



SOLUMIUM
PRODUCTS
VIDEO
USERS
F.A.Q.
CONTACT
BUY



SOLUMIUM® IS ONE OF THE MOST EFFECTIVE DISINFECTANTS, EVER.

It kills all pathogens including bacteria, fungi, protozoa, and viruses. And it does all that without harming you: it has no known side-effects. Solumium is based on a new Hungarian invention: Prof. Zoltán Noszticzius and coworkers succeeded in producing hyperpure chlorine-dioxide, one of the world's strongest and friendliest disinfectants.

INTERNATIONAL PATENTS

The Solumium production procedure is protected by Hungarian, European, American, and Chinese patents, and patent pending in several other countries.

HOW DOES SOLUMIUM WORK

The background of the unique properties of Solumium is unfolded in a recent scientific article by Dr. Zoltan Noszticzius and colleagues, in the scientific journal [PLOS ONE](#). The extended version of the article, which includes case studies on the treatment of wounds infected with resistant bacteria, can be read at the Cornell University website [arXiv](#).

SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 and 452/2010 EU REACH

Trade name: Solumium®Dental	Date of print: 06/01/2014
	Revision date: 17/12/2013
	Version: 1.1 / EN

SECTION 1. Identification of the substance/mixture and of the company/undertaking

1.1 Product identifier: Solumium®Oral

1.2 Relevant identified uses of the substance or mixture and uses advised against

Disinfectants for the skin, mucous membrane

1.3 Details of the supplier of the safety data sheet

Manufacturer and supplier:

Solumium Kft.

Address:

1118 Budapest, Rozmaring u. 19.

E-mail address for the competent person responsible for the safety data sheet:

info@solumium.com

Phone

+36-1-3194323 (8:00-16:00)

1.4 Emergency telephone number

Emergency telephone number: 44 (0) 845-408-9575 (Merseyside, UK); (800) 424-9300 (USA); (0) 30 19-240 (Berlin)

SECTION 2. Hazards identification

2.1. Classification of the substance or mixture

2.1.1. Classification according to Regulation (EC) No. 1272/2008 (CLP): not classified

2.1.2. Classification according to Directive 1999/45/EC: not classified

2.2. Label elements

2.2.1. Labeling according to Regulation (EC) No 1272/2008 [CLP]

No specific requirement

Active ingredient on the label:

Chlorine dioxide (CAS: 10049-04-4);

2.3. Other hazards

The mixture does not meet persistent (P), bioaccumulation (B) and toxicity (T) criteria. The mixture is not PBT or vPvB.

SECTION 3. Composition/information on ingredients

Chemical characterization

Name	EC-Nr.	CAS-Nr.	REACH Nr.	Content (%)	Classification according to 67/548/EEC ³		Classification according to 1272/2008 (CLP) ³	
					Hazard symbol(s) ¹	R-phrases ¹	Hazard categories ¹	H-phrases ¹
Chlorine dioxide	233-162-8	10049-04-4	Not available ²	≥0.025 ≤0.03 ³	O C T+ N	R8 R6 R34 R26 R50	Press Gas Ox. Gas 1 Acute Tox.2* Skin Corr. 1B Aquatic Acute 1	H270 H330 H314 H400

¹ – See Section 16 for the full text of the abbreviations declared above.

² – The manufacturing volume of the substance does not reach the limit for registration requirement

³ – Chlorine dioxide has been classified in 790/2009/EU which is the ATP 1 for the CLP regulation with a new index number 017-026-00-3. These classifications are shown above. Its concentration limits are given in the sections below. The product is manufactured in diluted aqueous solution; therefore the classifications given here for pure chlorine dioxide are of informative value only.

* – so called minimum classification in the CLP regulation.

SECTION 4. First aid measures

4.1. Description of first aid measures

Immediately remove contaminated clothing.

SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 and 452/2010 EU REACH

Trade name: Solumium®Dental Date of print: 06/01/2014
Revision date: 17/12/2013
Version: 1.1 / EN

If inhaled: Remove to fresh air, seek medical attention.
On skin contact: After contact with skin, wash immediately with plenty of water. Consult a doctor if skin irritation persists.
On contact with eyes: Immediately wash affected eyes for at least 15 minutes under running water with eyelids held open, consult an eye specialist.
On ingestion: Drink ascorbic acid and then plenty of water, do not induce vomiting.

4.2. Most important symptoms and effects, both acute and delayed

Symptoms: tightness in the chest, coughing, difficulty breathing.

4.3. Indication of any immediate medical attention and special treatment needed

Treatment: Treat according to symptoms

SECTION 5. Firefighting measures

The product is not flammable.

5.1. Extinguishing media

Suitable extinguishing media: the same as for the source of the fire

5.2. Special hazards arising from the substance or mixture

Chlorine dioxide in the air.

5.3. Advice for firefighter

Special protective equipment: No specific measures.

Further information: Keep containers cool by spraying with water if exposed to fire.

SECTION 6. Accidental release measures

6.1. Personal precautions, protective equipment and emergency procedures

Ensure adequate ventilation.

6.2. Environmental precautions

Do not empty into drains. Do not discharge into the subsoil/soil.

6.3. Methods and material for containment and cleaning up

For large amounts: Pump off product.

For residues: Pick up with absorbent material (e.g. sand, sawdust, general-purpose binder). Dispose of absorbed material in accordance with regulations.

Neutralize with ascorbic acid.

6.4. Reference to other sections

Information regarding exposure controls/personal protection and disposal considerations can be found in section 8 and 13.

SECTION 7. Handling and storage

7.1. Precautions for safe handling

When handling heated product, vapours of the product should be ventilated

7.2. Conditions for safe storage, including any incompatibilities

Keep in the original container only.

Further information on storage conditions: Keep container tightly closed in a cool, well-ventilated place.

7.3. Specific end use(s)

For the relevant identified use(s) listed in Section 1 the advice mentioned in this section 7 is to be observed.

SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 and 452/2010 EU REACH

Trade name: Solumium®Dental Date of print: 06/01/2014
Revision date: 17/12/2013
Version: 1.1 / EN

SECTION 8. Exposure controls/personal protection

8.1. Control parameters

An occupational exposure level of 0.28 mg/m³ (0.1 ppmv) for 8 hour, and a short term of 0.84 mg/m³ (0.3 ppmv) have been assigned. There is a DNEL value of 0.308 mg/m³ in the registration document.

8.2. Exposure controls

Respiratory protection: None

Hand protection: None

Eye protection: None

Body protection: None

General safety and hygiene measures:

Do not breathe vapour/spray. Apply ventilation.

SECTION 9. Physical and chemical properties

9.1. Information on basic physical and chemical properties

Data refer to the product as a diluted aqueous solution. Data for the pure chlorine dioxide gas are given in brackets.

- | | |
|---|---|
| a) Appearance: | liquid (gas) |
| b) Color | yellow (yellowish green) |
| c) Odour: | specific, similar to chlorine |
| d) Odour threshold: | 0.1 ppmv |
| e) pH-value: | 4,5-5,5 (2-3 for saturated solution of 8g/l in water) |
| f) Melting point/freezing point: | 0°C (-59°C/1333 Pa) |
| g) Boiling range: | 100°C (11°C/760 Hgmm) |
| h) Flash point: | not flammable |
| i) Evaporation rate: | same as water |
| j) Flammability (solid, gaseous): | not flammable |
| k) Ignitable, explosive range: | not flammable |
| l) Vapour pressure: | same as water ($\log P = -1574/T + 10.55$, where P is the vapor pressure of chlorine dioxide in Pa) |
| m) Vapour density: | no data |
| n) Density: | 1,00 g/cm ³ (1,54 kg/dm ³) |
| o) Solubility: | miscible with water (8 g/l 15 °C) |
| p) Partition coefficient n-octanol/water: | (no data) |
| q) Self-ignition temperature: | not flammable (explosive) |
| r) Decomposition temperature: | stable for years (decomposes quickly) |
| s) Viscosity: | same as water (no data) |
| t) Explosive properties: | not explosive (explosive) |
| u) Oxidising properties: | oxidising |

9.2. Other information

Not applicable.

SECTION 10. Stability and reactivity

10.1. Reactivity

Oxidising organic matter.

SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 and 452/2010 EU REACH

Trade name: Solumium®Dental Date of print: 06/01/2014
Revision date: 17/12/2013
Version: 1.1 / EN

10.2. Chemical stability

The product is stable if stored and handled as prescribed/indicated.

10.3. Possibility of hazardous reactions

Not known

10.4. Conditions to avoid

Under fire or when heated the product evolves gaseous chlorine dioxide which is toxic

10.5. Incompatible materials

Substance that can be oxidised

10.6. Hazardous decomposition products

No hazardous decomposition products if stored and handled as prescribed/indicated.

SECTION 11. Toxicological information

Information is related to pure chlorine dioxide. Specific concentration limits for the aqueous solutions of chlorine dioxide are given from the 1. ATP as well as from the registration document.

11.1. Information on toxicological effects

Acute toxicity – oral:

Rats LD50 = 94 mg/kg
0.3-0.4 mg/kg chlorine dioxide when consumed by healthy adults caused no harmful effect. The 1. ATP classifies any aqueous solution as Acute Tox. 3. In the registration solution of 0.6-2.0% is classified as Acute Tox. 3

Acute toxicity – vapour inhalation:

Rats LC50 = 89 mg/m³ (4h)

11.2. Irritation/Corrosion

Skin corrosion/Skin irritation: Aqueous solution of $\geq 5\%$ is classified as Skin Corr. 1B, and those of $1\% \leq C < 5\%$ as Skin Irrit. 2 according to the 1. ATP. In the registration document a solution of 0.6-2% is considered as Skin Corr. 1B, a more severe specific concentration limit.

Eye damage/Irritation: Solutions of $3\% \leq C < 5\%$ are classified as Eye Dam. 2 and those of $0,3\% \leq C < 3\%$ as Eye Irrit. 2 according to the 1. ATP. In the registration document a solution of 0.6-2% is not considered as irritative to eye at all, based, however, negative tests performed in more diluted, 10-20 ppm solutions.

11.3. Sensitisation: not classified

11.4. Mutagenicity: Not classified. Based on available data, the classification criteria are not met.

11.5. Carcinogenicity: Not classified. Based on available data, the classification criteria are not met.

11.6. Reproductive toxicity: Not classified. Based on available data, the classification criteria are not met.

11.7. STOT-single exposure: The pure chlorine dioxide is not classified, however, in the 1. ATP aqueous solutions of $\geq 3\%$ are classified as STOT SE 3.

11.8. STOT-repeated exposure: not classified

11.9. Aspiration hazard: Not classified due to lack of data.

11.10. Toxicokinetics: No data

11.11. Genetic toxicity: Not classified. Based on available data, the classification criteria are not met.

SECTION 12. Ecological information

12.1. Toxicity

12.1.1. Aquatic toxicity

Short-term toxicity to fish:

SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 and 452/2010 EU REACH

Trade name: Solumium®Dental Date of print: 06/01/2014
Revision date: 17/12/2013
Version: 1.1 / EN

Freshwater fish LC50 = 0.49 mg/l (48 h)

Long-term toxicity to fish:

Freshwater fish LC50 = 1,6 mg/l (20 days)

Based on the toxicity data the M factor is 10. Therefore, aqueous solutions more diluted than 0.3% are not classified as Aquatic Acute 1.

12.2. Persistence and degradability

In the original container the solution is stable; however, it degrades quickly in natural environment and under UV radiation.

12.3. Bioaccumulative potential: No data.

12.4. Mobility in soil: No data

12.5. Results of PBT and vPvB assessment:

The product is not PBT neither vPvB.

12.6. Other adverse effects:

Chlorine dioxide has IR absorption, therefore it effects global warming.

SECTION 13. Disposal considerations

13.1. Waste treatment methods: The products becoming useless and the contaminated containers not suitable for product storage must be decontaminated by ascorbic acid and then they can be washed with water.

SECTION 14. Transport information

Land transport (ADR/RID/GGVSE)

Sea transport (IMDG-Code/GGVSee)

Air transport (ICAO-IATA/DGR)

- 14.1. UN number: Not dangerous goods
- 14.2. UN proper shipping name: Not dangerous goods
- 14.3. Transport hazard class(es): Not dangerous goods
- 14.4. Packaging group: Not dangerous goods
- 14.5. Environmental hazards: Marine pollutant: no
- 14.6. Special precautions for users: EmS number: Not dangerous goods

14.7. Transport in bulk according to Annex II of MARPOL73/78 and the IBC Code: Not relevant.

SECTION 15. Regulatory information

15.1. Safety, health and environmental regulations/legislations specific for the substance or mixture

- 15.1.1 **Information regarding relevant Community safety, health and environmental provisions:** Chlorine dioxide is listed as existing active biocid ingredient on the homepage of the European Commission.
 - 15.2. **Chemical Safety Assessment:** In accordance with REACH Chemical Safety Assessment has not been carried out for the substance by the supplier of the safety data sheet.
-

SECTION 16. Other information

The information given corresponds with our actual knowledge and experience. This information is meant to describe our product in view of possible safety requirements.

16.1. Indication of changes: This version replaces all previous versions.

16.2. Abbreviations and acronyms:

SAFETY DATA SHEET

according to Regulation (EC) No. 1907/2006 and 452/2010 EU REACH

Trade name: Solumium®Dental	Date of print:	06/01/2014
	Revision date:	17/12/2013
	Version:	1.1 / EN

Carc.: Carcinogenicity
CAS number: Chemical Abstracts Service number
CLP: Classification Labelling Packaging Regulation
CSR: Chemical Safety Report
DNEL: Derived No Effect Level
EC: European Commission
EC number: EINECS and ELINCS number
EC50: Half maximal effective concentration
EINECS: European Inventory of Existing Commercial Chemical Substances
ELINCS: European List of Notified Chemical Substances
Irrit.: Irritation
LC50: Lethal concentration, 50 %
LD50: Median Lethal dose
PBT: Persistent, Bioaccumulative and Toxic
PNEC: Predicted No Effect Concentration
REACH: The Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals
Resp.: Respiratory
Sens.: Sensitisation
STOT: Specific Target Organ Toxicity
STOT SE: Specific target organ toxicity — single exposure
STOT RE: Specific target organ toxicity — repeated exposure
Tox.: Toxicity
vPvB: Very Persistent and Very Bioaccumulative

16.3. Key literature references and sources for data: 1. ATP, Adaptation to the Technical Progress of the CLP regulation. Registration document published on the website of the European Chemical Agency.

16.4. Full text of abbreviations**Hazard symbol(s)**

O	Oxidizing
T	Toxic
C	Corrosive
N	Dangerous for the environment

R-Phrases

R6	Explosive with or without contact to air
R8	Contact with combustible material may cause fire
R26	Very toxic by inhalation
R34	Causes burns
R50	Very toxic to aquatic organisms

H- Phrases

H270	May cause or intensify fire; oxidizer
H330	Fatal if inhaled
H314	Cause sever skin burnes and eye damage
H400	Very toxic to aquatic life

Hazard classes

Acute Tox. 3	Acute Toxicity 3
Aquatic Acute	Hazardous to the aquatic environment
Eye irrit. 2	Serious eye irritation 2
Skin Irrit. 1B	Skin irritation 1B
STOT SE 2	Specific target organ toxicity – single exposure 2

Der Beweis, dass Chlordioxid ein gröÙenselektives antimikrobielles Mittel ist und in hochreiner Form als Lokalantiseptikum eingesetzt werden kann

Zoltán Noszticzius, Maria Wittmann, Kristóf Kály-Kullai
Bereich Chemische Physik, Physikfakultät, Technische und Wirtschaftsuniversität, Budapest, Ungarn
wittmann@eik.bme.hu

Zoltán Beregvári
Jósa András Krankenhaus, Nyíregyháza, Ungarn

István Kiss
St. Imre Krankenhaus, Budapest, Ungarn

László Rosivall
Simmelweis Universität, Budapest, Ungarn

János Szegedi
Jósa András Krankenhaus, Nyíregyháza, Ungarn

Kurzer Abriss
Hintergrund/Ziele

ClO_2 , das so genannte „ideale Biozid“, könnte auch als Antiseptikum eingesetzt werden, sobald geklärt ist, aus welchem Grund das rapide Vernichten von Mikroben durch die Lösung keinen Schaden bei Menschen und Tieren verursacht. Es war unser Ziel, den Mechanismus der Reaktion-Diffusions-Mechanismus' von ClO_2 theoretisch und experimentell zu untersuchen, um die Ursache für diese Selektivität zu finden.

Methoden

Die ClO_2 -Permeation durch Proteinmembranen wurde gemessen und die zeitliche Verzögerung des ClO_2 -Transports wegen Reaktion und Diffusion bestimmt. Um die Eindringtiefe des ClO_2 zu ermitteln und die Abtötungszeit der Bakterien abzuschätzen, wurden annähernde Lösungen der Reaktion-Diffusions-Gleichung abgeleitet. Als Vortest wurden zusätzlich drei Patienten mit infizierten Wunden mit hochreiner ClO_2 -Lösung (300 ppm) behandelt und der Heilungsprozess dokumentiert.

Ergebnisse

Das Geschwindigkeitsgesetz des Reaktion-Diffusions-Modells sagt voraus, dass sich die Abtötungszeit proportional zum Quadrat der charakteristischen Größe (zum Beispiel dem Durchmesser) verhält. Somit werden die kleinen Bakterien äußerst schnell getötet. Beispielsweise beläuft sich die Abtötungszeit eines Bakteriums in einer 300 ppm ClO_2 -Lösung auf einige Millisekunden. Demzufolge ist die Einwirkungsdauer von wenigen Minuten (wegen der Flüchtigkeit des ClO_2) ausreichend, um alle Bakterien zu töten, und kurz genug, um das Eindringen von ClO_2 in lebendes Gewebe mit Sicherheit auf unter 0,1 mm zu beschränken und zellschädigende Auswirkungen zu minimieren. Diverse, für ein Antiseptikum vorteilhafte Eigenschaften von ClO_2 werden ebenfalls diskutiert. Von größter Bedeutung ist, dass Bakterien keine Resistenz gegen ClO_2 entwickeln können, da es mit biologischen Thiolen reagiert, welche bei allen lebenden Organismen eine unverzichtbare Rolle spielen.

Zusammenfassung

Die Selektivität von ClO_2 zwischen Menschen und Bakterien begründet sich nicht durch ihre unterschiedliche Biochemie sondern ihre unterschiedliche Größe. Erste klinische Resultate mit diesem viel versprechenden Antiseptikum leisten weiterer Forschung Vorschub.

Finanzierung

Diese Arbeit wurde unterstützt von OTKA Grant 77908.

Konkurrierende Interessen

Drei der Autoren, Zoltán Noszticzius, Maria Wittmann sowie Kristóf Kály-Kullai, stellen konkurrierende finanzielle Interessen fest, da sie Miterfinder des europäischen Patents 2069232 „Permeationsverfahren und -apparatur zur Zubereitung von Flüssigkeiten, die hochreines Chlordioxid enthalten“ sind, siehe auch Quellenverweis 13. Außerdem ist Zoltán Noszticzius auch der Gründer von Solumium Limited. Die anderen vier Autoren haben keine konkurrierenden finanziellen Interessen.

Einführung

Das Aufkommen und die Verbreitung neuer Bakterienstämme, die durch zu häufigen Gebrauch von Antibiotika [1] gegen diese resistent geworden sind, stellt ein globales Problem des Gesundheitswesens dar. Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) [1], [2] und Carbapenem- oder Extreme Drug-resistenter *Acinetobacter baumannii* [3], [4] sind nur zwei wohlbekanntere Vertreter dieser Bakterien, die weltweite Aufmerksamkeit erregen. Während die Anzahl antibiotikaresistenter Infektionen steigt, nimmt außerdem die Anzahl neuer Antibiotika ab [1], [2]. In Folge dieser gefährlichen Situation wurde eine Suche nach neuen antimikrobiellen Mitteln initiiert, ebenso eine mögliche Umstellung von antibiotischen auf antiseptische Therapien.

Wenn örtliche Wundinfektionen, Geschwüre oder infizierte Schleimhäute behandelt werden, ist die Anwendung von Antiseptika an Stelle von Antibiotika eine vernünftige Alternative, insbesondere weil die Bakterien weniger in der Lage sind, eine Resistenz gegen sie zu entwickeln [5]. Die Mehrheit der zur Wundversorgung verwendeten Antiseptika [6] sind gegenwärtig organische Präparate. Die am häufigsten verwendeten [6] sind Chlorhexidin (Chlorhexidindigluconat), Octenidin (Octenidindihydrochlorid), Polyhexanid (Polyhexamethylenbiguanid) sowie Triclosan (5-Chlor-2-(2,4-Dichlorphenoxy)-Phenol). Nennenswerte Ausnahme ist PVP-Jod (Poly(vinylpyrrolidon)-Jod-Komplex) [6], dessen aktive und jeweils anorganische Bestandteile Jod und Silber sind.

Es gibt einige andere, weniger gebräuchliche, anorganische Antiseptika wie Natriumhypochlorit (NaOCl) oder Wasserstoffperoxid-Lösungen (H_2O_2) oder Ozongas (O_3), welches in der Zahnmedizin Anwendung findet [8]. Allerdings kommen diese Verbindungen hauptsächlich als Desinfektionsmittel zum Einsatz, weil sie bereits in niedriger Konzentration toxisch sein können – eine Eigenschaft, die ihre Anwendung als Antiseptikum ernsthaft einschränkt. NaOCl ist beispielsweise eine der am häufigsten verwendeten Komponenten in Spüllösungen bei Wurzelbehandlungen, kann jedoch zu Vergiftung und Gewebszerstörung führen, wenn es bei der Wurzeltherapie versehentlich in Periapikalgewebe injiziert wird [9]. H_2O_2 ist gegen Bakterien ebenfalls ein zweischneidiges Schwert, da es zugleich das lebende Gewebe verletzt [10]. Des Weiteren sind etliche Bakterien in der Lage, H_2O_2 zu widerstehen, da ihr Katalase-Enzym H_2O_2 zügig abbauen kann [11]. Somit kann neben der Toxizität auch die Resistenz zum Problem werden – sogar bei der Anwendung anorganischer Desinfektionsmittel [5]. Aus diesem Grund ist es ratsam, ein Antiseptikum ohne diese Probleme auszuwählen. Wie gehen davon aus, dass Chlordioxid in dieser Hinsicht die richtige Wahl darstellen könnte, zumal ClO_2 weitere Charakteristika aufweist, welche für antiseptische Anwendungen von Vorteil sind. Während der vergangenen rund zwanzig Jahre ist Chlordioxid als neuartiges und beliebtes, anorganisches Desinfektionsmittel aufgetaucht. Wegen seiner vorteilhaften Eigenschaften wird es auch als das „ideale Biozid“ bezeichnet [12]. Ungeachtet dessen werden ClO_2 -Lösungen unseres Wissens nach nicht oft als Antiseptikum verwendet. Der Grund dafür ist, dass verfügbare ClO_2 -Lösungen mit anderen Chemikalien, die bei ihrer Herstellung zum Einsatz kamen, mehr oder weniger kontaminiert waren. Diese Kontamination bildete ein ernstes Hindernis für medizinische Anwendungen wie zum Beispiel die Versorgung infizierter Wunden. Dank einer Erfindung [13] ist es allerdings seit 2006 relativ leicht möglich, hochreine wässrige ClO_2 -Lösungen herzustellen.

Solche Lösungen sind bereits kommerziell erhältlich [14] und werden seit 2008 erfolgreich in der Zahnmedizin eingesetzt [15]. Daher drängt sich die Frage auf, ob das „ideale Biozid“ in reiner Form zugleich auch das „ideale Antiseptikum“ sein kann.

Ein solches ideales Antiseptikum sollte mehrere Kriterien erfüllen. Zuerst sollte es sicher sein: Es sollte ausschließlich lokal wirken, um die Gefahr einer systemischen Vergiftung zu vermeiden, und auch im desinfizierten Bereich keine zytotoxischen Wirkungen mit sich bringen. Insofern ist es ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit, eine vernünftige Antwort auf folgende verblüffende Frage zu finden: Wie kann der Kontakt mit und sogar das Trinken von ClO_2 -Lösungen für Tiere [16] und Menschen [17] praktisch unbedenklich sein, wenn die gleichen wässrigen Lösungen Bakterien, Pilze und Viren schnell und höchst effektiv töten? Worauf beruht diese unerwartete Selektivität?

Die im Ergebnis-Kapitel vorgeschlagene Antwort lautet wie folgt: Die Selektivität zwischen Menschen oder Tieren und Mikroben basiert nicht auf deren unterschiedlicher Biochemie, sondern auf deren unterschiedlicher Größe. ClO_2 in der Überschrift als „größenselektives“ antimikrobielles Mittel zu bezeichnen, hebt diese neue Art von Selektivität hervor. Um zu dieser Schlussfolgerung zu gelangen, wurde der ClO_2 -Transport durch Eiweißmembranen experimentell untersucht. Die Ergebnisse dieser Experimente wurden mittels des Reaktion-Diffusions-Modells für den ClO_2 -Transport in einem reaktiven Medium evaluiert, um den Diffusionskoeffizienten von ClO_2 sowie die Konzentration reaktiver Gruppen in einem Eiweißmedium zu erhalten. Ausgehend von diesen Parametern der Abtötungszeit, kann die erforderliche Zeit berechnet werden, um ein Bakterium vollständig mit ClO_2 zu fluten. (Einzelheiten des Reaktion-Diffusions-Modells und die Herleitung der Formel, welche die Abtötungszeit bestimmt, werden im Ergänzungssteil bereitgestellt.) Es wurde herausgefunden, dass die typischerweise für das Töten einer Mikrobe notwendige Zeitspanne lediglich einige Millisekunden beträgt. Da ClO_2 eine recht flüchtige Verbindung ist, ist seine Kontaktdauer (sein Verweilen auf der behandelten Oberfläche) auf einige Minuten begrenzt. Während die Verweildauer mit Sicherheit lang genug ist, um alle Bakterien auf der Oberfläche des Organismus' auszuschalten (mindestens drei Größenordnungen länger als die Abtötungszeit), reicht sie für das ClO_2 nicht aus, um tiefer als einige Zehntelmillimeter einzudringen, und kann einem Organismus, der deutlich größer als ein Bakterium ist, demzufolge keinen Schaden zufügen.

Um zu illustrieren, dass diese Überlegungen in der medizinischen Praxis Anwendung finden können, zeigen wir einige Vorergebnisse erfolgreicher Behandlungen schlecht heilender Wunden mit einer hochreinen ClO_2 -Lösung.

Im Diskussions-Kapitel wird gezeigt, dass ClO_2 die für ein örtliches Antiseptikum erforderliche Sicherheit und Effektivität mit sich bringt. Anschließend wird der chemische Mechanismus der antiseptischen Wirkung von ClO_2 diskutiert und mit dem von hypochloriger sowie hypoiodiger Säure (HOCl und HOI) verglichen, welche „natürliche“ Antiseptika sind. Diese hypohalogenigen Säuren werden von neutrophilen Granulozyten, der häufigsten Art weißer Blutkörperchen bei Säugetieren, verwendet, um Bakterien nach der Phagozytose zu töten. Beide hypohalogenigen Säuren und auch ClO_2 attackieren Sulfhydryl-Gruppen, die eine essenzielle Rolle im Lebensprozess aller lebenden Systeme spielen, beispielsweise in der ATP-Synthese [18]. Das erklärt, weshalb Bakterien im endlosen Lauf der Evolution nicht im Stande waren, eine Resistenz gegen HOCl auszubilden, und warum das Auftauchen ClO_2 -resistenter Bakterienstämme ebenso wenig zu erwarten ist. Neben dieser Ähnlichkeit gibt es allerdings auch bedeutende Unterschiede zwischen diesen Reagenzen, zum Beispiel ist ClO_2 selektiver als HOCl . Zuerst kann der Kreislauf in mehrzelligen Organismen einen zusätzlichen Schutz gegen ClO_2 bieten.

Methoden

Physikalisch-chemische Methoden

Die Messung der ClO_2 -Permeation durch Eiweißmembranen

Die Geschwindigkeit des ClO_2 -Transports wurde mit Hilfe der Apparatur in Abbildung 1 durch zwei Arten von Eiweißmembranen ermittelt: Gelatine- beziehungsweise Schweineblasenmembranen. Es ist von Vorteil, eine Membrangeometrie für die Experimente auszuwählen, weil das Problem dann „eindimensional“ wird: Die Konzentration ist eine Funktion von nur einer Raumkoordinate x , welche senkrecht zur Membran ist, und die Verteilung der Konzentration kann angegeben werden mit $c=c(x,t)$.

Rührmotor	Spritze mit 0,01 molarer $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung
PVC-Halterung	PTFE-Rohr
PTFE-Rohr	saure KI-Lösung mit Stärkeindikator
oberer Teil der Glasapparatur	Silikonkautschukmembran (nur für ClO_2 durchlässig)
	Gelatine- oder Schweineblasenmembran
unterer Teil der Glasapparatur	ClO_2 -Gasschicht (oder gasförmiges ClO_2)
Rührstab	wässrige ClO_2 -Lösung

Abbildung 1: Apparatur zur Bestimmung des ClO_2 -Transports durch Gelatine- oder Schweineblasenmembranen.

Die beiden Glasteile der Apparatur werden von einem Klammerpaar zusammengehalten (nicht abgebildet), welche von Klammerhaltern fixiert werden. Der aktive Querschnitt der Membranen beträgt 28 cm^2 . Das Funktionsprinzip wird im Text erläutert.

Wie Abbildung 1 zeigt, befindet sich die Membran in einer horizontalen Position, und der Transport von ClO_2 findet durch die Membran statt, welche von zwei horizontalen Ebenen begrenzt wird. In unserer Berechnung bezeichnen wir $x=0$ und $x=d$, wobei d die Dicke der Membran ist.

Auf beiden Seiten der Membran herrscht eine konstante Konzentration von ClO_2 . Wir haben konstante Randbedingungen: $c(0,t)=c_0$ beziehungsweise $c(d,t)=0$. Zu Beginn des Experimentes befindet sich kein ClO_2 in der Membran, die Ausgangsbedingung lautet: $c(0 < x < d, 0)=0$ (siehe Abbildung S1 im Ergänzungssteil).

Obwohl die Unterseite der Proteinmembran keinen direkten Kontakt mit der flüssigen Schicht hat, würde ein solcher Kontakt keinen Unterschied bezüglich des ClO_2 -Transports machen, denn das chemische Potenzial von ClO_2 ist in der flüssigen und dampfförmigen Schicht das gleiche – wegen des durch kontinuierliches Rühren erzeugten Gleichgewichts zwischen flüssiger und dampfförmiger Schicht.

Über der Proteinmembran befindet sich eine Silikonkautschukmembran, um den Transport von anderen Substanzen außer ClO_2 zu blockieren. Silikonkautschuk ist außerordentlich durchlässig für Chlordioxid, aber praktisch undurchlässig für andere Reagenzen [13]. Auf diese Weise kann der ClO_2 -Transport durch die Testmembran selektiv gemessen werden.

Beide Testmembranen hatten eine Dicke von 0,5 mm und einen Durchmesser von 10 cm. Der Durchmesser der aktiven Fläche in der Apparatur betrug 6 cm, was einer aktiven Fläche von 28 cm^2 entspricht. Das Volumen der wässrigen ClO_2 -Lösung betrug 40 ml, und die ClO_2 -Konzentration lag etwa bei 1.000 ppm. (Der exakte Wert ist bei jedem einzelnen Experiment aufgeführt.)

Nachdem das ClO_2 die Membranen durchquert hat, gelangt es in die obere wässrige Lösung. Diese ist eine Mischung aus 10 ml Wasser, 2 ml 1 molarer Schwefelsäure, 1 ml 1 molarer KI sowie 0,5 ml 0,01 molares $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$. Als Indikator werden zwei Tropfen 5%iger Stärkelösung dazugegeben. Sobald ClO_2 die obere Lösung erreicht, oxidiert es Jodid zu Jod, was im Gegenzug durch das $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ zu Jodid zurückreduziert wird, solange Thiosulfat im Überschuss vorhanden ist. Wenn allerdings alles Thiosulfat aufgebraucht ist, erscheint plötzlich die schwarz-blaue Farbe des Stärke-Triiodid-Komplexes (**Dark Burst**). Die Zeitdauer t , bis die gesamte Lösung einheitlich schwarz wird („Black Burst“), wurde gemessen und mit Hilfe der Spritze, wie in Abbildung 1 illustriert, weitere 0,5 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung hinzu gegeben. Die Zufuhr von Thiosulfat lässt die schwarz-blaue Farbe umgehend verschwinden.

Wenn jedoch nach einer bestimmten Zeit ausreichend neues ClO_2 durch die Membranen transportiert wurde, erscheint sie erneut. Danach wurde der Kreislauf mit einer erneuten Injektion von 0,5 ml $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung wiederholt. Die Messergebnisse wurden in einem Diagramm $V=V(t)$ aufgetragen. Dabei ist t die Zeit des n -ten Dark Burst und $V=n \times 0,5 \text{ ml}$, also das gesamte Volumen der vor dem n -ten Durchbruch (**Black Burst**) zugeführten Thiosulfat-Lösung.

Die Experimente wurden bei einer Labortemperatur von 24°C mit einer Toleranz von 2°C durchgeführt.

Vorbereitung der Gelatinemembran

Um eine mechanisch starke Membran zu präparieren, wurde sie mit Filterpapier verstärkt und die Gelatine mit Glutaraldehyd vernetzt. Da die Zellulose im Filterpapier nicht mit ClO_2 reagiert, ist es ein inaktives Material, was unsere Experimente angeht.

10 ml der 10%igen wässrigen Gelatinelösung wurden bei Zimmertemperatur schnell mit 0,5 ml der 25%igen Glutaraldehydlösung gemischt und eine Scheibe Filterpapier (Durchmesser 10 cm) mit der Mischung getränkt. Anschließend wurde die Scheibe Filterpapier zwischen zwei mit Polyethylenfolie beschichteten Glasscheiben platziert. Es wurden Abstandhalter verwendet, um eine 0,5 mm dicke Membran herzustellen. Nach zwei Stunden Aushärtezeit wurde die mit Filterpapier verstärkte Gelatinemembran aus der Form genommen und vor den Messungen über Nacht in destilliertes Wasser getan.

Vorbereitung der Schweineblasenmembran

Für die Experimente wurden aus frei verkäuflicher Schweineblase Membranscheiben mit 10 cm Durchmesser geschnitten und einen Tag lang bei 4°C in destilliertem Wasser aufbewahrt, um ihren Wassergehalt zu stabilisieren. Die Schweineblasenmembranen sind leicht asymmetrisch: Die Oberfläche der einen Seite ist weicher als die andere. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurde die Membran stets mit der weicheren Seite nach unten in der Apparatur fixiert.

Methoden der Wundheilung Ethische Erklärung

Die ethische Zustimmung für das Protokoll und die Erlaubnis für das gesamte Programm (KLO2-UCD-HU_2010) wurden vom ungarischen staatlichen Gesundheitsamt (ANTSZ) ausgestellt, welches damit der Empfehlung des wissenschaftlichen Komitees ETT TUKEB [19] folgte. Von allen Patienten wurde eine schriftliche Einwilligung eingeholt.

Die Behandlung chronischer Wunden mit wässriger ClO_2 -Lösung

Die verwendete Lösung enthielt 300 ppm hochreines, in destilliertem Wasser gelöstes ClO_2 (Solumium Oral® [14]). Diese Lösung wurde in einer braunen Flasche aufbewahrt, welche mit einem Deckel fest verschlossen wurde, wenn sie nicht in Gebrauch war. Erst unmittelbar vor der Anwendung wurde der Deckel durch einen Sprühkopf ersetzt. Im ersten Behandlungsschritt wurde die Wunde vorsichtig mit der Lösung besprüht. (Der Kontakt mit der Wunde bereitet kein Unbehagen, da die Wunde nicht brennt.) Als Nächstes wurde eine Schicht nicht haftender Vaseline-Gaze zusammen mit drei Lagen normaler Gaze auf der Wunde platziert. Diese Lagen wurden wieder mit ClO_2 -Lösung besprüht, bis sie vollständig feucht waren. Die Bandage wurde komplettiert mit drei weiteren Lagen trockener Gaze – zum Teil, um das Verdunsten der aktiven Bestandteile zu verzögern, zum Teil, um das Unbehagen der Patienten ob des feuchten und kalten Verbandes zu verringern. Alle 24 Stunden wurde der Verband gewechselt. Beim Entfernen der Bandage half ein behutsames Sprühen mit der Lösung, um die alte Gaze zu lösen.

Ergebnisse

Unsere Ergebnisse betreffen die folgenden Themen: Erstens stellen wir die Membran-Transport-Experimente vor und evaluieren diese, um

- i) den Diffusionskoeffizienten D von ClO_2 in einem reaktiven Proteinmedium und
- ii) die Konzentration der reaktiven Gruppen s_0 in diesem Medium zu bestimmen.

Für die Evaluierung der Membran-Transport-Experimente verwendeten wir ein Reaktion-Diffusions-Modell für den ClO_2 -Transport in einem Medium mit reaktiven Eiweißen. Details zu dieser Theorie sowie die mathematische Ableitung der in diesem Abschnitt verwendeten Formeln werden im Ergänzungsstück bereitgestellt.

Ausgehend vom experimentell bestimmten D und s_0 errechnen wir T_{KILL} , die Zeit in der ClO_2 die Bakterien tötet, sowie p , die Eindringtiefe von ClO_2 in menschliches Gewebe während der Wundbehandlung. Um zu belegen, dass unsere Theorie in der Praxis angewendet werden kann, stellen wir zuletzt die Vorergebnisse einiger Wundheilungsexperimente vor.

Die ClO_2 -Permeation wurde durch Gelatine- und Schweineblasenmembranen gemessen. Die Apparatur ist in Abbildung 1 des Methodenkapitels dargestellt.

ClO_2 -Permeation durch eine künstliche Gelatinemembran

Gelatine war unsere erste Wahl als Modellmaterial, weil wir den ClO_2 -Transport in einem Proteinmedium mit bekannter Aminosäurezusammensetzung untersuchen wollten. Schweinehautgelatine (Fluka 48719) enthält lediglich zwei Aminosäuren, die mit ClO_2 reagieren können: Methionin (0,88 %) und Tyrosin (0,6 %) [20].

Abbildung 2: ClO_2 -Permeation durch Gelatinemembran als eine Funktion der Zeit t . Jeder Punkt im Diagramm stellt einen „Black Burst“ dar (siehe Methodenkapitel). V ist das kumulative Volumen des 0,01 molaren $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Titrants, welches vor dem Burst dazugegeben wird, und N ist die in der Zeit t durchgedrungene ClO_2 -Menge. $T_{L1}=627$ s und $T_{L2}=175$ s sind Zeitverzögerungen des ersten beziehungsweise zweiten Experiments. Die ClO_2 -Ausgangskonzentration in der magnetisch gerührten wässrigen Lösung betrug 1360 ppm (mg/kg) oder 20,1 mM.

Abbildung 2 zeigt die Resultate der zwei aufeinander folgenden Experimente, die mit der gleichen Gelatinemembran durchgeführt wurden (vergleiche beide mit 1. und 2. Experiment bezeichneten Kurven). Nach dem ersten Experiment wurde die Membran aus der Apparatur genommen und bis zum zweiten Experiment für eine Stunde in destilliertem Wasser aufbewahrt.

Die Berechnung des ClO_2 -Diffusionskoeffizienten D und der effektiven ClO_2 -Konzentration, bei der Gelatine-Substrate s_0 aufgebraucht werden

Abbildung 2 zeigt N , die kumulative, die Membran durchdringende ClO_2 -Menge, als eine Funktion der Zeit. Es ist ein übliches Kennzeichen der beiden in Abbildung 2 dargestellten Kurven, dass zwei charakteristisch unterschiedlich dynamische **Abschnitte** zu erkennen sind. Im ersten **Abschnitt** ist die Menge des durchdringenden ClO_2 sehr klein, ehe die kumulative ClO_2 -Menge nach einer schnellen Übergangsphase linear ansteigt. Eine echte Dynamik kann mit folgendem vereinfachten Modell annähernd erreicht werden: Während einer Wartephase zu Beginn wird null Permeation angenommen. Aber unmittelbar danach tritt ein kontinuierlicher Diffusionsfluss ein, womit die durchdringende Menge linear über die Zeit ansteigt. Um ein derartig dynamisches Verhalten zu beschreiben, kann das Konzept der „Zeitverzögerung“ eingeführt werden: Es handelt sich um den Zeitpunkt, an dem die Asymptote des linearen **Abschnitts** die Zeitachse schneidet [21].

Wenn wir die Asymptoten der korrespondierenden Kurven betrachten, ist die Zeitverzögerung im ersten Experiment $T_{L1}=627$ s beziehungsweise $T_{L2}=175$ s. Eine logische Erklärung für diese Abweichung ist, dass etwas ClO_2 durch die schnelle Reaktion mit Methionin und Tyrosin in der Gelatine verbraucht wird. Das heißt, das ClO_2 kann nur durchbrechen,

nachdem es all diese hochreaktiven Aminosäurerückstände eliminiert hat. Im Fall des zweiten Experiments tritt der Durchbruch eher ein, da der größte Teil dieser Rückstände bereits während des ersten Experiments mit ClO_2 reagiert hat.

Wenn wir annehmen, dass die Reaktion im zweiten Experiment nur eine untergeordnete Rolle spielt, begründet sich die Zeitverzögerung ausschließlich durch Diffusion. Grob gesagt ist die Diffusionszeitverzögerung jene Zeit, die notwendig ist, um einen stabilen Konzentrationszustand innerhalb der Membran aufzubauen und die Membran mit ClO_2 „vollzufüllen“. Ausgehend von Abwägungen der Dimensionsanalyse (die Dimension des Diffusionskoeffizienten ist die Länge zum Quadrat, geteilt durch die Zeit), können wir erwarten, dass die Zeitverzögerung proportional zum Quadrat der Dicke und umgekehrt proportional zum Diffusionskoeffizienten sein sollte. Das tatsächliche exakte Resultat [21] lautet, dass sich die Diffusionszeitverzögerung T_{DM} einer Membran mit der Dicke d wie folgt berechnen lässt:

$$T_{\text{DM}} = 1/6 \times d^2 / D \quad (1)$$

Daraus folgt unter der Voraussetzung $T_{\text{L2}} = T_{\text{DM}} = 175 \text{ s}$, dass der ClO_2 -Diffusionskoeffizient D in der Gelatinemembran ermittelt werden kann, da bekannt ist, dass $d = 0,5 \text{ mm}$. Das Ergebnis lautet $D = 2,4 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. D kann auch anders bestimmt werden – über den Gleichgewichtsabschnitt („Steady State“). Der gleichmäßige ClO_2 -Fluss ist der Anstieg der Kurve in dem linearen Abschnitt. Und im zweiten Experiment $J_2 = 30 \text{ nmol/s}$. Dann kann das Ficksche Diffusionsgesetz

$$J = A \times D \times \Delta c / d \quad (2)$$

zur Berechnung von D angewendet werden. Hierbei ist $A = 28,3 \text{ cm}^2$ der aktive Querschnitt der Membran und Δc die Differenz der Konzentration zwischen den beiden Membranseiten. Hinsichtlich unserer Randbedingungen $\Delta c = c_0 = 20,1 \times 10^{-3} \text{ M}$ erhalten wir $D = 2,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$. Die beiden unterschiedlichen Werte für D – einer über die Zeitverzögerung ermittelt, der andere über das Gleichgewicht – stimmen einigermassen überein und legen nahe, dass die Zeitverzögerung 175 s in der Tat hauptsächlich durch Diffusion verursacht wird und jegliche Verzögerung durch chemische Reaktionen im zweiten Experiment vernachlässigbar ist. Auf der anderen Seite wird die Zeitverzögerung T_{RM} im ersten Experiment überwiegend durch die Reaktion von ClO_2 mit den Aminosäurerückständen (kurz „Substrate“) in der Membran erzeugt. Es ist wichtig zu verstehen, dass T_{RM} nichts mit der Langsamkeit der Reaktion zu tun hat (da die Geschwindigkeitskonstanten der relevanten ClO_2 -Aminosäure-Reaktionen relativ groß sind [22], [23], [24]), sondern auf den vorliegenden ClO_2 -Verbrauch durch die Reaktionen innerhalb der Membran zurückzuführen ist, welche den Durchbruch verzögern. Nehmen wir an, dass die Geschwindigkeit der chemischen Reaktionen durch den diffusionsmäßigen Transport des ClO_2 von einem Bereich, in dem bereits keine reaktiven Aminosäuren mehr sind, zu einem Bereich, in dem nichtreagierte Aminosäuren vorliegen, begrenzt ist. Dann muss sich eine scharfe Reaktionsfront an der Grenze der beiden Bereiche ausbilden (siehe Abbildung S1 im Ergänzungssteil). Diese Front beginnt an einer Seite der Membran und verbreitet sich mittels Diffusion langsam in der Membran, wobei T_{RM} die Zeitdauer ist, in der sie auf der anderen Membranseite ankommt. Gemäß der detaillierten Herleitung im Ergänzungssteil kann T_{RM} durch das so genannte parabolische Geschwindigkeitsgesetz (siehe Gleichung (S12) im Ergänzungssteil) folgendermaßen angegeben werden:

$$T_{\text{RM}} = 1/2 \times s_0 / c_0 \times d^2 / D \quad (3)$$

Dabei ist s_0 die anfängliche effektive Substratkonzentration, sprich die volumenmäßige Kapazität der Membran, ClO_2 zu verbrauchen, und c_0 ist die ClO_2 -Konzentration an der Membrangrenze.

Wir substituieren den verlässlicheren Diffusionskoeffizienten $D = 2,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, den wir im Gleichgewicht des zweiten Experiments ermittelt haben, und verwenden die Annahme, dass $T_{\text{RM}} = T_{\text{L1}} = 627 \text{ s}$, und können die effektive Substratkonzentration s_0 der Gelatinemembran berechnen. Das Ergebnis: $s_0 = 26,2 \text{ mM}$.

ClO_2 -Permeation durch die Schweineblasenmembran

In diesem Experiment untersuchten wir, wie ClO_2 eine Schweineblasenmembran durchdringen kann, welche ein relativ dünnes (in unserem Fall 0,5 mm dick) aber robustes

Tiergewebe ist. Es wurde die gleiche Apparatur wie bei der Gelatinemembran verwendet. Und in Abbildung 3 sind die Experimentpunkte nach der gleichen Methode dargestellt.

Abbildung 3: ClO₂-Permeation durch Schweineblasenmembran als eine Funktion der Zeit t. V und N besitzen die gleiche Bedeutung wie in Abbildung 2. T_{L1}=2770 s, T_{L2}=586 s sowie T_{L3}=226 s sind die Zeitverzögerungen der Experimente, welche am ersten, zweiten beziehungsweise dritten Tag durchgeführt wurden. Die ClO₂-Ausgangskonzentration bei diesen Experimenten betrug 946 ppm (14,0 mM).

Alle drei Messungen (angegeben als erster, zweiter und dritter Tag) wurden mit der gleichen Schweineblasenmembran durchgeführt, jedoch an drei aufeinander folgenden Tagen. Die Membran wurde zwischen den Experimenten über Nacht in destilliertem Wasser bei +4 °C aufbewahrt, die Experimente jedoch stets mit neuen Lösungen begonnen.

Um die Reproduzierbarkeit unserer Messergebnisse zu überprüfen, wiederholten wir die Messungen mit einer anderen Schweineblasenmembran, was nicht Teil der Abbildung ist. Obgleich die neue Membran von einer anderen Schweineblase stammte und ihre Blutgefäßstruktur entsprechend verschieden war, war die relative Abweichung zwischen den beiden Messreihen überraschend gering: lediglich rund 10 %. (Die Blutgefäßstruktur der Membran wird vor dem „Black Burst“ als dunkles Netz sichtbar, weil die Durchlässigkeit der Membran durch diese Gefäße etwas größer ist.)

Eine weitere interessante Beobachtung war, dass die Schweineblasenmembran sogar nach dem dritten Experiment ihre Unversehrtheit und mechanische Festigkeit behielt. Das liegt daran, dass ClO₂ selektiv mit bestimmten Aminosäurerückständen des Proteins reagiert, aber nicht die Peptidbindungen zerstört, wodurch die Primärstruktur des Proteins intakt bleiben kann.

Die Berechnung des ClO₂-Diffusionskoeffizienten und der effektiven Konzentration der Substrate, welche ClO₂ in der Schweineblase verbrauchen

Die Evaluierung der Ergebnisse wurde ähnlich durchgeführt wie im Fall der Gelatinemembran. Es wurde angenommen, dass die Zeitverzögerung im dritten Experiment T_{L3}=226 s eine einzig und allein auf Diffusion zurückzuführende Zeitverzögerung T_{L3}≈T_{DM} ist. Der Diffusionskoeffizient von ClO₂ in einer Schweineblasenmembran, errechnet unter der obigen Annahme, beträgt D=1,84x10⁻⁶ cm²s⁻¹. Dieser Wert stimmt gut mit D=1,80x10⁻⁶ cm²s⁻¹ überein – dem Wert, welcher aus dem Gleichgewichtsfluss J₃=14,1 nmol/s des dritten Experiments berechnet wurde.

Wie wir sehen, ist der Diffusionskoeffizient von ClO₂ in Schweineblasengewebe lediglich 30 % geringer als in der strukturlosen Gelatine. Das bestätigt unsere Annahme, dass die Zellularstruktur des Schweineblasengewebes in Bezug auf den Diffusionstransport des ClO₂ nicht besonders stark ins Gewicht fällt, da ClO₂ durch die externen und internen Lipidmembranen der einzelnen Gewebezellen zu dringen vermag.

Allerdings gibt es eine wesentliche Abweichung zwischen der Schweineblase und der Gelatine, was s₀ angeht, die effektive Substratkonzentration. Angenommen, die Zeitverzögerung im ersten Experiment T_{L1}=2770 s ist auf die chemische Reaktion zurückzuführen, T_{L1}≈T_{RM}. So erhalten wir aus (3) s₀=56 mM. Das legt nahe, dass die Konzentration der reaktiven Komponenten im Schweineblasengewebe etwa zwei Mal höher ist als in Gelatine. Und dies ist ein vernünftiges Resultat, da tierisches Gewebe dichter ist und nicht bloß Methionin und Tyrosin enthält wie Gelatine, sondern auch Cystein- sowie Tryptophanrückstände. Wir möchten hinzufügen, dass in den Messreihen, welche mit der gleichen Membran durchgeführt werden, der ClO₂-Gleichgewichtsfluss im ersten Experiment stets kleiner ist als in den folgenden, obschon das Ausgangs-ClO₂ unverändert bleibt. Dieser Effekt ist bei einer tierischen Membran noch stärker (vergleiche den Anstieg im Experiment des ersten Tages mit denen der anderen Tage). Dieses Phänomen wird verständlich, wenn wir davon ausgehen, dass einige Bestandteile, die, wenn auch nur langsam, mit dem ClO₂ reagieren können, auch nach dem ersten ClO₂-Durchbruch in der Schweineblase bleiben

können. Wie die Gleichung (S40) im Ergänzungssteil zeigt, kann der langsame ClO_2 -Verbrauch dieser Bestandteile den kleinen aber stetigen Fluss erklären, der quasi ein Gleichgewicht darstellt. Der Umstand, dass diese Komponenten aus der Membran verschwinden, nachdem sie über Nacht in Wasser aufbewahrt wurde, legt nahe, dass sie Reaktionsprodukte sind, die aus der Membran ausgewaschen werden können, oder unbeständige Zwischenprodukte, welche zerfallen.

Abschätzung der Abtötungszeit von Bakterien mittels zylindrischer und sphärischer Geometrie

Wir gehen davon aus, dass ein Bakterium getötet wird, wenn sein Volumen mit ClO_2 geflutet ist. Wenn wir die Größe und die Form des Bakteriums kennen, benötigen zwei weitere Parameter, um die Abtötungszeit zu berechnen: den Diffusionskoeffizienten D von ClO_2 sowie die effektive Konzentration s_0 der Substrate im bakteriellen Medium, welche ClO_2 verbrauchen. In Ermangelung von Daten zu den Bakterien nehmen wir an, dass die Parameter D und s_0 in der einzelnen Bakterienzelle ähnlich dem sind, was wir oben in tierischen Zellverbänden der Schweineblase gemessen haben. Eine weitere vereinfachende Annahme ist, dass nur sphärische und zylindrische Bakterien betrachtet werden. Numerische Ergebnisse werden für einen Durchmesser von $1 \mu\text{m}$ ermittelt, was einer charakteristischen Länge von Bakterien entspricht. Mathematische Formeln für die Abtötungszeit sowie die Eindringtiefe werden im Ergänzungssteil hergeleitet. In diesem Abschnitt werden lediglich die Ergebnisse dieser Formeln vorgestellt, zusammen mit einigen qualitativen Erläuterungen ihrer Bedeutung.

Es wird angenommen, dass die Häufigkeit der „ ClO_2 -Bakterium-Reaktion“ außerdem durch die ClO_2 -Diffusion zu den schnell reagierenden Aminosäurerückständen in Eiweißmolekülen begrenzt ist, wie es im Fall der viel größeren Membranen ist, so dass sich eine scharfe Reaktionsfront von der Zellwand zum Zentrum des Bakteriums ausbreitet.

Intuitiv sollte die Abtötungszeit T_{KILL} analog zu der durch eine chemische Reaktion verursachten Zeitverzögerung T_{RM} in einer Membran sein. Denn dies ist jeweils die erforderliche Zeitdauer, um das gesamte Volumen zu fluten und auszufüllen. Allerdings können wir erwarten, dass der geometrische Faktor in Abhängigkeit von der Form des Bakteriums unterschiedlich sein sollte. Für ein zylindrisches Bakterium mit einem Durchmesser d beträgt die Abtötungszeit:

$$T_{\text{KILL,C}} = 1/16 \times s_0 / c_0 \times d^2 / D \quad (4)$$

Siehe Gleichung (S18) im Ergänzungssteil. Und gemäß der Gleichung (S24) im Ergänzungssteil gilt für ein sphärisches Bakterium mit einem Durchmesser d :

$$T_{\text{KILL,S}} = 1/24 \times s_0 / c_0 \times d^2 / D \quad (5)$$

Wie wir sehen, sind (4) und (5) analog zu (3), außer dass die geometrischen Faktoren für einen Zylinder und für eine Kugel viel kleiner sind als für eine ebene Membran. Das ist ein Indikator dafür, dass die Oberfläche, von der aus der Diffusionsfluss startet, im Vergleich zu dem zu flutenden Volumen bei diesen geometrischen Formen relativ größer ist.

Wir substituieren die Schweineblasenparameter $D = 1,8 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ und $s_0 = 56 \text{ mM}$ in die Formeln (4) und (5). Zusammen mit der ClO_2 -Konzentration, welche bei den Wundheilungsexperimenten verwendet wird (siehe weiter unten), $c_0 = 4,45 \text{ mM}$ (Solumium Oral®, 300 ppm), und unter Verwendung von $d = 1 \mu\text{m}$ erhalten wir die Abtötungszeit für ein zylindrisches Bakterium mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$:

$$T_{\text{KILL,C}} = 4,4 \text{ ms.}$$

Demgegenüber beträgt die Abtötungszeit für ein sphärisches Bakterium mit einem Durchmesser von $1 \mu\text{m}$:

$$T_{\text{KILL,S}} = 2,9 \text{ ms.}$$

Wie wir feststellen können, ist die Abtötungszeit für ein Bakterium wegen dessen geringer Größe nur einige Millisekunden. Selbst wenn s_0 , die effektive Substratkonzentration eines Bakteriums, eine Größenordnung größer als von angenommen wäre, würde die Abtötungszeit weiterhin kleiner als $0,1 \text{ s}$ sein. Andere Annäherungen in unseren Berechnungen würden die tatsächliche Abtötungszeit zu hoch einschätzen. Der ClO_2 -Diffusionskoeffizient in der Schweineblase wurde zum Beispiel bei $24 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ gemessen. Wenn ClO_2 zur Desinfektion von

lebendem menschlichem Gewebe verwendet wird, ist die Temperatur höher. Demzufolge ist der Diffusionskoeffizient größer und die Abtötungszeit noch kürzer. Das Konzept der festen Substrate ist eine weitere Approximation: Innerhalb eines Bakteriums treten auch mobile Substrate wie Glutathion [25], freie Aminosäuren sowie diverse Antioxidantien auf. Diese kleinen Moleküle können ungehindert innerhalb des Bakteriums diffundieren. Nichtsdestotrotz wäre T_{KILL} weiterhin ein brauchbarer, leicht größerer Näherungswert, denn die Mobilität der Substrate kann die Zeitspanne nur verkürzen, die das ClO_2 benötigt, diese Substrate zu erreichen und mit ihnen zu reagieren. Wenn die Abtötungszeit T_{KILL} außerdem als die Zeit angesehen wird, wann die scharfe Front das Zentrum der Sphäre oder die Symmetrieachse eines zylindrischen Bakterium erreicht, wird sie mit Sicherheit überschätzt. Denn es ist keinesfalls nötig, alle verfügbaren Substrate eines Bakteriums zu oxidieren, um es zu töten. Es ist beispielsweise ausreichend, weniger als 40 % des Methioningehalts von Kolibakterien zu oxidieren, um diese 100%ig zu töten [26].

Kontaktdauer und Eindringtiefe des ClO_2 in menschliche Haut oder Wunden

Wenn ein Organismus nicht in wässriger ClO_2 -Lösung eingetaucht ist, sondern die Lösung lediglich auf der Oberfläche angewendet wird wie zum Beispiel beim Desinfizieren von Wunden, muss auch die Unbeständigkeit von ClO_2 beachtet werden. Die effektive Kontaktdauer ist viel kürzer, wenn ClO_2 -Lösung anstatt wenig oder gar nicht flüchtiger Desinfektionsmittel verwendet werden. Wenn eine Wunde mit drei feuchten und drei trockenen Schichten von Gaze bedeckt wird, verdunsten nach unseren Berechnungen mehr als 80 % des ClO_2 wegen der enormen Flüchtigkeit des ClO_2 sowie der hohen spezifischen Oberfläche der Gaze binnen einer Minute aus dem Verband. Um eine Obergrenze für die Eindringtiefe in menschliches Gewebe zu erhalten, gehen wir aus diesem Grund von der Annahme aus, dass die ursprüngliche ClO_2 -Konzentration ($c_0=4,45$ mM, Solumium Oral®) 60 s lang erhalten bleibt. Formalisiert ergibt sich die Kontaktdauer $T_{\text{CON}}=60$ s. Als nullte Abschätzung nehmen wir erneut an, dass das menschliche Gewebe die gleichen D- und s_0 -Werte wie das Schweineblasengewebe aufweist.

Unter Anwendung des parabolischen Geschwindigkeitsgesetzes (siehe Gleichung (S13) im Ergänzungsteil, wo $t=T_{\text{CON}}$) kann die Eindringtiefe p berechnet werden:

$$p = \sqrt{2c_0 D x T_{\text{CON}} / s_0} \quad (6)$$

$p(T_{\text{CON}}=60 \text{ s})=41,5 \mu\text{m}$. Wir merken an, dass (6) direkt aus (3) hergeleitet werden kann, wenn klar ist, dass für unser gegenwärtiges Problem $d=p$ und $T_{\text{RM}}=T_{\text{CON}}$ gilt.

Dessen ungeachtet sollte die tatsächliche Eindringtiefe in lebendes Gewebe – egal ob dessen Oberfläche eine Wunde oder intakte menschliche Haut ist – geringer sein als die obige Annäherung. Der Grund hierfür liegt in der kapillaren Durchblutung, welche im lebenden Gewebe besteht, nicht aber im toten Gewebe der Schweineblasenmembran, die wir bei unseren Messungen benutzten. Das Serum in den Blutgefäßen und ebenso die extrazelluläre Flüssigkeit enthalten viele Bestandteile, die schnell mit ClO_2 reagieren können, der Flüssigkeitstransport dieser reaktiven Komponenten in den Blutkapillaren der Dermis [27] kann eine begrenzte Reaktionsmittelkonzentration in der Region aufrechterhalten. Dann kann der diffusive Transport dieser Reaktionsmittel von der Dermis nach außen in die Epidermis [27] die sich nach innen ausbreitende Reaktionsfront abhalten, einen Gleichgewichtszustand aufzubauen.

Des Weiteren sollte das ClO_2 im Fall intakter menschlicher Haut zuerst durch die Hornhaut [28] dringen, jene 10-40 μm dicke äußerste Schicht der Epidermis, die aus mehreren Schichten toter Zellen besteht. Diese keratinöse Schicht bildet eine Schutzschicht, um das darunter liegende Gewebe vor Infektion, Austrocknung und Chemikalien zu beschützen. Der Diffusionskoeffizient von ClO_2 in diese Schicht sollte im Vergleich mit dem darunter liegende Gewebe wesentlich geringer sein.

Wie wir sehen können, beträgt die Eindringtiefe in menschliche Haut, auch wenn wir die Durchblutung vernachlässigen, nur einige Zehntelmikrometer. Eine derart oberflächliche Penetration kann menschliche Gewebe nicht wirklich schädigen. Auf der anderen Seite

übersteigt diese kurze Einwirkzeit die Abtötungszeit dennoch um mehrere Größenordnungen, $T_{CON} \gg T_{KILL}$, was ein notwendiges Kriterium für eine erfolgreiche Desinfizierung darstellt.

Therapeutisches Fenster

Die obigen Formeln und Berechnungen legen die Vermutung nahe, dass der Desinfektion von lebendem Gewebe mit wässriger ClO_2 -Lösung ein großes therapeutisches Fenster offen steht: Während überraschend niedrige Konzentrationen und kurze Einwirkzeiten genügen, um Bakterien zu töten, sind deutlich höhere Konzentrationen und längere Einwirkzeiten weiterhin sicher in der Anwendung.

Es gibt nur eine nennenswerte Ausnahme: Das Inhalieren von ClO_2 -Gasen in hoher Konzentration über eine ausgedehnte Zeitspanne kann für die menschliche Gesundheit schädlich sein, da die Alveolarmembran äußerst dünn ist (bloß 1-2 μm und an manchen Stellen sogar weniger als 1 μm). Die Wirkung von ClO_2 auf diese Membranen wird allerdings von der dort intensiven Durchblutung ein Stück weit ausgeglichen.

Behandlung von schlecht heilenden Wunden mit einer verdünnten ClO_2 -Lösung
2011 wurde ein medizinisches Forschungsprogramm in zwei ungarischen Krankenhäusern bewilligt, um zu testen, wie sicher und wirksam ClO_2 als lokales Antiseptikum ist. Ein Ziel war es unter anderen, Wunden, die auf andere Weise nicht heilten, mit einer verdünnten hochreinen Chlordioxidlösung (300 ppm, Solumium Oral®) zu versorgen. Bis heute wurden über 50 Patienten mit chronischen Wunden erfolgreich behandelt. Die nachfolgenden drei Abbildungen sind Vorergebnisse aus einem längeren und detaillierteren Bericht, dessen Vorbereitung in Arbeit ist. Ein bakterielles Spektrum, welches zu jeder Abbildung gehört, ist in Tabelle S3 im Ergänzungsteil zu finden.

Abbildung 4, Patient I:

65-jährige Patientin, die vor einigen Jahren an tiefer Venenthrombose litt. Sie wurde gegen ein wiederholt auftretendes Geschwür behandelt und in diesem Zustand ins Krankenhaus eingewiesen.

- a) 8. November 2011: Zustand bevor die Behandlung mit Solumium-Lösung angefangen wurde.
- b) 19. November 2011: Zustand während der Behandlung – Reinigung und Granulation der Wunde sind deutlich erkennbar. Der nekrotische Biofilm ist verschwunden. Von diesem Zeitpunkt an wurde der Wundverband auch mit flexiblen Wickeln abgeschlossen.
- c) 25. November 2011: Neben der Wundgranulation hat am Rand auch die Epithelialisation angefangen.
- d) 7. Dezember 2011: Die Epithelialisation ist weiter vorangeschritten und das Geschwür fast vollständig abgeheilt.

Abbildung 5, Patient II:

60-jährige Frau, deren schwerer Diabetes seit Jahren mit Insulin behandelt wurde. Sie wurde ins Krankenhaus eingeliefert und an den eiternden und nekrotischen Zehen operiert, was an der Fußbasis Neuropathie und Angiopathie ausgebildet hatte.

- a) 16. Januar 2012: Das Bild zeigt den Zustand nach der Entfernung der Zehen und der Resektion von toter Haut und subkutanem Gewebe. Zu diesem Zeitpunkt wurde die Behandlung mit Solumium-Lösung gestartet.
- b) 28. Februar 2012: Nach der Granulation der Wunde wurde sie mit einem mittelmäßig dickem Hautlappen bedeckt und die Behandlung mit Solumium-Lösung fortgesetzt.
- c) 17. September 2012: der geheilte Zustand. (Die eigentliche Wundheilung war deutlich eher abgeschlossen. Das Foto wurde später gemacht, als die Patientin zur Nachuntersuchung ins Krankenhaus kam.)

Abbildung 6, Patient III:

52-jähriger Mann mit Diabetes, welcher mit Tabletten behandelt wurde. Im April 2012 erlitt er einen Verkehrsunfall. Unter der Haut des Beines bildete sich ein ausgedehntes eitriges Hämatom. Zudem wurde das die Muskeln bedeckte Bindegewebe nekrotisch.

- a) 15. Mai 2012: Das Bild zeigt den Zustand nach der chirurgischen Untersuchung, bei welcher das nekrotische Gewebe herausgeschnitten wurde. Die Wunden wurde offen gelassen und die Behandlung mit Solumium-Lösung gestartet.
- b) 17. Mai 2012: Situation während der Behandlung – der Wundgrund fängt zu granulieren an.
- c) 16. Juni 2012: Nach der Reinigung der unteren Wunde konnte sie mittels Direktnaht geschlossen werden. Die obere Wunde, welche ebenfalls aufklarte und granuliert, wurde mit einem mittelmäßig dicken Hautlappen bedeckt, welcher vom Oberschenkel entnommen wurde. Die Solumium-Behandlung wurde fortgesetzt.
- d) 27. August 2012: der geheilte Zustand. (Die eigentliche Wundheilung war deutlich eher abgeschlossen. Das Foto wurde später gemacht, als der Patient zur Nachuntersuchung ins Krankenhaus kam.)

Die Vorergebnisse belegen, dass wässrige ClO_2 -Lösung zur Heilung chronischer Wunden verwendet werden kann. Um die Leistungsfähig von ClO_2 mit anderen Antiseptika zu vergleichen, bedarf es weiterer Studien, was auch vorgesehen ist. Trotzdem macht es Mut, dass alle behandelten Patienten gesund wurden und ClO_2 bei keinem Patienten eine entzündliche Reaktion verursachte.

Diskussion

In diesem Abschnitt setzen wir uns zuerst mit der Frage auseinander, ob ClO_2 als ein „exotisches“ oder viel versprechendes Antiseptikum angesehen werden sollte, das ein bei der Behandlung lokaler Infektionen übliches Antiseptikum werden kann. Zu diesem Zweck werden Sicherheits- und Wirksamkeitserfordernisse für örtliche Antiseptika zusammengetragen, um zu prüfen, ob ClO_2 diesen Anforderungen im Vergleich zu anderen Antiseptika genügen kann.

Danach wird ein biochemisches Wirkprinzip diskutiert, welches die antiseptische Wirkung von ClO_2 erklärt und partielle Übereinstimmungen mit den Wirkprinzipien von hypochlorigen sowie hypoiodigen Säuren aufweist. Diese „natürlichen“ Antiseptika reagieren unter anderem wie ClO_2 mit Sulfhydryl-Gruppen (SH-Gruppen). Aber ihre Reaktionsprodukte können abweichend sein. Die Bedeutung dieses Unterschiedes sowie die Schutzfunktion der Sulfhydryl-Gruppen und des Blutkreislaufs im mehrzelligen Organismus werden ebenfalls diskutiert.

Sicherheits- und Wirksamkeitserfordernisse für ein örtliches Antiseptikum

Ein lokales Antiseptikum, welches als sicher angesehen werden soll, muss die folgenden Anforderungen erfüllen:

- i) Es sollte nur örtlich wirken, um eine systemische Vergiftung auszuschließen.
- ii) Es sollte den Heilungsprozess nicht verhindern oder verzögern, das heißt es sollte nicht zytotoxisch sein.

Und um als wirksam angesehen zu werden,

iii) sollte es in relativ geringer Konzentration und sogar in Biofilm wirksam sein. (Biofilm ist von medizinischer Bedeutung, da er für mehr als 80 % der mikrobiellen Infektionen im Körper verantwortlich ist [29]).

iv) Mikroben sollten nicht in der Lage sein, eine Resistenz dagegen zu entwickeln (ein Problem im Zusammenhang mit dem biochemischen Wirkprinzip).

Wie die dargestellten Ergebnisse zeigten, erfüllt ClO_2 als größen selektives Antiseptikum die Anforderungen i) und ii). Somit werden hier die Kriterien iii) sowie iv) abgehandelt.

Vergleich der Biozid-Wirkung von ClO_2 mit der anderer Antiseptika (Kriterium iii)

Das stärkste keimtötende chemische Mittel in freien wässrigen Lösungen ist Ozon. In Biofilm ist die Wirksamkeit von Ozon allerdings eher schwach. Obendrein ist Ozon giftig und zerfällt rasch in wässrigen Lösungen. (Seine Halbwertszeit bei 25 °C und einem pH-Wert von 7,0

beträgt lediglich 15 min.) Alle diese unvorteilhaften Eigenschaften von Ozon verhindern in den meisten Fällen seine Verwendung als Antiseptikum.

Das nach Ozon zweitstärkste Entkeimungsmittel ist Chlordioxid. Tanner [30] führte vergleichende Tests von elf Desinfektionsmitteln an drei Testorganismen durch (einschließlich zweier Bakterien – *Staphylococcus aureus* sowie *Pseudomonas aeruginosa* – eine Hefe: *Saccharomyces cerevisiae*). Er fand heraus, dass das Desinfektionsmittel mit ClO_2 die größte Biozid-Wirkung gegen die Testorganismen hatte. ClO_2 zeigte neben den antibakteriellen und antimykotischen Eigenschaften auch eine starke antivirale Wirkung – etwa zehn Mal stärker als Natriumhypochlorit [31]. Und es schaltete praktisch alle Mikroben aus, einschließlich Algen, tierisches Plankton [32] sowie Urtierchen [33].

Darüber hinaus vermag ClO_2 Biofilm prompt zu entfernen, weil es leicht in Wasser löslich ist und im Gegensatz zu Ozon nicht mit den extrazellulären Polysacchariden des Biofilms reagiert. Somit kann ClO_2 schnell in Biofilm eindringen und die dort lebenden Mikroben töten.

Die Unmöglichkeit einer bakteriellen Resistenz gegen ClO_2 (Kriterium iv)

ClO_2 ist ein starkes wiewohl selektives Oxidationsmittel. Anders als bei anderen Oxidantien reagiert es nicht (oder äußerst langsam) mit den meisten organischen Bestandteilen von lebendem Gewebe. ClO_2 reagiert allerdings recht zügig mit Cystein [22] und Methionin [34] (zwei schwefelhaltige Aminosäuren), mit Tyrosin [23] und Tryptophan [24] (zwei aromatische Aminosäuren) sowie mit den zwei anorganischen Ionen Fe^{2+} und Mn^{2+} . Es wird allgemein angenommen, dass sich die antimikrobielle Wirkung von ClO_2 hauptsächlich durch seine Reaktionen mit den oben genannten vier Aminosäuren beziehungsweise ihren Rückständen in Proteinen und Peptiden begründet. Aus der Peptidgruppe muss unbedingt Glutathion erwähnt werden – ein kleines, Cystein enthaltendes Tripeptid –, welches ein wichtiges Antioxidationsmittel in Zellen mit einer intrazellulären Konzentration von 0,1-10 mM [35] ist.

Die Gruppe um Margerum [22], [23], [24] berichtete bei 25 °C und einem pH-Wert von 7,0 von der folgenden Geschwindigkeitskonstanten zweiter Ordnung: Cystein $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} \gg$ Tyrosin $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1} >$ Tryptophan $3,4 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Es ist leicht zu sehen, dass Cystein wegen seiner Thiol-Gruppe die bei Weitem reaktivste Aminosäure ist. Da die oben erwähnten vier Aminosäuren und insbesondere Cystein und biologische Thiole eine entscheidende Rolle in allen lebenden Systemen einschließlich Mikroben spielen, ist es für jede Mikrobe unmöglich, eine Resistenz gegen Chlordioxid auszubilden.

Als bedeutsame Analogie können wir erwähnen, dass es Bakterien auch noch nie gelungen ist, eine Resistenz gegen hypochlorige Säure (HOCl) zu entwickeln, welche ein wichtiges natürliches Antiseptikum ist und seit Jahrmillionen von Neutrophilen verwendet wird. Neutrophile, eine Art weiße Blutkörperchen, sind Phagozyten, die umflossene Mikroben töten, indem sie diverse hydrolytische Enzyme sowie hypohalogenige Säuren, vornehmlich HOCl verwenden [36], [37]. Auf dieser Grundlage verwendeten Robson und Kollegen HOCl als eine Art „natürliches“ Wundpflegemittel [38], [39]. Daher ist es plausibel, Wirkmechanismen und andere Eigenschaften von ClO_2 und HOCl als antiseptische Mittel miteinander zu vergleichen.

Der Vergleich von ClO_2 und HOCl als potenziell antiseptische Mittel

HOCl reagiert wie ClO_2 zügig mit Aminosäurerückständen von Methionin und Cystein, welche Schwefel enthalten – die Geschwindigkeitskonstante (bei 22 °C und einem pH-Wert von 7,4) beträgt $3,8 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ beziehungsweise $3,0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ – und ebenso mit Tryptophan ($1,1 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) und Tyrosin ($44 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) [40]. Trotzdem reagiert HOCl anders als ClO_2 schnell mit vielen anderen Aminosäurerückständen, sogar mit Peptid-Bindungen [40] und etlichen weiteren Bestandteilen wie Kohlenhydrate, Lipide, Nukleinbase sowie Amine [41].

Die wichtige Ähnlichkeit zwischen HOCl und ClO₂ besteht offensichtlich in der schnellen Reaktion der beiden mit der SH-Gruppe von Cystein. Das ist bedeutsam, da angenommen wird, dass die Beseitigung der ATP-Synthese und das Töten von Bakterien durch HOCl an deren Reaktion mit Sulfhydryl-Gruppen liegt [18]. Es ist eine logische Annahme, dass auch ClO₂ die ATP-Synthese stoppen kann, da es mit genau denselben SH-Gruppen reagiert wie HOCl.

Allerdings gibt es zugleich wichtige Unterschiede zwischen HOCl und ClO₂:

- i) HOCl ist weit weniger spezifisch und reagiert schnell mit zahlreichen anderen Substraten. Bakterien mit HOCl zu töten, erfordert aus diesem Grund mehr Reagenz als mit ClO₂.
- ii) Während ClO₂ aus seiner wässrigen Lösung schnell verdunstet und Bakterien auch im gasförmigen Aggregatzustand erreichen und töten kann – beispielsweise mittels Luftblase, die den Zahnwurzelkanal blockiert [42] –, ist die Verdunstung von HOCl unerheblich klein. Demzufolge bleibt HOCl lange im desinfizierten Bereich, auch wenn bereits alle Bakterien getötet sind, was dort zu Entzündung führen kann [43].
- iii) HOCl ist ein stärkeres Reagenz und ruft irreversiblen Schaden hervor. Zum Beispiel oxidiert ClO₂ Glutathion (GSH) hauptsächlich zu Glutathiondisulfat (GSSG) [22], was wiederum leicht und auf natürliche Weise im Körper zu GSH reduziert werden kann. Andererseits kann HOCl Disulfid-Bindungen attackieren und GSH überwiegend zu Glutathionsulfonamid (GSA) [44] oxidieren, was zum unumkehrbaren Verlust von zellulärem GSH führt.

Sulfhydryl-Gruppen und Durchblutung können mehrzellige Organismen gegen irreversible, von ClO₂ zuzufügte Schädigungen schützen

Wie bereits erwähnt hat die Reaktion von ClO₂ mit der SH-Gruppe die höchste Geschwindigkeitskonstante unter den ClO₂-Aminosäure-Reaktionen. (Cystein oder GSH [22] reagieren etwa 50 Mal schneller als das zweitplatzierte Tyrosin.) Solange SH-Gruppen vorliegen (überwiegend in Form von GSH), reagieren diese umgehend mit ClO₂ und bewahren folglich andere Aminosäurerückstände vor oxidativen Schäden. Außerdem kann die Oxidation von SH-Gruppen zu Disulfid-Bindungen umgekehrt werden. Müller und Kramer [45], [46] haben ein interessantes Beispiel vorgestellt. Sie fanden heraus, dass die zytotoxische Wirkung von Providon-Iodin nach 30-minütigem Kontakt mit Mäuse-Fibroblast nur temporär war, nachdem eine 24-Stunden-Kultur ohne das Antiseptikum eine unerwartete Revitalisierung des Fibroblasts zeigte [45].

Laut Winterbourn und Kollegen [47] oxidiert HOI (das reaktive Hydrolyseprodukt von Jod) auch GSH zu GSSG, jedoch nicht zu GSA. Diese Parallele zwischen reversiblen HOI-GSH- sowie ClO₂-GSH-Reaktionen wirft die Frage auf, ob eine analoge Revitalisierung auch im Fall von ClO₂ möglich sein könnte. Diese Frage ist umso berechtigter, seit Ratten in einigen Tierexperimenten [16] 90 Tage lang Wasser tranken, welches 200 ppm ClO₂ enthielt, ohne dass sie irgendwelche Magen-Darm-Probleme entwickelten. In diesen Experimenten muss wohl das gesamte ClO₂ mit dem Tiergewebe reagiert haben, denn aus dem Magen der Ratten kann es nicht verdunsten. Für die Interpretation dieses Ergebnisses macht es Sinn, davon auszugehen, dass SH-Gruppen durch den Blutkreislauf der Nagetiere transportiert wurden und die Epithelzellen im Magen-Darm-Trakt vor einer unumkehrbaren Oxidation durch ClO₂ schützten.

Oberhalb eines bestimmten Limits, wenn ein zu hoher Prozentsatz der schützenden SH-Gruppen bereits oxidiert wurde, könnte ClO₂ allerdings den Eiweißstrukturen höherer Ordnung irreversible Veränderungen beibringen, indem es Tyrosin- und Tryptophanrückstände oxidiert [48]. Das würde mit Sicherheit mit den Bakterien auf der Oberfläche eines infizierten Gewebes geschehen, da ihre GSH-Zufuhr [26] durch ClO₂ enorm schnell erschöpft würde. Säugerzellen unterhalb der Oberfläche könnten allerdings durch die Hilfe des Blutkreislaufs überleben, der schützendes Sulfhydryl und andere reduktive Komponenten zu den Zellen transportiert, was diese kontinuierlich repariert oder sogar revitalisiert.

Somit gibt es neben ihrer Größe einen weiteren gewichtigen Unterschied zwischen einzelligen und komplexeren, mehrzelligen Organismen: Es ist der Blutkreislauf, welcher den Zellen eines mehrzelligen Organismus' helfen kann zu überleben, wohingegen diese Art von Hilfe für ein Bakterium nicht verfügbar ist.

Schlussfolgerung

Chlordioxid ist ein gröÙenselektives antimikrobielles Mittel, welches mikrometergroÙe Organismen im Handumdrehen töten kann. Aber deutlich größeren Organismen wie Tieren oder Menschen kann es keinen wirklichen Schaden zufügen, da es nicht in der Lage ist, tief in das lebende Gewebe einzudringen. Außerdem stellt der Blutkreislauf mehrzelliger Organismen einen zusätzlichen Schutz dieser Organismen vor ClO_2 dar.

Das prognostizierte sperrangelweite therapeutische Fenster der ClO_2 -Konzentration bei antiseptischen Anwendungen wurde mit viel versprechenden Ergebnissen in Experimenten der Wundheilung getestet. Diese Resultate sind allerdings vorläufiger Art – es bedarf detaillierter experimenteller Untersuchungen, um hochreine wässrige ClO_2 -Lösungen mit anderen Antiseptika zu vergleichen. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, derartige Studien zu initiieren – verbunden mit der Hoffnung, ClO_2 in Zukunft bei der Behandlung lokaler Infektionen anwenden zu können, insbesondere wenn das Problem einer bakteriellen Resistenz vorliegt.

Danksagungen

Die Autoren danken Marianna Megyesi für das Durchführen der physio-chemischen Experimente sowie Dr. György Berencsi, Dr. Mihály Kádár, Dr. Márta Milassin, Prof. Ferenc Rozgonyi und Dr. Gustáv Várnai für hilfreiche Diskussionen. Ebenfalls vielen Dank an Mary-Beth Sinamon als englische Muttersprachlerin für das Korrekturlesen unseres Manuskripts.

Beteiligung der Autoren

Z. N. konzipierte und entwickelte die physio-chemischen Experimente und verfasste das Manuskript. M. W. und K. K. steuerten das Reaktion-Diffusions-Modell sowie mathematischen Herleitungen bei und führten die Datenanalyse durch. Z. B. behandelte die gezeigten Wunden und machte Fotos, um den Heilungsprozess zu dokumentieren. I. K., L. R. und J. S. organisierten die medizinische Recherche, führten Voruntersuchungen durch, schrieben die Protokolle der Wundheilungsexperimente. Alle Autoren beteiligten sich an Diskussionen und Manuskriptüberarbeitungen.

Quellen

1. Amyes S. G. B. (2010) „Antibacterial Chemotherapy. Theory, Problems and Practice.“ Oxford: Oxford Univ. Press.
2. Spellberg B. (2009) „Rising Plague. The Global Threat from Deadly Bacteria and Our Dwindling Arsenal to Fight Them.“ Amherst, NY: Prometheus Books.
3. Evans B. A., Hamouda A., Amyes, S. G. B. (2013) „The rise of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*.“ *Curr Pharm Des* 19(2): 223–238.
4. Luo G., Lin L., Ibrahim A. S., Baquir B., Pantapalangkoor P. und andere (2012) „Active and Passive Immunization Protects against Lethal, Extreme Drug Resistant-*Acinetobacter baumannii* Infection.“ *PLOS ONE* 7(1): e29446. doi:10.1371/journal.pone.0029446
5. McDonnell G., Russell A. D. (1999) „Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance.“ *Clin Microbiol Rev* 12: 147–179.
6. Koburger T., Hübner N. O., Braun M., Siebert J., Kramer A. (2010) „Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate.“ *J Antimicrob Chemother* 65: 1712–1719.
7. Lansdown A. B. G. (2010) „Silver in Healthcare: Its Antimicrobial Efficacy and Safety in Use. Issues in Toxicology.“ Cambridge: RSC Publications.
8. Das S. (2011) „Application of ozone therapy in dentistry. Review.“ *Ind J Dent Adv* 3: 538–542.

9. Mehra P., Clancy C., Wu J. (2000) „Formation of facial hematoma during endodontic therapy.“ *J Am Dent Assoc* 131: 67–71.
10. Cadenas E. (1989) „Biochemistry of oxygen toxicity.“ *Annu Rev Biochem* 58: 79–110.
11. Harris A. G., Hinds F. E., Beckhouse A. G., Kolesnikow T., Hazell S. L. (2002) „Resistance to hydrogen peroxide in *Helicobacter pylori*: role of catalase.“ *Microbiology* 148: 3813–3825.
12. Simpson G. D., Miller R. F., Laxton G. D., Clements W. R. (1993) „A focus on chlorine dioxide: the ‚ideal‘ biocide.“ *Corrosion* 93, New Orleans, LA, 8. März 2012. Paper No. 472. www.clo2.gr/en/pdf/secure/chlorinedioxideidealbiocide.pdf, Zugriff 15. April 2013.
13. Noszticzus Z., Balogh S., Gyökérné Wittmann M., Kály-Kullai K., Megyesi M., Volford A. (2006) „Permeation method and apparatus for preparing fluids containing high purity chlorine dioxide.“ <http://patentscope.wipo.int/search/en/WO2008035130>, Zugriff 15. April 2013.
14. www.solumium.com, Zugriff 15. April 2013.
15. Csikány Cs., Várnai G., Noszticzus Z. (2009) „SOLUMIUM DENTAL: a hipertizta klórdioxid oldat és alkalmazása a fogorvosi gyakorlatban II.“ („SOLUMIUM DENTAL: Application of high purity chlorine dioxide solution in the dental practice II.“, auf Ungarisch) *Dental Hírek* 2009/5: 36–38.
16. Daniel F. B., Condie L. W., Robinson M., Stober J. A., York R. G. und andere (1990) „Comparative 90-day subchronic toxicity studies on three drinking water disinfectants, chlorine, monochloramine and chlorine dioxide in the Sprague-Dawley rats.“ *J Am Water Works Assoc* 82: 61–69.
17. Lubbers J. R., Chauhan S. R., Bianchine J. R. (1982) „Controlled clinical evaluations of chlorine dioxide, chlorite and chlorate in man.“ *Environ Health Perspect* 46: 57–62.
18. Barrette W. C. Jr., Hannum D. M., Wheeler W. D., Hurst J. K. (1989) „General mechanism for the bacterial toxicity of hypochlorous acid: abolition of ATP production.“ *Biochemistry* 28: 9172–9178.
19. www.ett.hu/tukeb.htm, Zugriff 15. April 2013.
20. Eastoe J. E. (1955) „The amino acid composition of mammalian collagen and gelatin.“ *Biochem J* 61: 589–600.
21. Crank J. (1975) „Mathematics of Diffusion.“ Oxford: Clarendon. Seite 51.
22. Ison A., Odeh I. N., Margerum D. W. (2006) „Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide and chlorite oxidations of cysteine and glutathione.“ *Inorg Chem* 45: 8768–8775.
23. Napolitano M. J., Green B. J., Nicoson J. S., Margerum D. W. (2005) „Chlorine dioxide oxidations of tyrosine, N-acetyltirosine, and Dopa.“ *Chem Res Toxicol* 18: 501–508.
24. Stewart D. J., Napolitano M. J., Bakhmutova-Albert E. V., Margerum D. W. (2008) „Kinetics and mechanisms of chlorine dioxide oxidation of tryptophan.“ *Inorg Chem* 47: 1639–1647.
25. Chesney J. A., Eaton J. W., Mahoney J. R. (1996) „Bacterial glutathione: a sacrificial defense against chlorine compounds.“ *J Bacteriol* 178: 2131–2135.
26. Rosen H., Klebanoff S. J., Wang Y., Brot N., Heinecke J. W., Fu X. (2009) „Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18686–18691. Seite 18688, Abbildung 3B.
27. <http://en.wikipedia.org/wiki/Skin>, Zugriff 15. April 2013.
28. http://en.wikipedia.org/wiki/Stratum_corneum, Zugriff 15. April 2013.
29. „Research on microbial biofilms“ (PA-03-047) NIH, Zugriff 15. April 2013.
30. Tanner R. (1989) „Comparative testing and evaluation of hard-surface disinfectants.“ *J Ind Microbiol* 4: 145–154.
31. Sanekata T., Fukuda T., Miura T., Morino H., Lee C. und andere (2010) „Evaluation of the antiviral activity of chlorine dioxide and sodium hypochlorite against feline calicivirus, human influenza virus, measles virus, canine distemper virus, human herpesvirus, human adenovirus, canine adenovirus and canine parvovirus.“ *Biocontrol Sci* 15/2: 45–49.
32. Junli H., Li W., Nenqi R., Li LX, Fun S. R., Guanle Y. (1997) „Disinfection effect of chlorine dioxide on viruses, algae and animal planktons in water.“ *Water Res* 31: 455–460.
33. „EPA Guidance Manual, Alternative Disinfectants and Oxidants, 4.4.3.2 Protozoa Inactivation.“ www.epa.gov/ogwdw/mdbp/pdf/alter/chapt_4.pdf, Zugriff 15. April 2013.
34. Loginova I. V., Rubtsova S. A., Kuchin A. V. (2008) „Oxidation by chlorine dioxide of methionine and cysteine derivatives to sulfoxide.“ *Chemistry of Natural Compounds* 44: 752–754.

35. Meister A. (1988) „Glutathione metabolism and its selective modification.“ *J Biol Chem* 263: 17205–17208.
36. Nauseef W. M. (2007) „How human neutrophils kill and degrade microbes. An integrated view.“ *Immunol Rev* 219: 88–102.
37. Rosen H., Klebanoff S. J., Wang Y., Brot N., Heinecke J. W., Fu X. (2009) „Methionine oxidation contributes to bacterial killing by the myeloperoxidase system of neutrophils.“ *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 18686–18691.
38. Wang L., Bassiri M., Najafi R., Najafi K., Yang J. und andere (2007) „Hypochlorous acid as a potential wound care agent, Part I.“ *J Burns Wounds* 6: 65–79.
39. Robson M. C., Payne W. G., Ko F., Mentis M., Donati G. und andere (2007) „Hypochlorous acid as a potential wound care agent, Part II.“ *J Burns Wounds* 6: 80–90.
40. Pattison D. I., Davies M. J. (2001) „Absolute rate constants for the reaction of hypochlorous acid with protein side chains and peptide bonds.“ *Chem Res Toxicol* 14: 1453–1464.
41. Pattison D. I., Davies M. J. (2006) „Reaction of myeloperoxidase-derived oxidants with biological substrates: gaining chemical insight into human inflammatory diseases.“ *Curr Med Chem* 13: 3271–3190.
42. Hercegh A., Ghidan Á., Friedreich D., Gyurkovics M., Bedő Zs., Lohinai Zs. (2013) „Effectiveness of a high purity chlorine dioxide solution in eliminating intercanal *Enterococcus faecialis* biofilm.“ *Acta Microbiol Immunol Hung* 60(1): 63–75.
43. Pullar J. M., Vissers M. C. M., Winterbourn C. C. (2000) „Living with a killer: the effects of hypochlorous acid on mammalian cells.“ *IUBMB Life* 50: 259–266.
44. Pullar J. M., Vissers M. C. M., Winterbourn C. C. (2001) „Glutathione oxidation by hypochlorous acid in endothelial cells produces glutathione sulfonamide as a major product but not glutathione disulfide.“ *J Biol Chem* 276: 22120–22125.
45. Müller G., Kramer A. (2006) „Comparative study of in vitro cytotoxicity of povidone-iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (Repithel) and selected antiseptics.“ *Dermatology* 212 Suppl 1: 91–3.
46. Müller G., Kramer A. (2007) „Revitalisierung von Säugerzellen nach Einwirkung von Antiseptika.“ (Revitalisation of mammalian cells exposed to antiseptics, auf Deutsch) *GMS Krankenhaushyg. Interdiszip.* 2007;2(2): Doc35.
www.egms.de/static/en/journals/dgkh/2007-2/dgkh000068.shtml, Zugriff 15. April 2013.
47. Harwood D. T., Kettle A. J., Winterbourn C. C. (2006) „Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase-derived oxidants and detection using a novel“ LC–MS/MS method. *Biochem J* 399: 161–168.
48. Ogata N. (2007) „Denaturation of Protein by Chlorine Dioxide: Oxidative Modification of Tryptophane and tyrosine Residues.“ *Biochemistry* 46: 4898–4911.

Ergänzende Informationen

Reaktion-Diffusions-Modell für den Transport von ClO_2 in einem Medium, welches reaktive Proteine enthält

Eine allgemeine Reaktion-Diffusions-Gleichung für ClO_2

Die folgende partielle Differenzialgleichung (im Allgemeinen Reaktion-Diffusions-Gleichung genannt¹) gilt für die lokale ClO_2 -Konzentration c (c ist eine Funktion der Zeit t und der Raumkoordinaten), wenn ClO_2 durch ein Medium diffundiert, welches diverse Bestandteile enthält, mit denen es reagieren kann:

Ich lasse alle komplizierten Gleichungen/Formeln weg, da es dabei nichts zu übersetzen gibt und ich zum Beispiel gar keinen Bruchstrich in Word darstellen kann.

(S1)

Die Gleichung (S1) $\delta c/\delta t$ ist die Zeit, abgeleitet von der lokalen ClO_2 -Konzentration. R_i ist das Maß des ClO_2 -Verbrauchs in Abhängigkeit zur i -ten Reaktion am selben Ort. N ist die Anzahl der verschiedenen, ClO_2 verbrauchenden Reaktionen. D ist der Diffusionskoeffizient des ClO_2 im Medium. Und $\Delta^2 c$ ist der Laplace-Operator von c , welcher das dreidimensionale Descartesche Koordinatensystem mit den Raumkoordinaten x , y und z anwendet und in folgender Form geschrieben werden kann:

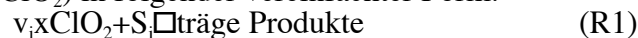
(S2)

Gleichung (S1) ist eine Bilanzgleichung für ClO_2 , wobei die nacheinander folgenden Terme auf der rechten Seite für die Wirkung der chemischen Reaktionen und des Diffusionstransportes stehen¹.

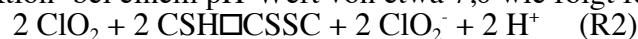
Eine vereinfachte Reaktion-Diffusions-Gleichung für ClO_2 – die effektive Substratkonzentration

Wie schon zuvor besprochen wurde, existieren vier verschiedene Aminosäuren und Aminosäurerückstände, mit denen ClO_2 schnell reagieren kann. In lebendem Gewebe hingegen gibt es sogar noch mehr chemische Komponenten², welche mit ClO_2 reagieren können – langsamer, aber immer noch messbar. Ein simples Modell vermag nicht, alle ClO_2 reduzierenden Substrate eines komplexen biologischen Systems individuell zu erfassen. Um das Modell zu vereinfachen, wird das Konzept der effektiven Substratkonzentration s eingeführt, welche für die lokale Kapazität aller verschiedenen Substrate in integrierter Form steht, ClO_2 zu reduzieren.

Um s zu bestimmen, nehmen wir die Stöchiometrie der i -ten Reaktion (die Reaktion des i -ten Substrats mit ClO_2) in folgender vereinfachter Form:



Der stöchiometrische Koeffizient v_i zeigt, wie viel Mol ClO_2 von einem Mol S_i reduziert werden können. Wenn das Substrat wie zum Beispiel Cystein eine Sulfhydryl- oder Thiol-Gruppe enthält, können wir die stöchiometrische Gleichung für eine zügige Ausgangsreaktion³ bei einem pH-Wert von etwa 7,0 wie folgt festhalten:



CSH steht dabei für Cystein, und CSSC ist sein Oxidationsprodukt – ein Disulfid namens Cystin. (Eines seiner Produkte ClO_2^- (Chlorit) ist genau genommen ein Zwischenprodukt, da es weiter mit Cystein reagieren kann, wenngleich sechs Größenordnungen langsamer als im ersten Schritt der ClO_2 /CSH-Reaktion³.) Wenn wir folglich nur die schnelle Ausgangsreaktion betrachten, so ist $v_{\text{CSH}}=1$, denn 1 mol CSH reduziert in (R2) 1 mol ClO_2 . Für Tyrosin⁴ und Tryptophan⁴ würde sich vereinfacht ergeben $v_{\text{TYR}}=v_{\text{TRP}}=2$. Aber auch bei diesen einfachen Fällen mit reinen Aminosäuren könnte es sich in Folge paralleler und aufeinander folgender Reaktionen^{3,4,5} schwierig gestalten, v sehr exakt zu berechnen, ganz zu schweigen davon, wenn diese Aminosäuren Rückstände in Proteinen oder Peptiden wären.

Für die Definition von s ist es jedoch ausreichend anzunehmen, dass ein solcher stöchiometrischer Koeffizient für jede Komponente existiert. Dann kann s , die effektive

Substratkonzentration des Mediums, als gewichtete Summe der jeweiligen Substratkonzentrationen s_i bestimmt werden, wobei v_i die Rolle des „Gewichtsfaktors“ spielt:
(S3)

Als weitere Vereinfachung nehmen wir des Weiteren an, dass R_i , das Maß der ClO_2 -Reduktion in Folge der i -ten Reaktion, als bilineare Funktion von s_i und c dargestellt werden kann:

(S4)

Dabei ist k_i die Geschwindigkeitskonstante zweiter Ordnung der i -ten Reaktion. Somit gehen wir davon aus, dass die Geschwindigkeit der ClO_2 -Substrat-Reaktion von einer Kinetik zweiter Ordnung geprägt ist. Diese Annahme ist für Cystein-, Tyrosin- sowie Tryptophansubstrate mit Bestimmtheit korrekt, wie die Margerum-Gruppe zeigte^{3,4,5}. Als Nächstes führen wir per Definition eine „effektive Geschwindigkeitskonstante“ k ein:

(S5)

Die Gleichung (S1) erhält folgende einfache Form:

(S6)

Vereinfachte Gleichgewichtsgleichungen für gebundene Substrate

Wir setzen voraus, dass alle Substrate im Medium gebunden sind und lediglich ClO_2 in der Lage ist zu diffundieren. Diese Annahme ist vertretbar, wenn das Reaktion-Diffusions-Medium (RD) menschliches oder tierisches Gewebe mit zellulärer Struktur ist.

Aminosäurerückstände sind für gewöhnlich Teile größerer Eiweißmoleküle, deren Diffusion äußerst langsam vonstatten geht. Kleinere Peptide, insbesondere Glutathion, sowie freie Aminosäuren können diffundieren – jedoch nur innerhalb einer Zelle, da die äußere Zellmembran für sie undurchdringlich ist. Hinsichtlich des weit reichenden Transports durch tierisches oder menschliches Gewebe können somit auch die kleinen Substrate als gebunden angesehen werden. Daher lautet die allgemeine Reaktion-Diffusions-Gleichung für ein Substrat:

(S7)

Da $D_i=0$, kann sie vereinfacht werden:

(S8)

Wenn wir beide Seiten der Gleichung (S8) mit v_i erweitern und dann alle Arten dieser Gleichungen zusammenfassen, erhalten wir die Gleichgewichtsgleichung für die effektive Substratkonzentration:

(S9)

Wenn das Medium hochreaktive SH-Gruppen in signifikanter Konzentration enthält, lässt sich beweisen, dass (S6) und (S9) weiter vereinfacht werden können: Die Form der Gleichungen bleibt bestehen, jedoch kann die effektive Geschwindigkeitskonstante näherungsweise bestimmt werden:

(S10)

Dabei steht k_{SH} für die Geschwindigkeitskonstante der Reaktion von ClO_2 mit den SH-Gruppen, und die effektive Substratkonzentration lautet:

(S11)

s_{SH} ist dabei die Konzentration der Sulfhydryl-Gruppen im entsprechenden Medium.

Näherungsweise Lösungen der vereinfachten Reaktion-Diffusions-Gleichungen

Sobald die vereinfachten RD-Gleichungen als Ausgangspunkt akzeptiert wurden, besteht der nächste logische Schritt darin, eine Lösung für diese Gleichungen zu finden, das heißt die Funktionen $c=c(t, x, y, z)$ und $s=s(t, x, y, z)$ unter Berücksichtigung der gegebenen Ausgangs- und Randbedingungen zu finden. Exakte analytische Lösungen für nichtlineare partielle Differenzialgleichungen zu finden, ist gewöhnlich nicht möglich. Und wir wollten in dieser Arbeit keine numerischen Lösungen verwenden. Aus diesem Grund sollten wir hier Näherungslösungen mit einfachen mathematischen Formeln finden und für die Interpretation unserer experimentellen Ergebnisse anwenden.

Der erste Fall ist, wenn eine sehr große Geschwindigkeitskonstante k vorliegt wie beispielsweise bei Substraten, die SH-Gruppen oder Tyrosinrückstände enthalten. Dann breitet sich eine scharfe Reaktionsfront im Medium aus, und die Lösung des RD-Problems

kann näherungsweise mit Gleichungen von der Art des parabolischen Geschwindigkeitsgesetzes erfolgen.

Der andere Fall einer Näherungslösung gilt für niedrige k -Werte. Dann werden die flachen Konzentrationsprofile hauptsächlich durch die Diffusion und nur leicht durch die Reaktion bestimmt, welche sich ohne scharfe Front im gesamten Medium verteilen kann. Wenn das Medium endlich ist, wie im Fall einer Membran, kann nach einer Übergangszeit ein annähernder Gleichgewichtszustand erreicht werden.

Quasigleichgewichtslösung der RD-Gleichungen, wenn die ClO_2 -Substrat-Reaktion schnell verläuft

Voraussetzungen des parabolischen Geschwindigkeitsgesetzes

Das so genannte parabolische Geschwindigkeitsgesetz⁶ gilt für bestimmte Reaktion-Diffusions-Probleme, wenn bei einer eigentlich schnellen, irreversiblen Reaktion (R3) des mobilen Reaktionsmittels C mit dem fixen Substrat S zum Produkt P

(R3)

nicht die Reaktion selbst, sondern die Diffusion des Reaktionsmittels C, um S zu erreichen, die Geschwindigkeit reduziert. In unserem Fall ist C das ClO_2 und S die reaktive Nebengruppe einer Aminosäure. Das diesbezüglich wichtigste Reaktionsmittel ist die SH-Gruppe von Cystein³.

Das Medium M spielt in diesem Prozess eine bedeutsame Rolle: Es immobilisiert das Substrat S, bleibt jedoch zugleich durchlässig für C. In unserem Fall ist das Medium M das Hydrogel des lebenden Gewebes, welches für ClO_2 durchlässig ist. Auch die Lipidmembranen der Gewebezellen prägen keine Barriere gegen das ClO_2 aus, da es in organischen Phasen auch sehr löslich ist. Auf der anderen Seite sind die reaktiven Aminosäuren, hauptsächlich Bausteine verschiedener Proteine, in dem Hydrogel immobilisiert.

Das eindimensionale parabolische Geschwindigkeitsgesetz für eine Scheibe mit der Dicke d

Die einfachste Geometrie angesichts des parabolischen Geschwindigkeitsgesetzes ergibt sich in jener Situation, wenn die Konzentration von C an der flachen Grenze der Scheibe konstant bleibt, beispielsweise $[C]=c_0$ auf der linken Seite, während auf der rechten Seite $[C]=0$ gilt. Das Material der Scheibe ist ein Medium, welches das gebundene Substrat S in einer homogenen Ausgangskonzentration s_0 enthält (siehe Abbildung S1). Die Dicke der Scheibe ist d .

scharfe Reaktionsfront

unreagiertes Substrat

Abbildung 1: Schematische ClO_2 - und Substrat-Konzentrationsprofile in einer Hydrogelscheibe mit der Dicke d zu einer Zwischenzeit t ($0 < t < T$), wobei p die Eindringtiefe ist.

Wenn C ClO_2 ist und von einer Seite der Scheibe gespeist wird, breitet sich eine scharfe Reaktionsfront von einer zur anderen Seite aus. Nur hinter der Front liegt eine messbare ClO_2 -Konzentration vor, so dass die Desinfektion der Scheibe nur vollständig ist, wenn die Reaktionsfront die andere Seite der Scheibe erreicht. Die dafür benötigte bezeichnende Zeit t kann mittels parabolischem Geschwindigkeitsgesetz errechnet werden. Das Ergebnis lautet:

also (S12)

Das heißt, dass sich die charakteristische Zeit t proportional zum Quadrat der Dicke verhält. Die nichtgeometrischen Parameter s_0 , c_0 und D sind gegeben, wobei D der Diffusionskoeffizient von C im Medium M ist. Alternativ verhält sich die Eindringtiefe p einer scharfen **Reaktion** proportional zur Quadratwurzel der Zeit t :

also (S13)

Natürlich ergibt die obige Formel nur den korrekten Wert für p , falls $t \leq T$ oder falls d unbegrenzt lang ist.

Ableitung des parabolischen Geschwindigkeitsgesetzes für eine Scheibe (oder Membran)

Wie das Konzentrationsprofil in Abbildung S1 zeigt, wird angenommen, dass die Reaktion lediglich in der Ebene $x=p$ auftritt. Das kann eine gute Annäherung darstellen, falls der größte Teil der Reaktion in einer engen Reaktionszone stattfindet, welche deutlich kleiner als d ist. Dies gilt bei einer schnellen Reaktion in Kombination mit einer relativ langsamen Diffusion.

Der ClO_2 -Fluss I_C über die Scheibe mit einem Querschnitt A im Bereich $0 < x < p$ kann mit dem Fickschen Diffusionsgesetz angegeben werden:

(S14)

I_C ist positiv, falls der ClO_2 -Fluss in Abbildung S1 von links nach rechts zeigt.

(S15)

In einem Quasigleichgewicht können wir ein lineares Konzentrationsprofil annehmen und somit:

(S16)

Als Nächstes können wir das Komponenten-Gleichgewicht anwenden. Wenn N_S die Mol-Anzahl der verbleibenden S-Moleküle im Volumen $V(N_S = s_0 V)$ ist, können wir notieren:

(S17)

Und dies ist das eindimensionale parabolische Geschwindigkeitsgesetz für eine Scheibe.

Das parabolische Geschwindigkeitsgesetz für einen unendlich langen Zylinder mit dem Radius R

In diesem Fall ist die charakteristische Zeit t , wenn die scharfe Reaktionsfront, welche anfing, sich von der Oberfläche nach innen auszubreiten, die Symmetrieachse des Zylinders erreicht.

also (S18)

Wir sollten die Verteilung der Konzentration mit zylindrischer Symmetrie berücksichtigen, wobei die örtliche Konzentration c ausschließlich eine Funktion des Radius r , also $c=c(r)$, und unabhängig vom Azimutalwinkel ϕ und der Höhe z ist:

(S19)

Analog zum eindimensionalen Fall, wo H die Zylinderhöhe ist. Wir werden ein Quasigleichgewicht der Konzentration im Bereich $R > r > R-p$ annehmen, wobei p die Eindringtiefe bezeichnet. Falls I_C in diesem Bereich unabhängig von r ist, gilt $r \times dc/dr = \text{const}$. Bezüglich der Grenzbedingungen $c(R-p)=0$ sowie $c(R)=c_0$ kann das gleichgewichtige Konzentrationsprofil in diesem Bereich wie folgt dargestellt werden:

(S20)

und

(S21)

Aus der obigen quasi gleichgewichtigen Annäherung folgt

(S22)

Das negative Vorzeichen zeigt an, dass I_C nach innen gerichtet ist: Es ist negativ, wenn $dc/dr > 0$.

Nun ist es Zeit, das Komponenten-Gleichgewicht anzuwenden. Wenn N_S die Mol-Anzahl der verbleibenden S-Moleküle im Volumen $V(N_S = s_0 V)$ ist, können wir schreiben:

(S23)

Das parabolische Geschwindigkeitsgesetz in der dritten Dimension für eine Kugel mit dem Radius R

also (S24)

Wir sollten die Konzentrationsverteilung mit sphärischer Symmetrie berücksichtigen, wobei die lokale Konzentration c ausschließlich eine Funktion des Radius r , also $c=c(r)$, und unabhängig vom Azimutalwinkel ϕ und dem Polarwinkel θ ist. Analog zum eindimensionalen Fall folgt:

(S25)

Wir werden ein Quasigleichgewicht der Konzentration im Bereich $R > r > R-p$ annehmen, wobei p die Eindringtiefe bezeichnet. Falls I_C in diesem Bereich unabhängig von r ist, gilt $r^2 \times dc/dr = \text{const}$. Bezüglich der Grenzbedingungen $c(R-p)=0$ sowie $c(R)=c_0$ kann das gleichgewichtige Konzentrationsprofil in diesem Bereich wie folgt dargestellt werden:

(S26)

und

(S27)

Aus der quasi gleichgewichtigen Annäherung folgt:

(S28)

Das negative Vorzeichen deutet darauf hin, dass I_C nach innen gerichtet ist: Es ist negativ, wenn $dc/dr > 0$.

Nun können wir das Komponenten-Gleichgewicht anwenden. Wenn N_S die Mol-Anzahl der verbleibenden S-Moleküle im Volumen $V(N_S = s_0 V)$ ist, können wir schreiben:

(S29)

Quasigleichgewichtslösung der eindimensionalen RD-Gleichung, wenn die ClO_2 -Substrat-Reaktion langsam verläuft

Die eindimensionale Reaktion-Diffusions-Gleichung (RDG) im Gleichgewicht lautet:

(S30)

Dabei ist r die Reaktionsgeschwindigkeit (R4)

(R4)

des mobilen Reaktionsmittel C mit dem gebundenen Substrat S2 zum Produkt P2

(S31)

In diesem Fall wird hingegen angenommen, dass die Reaktionsgeschwindigkeit relativ gering und das Substrat S2 in einem derartigen Überschuss vorhanden ist, dass sein Verbrauch während der Messzeit vernachlässigt werden kann. Also:

(S32)

und die Gleichgewichts-RDG:

(S33)

Wenn wir folgende Darstellung einführen,

$k^2 x(s_2)_0 / D \Delta k^2$

ergibt sich für die Gleichgewichts-RDG folgende Form:

(S34)

Die allgemeine Lösung der obigen Differentialgleichung lautet:

(S35)

Dabei können die Integrationskonstanten c_1 und c_2 an Hand der Randbedingungen ermittelt werden:

$c(0) = c_0$ sowie $c(d) = 0$.

Die Lösung hinsichtlich der obigen Randbedingungen:

(S36)

Falls die Reaktion sehr langsam verläuft, kann folgende Annäherung zur Anwendung kommen:

falls (S37)

Das auf diese Weise erhaltene gleichgewichtige Konzentrationsprofil ist das lineare Konzentrationsprofil, welches für reine Diffusion in Abwesenheit jeglicher chemischen Reaktion Gültigkeit besitzt:

(S38)

Die Strömungsdichte j der Komponente C, welche die Scheibe verlässt, ist maximal, wenn keine chemische Reaktion vorliegt:

(S39)

Die Strömungsdichte ist geringer, wenn eine langsame Reaktion in der Scheibe abläuft:

(S40)

Abschließend stellt sich das Verhältnis der Strömungsdichten wie folgt dar:

(S41)

Ergänzende Tabelle 1

Die Werte sind in Abbildung 2 dargestellt.

V ist das kumulative Volumen des 0,01 molaren $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Titrants, welches bis zum Zeitpunkt t hinzugegeben wird.

1. Experiment t/s	2. Experiment t/s	V/ml
0	0	0
540	140	0,5
630	202	1
695	252	1,5
752	294	2
809	326	2,5
855	366	3
876	403	3,5
915	440	4
955	476	4,5
995	507	5
1038	542	5,5
1078	575	6
1118	608	6,5
1153	642	7
1192	675	7,5
1226	708	8
1262	747	8,5
1299	782	9
1342	814	9,5
1374	847	10
1412	880	10,5
1450	908	11
1480	940	11,5
1518	872	12
1552	1004	12,5
1588	1038	13

Ergänzende Tabelle 2

Die Werte sind in Abbildung 3 dargestellt.

V ist das kumulative Volumen des 0,01 molaren $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Titrants, welches bis zum Zeitpunkt t hinzugegeben wird.

1. Tag	2. Tag	3. Tag	
0	0	0	0
2490	530	250	0,5
2894	655	346	1
3198	750	418	1,5
3456	837	493	2
3670	916	568	2,5
3882	991	639	3
4080	1069	713	3,5
4273	1140	777	4
4452	1216	856	4,5
4636	1285	928	5
4812	1354	1003	5,5
4993	1420	1076	6
5171	1487	1147	6,5
5344	1556	1216	7
5522	1618	1286	7,5
5704	1680	1358	8
5889	1743	1427	8,5
6075	1810	1501	9
6266	1877	1579	9,5
6472	1942	1655	10
6658	2008	1734	10,5
6852	2077	1819	11
7059	2146	1894	11,5
	2218	1978	12
	2280	2061	12,5
	2346	2144	13
		2235	13,5

Ergänzende Tabelle 3

Das von den Wunden kultivierte bakterielle Spektrum aus den Abbildungen 4-6. Die Proben wurden jeweils beim Wechseln des Verbandes entnommen, bevor das ClO_2 angewendet wurde.

Patient I	zur Einlieferung	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
		<i>Escherichia coli</i>
		<i>Enterococcus faecalis</i>
	nach drei Tagen	<i>Proteus mirabilis</i>
	nach 14 Tagen	<i>Streptococcus alpha-hämolyisierend</i>
	nach 28 Tagen	<i>Staphylococcus aureus</i>
Patient II	zur Einlieferung	<i>Staphylococcus aureus</i>
	nach einer Woche	keine Erreger gefunden
	nach zwei Wochen	<i>Corynebacterium</i> -Arten
Patient III	zur Einlieferung	<i>Staphylococcus aureus</i>
	nach einer Woche	keine Erreger gefunden
	nach vier Wochen	<i>Morganella morganii</i>

Anmerkungen zur ergänzenden Tabelle 3

i) Wie zu erkennen ist, verändert sich die Bakterienflora durch die Anwendung von ClO_2 . Sie kann auch vorübergehend verschwinden (wie im Fall von Patient II und III), aber normalerweise werden die vorliegenden Bakterienarten durch andere ersetzt. Allerdings wird das Tempo der Wundheilung nach unseren Beobachtungen nicht von der An- oder Abwesenheit bestimmter Bakterien beeinflusst. Das deckt sich mit der Erfahrung anderer Autoren, die berichten, dass die Gegenwart von Mikroorganismen an der Wunde weder schädlich für die Genesung noch ein Indikator für eine unvermeidliche Infektion ist⁷. So wurden zum Beispiel in einer Studie mit 58 Patienten mit Beinvenengeschwüren 69 Bakterienarten isoliert – kein einziger zeigte klinische Anzeichen einer Infektion⁸.

ii) James und andere⁹ erbrachten den Beweis, dass chronische Wunden im Gegensatz zu akuten Wunden mit Biofilm besiedelt sind. Die mikroskopische Analyse der Proben der Wundausscheidung bei diesen chronischen Wunden offenbarte die Anwesenheit von dicht verklumpten Mikroorganismen, die von einer schützenden Matrix ummantelt waren, was mit Biofilm übereinstimmt⁹. Höchstwahrscheinlich fördert ClO_2 die Wundheilung, indem es alle Bakterien an der Oberfläche tötet, einschließlich derer, die in Biofilm leben. Da die Einwirkzeit von ClO_2 wegen seiner Flüchtigkeit nur kurz ist, kann es nicht verhindern, dass erneut Bakterien auftauchen. Aber seine regelmäßige Anwendung verhindert die Bildung von neuem Biofilm.

iii) Es ist erwähnenswert, dass sich unter den 50 mit ClO_2 behandelten Patienten zwei Fälle befanden, bei denen die Wunden mit MRSA besiedelt waren. Auch hier war ClO_2 in der Lage, diese zu dekolonisieren und die Wunden zu heilen.

Ergänzende Quellen

- (1) Nicolis, G., De Wit, A. „Reaction-diffusion systems“ Scholarpedia 2(9), 1475 (2007).
www.scholarpedia.org/article/Reaction-diffusion_systems
- (2) Tan, H.-K., Wheeler, W. B., Wei, C.-I. „Reaction of chlorine dioxide with amino acids and peptides: Kinetics and mutagenicity studies“ Mutation Research/Genetic Toxicology 188, 259–266 (1987).
- (3) Ison, A., Odeh, I. N., Margerum, D. W. „Kinetics and Mechanisms of Chlorine Dioxide and Chlorite Oxidations of Cysteine and Glutathione“ Inorganic Chemistry 45, 8768–8775 (2006).
- (4) Napolitano, M. J., Green, B. J., Nicoson, J. S., Margerum, D. W. „Chlorine Dioxide Oxidations of Tyrosine, N-Acetyltyrosine, and Dopa“ Chem. Res. Toxicol. 18, 501–508 (2005).
- (5) Stewart, D. J., Napolitano, M. J., Bakhmutova-Albert E. V., Margerum, D. W. „Kinetics and Mechanisms of Chlorine Dioxide Oxidation of Tryptophan“ Inorganic Chemistry 47, 1639–1647 (2008).
- (6) House, J. E. „Inorganic Chemistry“ Academic Press, Seite 259 (2008). Absatz 8.2.2 The Parabolic Rate Law
- (7) Fernandez, M. „A longitudinal assessment of chronic wound fluid to detect biochemical indicators of healing, PhD Thesis“ Queensland University of Technology, Seite 17 (2010).
- (8) Hansson, C., Hoborn, J., Moller, A. und Swanbeck, G. „The microbial flora in venous leg ulcers without clinical signs of infection. Repeated culture using a validated standardised microbiological technique.“ Acta Derm. Venereol, 75 (1) 24–30 (1995).
- (9) James, G. A., Swogger, E., Wolcott, R., Pulcini, P., Sestrich, J., Costerton, J. W. und Stewart, P. S. „Biofilms in chronic wounds“ Wound Repair Regen, 16 (1) 37–44 (2008).