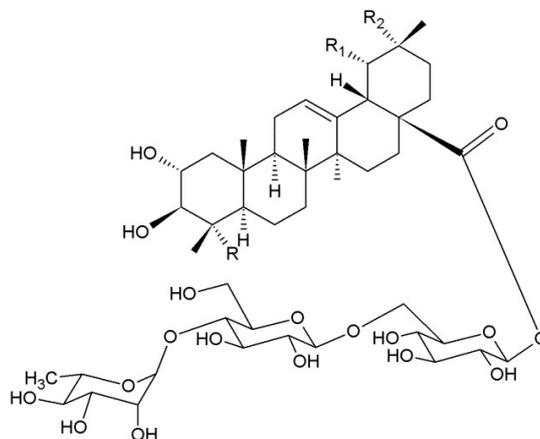


**Abb. 38:** Sericoside



**Abb. 39:** Ivorenoside C

Das Asiaticosid aus *Centella asiatica* (Abb. 40) zeigte bei 1000 µg/mL und mit 500 µg/mL bzw. 250 µg/mL Gentamicin uneinheitliche Ergebnisse. Die Versuche wurden an jedem der drei Patientenisolate zweimal durchgeführt und bei jedem Isolat lag die Gentamicin-MHK in Kombination jeweils einmal bei ≤250 µg/mL und bei >500 µg/mL. Eine antibakterielle Wirkung auf *Enterococcus faecalis* wurde von Zhang *et al.* festgestellt (Zhang *et al.* 2006).

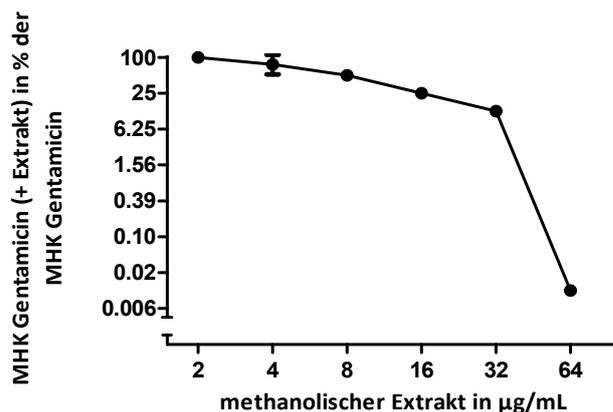


**Abb. 40:** Asiaticosid (R: CH<sub>2</sub>OH)

Von den acht übrigen methanolischen Extrakten traditioneller europäischer Heilpflanzen führten sechs zu synergistischen Wechselwirkungen mit Gentamicin am Referenzstamm *Enterococcus faecium* BM 4147. Die Extrakte von *Cetraria islandica* (FICI: 0,05), *Solidago virgaurea* (FICI: 0,05) und *Achillea millefolium* (FICI: 0,07) zeigten stärkere Synergien als die von *Salvia officinalis* (FICI: 0,19), *Plantago lanceolata* (FICI: 0,30) oder *Thymus vulgaris* (FICI: 0,31) (Tab. 2, 3, Abb. 41, Anhang Abb. 3,4, 5, 6, 7, 8).

Von allen in dieser Arbeit untersuchten Extrakten besitzt der methanolische Extrakt von *Cetraria islandica* mit einer MHK von 128 µg/mL die stärkste antibakterielle Aktivität gegenüber *Enterococcus faecium* (Abb. 4). Neben großen Mengen an Polysacchariden enthält Isländisch Moos (*Cetraria islandica*) 2 bis 3 % Flechtensäuren bestehend aus Fumarprotocetrarsäure, Cetrarsäure und Protolichesterinsäure (Wichtl 2009). Zum Vorkommen von Usninsäure gibt es unterschiedliche Angaben, entweder wird das Dibenzofuranderivat in Spuren nachgewiesen (0,04 %) oder es fehlt ganz (European Medicines Agency 2014). Fumarprotocetrarsäure und Cetrarsäure sowie Protolichesterinsäure werden bei Aufarbeitung und Lagerung der Droge wahrscheinlich zu Protocetrarsäure bzw. Lichesterinsäure umgewandelt (Wichtl 2009). Die vermutlich nur in Spuren vorkommende Usninsäure wirkt mit einer MHK von 8 µg/mL deutlich stärker hemmend auf *Enterococcus faecalis* als die mengenmäßig dominierende Protocetrarsäure mit 64 µg/mL. Das Wachstum von *Enterococcus faecium* inhibiert Usninsäure bei 16 µg/mL (Lauterwein *et al.* 1995, Nishanth *et al.* 2014).

Sowohl in Bezug auf das Ausmaß der Steigerung der Gentamicinempfindlichkeit als auch hinsichtlich der geringsten Konzentration, die zur Empfindlichkeitssteigerung führte, war der Extrakt von *Cetraria islandica* den anderen fünf Extrakten überlegen, mit Ausnahme des Goldrutenkrautextraktes der auch schon bei vergleichbar geringen Konzentrationen zu Veränderungen führte. Schon 8 µg/mL des methanolischen Extraktes bewirkten sicher eine Reduzierung der Gentamicin-MHK um eine Verdünnungsstufe von 16 auf 8 µg/mL (Abb. 41, Anhang Abb. 9). Das Ausmaß der Steigerung der Antibiotikaempfindlichkeit war mit 13 Verdünnungsstufen, von 16 auf 0,0020 µg/mL, die Höchste verglichen mit allen anderen Extraktkombinationen. Bei drei MRSA-Patientenisolaten ermittelten Segatore *et al.* synergistische Wirkungen von Gentamicin mit Usninsäure (FICI: 0,375) (Segatore *et al.* 2012). Diese Wirkung der Usninsäure geht vermutlich auf die Permeabilitätserhöhung der Bakterienmembran zurück, durch die mehr Gentamicin in die Zelle gelangt. Die Permeabilitätserhöhung, die mit einem Verlust an Zellmaterial einhergeht, liegt wahrscheinlich auch ihrer antibakteriellen Wirkung zugrunde (Gupta *et al.* 2012).



**Abb. 41:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 16 auf 0,002 µg/mL; FICI: 0,05. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Wie der methanolische Extrakt von *Cetraria islandica* verringerte der Extrakt von *Solidago virgaurea* die Gentamicin-MHK schon ab 8 µg/mL, in der höchsten untersuchten Konzentration von 16384 µg/mL reduzierte er die MHK von 16 µg/mL auf 0,25 bis 1 µg/mL (Anhang Abb. 3). Der Extrakt von *Achillea millefolium* führte erst ab 128 µg/mL sicher zu einer Sensibilitätssteigerung, verringerte die Gentamicin-MHK aber schon bei 4096 µg/mL um vier Verdünnungsstufen von 16 µg/mL auf 1 µg/mL (Anhang Abb. 4). Ein ähnliches Ausmaß der Sensibilitätssteigerung um vier Verdünnungsstufen zeigten auch die Extrakte von *Salvia officinalis* und *Thymus vulgaris*. Der Extrakt vom Thymiankraut bewirkte dies bei 1024 µg/mL, beim Extrakt der Salbeiblätter trat dies schon bei 256 µg/mL auf (Anhang Abb. 5, 7). Die geringste Konzentration, die zu Veränderungen führte, lag bei beiden Extrakten bei 64 µg/mL. *Plantago lanceolata* bewirkte Sensibilitätssteigerungen erst ab 1024 µg/mL und führte bei 8192 µg/mL nur zu einer Reduktion der MHK von 16 µg/mL auf 4 bis 2 µg/mL (Anhang Abb. 6, 8).

#### 4.2.4 Synergistisch wirkende Kombinationen von Imipenem mit Naturstoffen gegen *Enterococcus faecium*

*Enterococcus faecium* ist aufgrund der Bildung von Penicillin-bindenden Proteinen, die eine geringe Affinität zu Penicillinen aufweisen, resistent gegenüber dem Reserveantibiotikum Imipenem. Die Wechselwirkung mit Imipenem wurde am Patientenisolat VRE Nr. 5 untersucht, weil dieses mit einer MHK von 1024 µg/mL die größte Resistenz aller getesteten Patientenisolate zeigte (Tab. 2).

Von acht Extrakten wiesen *Plantago lanceolata* (FICI: 0,04), *Cetraria islandica* (FICI: 0,26) und *Thymus vulgaris* (FICI: 0,45) synergistische Wirkungen in Kombination mit Imipenem auf (Tab. 2, 3, Anhang Abb. 10, 11, 12). Nur der methanolische Extrakt von *Plantago lanceolata* war in der Lage bei

Konzentrationen von 16384 µg/mL die Imipenem-MHK in den sensiblen Bereich zu verschieben. Wie bei der Kombination mit Gentamicin zeigte das Isländisch Moos die geringste minimal modulierende Konzentration (MMK) mit 8 µg/mL. Trotz ähnlicher Wirk- und Resistenzmechanismen wie beim β-Laktam Ampicillin waren hier, mit Ausnahme von *Thymus vulgaris*, andere Extrakte aktiv (Tab. 2, 3). Synergistische Wirkungen mit Imipenem und Naturstoffen konnten Giacometti *et al.* mit einem antimikrobiellen Peptid an *E. faecalis* (FICI: 0,31) feststellen (Giacometti *et al.* 2005).

### 4.3 Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)

*Staphylococcus aureus* ist ein häufiger Erreger von Wundinfektionen und in der Lage über horizontalen Gentransfer gegen eine Vielzahl von Antibiotika Resistenzen zu erwerben (siehe 1.3.2). Wechselwirkungen zwischen Antibiotika und Naturstoffen bei MRSA sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt.

**Tab. 5:** FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) und wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei MRSA Nr. 25, 28, 29, 38 (FICI ≤0,5 synergistisch, FICI >0,5- 4,0 indifferent, FICI >4 antagonistisch (Odds 2003). Mittelwert von fünf Versuchen, n/c: kein Effekt bei ¼ der MHK (Extrakt)).

	<i>Achillea millefolium</i> ME	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> ME	<i>Cetraria islandica</i> ME	<i>Lythrum salicaria</i> ME	<i>Lythrum salicaria</i> WE
Ampicillin	n/c	<b>0,15</b>	n/c	n/c	n/c
Gentamicin	<b>0,06</b>	n/c	<b>0,13</b>	n/c	n/c
Aztreonam	n/c	n/c	n/c	n/c	n/c
Imipenem	n/c	<b>0,11</b>	n/c	1	<b>0,33</b>

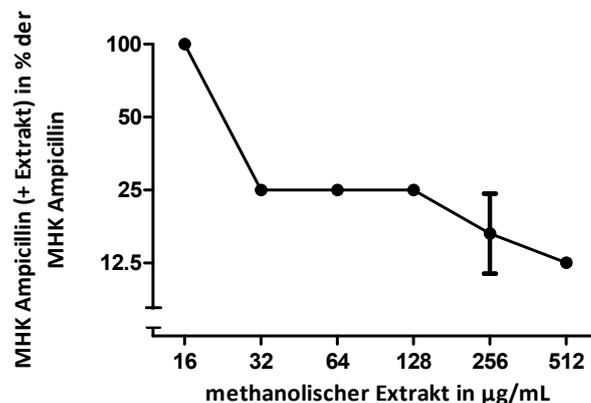
**Tab. 6:** FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) und wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei MRSA Nr. 25, 28, 29, 38 (FICI ≤0,5 synergistisch, FICI >0,5- 4,0 indifferent, FICI >4 antagonistisch (Odds 2003). Mittelwert von fünf Versuchen, n/c: kein Effekt bei ¼ der MHK (Extrakt)).

	<i>Plantago lanceolata</i> ME	<i>Salvia officinalis</i> ME	<i>Salvia officinalis</i> WE	<i>Thymus vulgaris</i> ME
Ampicillin	n/c	0,8	n/c	1,00
Gentamicin		<b>0,1</b>		<b>0,03</b>
Aztreonam	n/c	n/c	n/c	n/c
Imipenem	n/c	<b>0,02</b>	<b>0,02</b>	n/c

#### 4.3.1 Synergistisch wirkende Kombinationen von Ampicillin mit Naturstoffen gegen MRSA

Die Resistenz von MRSA gegen das  $\beta$ -Laktamase-stabile Standardantibiotikum Oxacillin und andere  $\beta$ -Laktamantibiotika wird durch die Expressierung von Penicillin-bindenden Proteinen (PBP 2a) mit geringer  $\beta$ -Laktamaffinität hervorgerufen. Nicht  $\beta$ -Laktamase-stabile Antibiotika wie das Acylaminopenicillin Ampicillin werden zusätzlich durch  $\beta$ -Laktamsen modifiziert und damit in ihrer Wirkung gehemmt. Die Kombination von Ampicillin und Extrakten wurde am Patientenisolat MRSA Nr. 28 untersucht, die MHK liegt bei 8 bis 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Von den analysierten Extrakten von sieben verschiedenen Pflanzen zeigte nur der methanolische Extrakt von *Arctostaphylos uva-ursi* eine synergistische Wirkung in Kombination mit Ampicillin bei MRSA (FICI: 0,15) (Abb. 42). Es bestehen mehrere Parallelen zwischen der Wirkung dieser Kombination auf VRE und MRSA. Die Reduzierung der Ampicillin-MHK durch den Extrakt war im Maximum bei MRSA drei Verdünnungsstufen und bei VRE durchschnittlich vier Stufen. Die minimal modulierende Konzentration (MMK) war mit 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bei MRSA und 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bei VRE ähnlich, genauso wie die antibakterielle Wirkung des Extraktes allein mit einer MHK für MRSA von 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$  und für VRE von 2048  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (siehe 4.2.1). Für das im Extrakt enthaltene Ellagitannin Corilagin ist eine inhibierende Wirkung auf die PBP2' von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen (Shimizu *et al.* 2001). Desweiteren kommen auch alle für diesen Extrakt unter 4.2.1 diskutierten Mechanismen als Grund für die synergistische Wirkung in Frage.



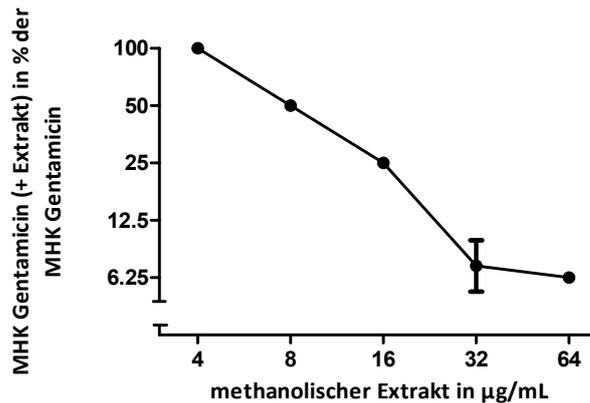
**Abb. 42:** Einfluss von *Arctostaphylos uva-ursi* auf die MHK von Ampicillin bei MRSA Nr. 28. Maximale Reduktion der MHK von 16 auf 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FICI: 0,15. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Kurek *et al.* wiesen für die in den Bärentraubenblättern enthaltene Triterpensäure Ursolsäure bei *S. aureus* ATCC 29213 eine synergistische Wirkung mit Ampicillin nach (FICI: 0,25) (Kurek *et al.* 2012). Mit Ursolsäure und Ampicillin kam es auch bei VRE zu einem Synergismus (siehe 4.2.1) (Abb. 14). Auch mit

anderen Stoffgruppen wie Polyphenolsäuren oder Flavonoiden, die in den Bärentraubenblättern vorkommen, sind Synergien mit Ampicillin an *S. aureus* nachgewiesen (Hemaiswarya *et al.* 2010, Fujita *et al.* 2005). Im Gegensatz zum Effekt des Bärentraubenblätterextraktes bei der Ampicillinresistenz von VRE, die nur auf einer Veränderung der Penicillin-bindenden Proteine beruht, könnte hier die Resistenzmodifizierung auch einen Einfluss auf die Wirkung der  $\beta$ -Laktamasen beinhalten, die durch das *blaZ*-Gen kodiert sind.

#### 4.3.2 Synergistisch wirkende Kombinationen von Gentamicin mit Naturstoffen gegen MRSA

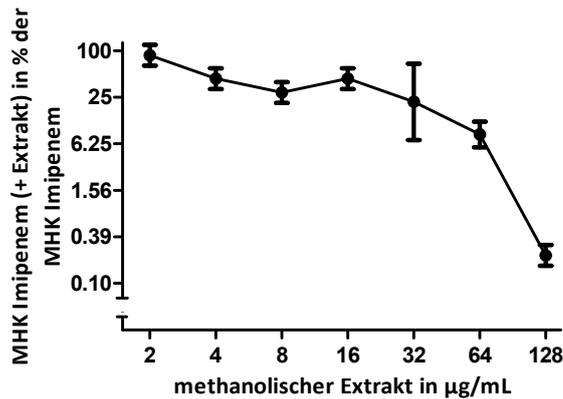
Die Resistenz gegenüber Aminoglykosiden wird wie bei den Enterokokken durch Aminoglykosidmodifizierende Enzyme (AME) hervorgerufen, die das Antibiotikum acetylieren, phosphorylieren oder adenylieren. Untersucht wurden die Wechselwirkung zwischen Gentamicin und Extrakten am Patientenisolat MRSA Nr. 29 mit einer MHK von 1024  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Isolate mit einer MHK  $\geq 1 \mu\text{g}/\text{mL}$  gelten als resistent (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing 2018). Mit den methanolischen Extrakten von *Cetraria islandica* (Abb. 43), *Thymus vulgaris*, *Achillea millefolia* und *Salvia officinalis* traten synergistische Wirkungen auf (Tab. 5, 6). Die niedrigste MMK von allen Extrakten zeigte mit 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  *Salvia officinalis* und die größte Reduktion mit 1024 auf 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  trat bei *Thymus vulgaris* auf. Die Resistenz konnte von keinem Extrakt vollständig aufgehoben werden. Der Hauptbestandteil des ätherischen Öles von *Thymus vulgaris* das Monoterpen Thymol, führte wie auch bei *Pseudomonas aeruginosa* (siehe 4.4.2) zu einer Reduzierung der MHK für Gentamicin. Sie sank bei 512  $\mu\text{M}$  Thymol von 1024 auf 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anhang Abb. 13). Ebenso führte das Saponin Glycyrrhizinsäure wie bei den Enterokokken (siehe 4.2.3) zu einer Erhöhung der Gentamicin-Empfindlichkeit. Mit 4096  $\mu\text{M}$  Glycyrrhizinsäure lag die Gentamicin-MHK bei 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Anhang Abb. 14). Die FICI-Werte bei MRSA lagen in einem ähnlichen Bereich wie die der Enterokokken, dies gilt auch für die antibakterielle Aktivität der Glycyrrhizinsäure (8,2 mM bei MRSA Nr. 29 und 9,5 mM VRE Nr. 24). De Breij *et al.* wiesen an zwei MRSA-Isolaten die synergistische Wechselwirkung zwischen Glycyrrhetinsäure, dem Aglykon der Glycyrrhizinsäure, und verschiedenen Aminoglykosiden, u. a. Gentamicin, im Checkerboard-Verfahren nach. Die FICI-Werte (FICI:  $<0,27$ ) sind vergleichbar mit den hier erhaltenen Werten (FICI: 0,15) (de Breij *et al.* 2016).



**Abb. 43:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Gentamicin bei MRSA Nr. 29. Maximale Reduktion der MHK von 1024 auf 64 µg/mL; FICI: 0,13. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

#### 4.3.3 Synergistisch wirkende Kombinationen von Imipenem mit Naturstoffen gegen MRSA

Die Resistenz gegenüber dem  $\beta$ -Laktamase-stabilen Imipenem beruht auf der Expressierung veränderter Penicillin-bindender Proteine. Wechselwirkung mit Imipenem wurde am Patientenisolat MRSA Nr. 25 untersucht, die MHK für Imipenem liegt bei 8 bis 16 µg/mL. Einen Synergismus in Kombination mit Imipenem zeigten die methanolischen Extrakte von *Salvia officinalis*, *Arctostaphylos uva-ursi* und die wässrigen Extrakte von *Salvia officinalis* und *Lythrum salicaria*. Die stärkste synergistische Wirkung zeigte der methanolische *Salvia officinalis* Extrakt (FICI: 0,02), schon bei 4 µg/mL erhöhte sich die Empfindlichkeit gegenüber Imipenem und es kam zu einer Reduzierung der Imipenem-MHK von 16 auf 0,0156 µg/mL (Abb. 44). Der wässrige Extrakt (FICI: 0,02) erhöhte die Empfindlichkeit bei 8 µg/mL und reduzierte die Imipenem-MHK auf 0,125 µg/mL. Obwohl der methanolische *Lythrum salicaria* Extrakt die MHK nur um eine Verdünnungsstufe verringerte zeigte der wässrige Extrakt mit einem FICI von 0,33 schwach synergistische Wirkungen. Bei allen anderen untersuchten Kombinationen kam es nicht zu einer stärkeren Wirkung des wässrigen Extraktes im Vergleich zum methanolischen Extrakt (Tab. 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9). Wie bei Ampicillin kam es auch bei der Kombination von Imipenem und *Arctostaphylos uva-ursi* zu synergistischen Wirkungen (FICI: 0,11). Ursache könnte hier das Vorkommen von Corilagin und die damit einhergehende Hemmung von Penicillin-bindenden Proteinen sein (siehe 4.3.1).



**Abb. 44:** Einfluss von *Salvia officinalis* auf die MHK von Imipenem bei MRSA Nr. 25. Maximale Reduktion der MHK von 16 auf 0,0156 µg/mL; FICI: 0,13. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Synergistische Wirkungen mit Imipenem bei Patientenisolaten mit *Staphylococcus aureus* fanden auch Silva *et al.* mit dem ätherischen Öl von *Ocimum basilicum* und Barbosa-Filho *et al.* mit einem ethanologischen Extrakt von *Anacardium microcarpum* (Silva *et al.* 2015, Barbosa-Filho *et al.* 2015). Die Erhöhung der Imipenempfindlichkeit durch zehn verschiedene Sesquiterpene zeigten Goncalves *et al.* an einem Patientenisolat mit dem Agardiffusionstest (Goncalves *et al.* 2011). Eines dieser Sesquiterpene das trans-Caryophyllen ist ein Bestandteil des ätherischen Öles von *Salvia officinalis* (Wichtl 2009). Wenn bei der Einengung des Trockenextraktes das ätherische Öl nicht vollständig verdunstet ist, könnten Sesquiterpene für die beobachteten Wirkungen verantwortlich sein. Dies würde auch die stärkere Wirkung des methanolischen Extraktes erklären, da in diesem mehr von dem lipophilen ätherischen Öl enthalten wäre.

#### 4.4 *Pseudomonas aeruginosa*

Zur Untersuchung der folgenden Kombinationen diente das Patientenisolat PA Nr. 289 das aus Tracheobronchialsekret gewonnen wurde, Metallo-β-Laktamase-negativ ist und zum 4MRGN-Typ gehört. Die Kombinationen mit Imipenem wurden zusätzlich am porindefekten (OprD) Isolat PA Nr. 323 untersucht, welches resistent gegenüber Imipenem und Meropenem ist. Für die Wechselwirkung zwischen Piperacillin und verschiedenen Extrakten diente zusätzlich zu PA Nr. 289, PA Nr. 288 (Metallo-β-Laktamase-positiv, 4MRGN-Typ), PA Nr. 264 (Metallo-β-Laktamase-negativ, ESBL-positiv, 3MRGN-Typ), PA Nr. 241 (Metallo-β-Laktamase-positiv Typ VIM-2, ESBL-positiv), PA Nr. 242 (Metallo-β-Laktamase-negativ) sowie PA Nr. 309 und PA Nr. 311 (beide 3MRGN-Typ). Die

Ergebnisse der Untersuchung auf synergistische Wechselwirkungen sind in den Tabellen 7, 8 und 9 dargestellt.

**Tab. 7:** FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) Extrakten und Antibiotika bei *Pseudomonas aeruginosa* (FICI ≤0,5 synergistisch, FICI >0,5- 4,0 indifferent, FICI >4 antagonistisch (Odds 2003). Mittelwert von fünf Versuchen, n/c: kein Effekt bei ¼ der MHK (Extrakt). *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289 oder in Klammern angegeben).

	<i>Achillea millefolium</i> ME	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i> ME	<i>Cetraria islandica</i> ME
Ampicillin	<b>0,18</b>	n/c	<b>0,36</b>
Ampicillin/Sulbactam	n/c	n/c	0,53
Gentamicin	n/c	n/c	n/c
Vancomycin	n/c	n/c	<b>0,05</b>
Aztreonam	0,61	n/c	0,53
Imipenem	n/c; n/c (PA Nr.323)	0,75; n/c (PA Nr.288); n/c (PA Nr.323)	n/c; n/c (PA Nr.288); n/c (PA Nr.323)
Piperacillin	<b>0,40</b> ; <b>0,17</b> (PA Nr. 309); <b>0,33</b> (PA Nr.288); 0,53 (PA Nr. 242)		<b>0,45</b> ; <b>≤0.03</b> (PA Nr.288); <b>0,12</b> (PA Nr.309); <b>0,33</b> (PA Nr.242)

**Tab. 8:** FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) oder wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei *Pseudomonas aeruginosa* (FICI ≤0,5 synergistisch, FICI >0,5- 4,0 indifferent, FICI >4 antagonistisch (Odds 2003). Mittelwert von fünf Versuchen, n/c: kein Effekt bei ¼ der MHK (Extrakt). *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289 oder in Klammern angegeben).

	<i>Lythrum salicaria</i> ME	<i>Lythrum salicaria</i> WE	<i>Plantago lanceolata</i> ME
Ampicillin	0,51	0,51	<b>0,25</b>
Ampicillin/Sulbactam	n/c	n/c	<b>≤0,25</b>
Gentamicin	n/c	n/c	n/c
Vancomycin	<b>0,07</b>	<b>0,008</b>	n/c
Aztreonam	n/c	n/c	0,52
Imipenem	n/c; n/c (PA Nr. 288); n/c (PA Nr. 323)	n/c; n/c (PA Nr. 288); n/c (PA Nr.323)	n/c; n/c (PA Nr.323)
Piperacillin	n/c		n/c; <b>0,41</b> (PA Nr.309); 0,73 (PA Nr.242); 0,93 (PA Nr.288); n/c (PA Nr.264); n/c (PA Nr.311)

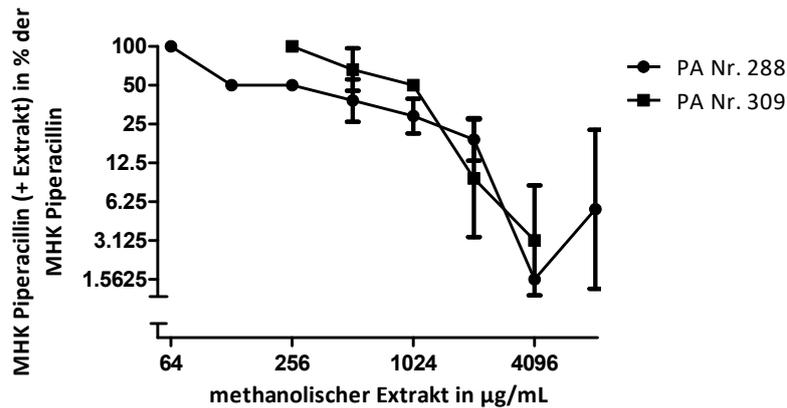
**Tab. 9:** FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) oder wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei *Pseudomonas aeruginosa* (FICI ≤0,5 synergistisch, FICI >0,5- 4,0 indifferent, FICI >4 antagonistisch (Odds 2003). Mittelwert von fünf Versuchen, n/c: kein Effekt bei ¼ der MHK (Extrakt). *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289 oder in Klammern angegeben).

	<i>Salvia officinalis</i> ME	<i>Salvia officinalis</i> WE	<i>Solidago virgaurea</i> ME	<i>Thymus vulgaris</i> ME
Ampicillin	1,00	n/c	<b>0,23</b>	n/c
Ampicillin/Sulbactam	n/c	n/c		n/c
Gentamicin	0,8	n/c	n/c	n/c
Vancomycin	n/c	n/c	n/c	n/c
Aztreonam	n/c	n/c	1,00	0,99
Imipenem	n/c	n/c	n/c; n/c (PA Nr. 288); n/c (PA Nr.323)	n/c; n/c (PA Nr.323)
Piperacillin			<b>0,45;</b> 0,58 (PA Nr.288); 0,63 (PA Nr.264); 0,63 (PA Nr.311)	

#### **4.4.1 Synergistisch wirkende Kombinationen von Ampicillin bzw. Piperacillin mit Naturstoffen gegen *Pseudomonas aeruginosa***

Der bedeutendste Resistenzmechanismus ist die im periplasmatischen Raum lokalisierten chromosomal kodierten AmpC- $\beta$ -Laktamasen. Die Effluxpumpe MexXY-OprM hat nur untergeordnete Bedeutung hinsichtlich der Resistenz gegen  $\beta$ -Laktame. Die methanolischen Extrakte von *Cetraria islandica*, *Achillea millefolium*, *Solidago virgaurea* und *Plantago lanceolata* zeigten mit Ampicillin an PA Nr. 289 eine synergistische Wirkung (Tab. 7, 8, 9). Alle Extrakte senkten die Ampicillin-MHK um zwei bis drei Verdünnungsstufen von 32768  $\mu\text{g/mL}$  auf 4096 bis 8192  $\mu\text{g/mL}$  bei relativ hohen Extraktkonzentrationen von 4096 bis 32768  $\mu\text{g/mL}$ . Die geringsten Konzentrationen, die einen Effekt zeigten, lagen zwischen 32 und 128  $\mu\text{g/mL}$ .

Mit einem anderen  $\beta$ -Laktam, Piperacillin dem Standardantibiotikum bei Pseudomonasinfektionen, führten nicht alle der vier Extrakte zu einer synergistischen Wirkung. So wirkte *Solidago virgaurea* synergistisch bei PA Nr. 289, aber mit drei anderen Patientenisolaten zeigte sich kein Synergismus. *Plantago lanceolata* wirkte nur mit PA Nr. 309 synergistisch, bei fünf anderen Patientenisolaten kam es zu keinem Effekt. Der Extrakt von *Cetraria islandica* wies an allen vier untersuchten Patientenisolaten synergistische Wechselwirkungen mit Piperacillin auf und der Extrakt von *Achillea millefolium* tat dies an drei von vier Patientenisolaten (Abb. 45, Anhang Abb. 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22). Während *Cetraria islandica* an beiden Metallo- $\beta$ -Laktamase-negativen Isolaten (PA Nr. 289, PA Nr. 242) die Piperacillin-MHK nur um ein bis zwei Verdünnungsstufen senkte, reduzierte sich die Piperacillin-MHK bei Metallo- $\beta$ -Laktamase-positiven Isolat PA Nr. 288 und an PA Nr. 309, dessen Metallo- $\beta$ -Laktamase-Status unbekannt ist, um bis zu sechs Stufen. Die MHK für Piperacillin sank für PA Nr. 288 von 64  $\mu\text{g/mL}$  auf 1  $\mu\text{g/mL}$  und für PA Nr. 309 von 16  $\mu\text{g/mL}$  auf 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . Somit konnte die Piperacillinresistenz bei drei der vier untersuchten Patientenisolate aufgehoben werden, denn bei PA Nr. 242 sank die MHK nur auf 32  $\mu\text{g/mL}$  von ursprünglich 128  $\mu\text{g/mL}$ . Die minimal modulierende Konzentration (MMK) betrug bei drei Isolaten 512  $\mu\text{g/mL}$ , nur bei PA Nr. 288 war sie mit 128  $\mu\text{g/mL}$  geringer. Ein Unterschied in der antibakteriellen Wirkung des Extraktes auf die vier Isolate bestand nicht, die MHK-Werte lagen bei 8192  $\mu\text{g/mL}$  bzw. 16348  $\mu\text{g/mL}$ .



**Abb. 45:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 288, 309. Maximale Reduktion der MHK von 64 auf <2 µg/mL (288), bzw. 16 auf 0,5 µg/mL (309); FICI: <0,03 (288), 0,12 (309). Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Der Extrakt von *Achillea millefolium* mit Piperacillin führte bei Patientenisolat PA Nr. 242 mit der höchsten Piperacillinresistenz zu keiner Synergie, der FICI lag mit 0,53 knapp über der Grenze von 0,5. Bei drei anderen Isolaten wirkte der Extrakt synergistisch, die MMK-Werte lagen mit 2048 bzw. 4096 µg/mL höher, verglichen mit *Cetraria islandica* und die Reduzierung der Piperacillin-MHK war mit zwei Verdünnungsstufen bei PA Nr. 289 ähnlich (Anhang Abb. 19, 20, 21, 22). Die Piperacillin-MHK von PA Nr. 288 ließ sich im Gegensatz zu *Cetraria islandica* auch nur um zwei Stufen senken. PA Nr. 309 zeigte wie mit *Cetraria islandica* eine starke Senkung der Piperacillin-MHK von 16 auf 0,125 µg/mL. Bei drei von vier Patientenisolaten konnte die Piperacillinresistenz aufgehoben werden. Auch bei *Achillea millefolium* bestand kein Unterschied bei den verschiedenen Isolaten hinsichtlich der antibakteriellen Wirkung des Extraktes, die MHK lag bei 32768 µg/mL.

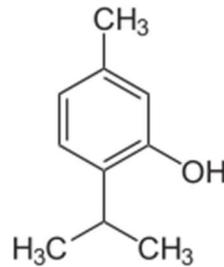
An einem Patientenisolat konnten Nascimento *et al.* mit den ethanolischen Extrakten von *Thymus vulgaris*, *Syzygium aromaticum* und *Syzygium cumini* eine Erhöhung der Ampicillinempfindlichkeit nachweisen (Nascimento *et al.* 2000). Der hier untersuchte methanolische Extrakt von *Thymus vulgaris* führte in der Kombination mit Ampicillin zu keinem Effekt (Tab. 9). Auch ein Lignan von *Sambucus williamsii*, (+)-Medioresinol zeigte mit Ampicillin Synergie (FICI: 0,5) an einem Referenzstamm (Hwang *et al.* 2013). EDTA, welches die Lipopolysaccharidstruktur der äußeren Membran verändert und damit die Permeabilität erhöht, konnte in einer Konzentration von 500 µg/mL die Ampicillin-MHK von 1524 auf 22 µg/mL an einem Referenzstamm reduzieren. Als Gründe wurden von Lambert *et al.* nicht nur ein permeabilitätserhöhender Effekt, sondern auch eine Begünstigung von Aufnahmemechanismen oder die Entfernung von inaktivierenden Faktoren aus der Membran oder dem periplasmatischen Spalt genannt (Lambert *et al.* 2004). Mit einem Inhaltsstoff aus dem

Manukahonig, dem Methylglyoxal trat Synergie (FICI: 0,5) mit Piperacillin an einem Referenzstamm und mehreren Patientenisolaten auf (Mukherjee *et al.* 2011).

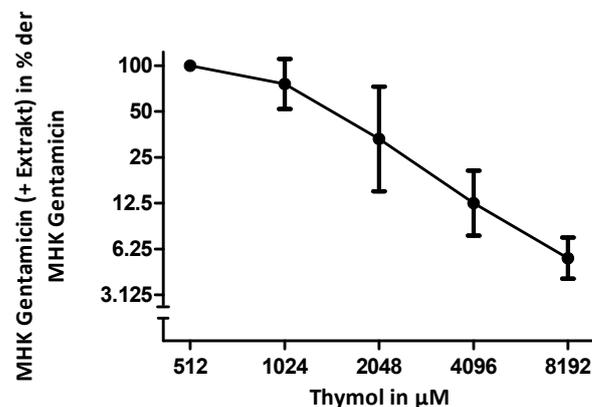
#### **4.4.2 Synergistisch wirkende Kombinationen von Gentamicin mit Naturstoffen gegen *Pseudomonas aeruginosa***

Die Resistenz von *Pseudomonas aeruginosa* gegen die Wirkung von Aminoglykosiden beruht auf verschiedenen Mechanismen. Vor allem verschiedene Aminoglykosid-modifizierende Enzyme (AME) aber auch Permeabilitätsveränderungen, Zielstrukturveränderungen an den Bindestellen der Ribosomen oder Veränderungen am Lipid A, wodurch die Aminoglykosidaufnahme gehemmt wird, sind für die Resistenz verantwortlich. Als einziger intrinsischer Mechanismus ist die Expression der Effluxpumpe MexXY-OprM an der Resistenz beteiligt. Ihre vermehrte Expression sowie einige Aminoglykosid-modifizierende Enzyme können zu einer Hochresistenz gegenüber Aminoglykosiden führen. Keiner der acht untersuchten Extrakte zeigte eine Synergie mit Gentamicin (Tab. 7, 8, 9), nur in der Kombination mit Thymol (Abb.46) kam es zu synergistischen Wechselwirkungen (FICI:  $\leq 0,18$ ) an dem Gentamicin-hochresistenten Isolat PA Nr. 289 (Abb. 47). Ab Konzentrationen von 2048  $\mu\text{M}$  wurde die MHK von Gentamicin reduziert, in der höchsten Konzentration von 8192  $\mu\text{M}$  sank die MHK von ursprünglich 4096  $\mu\text{g}/\text{mL}$  auf 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Thymol allein war nicht in der Lage das Wachstum von PA Nr. 289 bis zu Konzentrationen von 16384  $\mu\text{M}$  zu hemmen (Anhang Tab. 1). Die Gentamicin-hochresistenten Patientenisolat PA Nr. 242 und PA Nr. 288 zeigten bei 3 mM Thymol nur eine MHK-Verschiebung um eine Verdünnungsstufe von 16384 auf 8192  $\mu\text{g}/\text{mL}$  bzw. 8192 auf 4096  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , während das Patientenisolat PA Nr. 311 ohne Gentamicinhochresistenz bei 3 mM keine MHK-Verschiebung aufwies. Mit 4,8 mM konnte die MHK des resistenten Keims in den sensiblen Bereich verschoben werden, von 16 auf 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Ergebnisse nicht abgebildet). Veras *et al.* wiesen ebenso eine Erhöhung der Gentamicin-Empfindlichkeit durch Thymol am Referenzstamm ATCC 15442 nach. Dieser war nicht hochresistent und mit 64  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (426  $\mu\text{M}$ ) Thymol sank die MHK von 32 auf 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Bei dieser Thymolkonzentration trat bei den hier untersuchten Patientenisolaten keine Veränderung auf. Jedoch war die Thymol-MHK vom Referenzstamm ATCC 15442 mit 512  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (3408  $\mu\text{M}$ ) auch deutlich geringer als bei PA Nr. 289 mit  $\geq 32768 \mu\text{M}$ . Als möglichen Mechanismus der Resistenz-modifizierenden Wirkung diskutierte Veras *et al.* die Akkumulation in der Bakterienmembran aufgrund des lipophilen Charakters, die zur Zerstreuung der Polypeptidketten und einer Permeabilitätserhöhung um 90 % bei *Pseudomonas aeruginosa* und *Staphylococcus aureus* führt (Veras *et al.* 2017). Mit dem Agarverdünnungstest stellten auch Walsh *et al.* bei 1 mg/mL (6,66 mM) keine Inhibition des Wachstums von *Pseudomonas aeruginosa* fest (Walsh *et al.* 2003). Hamuod *et al.* stellen an einem Referenzstamm und drei klinischen Isolaten MHK-Werte von 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (3,33 mM) bzw. zwischen 1000 und 4000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (6,66 – 26,63 mM) fest (Hamoud *et al.* 2014). Als Ursache der

antibakteriellen Aktivität von Komponenten ätherischer Öle nach Penetration in die Membran nannten Veras *et al.* die Störung des Ionentransportes, welche zum Verlust von Ionen und Verringerung des Membranpotentials und letztendlich zum ATP-Abbau und Zelltod führt (Veras *et al.* 2017).



**Abb. 46:** Thymol



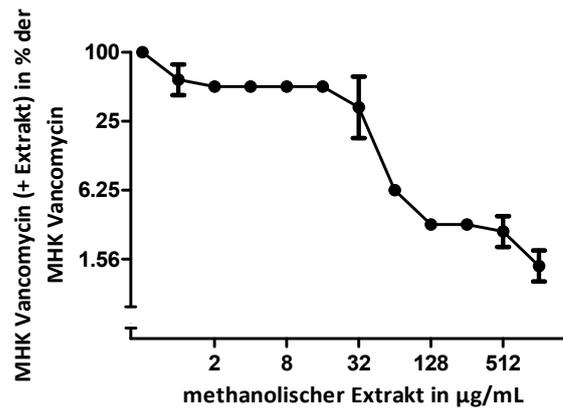
**Abb. 47:** Einfluss von Thymol auf die MHK von Gentamicin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289. Maximale Reduktion der MHK von 4096 auf 256  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FICI: 0,18. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

#### 4.4.3 Synergistisch wirkende Kombinationen von Vancomycin und Naturstoffen gegen

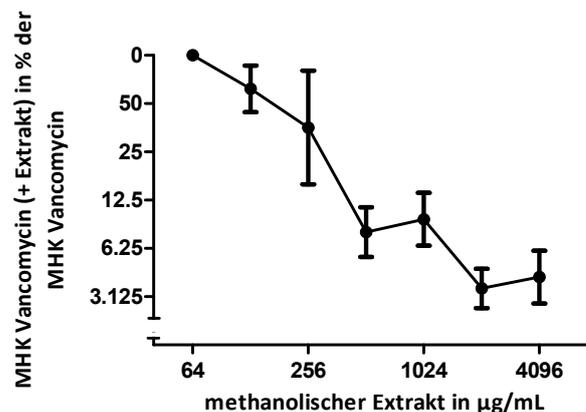
##### *Pseudomonas aeruginosa*

Bei Infektionen mit gramnegativen Erregern wird Vancomycin nicht eingesetzt. Aufgrund der Hydrophilie wäre eine Penetration der äußeren Membran nur durch die Porine möglich, dies ist aber durch die Größe des Moleküls ausgeschlossen. Deshalb zeigte Vancomycin am Patientenisolat PA Nr. 289 keine antibiotische Wirkung, auch bei Vancomycinkonzentrationen von 65,536 mg/mL kam es zum Wachstum. Erst bei 131,072 mg/mL war kein Wachstum mehr zu erkennen, vermutlich eher aufgrund von physikochemischen Wirkungen statt inhibierenden Wirkungen an bakteriellen Zielstrukturen.

Trotz der Impermeabilität der äußeren Membran sank die Vancomycin-MHK in Anwesenheit der methanolischen Extrakte von *Lythrum salicaria* (FICI: 0,07) und *Cetraria islandica* (FICI: 0,05) ab Konzentrationen von 1 µg/mL bzw. 128 µg/mL (Abb. 48, 49). Es traten starke synergistische Wirkungen auf, die Vancomycin-MHK konnte bis auf 2048 µg/mL mit 1024 µg/mL *Lythrum-salicaria*-Extrakt und bis auf 4096 bis 8192 µg/mL mit 4096 µg/mL *Cetraria-islandica*-Extrakt gesenkt werden. Die Untersuchung des wässrigen *Lythrum-salicaria*-Extraktes führte zu uneinheitlichen Ergebnissen.



**Abb. 48:** Einfluss von *Lythrum salicaria* auf die MHK von Vancomycin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289. Maximale Reduktion der MHK von 131072 auf 2048 µg/mL; FICI: 0,07. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



**Abb. 49:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Vancomycin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289. Maximale Reduktion der MHK von 131072 auf 8192 µg/mL; FICI: 0,05. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.

Auch mit einer anderen Kombination konnte Vancomycin in die Lage versetzt werden die äußere Membran gramnegativer Erreger zu überwinden. Hamoud *et al.* zeigten dies mit Vancomycin in Kombination mit dem Alkaloid Sanguinarin und EDTA an verschiedenen gramnegativen Bakterien, die gegenüber Vancomycin sensibel wurden (Hamoud *et al.* 2014). Ein Derivat vom Vancomycin mit einem

quartären Ammonium und einer hydrophoben Seitenkette war trotz seiner Größe in der Lage die äußere Membran mehrerer gramnegativer Bakterien zu durchdringen (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*) und antibakterielle Wirksamkeit zu entfalten (Yarlagadda *et al.* 2015).

Der methanolische Extrakt von *Lythrum salicaria* zeigte mit einer MHK von 2048 µg/ml von allen Extrakten die stärkste Aktivität gegen *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289, gefolgt vom wässrigen Extrakt mit 4096 µg/mL. *Lichen islandicus* war mit 8192 µg/mL etwas schwächer wirksam (Abb. 2). Bencsik erhielt für einen wässrig-ethanolischen Extrakt von *Lythrum salicaria* bei *Pseudomonas aeruginosa* einen ähnlichen MHK-Wert von 2,5 mg/mL (Bencsik 2014).

Der methanolische Extrakt von *Thymus vulgaris* inhibierte das Wachstum von *Pseudomonas aeruginosa* bei 8192 µg/mL. Die Angaben in der Literatur liegen deutlich höher, so bestimmten Navarro *et al.* ebenso mit einem methanolischen Extrakt eine MHK von 40 mg/mL im Agarverdünnungstest und Nascimento *et al.* mit einem ethanolischen Extrakt im Mikrodilutionsverfahren 70 mg/mL, beide mit einem ATCC-Referenzstamm (Navarro *et al.* 1996, Nascimento *et al.* 2000). *Salvia officinalis* inhibierte bei 4096 µg/mL, während beim wässrigen Extrakt 8192 µg/mL notwendig waren.

#### **4.5 *Klebsiella pneumoniae***

Zur Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Extrakten und Antibiotika diente das multiresistente Patientenisolat KP Nr. 245, welches eine Carbapenemase vom OXA-48-Typ expremiert. Wechselwirkungen mit Imipenem wurden zusätzlich mit KP Nr. 320 durchgeführt. Dieses Isolat weist einen Porinverlust von OmpK35 und OmpK36 auf und produziert β-Laktamasen von Typ CTX-M-15, TEM-1, OXA-1 und SHV-1.

Keiner der acht untersuchten Extrakte zeigte eine synergistische Wirkung mit Ampicillin, Imipenem, Aztreonam, Gentamicin oder Vancomycin.

## 5 Zusammenfassende Diskussion

In dieser Arbeit führte das Triterpensaponin Glycyrrhizinsäure zu starken synergistischen Wirkungen bei 44 Enterokokkenisolaten mit einer low-level-Gentamicinresistenz, 11 Enterokokkenisolaten mit high-level-Gentamicinresistenz und einem Gentamicin-resistenten MRSA-Isolat. Bei allen untersuchten Isolaten wird die Resistenz in unterschiedlichem Ausmaß durch Aminoglykosid-modifizierende Enzyme (AME) hervorgerufen (siehe 1.3.1.1.3). Der Wirkmechanismus dieses Synergismus könnte daher in einer Inhibition der AME durch Glycyrrhizinsäure bestehen. Bei den high-level-resistenten *Enterococcus-faecium*-Isolaten reduzierte sich die Gentamicin-MHK von 131072 µg/mL auf 8 – 16 µg/mL. Dies entspricht dem MHK-Niveau der low-level-resistenten Isolate und könnte auf eine Enzyminhibition von ACC(6')-Ie/APH(2')-Ia als Mechanismus hinweisen (siehe 4.2.3). Bekannte Inhibitoren von AAC(6')-Ii, dem Enzym das die low-level-Resistenz bei *Enterococcus faecium* vermittelt, sind kationische Peptide. Aufgrund ihrer positiven Ladung binden sie an der negativ geladenen Bindungsstelle für die Aminoglykoside (Draker *et al.* 2003, Zárate *et al.* 2018). Da Glycyrrhizinsäure die positive Ladung fehlt, die für die Interaktion mit der Bindungsstelle notwendig wäre, erscheint eine Enzyminhibition als mechanistische Grundlage unwahrscheinlich. Die Resistenz-modifizierende Wirkung von Triterpenen vom Oleanan- und Lupan-Typ in Kombination mit Vancomycin und Methicillin zeigten Chung *et al.* an *Staphylococcus aureus* (Chung *et al.* 2011).

Den antibakteriellen Mechanismus der Glycyrrhizinsäure bei *Pseudomonas aeruginosa* untersuchten Chakotiya *et al.* und wiesen eine Permeabilitätserhöhung der Membran nach, die der von Amikacin überlegen war. Auch eine Hemmung von Effluxpumpen und der Biofilmbildung wurde festgestellt. Die antibakterielle Aktivität der Glycyrrhizinsäure auf das klinische *P. aeruginosa* Isolat war mit 100 µg/mL relativ stark. Die hier untersuchten klinischen *P. aeruginosa*-Isolate zeigten auch noch Wachstum bei Glycyrrhizinsäurekonzentrationen von 5 mg/mL (PA Nr. 241, 242, 264, 288, 289, 309, 311). Die 52 *Enterococcus-faecium*-Isolate in dieser Arbeit zeigten MHK-Werte von 4 oder 8 mg/mL (Anhang Tab. 1).

Da Effluxpumpen nicht zur Aminoglykosidresistenz der Enterokokken beitragen, liegt es nahe, dass die Resistenz-modifizierende Wirkung des Glycyrrhizins auf einer Erhöhung der Membranpermeabilität beruht. Diese könnte die durch AME gestörte zweite Aufnahmephase befördern und damit das Einsetzen der dritten Phase bei niedrigeren Aminoglykosidkonzentrationen ermöglichen. Weiterhin wäre auch eine erleichterte Porenbildung im späteren Verlauf der Gentamicinwirkung möglich (siehe 1.3.1.1.3). Die Eigenschaft der Glycyrrhizinsäure, die zur Erhöhung der Membranpermeabilität führt, ist vermutlich ihre Amphiphilie, aufgrund der Verknüpfung des hydrophoben Triterpens mit der

hydrophilen Zuckerkette (Abb. 23). Dies würde auch die Resistenz-modifizierenden Eigenschaften der anderen Saponine erklären (siehe 4.2.3). Die Reduzierung der Gentamicin-MHK bei *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 von 16 auf 0,5 µg/mL mit Glycyrrhizinsäure war in ihrer Intensität vergleichbar mit der Reduzierung bei low-level-resistenten *Enterococcus-faecium*-Isolaten. Da die intrinsische Resistenz bei dieser Art hauptsächlich über eine Impermeabilität der Membran vermittelt wird und nicht ausschliesslich über AME wie bei *E. faecium*, wäre bei einer Inhibition von AME als Wirkmechanismus eine geringere Reduzierung zu erwarten (siehe 1.3.1.1.3). Untersucht wurde auch das Triterpen Ursolsäure, das einen Triterpengrundkörper vom Ursan-Typ besitzt und nicht wie bei der Glycyrrhizinsäure vom Oleanan-Typ. Es ist kein Saponin, da es keine Zuckerkette besitzt, daher zeigt es auch keine amphiphilen Eigenschaften und sollte die Membranpermeabilität nicht beeinflussen. Übereinstimmend damit kam es zu keiner synergistischen Wechselwirkung mit Gentamicin an *Enterococcus faecium* BM 4147.

Die Aufhebung der Gentamicinresistenz an einem MRSA-Isolat durch Glycyrrhizinsäure geschah in einer ähnlichen Intensität wie bei *Enterococcus faecium* (Anhang Abb. 14). Die Resistenzmodifizierung ist daher speziesunabhängig. Gegen die Hypothese, dass die Permeabilitätssteigerung der Membran die Ursache der synergistischen Wechselwirkung ist, sprechen die Ergebnisse von de Breij *et al.*. Sie wiesen eine synergistische Wechselwirkung von Gentamicin (FICI: >0,27) sowie zwei weiterer Aminoglykosiden und der Glycyrrhetinsäure bei einem Patientenisolat mit MRSA nach (de Breij *et al.* 2016). Die Glycyrrhetinsäure ist das Aglykon der Glycyrrhizinsäure, welches nach Abspaltung der Zuckerkette entsteht. Damit gehen auch die amphiphilen Eigenschaften verloren, die als Bedingung für die Permeabilitätserhöhung erscheinen. Auch die großen Unterschiede im Ausmaß der Reduzierung der Gentamicin-MHK zwischen low-level-resistenten und high-level-resistenten *Enterococcus-faecium*-Isolaten, von 4 – 32 µg/mL auf 0,125 – 2 µg/mL verglichen mit einer Reduzierung von 131072 µg/mL zu 8 – 16 µg/mL, sprechen gegen einen unspezifischen Membraneffekt (siehe 4.2.3).

Die synergistische Wirkung des methanolischen Extraktes von *Glycyrrhiza glabra* mit Gentamicin ist vermutlich auf die Glycyrrhizinsäure und das in geringeren Mengen vorkommende Uralsaponin N zurückzuführen (siehe 4.2.3). Licoricesaponin A3 und B2 inhibierten das Wachstum bei den untersuchten Konzentrationen und die übrigen fünf Vertreter aus der Saponinfraktion der Süßholzwurzel zeigten keine Wirkung. Darunter war auch das Licoricesaponin G2 dessen einziger Unterschied in der Struktur verglichen mit Uralsaponin N die axiale Stellung einer Hydroxylgruppe im zweiten Glucuronsäurerest ist. Dennoch zeigte sie keinen Einfluss auf die MHK von Gentamicin (siehe 4.2.3).

Von den Saponinen, die aus anderen Pflanzen stammten, waren nur die Triterpensaponine vom Oleanan-Typ Primulasaponin I,  $\alpha$ -Hederin und  $\beta$ -Aescin in ihrer Wirkung mit Glycyrrhizinsäure vergleichbar, teilweise erzielten sie ähnliche Wirkungen bei geringeren Konzentrationen (siehe 4.2.3).

Neben dem Süßholzwurzelextrakt führten auch sechs andere methanolische Extrakte zu synergistischen Wechselwirkungen mit Gentamicin (Tab. 2, 3). Wie bei der Glycyrrhizinsäure traten diese Wirkungen bei *E. faecium* und auch bei *Staphylococcus aureus* auf. Bei den gramnegativen Erregern war dies nicht der Fall, vermutlich bedingt durch den unterschiedlichen Zellwandaufbau. Von allen untersuchten Kombinationen sind die erfolgversprechendsten in Tabelle 10 dargestellt.

**Tab. 10:** FICI der Wechselwirkung zwischen Antibiotika und methanolischen Extrakten oder Einzelsubstanzen (FICI  $\leq 0,5$  synergistisch, FICI  $>0,5- 4,0$  indifferent, FICI  $>4$  antagonistisch (Odds 2003). Mittelwert von fünf Versuchen).

VRE		FICI
Ampicillin	Urolithin A	$\leq 0.0002$
Vancomycin	<i>Salvia officinalis</i>	0,06
Gentamicin	<i>Cetraria islandica</i>	0,05
Gentamicin	Glycyrrhizinsäure	0,016 - $\leq 0,5$
MRSA		
Ampicillin	<i>Arctostaphylos uva-ursi</i>	0,15
Gentamicin	<i>Cetraria islandica</i>	0,13
Gentamicin	<i>Salvia officinalis</i>	0,1
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		
Piperacillin	<i>Cetraria islandica</i>	$\leq 0,03 - 0,45$

## 6 Fazit

Antibiotikaresistenzen sind ein weltweites Problem, welches die erfolgreiche Behandlung von Infektionskrankheiten insbesondere auch von Wundinfektionen bedroht. Die zunehmende Verbreitung von Resistenzen gegen Reserveantibiotika für lebensbedrohliche Infektionen vor allem im gramnegativen Bereich ist besorgniserregend. Mittlerweile findet die Hälfte aller nosokomialen Infektionen durch multiresistente Erreger statt. Eine Entwicklung, die den medizinischen Fortschritt, der auf diesem Gebiet erreicht wurde, teilweise gefährdet (World Health Organization 2014). Durch den Mangel an neuen Antibiotika verschlechtert sich die Situation zusätzlich (Kirchner *et al.* 2014).

Die Verwendung von Adjuvantien in der antiinfektiven Therapie ist Teil einer sinnvollen Strategie für die Bewältigung dieser Problematik. Das Potential zeigt sich am umfangreichen und erfolgreichen Einsatz von  $\beta$ -Laktamaseinhibitoren in Kombination mit Penicillinen. Durch Adjuvantien kann die Wirksamkeit der vorhandenen Antibiotika erhalten und neue Therapieoptionen für bekannte Antibiotika können erschlossen werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen ein therapeutisches Potential der untersuchten Substanzen für die Verwendung als Adjuvantien vermuten (Tab. 10). Die Wechselwirkungen mit den Standardantibiotika Ampicillin bei VRE und Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* oder dem Reserveantibiotikum Vancomycin bei VRE könnten zur Verbesserung der Therapie dieser Infektionen beitragen. Die Aufhebung der intrinsischen Gentamicinresistenz bei den Enterokokken durch Glycyrrhizinsäure lässt einen therapeutischen Einsatz dieser Kombination sinnvoll erscheinen. Aufgrund der geringen Bioverfügbarkeit der Glycyrrhizinsäure, bedingt durch die Hydrolyse und geringfügige Absorption im Gastrointestinaltrakt ist eine orale Gabe der Glycyrrhizinsäure nicht möglich (Sasakia *et al.* 2003). Obwohl sie im Vergleich zu anderen Saponinen eine niedrige hämolytische Aktivität aufweist (Hämolytischer Index: <2000) und in Japan parenteral bei chronischer Hepatitis appliziert wird, sind die notwendigen Konzentrationen für die Resistenzmodifizierung viel zu hoch für eine systemische Gabe (Hänsel & Sticher 2007, van Rossum *et al.* 1999). Möglich wäre eine topische Anwendung der Glycyrrhizinsäure in Kombination mit Gentamicin. Topische Formulierungen mit 0,1 % Glycyrrhizinsäure wurden auf intakter Haut gut vertragen und zeigten keine Irritationen (Cosmetic Ingredient Review Expert Panel 2007). Gentamicin ist das am häufigsten verschriebene Lokalantibiotikum und weist ein relativ geringes Sensibilisierungspotential auf. Die gravierenden unerwünschten Wirkungen wie die Nephro- und Ototoxizität spielen bei der topischen Applikation kaum eine Rolle, da Gentamicin aufgrund seiner Hydrophilie durch die intakte Haut kaum resorbiert wird. Die topische Antibiotikatherapie wird aus unterschiedlichen Gründen oft abgelehnt. Befürchtet werden Induktionen von Kontaktsensibilisierungen, Resistenzentwicklungen gegenüber wichtigen Systemantibiotika, eine Resistenzselektion innerhalb der kutanen Flora, resorptive Toxizität und lokal

toxische Effekte. Jedoch sind Resistenzentstehungen bei der antibiotischen Kombinationstherapie durch die Wirkung über verschiedene Mechanismen erschwert und im Vergleich zur oralen Therapie wird eine intestinale Resistenzselektion verhindert. Unerwünschte systemische Wirkungen werden reduziert und es kommt zu einem schnelleren Wirkungseintritt. Ein weiterer Vorteil der lokalen Gabe ist, dass die Beeinflussung pharmakokinetischer Parameter, die zum Beispiel bei schwereren Brandverletzungen auftritt, nicht berücksichtigt werden muss (Höger 1998).

Auch die Kombination von Vancomycin und Inhaltsstoffen von Salbeiblättern könnte zu einer erfolgversprechenden topischen Formulierung führen. Die Resorption von Vancomycin über die Haut ist verglichen mit Gentamicin als noch geringer einzuschätzen. Im Gastrointestinaltrakt findet die Vancomycinresorption ebenso nicht statt; das ermöglicht die Verwendung dieser Kombination zur Dekontamination von Patienten, die mit VRE besiedelt sind. Zur Aufklärung der Rolle einzelner Extraktbestandteile bei den hier untersuchten synergistischen Kombinationen mit Antibiotika sind noch weitere Untersuchungen notwendig.

## 7 Literatur

Abbasoglu, U. & Türköz, S., 1995. Antimicrobial activities of saponin extracts from some indigenous plants of Turkey. *International Journal of Pharmacognosy*, 33(4), pp.293-296

Acebey-Castellon, I. L. *et al.*, 2011. Triterpenoid saponins from *Symplocos lancifolia*. *Journal of Natural Products*, 74(2), pp.163-168

Adelodun, V. O. *et al.*, 2013. Evaluation of antitrypanosomal and anti inflammatory activities of selected nigerian medicinal plants in mice. *African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines*, 10(6), pp.469-476

Adewunmi, C. O. *et al.*, 2001. Ethno-veterinary medicine: screening of Nigerian medicinal plants for trypanocidal properties. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), pp.19-24

Aghazadeh, M. *et al.*, 2013. Dissemination of aminoglycoside-modifying enzymes and 16S rRNA methylases among *acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Microbial Drug Resistance*, 19(4), pp.282-288

Aiyegoro, O. *et al.*, 2011. Interactions of Antibiotics and Methanolic Crude Extracts of *Azelia Africana* (Smith.) Against Drug Resistance Bacterial Isolates. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7), pp.4477-4503

Aktories *et al.*, 2005. Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Elsevier, München

Annan, K. *et al.*, 2012. In vitro anti-plasmodial activity of three herbal remedies for malaria in Ghana: *Adenia cissampeloides* (Planch.) Harms., *Terminalia liaivorensis* A. Chev, and *Elaeis guineensis* Jacq. *Pharmacognosy Research*, 4(4), pp.225-229

Annu, H. *et al.*, 1999. Effect on cell surface hydrophobicity and susceptibility of *Helicobacter pylori* to medicinal plant extracts. *FEMS Microbiology Letters*, 172(1), pp.41-45

Applequist, W. L. & Moerman, D. E., 2011. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research. *Economic Botany*, 65(2), pp.209-225

- Asl, M. N. & Hosseinzadeh, H., 2008. Review of pharmacological effects of *Glycyrrhiza sp.* and its bioactive compounds. *Phytotherapy Research*, 22(6), pp.709-724
- Aslangul, E. *et al.*, 2006. Acquired Gentamicin Resistance by Permeability Impairment in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(11), pp.3615-3621
- Avato, P. *et al.*, 2006. Antimicrobial activity of saponins from *Medicago sp.*: structure-activity relationship. *Phytotherapy Research*, 20(6), pp.454-457
- Balmer, P., 2012. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) in einem Universitätsklinikum (1998-2005) unter besonderer Beobachtung von Verteilung, Infektion und Letalität. Hochschulschrift, UB FU, Berlin
- Barbosa-Filho, V. M. *et al.*, 2015. Phytocompounds and modulatory effects of *Anacardium microcarpum* (cajuí) on antibiotic drugs used in clinical infections. *Drug Design, Development and Therapy*, 9, pp.5965-5972
- Bassetti, M. *et al.*, 2013. New antibiotics for bad bugs: where are we? *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 12:22
- Beara, I. N. *et al.*, 2012. Comparative analysis of phenolic profile, antioxidant, anti-inflammatory and cytotoxic activity of two closely-related Plantain species: *Plantago altissima* L. and *Plantago lanceolata* L., *LWT - Food Science and Technology*, 47(1), pp.64-70
- Becker, H. *et al.*, 2005. Bioactivity guided isolation of antimicrobial compounds from *Lythrum salicaria*. *Fitoterapia*, 76(6), pp.580-584
- Bencsik, T., 2014. Comparative Histological, Phytochemical, Microbiological, and Pharmacological Characterization of Some *Lythrum salicaria* L. Populations. unv. Diss. University of Pécs
- Bernardes, W. A. *et al.*, 2010. Antimicrobial Activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of Carnosic Acid and Carnosol. *Chemistry & biodiversity*, 7(7), pp.1835-1840
- Biswas, M. *et al.*, 2011. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Terminalia arjuna* leaf. *Journal of Phytology*, 3(1), pp.33-38

Biswas, T. K. & Mukherjee, B., 2003. Plant medicines of Indian origin for wound healing activity: a review. *The international journal of lower extremity wounds*, 2(1), pp.25-39

Blaschek, W., 2007. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. Bd. 3, 15, 6. Aufl., Springer, Berlin

Boerlin, P., 2013. Antimicrobial resistance and its epidemiology in: Giguère, S. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 5. Aufl., Wiley Blackwell, Oxford

Boucher, H. W. *et al.*, 2009. Bad bugs, no drugs: no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infection Diseases*, 48(1), pp.1-12

Brantner, A. & Grein, E., 1994. Antibacterial activity of plant extracts used externally in traditional medicine. *Journal of ethnopharmacology*, 44(1), pp.35-40

Breidenstein, E. B. *et al.*, 2011. Pseudomonas aeruginosa: all roads lead to resistance. *Trends in microbiology*, 19(8), pp.419-426

Brunner, R., 1966. Die Entwicklungsgeschichte der Antibiotika. In: Schriften des Vereins zur Verbreitung naturwissenschaftlicher Kenntnisse. Verlag der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Österreich, Wien

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2016. Berichte zur Resistenzmonitoringstudie 2012/2013. BVL, Berlin

Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2017. Berichte zur Resistenzmonitoringstudie 2014/2015. BVL, Berlin

Castelman, M., 2001. The New Healing Herbs. Rodale Books, Emmaus

Cerda, B. *et al.*, 2004. The potent in vitro antioxidant ellagitannins from pomegranate juice are metabolised into bioavailable but poor antioxidant hydroxy-6H-dibenzopyran-6-one derivatives by the colonic microflora of an unhealthy human. *European journal of nutrition*, 43(4), pp.205-220

Cetinkaya, Y. *et al.*, 2000. Vancomycin-Resistant Enterococci. *Clinical Microbiology*, 13(4), pp.686–707

Chaudhari, M. & Mengi, S., 2006. Evaluation of phytoconstituents of *Terminalia arjuna* for wound healing activity in rats. *Phytotherapy Research*, 20(9), pp.799-805

Chung, P. Y. *et al.*, 2011. Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 10, pp.25

Cirioni, O. *et al.*, 2011. In vitro activity and in vivo efficacy of the saponin diosgenyl 2-amino-2-deoxy- $\beta$ -D-glucopyranoside hydrochloride (HSM1) alone and in combination with daptomycin and vancomycin against Gram-positive cocci. *Journal of Medical Microbiology*, 60(9), pp.1337-1343

Clewell, D. B., 1990. Movable Genetic Elements and Antibiotic Resistance in Enterococci. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 9(2), pp.90-102

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacterial that Grow Aerobically—Ninth Edition: Approved Standard M07-A9. 32(2), CLSI, Wayne, PA

Cosmetic Ingredient Review Expert Panel, 2007. Final report on the safety assessment of glycyrrhetic acid, potassium glycyrrhetinate, disodium succinoyl glycyrrhetinate, glyceryl glycyrrhetinate, glycyrrhetinyl stearate, stearyl glycyrrhetinate, glycyrrhizic acid, ammonium glycyrrhizate, dipotassium glycyrrhizate, disodium glycyrrhizate, trisodium glycyrrhizate, methyl glycyrrhizate, and potassium glycyrrhizinate. *International Journal of Toxicology*, 26(Suppl2), pp.79-112

Coulibaly, K. *et al.*, 2010. Botanical study and evaluation of antifungal activity of *Terminalia ivorensis* and *Terminalia superba* (Combretaceae) on the growth in vivo of *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2(3), pp.904-912

Dafni, A. *et al.*, 1984. Ethnobotanical survey of medicinal plants in northern Israel. *Journal of Ethnopharmacology*, 10(3), pp.295-310

Dash, B. K. *et al.*, 2011. Antibacterial and antifungal activities of several extracts of *Centella asiatica* L. against some human pathogenic microbes. *Life Science and Medicine Research*, Vol. 2011, LSMR-35

Davis, E. A. & Morris, D. J., 1991. Medicinal uses of licorice through the millennia: the good and plenty of it. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 78(1-2), pp.1-6

de Breij, A. *et al.*, 2016. The licorice pentacyclic triterpenoid component 18 $\beta$ -glycyrrhetic acid enhances the activity of antibiotics against strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(4), pp.555-562

de Olivera, J. R. *et al.*, 2017. *Thymus vulgaris* L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. *Archives of oral biology*, 82, pp.271-279

de Villiers, B. J. *et al.*, 2010. Antimicrobial and antimalarial activity of *Cussonia species* (Araliaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 129, pp.189-196

Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V., 2012. Lokalthherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken periphere arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz. S3-Leitlinie 091-001, unter:  
[https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/091001I\\_S3\\_Lokalthherapie\\_chronischer\\_Wunden\\_2012-ungueltig.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/091001I_S3_Lokalthherapie_chronischer_Wunden_2012-ungueltig.pdf) (Abgerufen am 29.09.2018)

Diaz, C. *et al.*, 2012 First Study on Antimicrobial Activity and Synergy Between Isothiocyanates and Antibiotics Against Selected Gram-negative and Gram-positive Pathogenic Bacteria from Clinical and Animal Source. *Medicinal chemistry*, 8(3), pp.474-480

Dingermann, T. & Schneider, G., 2004. Schneider, *Arzneidrogen*. 5. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, München

Draker, K. A. *et al.*, 2003. Kinetic mechanism of the GCN5-related chromosomal aminoglycoside acetyltransferase AAC(6')-II from *Enterococcus faecium*: evidence of dimer subunit cooperativity  
Characterization of the Chromosomal Aminoglycoside 6'-N-Acetyltransferase from *Enterococcus faecium*. *Biochemistry*, 42(21), pp.6565-6574

Dursun, N. *et al.*, 2003. Role of Thymus Oil in Burn Wound Healing. *The Journal of burn care & rehabilitation*, 24(6), pp.395-399

Dykes, G. A. *et al.*, 2003. An antioxidant bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi*) extract modulates surface hydrophobicity of a wide range of food-related bacteria: implications for functional food safety. *Food Control*, 14(7), pp.515-518

Eerundbayaer *et al.*, 2014. Structures of Two New Flavonoids and Effects of Licorice Phenolics on Vancomycin-Resistant *Enterococcus* Species. *Molecules*, 19(4), pp.3883-3897

European Medicines Agency, 2008. Assessment Report on *Solidago virgaurea* L., Herba. EMA, London

European Medicines Agency, 2009. Assessment Report on *Aesculus hippocastanum* L., Semen. EMA, London

European Medicines Agency, 2011. Assessment report on *Achillea millefolium* L., flos. EMA, London

European Medicines Agency, 2012. Assessment report on *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., folium. EMA, London

European Medicines Agency, 2013. Assessment report on *Glycyrrhiza glabra* L. and/or *Glycyrrhiza inflata* Bat. and/or *Glycyrrhiza uralensis* Fisch., radix. EMA, London

European Medicines Agency, 2014. Assessment report on *Cetraria islandica* (L.) Acharius s.l., thallus. EMA, London

Emboden, W. A., 1985. The ethnopharmacology of *Centella asiatica* (L.) Urban (Apiaceae). *Journal of Ethnobiology*, 5(2), pp.101-107

Essawi, T. & Srour, M., 2000. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *Journal of ethnopharmacology*, 70(3), pp.343-349

European Centre for Disease Prevention and Control, 2016. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2016. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2016. ECDC, Stockholm

European Centre for Disease Prevention and Control, 2017a. Surgical site infections. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. ECDC, Stockholm

European Centre for Disease Prevention and Control, 2017b. Healthcare-associated infections acquired in intensive care units. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2015. ECDC, Stockholm.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2018. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 8.0, 2018. <http://www.eucast.org> [Abgerufen am 25.04.2018]

Favel, A. *et al.*, 1994. In vitro antifungal activity of triterpenoid saponins. *Planta Medica*, 60(1), pp.50-53

Fiore, C. *et al.*, 2005. A history of the therapeutic use of liquorice in Europe. *Journal of Ethnopharmacology*, 99(3), pp.317-324

Fisher, K. & Phillips, C., 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology*, 155, pp.1749–1757

Flemming, 1945: *Nobel Lectures, Physiology or Medicine 1942-1962*, Elsevier Publishing Company, Amsterdam, 1964 oder  
[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/medicine/laureates/1945/flemming-lecture.pdf](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1945/flemming-lecture.pdf)

Fuchs, G., 2007. Allgemeine Mikrobiologie. 8. Aufl., Thieme, Stuttgart

Fujita, M. *et al.*, 2005. Remarkable synergies between baicalein and tetracycline, and baicalein and beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiology and Immunology*, 49(4), pp.391-396

Gellatly, S. & Hancock, R. E., 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defences. *Pathogens and disease*, 67(3), pp.59-73

Generalic, I. *et al.*, 2012. Seasonal Variations of Phenolic Compounds and Biological Properties in Sage (*Salvia officinalis* L.). *Chemistry & biodiversity*, 9(2), pp.441-457

Giacometti, A. *et al.*, 2005. In vitro activity and killing effect of temporin A on nosocomial isolates of *Enterococcus faecalis* and interactions with clinically used antibiotics, 55(2), pp.272-274

- Gibbons, S., 2008. Phytochemicals for Bacterial Resistance – Strengths, Weaknesses and Opportunities. *Planta med*, 74(6), pp.594-602
- Nascimento, G. G. F. *et al.*, 2000. Antibacterial Activity of Plant Extraks and Phytochemicals on Antibiotic-resistant Bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, 31(4), pp.247-256
- Goncalves, O. *et al.*, 2011. Evaluation of the mutagenicity of sesquiterpenic compounds and their influence on the susceptibility towards antibiotics of two clinically relevant bacterial strains. *Mutation Research*, 723(1), pp.18-25
- Gossan, D. P. *et al.*, 2016 Antibacterial and cytotoxic triterpenoids from the roots of *Combretum racemosum*. *Fitoterapia*, 110, pp.89-95
- Gülcin, I. *et al.*, 2002. Determination of antioxidant activity of lichen *Cetraria islandica* (L) Ach. *Journal of ethnopharmacology*, 79(3), pp.325-329
- Güldas, H. E. *et al.*, 2016. Evaluation of antimicrobial efficacy of cetrimide and *Glycyrrhiza glabra* L. extract against *Enterococcus faecalis* biofilm grown on dentin discs in comparison with NaOCl. *Dental materials journal*, 35(5), pp.721-727
- Gupta, V. K. *et al.*, 2012. Membrane-damaging potential of natural L-(–)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 31(12), pp.3375-3383
- Gutiérrez-Fernández, J. *et al.*, 2013. Antimicrobial activity of binary combinations of natural and synthetic phenolic antioxidants against *Enterococcus faecalis*. *Journal of dairy science*, 96(8), pp.4912-4920
- Hacioglu, M. *et al.*, 2017. Antimicrobial activities of widely consumed herbal teas, alone or in combination with antibiotics: an *in vitro* study. *PeerJ*, 5, e3467
- Hamoud, R. *et al.*, 2014. Synergistic antimicrobial activity of combinations of sanguinarine and EDTA with vancomycin against multidrug resistant bacteria. *Drug metabolism letters*, 8(2), pp.119-128
- Hänsel, R. & Sticher, O.; 2007. *Pharmakognosie – Phytopharmazie*. Springer Medizin Verlag, Heidelberg

- Hassan, S. M. *et al.*, 2010 Hemolytic and antimicrobial activities differ among saponin-rich extracts from guar, quillaja, yucca, and soybean. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(4), pp.1008-1017
- Hemaiswarya, S. *et al.*, 2010. Synergistic interaction of phenylpropanoids with antibiotics against bacteria. *Journal of Medical Microbiology*, 59(12), pp.1469-1476
- Henrichfreise, B. *et al.*, 2007. Resistance mechanisms of multiresistant pseudomonas aeruginosa strains from germany and correlation with hypermutation. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(11), pp.4062-4070
- Hoellman, D. B. *et al.*, 1998. Activities and Time-Kill Studies of Selected Penicillins,  $\beta$ -Lactamase Inhibitor Combinations, and Glycopeptides against *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(4), pp.857-861
- Höger, P. H., 1998. Topische Antibiotika und Antiseptika. *Der Hautarzt*, 49(4), pp.331-331
- Holopainen M. *et al.*, 1988. Antimicrobial Activity of some Finnish Ericaceous Plants. *Acta Pharmaceutica*, 97, pp.179-202
- Horiuchi, K. *et al.*, 2007. Antimicrobial Activity of Oleanolic Acid from *Salvia officinalis* and Related Compounds on Vancomycin-Resistant Enterococci (VRE). *Biological & pharmaceutical bulletin*, 30(6), pp.1147-1149
- Hwang, J. H. *et al.*, 2013. Synergistic Antibacterial and Antibiofilm Effect Between (+)-Medioresinol and Antibiotics In Vitro. *Applied biochemistry and biotechnology*, 170(8), pp.1934-1941
- Hyldgaard, M. *et al.*, 2012 Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in microbiology*, 3, pp.12
- Irani, M. *et al.*, 2010. Leaves Antimicrobial Activity of *Glycyrrhiza glabra* L.. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 9(4), pp.425-428

International Organization for Standardization, 2006. Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems -- Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance of antimicrobial susceptibility test devices -- Part 1: Reference method for testing the in vitro activity of antimicrobial agents against rapidly growing aerobic bacteria involved in infectious diseases (ISO 20776-1:2006). ISO, Geneva

Iwu, M. M. & Anyanwu, B. N., 1982. Phytotherapeutic profile of Nigerian herbs. I: Antiinflammatory and anti-arthritic agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 6(3), pp.263-274

Jamil, S. *et al.*, 2007. *Centella asiatica* (Linn.) Urban - A Review. *Natural Product Radiance*, pp.158-170

Jensen, S. O. & Lyon, B. R., 2009. Genetics of Antimicrobial Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Future Microbiology*, 4(5), pp.565-582

Juan, C. *et al.*, 2013. Challenges for accurate susceptibility testing, detection and interpretation of  $\beta$ -lactam resistance phenotypes in *Pseudomonas aeruginosa*: results from a Spanish multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48(3), pp.619-630

Kimura, Y. *et al.*, 2008. Facilitating action of asiaticoside at low doses on burn wound repair and its mechanism. *European Journal of Pharmacology*, 584, pp. 415-423

Kirchner, N. *et al.*, 2014. Mangelware Antibiotika: wie es zu der Entwicklungslücke kommen konnte. *Deutsche Apotheker Zeitung*, 5, pp.48–53

Klare, I. *et al.*, 2012. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE). Aktuelle Daten und Trends zur Resistenzentwicklung. *Bundesgesundheitsblatt – Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, 55 (11), pp.1387-1400

Knape, C., 2003. Prävalenz der Kolonisation von Vancomycin-resistenten Enterokokken in verschiedenen Berliner Patientenpopulationen im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv und Validität unterschiedlicher Screening-Methoden. Hochschulschrift. UB FU, Berlin

Kubínová, R. *et al.*, 2014. Antimicrobial and enzyme inhibitory activities of the constituents of *Plectranthus madagascariensis* (Pers.) Benth. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*, 29(5), pp.749-52

Kurek, A. *et al.*, 2012. Modulation of antibiotic resistance in bacterial pathogens by oleanolic acid and ursolic acid. *Phytomedicine*, 19(6), pp.515-519

Lambert, R. J. *et al.*, 2004. The synergistic effect of EDTA/antimicrobial combinations on *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of applied microbiology*, 96(2), pp.44-53

Lauterwein, M. *et al.*, 1995. In Vitro Activities of the Lichen Secondary Metabolites Vulpinic Acid, (1)-Usnic Acid, and (2)-Usnic Acid against Aerobic and Anaerobic Microorganisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 39(11), pp.2541-2543

Leclercq, R. *et al.*, 1988. Plasmid-Mediated Resistance to Vancomycin and Teicoplanin in *Enterococcus faecium*. *The New England journal of medicine*, 319(3), pp.157-161

Lee, J. *et al.*, 2012. Asiaticoside enhances normal human skin cell migration, attachment and growth in vivo wound healing model. *Phytomedicine*, 19, pp.1223-1227

Ley, R. E. *et al.*, 2006. Microbial ecology - human gut microbes associated with obesity. *Nature*, 444(7122), pp.1022–1023

Lister, P. D. *et al.*, 2009 Antibacterial-Resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical Impact and Complex Regulation of Chromosomally Encoded Resistance Mechanisms. *Clinical microbiology reviews*, 22(4), pp.582-610

Malhotra, S. *et al.*, 2008. Lichens- Role in Traditional Medicine and Drug Discovery. *The Internet Journal of Alternative Medicine*, 5(2)

Mandal, S. *et al.*, 2013. Analysis of phytochemical profile of *Terminalia arjuna* bark extract with antioxidative and antimicrobial properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 3(12), pp.960-966

Mbosso, E. J. *et al.*, 2012. Ceramide, cerebroside and triterpenoid saponin from the bark of aerial roots of *Ficus elastica* (Moraceae). *Phytochemistry*, 83, pp.95-103

Melo, A. D. *et al.*, 2015. Antimicrobial effect against different bacterial strains and bacterial adaptation to essential oils used as feed additives. *Canadian journal of veterinary research*, 79(4),285-289

Miller, R. W. *et al.*, 2014.: Mechanisms of antibiotic resistance in enterococci. *Expert review of anti-infective therapy*, 12(10), pp.1221–1236

Mukherjee, S. *et al.*, 2011. Distinct synergistic action of piperacillin and methylglyoxal against *Pseudomonas aeruginosa*. *Indian journal of experimental biology*, 49(7), pp.547-551

Murray, B. E., 1990 The Life and Times of the Enterococcus. *Clinical Microbiology Reviews*, 3(1), pp.46-65

Navarro, V. *et al.*, 1996. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. *Journal of ethnopharmacology*, 53(3), pp.143-147

Navon-Venezia, S. *et al.*, 2017. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, 41(3), pp.252-275

Nelson, R. R., 1997. In-vitro activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 40(2), pp.305-306

Nishanth, K. S. *et al.* 2014. Protocetraric acid: an excellent broad spectrum compound from the lichen *Usnea albopunctata* against medically important microbes. *Natural product research*, 29(6), pp.574-577

Nzowa, L. K. *et al.*, 2010. Rheedinosides A and B, two antiproliferative and antioxidant triterpene saponins from *Entada rheedii*. *Phytochemistry*, 71, pp.254-261

Odds, F. C., 2003. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(1), pp. 1

Ogunwande, I. A. *et al.*, 2001. Phytochemical and antimicrobial studies on *Butyrospermum paradoxum*. *Fitoterapia*, 72, pp.54-56

Ouattara, S. *et al.*, 2013. Antifungal activities of *Terminalia ivorensis* A. Chev. bark extracts against *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, 2(1), pp.49-52

Özçelik, B. *et al.*, 2017 Cytotoxicity, antiviral and antimicrobial activities of alkaloids, flavonoids, and phenolic acids. *Pharmaceutical biology*, 49(4), pp.396-402

Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie e.V., 2018. S2k Leitlinie: Kalkulierte parenterale Initialtherapie bakterieller Erkrankungen bei Erwachsenen – Update 2018, unter: [https://www.awmf.org/uploads/tx\\_szleitlinien/S82-006l\\_S2k\\_Parenterale\\_Antibiotika\\_2018-1.pdf](https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/S82-006l_S2k_Parenterale_Antibiotika_2018-1.pdf) [Abgerufen am 29.09.2018]

Périchon, B. & Courvalin, P., 2009 VanA-Type Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 53(11), pp.4580-4587

Pierozan, M. K. *et al.*, 2009. Chemical characterization and antimicrobial activity of essential oils of *salvia* L. species. *Food Science and Technology*, 29(4)

Pillai, S. K. & Moellering, R. C., 2005. Antimicrobial combinations. in: *Antibiotics in laboratory medicine*. Lippincott Williams & Wilkins, New York

Piowarski, J. P. *et al.*, 2014. Role of human gut microbiota metabolism in the anti-inflammatory effect of traditionally used ellagitannin-rich plant materials. *Journal of ethnopharmacology*, 155(1), pp.801-809

Piowarski, J. P. *et al.*, 2015. *Lythrum salicaria* L.- underestimated medicinal plant from European traditional medicine. A review. *Journal of ethnopharmacology*, 170, pp.226-250

Ponou, B. K. *et al.*, 2010. Dimeric antioxidant and cytotoxic triterpenoid saponins from *Terminalia ivorensis* A. Chev.. *Phytochemistry*, 71(17-18), pp.2108-2115

Ponou, B. K. *et al.*, 2011. Novel 3-oxo- and 3,24-dinor-2,4-secooleanane-type triterpenes from *Terminalia ivorensis* A. Chev.. *Chemistry & Biodiversity*, 8(7), pp.1301-1309

Quideau, S., 2009. Chemistry and Biology of Ellagitannins: An Underestimated Class of Bioactive Plant Polyphenols. World Scientific, Singapore

Rahimi, H. R. *et al.*, 2012. A Comprehensive Review of *Punicagranatum* (Pomegranate) Properties in Toxicological, Pharmacological, Cellular and Molecular Biology Researches. *Iranian journal of pharmaceutical research*, 11(2), pp.385-400

Rather, M. A., *et al.*, 2013. Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: Is the "one drug to fit all" model breaking down? *Phytomedicine*, 21(1), pp.1-14

Rätsch, C. & Müller-Ebeling, C., 2003. Lexikon der Liebesmittel. AT Verlag, Aarau

Regmi, S. *et al.*, 2017. Antimicrobial peptide isolated from *Bacillus amyloliquefaciens* K14 revitalizes its use in combinatorial drug therapy. *Folia microbiologica*, 2(2), pp.127-138

Riera, E. *et al.*, 2011 *Pseudomonas aeruginosa* carbapenem resistance mechanisms in Spain: impact on the activity of imipenem, meropenem and doripenem. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66(9), pp.2022-2027

Robert Koch-Institut, 2002. Epidemiologisches Bulletin Nr. 19.

[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2010/Ausgaben/44\\_10.pdf](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2010/Ausgaben/44_10.pdf) [Abgerufen am 8.03.2018]

Robert Koch-Institut, 2010. Epidemiologisches Bulletin Nr. 44.

[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2010/Ausgaben/44\\_10.pdf](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2010/Ausgaben/44_10.pdf) [Abgerufen am 8.03.2018]

Robert Koch-Institut, 2012. Hygienemaßnahmen bei Infektionen oder Besiedlung mit multiresistenten gramnegativen Stäbchen, KRINKO-Empfehlung. *Bundesgesundheitsblatt* 2012, 55, pp.1311-1354

Robert Koch-Institut, 2013. Epidemiologisches Bulletin Nr. 33.

[https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/33\\_13.pdf](https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2013/Ausgaben/33_13.pdf). [Abgerufen am 8.03.2018]

- Robert Koch-Institut, 2016. Antibiotika-Resistenz-Surveillance in Deutschland, 2008–2016  
<https://ars.rki.de> [Abgerufen am 2.04.2018]
- Robredo B., *et al.*, 2000. Vancomycin-resistant enterococci isolated from animals and food. *International Journal of Food Microbiology*, 54(3), pp.197–204
- Rodloff, A. *et al.*, 2008. Sensibel, intermediär und resistent – Wirkintensität von Antibiotika. *Deutsches Ärzteblatt*, 105(39), pp.657-62
- Roslon W., *et al.*, 2014. Chemical characteristics of european goldenrod (*Solidagovirgaurea* L. *subsp. virgaurea*) from natural sites in Central and Eastern Poland. *Hortorum Cultus*, 13(1), pp.55-65
- van Rossum, T. G. *et al.*, 1999. Intravenous glycyrrhizin for the treatment of chronic hepatitis C: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase I/II trial. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 14(11), pp.1093-1099
- Rungsimakan, S. & Rowan, M. G., 2014. Terpenoids, flavonoids and caffeic acid derivatives from *Salvia viridis* L. cvar. Blue Jeans. *Phytochemistry*, 108, pp.177-88
- Saadat, S. *et al.*, 2014. VanA and VanB Positive Vancomycin-resistant Staphylococcus aureus Among Clinical Isolates in Shiraz, South of Iran. *Oman medical journal*, 29(5), pp.335–339
- Saavedra, M. J. *et al.*, 2010. Antimicrobial activity of phenolics and glucosinolate hydrolysis products and their synergy with streptomycin against pathogenic bacteria. *Medicinal Chemistry*, 6(3), pp.174-183
- Samuelsen, A. B., 2000. The traditional uses, chemical constituents and biological activities of *Plantago major* L. A review. *Journal of ethnopharmacology*, 71(1-2), pp.1-21
- Sangster, J., 1987. Octanol-Water Partition Coefficients: Fundamentals and Physical Chemistry. Wiley, New York
- Sasakia, K. *et al.*, 2003. Improvement in the bioavailability of poorly absorbed glycyrrhizin via various nonvascular administration routes in rats. *International Journal of Pharmaceutics*, 265(1–2), pp.95–102

- Segatore, B. *et al.*, 2012. In vitro interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and E model methods. *Phytomedicine*, 19 (3-4), pp.341-347
- Shahid, M. & Malik, A., 2005. Resistance due to aminoglycoside modifying enzymes in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from burns patients. *The Indian journal of medical research*, 122(4), pp.324-329
- Shibata, S., 2000. A drug over the millennia: pharmacognosy, chemistry, and pharmacology of licorice. *Yakugaku Zasshi*, 120(10), pp.849-862
- Shimizu, M. *et al.*, 2001. Marked Potentiation of Activity of  $\beta$ -Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by Corilagin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(11), pp.3198-3201
- Shin, K. M. *et al.*, 2004. In vitro anti-inflammatory activity of 23-hydroxyursolic acid isolated from *Cussonia bancoensis* in murine macrophage RAW 264.7 cells. *Planta Medica*, 70(9), pp.803-807.
- Shukla, A. *et al.*, 1999. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 65, pp.1-11
- Sienkiewicz-bis, M. *et al.*, 2012. The Antimicrobial Activity of Thyme Essential Oil Against Multidrug Resistant Clinical Bacterial Strains. *Microbial drug resistance*, 18(2), pp.137-148
- Silva, A. *et al.*, 2016. *Ocimum basilicum*: Antibacterial activity and association study with antibiotics against bacteria of clinical importance. *Pharmaceutical Biology*, 54(5), pp.863-867
- Singh, D. V. *et al.*, 2002. Quantitative determination of Oleanane derivatives in *Terminalia arjuna* by high performance thin layer chromatography. *Phytochemical Analysis*, 13, pp.207-210
- Skurnik, D. *et al.*, 2013. Enhanced in vivo fitness of carbapenem-resistant oprD mutants of *Pseudomonas aeruginosa* revealed through high-throughput sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(51), pp.20747-20752
- Soković, M. *et al.*, 2007. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food*, 2, pp.220 – 226

Stein, C. *et al.*, 2015. Three dimensional checkerboard Synergy analysis of Colistin, Meropenem, Tigecycline against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates. *PloS one*, 10(6), e0126479

Stermitz, F. R. *et al.*, 1999. Synergy in a medicinal plant: antimicrobial action of berberine potentiated by 5'-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(4), pp.1433-1437

Sugimoto, S. *et al.*, 2011. Medicinal plants of Thailand. I structures of Rheedeiosides A—D and cis-Entadamide A  $\beta$ -D-Glucopyranoside from the seed kernels of *Entada rheedei*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(4), pp.466-471

Sumitra, M. *et al.*, 2001 Experimental myocardial necrosis in rats: Role of arjunolic acid on platelet aggregation, coagulation, and antioxidant status. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 224, pp. 135-142

Taber, H. W. *et al.*, 1987. Bacterial Uptake of Aminoglycoside Antibiotics. *Microbiological Reviews*, 51(4), pp.439-457

Takaya, M. *et al.*, 2009. 23-hydroxyursolic acid causes cell growth-inhibition by inducing caspase-dependent apoptosis in human cervical squamous carcinoma HeLa cells. *Anticancer Research*, 29(4), pp. 995-1000

Tapondjou, L. A. *et al.*, 2003a. In vivo anti-nociceptive and anti-inflammatory effect of the two triterpenes, ursolic acid and 23-hydroxyursolic acid, from *Cussonia bancoensis*. *Archives of Pharmacal Research*, 26(2), pp.143-146

Tapondjou, L. A. *et al.*, 2003b. Saponins from *Cussonia bancoensis* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Journal of Natural Products*, 66, pp.1266-1269

Tapondjou, L. A. *et al.*, 2011. Cytotoxic and antioxidant triterpene saponins from *Butyrospermum parkii* (Sapotaceae). *Carbohydrate Research*, 346(17), pp.2699-2704

Teuber, M., 2001. Veterinary use and antibiotic resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 4(5), pp.493–499

Teuscher, E. *et al.*, 2004. Biogene Arzneimittel. 6. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.

Uprety, Y. *et al.*, 2010. Indigenous use and bio-efficacy of medicinal plants in the Rasuwa District, Central Nepal. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6, Art.-Nr. 3.

Veras, H. N. H. *et al.*, 2017 Enhancement of aminoglycosides and b-lactams antibiotic activity by essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and the Thymol. *Arabian Journal of Chemistry*, 10(2), pp.2790-2795

Wagner, H. & Blatt, S., 1996. Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas. 2. Aufl., Springer, Berlin

Walsh, S. E. *et al.*, 2003 Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *Journal of applied microbiology*, 94(2), pp.240-247

Walters, M. S. *et al.*, 2015. Vancomycin-Resistant *Staphylococcus aureus* - Delaware, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, 64(37), pp.105

Wang X. *et al.*, 2013 Licorice, a unique "guide drug" of traditional Chinese medicine: a review of its role in drug interactions. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(3), pp.781-790

Wang, W. *et al.*, 2010. Ursane triterpenoids from the bark of *Terminalia arjuna*. *Fitoterapia*, 81, pp.480-484

Wendt, C. *et al.*, 1998. Vancomycin-resistente Enterokokken. Epidemiologie, Risikofaktoren und Prävention. *Deutsches Ärzteblatt*, 95(25), pp.1604-1611

Werner, G. *et al.*, 2008. Vancomycin-resistente Enterokokken. *Chemotherapie Journal*, 5, pp.183-193

Wichtl, M., 2009. Teedrogen und Phytopharmaka. 5. Aufl., Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart

Witte, W. 2008. Verbreitung multiresistenter Erreger. *Trauma und Berufskrankheit*, 10(S1), pp.125-132

Wolters, B., 1968. Saponine als pflanzliche Pilzabwehrstoffe. *Planta*, 79, pp.77-83

World Health Organization, 2014. Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. WHO Press, Geneva

World Health Organization, 2017. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. WHO Press, Geneva

Wright, G. D., 2016. Antibiotic Adjuvants: Rescuing Antibiotics from Resistance. *Trends in Microbiology*, 24(11), pp.862-871

Wu, F. *et al.*, 2012. Identification of major active ingredients responsible for burn wound healing of *Centella asiatica* herbs. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, Art. ID 848093, 13 Seiten

Wu, S. & Tian, L., 2017. Diverse Phytochemicals and Bioactivities in the Ancient Fruit and Modern Functional Food Pomegranate (*Punica granatum*). *Molecules*, 22(10), E1606

Xia, J. *et al.*, 2013. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* antibiotic resistance and virulence. *Bioscience trends*, 7(3), pp.113-121

Yarlagadda, V. *et al.*, 2015. Glycopeptide Antibiotic to Overcome the Intrinsic Resistance of Gram-negative Bacteria. *ACS infectious diseases*, 2(2), pp.132-139

Yoshida, T. *et al.*, 2010. Pivotal advance: glycyrrhizin restores the impaired production of beta-defensins in tissues surrounding the burn area and improves the resistance of burn mice to *Pseudomonas aeruginosa* wound infection. *Journal of Leucocyte Biology*, 87(1), pp.35-41

Zárate, S. G. *et al.*, 2018. Overcoming Aminoglycoside Enzymatic Resistance: Design of Novel Antibiotics and Inhibitors. *Molecules*, 23(2), pii: E284

ZHANG, S. *et al.*, 2006. Suppression of bacterial urinary infection in mice with asiaticoside. *Chinese Journal of New Drugs*, 20, pp.1746-1749

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Antibiotikaresistenzen von Enterokokken.....	18
Tab. 2: FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) und wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147.....	51
Tab. 3: FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) und wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147.....	52
Tab. 4: FICI der Wechselwirkung zwischen Gentamicin und Glycyrrhizinsäure bei Enterokokken .....	69
Tab. 5: FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) und wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei MRSA Nr. 25, 28, 29, 38.....	79
Tab. 6: FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) und wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei MRSA Nr. 25, 28, 29, 38.....	79
Tab. 7: FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) Extrakten und Antibiotika bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	84
Tab. 8: FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) oder wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	85
Tab. 9: FICI der Wechselwirkung zwischen methanolischen (ME) oder wässrigen (WE) Extrakten und Antibiotika bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	85
Tab. 10: FICI der Wechselwirkung zwischen Antibiotika und methanolischen Extrakten oder Einzelsubstanzen .....	94

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: WHO priority pathogens list for R&D of new antibiotics.....	3
Abb. 2: Minimale Hemmkonzentration (MHK) acht methanolischer (ME) und zwei wässriger Extrakte (WE) bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 289 im Mikrodilutionsverfahren .....	49
Abb. 3: MHK acht methanolischer (ME) und zwei wässriger Extrakte (WE) bei <i>Klebsiella pneumoniae</i> KP Nr. 245 .....	49
Abb. 4: MHK neun methanolischer (ME) und fünf wässriger Extrakte (WE) bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	50
Abb. 5: MHK acht methanolischer (ME) und zwei wässriger Extrakte (WE) bei <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA Nr. 29 .....	50
Abb. 6: Einfluss von <i>Solidago virgaurea</i> auf die MHK von Ampicillin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	53
Abb. 7: Rosmarinsäure .....	54
Abb. 8: Chlorogensäure.....	54
Abb. 9: Kaffeesäure .....	54
Abb. 10: Einfluss von Chlorogensäure auf die MHK von Ampicillin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147.. .....	55
Abb. 11: Einfluss von Kaffeesäure auf die MHK von Ampicillin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 ...	55
Abb. 12: Rutin.....	56
Abb. 13: Einfluss von <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> auf die MHK von Ampicillin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	56
Abb. 14: Corilagin .....	58
Abb. 15: Ursolsäure .....	58
Abb. 16: Einfluss von Ursolsäure auf die MHK von Ampicillin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	59
Abb. 17: Einfluss von <i>Lythrum salicaria</i> auf die MHK von Ampicillin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	60

Abb. 18: Urolithin A .....	61
Abb. 19: Einfluss von Urolithin A auf die MHK von Ampicillin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	61
Abb. 20: Einfluss von <i>Salvia officinalis</i> auf die MHK von Vancomycin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	64
Abb. 21: Einfluss von <i>Lythrum salicaria</i> auf die MHK von Vancomycin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	64
Abb. 22: Einfluss von <i>Glycyrrhiza glabra</i> auf die MHK von Gentamicin bei <i>Enterococcus faecium</i> VRE Nr. 24 .....	66
Abb. 23: Glycyrrhizinsäure .....	68
Abb. 24: Einfluss von Glycyrrhizinsäure auf die MHK von Gentamicin bei Vancomycin-resistenten <i>Enterococcus faecium</i> .....	70
Abb. 24: Einfluss von Glycyrrhizinsäure auf die MHK von Gentamicin bei 11 Isolaten von Gentamicin-hochresistenten <i>Enterococcus faecium</i> .....	70
Abb. 26: Einfluss von Glycyrrhizinsäure auf die MHK von Gentamicin bei verschiedenen Enterokokkenarten .....	71
Abb. 27: Uralsaponin N .....	71
Abb. 28: Licoricesaponin B2 .....	72
Abb. 29: Licoricesaponin A3 .....	72
Abb. 30: $\beta$ -Aescin .....	73
Abb. 31: $\alpha$ -Hederin .....	74
Abb. 32: Hederacosid C .....	74
Abb. 33: Primulasaponin 1 .....	74
Abb. 34: Parkioside B .....	75
Abb. 35: Zemoside A .....	75
Abb. 36: Rheediinoside A und B .....	75
Abb. 37: Arjunglucosid I .....	76
Abb. 38: Sericoside .....	76

Abb. 39: Ivorenoside C .....	76
Abb. 40: Asiaticosid .....	76
Abb. 41: Einfluss von <i>Cetraria islandica</i> auf die MHK von Gentamicin bei <i>Enterococcus faecium</i> BM 4147 .....	78
Abb. 42: Einfluss von <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> auf die MHK von Ampicillin bei MRSA Nr. 28.....	80
Abb. 43: Einfluss von <i>Cetraria islandica</i> auf die MHK von Gentamicin bei MRSA Nr. 29.....	82
Abb. 44: Einfluss von <i>Salvia officinalis</i> auf die MHK von Imipenem bei MRSA Nr. 25 .....	83
Abb. 45: Einfluss von <i>Cetraria islandica</i> auf die MHK von Piperacillin bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 288, 309 .....	87
Abb. 46: Thymol .....	89
Abb. 47: Einfluss von Thymol auf die MHK von Gentamicin bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 289.... .....	89
Abb. 48: Einfluss von <i>Lythrum salicaria</i> auf die MHK von Vancomycin bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 289 .....	90
Abb. 49: Einfluss von <i>Cetrarie islandica</i> auf die MHK von Vancomycin bei <i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA Nr. 289.....	90

## 10 Zusammenfassung

Die Resistenz von kommensalen Bakterien gegenüber Standard- und Reserveantibiotika hat in vielen Teilen der Welt ein beängstigendes Ausmaß erreicht und stellt zunehmend eine Gefahr für den Erfolg antibiotischer Behandlungen dar. Insbesondere Infektionen mit den Bakterienarten *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* (VRE) und *Staphylococcus aureus* (MRSA), welche zu den Erregern von Wundinfektionen zählen und eine Vielzahl von Antibiotikaresistenzen aufweisen können, führen im klinischen Umfeld zunehmend zu Problemen. In Anbetracht des Mangels an verfügbaren neuen Antibiotika, eröffnet die Entwicklung von Resistenz-modifizierenden Substanzen eine Perspektive um die Verbreitung von Antibiotikaresistenzen einzudämmen und die Verwendung zugelassener Antibiotika, gegen die Resistenzen auftreten, weiterhin zu ermöglichen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von pflanzlichen Extrakten und Einzelsubstanzen auf die Resistenz von klinischen Isolaten der oben erwähnten Bakterienarten gegenüber den Antibiotika Ampicillin, Piperacillin, Imipenem, Gentamicin, Vancomycin und Aztreonam untersucht. Die methanolischen und wässrigen Extrakte sowie die Einzelsubstanzen stammen unter anderem von *Achillea millefolium*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Cetraria islandica*, *Glycyrrhiza glabra*, *Lythrum salicaria*, *Plantago lanceolata*, *Salvia officinalis*, *Solidago virgaurea* und *Thymus vulgaris*. Für alle diese Pflanzen ist eine historische Verwendung zur Wundbehandlung belegt. Um mögliche synergistische Wechselwirkungen zwischen den Antibiotika und den Naturstoffen zu identifizieren wurden die Kombinationen mit der checkerboard-Methode analysiert. Von den 160 Kombinationen von Antibiotika und Extrakten aus acht verschiedenen Pflanzen, zeigten 30 Kombinationen Werte für den fraktionierten inhibitorischen Konzentrationsindex (FICI) von  $\leq 0,5$ , was ein Nachweis für eine synergistische Wechselwirkung ist. Die meisten Synergien traten bei den gram-positiven Erregern VRE und MRSA auf, hauptsächlich in Kombination mit Ampicillin und Gentamicin. Bei *Klebsiella pneumoniae* erwies sich keine Kombination als synergistisch und bei *Pseudomonas aeruginosa* traten Synergien nur mit Ampicillin, Piperacillin und Vancomycin auf. Die stärksten synergistischen Wechselwirkungen zeigten sich an den Enterokokken mit den Kombinationen von Urolithin A mit Ampicillin (FICI:  $\leq 0,0002$ ), Glycyrrhizinsäure mit Gentamicin (FICI: 0,018) sowie dem methanolischen Extrakt von *Cetraria islandica* mit Gentamicin (FICI: 0,05). Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten auf ein therapeutisches Potential von Naturstoffen als Kombinationspartner von Antibiotika bei der Behandlung von Wundinfektionen mit multiresistenten Bakterien hin.

## Abstract

The resistance of commensal bacteria to first- and second-line antibiotics has reached an alarming level in many parts of the world and endangers the effective treatment of infectious diseases. Particularly *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecium* (VRE) and *Staphylococcus aureus* (MRSA), which may exhibit a broad resistance to various antibiotics and be involved in wound infections, represent an increasing clinical problem in the treatment of infectious diseases and hinder adequate antibiotic stewardship. Considering the lack of novel antibiotic compounds, the development of resistance-modifying agents, however, can mitigate the spread of bacterial drug resistance and might possibly extend the useful application indices of an existing licensed antibiotic. In this thesis, the influence of herbal extracts and pure substances on the susceptibility of clinical isolates of the bacteria mentioned above against the antibiotics ampicillin, piperacillin, imipenem, gentamicin, vancomycin and aztreonam was investigated. Furthermore, the antibacterial properties of the natural substances under study were determined in vitro. The plants from which the methanolic and aqueous extracts and pure substances originated were among others *Achillea millefolium*, *Arctostaphylos uva-ursi*, *Cetraria islandica*, *Glycyrrhiza glabra*, *Lythrum salicaria*, *Plantago lanceolata*, *Salvia officinalis*, *Solidago virgaurea* and *Thymus vulgaris*. For all these plants the historical use in wound infections has been proven. The combined effects of antibiotics and natural substances were determined with the checkerboard method to estimate a possible synergy. Out of 160 investigated combinations with eight plant extracts, 30 showed a synergistic interaction, with FICI values of  $\leq 0.5$ , which indicates synergy. Most synergistic interactions occurred with the gram-positive pathogens VRE and MRSA, mostly with ampicillin and gentamicin. *Klebsiella pneumoniae* showed no synergy with any combination and *Pseudomonas aeruginosa* only with ampicillin, piperacillin and vancomycin. The strongest synergistic interactions were observed in enterococci with the combination of urolithin A with ampicillin (FICI:  $\leq 0.0002$ ), of glycyrrhizic acid with gentamicin (FICI: 0.018) and of the methanolic extract of *Cetraria islandica* with gentamicin (FICI: 0.05). In conclusion, this thesis points towards a therapeutic potential of natural substances in co-application with antibiotics for defined local bacterial infections caused by antibiotic resistant bacteria.

## 11 Verzeichnis der Publikationen

Schmidt, S. *et al.*, 2016. Glycyrrhizic Acid Decreases Gentamicin-Resistance in Vancomycin-Resistant Enterococci. *Planta Medica*, 82(18), pp.1540-1545

## 12 Anhang

### 12.1 Tabellen

Anhang Tab. 1: Antibakterielle Aktivitäten einzelner Substanzen (angegeben ist der Mittelwert der MHK in µg/mL).

	Enterokokken	MRSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Kaffeensäure	8192 µM	300 µg/mL	>450 µg/mL	8192 µM
Chlorogensäure	8192 µM			
Rosmarinsäure	>1 mg/mL			
Ursolsäure	≥128 µM	128 µM	≥512 µM	
Urolithin A	≥512 µM	≥256 µM	≥256 µM	≥256 µM
Thymol	300 µg/mL	8192 µM	≥32768 µM	
Glycyrrhizinsäure	4,8 - 9,5 mM	8192 µM	>5 mg/mL	>2 mg/mL
β-Aescin	≥32768 µM	>1 mg/mL		>1 mg/mL
α-Hederin	128 µM	>350µg/mL	>350 µg/mL	>200 µg/mL

Anhang Tab. 2: MHK der Antibiotika bei Enterokokken (angegeben ist der Mittelwert der MHK in µg/mL).

Isolat	Ampicillin	Vancomycin	Gentamicin	Imipenem	Aztreonam
<i>Enterococcus faecium</i>					
BM 4147	8 I	256 R	16	≤2 S	4096
VRE Nr. 5		512 R	131072	1024 R	
VRE Nr. 6			8	256 R	
VRE Nr. 7		512 R	8	512 R	
VRE Nr. 8			8		
VRE Nr. 9			131072		
VRE Nr. 10			8		
VRE Nr. 11		256 R	32		
VRE Nr. 12			16		
VRE Nr. 13			16		
VRE Nr. 14			8		
VRE Nr. 16			8		
VRE Nr. 17			32		
VRE Nr. 18		256 R	16		
VRE Nr. 19		64 R	16		
VRE Nr. 20			8		
VRE Nr. 21			16		
VRE Nr. 22		512 R	16		
VRE Nr. 23			16		
VRE Nr. 24			32		
VRE Nr. 25			131072		
VRE Nr. 26			16		
VRE Nr. 27			32		
VRE Nr. 28			16		
VRE Nr. 29			8		
VRE Nr. 30			32		
VRE Nr. 31			16		
VRE Nr. 32			32		
VRE Nr. 33			8		
VRE Nr. 34		64 R	16		
VRE Nr. 35			32		
VRE Nr. 36			131072		
VRE Nr. 37			131072		
VRE Nr. 38			131072		
VRE Nr. 39			131072		
VRE Nr. 40			32		
VRE Nr. 41			32		
VRE Nr. 42			16		
VRE Nr. 43			32		
VRE Nr. 44			32		
VRE Nr. 45			32		
VRE Nr. 46			8		

VRE Nr. 47		4
VRE Nr. 48		131072
VRE Nr. 49		32
VRE Nr. 50		16
VRE Nr. 51		131072
VRE Nr. 52		8
VRE Nr. 53		131072
VRE Nr. 54		131072
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	2 S	16
<i>Enterococcus gallinarum</i>	8 R	2
<i>Enterococcus casseliflavus</i>	≤0,5 S	1

**Anhang Tab. 3:** MHK der Antibiotika bei MRSA (angegeben ist der Mittelwert der MHK in µg/mL).

Isolat	Ampicillin	Gentamicin	Imipenem	Aztreonam
<b>MRSA</b>				
MRSA Nr. 26		≤0,5	8	
MRSA Nr. 27		≤0,5	2	
MRSA Nr. 28	16	≤0,5		
MRSA Nr. 29		1024	≤0,25	
MRSA Nr. 38		≤0,5		2048
MRSA Nr. 46		≤0,5	32	

**Anhang Tab. 4:** MHK der Antibiotika bei *Pseudomonas aeruginosa* (angegeben ist der Mittelwert der MHK in µg/mL).

Isolat	Gentamicin	Ampicillin	Piperacillin	Imipenem	Aztreonam	Vancomycin
PA Nr. 241	8			128 - 256		≥8192
PA Nr. 242	16384		128	16 - 32	1024	≥8192
PA Nr. 264	2 - 4		16	4	32 - 64	
PA Nr. 288	8192		64	32 - 64	2048	≥8192
PA Nr. 289	16384	32768	32	32	2048	131072
PA Nr. 309	8		16	32	64 - 128	
PA Nr. 311	8 - 16		32	4 - 8		
PA Nr. 323				32		
PA Nr. 324				32		

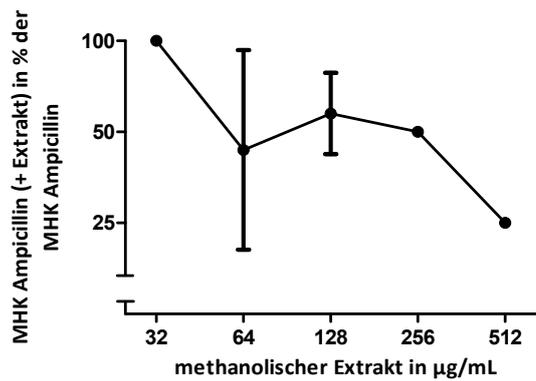
**Anhang Tab. 5:** MHK der Antibiotika bei *Klebsiella pneumoniae* (angegeben ist der Mittelwert der MHK in µg/mL).

Isolat	Ampicillin	Imipenem	Gentamicin	Aztreonam	Vancomycin
KP Nr. 243		16	0,5 - 1		1024
KP Nr. 244		16	2		1024
KP Nr. 245	32768	4 - 8	256 - 512	64 - 128	1024
KP Nr. 267			2		256
KP Nr. 317		4			
KP Nr. 318		≤4			
KP Nr. 319		≤1			
KP Nr. 320		4 - 8			
KP Nr. 321		≤ 2			

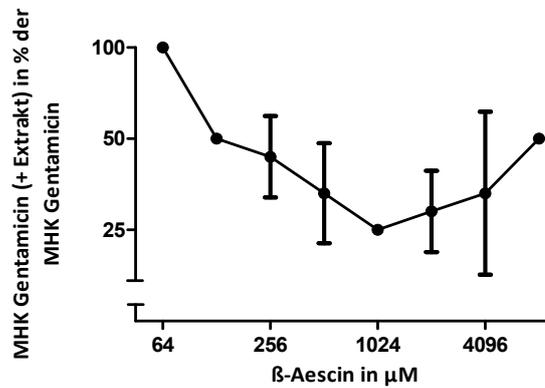
**Anhang Tab. 6:** Einfluss von β-Aescin, α-Hederin, Hederacoside C und Primulasaponin I (angegeben ist die MHK von Gentamicin in µg/mL, n: Anzahl der Isolate die dieses Ergebnis zeigten).

MHK (µg/mL)				
β-Aescin in µg/mL	High-level Resistenz (3 Isolate)	n	Low-level Resistenz (17 Isolate)	n
0	>1000		2 - >8	
1	>500 (2/2)	3	1 - 4 (14/15)	21
0.9			2 (1/1)	1
0.75			1 (1/1)	4
0.5	>500 (2/2)	3	0.5 - 2 (15/15)	16
<b>α-Hederin</b>				
0.4			1 (1/2)	2
0.2	n/c (2/2)	2	2 (2/4)	7
<b>Hederacoside C</b>				
1	n/c (1/1)	2	2 (1/3)	5
0.75			n/c (1/1)	1
0.5			n/c (1/1)	1
<b>Primulic acid 1</b>				
0.4			n/c (1/1)	2
0.2	n/c (2/2)	3	n/c (3/3)	5

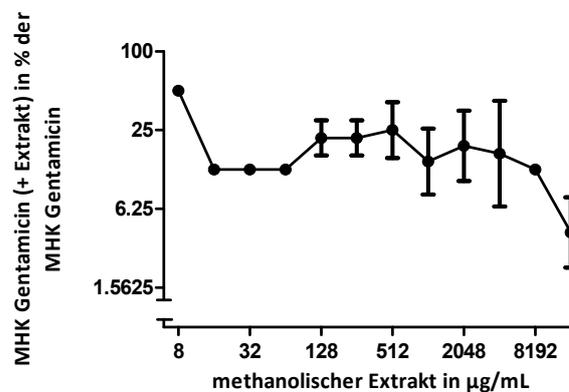
## 12.2 Abbildungen



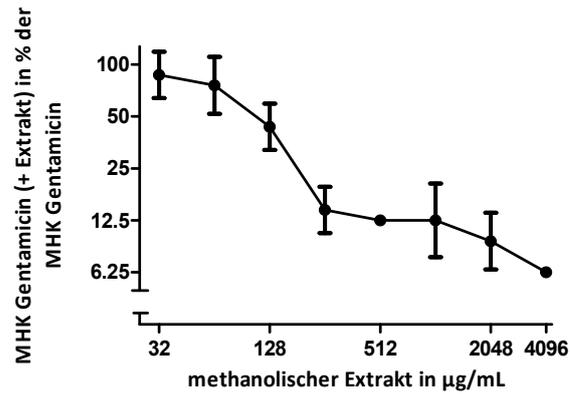
**Anhang Abb. 1:** Einfluss von *Thymus vulgaris* auf die MHK von Ampicillin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 2 µg/mL; FICI: 0,31. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



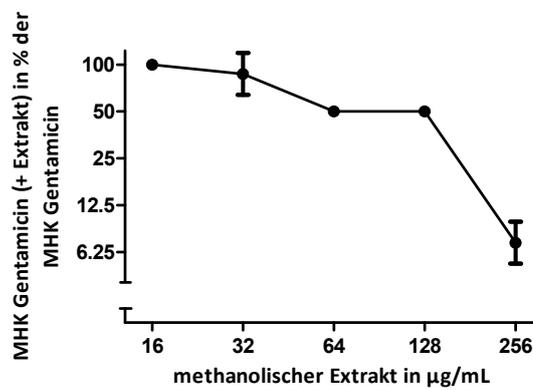
**Anhang Abb. 2:** Einfluss von  $\beta$ -Aescin auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 2 µg/mL; FICI: > 0,26. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



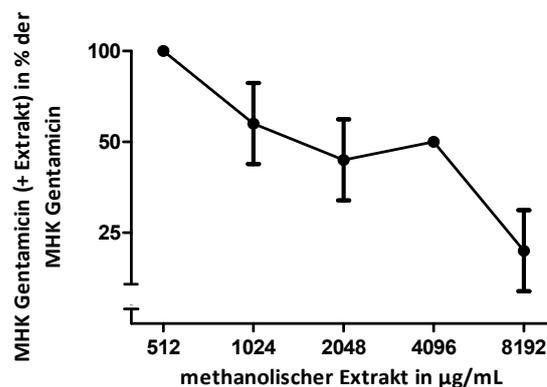
**Anhang Abb. 3:** Einfluss von *Solidago virgaurea* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 0,5 µg/mL; FICI: 0,05. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



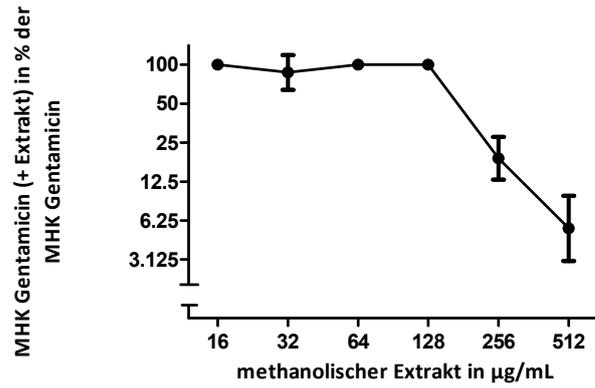
**Anhang Abb. 4:** Einfluss von *Achillea millefolium* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 0,5 µg/mL; FICI: 0,07. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



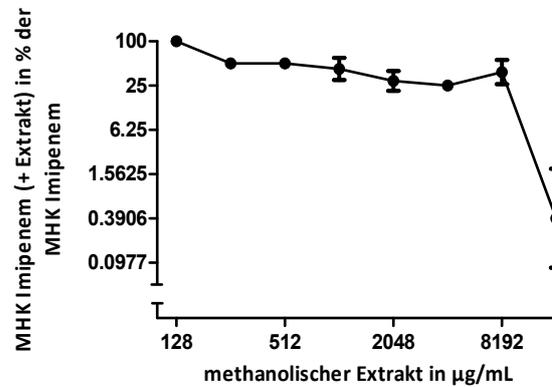
**Anhang Abb. 5:** Einfluss von *Salvia officinalis* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 0,5 µg/mL; FICI: 0,19. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



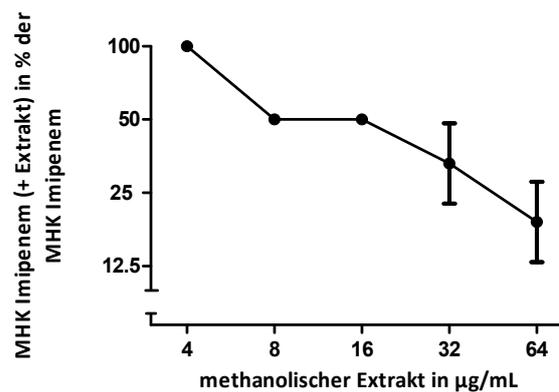
**Anhang Abb. 6:** Einfluss von *Plantago lanceolata* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 2 µg/mL; FICI: 0,30. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



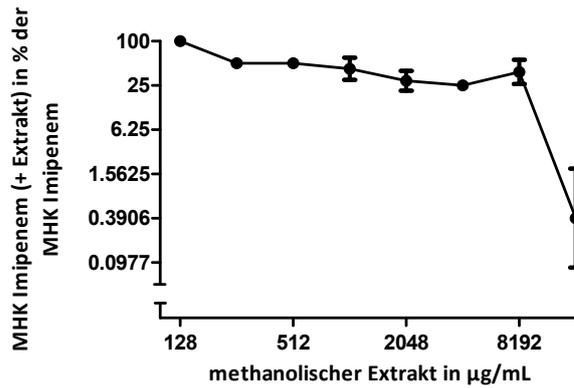
**Anhang Abb. 7:** Einfluss von *Thymus vulgaris* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* BM 4147. Maximale Reduktion der MHK von 8 auf 0,5 µg/mL; FICI: 0,31. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



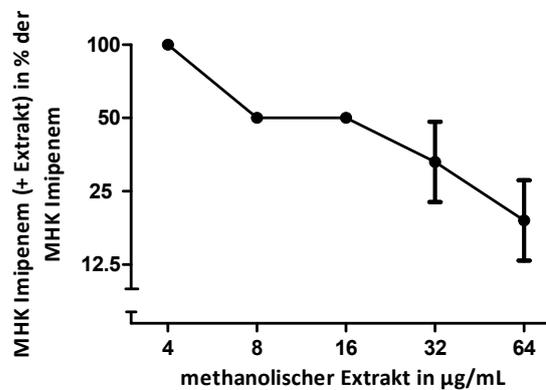
**Anhang Abb. 8:** Einfluss von *Plantago lanceolata* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* VRE Nr. 5. Maximale Reduktion der MHK von 1024 auf 4 µg/mL; FICI: 0,04. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



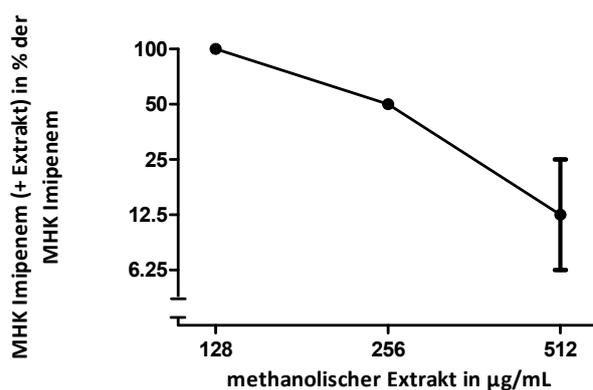
**Anhang Abb. 9:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* VRE Nr. 5. Maximale Reduktion der MHK von 1024 auf 256 µg/mL; FICI: 0,26. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



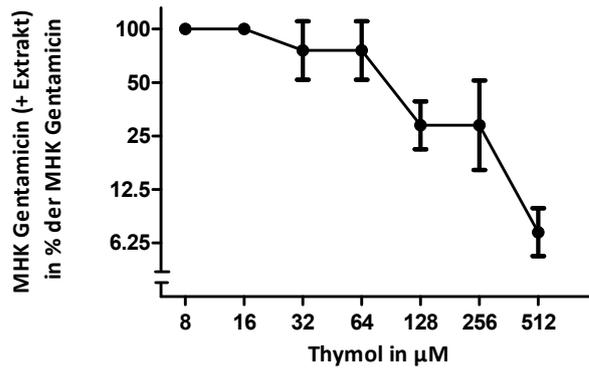
**Anhang Abb. 10:** Einfluss von *Plantago lanceolata* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* VRE Nr. 5. Maximale Reduktion der MHK von 1024 auf 4 µg/mL; FICI: 0,04. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



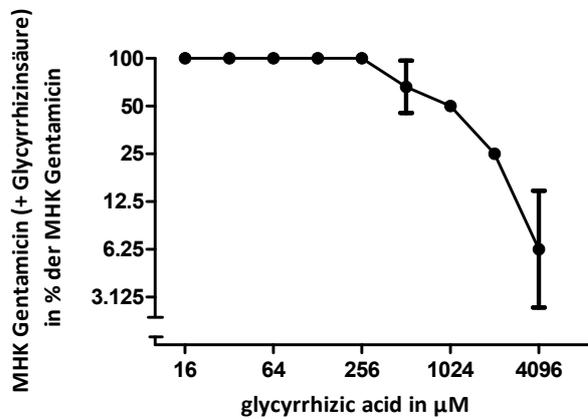
**Anhang Abb. 11:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* VRE Nr. 5. Maximale Reduktion der MHK von 1024 auf 256 µg/mL; FICI: 0,26. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



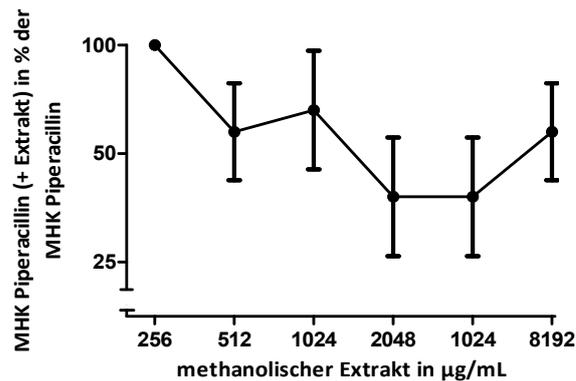
**Anhang Abb. 12:** Einfluss von *Thymus vulgaris* auf die MHK von Gentamicin bei *Enterococcus faecium* VRE Nr. 5. Maximale Reduktion der MHK von 1024 auf 128 µg/mL; FICI: 0,45. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



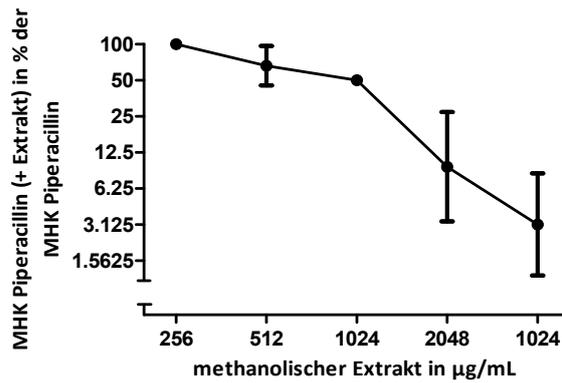
**Anhang Abb. 13:** Einfluss von Thymol auf die MHK von Gentamicin bei MRSA Nr. 29. Maximale Reduktion der MHK von 512 auf 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FICI: 0,23. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchföhrungen.



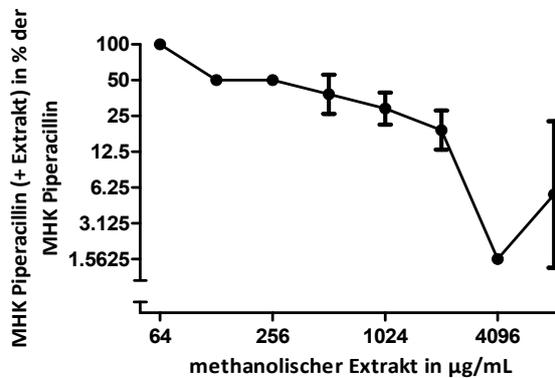
**Anhang Abb. 14:** Einfluss von Glycyrrhizinsäure auf die MHK von Gentamicin bei MRSA Nr. 29. Maximale Reduktion der MHK von 1024 auf 16  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FICI: 0,15. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchföhrungen.



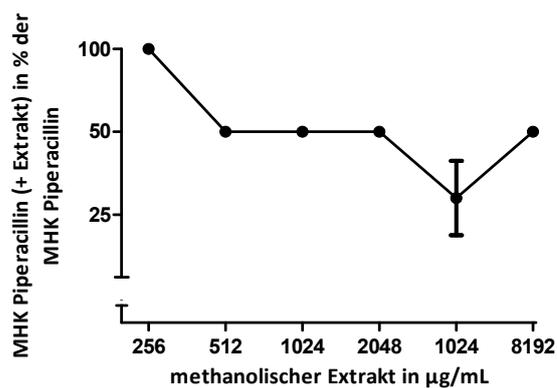
**Anhang Abb. 15:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289. Maximale Reduktion der MHK von 64 auf 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; FICI: 0,45. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchföhrungen.



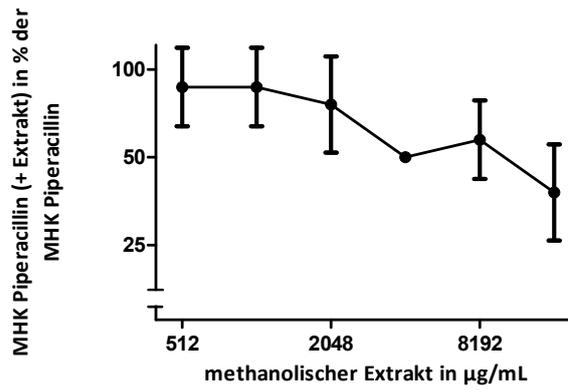
**Anhang Abb. 16:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 309. Maximale Reduktion der MHK von 16 auf 0,5 µg/mL; FICI: 0,12. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



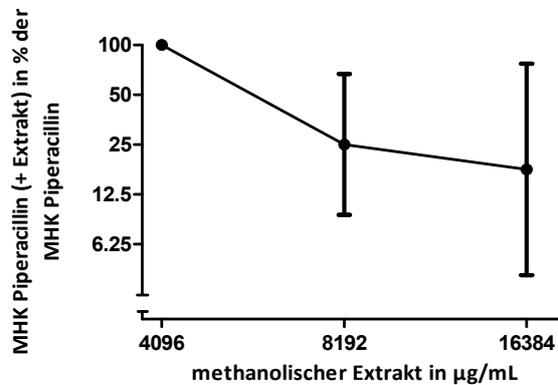
**Anhang Abb. 17:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 288. Maximale Reduktion der MHK von 64 auf 1 µg/mL; FICI: > 0,03. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



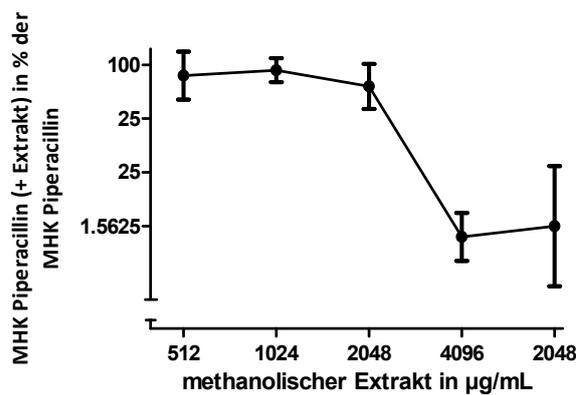
**Anhang Abb. 18:** Einfluss von *Cetraria islandica* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 242. Maximale Reduktion der MHK von 128 auf 32 µg/mL; FICI: > 0,03. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



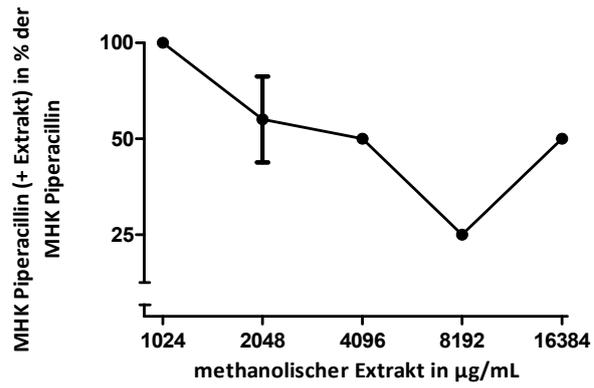
**Anhang Abb. 19:** Einfluss von *Achillea millefolium* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 289. Maximale Reduktion der MHK von 32 auf 16 µg/mL; FICI: 0,40. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



**Anhang Abb. 20:** Einfluss von *Achillea millefolium* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 242. Maximale Reduktion der MHK von 128 auf 32 µg/mL; FICI: 0,53. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



**Anhang Abb. 21:** Einfluss von *Achillea millefolium* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 309. Maximale Reduktion der MHK von 16 auf 0,125 µg/mL; FICI: 0,17. Mittelwert ± Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.



**Anhang Abb. 22:** Einfluss von *Achillea millefolium* auf die MHK von Piperacillin bei *Pseudomonas aeruginosa* PA Nr. 288. Maximale Reduktion der MHK von 64 auf 16  $\mu\text{g/mL}$ ; FICI: 0,33. Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung von fünf Versuchsdurchführungen.