

Ácido hipocloroso como un posible agente de cuidado de heridas

Abrir las ciencias Company, LLC

Martin C. Robson [a], Wyatt G. Payne [a], Francis Ko [a], Marni Mentis [a], Guillermo Donati [a], Susan M. Shafii [b], Susan Culverhouse [b], Lu Wang [C], Behzad Khosrovi [c], Ramin Najafi [c], Diane M. Cooper [d], Mansour Bassiri [c]

[a] Instituto para la regeneración de tejido, Reparación y Rehabilitación, Bay Pines, FL

[b] Universidad de South Florida, Tampa, FL

[c] NovaBay Pharmaceuticals, Inc, Emeryville, CA

[d] Healthpoint Ltd, Forth Worth, TX

Copyright © 2007 El Autor (s)

Se trata de un acceso abierto mediante el cual el artículo los autores conservan los derechos de autor de la obra. El artículo se distribuye bajo la licencia Creative Commons Attribution License, que permite el uso ilimitado, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original esté debidamente citados.

Resumen

Antecedentes: A los [antimicrobianos](#) tópicos que pueden disminuir la carga [biológica](#) bacteriana de las heridas crónicas sin que ello afecte a la herida a la capacidad de curar es un imperativo terapéutico. Un estabilizado forma de ácido hipocloroso (NVC-101) se ha demostrado in vitro y en ensayos de toxicidad estándar de poseer propiedades que podrían cumplir estos criterios. **Materiales y Métodos:** Utilizando un modelo estándar de roedores de una infección crónica granulación herida, diversos preparativos de NVC-101 Y múltiples regímenes de tratamiento fueron objeto de investigación para evaluar el papel de NVC-101 en la reducción bacteriana del tejido carga biológica y la superación de la inhibición de la infección en la cicatrización de heridas. Bacteriología cuantitativa de biopsias de tejido y la cicatrización de la herida trayectorias fueron utilizados para comparar los distintos NVC-101 y los preparativos para los regímenes de solución salina tratada con controles negativos y sulfadiazina de plata tratada con los controles positivos. **Resultados:** NVC-101 a 0,01% de ácido hipocloroso con un pH de 3,5 a 4,0 demostrado ser un eficaz antimicrobianos tópicos. Es más eficaz cuando se utiliza durante un breve período (15-30 minutos), y seguido con otra aplicación. Posiblemente esto se debió a su rápida neutralización por la herida cama medio ambiente. Aunque no son tan eficaces en la disminución de la carga biológica bacteriana del tejido como sulfadiazina de plata, NVC-101 se asoció con la mejora de la herida cierre. **Conclusiones:** Este estabilizado forma de ácido hipocloroso (NVC-101) podría tener aplicaciones potenciales como un antimicrobiano herida de riego y el tratamiento en caso de solución la eficacia de su pH puede mantenerse en la situación clínica. NVC-101 solución es igualmente efectivo a pH 3,5 o 4,0 y más eficiente poco después de su aplicación. A diferencia de otros antimicrobianos investigados en este modelo animal, NVC-101 controles de la carga biológica bacteriana del tejido sin inhibir el proceso de cicatrización de la herida.

La cicatrización de heridas es el resultado final de una serie de procesos celulares humoral iniciado por factores tales como factores de crecimiento de citoquinas. [1](#) Estos procesos celulares están inhibidos por una gran carga biológica bacteriana del tejido. [2](#) Las citoquinas y factores de crecimiento también son degradadas por bacterias. [3](#) El nivel de tejido carga biológica bacteriana se ha demostrado en múltiples estudios a ser más de 10^5 o, al menos, 1×10^6 bacterias por gramo de tejido. [4](#), [5](#) niveles tan elevados de tejido bacterias pueden estar presentes sin signos clínicos de infección, y cuando deletéreamente actual puede afectar la cicatrización de la herida [6](#).

Los intentos de controlar la carga biológica bacteriana del tejido han sido difíciles. Sistémicamente los antibióticos administrados de manera efectiva no disminuir el nivel de bacterias en una herida crónica granulación. [7](#) Por lo tanto, los antimicrobianos tópicos o apósitos biológicos temporal han sido los métodos de elección. [4](#), [8](#) tópico uso de antibióticos que se utilizan con eficacia sistémica para fines distintos de herida se desalienta la infección debido a un aumento de riesgo de desarrollar alergias o la posibilidad de que las bacterias de desarrollar resistencia al fármaco. [9](#) antisépticos y antimicrobianos nonantibiotic como povidona yodada, sulfadiazina de plata, o acetato de mafenide crema se haya demostrado citotóxica para el celular componentes de la cicatrización de heridas. [10](#) - [12](#)

Estabilizado ácido hipocloroso (NVC-101) preparado por la adición de hipoclorito de sodio a una solución de cloruro sódico en agua estéril seguido por adición de una solución de ácido clorhídrico y mantenido a un pH comprendido entre 3,5 y 5 se ha demostrado tener excelente in vitro propiedades antibacterianas. Su potencial limitación es el requisito de mantener su estrecho rango de pH en el entorno clínico herida.

El objetivo de los estudios informó aquí fue evaluar diferentes concentraciones de ácido hipocloroso estabilizado (NVC-101) administrados tópicamente a una infección crónica experimental granulación herida a diferentes pHs y con diferentes regímenes de tratamiento. Los efectos se evaluaron la capacidad de NVC-101 para controlar la carga biológica bacteriana del tejido y la capacidad del agente para superar la inhibición de la cicatrización de la herida causada por la infección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reactivos

Las diversas NVC-101 preparados en concentraciones que van desde 0,01% a 0,02% y un pH de 3,5 a 4,5 fueron aportados por NovaBay Farmacéutica, Emeryville, California. En resumen, el estabilizado HOCl se preparó en 150 mM NaCl de acidificación de grado reactivo a NaOCl el pH de 3,5 a 4,5 con HCl diluido. La concentración de cloro activo especies ($[\text{HOCl}]_{\text{T}} = [\text{HOCl}] + [\text{Cl}_2] + [\text{Cl}_3] + [\text{OCl}^-]$) en solución salina al 0,9% fue determinado mediante la conversión de todas las especies de cloro activo a OCl^- con 0,1 M NaOH y medir la concentración de OCl^- espectrofotómetro a 292 nm utilizando un molar absorbtivity de $362 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [13](#).

Métodos microbiológicos

Escherichia coli (ATCC 25922) se adquirió de la American Type Culture Collection, y crecido y se propaga de acuerdo con las recomendaciones ATCC. Las bacterias para su uso en el modelo animal se obtuvieron de nuevo 18 horas el caldo de cultivo, tamaño del inóculo y fue confirmada por back-plating.

Modelo animal de granulación herida crónica

Granulación heridas crónicas se prepararon tal como está descrita anteriormente. [7](#), [14](#) - [16](#) varones Sprague-Dawley, ratas que pesen entre 300 y 350 g fueron aclimatadas en la instalación durante una semana antes de su uso. Bajo intraperitoneal pentobarbital (Nembutal) [anestesia](#) (35 mg / kg), la rata se le rasuró dorso y depilado. A continuación se detallan espesor dorsal de grabación de medición de 30 cm^2 fue creado mediante la inmersión en agua hirviendo. Infectados por grupos Se sembró con 5×10^9 UFC de *E. coli* (ATCC 25922) después de las ratas se ha permitido que se enfríe durante 15 minutos. [16](#)

Los animales fueron enjaulados individualmente y teniendo en cuenta los alimentos y el agua ad libitum. Los animales no infectados se mantuvieron en una instalación separada físicamente. Todos los experimentos se llevaron a cabo de conformidad con el Cuidado y Uso Comité en el Departamento de Asuntos de Veteranos del Centro Médico, Bay Pines, Florida. Cinco días después de la grabación, el escaras fue eliminado de anestesiados los animales, resultando en una herida crónica

granulación. Caracterización histológica de esta herida con respecto a un ser humano granulación herida ya ha sido realizado [7](#).

Grupos de tratamiento

Hay dos tipos diferentes de experimentos utilizando varios regímenes de tratamiento fueron realizadas. En el experimento 1, 45 ratas fueron divididas en 9 grupos de 5 animales cada uno. Los grupos fueron tratados como sigue: Grupo I sirvió como controles no infectados y no recibió la inoculación de bacterias. Tras escharectomy, estos ratones fueron tratados con una solución salina (0,9% NaCl)-apósito de gasa empapada, que se cambian cada 24 horas. Grupo II es una infección de control y se inoculó, al igual que los grupos III a VIII. Después de escharectomy, las ratas del grupo II fueron tratados diariamente con los cambios de salinidad de apósito de gasa empapada. Grupo III los animales tuvieron su escharectomized heridas infectadas tratadas con apósitos de gasa saturado con 0,01% NVC-101, pH 3,5, cambiarse cada 24 horas. Grupos IV y IV ter fueron tratados idénticamente. Animales en estos 2 grupos tenían sus escharectomized heridas infectadas tratadas con un apósito humedecido con 0,01% NVC-101, pH 3,5, que permaneció en el lugar durante 30 minutos y luego fue reemplazado con un apósito empapado en NaCl 0,9% para 23,5 horas. Este régimen se repite cada 24 horas. Grupo V recibido un trato similar en el grupo III, salvo que el 0,01% NVC-101 tiene un pH de 4,0. El régimen para el grupo VI fue similar a los grupos III y V, excepto que el pH se ajustó a 4,5. Grupo VII fue un trato similar al grupo III, salvo que la concentración de NVC-101 se incrementó 0,02%, con el pH a 3,5. Por último, el grupo VIII animales fueron tratados con 1% crema de sulfadiazina de plata (Silvadene) sin vestirse y cambiarse cada 24 horas. Los apósitos de gasa húmeda en los grupos la VII se cubre con una capa de petrolatum-gasa impregnada (Adaptic), y luego cubierto con apósito Cobán. Un resumen de los grupos de tratamiento animal se muestra en la [Tabla 1](#).

Tras la evaluación de los resultados del experimento 1, in vitro de modificaciones técnicas fueron investigados. Se decidió que los trapos de limpieza frente a la herida a raíz de una solicitud inicial de ácido hipocloroso se estabilizó y, a continuación, su sustitución puede tener beneficios adicionales (datos no presentados).

Experimento 2 consistió en 8 grupos de 5 animales cada uno. Grupo I sirvió como control de la infección y escharectomized

heridas infectadas fueron tratados con 0,9% NaCl-empapado vestirse cambiarse cada 24 horas. Grupo II fue tratado con una gasa empapada en 0,01% NVC-101, pH 3,5, durante 15 minutos, seguido de suaves atraumatic trapos de limpieza de la herida, y luego tratados por otra aplicación del 0,01% NVC-101, pH 3,5, de 23,75 horas . Este régimen se repite cada 24 horas. Grupo III se tratan del mismo modo como el grupo II, a excepción de que el pH de NVC-101 solución se ajustó a pH 4,0. El régimen para el grupo IV es idéntico al del grupo III utilizando la solución de pH 4,0 como la primera aplicación. Sin embargo, después de eliminar la suave, el 0,9% de NaCl fue sustituido por el resto de 23,75 horas en vez de repetir una solicitud de NVC-101. Grupo V había solución salina normal (0,9% NaCl) aplicado el primer apósito durante 15 minutos, seguido de borrar, y luego otra solución salina-apósito empapado de 23,75 horas. Esto se repite cada 24 horas. Grupo VI fue tratado idéntico al del grupo II y tuvo una de 15 minutos de duración aplicación del 0,01% NVC-101, pH 3,5, seguido de trapos de limpieza, pero luego seguido por un apósito de gasa empapada con 0,01% NVC-101, pH 3,5, a la izquierda en lugar de 47,75 horas. Esto se repite cada 48 horas. Grupo VII imitado grupo VI, salvo que la segunda vestirse consistió en una solución salina-esponja empapada de 47,75 horas. Por último, el grupo VIII animales fueron tratados después de escharectomy con un 0,9% NaCl-empapado apósito durante 30 minutos, seguido por 23,5 horas de una segunda solución salina-empapado vestirse. No fue suave borrar intercaladas entre los apósitos en el grupo VIII. Un resumen de los grupos de tratamiento de animales en el experimento 2 se muestra en la Tabla [2](#).

Animal procedimientos

En el experimento 1, las ratas fueron premedicados con buprinorphine (0,1 mg / kg) y anestesiados con halotano por inhalación postescharectomy días 4, 8, 12, 16 y 20. Cualquier secos exudados que se formó atraumatically eliminado. Heridas la biopsia se realizó por bacteriología cuantitativa en el día de escharectomy (día 0) y en cada uno de los días de reanesthesia según los métodos descritos por Heggens y Robson. [5](#) la superficie de la herida fue limpiada con un 70% de [alcohol](#) isopropílico antes de la biopsia para excluir la superficie contaminación. Las biopsias fueron asépticamente pesada, homogeneizada, diluido en serie, y back-chapada en nonselective los medios de comunicación. Bacteriana

se completaron después de 48 horas de incubación y se expresan como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de tejido. [5](#)

Aunque las ratas fueron anestesiados por la herida biopsias, líneas generales de las heridas habían sido localizadas en las hojas de acetato, y el área cálculos se realizaron con planimetría digital computarizado (Sigma Scan Jandel Científico, Corte Madera, CA). Atención fue tomada sólo para registrar el perímetro de la herida que representa el avance de espesor total margen más que el borde de cualquier avance de epitelio. Esto evita el pequeño componente de adelanto proporcionado por la suave, color rosado, translúcido, pelo neopithelium. [16](#) Todos los animales fueron pesados en el momento de la biopsia y la herida de medición.

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de Nembutal y bilaterales thoracotomies cuando la herida había sanado por completo o se redujo a menos del 10% de su superficie original. Haywood et al demostraron que la medición de muy pequeñas heridas de rastreo manual presenta importantes errores sistemáticos y comprobó que las heridas seguido este último punto se mantuvo estática durante largos períodos de tiempo [17](#).

Los animales en el experimento 2 tuvo los mismos procedimientos que las realizadas en el experimento 1, excepto que se realizaron en diferentes puntos temporales, es decir, los días 0, 2, 4, 7, 9, 11 y 14, con el tamaño de la herida final registrada en día 16. El tiempo que los puntos fueron elegidos para captar los puntos anteriores vez más frecuentes y los cambios en el tamaño de la herida y bacteriología.

El análisis estadístico

El promedio de carga bacteriana para cada grupo de animales en ambos experimentos se determinó y expresado en UFC / g de tejido. Estos valores se compararon para cada experimento utilizando una sola dirección el análisis de la varianza. Análisis post hoc de las diferencias entre los grupos se llevaron a cabo utilizando el test de Tukey (todas las parejas, múltiple prueba de comparación), con $P < .05$ consideró significativo. Sigma Stat software estadístico (Jandel Científico, Corte Madera, CA) se utilizó para el análisis de datos.

Serial herida zona mediciones se trazan a lo largo del tiempo. Para cada animal de datos, una ecuación de Gompertz fue ajustado (típico $r^2 = 0,85$). [18](#) El uso de este enfoque, una mejor curva de

ajuste se generó para cada grupo. Comparación entre los grupos se realizó mediante análisis de tablas de vida y el rango de prueba de Wilcoxon. Estos análisis estadísticos se realizaron con SAS [19](#) y BMDP [20](#) paquetes en un ordenador personal.

RESULTADOS

Cuantitativas bacteriología

Bacteriología cuantitativa de la granulación crónica tratados con heridas diversas formulaciones de estabilizado HOCl (NVC-101) o Silvadene se determinaron. El promedio de carga bacteriana para cada una biopsia día en el experimento 1 se muestran en la Tabla [3](#). Parcelas de media \log_{10} en función del tiempo para los distintos grupos de tratamiento en el experimento 1 se muestran en la Figura [1](#) con el comparaciones estadísticas.

Es evidente que Silvadene es el mejor antimicrobiano tópico a disminuir la carga bacteriana del tejido. 0,01% NVC-101, pH 3,5, aplicado durante 30 minutos y luego eliminado de la herida resultó ser el siguiente régimen más eficaz para disminuir la carga bacteriana en el experimento 1. Este régimen se utilizó en ambos grupos IV y IVb y los resultados fueron similares (Tabla [3](#) y Fig [1](#)]. El bacteriana datos de experimento 2 son también figura en el cuadro [4](#). Parcelas de media \log_{10} en función del tiempo para los distintos grupos en el experimento 2 se ilustra en la Figura [2](#), con comparaciones estadísticas. Experimento 2 ampliado en gran medida el conocimiento del régimen de dosificación para NVC-101. Experimento 2 miró con más cuidado a la anterior, más frecuentes los puntos temporales. Tres regímenes en el experimento 2 fueron tan buena como o mejor que el mejor régimen en el experimento 1 a disminuir la carga bacteriana del tejido. Grupos II, III, IV y todos los cargos habían inferior a 10^3 UFC / g de tejido de 14 días. En los grupos II y III, que esencialmente los mismos regímenes de tratamiento, la carga bacteriana disminuyó más rápidamente que en el grupo IV. Para estos grupos (II y III), el régimen consistió en NVC-101 se coloca en la herida durante 15 minutos, atraumatically borrado, y luego volverá a 23,75 horas. La única diferencia entre los tratamientos para los grupos II y III fue el pH de NVC-101. No se observaron diferencias significativas entre pH 3,5 y pH 4.0 (Tabla [4](#) y Fig [2](#)].

Órgano de pesos

Hubo una ganancia equivalente en peso corporal entre todos los grupos durante el período de estudio, sin variaciones significativas entre los grupos, ya sea en el experimento 1 o el experimento 2

Zona de la herida

De ajuste óptimo de curación curvas demostrado que ninguno de los regímenes de tratamiento dio lugar a la zona de la herida aumentando en tamaño (Figs 3 y 4].

Control de animales infectados (grupo II en el experimento 1, grupo I en el experimento 2) retardo de curación en comparación con los controles noninfected (grupo I en el experimento 1). Curación curvas para los grupos IV y IV ter en el experimento 1 demostró aumentos estadísticamente significativos en la reducción de la fracción de heridas abiertas en comparación con los grupos I, III, V, VIII y ($P < .05$) y los grupos II, V, VII y ($P < .01$) (Fig3]. Grupos II, V, VII y demostrado una trayectoria más lento que todos los demás grupos, también estadísticamente significativa ($P < .05$) (Fig 3].

En el experimento 2, las curvas de curación para los grupos II y III demostrado estadísticamente significativas reducciones mayores en la fracción de heridas abiertas en comparación con los grupos IV, VI y VII ($P < 0,05$) y los grupos I, V, VIII y ($P < .01$) (Fig. 4]. Grupos I, V, VIII y demostrado una trayectoria más lenta curación que todos los demás grupos, que también fue estadísticamente significativa ($P < .05$).

DISCUSIÓN

Debido a los efectos perjudiciales de un tejido de alta carga bacteriana en el proceso de cicatrización de la herida, una eficaz agente antimicrobiano se convierte en un imperativo terapéutico. Este agente debe ser eficaz como una preparación tópica, sin embargo, a no ser citotóxicas para las células que participan en el proceso de cicatrización de heridas 21. Estabilizada ácido hipocloroso, como prueba en los 2 experimentos informó, puede ser ese agente. Su in vitro propiedades antibacterianas y tejidos perfil de seguridad sugieren su potencial como agente de cuidado de heridas. 13 Sin embargo, lo más probable es rápidamente neutralizado por la herida.

En el experimento 1, Silvadene fue, como era de esperarse, el medio más eficaz antibacteriana. Sin embargo, Silvadene no era tan

eficaz en la promoción de la herida se cierre como dos de la NVC regímenes-101 (IV y IV b) (Fig 3]. La curación que se produjeron con Silvadene fue probablemente debido a la eliminación de la carga bacteriana del tejido (Tabla 3]. La razón de las heridas no se curan totalmente o superior a la de los grupos IV y IV b se debe a que el conocido de propiedades citotóxicas de Silvadene. 11, 12 A partir de una revisión de los datos cuantitativos de bacteriología de ambos experimentos, es evidente que una breve aplicación de NVC-101, seguido por un segundo cambio de apósito es mejor que una única solicitud de NVC-101 izquierda en lugar de 24 horas (grupo III, el experimento 1) (Cuadros 3 y 4].²¹ Cuando el segundo es vestirse de nuevo NVC-101 (grupos II y III de experimento 2), la tasa de reducción bacteriana es más rápido que cuando la solicitud inicial de NVC-101 es seguido por normal salina (grupos IV y IV ter en el experimento 1, o grupo IV en el experimento 2) (Tabla 3 y 4, y Figs 1 y 2]. No hubo diferencia aparente en la cicatrización de la herida trayectoria si la segunda figura vestirse NVC-101 o solución salina (Figs 3 y 4].

Es evidente que el efecto de NVC-101 en las bacterias se produzca en un breve período de tiempo después de su aplicación.

Posiblemente dejando NVC-101 en el lugar durante 24 horas estimula una mayor plasma o suero respuesta a estímulos inflamatorios y que plasma entorno permite el crecimiento bacteriano lo largo del tiempo. Esto no es a diferencia de las sugerencias de Fleming's artículo clásico de 1919. ²¹ Por lo tanto, puede ser útil para el uso NVC-101 durante un corto período de tiempo. La inicial de matar bacterias NVC-101 no parece suficiente para permitir la regeneración de las bacterias cuando se sustituye por solución salina (grupos IV y IV ter, el experimento 1). El efecto antibacteriano es, evidentemente, debido a NVC-101, ya que cuando sólo se utilizó solución salina en 1 ó 2 aplicaciones, las bacterias se matan menos (grupo II, el experimento 1, los grupos V, VIII, el experimento 2) (Cuadros 3 y 4, Figs 1 y 2].

Las diferencias de pH entre 3,5 y 4,0 no son detectables. Sin embargo, cuando el pH de NVC-101 se elevó a 4,5, el control de la carga bacteriana del tejido parece ligeramente menos eficaz, con una cicatrización más lenta trayectoria. Por lo tanto, parece que un pH de 3.5 o 4.0 puede ser más útil. Sin embargo, estas diferencias pueden no ser significativos.

El papel de los trapos de limpieza atraumatic entre aplicaciones vestirse no es del todo clara. Si NVC-101 mata a las bacterias antes

o inmediatamente después de contacto inicial, entonces el suave limpiar puede eliminar el devitalized las bacterias y los posibles desechos, permitiendo que la segunda solicitud de NVC-101 para estar en contacto inmediato con cualquier resto de bacterias viables. Esto puede explicar el rápido descenso en los niveles de bacterias tejidos visto en los grupos II y III en el experimento 2. En conclusión, el piloto estudio in vivo los resultados de la 2 experimentos indican que el estabilizado de forma ácido hipocloroso (NVC-101) es igualmente eficaz a pH 3,5 o 4,0 y más eficaz poco después de su aplicación. A diferencia de otros antimicrobianos investigados en este modelo animal, NVC-101 controles de la carga biológica bacteriana del tejido sin inhibir el proceso de cicatrización de la herida.