

M. Nagl\* und W. Gottardi

## Verstärkung der bakteriziden Wirkung von N-Chlortaurin in Gegenwart von Entzündungsproben und ausgewählten N-H-Verbindungen

### Zusammenfassung

Der Einfluß organischer Substanzen auf die bakterizide Wirkung der körpereigenen Substanz N-Chlortaurin wurde untersucht. Im Gegensatz zur Wirksamkeit anderer aktiver N-Chlorverbindungen (z.B. Hypochlorit, Chloramin T) nahm die Wirksamkeit von N-Chlortaurin in Gegenwart der Aminoverbindungen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Alanin, Glycin und vor allem Ammoniumchlorid zu. Dieser bemerkenswerte Effekt wird durch eine Äquilibration zwischen N-Chlortaurin und den Aminosäuren bzw. dem Ammoniumion unter Bildung der entsprechenden N-Chlororderivate erklärt. Auch in menschlichen Entzündungsproben nahm die bakterizide Wirkung eher zu, da stärker wirkende N-Chlororderivate entstehen und zehrende Effekte dadurch überkompensiert werden. Zudem nahm die Empfindlichkeit gegenüber N-Chlortaurin nach mehrfacher Einwirkung in subletaler Dosierung nicht ab. Die Verwendung von N-Chlortaurin zur lokalen Behandlung topischer Infektionen ist daher naheliegend.

Schlüsselwörter: N-Chlortaurin, bakterizide Wirkung, Ammoniumchlorid, Aminosäuren, menschliche Entzündungsproben

### 1 Einleitung

N-Chlortaurin (NCT), das N-Chlorderivat der Aminosäure Taurin ( $\text{ClHN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$ ), ist ein schwaches Oxidationsmittel, welches von menschlichen Granulozyten und Makrophagen beim „oxidative burst“ produziert wird (1-4). Obwohl die Funktion von NCT in biologischen Systemen *in vivo* bisher noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, besteht kein Zweifel über seine mikrobiziden Eigenschaften *in vitro*: NCT erwies sich bereits in mikromolaren Konzentrationen als vermizid (*Schistosoma mansoni* (5)), bakterizid und fungizid (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, Vegetativformen von *Bacillus subtilis* (6)).

Diese Ergebnisse sowie die Verfügbarkeit von NCT als Natriumsalz (7) lassen an die Möglichkeit eines Einsatzes von NCT zur Behandlung von bakteriellen und Pilzinfektionen denken. Daher wurde in dieser Studie der Einfluß organi-

M. Nagl\* and W. Gottardi

## Enhancement of the Bactericidal Efficacy of N-Chlorotaurine by Inflammation Samples and Selected N-H Compounds

### Summary

The influence of organic matter on the antibacterial activity of the endogenous substance N-chlorotaurine was examined. In contrast to other active N-chlorine compounds (e.g. hypochlorite, chloramine T) the efficacy of N-chlorotaurine was enhanced in the presence of the amine compounds  $\alpha$ - and  $\beta$ -alanine, glycine and especially ammonium chloride. This remarkable effect was found to result from an equilibration between N-chlorotaurine and the amino acids, resp. ammonium, and formation of the corresponding N-chlorine derivatives by transhalogenation. In human exudates, too, the efficacy of N-chlorotaurine increased, which can be explained by an over-compensation of consumption effects by generation of these highly bactericidal N-chlorine derivatives. Moreover, repeated treatment at sublethal doses did not cause a decrease in efficacy of N-chlorotaurine. This suggests that application of N-chlorotaurine for local treatment of topical infections will be successful.

Keywords: N-Chlorotaurine, bactericidal effect, ammonium chloride, amino acids, human inflammation samples

### 1 Introduction

N-chlorotaurine ( $\text{ClHN-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SO}_3\text{H}$ , NCT), the N-chlorine derivative of the amino acid taurine, is a weak oxidant produced by human granulocytes and macrophages during oxidative burst (1-4). Although the function of NCT in biological systems *in vivo* has not been clarified yet, there is no doubt about its microbicidal effect *in vitro*: NCT has demonstrated vermizidal (*Schistosoma mansoni*, (5)), bactericidal and fungicidal properties (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Candida albicans*, vegetative forms of *Bacillus subtilis*, (6)) already at micromolar concentrations.

These results suggest that the endogenous substance NCT, available as a sodium salt (7), may be used to treat bacterial and fungal infections. Therefore, the influence of organic material on the bactericidal potential of NCT was investigated, keeping in mind that protein load is omnipresent *in vivo*. Normally, interactions between active chlorine compounds and protein constituents cause a chlorine consumption, which is associated with a decrease of bactericidal activity (8).

Dr. Markus Nagl, Prof. Dr. Waldemar Gottardi, Institut für Hygiene der Universität Innsbruck, Fritz-Pregl-Str. 3, A-6010 Innsbruck

schen Materials, welches in Form einer Proteinbelastung in vivo stets vorhanden ist, auf die bakterizide Wirkung von NCT untersucht. Normalerweise verursachen Interaktionen zwischen aktiven Chlorverbindungen und Proteinbestandteilen eine sog. Chlorzehrung, die mit einer Abnahme der bakteriziden Aktivität verbunden ist (8).

Im Hinblick auf eine eventuelle Anwendung von NCT als antimikrobielle Substanz in der Humanmedizin wurden zusätzlich der Einfluß einer wiederholten Einwirkung auf die Keime und die Langzeitstabilität von wäßrigen NCT-Lösungen untersucht.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Reagentien

NCT (MG = 181,52) wurde nach (7) hergestellt. Die Identität wurde durch IR-Spektrometrie, die Reinheit durch iodometrische Titration bestimmt (19,3% Cl<sup>-</sup> bzw. 99% Reinheit).  $\alpha$ - und  $\beta$ -Alanin, Glycin, Glycylglycin, Arginin, Ammoniumchlorid, Natriumthiosulfat und Puffer (Natriumdihydrogen- und Dinatriumhydrogenphosphat) stammten von Merck und Serva (Reinheitsgrad p.A. bzw. reinst). Bovines Albumin war „rein“ (min. 92%, Serva 11930). Die Konzentration der Pufferlösungen betrug 0,05–0,1 mol/l.

### 2.2 Entzündungsproben

Die aus nicht standardisierten Punktaten und Drainagen unterschiedlicher Körperregionen gewonnenen Proben stammten von der Bakteriologischen Untersuchungsanstalt des Institutes für Hygiene der Universität Innsbruck und wurden vor Gebrauch im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.3 Bakterien

Kulturen von *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) und *Candida albicans* (ATCC 10231) wurden in 3% Caseinpepton-Sojabohnenmehlpepton-Bouillon (CSB) 20 h lang bei 37 °C bebrütet bis zum Vorliegen von 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> KBE/ml (10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> KBE/ml bei *Candida albicans*).

### 2.4 Instrumente

Für die iodometrische Titration der Oxidationskapazität wurde eine automatische Bürette ABU 80 von Radiometer und für die photometrische Messung das Spektrophotometer DU 7500 von Beckman verwendet.

### 2.5 Evaluierung der bakteriziden Wirkung

Sowohl der qualitative als auch der quantitative Suspensionstest wurde gemäß den Richtlinien der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie angewendet (9). Die Bakterien und *Candida albicans* wurden einerseits in Pufferlösungen, welche NCT und die jeweilige Aminosäure bzw. Ammoniumchlorid enthielten, suspendiert und andererseits in Entzündungsproben, in denen nach der Suspendierung das NCT gelöst wurde (Kontrollen jeweils ohne NCT). Die Inaktivierung von NCT mit 0,5% Natriumthiosulfat war nur beim quantitativen Suspensionstest notwendig (6).

In view of a possible application of NCT as an antimicrobial agent in human medicine, the influence of repeated sublethal doses on the survival of microorganisms as well as the long-term stability of aqueous NCT solutions were also studied.

## 2 Materials and Methods

### 2.1 Reagents

NCT (MW = 181.52) was synthesized according to (7). Identity was proved by IR-spectrometry, purity by iodometric titration (19.3% Cl<sup>-</sup>, indicating 99% purity).  $\alpha$ -/ $\beta$ -alanine, glycine, glycylglycine, arginine, ammonium chloride, sodium thiosulfate and buffers (sodium dihydrogen phosphate and di-sodium hydrogen phosphate) were purchased from Merck and Serva. All chemicals were reagent grade and purest, resp., except albumin bovine, which was pure (minimum 92%, Serva 11930). The concentration of the buffer solutions was 0.05–0.1 mol/l.

### 2.2 Inflammation samples

Non-standardised puncture and drainage specimens of different body regions were obtained from the Institute of Hygiene of Innsbruck (Department for Bacteriological Investigations) and stored in a refrigerator before use.

### 2.3 Bacteria

Cultures of *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442) and *Candida albicans* (ATCC 10231) were incubated in 3% tryptic soy broth (TSB) at 37 °C for 20 hours. The resulting suspensions showed 10<sup>8</sup>–10<sup>9</sup> cfu/ml (10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> cfu/ml of *Candida albicans*).

### 2.4 Instruments

For iodometric titration of oxidation capacity an automatic burette ABU 80 (Radiometer) and for photometric measurement the DU 7500 spectrophotometer (Beckman) was used.

### 2.5 Evaluation of bactericidal effects

Both the qualitative and quantitative suspension test according to the guidelines of the German Society of Hygiene and Microbiology (9) were applied. Bacteria and *Candida albicans* were suspended on the one hand in buffer solutions containing NCT and the respective amino acid or ammonium chloride and on the other hand in inflammation samples in which NCT was dissolved subsequent to suspension (controls without NCT in each case). Inactivation of NCT (by 0.5% sodium thiosulfate) was necessary only for the quantitative suspension test (6).

#### 2.5.1 Buffer solutions

The qualitative suspension test was employed at room temperature and pH 7.0–7.2: After different exposure times, aliquots (0.1 ml) of the bacterial suspensions were pipetted into tubes containing 10 ml TSB, which were incubated at 37 °C for 72 h. From the exposure times of the

### 2.5.1 Pufferlösungen

Es wurde der qualitative Suspensionstest bei Zimmertemperatur und pH 7,0–7,2 angewendet: Nach unterschiedlich langen Einwirkungszeiten wurden Aliquots (0,1 ml) der Bakteriensuspensionen in Reagenzgläser mit 10 ml CSB pipettiert, welche bei 37 °C 72 h lang bebrütet wurden. Aus den Einwirkungszeiten des letzten getrübbten ( $t_n$ ) und ersten klaren Röhrchens ( $t_{n+1}$ ) wurde mit Hilfe der unten genannten Formeln die Abtötungszeit und der Fehler errechnet. Im Falle mehrerer durchgeführter Experimente wurden die jeweiligen Mittelwerte herangezogen.

$$t_{\text{kill}} = (t_n + t_{n+1})/2$$

$$\text{Err}_{t_{\text{kill}}} = \pm (t_{n+1} - t_n)/2$$

### 2.5.2 Entzündungsproben

Die Bestimmung der Keimreduktion erfolgte in diesem Fall mit dem quantitativen Suspensionstest bei 37 °C (Wasserbad). Nach unterschiedlich langen Einwirkungszeiten wurden Aliquots (0,1 ml) der Bakteriensuspension nach geeigneter Verdünnung mit 0,9% NaCl und 0,5% Natriumthiosulfat auf Caseinpepton-Sojabohnenmehl-peptonagar (CSA) ausplattiert. Die CSA-Platten wurden bei 37 °C 72 h lang bebrütet. Die Reduktionsfaktoren (Rf) wurden folgendermaßen errechnet:

$$\text{Rf} = \log \text{KBE}_{\text{kontr}} - \log \text{KBE}_{\text{NCT}}$$

$\text{KBE}_{\text{kontr}}$  = Anzahl der KBE/ml ohne Einwirkung von NCT  
 $\text{KBE}_{\text{NCT}}$  = Anzahl der KBE/ml nach Einwirkung von NCT

Der Einfluß unterschiedlicher Inokula wurde bereits untersucht (10), wobei die Abtötungszeiten von NCT in Pufferlösung im Falle von gewaschenen Keimen im Vergleich zu ungewaschenen zunahm (ca. Faktor 1,4 bei 1% NCT). Dieser Effekt kann dadurch erklärt werden, daß organische Substanzen des nicht gewaschenen Inokulums halogeniert werden und die antimikrobielle Wirkung verstärken. In dieser Arbeit wurden solche Effekte aufgrund ihres geringen Ausmaßes jedoch vernachlässigt.

### 2.6 Einfluß mehrfacher sublethaler Dosen auf die Abtötungszeit

Der Einfluß eines wiederholten Kontaktes mit 1% NCT bei nicht bakterizider Einwirkungszeit bei pH 7,2 und Raumtemperatur wurde mit Hilfe des qualitativen Suspensionsversuches ermittelt. Die Konzentration von 1% wurde gewählt, weil niedrigere Konzentrationen für die Praxis zu wenig effektiv sein dürften. Nach Einwirkungszeiten von 2 min (*Proteus mirabilis*), 10 min (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* und *Pseudomonas aeruginosa*) und 15 min (*Candida albicans*) wurde NCT durch Natriumthiosulfat inaktiviert. 0,1 ml dieser Suspension (sowie von 10- und 100fachen Verdünnungen) wurden auf CSA ausplattiert und bei 37 °C 24 h lang bebrütet. Teile von 20 Einzelkolonien, welche von der geeigneten Verdünnung angewachsen waren, wurden wiederum in CSB kultiviert und für die Wiederholung des oben beschriebenen Zyklus verwendet. Die Keime, die

last turbid ( $t_n$ ) und the first clear tube ( $t_{n+1}$ ) the killing time was computed by the formula shown below, which includes an error  $\text{Err}_{t_{\text{kill}}}$ . Whenever repeated tests had been conducted, killing time and error were averaged.

$$t_{\text{kill}} = (t_n + t_{n+1})/2$$

$$\text{Err}_{t_{\text{kill}}} = \pm (t_{n+1} - t_n)/2$$

### 2.5.2 Inflammation samples

Here, reduction in the microbial count was determined by the quantitative suspension test at a temperature of 37 °C (water bath). After different exposure times, aliquots (0.1 ml) of the bacterial suspensions were spread onto TSA-plates (tryptic soy agar) subsequent to dilution with 0.9% NaCl and 0.5% sodium thiosulfate. The TSB-plates were incubated at 37 °C for 72 h. Reduction factors were computed by:

$$\text{Rf} = \log \text{cfu}_{\text{contr}} - \log \text{cfu}_{\text{NCT}}$$

$\text{cfu}_{\text{contr}}$  = number of cfu/ml without NCT exposure  
 $\text{cfu}_{\text{NCT}}$  = of CFU/ml after exposure to NCT

The influence of different inocula has already been investigated (10), with killing times by NCT within buffer solutions being longer for washed microorganisms (about 1.4 times at 1% NCT) than for those not washed. This effect can be explained by halogenation of organic molecules of the inoculum not washed, thus resulting in stronger antimicrobial activity. However, with regard to the aim of the present investigation, the effects described above are not relevant because of their limited extent.

### 2.6 Influence of repeated sublethal doses on the killing time

The effect of a repeated contact with 1% NCT at non-lethal exposure times at pH 7.2 and room temperature was examined by the quantitative suspension test. The concentration of 1% was chosen, because for an application in practice lower concentrations would most likely not be sufficiently effective.

After exposure times of 2 min (*Proteus mirabilis*), 10 min (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*) and 15 min (*Candida albicans*) NCT was inactivated by addition of sodium thiosulfate. 0.1 ml of this suspension (as well as 10- and 100fold diluted fractions) were spread onto TSB plates which were incubated at 37 °C for 24 h. Parts of 20 single colonies (grown from the adequate dilution) were cultured again in TSB and used for the next experiment of the cycle described above. Bacteria that had survived the exposure to NCT for 15 times were compared with those of the original culture (meanwhile stored in the refrigerator) using the quantitative suspension test.

### 2.7 Stability of NCT

Aqueous solutions of 2.8% NCT were stored in a refrigerator (6 °C), at room temperature (20–25 °C) and in an incubator (37 °C) under exclusion of light. As a standard method for evaluating stability the very simple and pre-

insgesamt 15mal unter Einwirkung von NCT gestanden hatten, wurden zuletzt im quantitativen Suspensionsversuch mit denen der ursprünglichen Kultur (inzwischen im Kühlschrank aufbewahrt) verglichen.

### 2.7 Stabilität von NCT

Zur Überprüfung der Stabilität von NCT wurden wäßrige Lösungen von 2,8% NCT im Kühlschrank (6 °C), bei Raumtemperatur (20–25 °C) und im Brutschrank (37 °C) unter Ausschluß von Licht aufbewahrt. Als Standardmethode zur Ermittlung der Stabilität wurde die sehr einfache und genaue iodometrische Titration (11) verwendet. Als Vergleichsmethode diente die Messung der Extinktion bei 252 nm ( $\lambda_{\max}$  der N-Cl Bande von NCT,  $\epsilon = 393,6 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) bei Verwendung einer 0,01-cm-Kuvette. Beide Methoden korrelierten gut bis zu einem Abfall der Oxidationskapazität um ca. 20%; unterhalb dieses Wertes lieferte die Photometrie zu hohe Werte.

Die Stabilität von 0,5% NCT in Entzündungsproben wurde bei 37 °C bestimmt. Nach Einwirkungszeiten von 15–135 min wurden von der Probe jeweils 0,5 ml entnommen und 5 min lang bei 15000 U/min ( $12 \times 3g$ ) zentrifugiert. Vom Überstand wurde nach 100facher Verdünnung mit Aqua bidest. und Zugabe von Kaliumiodid im Überschub die Extinktion (1-cm-Kuvette) bei 350 nm bestimmt ( $\lambda_{\max}$  von  $I_3^-$ ;  $\epsilon = 2,29 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , (12)).

Die Transformation von NCT zu einer äquimolaren Konzentration von Trijodid verläuft nach:



## 3 Ergebnisse

### 3.1 Bakterizide Wirkung von NCT in Gegenwart von Aminosäuren, Ammoniumchlorid und Albumin

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 sowie Abbildung 1 und 2 dargestellt und zeigen zwei gegensätzliche Effekte – sowohl Zunahme als auch Abnahme der bakteriziden Eigenschaften.

Molverhältnis NCT : AS* Molar ratio NCT : AA*	Relativer bakterizider Effekt** von NCT in Gegenwart von Aminosäuren bzw. Albumin/ Relative bactericidal effect** of NCT in presence of amino acids resp. albumin				
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16
Arginin/arginine	1,0	<0,8	<0,8	-	-
Glycin/glycine	2,5	3,3	3,3	5,0	5,0
$\alpha$ -Alanin/ $\alpha$ -alanine	3,3	3,3	5,0	5,0	5,0
$\beta$ -Alanin/ $\beta$ -alanine	5,0	10,0	12,5	16,7	20,0
Konz. (%) von Albumin/ Conc. (%) of albumin	0,2	1,0	2,5	5,0	10,0
Albumin/albumin	0,8	0,5	<0,2	<0,2	<0,2

\* AS = Aminosäure/amino acid. \*\* Relativer bakterizider Effekt = Quotient der Abtötungszeit mit NCT ohne Zusätze und der Abtötungszeit mit NCT in Gegenwart der Aminosäure bzw. Albumin/ relative bactericidal effect = quotient of the killing time by NCT without additives and the killing time by NCT in presence of the amino acid and albumin, resp.

cise iodometric titration (11) was used. Additionally extinction at 252 nm ( $\lambda_{\max}$  of the N-Cl band of NCT,  $\epsilon = 393,6 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) using a 0.01 cm cuvette was monitored.

A comparison of both methods showed good correlation until a decrease of oxidation capacity of approximately 20% (Below this value the photometric method yielded values which were too high).

Stability of 0.5% NCT within inflammation samples was measured at 37 °C. After exposure times of 15–135 min 0.5 ml each were taken from the sample and centrifuged for 5 min at 15,000 Rpm ( $12 \times 3g$ ). After 100fold dilution with aqua bidest. and addition of excess potassium iodide extinction (1 cm cuvette) at 350 nm ( $\lambda_{\max}$  of  $I_3^-$ ;  $\epsilon = 2.29 \times 10^4 \text{ mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , (12)) was determined.

Transformation of NCT to an equimolare concentration of triiodide is as follows:



## 3 Results

### 3.1 Bactericidal effect of NCT in the presence of amino acids, ammonium chloride and albumin

The results are presented in Table 1, Figures 1 and 2 and show two opposite effects – increase as well as decrease of bactericidal properties.

#### 3.1.1 Increase of bactericidal efficacy

Addition of the non-basic amino acids glycine,  $\alpha$ - and  $\beta$ -alanine to NCT 1% clearly accelerated killing of bacteria (Tab. 1). In case of  $\beta$ -alanine (equimolar ratio) NCT was tested also at concentrations down to 0.01%, showing a 6–7fold reduction of the killing time for *Staphylococcus aureus* (Fig. 1).

An even more pronounced increase of the bactericidal effect could be seen by addition of ammonium chloride, which caused an up to more than 50fold reduction of

Tabelle 1: Einfluß von Aminosäuren und Albumin auf die bakterizide Wirkung von 1% NCT gegen *Staphylococcus aureus*; Mittelwerte von vier Experimenten; qualitative Suspensionstests bei pH 7,0 (Albumin: 7,2; Arginin: 8, 9, 10 mit zunehmender Molarität) und Raumtemperatur.

Table 1: Influence of amino acids and albumin on the bactericidal effect of 1% NCT against *Staphylococcus aureus*; mean values of four experiments; qualitative suspension tests at pH 7.0 (albumin: 7.2; arginine: 8, 9, 10 resp. with increasing ratio) and room temperature.

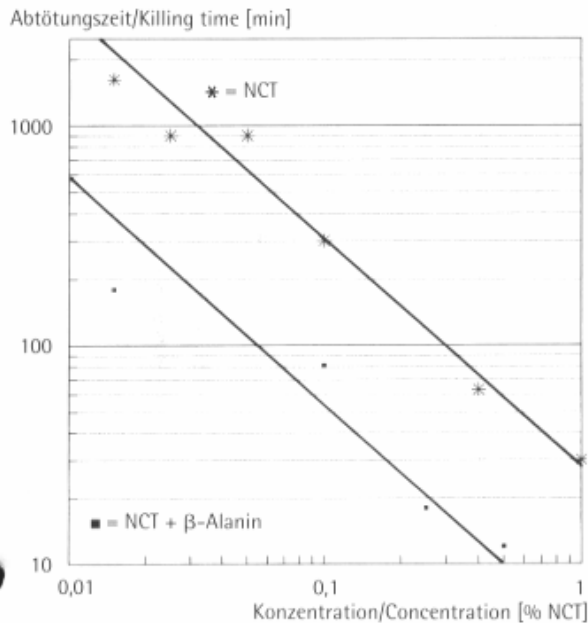


Abbildung 1: Bakterizide Wirkung von NCT verglichen mit NCT +  $\beta$ -Alanin (Molverhältnis = 1:1) gegen *Staphylococcus aureus* in Abhängigkeit von der Konzentration; qualitative Suspensionstests bei pH 7,0 und Raumtemperatur

Figure 1: Bactericidal effect of NCT compared to NCT +  $\beta$ -alanine (molar ratio = 1:1) against *Staphylococcus aureus* dependent on the concentration; qualitative suspension tests at pH 7.0 and room temperature

3.1.1 Zunahme der Bakterizidie

Die Zugabe der nichtbasischen Aminosäuren Glycin,  $\alpha$ - und  $\beta$ -Alanin zu 1% NCT beschleunigte das Abtöten der Bakterien deutlich (Tab. 1). Im Falle von  $\beta$ -Alanin (äquimolare Konzentration) wurden NCT-Konzentrationen bis zu 0,01% geprüft, wobei es durchwegs zu einer 6–7fachen Verkürzung der Abtötungszeit von *Staphylococcus aureus* kam (Abb. 1).

Eine noch stärkere Zunahme der bakteriziden Wirkung konnte durch Zugabe von Ammoniumchlorid erreicht werden, das eine Verkürzung der Abtötungszeiten bis über das 50fache herbeiführte (Abb. 2), was der Entstehung von  $\text{NH}_2\text{Cl}$  zugeschrieben wird. Wie photometrisch nachgewiesen werden kann, reagiert NCT mit Ammonium-Ionen wobei sich folgendes Gleichgewicht einstellt (W. Gottardi, unveröffentlicht):



3.1.2 Abnahme der Bakterizidie (Tab. 1)

Das basische Arginin führte eher zu einer Abnahme als zu einer Zunahme der Abtötungszeit. Dies kann durch die Zunahme des pH-Wertes (vor allem bei höheren Konzentrationen an Arginin) erklärt werden, was eine Verzögerung der Abtötungsgeschwindigkeit von NCT zur Folge hat (6). Anwesenheit von Albumin verringerte den bakteriziden Effekt bei pH 7,2 deutlich.

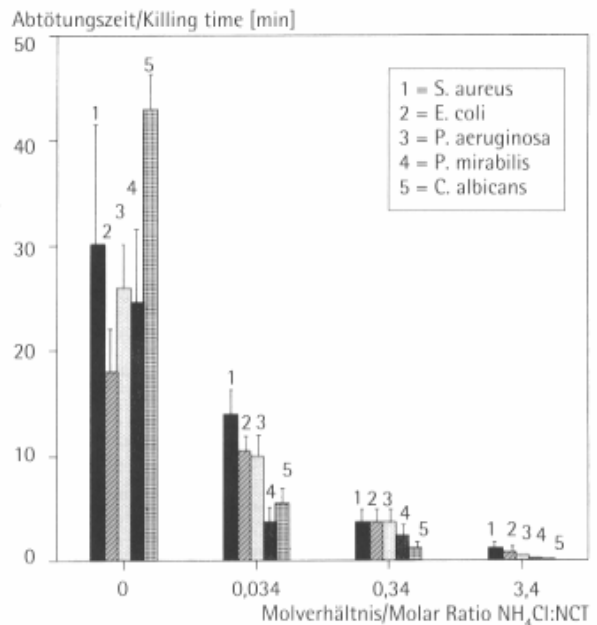
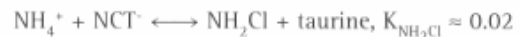


Abbildung 2: Bakterizide Wirkung von 1% NCT verglichen mit 1% NCT + Ammoniumchlorid bei einem Molverhältnis von 0,034 - 3,4; Mittelwerte von drei Experimenten (5–14 bei 0%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )  $\pm$  Standardabweichung; qualitative Suspensionstests bei pH 7,0 und Raumtemperatur.

Figure 2: Bactericidal effect of 1% NCT compared to 1% NCT + ammonium chloride at a molar ratio of 0.034–3.4; mean values of three experiments (5–14 at 0%  $\text{NH}_4\text{Cl}$ )  $\pm$  standard deviation; qualitative suspension tests at pH 7.0 and room temperature.

killing times (Fig. 2), which can be attributed to the formation of  $\text{NH}_2\text{Cl}$ . As can be demonstrated photometrically, there is a reaction of NCT with ammonia leading to the equilibration (W. Gottardi, unpublished):



3.1.2 Decrease of killing properties (Tab. 1)

Concerning the basic arginine, a retarding rather than an accelerating effect resulted. This can be explained by an increase of pH (especially at higher concentrations of arginine), which slows killing by NCT (6). At a pH of 7.2, presence of albumin significantly decreased the bactericidal effect.

In absence of NCT (control experiments) viability of bacteria was not impaired.

3.2 Bactericidal effect of NCT in inflammation samples

As shown in Table 2, in human inflammation samples 0.5% NCT killed grampositive and gramnegative bacteria at least within 60 min. Neither pH-value nor the type of exudate (NCT proved to be equally well soluble in all samples tested) markedly influenced the efficacy of NCT.

In absence of NCT (control experiments) viability of bacteria was not impaired.

Tabelle 3: Reduktionsfaktoren (Rf) von mit 1% NCT 15mal vorbehandelten Bakterien (Resist.) verglichen mit denen von un- behandelten Kontrollbakterien (Kontr.); Mittelwerte von je zwei Experimenten; quantitative Suspensionstests bei pH 7,2 und Raumtemperatur.

Table 3: Reduction factors (Rf) of with 1% NCT for 15 times pre-treated bacteria (Resist.) compared to those of not pre-treated control bacteria (Contr.); mean values of two experiments; quantitative suspension tests at pH 7.2 and room temperature.

Erreger/Pathogen	Rf <sub>10 min</sub>		Rf <sub>30 min</sub>	
	Resist.	Contr.	Resist.	Contr.
S. aureus	2,0	2,0	>6	5,4*
P. aeruginosa	>6	3,8	>6	>6
E. coli	>6	>6	>6	>6
P. mirabilis	>6	>6	>6	>6
C. albicans	0	0	>4	>4

\* nach 60 min >6/after 60 min >6

Bei allen Kontrolleexperimenten (Aminosäuren bzw. Albumin in Abwesenheit von NCT) war das Bakterienwachstum nicht beeinträchtigt.

### 3.2 Bakterizide Wirkung von NCT in Entzündungsproben

Wie Tabelle 2 zeigt, tötete 0,5% NCT in menschlichen Entzündungsproben grampositive und gramnegative Bakterien zumindest innerhalb von 60 min ab. Weder der pH-Wert noch die Art der Exsudate (NCT löste sich in allen Testproben gut) hatte entscheidenden Einfluß auf das Ergebnis.

Erreger, Punktat/ Pathogen, punctate	pH-Wert/ pH value	Reduktionsfaktor/Reductionfactor		
		10'	30'	60'
<i>S. aureus</i>				
Hirnabszeß/brain abscess	5,1	1,8	3,7	>5,2
Liquor/cerebrospinal fluid	7,8	0	1,5	>5,2
Inguinalabszess/inguinal abscess	7,6	0,4	2,7	5,1
Aszites/ascites	7,8	0,8	>3,3	
<i>P. aeruginosa</i>				
Synovia (Kniegelenk)/synovia of knee-joint	8,2	1,1	3,8	>5,3
Galle/bile (cholangitis)	7,9	>5,3		
Ovarialzyste/ovarial cyst	5,7	>5,3		
Bronchiallavage/bronchial lavage	7,8	>5,3		
<i>E. coli</i>				
Lungenabszeß/pulmonary abscess	7,3	2,9	>4,7	
Synovia (Kniegelenk)/synovia of knee-joint	8,2	0,3	>5,3	
Galle/bile (cholecystitis)	8,0	>5,2		
Pleuraempyem/pleural empyema	8,3	4,0	>5,3	
<i>Proteus mirabilis</i>				
Pleuraempyem/pleural empyema	6,9	>5,3		
Synovia (Handgelenk)/synovia of wrist	7,5	>5,3		
Abdominelle Drainage/abdominal drainage	8,1	>5,3		
Aszites/ascites	8,3	3,8	>5,3	
<i>Candida albicans</i>				
Aszites/ascites	7,6	2,7	>3,7	
Pleuraempyem/pleural empyema	7,7	>3,9		
Synovia (Kniegelenk)/synovia of knee-joint	7,7	3,1	>3,8	
Bülaudrainage/pleural effusion	7,7	>3,9		

Tabelle 2: Reduktionsfaktoren durch 0,5% NCT in menschlichen Punktat bei 37 °C (quantitative Suspensionstests).

Table 2: Reduction factors by 0.5% NCT in human puncture specimens at 37 °C (quantitative suspension tests).

### 3.3 Influence of repeated sublethal doses on the killing time

Treatment with 1% NCT for 15 times at non-lethal exposure time did not change the susceptibility of the tested bacterial strains (Tab. 3).

### 3.4 Stability of NCT

Stability of the aqueous NCT-solution largely depends on the temperature (Fig. 3): Whereas at 37 °C, no oxidation capacity at all could be detected already after three weeks, at room temperature after one, resp. two months 43%, resp. 24% of the baseline value were still found. Storage at 6 °C, however, only resulted in a decrease by 8-11% per month.

In inflammation samples (i.e. pleural exudates, subcutaneous empyema of thigh, tracheal secretion, cerebrospinal fluid, subcutaneous empyema of breast), oxidation capacity decreased considerably more quickly at 37 °C, because of halogen consuming proteins. The decrease after 15 min was 30-55%, after two hours 45-90% of the baseline value (27.5 mmol/l).

## 4 Discussion

### 4.1 Bactericidal effect in the presence of organic load

The surprising result, that organic load does not only decrease, but also enhance the bactericidal effect of NCT, can be explained by chemical reactions occurring in the presence of such organic material. The new compounds formed will influence the bactericidal behaviour. These

In Abwesenheit von NCT (Kontrollen) wurde das Bakterienwachstum nicht beeinträchtigt.

3.3 Einfluß mehrfacher subletaler Dosen auf die Abtötungszeit

Die insgesamt 15malige Behandlung mit 1% NCT in nichtletaler Einwirkungszeit veränderte die Empfindlichkeit der getesteten Bakterienstämme nicht (Tab. 3).

3.4 Stabilität von NCT

Die Stabilität der wäßrigen NCT-Lösung hängt weitgehend von der Temperatur ab (Abb. 3): Während bei 37 °C schon nach drei Wochen keine Oxidationskapazität mehr nachgewiesen werden konnte, wurden bei Raumtemperatur nach einem bzw. zwei Monaten noch 43% bzw. 24% des Ausgangswertes gemessen. Die Lagerung bei 6 °C hingegen führte zu einer Abnahme von nur 8-11% pro Monat.

In Entzündungsproben (Pleuraexsudate, subkutanes Empyem des Oberschenkels, Trachealsekret, Liquor, subkutanes Empyem der Brust) bei 37 °C sank die Oxidationskapazität erwartungsgemäß aufgrund der chlorzehlenden Proteine deutlich schneller ab: Die Abnahme betrug nach 15 min 30-55% und nach 2 h 45-90% des Ausgangswertes (27,5 mmol/l).

4 Diskussion

4.1 Bakterizide Wirkung in Gegenwart von organischer Belastung

Das überraschende Ergebnis, daß organische Belastung die bakterizide Wirkung von NCT nicht nur abschwächen, sondern auch verstärken kann, läßt sich durch chemische Reaktionen erklären, welche in Gegenwart organischen Materials auftreten, wobei die neu gebildeten Verbindungen das bakterizide Geschehen beeinflussen. Diese Reaktionen sind vereinfacht im folgenden Schema dargestellt, wobei nur die Änderungen der reagierenden funktionellen Gruppen aufgezählt sind:



X = R-O, R<sub>2</sub>N; R = H, alkyl, acyl

Wie man sieht, entstehen dabei einerseits nicht oxidierende und daher im allgemeinen nicht desinfizierende (-S-S-, C-Cl), andererseits aber ebenfalls oxidierende und daher bakterizide Verbindungen (-O-Cl, >N-Cl).

Da die Reaktionsprodukte dieser Transhalogenierungen jedenfalls weniger stark oxidierend wirken als die ursprünglichen Verbindungen, sollte der Einfluß organischen Materials zu einer Abnahme der bakteriziden Wirkung führen, was im allgemeinen auch beobachtet wird (Chlorzehrung). Um die Zunahme der Bakterizidie zu erklären, müssen neben der Reaktivität der N-Cl-Funktion auch noch andere Parameter wie Molekülgröße und Polarität für die Wirkung verantwortlich sein.

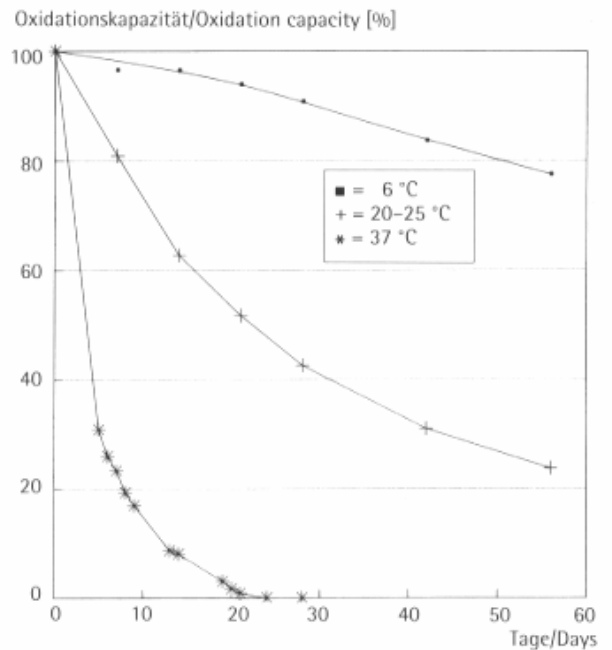
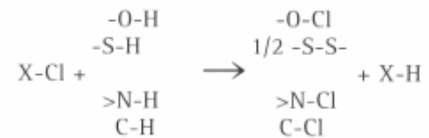


Abbildung 3: Stabilität einer 2,8%igen (155 mmol/l) wäßrigen NCT-Lösung bei verschiedenen Temperaturen, bestimmt durch iodometrische Titration der Oxidationskapazität (Mittelwerte von je zwei Messungen).

Figure 3: Stability of a 2.8% (155 mmol/l) aqueous solution of NCT at different temperatures, determined by iodometric titration of oxidation capacity (mean values of two measurements each).

reactions are shown in a simplified way in the following scheme, at which only the changes of the reacting functional groups are represented:



X = R-O, R<sub>2</sub>N; R = H, alkyl, acyl

As can be seen, these reactions produce non-oxidising compounds (-S-S-, C-Cl), generally exhibiting no disinfecting efficacy, as well as oxidising bactericidal compounds (-O-Cl, >N-Cl), which do exert bactericidal effects.

As in any case the reaction products of these transhalogenations have a less strong oxidising effect than the original compounds, the presence of organic material should cause a decrease in bactericidal efficacy. Indeed this is what is generally observed. Therefore, to explain the increase in the bacterial killing time, other parameters like bulk and polarity of molecules must be responsible for bactericidal effects in addition to the reactivity of the N-Cl-function.

- Molekülgröße: Offensichtlich sind kleine Moleküle mobiler und penetrieren leichter durch Zellbarrieren. Kleine Moleküle wie  $\text{NH}_2\text{Cl}$  werden die bakterizide Wirkung daher verstärken, größere wie N-Chlor-Albumin abschwächen.
- Polarität: Die Fähigkeit, Bakterienhüllen zu durchdringen, hängt auch von der Polarität (Ladungszustand) ab, wobei ungeladene Moleküle im Vergleich zu geladenen (ionisierten) im Vorteil sind. Abhängig vom pH-Wert und individuellem  $\text{pK}_a$ -Wert, liegen N-Chloraminosäuren bei für die Desinfektion relevanten Bedingungen (pH 6-9) teilweise in ionisierter Form vor. Aus den  $\text{pK}_a$ -Werten von Taurin (-0,3) und  $\beta$ -Alanin (+3,55) - Glycin (+2,36) und  $\alpha$ -Alanin (+2,35) sind etwas saurer als  $\beta$ -Alanin - kann geschlossen werden, daß die Dissoziationskonstante der Sulfonsäure NCT um ca. 3,85 Zehnerpotenzen höher liegt als die der Carbonsäure N-Chlor- $\beta$ -Alanin. Das bedeutet, der Anteil der ungeladenen (nicht dissoziierten) N-Chlorverbindung ist bei pH 7 im Falle der Carbonsäure  $\beta$ -Alanin ca. 7000mal höher (450mal im Falle von  $\alpha$ -Alanin und Glycin) als bei NCT. Dies erklärt die verbesserte Desinfektionswirkung dieser N-Chloraminosäuren im Vergleich zu NCT. Die noch bessere Wirkung von  $\text{NH}_2\text{Cl}$  (1, 13) wird nicht nur durch seine vergleichsweise geringe Polarität und daher lipophilen Eigenschaften, sondern auch durch seine Kleinheit verursacht (s.o.).
- Die Korrelation zwischen Molverhältnis und Zunahme der abtötenden Wirkung ist vereinbar mit der Hypothese der Transhalogenierung zu stärker bakteriziden N-Chlorverbindungen: Nimmt die Konzentration der Aminosäure (Tab. 1) bzw. des Ammoniumchlorids (Abb. 2) zu, verschiebt sich das Gleichgewicht gemäß Massenwirkungsgesetz in Richtung Produkt der Transhalogenierung.
- In Entzündungsproben war der bakterizide Effekt von NCT trotz der verhältnismäßig raschen Abnahme der Oxidationskapazität vergleichbar mit dem in wäßriger Lösung, in basischem Milieu sogar besser (6). Dies kann durch eine Überkompensation der Zehrungseffekte durch Bildung von stärker wirksamen Substanzen wie  $\text{NH}_2\text{Cl}$  und anderen N-Chloraminosäuren erklärt werden (z.B. Alanin und Glycin sind in menschlichen Leukozyten relativ hoch konzentriert (14, 15)).

#### 4.2 Einfluß mehrfacher subletaler Dosen auf die Abtötungszeit

Das offensichtliche Beibehalten der Wirksamkeit von NCT auf die Keime dürfte auf dem unspezifischen Reaktionsmechanismus, der typisch für aktive Chlorverbindungen ist, beruhen:

- Weil alle freien  $\text{NH}_2$ - und SH-Gruppen, welche sowohl in der Zellmembran bzw. Zellwand als auch im Inneren der Bakterienzellen vorhanden sind, oxidiert (chloriert) werden können, werden chemische Veränderungen einzelner Proteine nicht ausreichen, um eine Resistenz zu entwickeln.
- Eine Veränderung der Bakterienhülle, welche das Eindringen von NCT verhindert, dürfte ebenfalls nicht ausreichen, da bereits vor dem Eindringen von NCT in die Bakterienzelle ein Chloramingemisch gebildet wird (Transhalogenierung). Daher müßte eine solche Barriere eine Vielzahl von Substanzen betreffen.

- Bulk: It is evident that small molecules are more mobile and penetrate through cell barriers more easily. Such small molecules like  $\text{NH}_2\text{Cl}$  will increase, larger ones like N-chlorinated albumin decrease bactericidal activity.
- Polarity: The ability to penetrate bacterial membranes is also dependent on polarity (state of charge), with molecules not charged being favored over charged (ionised) ones. Depending on both pH value and individual  $\text{pK}_a$  value, N-chloroamino acids partially are present in ionised form at pH conditions relevant for disinfection (pH 6-9). From the  $\text{pK}_a$  values of taurine (-0.3) and  $\beta$ -alanine (+3.55) - glycine (2.36) and  $\alpha$ -alanine (2.35) are a little more acidic than  $\beta$ -alanine - it can be presumed that the dissociation constant of the sulfonic acid NCT is about 3.85 powers of ten higher than the one of the carbonic acid N-chloro- $\beta$ -alanine. That means that at pH 7 the proportion of N-chloro-compound which is not charged, i.e. not dissociated, is approximately 7000 times higher in the case of the carbonic acid  $\beta$ -alanine (450 times in case of  $\alpha$ -alanine and glycine) than of NCT. This explains the improved disinfecting properties of these N-chloroamino acids compared to NCT. The still better bactericidal qualities of  $\text{NH}_2\text{Cl}$  (1, 13) are a consequence of its comparatively low polarity, and thus lipophilic properties, but also of its small dimensions (see above).
- The correlation between molar ratio and increase of killing power is compatible with the hypothesis of transhalogenation to more bactericidal N-chlorine compounds: If the concentration of the amino acid (Tab. 1) or ammonium chloride (Fig. 2) is raised, the equilibrium is moved (mass action law) to the product of transhalogenation.
- In the inflammation samples, despite of a relatively rapid loss of oxidation capacity the bactericidal effect was comparable, at basic pH even superior to the pure aqueous system (6). This can be explained by an overcompensation of consumption effects by generation of highly bactericidal substances like  $\text{NH}_2\text{Cl}$  and other N-chloroamino acids (e.g. alanine and glycine are present in relatively high concentrations in human leucocytes (14, 15)).

#### 4.2 Influence of repeated sublethal doses on the killing time

The maintenance of NCT efficacy after repeated treatment of the same germs at sublethal doses can be explained by the unspecific reaction mode typical for active chlorine compounds:

- As a result of the possibility of oxidation (chlorination) of all free  $\text{NH}_2$ - and SH-groups present within both membrane or wall and inside bacterial cells, chemical alterations of individual proteins are not likely to induce resistance.
- Alteration of the bacterial envelope to inhibit penetration of NCT into the bacterium will not be successful, because already before the approach of NCT to the microbial cell, a mixture of N-chlorinated compounds will be produced (transhalogenation). Therefore such a barrier would have to be effective against a variety of substances.

### 4.3 Stabilität

Im Vergleich zu anderen N-Chloraminosäuren (16, 17) erwies sich NCT als überraschend stabil. Bei Lagerung im Kühlschrank ist eine für die praktische Anwendung ausreichende Stabilität der wäßrigen Lösung gewährleistet.

Vorteile von NCT bei eventueller Anwendung als antimikrobielle Substanz in der Humanmedizin:

- Die bakterizide Aktivität von NCT wird in Gegenwart von organischem Material eher gesteigert als vermindert.
- NCT ist eine körpereigene Substanz, so daß weder allergische noch toxische Nebenerscheinungen auftreten dürften.
- Eine Selektion resistenter Keime kann zumindest für die Dauer einer Therapie ausgeschlossen werden, wie unsere Tests beweisen.
- Aufgrund dieser Tatsachen könnte die Anwendung von NCT in der Humanmedizin, z.B. zur Behandlung lokalisierter Infektionen von Haut, Schleimhaut und Abszessen im Körperinneren, erfolgreich sein. ■

### 4.3 Stability

In comparison to other N-chloroamino acids (16, 17) NCT proved to be surprisingly stable. Storage in the refrigerator ensures sufficient effectiveness of the aqueous solution for an application in practice.

Advantages of NCT in case of possible usage as an antimicrobial agent in human medicine:

- The bactericidal activity of NCT is not diminished but enhanced in the presence of organic material.
- NCT is an endogenous substance, so that neither allergic nor toxic side effects are likely to occur.
- Selection of resistant germs (at least during therapy) can be excluded as our tests are showing.
- As a consequence of these facts, application of NCT in human medicine, e.g. for the treatment of topical infections of the skin and mucous membranes as well as abscesses inside body cavities, might be successful. ■

## References/Literatur

1. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL: Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. *J Biol Chem* 1984; 259 (16): 10404-10413.
2. Lampert M; Weiss SJ: The chlorinating potential of the human monocyte. *Blood* 1983; 62: 645-651.
3. Test ST, Lampert MB, Ossana PJ, Thoene JG, Weiss SJ: Generation of nitrogen-chlorine oxidants by human phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 74:1341-1349.
4. Weiss SJ, Lampert MB, Test ST: Long-lived oxidants generated by human neutrophils: characterization and bioactivity. *Science* 1983; 222: 625-628.
5. Yazdanbakhsh M, Eckmann CM, Roos D: Killing of schistosomula by taurine chloramine and taurine bromamine. *Am J Trop Med Hyg* 1987; 37 (1): 106-110.
6. Nagl M, Gottardi W: In-vitro experiments on the bactericidal action of N-chlorotaurine. *Hyg Med* 1992; 17: 431-439.
7. Gottardi W: Alkalimetallsalze des N-Chlortaurins in kristalliner Form, Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung. Patentschrift DE 40 41 703, 1993.
8. Horn H, Privora M, Weuffen WF: Handbuch der Desinfektion und Sterilisation. Band 1. Berlin: VEB Verlag Volk und Gesundheit, 1972: 140.
9. Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM): Richtlinien für die Testung und Bewertung chemischer Desinfektionsverfahren. Stuttgart, New York: Gustav Fischer, 1981: 4-7.
10. Nagl M: N-Chlortaurin als Teil des menschlichen Abwehrsystems: in vitro Experimente zur oxidativen und bakteriziden Wirkung. Universität Innsbruck: Dissertation 1991.
11. Rand MC, Greenberg AE, Taras MJ: Standard methods for examination of water and wastewater. 14th ed. Washington DC: American Public Health Association, 1976: 316-318.
12. Alexander NM: A spectrophotometric assay for iodide oxidation by thyroid peroxidase. *Anal Biochem* 1962; 4: 351-355.
13. Dychdala GR: Chlorine and chlorine compounds. In: Blocks SS (ed): Disinfection, sterilization and preservation. 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1991: 143.
14. Fukuda K, Hirai Y, Yoshida H, Nakijima T, Usui T: Free amino acid content of lymphocytes and granulocytes compared. *Clin Chem* 1982; 28: 1758-1761.
15. Soupart P: Free amino acids of blood and urine in the human. In: Holden JT (ed): Amino acid pools. Amsterdam: Elsevier, 1962: 220-262.
16. Gottardi W, Bock V: The reaction of chloramine T (CAT) with protein constituents: model experiments on the halogen demand during the disinfection of biological material. Proceedings of the 4th conference on progress in chemical disinfection, CD-IV. 1988; 34-60.
17. Zgliczynski JM, Stelmaszynska T, Domanski J, Ostrowski W: Chloramines as intermediates of oxidation reaction of amino acids by myeloperoxidase. *Biochem Biophys Acta* 1971; 235: 419-425.