

## 1. Einleitung und Zielstellung

Im „Global Report on Traditional and Complementary Medicine 2019“ der Weltgesundheitsorganisation (WHO) wird die zunehmende Relevanz traditioneller und komplementärer Medizin als Therapieoption weltweit hervorgehoben<sup>[1]</sup>. Von den 194 Mitgliedsstaaten der WHO haben 170 die Nutzung traditioneller und komplementärer Medizin anerkannt<sup>[1]</sup>. Dies zeigt die zunehmende Akzeptanz traditioneller Heilmethoden in der medizinischen Anwendung, wobei Arzneipflanzen eine bedeutende therapeutische Ressource darstellen<sup>[2]</sup>. Diese spielen nicht nur in traditionellen Heilpraktiken eine Rolle, sondern finden auch in modernen Therapieformen Anwendung<sup>[3]</sup>. Das Echte Johanniskraut, *Hypericum perforatum* L., beispielsweise gehört zu den ältesten Heilpflanzen und wurde bereits in der Antike bei Schlangenbissen, Menstruationsbeschwerden, Wunden, Verbrennungen, Ischiasbeschwerden und Depressionen eingesetzt<sup>[4]</sup>. Seit Ende des 15. Jahrhunderts wurde es auch in der traditionellen europäischen Medizin zur Behandlung psychischer Störungen, einschließlich Neuralgien, Angstzuständen, Neurosen und Depressionen verwendet<sup>[4]</sup>. Die klinische Wirksamkeit in der Therapie von Depressionen wurde in zahlreichen Studien nachgewiesen und in S3-Leitlinien berücksichtigt<sup>[5]</sup>.<sup>[6]</sup><sup>[7]</sup>. Dieses Beispiel zeigt die Entwicklung von der traditionell erfahrungsbasierten Anwendung von Arzneipflanzen hin zu einer wissenschaftlich fundierten Phytotherapie. Dieser Übergang setzt eine umfassende Qualitätssicherung sowie standardisierte Prüfverfahren voraus, die gewährleisten, dass pflanzliche Präparate den hohen Ansprüchen der modernen Medizin in Bezug auf Qualität, Sicherheit und Wirksamkeit entsprechen. Um diese Anforderungen zu erfüllen, wurde in der Richtlinie 2001/83/EG (vom 6. November 2001 zur Schaffung eines Gemeinschaftskodex für Humanarzneimittel, Anhang 1, Teil 2, C. Kontrolle der Ausgangsstoffe) das Europäische Arzneibuch (Ph. Eur.) als verbindlicher Standard für die Prüfung der Qualität von Ausgangsstoffen für die Herstellung von Arzneimitteln festgelegt<sup>[8]</sup>. In den Monographien des Ph. Eur. werden getrocknete Pflanzenteile, sogenannte pflanzliche Drogen, mitberücksichtigt. Bereits beim Zulassungsverfahren von Arzneimitteln müssen Analysemethoden und Parameter für die Qualitätssicherung angegeben werden. Die Europäische Arzneimittelagentur (European Medicines Agency, EMA) weist in der Richtlinie „Guideline on the requirements for quality documentation concerning biological investigational medicinal products in clinical trials“ (EMA/CHMP/BWP/534898/2008 Rev. 2, 31. Januar 2022) auf die Möglichkeit hin, bereits etablierte Methoden des Ph. Eur. als Vorgabe für die Qualitätsdokumentation heranzuziehen. Dadurch können bestehende Verfahren genutzt werden, um einheitliche Standards für die Qualitätskontrolle neuer Arzneimittel zu etablieren<sup>[9]</sup>. Zudem ist im Zulassungsverfahren die Bewertung der Sicherheit neuer Wirkstoffe von entscheidender Bedeutung. Die Relevanz solcher Sicherheitsprüfungen zeigte sich durch den Contergan-Skandal in den 1960er Jahren. Die Einnahme des Schlaf- und Beruhigungsmittels in der Schwangerschaft führte zu schwerwiegenden Fehlbildungen bei Neugeborenen<sup>[10]</sup>.

In der Konsequenz wurden die regulatorischen Anforderungen an die Zulassung und Sicherheitsbewertung von Arzneimitteln erheblich verschärft.

Zudem wurden verbindliche Richtlinien etabliert, um Qualität und Sicherheit sicherzustellen<sup>[11]</sup>. Ein erster essentieller Schritt zur Identifizierung potenziell schädlicher Effekte umfasst die Zytotoxizitätstestung. Dabei werden Stoffe oder Stoffgemische auf ihre toxischen Eigenschaften hin untersucht, indem sie in Zellkulturen getestet werden. Diese Daten bilden die Grundlage für die weiteren Schritte hin zu klinischen Studien<sup>[12]</sup>.

Ein weiterer wichtiger Punkt in der Sicherheitsbewertung von Wirkstoffen ist das Verständnis über die Art der Wirkung. Der Wirkmechanismus gibt Aufschluss über die biologischen Zielstrukturen und Signalwege, durch die pflanzliche Inhaltsstoffe ihre Effekte vermitteln. Dieses Wissen trägt nicht nur dazu bei, die therapeutische Wirksamkeit zu optimieren, sondern ermöglicht auch eine präzisere Bewertung potenzieller Risiken<sup>[13]</sup>. So können durch die Analyse des Wirkmechanismus molekulare Mechanismen aufgedeckt werden, die zu unerwünschten Nebenwirkungen oder toxischen Reaktionen führen<sup>[14]</sup>. Dies setzt jedoch voraus, dass der Wirkstoff genau bekannt ist, was bei pflanzlichen Arzneimitteln oft eine Herausforderung darstellt. Aufgrund der komplexen Zusammensetzung pflanzlicher Extrakte ist es häufig schwierig, einzelne bioaktive Komponenten und deren genaue Wirkweise zu bestimmen. Hier setzt die bioaktivitätsgeführte Isolierung an. Bei der bioaktivitätsgeführten Isolierung wird ein Extrakt zunächst auf seine biologische Wirkung geprüft. Anschließend erfolgt eine schrittweise Fraktionierung, um die aktiven Wirkstoffgruppen einzugrenzen. In weiteren Schritten werden einzelne bioaktive Verbindungen isoliert und gezielt auf ihre therapeutische Wirkung untersucht. Dieser systematische Ansatz kombiniert biologische Testsysteme mit chemischer Analyse und ermöglicht die gezielte Identifizierung wirksamer Naturstoffe. Damit kann die genaue pharmakologische Wirkung besser verstanden und die Entwicklung von zielgerichteten Therapien vorangetrieben werden<sup>[15], [16]</sup>. Darüber hinaus können neue Perspektiven eröffnet werden, die für die Entwicklung innovativer Therapieansätze von Bedeutung sein können, insbesondere im Hinblick auf globale Herausforderungen, wie die starke Zunahme von Antibiotikaresistenzen<sup>[17]</sup>.

So sind Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-bildende *Escherichia (E.) coli* in der Lage, Beta-Lactam-Antibiotika zu hydrolysieren und somit deren Wirksamkeit zu neutralisieren, was die Behandlung von Infektionen erschwert<sup>[18]</sup>. Einige phylogenetische Linien von ESBL-produzierenden *E. coli*, wie beispielsweise Sequenztyp (ST) 131 und ST648, sind nicht nur resistent gegenüber mehreren Antibiotikaklassen, sondern besitzen zusätzlich eine hohe Virulenz. Diese beschreibt das Ausmaß der Pathogenität eines Organismus. Sie ist eng mit der Fähigkeit von Pathogenen verbunden, trotz der Abwehrmechanismen des Wirts eine Infektion hervorzurufen. Dies verstärkt die Persistenz im infizierten Gewebe sowie die Resistenz gegenüber Immunantworten<sup>[19]</sup>. Der Grad der Virulenz wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, darunter die Menge der eindringenden Bakterien, der Eintrittspfad in den Körper, die spezifischen und unspezifischen Abwehrmechanismen des Wirts sowie die Virulenzfaktoren des Bakteriums<sup>[20], [21]</sup>.

Virulenzfaktoren sind spezifische Moleküle oder Mechanismen eines Pathogens, die sein Überleben, seine Vermehrung und die Krankheitsentstehung im Wirt ermöglichen<sup>[22]</sup>. Dazu zählen Faktoren wie Toxinbildung, Adhäsion an Oberflächen und die Biofilmbildung<sup>[22]</sup>.

Letztere stellt einen komplexen Prozess dar, bei dem sich Bakterien zu einer strukturierten Gemeinschaft organisieren und von einer schützenden extrazellulären Matrix umgeben sind. Diese Lebensform bietet den Bakterien einen erheblichen Schutz vor antimikrobiellen Substanzen, was die Behandlung erschwert<sup>[23]</sup>. Ein weiterer Virulenzfaktor ist die Produktion von Siderophoren. Diese niedermolekularen Verbindungen binden Eisen und erleichtern die Aufnahme des essenziellen Spurenelements in die Bakterienzelle<sup>[24]</sup>. Dadurch wird das Wachstum der Erreger selbst unter den eisenlimitierten Bedingungen im Wirt begünstigt<sup>[25]</sup>. Dies verschafft ihnen einen entscheidenden Überlebensvorteil im infizierten Gewebe und fördert sowohl die Kolonisierung als auch die Ausbreitung im Wirt<sup>[26]</sup>.

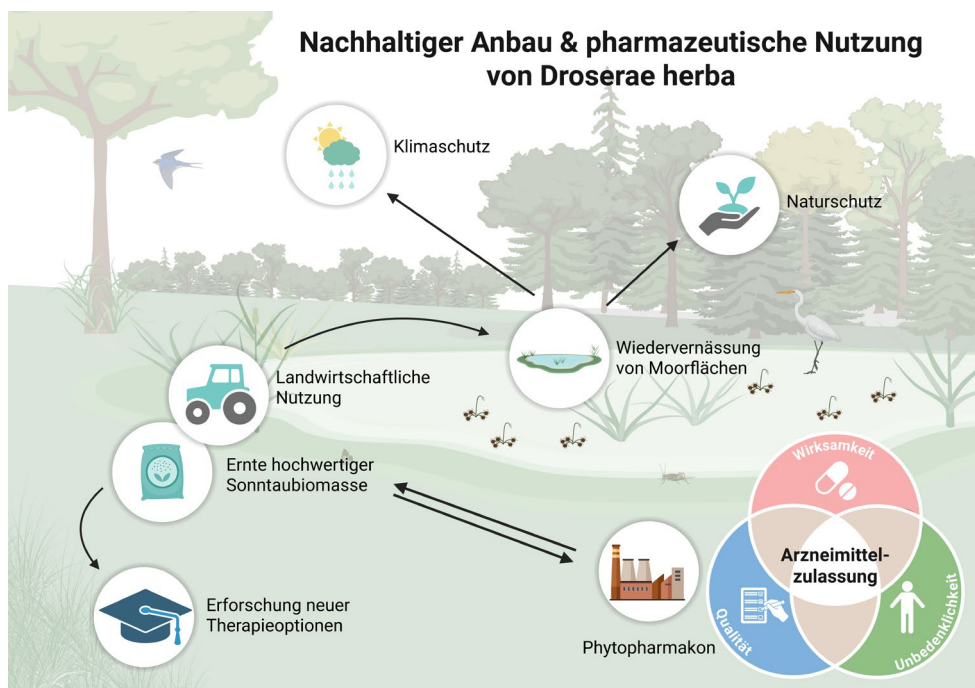
*E. coli* kann je nach Virulenzfaktoren und Krankheitsbild in verschiedene Pathotypen unterteilt werden. Je nach Infektionsort lassen sich Pathogene in zwei Hauptgruppen einteilen; extra-intestinale und intestinale Typen. Stämme, die extra-intestinale Infektionen verursachen (extra-intestinal pathogene *E. coli*, ExPEC), zeichnen sich vor allem durch Adhäsionsfaktoren aus, die die Kolonisierung im Wirt ermöglichen<sup>[27]</sup>. Intestinale pathogene *E. coli* (InPEC) sind vor allem dafür bekannt, Barrieren zu überwinden und Toxine, wie das Shigatoxin, zu produzieren<sup>[28]</sup>. Eine tiefgreifende Klassifizierung von *E. coli* Subtypen kann durch genetische Marker erfolgen, die häufig in epidemiologischen Studien verwendet werden, um die Herkunft der Erreger sowie potenzielle Risikofaktoren für ihre Übertragung zu untersuchen. Diese phylogenetischen Gruppen helfen dabei, verschiedene *E. coli*-Stämme zu klassifizieren und ihre biologischen Eigenschaften, einschließlich ihrer Pathogenität, besser zu verstehen<sup>[29]</sup>. Die sieben phylogenetischen Gruppen von *E. coli* (A, B1, B2, C, D, E und F)<sup>[30]</sup> unterscheiden sich genetisch und sind mit unterschiedlichen Eigenschaften und Krankheitsverläufen assoziiert. Kommensale Stämme gehören meist den Gruppen A und B1 an, während extra-intestinale pathogene Stämme vor allem in den Gruppen B2 und D vorkommen, die mit schwereren Infektionen assoziiert werden<sup>[31]</sup>. Eine weitere Methode zur Differenzierung von *E. coli*-Stämmen ist die Multilocus-Sequenztypisierung (MLST). Diese Methode ermöglicht eine detaillierte Charakterisierung durch die Analyse der Sequenzen von ursprünglich sieben Haushaltsgenen („housekeeping genes“) aus dem Kerngenom von *E. coli* und hilft dabei, genetische Linien sowie deren Verbreitung zu identifizieren. So konnte beispielsweise *E. coli* ST131 als globaler Hochrisikoklon beschrieben werden, der häufig mit ESBL-Bildung sowie schweren extra-intestinalen Infektionen assoziiert wird<sup>[32]</sup>, <sup>[33]</sup>, <sup>[34]</sup>. *E. coli* ST648 ist eine weitere pandemisch auftrennende ESBL-produzierende *E. coli*-Linie der Gruppe D. MLST trägt somit maßgeblich dazu bei, die Ausbreitung und Evolution klinisch relevanter Stämme zu überwachen und deren Pathogenität besser zu verstehen<sup>[35]</sup>. Diese beiden Linien (ST131 und ST648) zeichnen sich nicht nur durch ihre Resistenzprofile aus, sondern insbesondere auch durch ihre Fähigkeit, Biofilme zu bilden, was ihre Persistenz in verschiedenen Wirten und Umweltreservoirs erheblich erhöht<sup>[35]</sup>.

Etwa 80 % der chronischen und rezidivierenden mikrobiellen Infektionen im menschlichen Körper stehen in direktem Zusammenhang mit der Bildung bakterieller Biofilme<sup>[36]</sup>. Die zunehmende Verbreitung von ST131 und ST648 Linien, die sowohl Tiere als auch Menschen infizieren können, stellt eine wachsende Bedrohung für die Gesundheit dar<sup>[37], [38]</sup>.

Eine vielversprechende Möglichkeit zur Bekämpfung solcher multiresistenten Keime könnte in der Entwicklung antivirulenter Wirkstoffe liegen. Sie zielen darauf ab, Virulenzeigenschaften wie Biofilmbildung oder Adhäsion an Oberflächen gezielt abzuschwächen, ohne direkt bakterizid oder bakteriostatisch zu wirken. Dadurch wird der Selektionsdruck auf die Keime reduziert, was die Entstehung weiterer Resistenzen verlangsamen könnte<sup>[39]</sup>. Naturstoffe stellen eine vielversprechende Quelle für die Entwicklung neuer therapeutischer Ansätze dar, da ihre Vielzahl ein nahezu unerschöpfliches Reservoir bietet. Dabei stehen insbesondere sekundäre Pflanzenstoffe im Fokus der Forschung<sup>[40]</sup>. Durch Jahrmillionen der Koevolution mit Proteinen und anderen biologischen Molekülen haben sie die Fähigkeit entwickelt, gezielt mit lebenden Zellen und deren Signalwegen zu interagieren. Diese Verbindungen bilden Pflanzen nicht primär zum Überleben, sondern sie erfüllen andere Aufgaben wie die Anlockung von Insekten oder die Abwehr von Krankheitserregern<sup>[41]</sup>. Ein Beispiel hierfür sind Flavonoide, die bekannt für ihre antioxidativen<sup>[42]</sup>, antiinflammatorisch<sup>[43], [44]</sup> und antimikrobiellen<sup>[45]</sup> Eigenschaften sind. Zudem besitzen Flavonoide biofilmhemmende Eigenschaften<sup>[46], [47]</sup>. Als Adjuvans in der antibakteriellen Therapie können sie damit die Empfindlichkeit der Bakterien gegenüber einem Antibiotikum erhöhen<sup>[48], [49]</sup>. Neben Flavonoiden spielen auch Naphthochinone eine bedeutende Rolle als bioaktive Pflanzenstoffe. Diese Verbindungen zeichnen sich durch ihr antimikrobielles<sup>[34], [50]</sup>, antioxidatives<sup>[51]</sup> und zytotoxisches<sup>[52]</sup> Potential aus. Die Kombination von Flavonoiden und Naphthochinonen in Pflanzenextrakten könnte einen synergistischen Effekt haben, der die Wirksamkeit gegen multiresistente Keime steigert und neue Perspektiven für die Entwicklung pflanzlicher Medikamente eröffnet.

Der Rundblättrige Sonnentau, *Drosera (D.) rotundifolia*, ist eine Arzneipflanze, die reich an Flavonoiden und Naphthochinonen ist. Die Gattung *Drosera* umfasst weltweit mehr als 150 Arten, die vor allem auf der Südhalbkugel, insbesondere in Australien, Südafrika und Südamerika vorkommen, aber auch in Europa, Nordamerika und Asien verbreitet sind<sup>[53]</sup>. Zu den in Europa heimischen Arten zählen neben *D. rotundifolia* auch *D. intermedia* und *D. anglica*<sup>[54]</sup>. In der traditionellen Heilkunde fand *D. rotundifolia* Anwendung zur Behandlung von krampfhaften Atemwegserkrankungen. Die Wirkung lässt sich auf ihre spasmolytischen, antiinflammatorischen und antimikrobiellen Eigenschaften zurückführen<sup>[55]</sup>. Trotz der nachgewiesenen Wirksamkeit ist Sonnentau in Deutschland als Phytopharmakon kaum erhältlich. Die Hauptursachen hierfür sind die Zerstörung des natürlichen Lebensraums durch die Entwässerung von Moorebenen im Zuge landwirtschaftlicher Nutzung, klimatische Veränderungen und der dezimierte natürliche Bestand aufgrund von Wildsammlung<sup>[56]</sup>. Dadurch war die Beschaffung von ausreichend Pflanzenmaterial aus natürlichen Beständen über Jahre erschwert<sup>[56]</sup>.

Infolgedessen gewannen andere *Drosera*-Arten, wie *D. madagascariensis* aus dem tropischem Afrika und Madagaskar, zunehmend an Bedeutung als Ausgangsmaterial für pflanzliche Arzneimittel<sup>[56]</sup>. Studien haben jedoch gezeigt, dass die Zusammensetzung der sekundären Pflanzenstoffe, insbesondere der Flavonoide und Naphthochinone, innerhalb der *Drosera*-Arten variiert<sup>[57], [58]</sup>. So enthalten *D. rotundifolia* und *D. anglica* etwa 5 %, *D. intermedia* rund 1 % und *D. madagascariensis* nur ca. 0,3 % Flavonoide. Auch der Gehalt an Naphthochinonen, wie beispielsweise Plumbagin, variiert zwischen den Arten. *D. intermedia* zeichnet sich durch einen besonders hohen Naphthochinongehalt von über 0,9 % aus, während in *D. rotundifolia* nur etwa 0,6 % und in *D. madagascariensis* nur 0,04 % enthalten sind<sup>[59], [60]</sup>. Die Unterschiede in der Zusammensetzung und Konzentration der bioaktiven Inhaltsstoffe können Einfluss auf die Qualität und Wirksamkeit der Pflanzen haben. Aufgrund ihres hohen Flavonoidgehalts sind europäische *Drosera*-Arten für die therapeutische Nutzung von großer Bedeutung. Ein zentrales Problem bleibt jedoch die Beschaffung von ausreichend hochwertigem Pflanzenmaterial. Eine Lösung kann die Wiedervernässung von Mooregebieten, dem natürlichen Habitat des Sonnentaus, sein. Die Wiedervernässung von Mooren wäre nicht nur entscheidend für den Arterhalt des Sonnentaus, sondern auch für den Klimaschutz, da Moore bedeutende Kohlenstoffspeicher darstellen<sup>[61]</sup>. Im Juni 2024 wurde vom Europäischen Umweltrat das Gesetz zur Wiederherstellung der Natur (Nature Restoration Law) beschlossen, das darauf abzielt, wichtige Ökosysteme, einschließlich Feuchtgebieten wie Mooren, auf großer Fläche zu renaturieren<sup>[62], [63]</sup>. Die Wiederherstellung dieser wertvollen Lebensräume bietet zudem die Möglichkeit, das pharmazeutische Potential vom Rundblättrigen Sonnentau zu revitalisieren, indem Paludikultur-Anbauverfahren zur nachhaltigen Produktion der Pflanze eingesetzt werden können. Die mögliche Nutzung von *Droserae herba* im bioökonomischen Gesamtkontext wird in Abbildung 1 veranschaulicht.



**Abbildung 1.** Die mögliche Nutzung von *Droserae herba* im bioökonomischen Gesamtkontext; erstellt mit Biorender.com.

### **Zielstellung der Dissertation**

Mit dieser Arbeit sollen Grundlagen erforscht werden, die *Droserae herba* von der traditionellen Anwendung hin zur modernen Phytotherapie führen könnten. Ein zentraler Aspekt ist die Qualitätssicherung. Unterschiede in Art und Anbaubedingungen können die Konzentration der wirksamkeitsbestimmenden Inhaltsstoffe und damit die Therapiesicherheit beeinflussen. Angesichts des Fehlens einer verbindlichen Arzneibuchmonographie besteht ein wichtiger Teil dieser Arbeit darin, Prüfmethode und Qualitätskriterien auf der Grundlage der Ph. Eur.-Standards zu entwickeln. Die Ergebnisse dieser Studie sind in einer Publikation zusammengefasst und sollen einen Beitrag zur Standardisierung sowie zur Sicherstellung der Qualität von *Droserae herba* als Ausgangsmaterial für die pharmazeutische Nutzung leisten (**Publikation A**).

Die traditionelle Anwendung von *Droserae herba* liefert wertvolle Hinweise zur Indikation, die jedoch für eine Etablierung in der modernen Phytotherapie wissenschaftlich belegt werden müssen. Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der Untersuchung der antibakteriellen und antiinflammatorischen Wirkung. Hierbei sollen sowohl klassische Atemwegskeime wie *Pseudomonas aeruginosa* als auch atypische Pathogene wie *E. coli* oder Hefen auf ihre Empfindlichkeit gegenüber Extrakten von *Droserae herba* untersucht werden. Dies erfolgt mittels Agardiffusionstest und der Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration (MHK). Zusätzlich soll das Potenzial von *Droserae herba* zur Hemmung eines spezifischen Virulenzfaktors, der Biofilmbildung, untersucht werden, wobei insbesondere die Inhibition der Matrixkomponenten Cellulose und Curli im Fokus steht. Die antiinflammatorische Wirkung soll durch die Hemmung der 5-Lipoxygenase bewertet werden. Die Untersuchung von Bakterien und Hefen, die nicht direkt mit Atemwegserkrankungen in Verbindung stehen, sowie die Analyse der Biofilmhemmung sollen dazu beitragen, das Indikationsgebiet von *Droserae herba* zu erweitern und so seine Rolle in der modernen Phytotherapie voranzutreiben. Die Ergebnisse der Untersuchungen der Biofilmhemmung sind in einer Publikation veröffentlicht (**Publikation B**).

Zudem sollen Proteom- und Metabolom-Untersuchungen durchgeführt werden, um Hinweise auf den potentiellen Wirkungsmechanismus der biofilmhemmenden Wirkung von *Drosera* Extrakten zu gewinnen. Durch bioaktivitätsgeführte Fraktionierung und Isolierung sollen gezielt bioaktive Verbindungen analysiert werden, die für die Wirkung verantwortlich sind. Dadurch lässt sich das Zusammenspiel der verschiedenen Wirkstoffgruppen untersuchen. Die Ergebnisse sind in einer Publikation zusammengefasst. (**Publikation C**).

Zusätzlich sollen Zytotoxizitätsdaten für die untersuchten Extrakte, Fraktionen und Einzelsubstanzen erhoben werden, um erste toxikologische Bewertungen vorzunehmen. Die Untersuchungen erfolgen in verschiedenen Modellsystemen, darunter Monolayer-basierten-Zellkulturen, einem 3D-Zellmodell sowie einem *in vivo* *Galleria*-Modell. Erstere basieren auf Mundschleimhaut-Epithelzellen (TR146) und bronchialen Epithelzellen (A549) und sind Teil der **Publikation A**.

Für das 3D-Zellmodell sollen ebenfalls TR146-Zellen verwendet werden. Die Ergebnisse dieses Modells sowie des *Galleria*-Modells sind in der **Publikation C** enthalten.

Das Ziel dieser Dissertation ist es, Grundlagen für die Etablierung von *Drosera herba* in der evidenzbasierten Phytotherapie zu schaffen. Zusammengefasst wurden folgende Schwerpunkte untersucht:

- Qualitätsuntersuchungen als Basis für einen Monographie-Entwurf nach den Standards des Ph. Eur.
- Mikrobiologische Analysen, die sowohl das klassische Indikationsgebiet mit der Testung der Aktivität gegen Atemwegskeime und der Untersuchung antiinflammatorischer Eigenschaften umfassen als auch die Wirkung gegen weitere Bakterien und Hefen, mit besonderem Fokus auf der biofilmhemmenden Aktivität gegenüber ESBL-produzierenden *E. coli* zur potenziellen Indikationserweiterung,
- bioaktivitätsgeführte Testung zur Identifizierung wirksamer Inhaltsstoffe und Untersuchung molekularer Wirkmechanismen im Kontext der biofilmhemmenden Wirkung,
- Bewertung des zytotoxischen Potenzials anhand von Monolayer-basierten-Zellkulturen, 3D-Zellmodellen und dem *Galleria mellonella*-Mode