

Antimikrobielle Effekte von *standardisiertem Myrtol* auf *Staphylococcus aureus*



Constantin L. M. Schütz¹, Achim G. Beule¹, Katrin Darm¹, Julia Kolata², Werner G. Hosemann¹, Rabea Schlüter³, Christian Scharf¹

¹HNO-Forschungslabor, ²Institut für Immunologie der Universitätsmedizin Greifswald, Fleischmannstraße 8, 17475 Greifswald ³Institut für Mikrobiologie der Universität Greifswald



Einleitung

Wirkung der Extrakte ätherischer Öle:

Mukosekretolyse- und motorik, Antiinflammation, Bronchospasmolyse und Wachstumshemmung einiger mikrobieller Erreger¹

Staphylococcus aureus:

wichtiger Kommensal der Nase von fast der Hälfte aller Menschen^{II}, in vielen Fällen an bakteriellen Rhinosinuitiden beteiligt, bekannt für Bildung schwer behandelbarer Biofilmformationen und Resistenzentwicklung wie MRSA^{III}

Zielsetzung: Bestätigung antimikrobieller Effekte und Beschreibung morphologischer und molekularbiologischer bzw. biochemischer Veränderungen von *myrtol stand.* auf *Staphylococcus aureus*

Material und Methoden

myrtol stand.: Kapselinhalt Gelomyrtol® forte, sterilfiltriert
Konzentrationen: 0,25%, 0,125%, Kontrolle

Bakterienzellen: COL-Referenzstamm + 3 Patientenisolat;
Charakterisierung durch PCR

Kultivierung: OD-Messungen (bei 595nm in LB-Medium),
CFU-Zählung (LB-Agar)

Elektronenmikroskopie: SEM mit Rutheniumrot extern

Proteomanalyse: 2D-DIGE + MS von Proteinen (IC und EC)

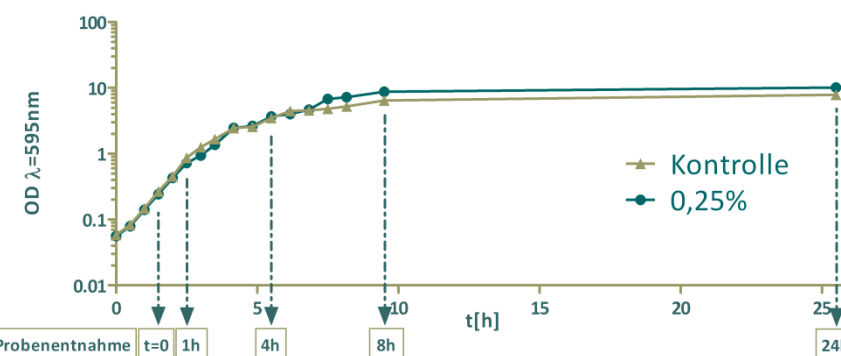


Abb. 1: Probenentnahme für CFU-Zählung, SEM und 2D-DIGE nach Behandlung von *S. aureus* mit *myrtol stand.* 0,25 % bei $t[h]=0;1;4;8;24$.

Überlebensraten 1

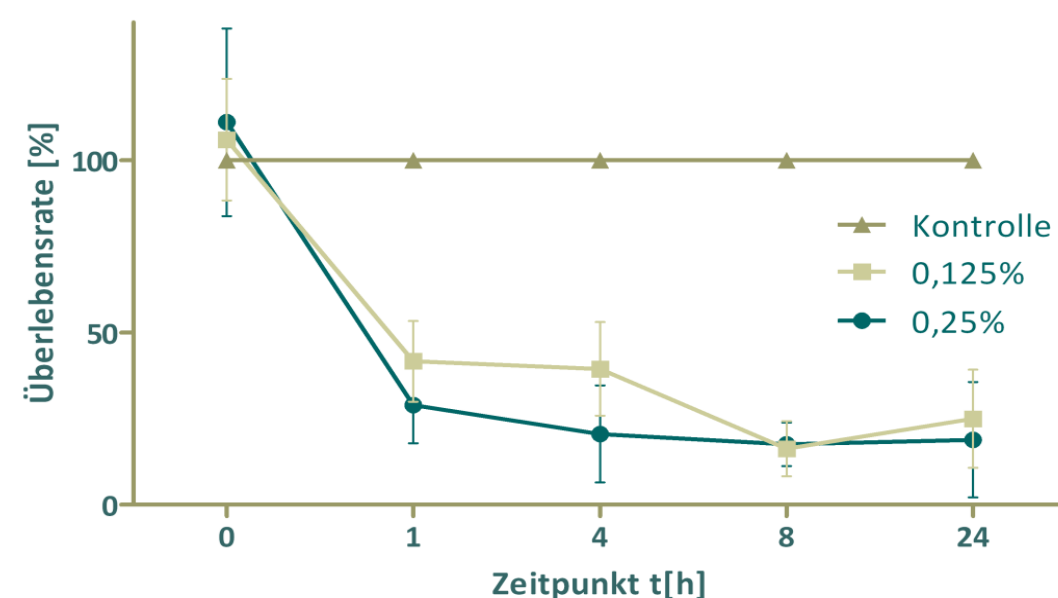


Abb. 2: Durchschnittliche prozentuale Überlebensraten und deren Standardabweichung aller getesteten Isolate unter den *myrtol stand.* Konzentrationen 0,25 %, 0,125 % zu den Zeitpunkten $t[h]=0;1;4;8;24$ nach Behandlung.

Anhang

Quellen: I) Wittig T (2010), II) Holtfreter S et al. (2007), III) McCarthy Rudkin et al. (2015)
Abkürzungen: MRSA: methicillin resistant *Staphylococcus aureus*; OD: optische Dichte; CFU: colony forming unit; LB: lysogeny broth; SEM: scanning electron microscopy; 2D-DIGE: 2D Difference gel electrophoresis; MS: Massenspektrometrie; se(b,c,d,k,q,r): Superantigen Enterotoxine; mecA: kodiert MRSA spezifisches Penicillin-Binding Protein; IC: intrazellulär; EC: extrazellulär
Kontakt: christian.scharf@uni-greifswald.de

Ergebnisse

- Überlebensraten $< 45\%$ von 1h bis 24h nach *myrtol stand.* Gabe (im Vergleich zu Kontrolle)
- erhöhte OD nach 8h und 24h in der Kultivierung verglichen zur Kontrolle
- Signifikant größere Volumina der behandelten Zellen visualisiert mittels SEM ($\Delta V \approx 50\%$)
- Signifikant veränderte Proteinzusammensetzung von Zellen und Überstand in 2D-DIGE (48 bzw. 51 Proteinspots über alle Zeitpunkte mit veränderter Ausprägung im Vergleich zur Kontrolle)
→ sowie hunderte weitere Proteine in einzelnen Vergleichen

Überlebensraten 2

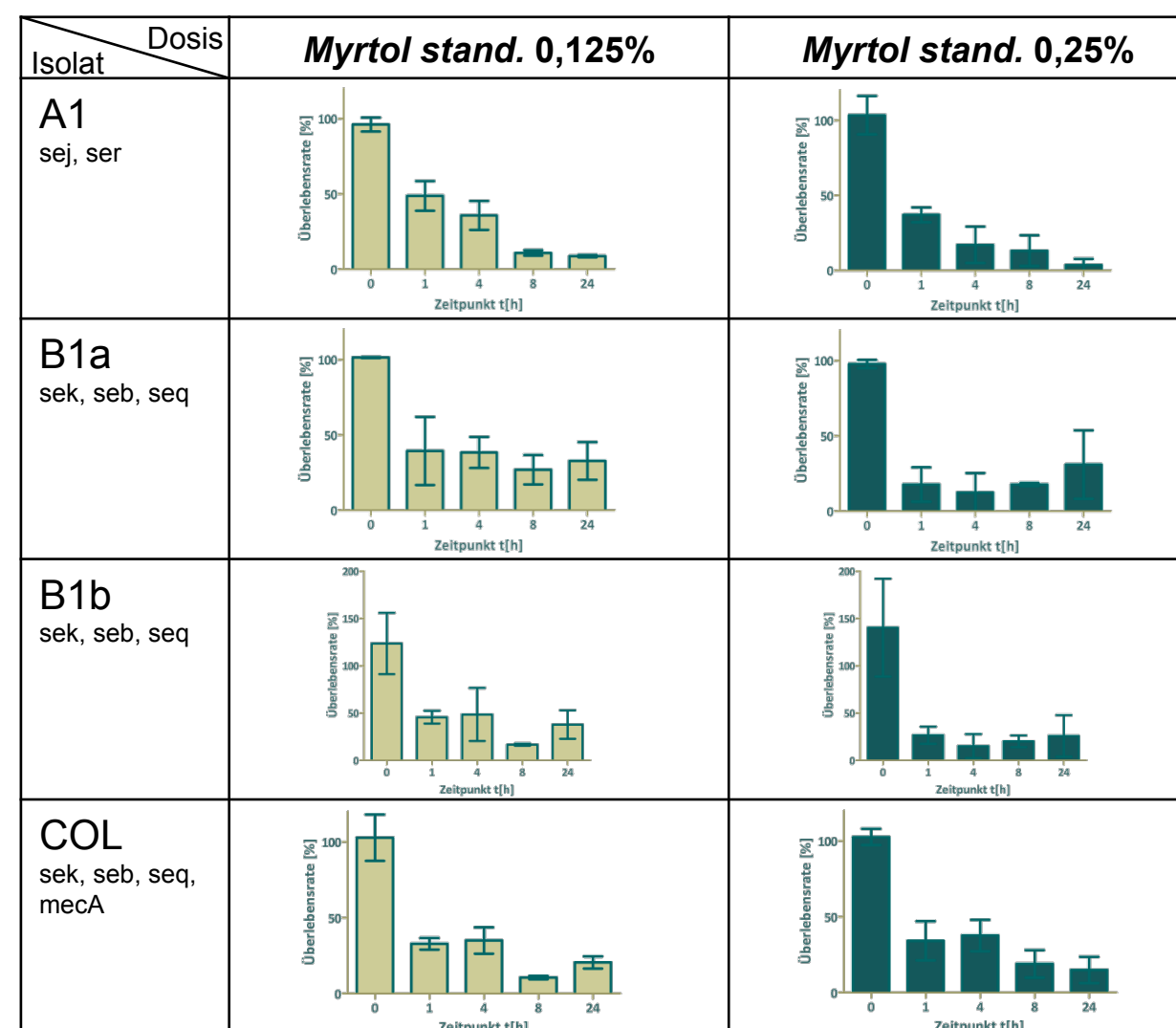
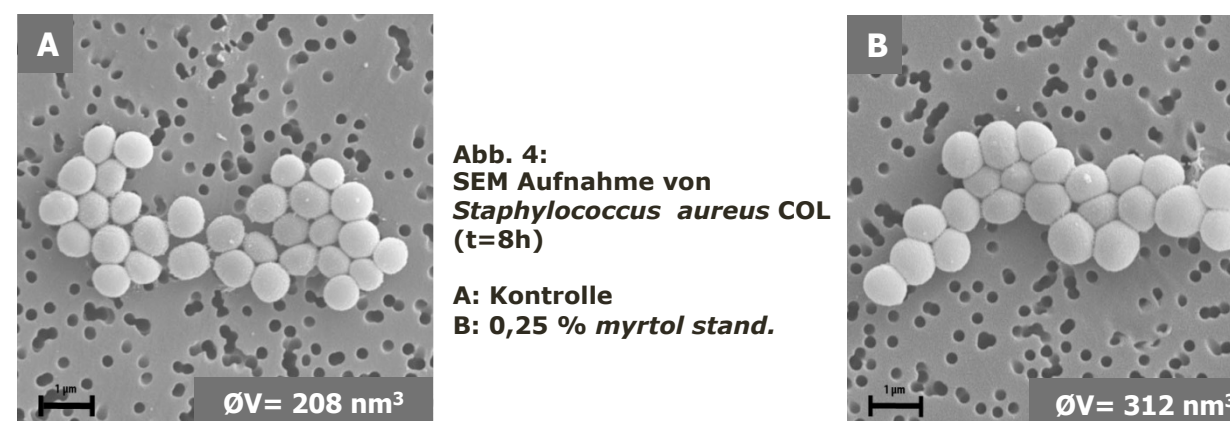


Abb. 3: Durchschnittliche prozentuale Überlebensraten und die entsprechende Standardabweichung unter den *myrtol stand.* Konzentrationen 0,25% und 0,125% der jeweils untersuchten *S. aureus* Isolate (3 Patientenisolat und 1 Referenzstamm). In Spalte 1 sind zusätzlich mittels PCR ermittelte stammspezifische Gene angegeben.

SEM-Aufnahmen



Proteomveränderung 2D-DIGE + MS

	1h	4h	8h	24h
IC	337	232	395	504
EC	130	208	239	264

Tab. 1: Differenziell exprimierte Protein-Spots zum jeweiligen Zeitpunkt nach Gabe von 0,25 % *myrtol stand.* (ratio $<0,667$; ratio $>1,5$; $p<0,05$).

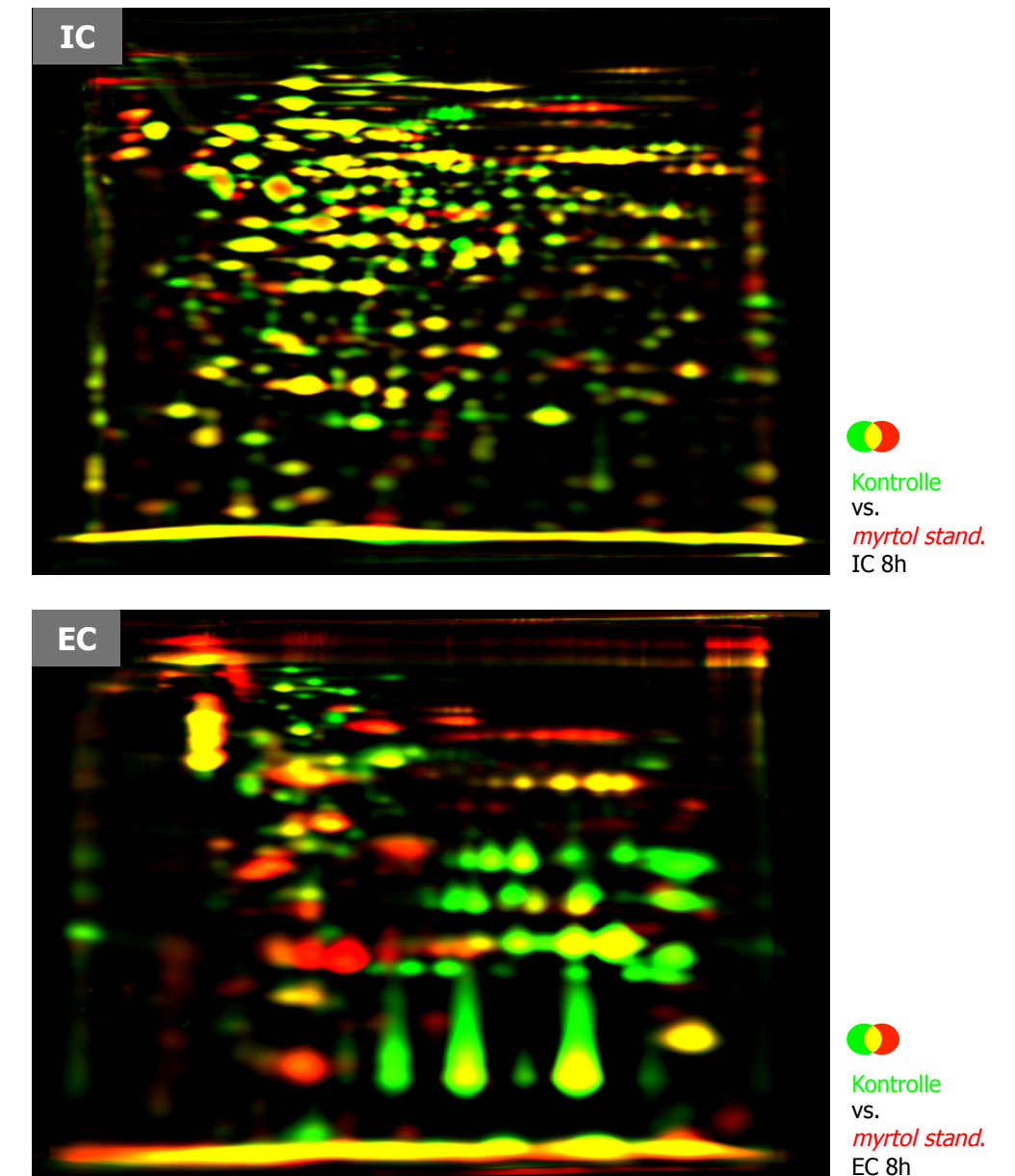


Abb. 5: Darstellung der 2D-DIGE Gele 8h nach Gabe von 0,25 % *myrtol stand.* im Vergleich zur Kontrolle. Rote Protein-Spots zeigen eine erhöhte Protein-Expression und grüne Protein-Spots eine erniedrigte Protein-Expression nach Behandlung. IC entspricht den Proteinen aus dem Pellet der Zellen und EC dem Überstand nach Zentrifugation.

Diskussion

Eine Behandlung mit *myrtol stand.* zeigte eine spezifische, dosisabhängige Wirkung auf die Überlebensrate von *S. aureus*. Mit Hilfe von 2D-DIGE Analysen konnten zahlreiche metabolische Veränderungen, sowohl für intra- als auch extrazelluläre Proteine gefunden werden. Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen der Zellen nach *myrtol stand.* Gabe zeigen signifikante Volumen-Veränderungen und weisen damit auf eine Veränderung der Membran-Zusammensetzung hin.

Schlussfolgerung

Nach Behandlung von *S. aureus* mit *myrtol stand.* konnten dosisabhängige Wachstumsminde rung, Volumenvergrößerung und eine Veränderung der Proteinzusammensetzung nachgewiesen werden.