

**29.01.2020**

## **Antimikrobielle Aktivität von Kiefern-Kernholz-Extrakt gegenüber *Porphyromonas gingivalis***

Unter den Mikroorganismen, die mit Parodontitis assoziiert sind, nimmt *Porphyromonas gingivalis* eine Schlüsselrolle ein [1]. *P. gingivalis* ist mit einer Vielzahl von Virulenzfaktoren ausgestattet, so Lipopolysaccharid, Kapsel, Fimbrien und Proteasen [2]. *P. gingivalis* wird im Zusammenhang mit Allgemeinerkrankungen wie z.B. rheumatoider Arthritis [3] und Alzheimer-Erkrankung [4], diskutiert.

Die unterstützende Anwendung von pflanzlichen Produkten in der Prävention und Therapie von parodontalen Erkrankungen wird seit einigen Jahren diskutiert. Hierbei ist auch der Effekt auf orale Mikroorganismen von Interesse. So sind mediterrane Pflanzen hoch aktiv, auch gegen *P. gingivalis* [5].

Produkte der heimischen Kiefer (*Pinus sylvestris*) wurden generell bisher eher selten untersucht, gelegentlich wurde von einer entzündungshemmenden und immunstimulierenden Wirkung berichtet [6, 7]. In der wissenschaftlichen Literatur gibt es nur sehr wenige Hinweise über mögliche antimikrobielle Effekte von Kiefernextrakt. So kann dieser die antimikrobielle Aktivität der Azole gegen *Cryptococcus neoformans* erhöhen [8]. Speziell in Bezug auf Mikroorganismen der Mundhöhle wurde bisher nichts publiziert.

Das Ziel unserer In vitro-Studie war es, die antimikrobielle Wirksamkeit von Kiefernextrakt (Wilms®-KiefernGold) auf *Porphyromonas gingivalis*-Stämme zu testen.

### **Material und Methoden**

#### *Testsubstanz*

Testsubstanz war handelsüblicher Kiefernextrakt (Wilms®-KiefernGold).

#### *Mikroorganismen*

Die folgenden Mikroorganismen wurden in den Versuchen eingesetzt:

Referenzstamm:

1. *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277

Klinische Isolate

2. *Porphyromonas gingivalis* M5-1-2
3. *Porphyromonas gingivalis* BeOR14
4. *Porphyromonas gingivalis* B3014
5. *Porphyromonas gingivalis* B3016
6. *Porphyromonas gingivalis* B3042.

Die Identität der Stämme wurde mittels PCR mit spezifischen Primern bestätigt.

#### *Methodik Bestimmung minimale Hemmkonzentration (MHK)*

Die Bakterienstämme wurden auf Trypticase-Soja-Agar-Platten mit 5% Schafblut unter anaeroben Verhältnisse bei 37°C über 24 h vorkultiviert. Von dem Kiefernkernelholzextrakt wurde mit dH<sub>2</sub>O eine Verdünnungsreihe hergestellt. Je 100 µl wurden in ein Well einer 96-Well-Mikrotiterplatte gegeben. Die Bakterien wurden in 0,9% w/v NaCl suspendiert (McFarland 0,5) und anschliessend 1 : 9 in doppelt konz. Wilkins-Chalgren-Bouillon (mit 2 x 10 mg/l = 20 mg/l β-NAD) vermischt. Auch von der Nährbouillon mit Keimsuspension wurden je 100 µl pro Well der Mikrotiterplatte pipettiert.

Nach einer Inkubation von 24 h unter anaeroben Verhältnissen wurden Subkulturen angelegt und diese wurden bis zu einer Woche wiederum anaerob inkubiert. Die MHK war die kleinste Konzentration des Kiefernkernelholzextraktes, wo eine deutliche Wachstumshemmung auftrat (Kein Wachstum bzw. nur wenige Einzelkolonien). Die Ermittlung der MHK erfolgte in unabhängiger Doppelbestimmung.

#### *Methodik Killing*

Die Vorkultur der Bakterienstämme erfolgte wie zuvor beschrieben. Es wurde eine Keimsuspension McFarland 0,5 in 0,9% w/v NaCl hergestellt, Diese wurde im Verhältnis 1 : 100 zu 100% bzw. 20% Kiefernkernelholzextrakt (verdünnt mit dH<sub>2</sub>O) bzw. dH<sub>2</sub>O (Kontrolle) zugegeben. Nach 2 min Inkubation wurde diese Mischung 1 : 1 mit doppelt konzentriertem Nährmedium (Wilkins-Chalgren-Bouillon mit 20 mg/l β-NAD) gemischt. Die Endkonzentration in den Röhrchen betrug so 50%, 10% und 0% Kiefernkernelholzextrakt.

Nach anaerober Inkubation bei 37°C wurden zu den Zeiten 1 h, 6 h und 24 h Proben entnommen, diese nach Herstellen einer Verdünnungsreihe auf Trypticase-Soja-Agar ausplattiert. Die Agar-Platten wurden wiederum anaerob bei 37°C für 8 d inkubiert. Anschliessend wurde die Zahl der Koloniebildenden Einheiten (cfu) ermittelt.

### **Ergebnisse**

#### *Minimale Hemmkonzentration (MHK)*

Bei Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration des Kiefernkernelholzextraktes fiel eine stammspezifische Wirkung auf. Während der Referenzstamm ATCC 33277 und ein klinisches Isolat (M5-1-2) erst bei 50% Kiefernkernelholzextraktkonzentration gehemmt wurden, wurden andere klinische Isolate bereits bei 6,3% Kiefernkernelholzextraktkonzentration in ihrer Vermehrung blockiert (Tabelle 1).

Tabelle 1 Minimale Hemmkonzentration (MHK) des Kiefernkernelholzextraktes gegenüber verschiedenen *P. gingivalis*-Stämmen

<b>Stamm</b>	<b>MHK (% Kiefernkernelholzextrakt)</b>
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	50
<i>P. gingivalis</i> M5-1-2	50
<i>P. gingivalis</i> BeOR14	12,5
<i>P. gingivalis</i> B3014	6,3
<i>P. gingivalis</i> B3016	6,3
<i>P. gingivalis</i> B3042	12,5

*Killing von Porphyromonas gingivalis*-Stämmen durch Kiefernkernelholzextrakt

Alle Stämme wurden nach Einsatz von 100% Kiefernkernelholzextrakt für 2 min und nachfolgender Verdünnung auf 50% vollständig nach spätestens 6 h abgetötet. Hier war eine gewisse Übereinstimmung mit den MHK-Werten sichtbar, bei den beiden Stämmen mit einer MHK von 50% wurde die Abtötung erst nach 6 h erreicht. Aber auch mit einer Einwirkung von initial 20% und nachfolgend 10% Kiefernkernelholzextrakt wurde immer eine vollständige Abtötung nach 6 h bzw. 24 h erreicht (Abb. 1). Es ist anzumerken, dass offensichtlich eine gewisse Einschränkung der Viabilität der Stämme auftrat, welches sich in sinkenden Bakterienzahlen vor allem nach 24 h zeigte.

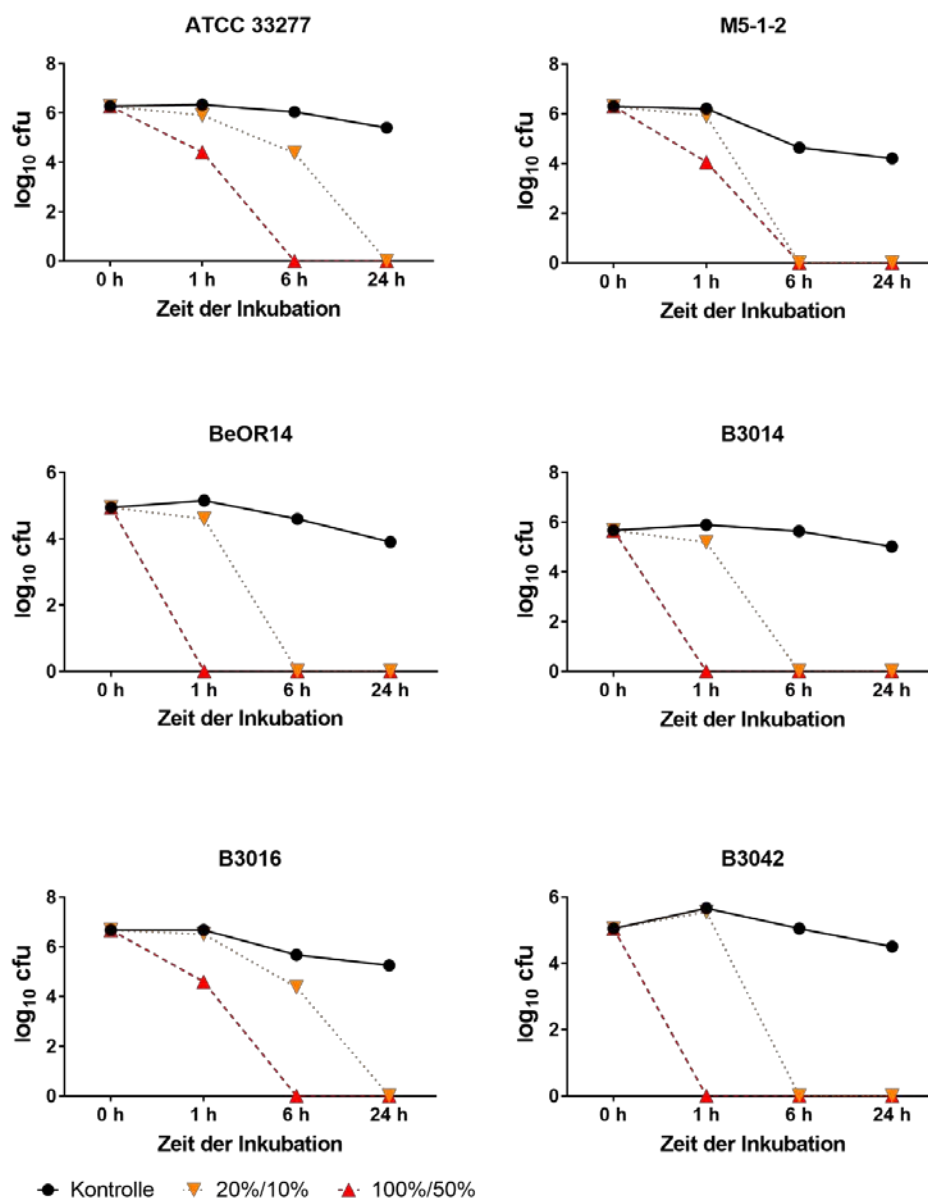


Abb. 1  
Killing von *P. gingivalis*-Stämmen durch Kiefernkernelholzextrakt nach 2 min Einwirkung von 100% bzw. 20% Kiefernkernelholzextrakt und nachfolgender Verdünnung auf 50% und 10% Kiefernkernelholzextrakt und Zusatz von Nährmedium

**Zusammenfassend** lässt sich feststellen, dass Kiefernkernelholzextrakt eine antimikrobielle Aktivität gegenüber *P. gingivalis* aufweist. Es ist aber zu berücksichtigen, dass es offensichtlich stammspezifische Unterschiede gibt und nach klinischer Anwendung in vivo durch die verdünnende Wirkung von Speichel und Gingivafluid nicht von Konzentrationen im Bereich von 50%-100% auszugehen ist. Trotzdem könnte Kiefernkernelholzextrakt eine interessante Alternative in der adjunktiven Parodontitistherapie darstellen und sollte Gegenstand weiterer wissenschaftlicher Untersuchung sein.

#### Literatur:

1. Hajishengallis, G., R.P. Darveau, and M.A. Curtis, The keystone-pathogen hypothesis. *Nat Rev Microbiol* 2012;10:717-25.
2. Holt, S.C. and J.L. Ebersole, Porphyromonas gingivalis, Treponema denticola, and Tannerella forsythia: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol* 2000 2005;38:72-122.
3. Bender, P., W.B. Burgin, A. Sculean, and S. Eick, Serum antibody levels against Porphyromonas gingivalis in patients with and without rheumatoid arthritis - a systematic review and meta-analysis. *Clin Oral Investig* 2017;21:33-42.
4. Laugisch, O., A. Johnen, A. Maldonado, B. Ehmke, W. Burgin, I. Olsen, J. Potempa, A. Sculean, T. Duning, and S. Eick, Periodontal Pathogens and Associated Intrathecal Antibodies in Early Stages of Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2018;66:105-114.
5. Karygianni, L., M. Cecere, A. Argyropoulou, E. Hellwig, A.L. Skaltsounis, A. Wittmer, J.P. Tchorz, and A. Al-Ahmad, Compounds from Olea europaea and Pistacia lentiscus inhibit oral microbial growth. *BMC Complement Altern Med* 2019;19:51.
6. Bradley, W.G., K.N. Holm, and A. Tanaka, An orally active immune adjuvant prepared from cones of Pinus sylvestris, enhances the proliferative phase of a primary T cell response. *BMC Complement Altern Med* 2014;14:163.
7. Laavola, M., R. Nieminen, T. Leppanen, C. Eckerman, B. Holmbom, and E. Moilanen, Pinosylvin and monomethylpinosylvin, constituents of an extract from the knot of Pinus sylvestris, reduce inflammatory gene expression and inflammatory responses in vivo. *J Agric Food Chem* 2015;63:3445-53.
8. Scalas, D., N. Mandras, J. Roana, R. Tardugno, A.M. Cuffini, V. Ghisetti, S. Benvenuti, and V. Tullio, Use of Pinus sylvestris L. (Pinaceae), Origanum vulgare L. (Lamiaceae), and Thymus vulgaris L. (Lamiaceae) essential oils and their main components to enhance itraconazole activity against azole susceptible/not-susceptible Cryptococcus neoformans strains. *BMC Complement Altern Med* 2018;18:143.

Prof. Sigrun Eick

Leiterin Labor Orale Mikrobiologie