

Sicherheits- und Wirksamkeitsprofile verschiedener kommerzieller Natriumhypochlorit / Hypochlorsäurelösungen (NaClO/HClO): antimikrobielle Wirksamkeit, zytotoxische Wirkung und physikalisch-chemische Parameter *in vitro*

Anna-Lena Severing†, Julian-Dario Rembe *†, Verena Koester and Ewa K. Stuermer

Institute for Translational Wound Research, Centre for Biomedical Education and Research (ZBAF), Witten/Herdecke University, Witten, Germany

*Corresponding author. Tel: +49 (0) 2 30 2-9 26 31 6; E-mail: julian-dario.rembe@uni-wh.de  orcid.org/0000-0002-5176-6941

†Considered equal first authors.

Received 9 July 2018; returned 17 August 2018; revised 13 September 2018; accepted 26 September 2018

Hintergrund: Wundspüllösungen aus Natriumhypochlorit (NaClO, SHC)/hypochlorige Säure (HClO, HCA) haben eine Renaissance in der Prävention und Behandlung von niedriggradigen Wundinfektionen erlebt. Sie weisen eine geringere Zytotoxizität auf und haben daher in der täglichen klinischen Praxis zunehmend an Bedeutung gewonnen.

Ziele: Es sollten die Zytotoxizität und antimikrobielle Wirksamkeit von sechs NaClO/HClO-Wundspüllösungen bestimmt werden.

Methoden: Für die Zytotoxizitätsbewertung (basierend auf DIN EN 10993-5) wurden humane Keratinozyten (HaCaT) und humane Hautfibroblasten (BJ) verwendet. *Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa* wurden zur Beurteilung der antimikrobiellen Wirksamkeit eingesetzt (basierend auf DIN EN 13727). Die Lösungen wurden nach 1, 5 und 15 Min. Exposition bewertet. Zusätzlich wurden physikalisch-chemische Eigenschaften (pH- und Oxidationsreduktionspotentialwerte) untersucht.

Ergebnisse: Die Wirksamkeit und Zytotoxizität variierten signifikant zwischen den Lösungen. Im Allgemeinen war die Erhöhung der antimikrobiellen Aktivität mit einer Verringerung der Zellebensfähigkeit verbunden. Darüber hinaus wurde eine konzentrations- und zeitabhängige Wirkung auf Krankheitserreger und Zellen beobachtet: Die zytotoxische und antimikrobielle Aktivität nahm mit zunehmender NaClO/HClO-Lösungskonzentration und längeren Expositionszeiten zu. Basierend auf diesen *in vitro* Bewertungen wurde das folgende Ranking (niedrigste bis höchste mikrobizide und zytotoxische Wirkung) ermittelt: Microdacyn60® (SHC/HCA-M) < Granudacyn® (SHC/HCA-G) < Veriforte™ (SHC/HCA-V) < KerraSol™ (SHC-K) < Lavanox® (SHC-L) << ActiMaris® forte (SHC/SM-A).

Schlussfolgerungen: Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass mikrobizide Effekte fast immer mit bestimmten negativen Auswirkungen auf die Zellproliferation verbunden sind. Die Wirksamkeit und Biokompatibilität von NaClO/HClO-Lösungen hängt von ihrer spezifischen Formulierung und ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften ab. Die Untersuchungen unterstreichen auch die Notwendigkeit genauer produkt- und anwendungsspezifischer Wirksamkeitsprofile.

Einführung:

Wundinfektionen und die Entwicklung mikrobieller Biofilme stellen eine ernsthafte Bedrohung für den Wundheilungsprozess dar. Während die alleinige Besiedlung einer Wunde mit Mikroorganismen, die nur begrenzt vermehrt werden, in der Regel nicht zu einer Wirtsreaktion führt, kann eine Erhöhung der Keimzahl, Diversität, Virulenz und Durchdringung tieferer Gewebestufen zu lokalen Infektionen, Gewebeschäden und verzögerter Heilung führen.¹⁻³ So kommt es häufig zu Infektionen sowohl bei chronischen als auch bei akuten Wunden, wie z.B. Infektionen bei Operationswunden (SSI = «surgical site infection»), die schwerwiegende Folgen wie Heilungsstörungen, verlängerte Behandlungszeiten, verminderte Lebensqualität und finanzielle Belastung des Gesundheitssystems haben. Bis zu 8% der chirurgischen Patienten entwickeln postoperative SSIs, die im Durchschnitt ~20% aller im Krankenhaus erworbenen Infektionen in Europa ausmachen (je nach Untersuchungsgebiet zwischen 15,0% in Großbritannien und 29,0% in Spanien).⁴⁻⁶ Bei chronischen Wundinfektionen ist insbesondere die Biofilmbildung ein relevanter Faktor, der bei ~78,2% aller chronischen Wunden auftritt.⁷

Im Allgemeinen ist ein ganzheitlicher Ansatz zur Behandlung von Wundinfektionen erforderlich, und die lokale Reinigung mit Spüllösungen und Antiseptika ist ein wichtiger therapeutischer Aspekt.^{8,9} Im Laufe der Jahre wurden mehrere antimikrobielle Mittel entwickelt, von denen Octenidindihydrochlorid, Polyhexanid und Povidonjod (PVP-I) die gängigsten Mittel sind.⁸ Dennoch wird weiterhin nach alternativen Spüllösungen und antimikrobiellen Mitteln mit einer günstigeren Biokompatibilität gesucht.¹⁰⁻¹³

Eine seit einiger Zeit bekannte Wirkstoffgruppe erlebt derzeit eine Renaissance: chlorhaltige und -freisetzende Wirkstoffe [Natriumhypochlorit (NaClO), hypochlorige Säure (HClO) und Hypochlorit (OCI⁻); Abbildung 1]. Diese Mittel werden durch Elektrolyse von Natriumchlorid (NaCl) in Wasser sowie vergleichbare elektrochemische Prozesse hergestellt. Kurz zusammengefasst wird elektrischer Strom angewandt, der eine Redoxreaktion der chemischen Substanzen und damit die Umwandlung in NaClO und HClO bewirkt.¹⁴ Ähnliche Mittel, oft mit nur geringen Schwankungen in der chemischen Zusammensetzung oder im Herstellungsprozess, sind elektrolysiertes Wasser¹⁴, superoxidiertes Wasser^{15,16} und säureoxidierende Lösung.¹⁷ Ihre allgemeine antimikrobielle Wirk-

samkeit wurde bereits beschrieben,¹⁸⁻²⁵ und HClO ist als endogene bakterizide Substanz aus dem angeborenen Immunsystem des Menschen bekannt, die insbesondere von Neutrophilen durch Umwandlung von H₂O₂ durch das Enzym Myeloperoxidase während des Abwehrmechanismus, der als „oxidativer Burst“ bekannt ist, erzeugt wird.²⁶

In der Vergangenheit standen diese Lösungen vor einem Problem hinsichtlich Stabilität und Haltbarkeit, das zu einem schnellen Verlust der Wirksamkeit führte. In jüngster Zeit ist es möglich geworden, die Produktion zu optimieren, um eine längere Haltbarkeit zu erreichen, was die Lösungen zu einem kostengünstigen, leicht zu produzierenden und angeblich wirksamen, biokompatiblen Mittel in der antimikrobiellen Behandlung macht. Dennoch basieren die behaupteten Effekte und die Biokompatibilität neu eingeführter NaClO/HClO-Produkte hauptsächlich auf Ergebnissen, die mit zuvor verfügbaren Lösungen erzielt und auf neuere Formulierungen hochgerechnet wurden. Eine kritische Bewertung ihrer spezifischen Wirksamkeit und Toxizität fehlt.

Daher zielte diese Studie darauf ab, solche Bewertungen von sechs neu eingeführten NaClO/HClO-Wundspüllösungen für gängige Wundpathogene (*Staphylococcus aureus* und *Pseudomonas aeruginosa*) sowie Fibrillen der menschlichen Haut (BJ-Zellen) und Keratinozyten (HaCaT-Zellen) zu liefern.

Materialien und Verfahren

Herstellung von Wundspüllösungen

Sechs Wundspüllösungen auf Basis von Natriumhypochlorit (SHC) allein, kombiniert mit hypochloriger Säure (HCA) oder Meersalz (sal maris; SM) wurden untersucht (Tabelle 1): Lavanox® (SHC-L), KerraSol™ (SHC-K), Veriforte™ (SHC/HCA-V), Microdacyn60® (SHC/HCA-M), Granudacyn® (SHC/HCA-G) und ActiMaris® Forte (SHC/SM-A). NaClO/HClO-Lösungen wurden in doppelt destilliertem H₂O verdünnt, um den pH-Wert des Produkts zu erhalten. Zusätzlich wurden *in vitro* Zellkultur-Assays verwendet, ein konzentriertes Medium bestehend aus 10% 10× DMEM (Biochrom, Berlin, Deutschland), 10% FBS (PAN-Biotech, Aidenbach, Deutschland) und 580 mg/L L-Glutamin (Biochrom, Berlin, Deutschland) (wie in DIN EN ISO 10993-5 empfohlen²⁷). Vorverdünnte NaClO/HClO-Lösungen wurden dem konzentrierten DMEM/FBS/L-Glutamin-Gemisch zugesetzt, so dass Endkonzentrationen von 75%, 50%, 25% und 10% (v/v) erreicht wurden.

Testorganismen, Zelllinien und Nährstofflösungen

Für Zellkultur-Tests wurden humane Keratinozyten [HaCaT; Cell Line Service (CLS), Eppelheim, Deutschland] und humane Hautfibroblasten (BJ, CRL-2522™; ATCC®, Manassas, VA, USA) verwendet. Beide Zelllinien wurden in DMEM kultiviert und mit 10% FBS, 1 ng/ml basischem Fibroblasten-Wachstumsfaktor, 1 ng/ml epidermale Wachstumsfaktor (alle von Pan-Biotech, Aidenbach, Deutschland) und 1% Penicillin/Streptomycin (Biochrom, Berlin, Deutschland) unter feuchten Bedingungen mit 5% CO₂ bei 37°C versehen.

Für antimikrobielle Wirksamkeitstests wurden *S. aureus* (DSM-799) und *P. aeruginosa* (DSM-2146, beide DSMZ, Braunschweig, Deutschland) nach Standardprotokollen in steriler Casein/Soja-Pepton-Brühe (CSB) und auf Casein/Soja-Pepton-Agar-Platten (CSA) kultiviert.

Zytotoxizitätstest

In dieser Studie wurde ein anwendungsorientiertes, modifiziertes Prüfverfahren auf Basis der DIN EN 10993-5²⁷ mit kurzen Expositionszeiten von 1, 5 und 15 Min. je nach klinischer Anwendung durchgeführt. Die Zytotoxizität wurde mit einem XTT-Assay untersucht (CellTiter 96® AQ Proliferation Assay; Promega, Mannheim, Deutschland). Kurz zusammengefasst wurden die Zellen auf 96-Well-Zellkulturplatten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit einer Dichte von 7500 (BJ-Fibroblasten) oder 30000 Zellen/Well (HaCaT-Keratinozyten) aufgebracht, um nach 24 Stunden Inkubation mit 5% CO₂ bei 37°C eine Konfluenz von ~90% zu erreichen. Anschliessend wurde das Kulturmedium durch 100 µL/Well

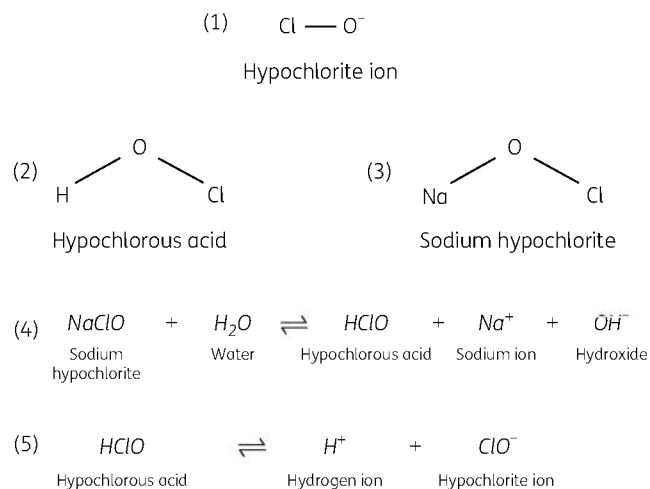


Abbildung 1. Wichtigste chemische Strukturen und Reaktionen. Strukturformeln von Hypochlorit [ClO^- ; (1)], hypochloriger Säure [HClO ; (2)] und Natriumhypochlorit [NaClO ; (3)] sowie relevante chemische Reaktionen in wässrigen Lösungen. (4) Aufspaltung von Natriumhypochlorit (NaClO) zu hypochloriger Säure (HClO), Natrium (Na^+) und Hydroxid (OH^-) in Wasser (H_2O). (5) Gleichgewichtsreaktion von hypochloriger Säure (HClO) zu Wasserstoff (H^+) und Hypochlorit (ClO^-) in Abhängigkeit vom pH-Wert.

der vorbereiteten Test-Verdünnungslösungen ersetzt. Um den Einfluss der unterschiedlichen pH-Werte der NaClO/HClO-Lösungen zu erhalten, wurden Experimente ohne Pufferlösung durchgeführt. Nach dem Spülen mit PBS, wurde jedem Well 100 µL des XTT-Testreagens zugegeben und die Zellen für 4 h unter den beschriebenen Bedingungen inkubiert. Mit einem Mikroplattenleser (EON™; BioTek Instruments, VT, USA) wurde der Prozentsatz der überlebenden Zellen im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle durch Messung der Absorption jeder Probe bei 490 nm ermittelt.

Antimikrobieller Wirksamkeitsnachweis

Die antimikrobielle Wirksamkeit der NaClO/HClO-Lösungen wurde durch eine quantitative Suspensionsmethode nach DIN EN 13727²⁸ ohne organische Belastung bewertet. Die Suspensionen der bakteriellen Tests wurden auf den 0,5 McFarland-Standard ($\sim 1.5 \times 10^8$ cfu/mL) angepasst. Kurz zusammengefasst wurden 100 µL der bakteriellen Testsuspension zu 900 µL der NaClO/HClO-Verdünnungslösungen (100%, 75%, 50%, 25% und 10%) hinzugefügt. Nach 1, 5 und 15 Min. Exposition wurden 100 µL der Mischung für 5 Min. in 900 µL der Neutralisationslösung überführt, um die antimikrobielle Aktivität zu stoppen. Die Neutralisationslösung bestand aus 3 g/L Natriumthiosulfat, 30 g/L Polysorbat 80 (Tween 80) und 3 g/L Lecithin (alle von Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland). Anschliessend wurde die neutralisierte Testsuspension seriell 10-fach verdünnt und 50 µL von jedem Verdünnungsschritt auf CSA aufgebracht und über Nacht bei 37°C unter aeroben Bedingungen inkubiert. Überlebende Mikroorganismen wurden mit einem Koloniezähler mit Pen (Heathrow Scientific®, Vernon Hills, IL, USA) gezählt (in cfu/mL).

Physikalisch-chemische Parameter

Zusätzlich wurden relevante physikalisch-chemische Parameter wie pH-Wert und Oxidations-Reduktionspotenzial (ORP) der getesteten NaClO/HClO-Lösungen bewertet; die pH-Werte der Produkte und deren Verdünnungen wurden mit einem pH-Meter (pH110; VWR, Darmstadt, Deutschland) gemessen. Das ORP wurde mit einer Redox-Elektrode (SenTix® ORP; alle von WTW, Xylem Analytics, Weilheim, Deutschland) bewertet.

Table 1. Product information and physicochemical properties of the tested NaClO/HClO solutions

Product	Manufacturer	Durability (months)	Composition	MDC	pH (mean \pm SD)	Total chlorine (ppm)	ORP (mV)
Lavanox [®] (SHC-L)	Serag Wiessner GmbH & Co KG, Germany	3	H ₂ O, <0.08% NaClO	IIa	8.60 \pm 0.09	670	806
KerraSol [™] (SHC-K)	Crawford Healthcare GmbH, Germany	3	H ₂ O, <0.08% NaClO	IIa	8.76 \pm 0.53	690	761
Veriforte [™] (SHC/HCA-V)	Mediset Clinical Products GmbH, Germany	2	H ₂ O, NaCl, NaClO and HClO	I Ib	6.52 \pm 0.17	93	882
Microdacyn60 [®] (SHC/HCA-M)	Bamboo Health Care GmbH, Germany	2–3	H ₂ O, NaCl, NaClO and HClO	I Ib	6.88 \pm 0.23	80	857
Granudacyn [®] (SHC/HCA-G)	SastoMed GmbH, Germany	2	H ₂ O, NaCl, NaClO and HClO	I Ib	6.78 \pm 0.14	105	874
ActiMaris [®] Forte (SHC/SM-A)	ActiMaris AG, Germany, Switzerland	3	H ₂ O, 3% sal maris, 0.2% NaClO	I Ib	9.51 \pm 0.18	1315	747

Information regarding durability, composition and European Union medical device classification (MDC) was obtained from the manufacturer. pH and ORP values were determined continuously during experiments; total chlorine content is based on data received from the manufacturer or reported evaluations.^{4,3}

Statistische Auswertung

Für alle Experimente wurden Mittelwerte \pm SA aus Tripelzahlen berechnet und Differenzen bei $P < 0,05$ als statistisch signifikant berücksichtigt. Für alle getesteten NaClO/HClO-Lösungen wurden mikrobielle Reduktionsraten berechnet (in $\Delta \log_{10}$ cfu/mL). Eine hohe antimikrobielle Wirksamkeit (Reduzierung der anfänglichen Keimzahlen um 99,999%) wurde durch eine Reduktion von mindestens 5 \log_{10} innerhalb von 1 Min. gemäss DIN EN 13727 nachgewiesen.²⁸

Die zytotoxische Wirkung, basierend auf der Zellviabilität, wurde nach der in DIN EN 10993-5²⁷ festgelegten Zytotoxizitätsskala bewertet. In dieser Skala werden die Zellproliferationsraten in Bezug auf die Negativkontrolle (100%) festgelegt und in vier Zytotoxizitätsstufen eingeteilt: 100%-81% gelten als nicht zytotoxisch (Grad 0), 80%-71% als schwach zytotoxisch (Grad 1), 70%-61% als mässig zytotoxisch (Grad 2) und $\leq 60\%$ als hoch zytotoxisch (Grad 3).

Statistische Auswertungen der antimikrobiellen Wirksamkeit und zytotoxischen Wirkung, die sowohl zwischen den Testlösungen als auch mit einer Kontrolle verglichen wurden, wurden mittels Varianzanalyse mit einem Tukey's HSD-Test als *Post-Hoc*-Analyse für Mehrfachvergleiche mit dem Statistik-Paket GraphPad PRISM (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

Ergebnisse

Zytotoxizität

SHC/HCA-V, -M und -G (Abbildungen 2b, d, e und 3b, d und e) zeigten innerhalb von 15 Min. nach der Exposition keine Zytotoxizität für menschliche Keratinozyten (HaCaT) und Hautfibroblasten (BJ), während die übrigen Lösungen (SHC-L, SHC-K und SHC/SM-A) teilweise eine erhöhte zytotoxische Wirkung aufwiesen.

Innerhalb der ersten Minute zeigte keine getestete SHC-L Konzentration eine zytotoxische Wirkung (Abbildungen 2a und 3a). Nach 5 Minuten verursachte die 75% SHC-L Konzentration eine schwache Zytotoxizität bei HaCaT-Zellen und eine starke Zytotoxizität bei Fibroblasten (30% Proliferationsreduktion; $P \leq 0.0001$; Abbildung 3a). Mit zunehmender Exposition (15 Min.) verursachten höhere SHC-L Konzentrationen (50% und 75%) Zytotoxizität Grad 3 in beiden Zelllinien (signifikante Abnahme der Proliferation auf 60% und 39% bei Keratinozyten und 17% und 13% bei Fibroblasten; Abbildungen 2a und 3a).

SHC-K zeigte eine deutlich geringere Zytotoxizität im Vergleich zu SHC-L ($P \leq 0.0001$; Abbildungen 2c und 3c): Mit Ausnahme von 75% SHC-K, das Zytotoxizität Grad 2 bei Fibroblasten verursacht, konnten innerhalb von 5 Min. nach der Exposition keine negativen Auswirkungen beobachtet werden. Nach 15 Min. zeigte die 75% SHC-K Konzentration eine moderate Zy-

totoxizität in HaCaT-Zellen und eine starke Zytotoxizität bei Fibroblasten, während andere getestete Konzentrationen wiederum keine negativen Auswirkungen aufwiesen ($P \leq 0.0001$; Abbildungen 2c und 3c).

SHC/SM-A zeigte die höchste Zytotoxizität aller getesteten Lösungen ($P \leq 0.0001$; Abbildungen 2f und 3f). Als besonders anfällig erwiesen sich Fibroblasten: innerhalb von 1 Min. verursachte eine 25% SHC/SM-A Konzentration eine moderate Zytotoxizität, während 50% und 75% SHC/SM-A Konzentration eine Zytotoxizität der Stufe 3 aufwiesen, wobei die Proliferationsraten für jede getestete Konzentration im Laufe der Zeit weiter abnahmen ($P \leq 0.0001$; Abbildung 3f). Keratinozyten erwiesen sich als weniger anfällig als Fibroblasten und zeigten innerhalb der ersten Minute der Exposition keine zytotoxische Wirkung für eine getestete Konzentration. Eine längere Exposition verursachte jedoch auch Zytotoxizität Grad 3 (5 Min. für 75% und 15 Min. für 50% SHC/SM-A; $P \leq 0.0001$), während bei 25% SHC/SM-A die Zytotoxizität Grad 2 nicht überschritt.

Antimikrobielle Wirksamkeit

Die unverdünnte SHC/SM-A (100%) Lösung erreichte - sowohl gegen getestete Mikroorganismen als auch in einer Konzentration von 75% gegenüber *S. aureus* - innerhalb von 1 Min. $> 5 \log_{10}$ Reduktionsphasen (definiert für Antiseptika in DIN EN 13727). Mit Ausnahme der niedrigsten Konzentration (10%) erzielten alle getesteten SHC/SM-A Konzentrationen innerhalb von 15 Min. eine starke antimikrobielle Wirkung gegen beide getesteten Mikroben; Konzentrationen von $\geq 50\%$ führten innerhalb von 5 Min. zu einer vollständigen Eliminierung (Abbildungen 4f und 5f).

SHC-L und SHC-K zeigten beide ebenfalls starke mikrobizide Effekte, brauchten aber mindestens 5 Min., um die erforderliche Reduktion von $> 5 \log_{10}$ zu erreichen. Insgesamt zeigten SHC-L und SHC-K ähnliche Ergebnisse an beiden getesteten Bakterien (Abb. 4a, c und 5a, c): Unverdünt gelang es beiden Lösungen, beide getesteten Krankheitserreger innerhalb von 5 Min. vollständig zu eliminieren, während eine Konzentration von 75% längere Expositionszeiten erforderte und nur *P. aeruginosa* vollständig eliminieren konnte. Obwohl eine 50%ige Konzentration beider Lösungen eine $> 5 \log_{10}$ Reduktion gegenüber *P. aeruginosa* erreichte, zeigte die 50% SHC-K Konzentration im Gegensatz zu SHC-L ($P \leq 0.0001$) keinen Einfluss auf *S. aureus*.

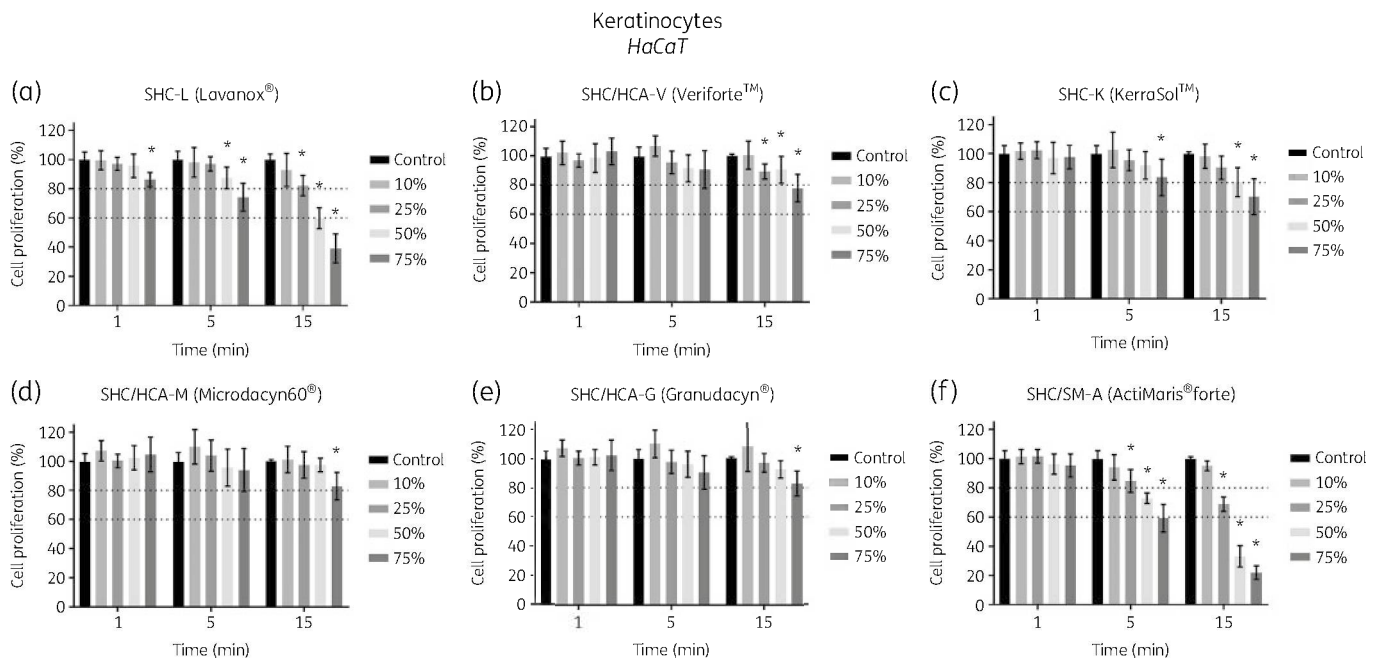


Abbildung 2. Zytotoxizität der getesteten NaClO/HClO-Wundspüllösungen gegenüber Keratinozyten (HaCaT-Zellen). Zellproliferationsraten von HaCaT-Zellen, die mit den verschiedenen Wundspüllösungen (a-f) und deren jeweiligen Konzentrationen (10%-75%) nach 1, 5 und 15 Min. Exposition behandelt wurden. Die gestrichelten Linien zeigen Zytotoxizitätsschwellenwerte an; die obere Linie stellt die Grenze zu nicht-zytotoxisch (>81%) und die untere Linie die Grenze zu stark zytotoxisch (<60%) dar. Die Werte werden als Prozentsatz im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle und als Mittelwert ± SA ausgedrückt (* $P \leq 0.05$ gegenüber unbehandelter Kontrolle).

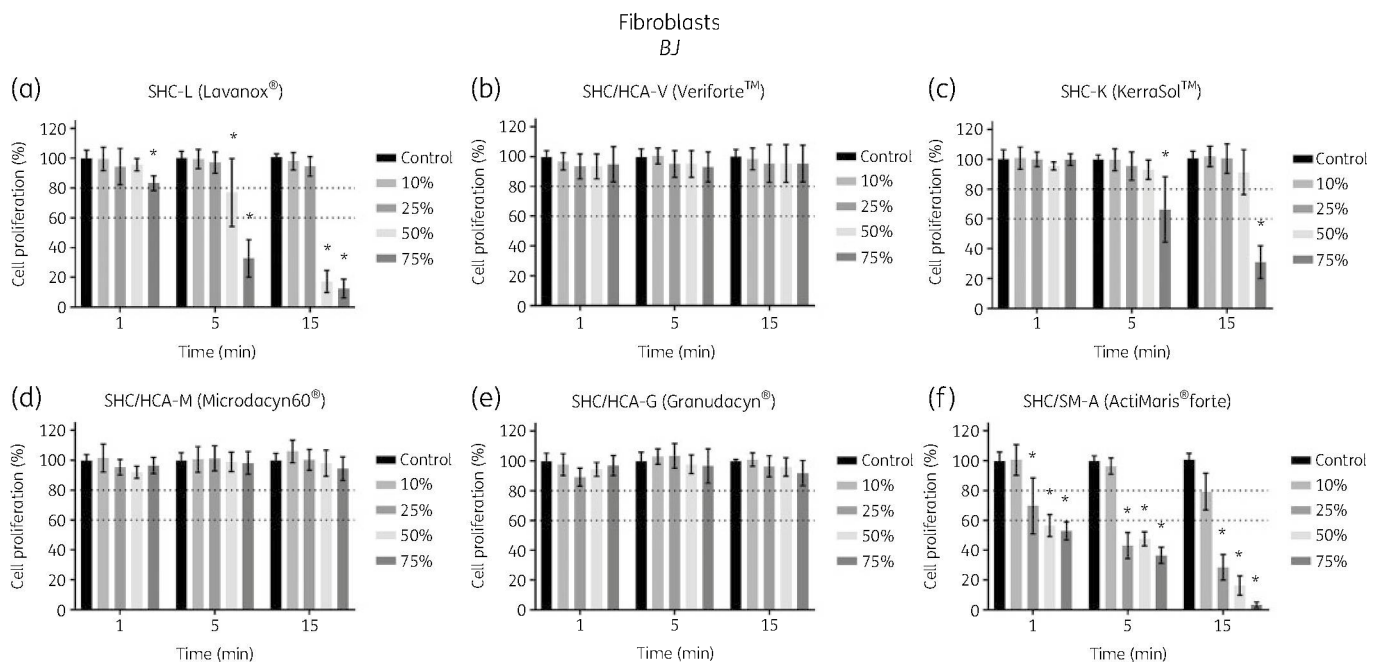


Abbildung 3. Zytotoxizität der getesteten NaClO/HClO-Wundspüllösungen gegenüber Hautfibroblasten (BJ-Zellen). Zellproliferationsraten von BJ-Zellen, die mit den verschiedenen Wundspüllösungen (a-f) und deren jeweiligen Konzentrationen (10%-75%) nach 1, 5 und 15 Min. Exposition behandelt wurden. Die gestrichelten Linien zeigen Zytotoxizitätsschwellenwerte an; die obere Linie stellt die Grenze zu nicht-zytotoxisch (>81%) und die untere Linie die Grenze zu stark zytotoxisch (<60%) dar. Die Werte werden als Prozentsatz im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle und als Mittelwert ± SA ausgedrückt (* $P \leq 0.05$ gegenüber unbehandelter Kontrolle).

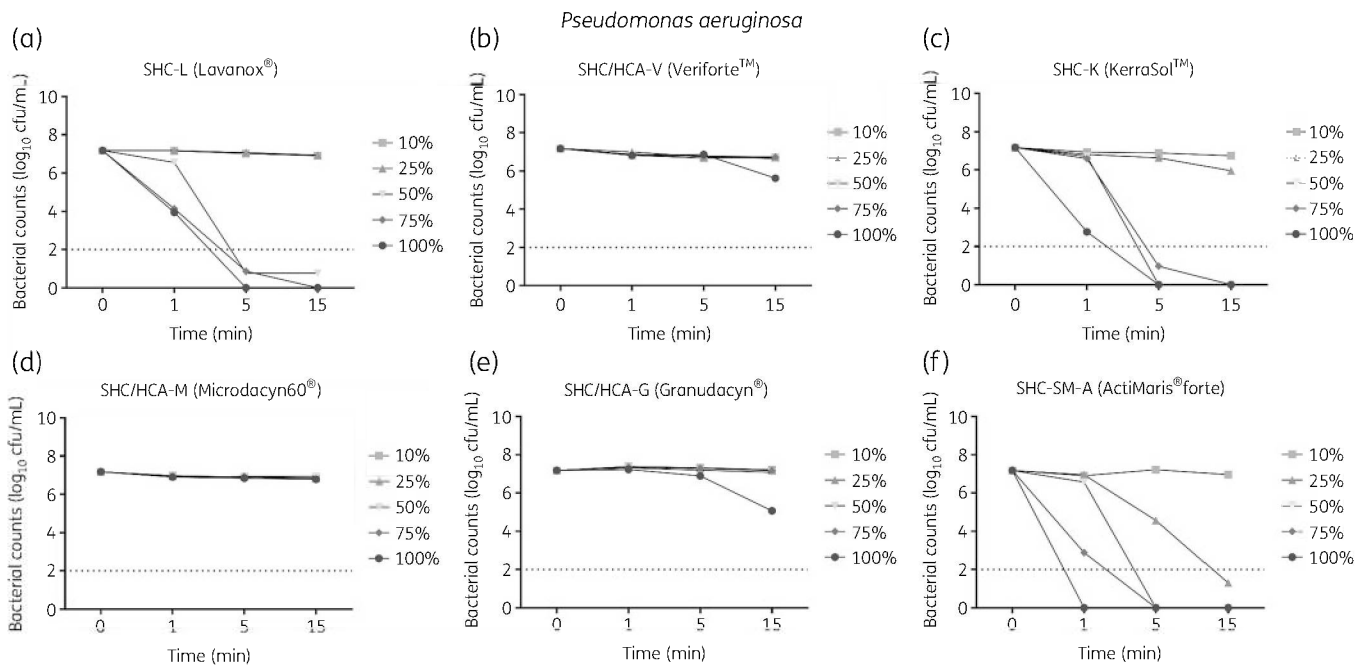


Abbildung 4. Time-Kill-Kurven der getesteten NaClO/HClO-Wundspüllösungen gegenüber *P. aeruginosa*. Reduzierung der Keimzahlen (in \log_{10} cfu/mL) im Laufe der Zeit (1, 5 und 15 Min.) für alle getesteten Wundspüllösungen (a-f) und deren jeweilige Konzentrationen (10%-100%). Die gestrichelte Linie stellt eine Reduzierung von >5 log-Phasen dar (hohe antimikrobielle Wirkung).

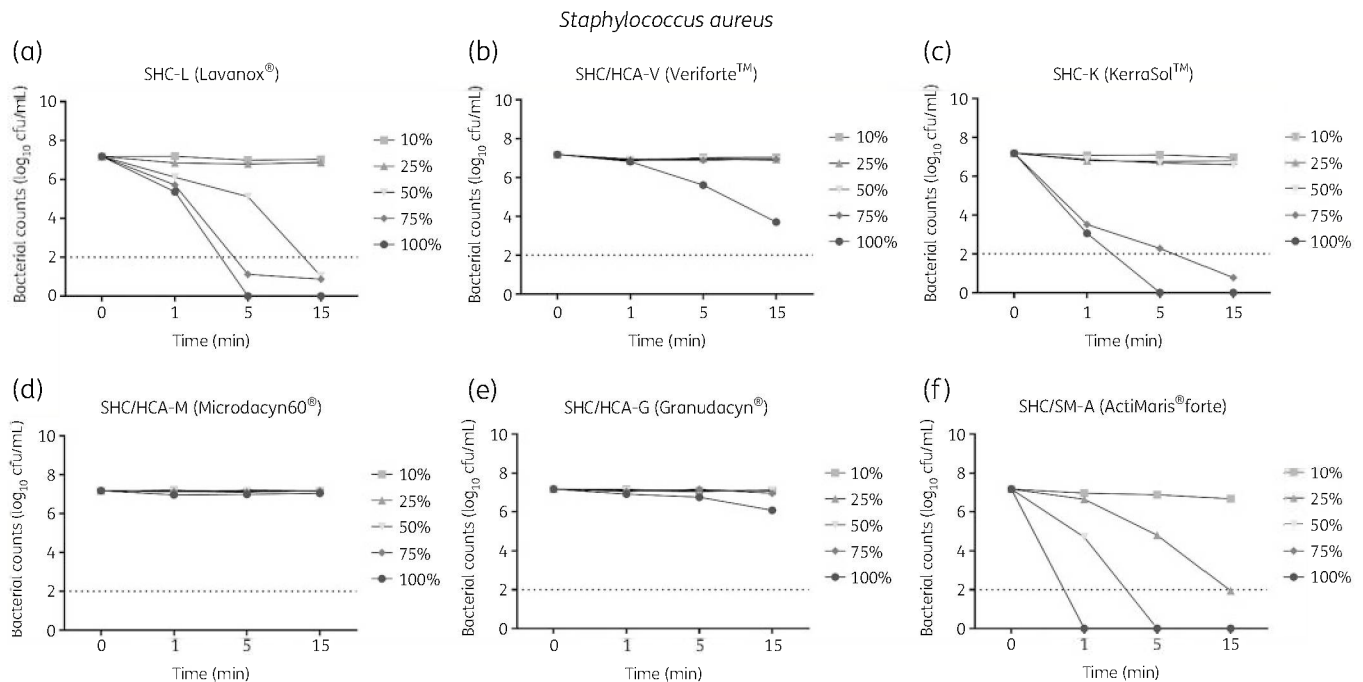


Abbildung 5. Time-Kill-Kurven der getesteten NaClO/HClO-Wundspüllösungen gegenüber *S. aureus*. Reduzierung der Keimzahlen (in \log_{10} cfu/mL) im Laufe der Zeit (1, 5 und 15 Min.) für alle getesteten Wundspüllösungen (a-f) und deren jeweilige Konzentrationen (10%-100%). Die gestrichelte Linie stellt eine Reduzierung von >5 log-Phasen dar (hohe antimikrobielle Wirkung).

Für SHC/HCA-V, -M und -G konnte keine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen werden, mit Ausnahme einer geringen antimikrobiellen Aktivität des unverdünnten SHC/HCA-V gegenüber *S. aureus* und SHC/HCA-G gegenüber *P. aeruginosa* nach 15 Min. (beide $\sim 3 \log_{10}$ Reduktion; Abb. 4b, d, e und 5b, d, e).

Im Vergleich der unverdünnten Lösungen zeigte SHC/SM-A eine signifikant schnellere mikrobizide Wirkung als die anderen getesteten Lösungen ($P \leq 0.0001$). SHC-K zeigte innerhalb der ersten Minute eine signifikant stärkere Wirkung als SHC-L ($P \leq 0.05$), aber mit zunehmender Expositionszeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Wirksam-

keit festgestellt werden. SHC/HCA-V, -M und -G erwiesen sich im Allgemeinen als deutlich weniger wirksam ($P \leq 0.0001$).

Physikalisch-chemische Parameter

Drei der getesteten NaClO/HClO-Wundspüllösungen (SHC-L, SHC-K und SHC/SM-A) wiesen alkalische pH-Werte ($\text{pH} > 8$) auf, während für die übrigen Lösungen (SHC/HCA-V, -M und -G) leicht saure pH-Werte gemessen wurden ($\text{pH} 6,5-7,0$; Tabelle 1). In den ungepufferten Zellkulturexperimenten sanken die pH-Werte der Lösungen schrittweise (bei alkalischen Lösungen) oder stiegen (bei sauren Lösungen), was schliesslich zu einem physiologischen pH-Bereich führte ($\text{pH} 7,5-7,7$; Tabellen S2 und S3, verfügbar als ergänzende Daten unter JAC Online).

Die ORP-Werte der untersuchten Lösungen lagen im Allgemeinen zwischen 747 und 882 mV; diejenigen mit höherer antimikrobieller Wirksamkeit und zytotoxischer Wirkung zeigten niedrigere ORP-Werte (Tabellen 1 und S4).

Diskussion

Wundspüllösungen aus Natriumhypochlorit/Hypochlorsäure sind chlorhaltige und -freisetzende Mittel. Ihre Wirkung ergibt sich hauptsächlich aus den frei verfügbaren Chlorarten, die in einer Lösung bei Kontakt mit Wasser, organischem und anorganischem Material vorhanden sind und/oder gebildet werden. Die wichtigsten aktiven Chlorarten sind HClO und OCI^- ; das Verhältnis der vorherrschenden Chlorionenarten hängt vom pH-Wert und der Temperatur ab.^{26,29} NaClO wird unter Zugabe von Wasser unter Bildung von HClO hydrolysiert, das sich selbst teilweise in OCI^- und Wasserstoffionen (H^+) aufspaltet (Abbildung 1). Abhängig von pH-Wert, Temperatur und Lagerung wird ein Reaktionsgleichgewicht hergestellt, das ein bestimmtes Verhältnis der Chlorarten aufrechterhält.

Die untersuchten NaClO/HClO-Lösungen sind für die Wundspülung, Spülung und Reinigung von mässig infizierten Wunden und die allgemeine Prävention von Wundinfektionen bestimmt. Der Kontakt mit der Wunde sowie den vorhandenen mikrobiellen Krankheitserregern ist in der klinischen Praxis meist kurz, so dass kurze Expositionszeiten von 1, 5 und 15 Min. getestet wurden, um die klinische Anwendung adäquat nachzuahmen. Diese Expositionszeiten werden auch von den Herstellern empfohlen. Um den möglichen Einfluss der unterschiedlichen pH-Werte der Lösungen zu berücksichtigen, wurde in den Experimenten keine Pufferlösung verwendet (weitere Daten finden Sie in Tabelle S1).

Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eine indirekte proportionale Korrelation: Eine zunehmende antimikrobielle Wirkung ist mit einer abnehmenden Lebensfähigkeit von Keratinozyten und Fibroblasten verbunden. Folglich sind mikrobizide Effekte fast immer mit einem gewissen negativen Einfluss auf die Zellproliferation und -viabilität verbunden. Wie erwartet, konnte ein konzentrations- und zeitabhängiger Einfluss auf Mikroorganismen und Zellen beobachtet werden: Sowohl die zytotoxische als auch die mikrobizide Wirkung nahmen mit zunehmender Konzentration der NaClO/HClO-Lösungen und längeren Expositionszeiten zu. Darüber hinaus wurden signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Lösungen festgestellt. Es wurde keine relevante Zytotoxizität einer getesteten Konzentration von SHC/HCA-V, -M und -G beobachtet, was eine hohe Biokompatibilität bestätigt. Allerdings zeigten diese NaClO/HClO-Lösungen auch keine nennenswerte antimikrobielle Wirkung im Vergleich zu SHC-L, SHC-K und SHC/SM-A ($P \leq 0.0001$).

Von den untersuchten Lösungen war SHC/SM-A das wirksamste mikrobizide Mittel ($>5 \log_{10}$ Reduktion innerhalb von 1 Min.), mit einer Wirksamkeit, die mit der von etablierten Antiseptika wie Octenidindihydrochlorid, PVP-I und Polyhexanid vergleichbar ist.³⁰ In Bezug auf die Zytotoxizität zeigte SHC/SM-A den grössten negativen Effekt und verdeutlichte die untrennbare Beziehung zwischen mikrobizider und zytotoxischer Wirkung. Dennoch wurde für jede getestete SHC/SM-A-Konzentration innerhalb der ersten Minute der Exposition keine zytotoxische Wirkung auf Keratinozyten festgestellt, und innerhalb von

5 Min. wurde eine moderate (Grad 2) Zytotoxizität nicht überschritten. Daher weist SHC/SM-A ein ausgezeichnetes Gleichgewicht von positiven und negativen Effekten mit guter Biokompatibilität innerhalb von 5 Min. nach der Exposition auf (Abbildungen 2f, 4f und 5f). Bei Fibroblasten hingegen verursachte SHC/SM-A innerhalb von 1 Min. nach der Exposition einen starken negativen Einfluss (Abbildung 3f). Insgesamt blieben die Zellen unter der Behandlung mit SHC/SM-A deutlich lebensfähiger als mit etablierten Antiseptika in früheren Studien (0% für 10% Octenisept und 7,5% PVP-I; $<20\%$ für Polyhexanid).^{11,12}

SHC-L und SHC-K benötigten längere Expositionszeiten, um eine starke antimikrobielle Wirkung zu erzielen, verursachten aber deutlich weniger Zytotoxizität als SHC/SM-A ($P \leq 0.001$). Auch hier waren die Keratinozyten weniger anfällig, mit einem höchstens schwachen Einfluss (Grad 1) von SHC-L und keinem Einfluss von SHC-K innerhalb von 5 Min. Zu diesem Zeitpunkt hatten sowohl SHC-L als auch SHC-K jedoch bereits eine vollständige Zerstörung der beiden getesteten Krankheitserreger erreicht (Abbildungen 2a, c, 4a, c und 5a, c). Bei Fibroblasten wurde für beide Lösungen eine höhere zytotoxische Wirkung nachgewiesen, wobei SHC-L mit zunehmender Konzentration und Expositionszeit zytotoxischer war als SHC-K ($P \leq 0.0001$; Abbildung 3a, c). Insgesamt verursachten SHC-L und SHC-K in der vorliegenden Arbeit eine deutlich geringere Zytotoxizität als etablierte Antiseptika, wobei ähnliche mikrobizide Effekte erzielt wurden.^{11,12,30,31}

Mehrere frühere *In-vitro*-Studien zu NaClO, HClO und OCI^- , die ihre allgemeine Wirksamkeit untersuchten,^{18,20,26,29} berichteten von günstigen mikrobiziden Wirkungen gegen eine Vielzahl von Mikroben,³² während sie eine vergleichsweise geringe Zytotoxizität aufwiesen.^{8,33} Alle untersuchten Lösungen sind als Reinigungs- und Spüllösungen klassifiziert und eignen sich zur Dekontamination und Behandlung von akuten und chronischen Wunden.^{3,8} Darüber hinaus werden sie häufig als hochwirksam gegen Mikroben und nicht zytotoxisch für den Menschen beworben, da sie natürlich im angeborenen Immunsystem des Menschen vorkommen.^{26,34} Wie die vorgestellten Ergebnisse jedoch zeigen, ist eine sorgfältige Unterscheidung zwischen der allgemein berichteten Wirkung eines antimikrobiellen Mittels und der tatsächlichen Wirksamkeit eines Produkts auf der Grundlage eines solchen Mittels wichtig: Von sechs untersuchten Lösungen zeigte die Hälfte überhaupt keine relevante antimikrobielle Wirkung, während der Rest nicht als hochwirksam und ohne zytotoxische Nebenwirkungen nachgewiesen werden konnte. Diese Diskrepanzen ergeben sich aus den physikalisch-chemischen Eigenschaften der Lösungen. Obwohl alle diese Lösungen bestimmte Mengen an NaClO, HClO und/oder OCI^- enthalten, unterscheiden sie sich in Bezug auf Gesamtchlorgehalt, pH-Wert und ORP deutlich (Tabelle 1). Während HClO im Allgemeinen die stärkste mikrobizide Chlorart ist, hängt ihre Verfügbarkeit vom pH-Wert der Lösung ab: Bei einem pH-Wert von 4–6 ist HClO vorherrschend; bei steigendem pH-Wert wird mehr OCI^- gebildet, bis sich die beiden Arten in einem physiologischen pH-Bereich im Gleichgewicht befinden. Bei einem pH-Wert von $>8,5$ überschreitet OCI^- dann HClO.^{26,29} Durch die Verknüpfung des pH-Wertes mit der vorherrschenden Chlorart wird die Relevanz des ORP-Wertes deutlich: HClO und OCI^- sind starke Oxidationsmittel, die in einer Redoxreaktion ein hohes Interaktionspotenzial mit anderen Molekülen ausüben. Dies führt zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies wie Peroxiden (hauptsächlich Wasserstoffperoxid; H_2O_2), Superoxid (O_2^-), Hydroxylradikalen ($\cdot\text{OH}$) und Singlett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$),²⁹ Proteinoxidation,^{35–38} Oxidation von Lipiden in Zellmembranen/-wänden,³⁹ oxidative Enzymdeaktivierung^{40, 41} und DNA-Schäden.⁴² Je höher das Redoxpotential, desto höher der ORP-Wert; Lösungen mit hohem antimikrobiellem Potenzial liegen im Allgemeinen über 650 mV, wie dies bei allen untersuchten Lösungen der Fall war (Tabelle 1). Entgegen den Erwartungen korrelierten die ORP-Werte jedoch umgekehrt mit den antimikrobiellen und zytotoxischen Wirkungen: effektivere Lösungen zeigten niedrigere ORP-Werte. Wir gehen davon aus, dass dies dadurch erklärt werden kann, dass der Gesamtchlorgehalt wahrscheinlich die wichtigste physikalisch-chemische Eigenschaft der untersuchten NaClO/HClO-Lösungen ist. Das wirksamste Produkt, SHC/SM-A, hat den

höchsten Gehalt (1315 ppm), gefolgt von SHC-K und SHC-L (690 und 670 ppm), während SHC/HCA-V, -G und -M nur etwa 100 ppm enthalten (Tabelle 1). In Anbetracht der Tatsache, dass der ORP ein relatives Potenzial ist, kann eine Lösung ein höheres Redoxpotenzial, aber eine insgesamt geringere Nettoreaktionswirksamkeit aufweisen, da die absolute Menge an leicht verfügbaren reaktiven Spezies einfach nicht ausreicht. Auch die Lösungen ohne antimikrobielle Wirkung lagen in einen physiologischen pH-Wert (Tabelle 1), wobei weniger des reaktionsfähigeren und pH-abhängigeren HClO verfügbar ist und auch eine relativ hohe Zersetzungsrates des nicht dissoziierten HClO beschrieben wurde.²⁹

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die vorgestellten Untersuchungen signifikante Unterschiede zwischen bestimmten NaClO/HClO-basierten Lösungen aufzeigen. Ihre Wirksamkeit und Biokompatibilität hängt von spezifischen physikalisch-chemischen Eigenschaften, Konzentrationen und Expositionszeiten ab. Insbesondere die pH-Werte der Lösungen und der Gesamtchlorgehalt sind die Haupttreiber der Reaktivität. Basierend auf der bewerteten Zytotoxizität und mikrobiziden Wirksamkeit lassen sich die Lösungen wie folgt einordnen (niedrigste bis höchste mikrobizide Wirkung und zytotoxische Wirkung): Microdacyn60® (SHC/HCA-M) < Granudacyn® (SHC/HCA-G) < Veriforte™ (SHC/HCA-V) < KerraSol™ (SHC-K) < Lavanox® (SHC-L) << ActiMaris® Forte (SHC/SM-A). SHC/HCA-V, -G und -M können als nicht zytotoxisch und damit als biokompatible Spüllösungen betrachtet werden, jedoch ohne nachweisbare antimikrobielle Wirksamkeit basierend auf den *in vitro* präsentierten Ergebnissen. SHC/SM-A, SHC-L und SHC-K zeigten relevante mikrobizide Effekte bei gleichzeitiger Zytotoxizität (von 0 bis 3) in Keratinozyten und Fibroblasten in Abhängigkeit von Konzentration und Expositionszeit. Diese Untersuchungen verdeutlichen die Notwendigkeit genauer produkt- und anwendungsspezifischer Sicherheits- und Wirksamkeitsprofile von neu eingeführten Wundversorgungsprodukten, anstatt Ergebnisse aus ähnlichen Produkten zu extrapolieren.

Funding

This work was supported by the institution's general funds.

Transparency declarations

None to declare.

Supplementary data

Tables S1 to S4 [containing additional data regarding cytotoxicity evaluations strictly conducted according to DIN EN 10993-5 (24 h exposure and in a buffered test procedure), changes in pH value in buffered and unbuffered test procedures (for all tested dilutions) as well as ORP values and corresponding pH values] are available as [Supplementary data](#) at JAC Online.

References

- 1 Eberlein T, Assadian O. Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antiseptics and decontamination. *Skin Pharmacol Physiol* 2010; **23** Suppl: 45–51.
- 2 Siddiqui AR, Bernstein JM. Chronic wound infection: facts and controversies. *Clin Dermatol* 2010; **28**: 519–26.
- 3 IWII. International Wound Infection Institute—wound infection in clinical practice. *Wounds International* 2016. <https://www.woundsinternational.com/resources/details/iwii-wound-infection-clinical-practice>.
- 4 Zarb P, Coignard B, Griskeviciene J *et al*. The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. *Euro Surveill* 2012; **17**: pii=20316.
- 5 ESPAUR. *English Surveillance Programme for Antimicrobial Utilisation and Resistance (ESPAUR)—Report 2017*. 2017. https://assets.publishing.service.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/656611/ESPAUR_report_2017.pdf.
- 6 NRZ. [German National Point-Prevalence Survey on Nosocomial Infections and Antibiotic Utilisation 2016]. 2016. https://www.nrz-hygiene.de/fileadmin/nrz/download/pps2016/PPS_2016_Abschlussbericht_20.07.2017.pdf.
- 7 Malone M, Bjarnsholt T, McBain AJ *et al*. The prevalence of biofilms in chronic wounds: a systematic review and meta-analysis of published data. *J Wound Care* 2017; **26**: 20–5.
- 8 Kramer A, Dissemmond J, Kim S *et al*. Consensus on wound antiseptics: update 2018. *Skin Pharmacol Physiol* 2018; **31**: 28–58.
- 9 Schultz G, Bjarnsholt T, James GA *et al*. Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair Regen* 2017; **25**: 744–57.
- 10 Rembe JD, Fromm-Dornieden C, Schafer N *et al*. Comparing two polymeric biguanides: chemical distinction, antiseptic efficacy and cytotoxicity of polyaminopropyl biguanide and polyhexamethylene biguanide. *J Med Microbiol* 2016; **65**: 867–76.
- 11 Hirsch T, Koerber A, Jacobsen F *et al*. Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics *in vitro*. *J Surg Res* 2010; **164**: 344–50.
- 12 Hirsch T, Seipp HM, Jacobsen F *et al*. Antiseptics in surgery. *Eplasty* 2010; **10**: e39.
- 13 Lachapelle JM. A comparison of the irritant and allergic properties of antiseptics. *Eur J Dermatol* 2014; **24**: 3–9.
- 14 Thorn RM, Lee SW, Robinson GM *et al*. Electrochemically activated solutions: evidence for antimicrobial efficacy and applications in healthcare environments. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; **31**: 641–53.
- 15 Eftekarizadeh F, Dehnavieh R, Noori Hekmat S *et al*. Health technology assessment on super oxidized water for treatment of chronic wounds. *Med J Islam Repub Iran* 2016; **30**: 384.
- 16 Tanaka H, Hirakata Y, Kaku M *et al*. Antimicrobial activity of superoxidized water. *J Hosp Infect* 1996; **34**: 43–9.
- 17 D'Atanasio N, Capezzone de Joannon A, Mangano G *et al*. A new acid-oxidizing solution: assessment of its role on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) biofilm morphological changes. *Wounds* 2015; **27**: 265–73.
- 18 Chang B, Nerandzic MM, Kundrapu S *et al*. Efficacy of dilute hypochlorite solutions and an electrochemically activated saline solution containing hypochlorous acid for disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a pig skin model. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; **34**: 1231–3.
- 19 Chittoria RK, Yootla M, Sampatrao LM *et al*. The role of super oxidized solution in the management of diabetic foot ulcer: our experience. *Nepal Med Coll J* 2007; **9**: 125–8.
- 20 DeQueiroz GA, Day DF. Antimicrobial activity and effectiveness of a combination of sodium hypochlorite and hydrogen peroxide in killing and

- removing *Pseudomonas aeruginosa* biofilms from surfaces. *J Appl Microbiol* 2007; **103**: 794–802.
- 21** Dharap SB, Ghag GS, Kulkarni KP et al. Efficacy and safety of oxum in treatment of the venous ulcer. *J Indian Med Assoc* 2008; **106**: 3268–30.
- 22** Hadi SF, Khaliq T, Bilal N et al. Treating infected diabetic wounds with superoxidized water as anti-septic agent: a preliminary experience. *J Coll Physicians Surg Pak* 2007; **17**: 740–3.
- 23** Johani K, Malone M, Jensen SO et al. Evaluation of short exposure times of antimicrobial wound solutions against microbial biofilms: from in vitro to in vivo. *J Antimicrob Chemother* 2018; **73**: 494–502.
- 24** Kammerlander G, Assadian O, Eberlein T et al. A clinical evaluation of the efficacy and safety of singlet oxygen in cleansing and disinfecting stagnating wounds. *J Wound Care* 2011; **20**: 149–50, 52, 54 passim.
- 25** Robson MC, Payne WG, Ko F et al. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part II. Stabilized hypochlorous acid: its role in decreasing tissue bacterial bioburden and overcoming the inhibition of infection on wound healing. *J Burns Wounds* 2007; **6**: e6.
- 26** Wang L, Bassiri M, Najafi R et al. Hypochlorous acid as a potential wound care agent: part I. Stabilized hypochlorous acid: a component of the inorganic armamentarium of innate immunity. *J Burns Wounds* 2007; **6**: e5.
- 27** DIN. EN ISO 10993-5: 2009—*Biological Evaluation of Medical Devices—Part 5: Tests for in vitro Cytotoxicity (ISO 10993-5: 2009); German Version*. 2009.
- 28** DIN. EN 13727: 2012+A1: 2013—*Chemical Disinfectants and Antiseptics—Quantitative Suspension Test for the Evaluation of Bactericidal Activity in the Medical Area—Test Method and Requirements (Phase 2, Step 1); German Version*. 2013.
- 29** Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci* 2006; **11**: 147–57.
- 30** Koburger T, Hubner NO, Braun M et al. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1712–9.
- 31** Muller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 1281–7.
- 32** Aggarwal R, Goel N, Chaudhary U et al. Evaluation of microbiocidal activity of superoxidized water on hospital isolates. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; **53**: 757–9.
- 33** Gonzalez-Espinosa D, Perez-Romano L, Guzman-Soriano B et al. Effects of pH-neutral, super-oxidised solution on human dermal fibroblasts in vitro. *Int Wound J* 2007; **4**: 241–50.
- 34** Weiss SJ, Lampert MB, Test ST. Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. *Science* 1983; **222**: 625–8.
- 35** Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced damage to proteins: formation of nitrogen-centred radicals from lysine residues and their role in protein fragmentation. *Biochem J* 1998; **332**: 617–25.
- 36** Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorite-induced oxidation of proteins in plasma: formation of chloramines and nitrogen-centred radicals and their role in protein fragmentation. *Biochem J* 1999; **340**: 539–48.
- 37** Hazell LJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein with hypochlorite causes transformation of the lipoprotein into a high-uptake form for macrophages. *Biochem J* 1993; **290**: 165–72.
- 38** Hazell LJ, van den Berg JJ, Stocker R. Oxidation of low-density lipoprotein by hypochlorite causes aggregation that is mediated by modification of lysine residues rather than lipid oxidation. *Biochem J* 1994; **302**: 297–304.
- 39** Spickett CM, Jerlich A, Panasenko OM et al. The reactions of hypochlorous acid, the reactive oxygen species produced by myeloperoxidase, with lipids. *Acta Biochim Pol* 2000; **47**: 889–99.
- 40** Barrette WC Jr, Albrich JM, Hurst JK. Hypochlorous acid-promoted loss of metabolic energy in *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1987; **55**: 2518–25.
- 41** Barrette WC Jr, Hannum DM, Wheeler WD et al. General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production. *Biochemistry* 1989; **28**: 9172–8.
- 42** Prutz WA. Interactions of hypochlorous acid with pyrimidine nucleotides, and secondary reactions of chlorinated pyrimidines with GSH, NADH, and other substrates. *Arch Biochem Biophys* 1998; **349**: 183–91.
- 43** Sellmer W. [A recent and comprehensive overview on wound irrigation solutions in the German health sector]. In: *German Wound Congress 2018*. Bremen, Germany, 2018.