



2-hydroksi-isokapronihapon (HICAn) antiseptiset ominaisuudet



Hyväksytty julkaistavaksi 3.4.2023.



Antibioottiresistenssin maailmanlaajuisesti kasvavan ongelman vuoksi infektioiden hoitoon tarvitaan uusia luonnonmukaisia antimikrobiaineita, joilla on anti-inflammatorisia ominaisuuksia. 2-hydroksi-isokapronihappo (HICA) on bakteerien proteiinifermentaatioissa tuottama aminohappojohdannainen, jolla on anti-inflammatorisia, antiproteolyttisiä, antikatabolisia ja antimikrobisia ominaisuuksia. HICA inhiboi useiden elimistön liiallisiin tulehdusvasteisiin osallistuvien proteolyttisten entsyymien toimintaa, kuten matriksin metalloproteaseja ja seerumin proteaseja.

Nisäkkäille annettuna HICA on osoittautunut turvallisesti sekä anti-inflammatoriseksi ja antikataboliseksi. Sillä on laajakirjoista antibakteerista tehoa ehdollisesti ja ehdottomasti anaerobisiin grampositiivisiin ja gramnegatiivisiin bakteereihin sekä useille antibiooteille resistentteihin *Staphylococcus aureus* ja *Escherichia coli* -bakteerikantoihin ja dysbioottisiin parodontopatoogeneihin. HICAlla on antimykoottista tehoa useita *Candida* ja *Aspergillus*-kantoja vastaan. Ihmissolut pystyvät tuottamaan ja hajottamaan HICAA, minkä vuoksi se on hyvin siedetty sekä pinnallisesti että sisäisesti käytettynä aineena.

Antimikrobisten ja anti-inflammatoristen ominaisuuksiensa perusteella HICA voisi soveltaa paikallishoitoon.

2-hydroksi-isokapronihapon (HICAn) antiseptiset ominaisuudet

Marjut Sakko, Tuomo Karila, Taina Tervahartiala, Mikko Nieminen, Leo Tjäderhane, Riina Richardson, Timo Sorsa

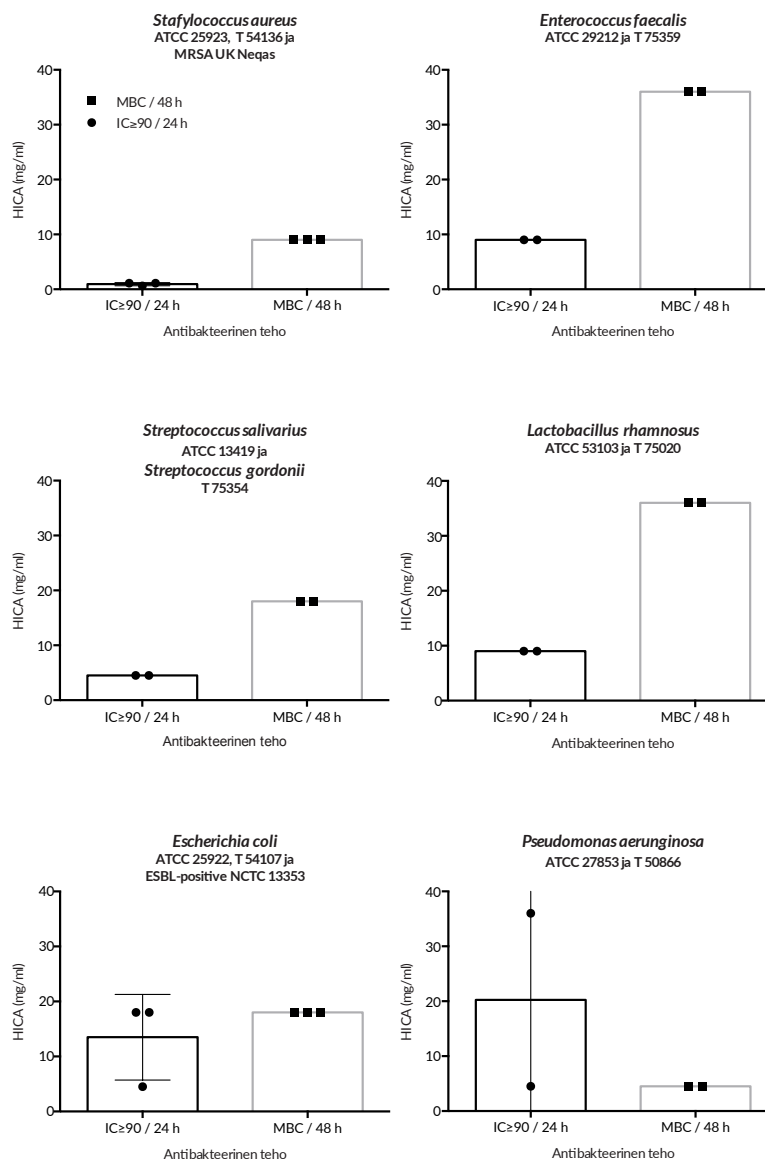
2-hydroksi-isokapronihappo (HICA) on aminohappojohdannainen, joka on leusiini-asetyyli-CoA-hajoamisreitin sivutuote. Sitä kutsutaan myös leusiinihapoksi, 4-hydroksi-4-metyylivalerihapoksi ja 2-hydroksi-4-pentaanihapoksi. Leusiini on valmiin ja isoleusiinin ohella yksi kolmesta välttämättömästä haaraketjuisesta aminohaposta, jota ihmisen pitää saada ravinnostaan. HICAA esiintyy muun muassa juustoissa ja hapattamalla tuotetuissa ruoka-aineissa. Sitä esiintyy pieninä annoksina (17 µg/l) äidinmaidossa (1). Tuorejuustoihin ja raejuustoihin on lisätty 100–1000 mg/kg HICAA parantamaan juuston makua (2). Euroopan elintarvikeviraston mukaan HICAn päivittäinen saanti ravinnosta on keskimäärin 0,0012 µg henkilöä kohden. Huolestuttavan annoksen raja on yli 1 800 µg vuorokaudessa (3).

HICA on bakteerien metaboliatuote. Erityisesti laktobasillien on osoitettu tuottavan HICAA. Myös muutamien muiden bakteerien kuten *Peptostreptococcus anaerobicus* (4), *Weissenella paramesenteroideksen* (5) ja *Clostridium difficile* (6) on osoitettu tuottavan sitä. HICAA muodostuu leusiinin transaminaation ja sitä seuraavan pelkistysreaktion seurauksena. Sen eliminaatio vaatii hydroksyyisokapronihappodehydrogenaasi-entsyymien katalysoiman hapetusreaktion, minkä seurauksena reaktiokeiju etenee sitruunahappokierron kautta energiatuotantoon. Pentti Hietalan tutkimusryhmä eristi HICAA *Lactobacillus plantarum* fermentaatiotuotteesta (7). Ryhmä osoitti sen olevan antimikrobinen *Escherichia coli* -bakteerikantaa sekä *Trichophyton*-sienikantaa vastaan. HICA on amfipaattinen ja hydrofobinen molekyyli, millä voi olla merkitystä sen toimintameka-

nismissa (8–9). Se on patentoitu anti-inflammatorista, antiproteolyttista ja antimikrobista käyttöä varten (9–11).

HICA on hyvin siedetty aine. Sen plasmapitoisuus on normaalisti 0,1–0,25 µmol/l, mutta pitoisuus voi suurentua paaston aikana ja fyysisen rasituksen jälkeen (12). Paastoaineenvaihdunnan aikana energiaa tuotetaan ketoaineenvaihdunnan kautta, jolloin hajotetaan muun muassa valkuaisaineita. Lihaksen alkaessa hajota HICAa muodostuu leusiinin hajoamisen seurauksena. Myös fyysinen rasitus hajottaa aina lihaskudosta. Suurentuneita HICA-pitoisuuksia on havaittu esimerkiksi diabeettisen ketoasidoosin (13) ja lyhytsuolisyyden yhteydessä (14). Haaraketjuiset aminohapot metaboloituvat pääasiassa lihaksissa, maksassa, munuaisissa ja aivoissa (12, 15, 16). HICAn on todettu ehkäisevän ihmisen MMP-2:a, -8:aa ja -9:ää sekä neutrofiilien elastaasia ja katepsiini G:tä (9, 11). Sen on lisäksi osoitettu toimivan antikatabolisesti ja antiproteolyttisesti koe-eläimillä ja ihmisillä, mutta tämän vaikutusmekanismia ei vielä tunneta (17–19). Tuotantoeläinten ruokintakokeiden pohjalta (10, 20–21) tehdyssä pilottitutkimuksessa yläraajojaan vahvasti käyttävillä urheilijoilla todettiin juuri näiden lihaskudosten kasvu (17). Urheilijat saivat 1 488 mg HICAA vuorokaudessa kuuden viikon ajan, ja heillä todettiin $0,84 \pm 1,0$ kg:n painonnousu. Kaikki mitatut laboratorioarvot pysyivät muuttumattomina. Meron tutkimusryhmä havaitsi vastaavasti neljän viikon aikana alaraajojen rasvattoman 400 gramman lihaskudoksen kasvun alaraajojaan rasittavilla urheilijoilla, kun nämä koehenkilöt saivat 1 500 milligramman vuorokausiannoksen HICAA (18). Yhdysvalloissa HICA on edelleen urheilijoiden käyttämä sallittu ravintolisä.

Tämän katsausartikkelin tavoitteena oli selvittää HICAn antiseptisiä ominaisuuksia ja vaikutuksia muun muassa endodontista alkuperää olevissa infektioissa yleisimpien ja antibiootille resistenttien bakteerien kasvun sekä hiiva- ja rihmasienten kasvun ehkäise-



Kuva 1. Mikroaerofiilisten grampositiivisten (A-D) ja gramnegatiivisten (E-F) bakteerikantojen herkkyys HICAlle tioglykolaattielatusliemessä 0,6–36 mg/ml:n pitoisuuksissa (pH 5,2). Bakteerikasvua vähintään 90 prosenttisesti inhiboiva pitoisuus (IC₅₀ / 24 h) ja pienin bakterisidinen pitoisuus Brucella agar -viljelyssä (MBC / 48 h) on ilmoitettu. Modifioitu kuva on esitetty International Journal of Antimicrobial Agents -lehdessä julkaistuun dataan perustuen (23).

misessä ja estossa. Tavoitteena oli myös selvittää HICAn käyttömahdollisuuksia juurihoidossa.

Materiaalit ja menetelmät

Katsausartikkelia varten tehtiin kirjallisuushaku Medline-tietokannasta ha-

kusanoilla: ”2-hydroxyisocaproic acid”, ”α-hydroxyisocaproic acid”, ”antimicrobial and 2-hydroxyisocaproic acid”. Tutkimuksia löytyi aikavälillä 1979–2022. Lisäksi mukaan hyväksyttiin vi-ranomaisten ja kaupallisten yritysten, kuten esimerkiksi EFSA:n ja Extracta



Oy:n dokumentteja, sekä patenteja koskevia dokumentteja.

Tulokset

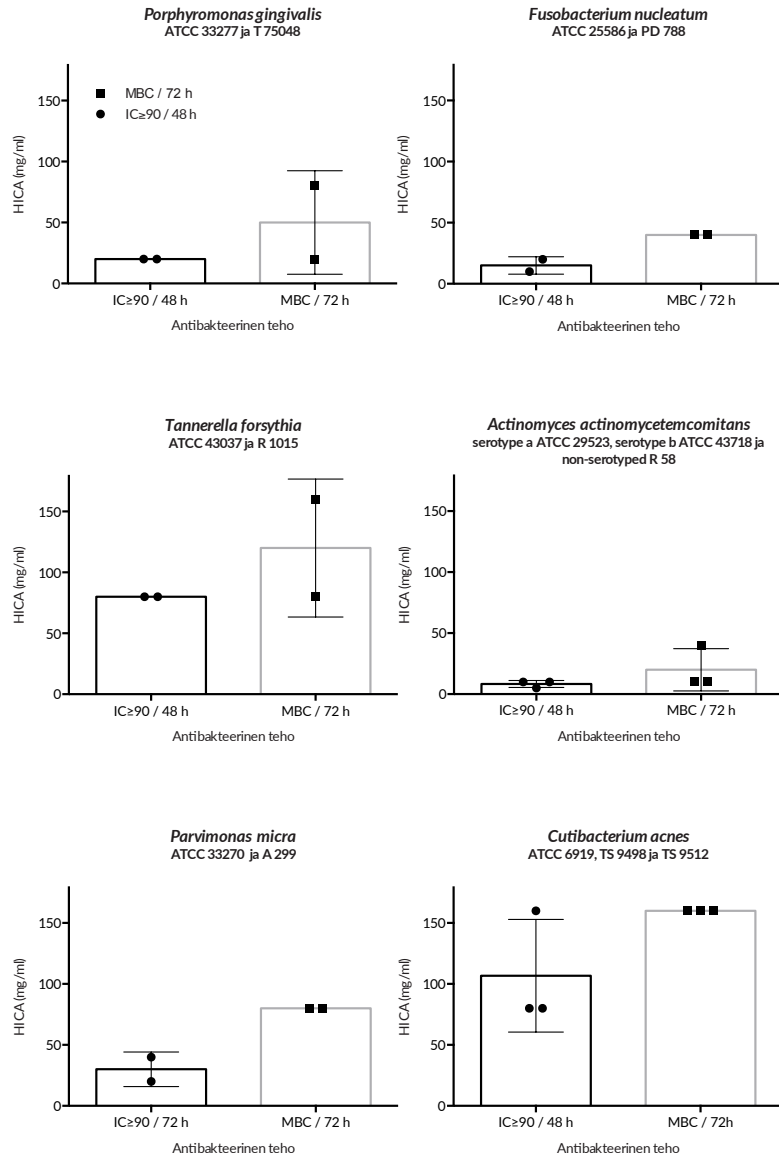
Onko HICA antiproteolyttinen ja anti-inflammatorinen aine?

HICAn on osoitettu estävän annosriippuvaisesti matriksin metalloproteiinaasien MMP-2:n ja -9:n eli gelatinaasi A:n ja B:n sekä neutrofiili kollageenaasin MMP-8:n (kollageenaasi-2:n) katalyyttistä kykyä hajottaa kollageenia, gelatiinia sekä yleistä proteiinisubstraattia β -kaseiinia (9, 11). HICA kykenee myös estämään neutrofiililastaasia ja katepsiini G:tä. Parodontiittipotilaalla HICA estää myös ientaskunesteen kollageenaasi- ja gelatinaasiaktiiviteetteja (9). Eläinmallissa HICAn on osoitettu vähentävän ihokudoksessa neutrofiililastaasin ja gelatinaasi B:n (MMP-9) ilmentymistä (22).

Onko HICA antibakteerinen aine?

Bakteerien herkkyystudkimuksessa tarkasteltiin mikroaerofiilisten bakteerilajien kliinisiä kantoja ja kantapankkien vertailukantoja (n = 18), joita esiintyy yleensä juurikanavainfektioiden yhteydessä (23). Mukaan otettiin myös vertailuksi antibioottiresistentit bakteerikannat metisilliiniresistentti *Stafylococcus aureus* (MRSA) ja laajakirjoista beetalaktamaasia tuottava *E. coli* (ESBL). Toiseen tutkimukseen valittiin obligatorisesti anaerobisia bakteerilajeja (n = 14), joita esiintyy yleensä parodontiitin yhteydessä (24). Lisäksi verrokkilajina testattiin ihosairauksissa esiintyvän *Cutibacterium acnes* kolmea kantaa. Tutkimusmenetelmänä käytettiin Clinical and Laboratory Standard Institutun (CLSI) julkaisemaa anaerobibakteerian herkkyystudkimuksiin standardoitua pienerälaimennosmenetelmää (25). Mikroaerofiilibakteerian herkkyyttä testattiin pH 5,2:ssa, koska se on HICAn toiminnalle optimaalisin. Kokeet ehdottomasti anaerobisilla bakteereilla tehtiin pH 6,5:ssa, koska se on niille suotuisampi kasvuympäristö.

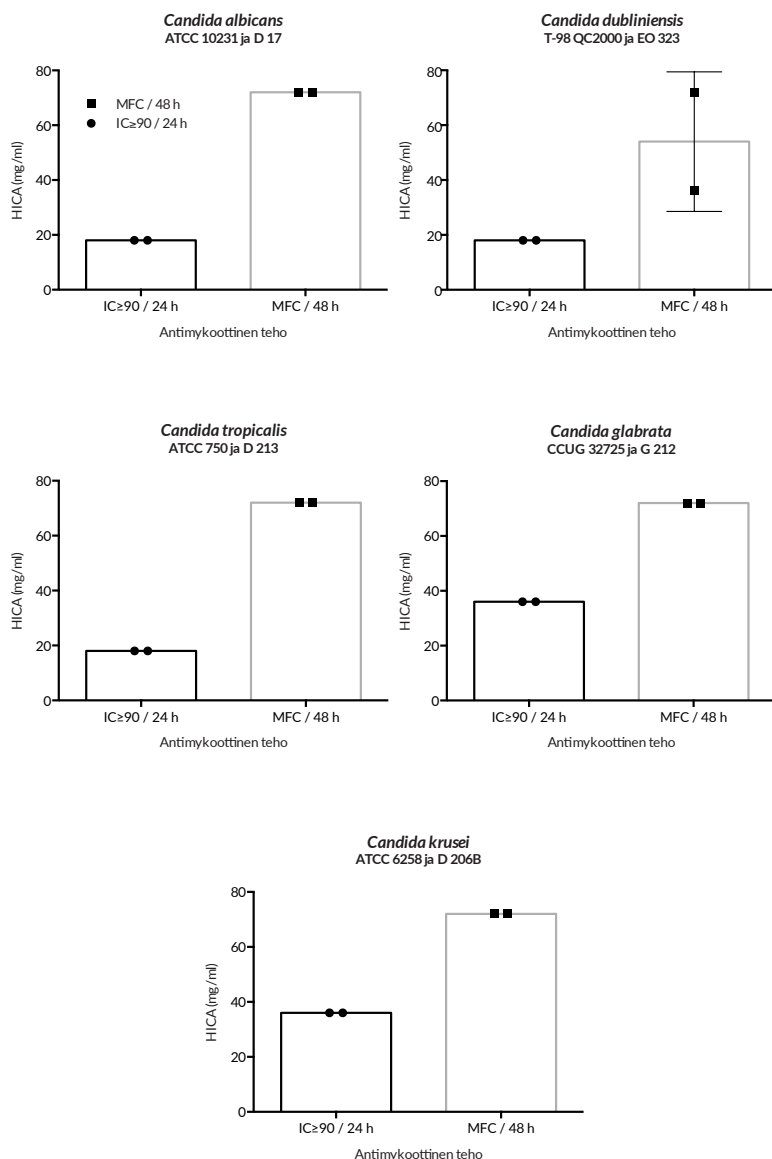
Kaikkien mikroaerofiilisten baktee-



Kuva 2. Ehdottomasti anaerobisten gramnegatiivisten (A-D) ja grampositiivisten (E-F) bakteerikantojen herkkyys HICAlle tioglykolaattielatusliemessä 2,5–160 mg/ml:n pitoisuuksissa (pH 6,5). Bakteerikasvua vähintään 90 prosenttisesti inhiboiva pitoisuus (IC₅₀ / 48 h) ja pienin bakterisidinen pitoisuus Brucella agar -viljelyssä (MBC / 72 h) on ilmoitettu. Modifioitu kuva on esitetty Microbiology Insights Open Access -lehdessä julkaistuun dataan perustuen (24).

rikantojen ja antibioottiresistenttien bakteerikantojen todettiin olevan herkkiä HICAlle 36 mg/ml:n pitoisuudessa (kuva 1, pH 5,2 / 48 h). *Enterococcus faecalis* ja *Lactobacillus rhamnosus* -kannat olivat vastustuskykyisimpiä, kun taas *Pseudomonas aeruginosa* -kannat olivat herkimpiä. HICA inhiboi pienimmillä testipitoisuuksilla

(IC₅₀ 1,1 mg/ml) merkittävästi *Stafylococcus aureus* -kantojen, mukaan lukien MRSA-kannan, kasvua. Ehdottomista anaerobibakteereista *Cutibacterium acnes* -kannat ja *Tannerella forsythian* vertailukanta olivat vastustuskykyisimpiä. Sen sijaan *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* -kannat olivat herkimpiä HICAn vaikutukselle (kuva 2,



Kuva 3. Hiivakantojen (A-E) herkkyys HICAlle tioglykolaattielatusliemessä 18–72 mg/ml:n pitoisuuksissa. Hiivakasvua vähintään 90 prosenttisesti inhihoiva pitoisuus (IC₅₀ / 24 h) ja pienin fungisidinen pitoisuus Sabouraud agar -viljelyssä (MFC / 48 h) on ilmoitettu. Modifioitu kuva on esitetty Mycoses -lehdessä julkaistuun dataan perustuen (26).

pH 6,5 / 72 h). Molemmassa tutkimuksessa bakteerikasvun inhibition havaittiin olevan riippuvainen HICAn pitoisuudesta.

Onko HICA antimykoottinen aine?

Ensimmäiseen tutkimukseen valittiin *Candida*-lajien klinisiä kantoja ja kantapankkien vertailukantoja (n = 10), joi-

ta voi esiintyä esimerkiksi suun hiivainfektioissa (26). Tutkimusmenetelmänä käytettiin CLSI:n julkaisemaa hiivalajien herkkyystutkimuksiin standardoitua pienerälaimennosmenetelmää (27). Kaikkien hiivakantojen todettiin olevan herkkiä HICAlle 72 mg/ml:n pitoisuudessa (kuva 3, pH 5,2 / 48 h). *Candida dubliniensis*in referenssikanta oli

kaikkein herkin. Lisäksi erillisessä hyy-fikokeessa havaittiin, että testattujen *Candida albicans* -kantojen rihmanmuodostus estyy jo 36 mg/ml:n HICA-pitoisuudessa. Hiivakasvun inhibition havaittiin olevan HICA-pitoisuudesta riippuvaista.

Toiseen tutkimukseen valittiin mukaan itiöitä muodostavien *Aspergillus*-rihmasienten klinisiä ja kantapankkien vertailukantoja (n = 9), joita voi esiintyä esimerkiksi ylähengitystieinfektioissa. Tutkimusmenetelmänä seurattiin European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testingin (ESCMID) antimykoottisten aineiden testaukseen laatimaa standardoitua herkkyystestimenetelmää (28). *Aspergillus flavuksen* todettiin olevan vastustuskykyinen kaikilla testatuilla pitoisuuksilla, kun taas *A. fumigatus* ja *A. terreus* -kantojen todettiin olevan herkkiä HICAlle 18–36 mg/ml:n pitoisuudessa. *A. flavus* -kannat olivat kuitenkin herkkiä itakonatsolille. Mielenkiintoista oli, että tässä tutkimuksessa itakonatsolille vastustuskykyisimmät *A. fumigatus* -kannat olivat HICAlle herkimpään kantojen joukossa.

Voisiko HICA soveltua juurihoitokäyttöön?

Laboratoriotutkimuksessa testattiin potentiaalisten juurikanavalääkkeiden inhibiittorien, kuten dentiinjauheen, hydroksiapatiitin ja naudan seerumin vaikutusta HICAn (33 mg/ml) antibakteeritehokkuuteen (29). Menetelmänä käytettiin Portenierin tutkimusryhmän julkaisemaa metodia (30). Testiorganismiksi valittiin sitkeissä juurikanavainfektioissa usein esiintyvä *E. faecalis*. Dentiinjauheen aiheuttaman inhibition havaittiin olevan pitoisuudesta riippuvaista. Kahden vuorokauden kuluttua pienen (2 mg/ml) dentiinjauhemäärän vaikutuksesta HICAn antibakteeriteho ei heikentynyt. Satakertainen dentiinjauheen pitoisuus esti HICAn antibakteerisen vaikutuksen. Näin suuri pitoisuus lienee kuitenkin kliinisesti epätodennäköinen, jos juurikanavan preparoinnissa ja huuhtelussa



noudatetaan asianmukaisia hoitokäytäntöjä. Kymmenkertaisessa dentiini jauhepitoisuudessa (20 mg/ml) HICAn antibakteerivaikutus estyi hyvin vähän. Bakteerikasvua havaittiin vain alle 1 % enemmän kuin pienimmällä testatulla dentiinjauheen pitoisuudella (2 mg/ml). Kalsiumhydroksiditahnan havaittiin olevan vähemmän tehokas *E. faecalis* vastaan kuin HICA pienessä 2 mg/ml:n dentiinjauhepitoisuudessa. Dentiinjauheella ei ollut vaikutusta klooriheksidiiniasetaatin tai -diglukonaatin antibakteeritehoon. Lisäksi mielenkiintoista oli, että hydroksidiapatiitti esti 10 mg/ml:n pitoisuudella HICAn antibakteerivaikutusta enemmän kuin dentiinjauhe tai naudan seerumin albumiini. HICAn antibakteerinen teho ei inhiboidu merkittävästi mahdollisten inhibiittorien, kuten dentiinjauheen vaikutuksesta (29). Tutkimuksesamme dentiinjauheella mallinnettiin juurikanavan olosuhteita ja juurikanavassa preparoinnista aiheutuvaa dentiinistä koostuvaa porausjätettä.

HICAn soveltuvuutta juurihoitoon tutkittiin myös poistettujen hampaiden juurikanavissa *ex vivo* (31). Tutkimusmenetelmänä käytettiin Basranin ym. julkaisemaa menetelmää (32), jossa hampaiden juurista valmistettuihin standardikappaleiden juurikanaviin lisättiin 21 vuorokauden ajan *E. faecalis* elatusainesuspensiota, jotta dentiinitubulukset infektoituisivat (kuva 4). Infektion onnistuminen varmistettiin myöhemmin Brown & Brenn-metodilla värjäytyistä hammasleikkeistä. HICAn (400 mg/ml) antibakteerista tehoa verrattiin kalsiumhydroksiditahnaan (400 mg/ml), klooriheksidiinidiglukonaattiin (20 mg/ml) ja keittosuolaliuokseen. Kolmen viikon infektoinnin jälkeen juurikanavat huuhdeltiin keittosuolaliuoksella, lääkittiin ja suljettiin tiiviillä paikka-ainemateriaalilla. Kuhunkin testiryhmään kuului seitsemäntoista testikappaletta. Yhden viikon lääkityksen jälkeen juurikanavat huuhdeltiin keittosuolaliuoksella ja juurikanavan seinämistä otettiin näytteet Gates-glidden #3- ja #4-po-



Kuva 4. HICAn antibakteeritehoon testaus *E. faecalis* vastaan poistettujen hampaiden juurikanavissa. Esimerkkikuvissa nähdään standardikappaleissa juurikanava ilman lääkettä (A), HICA-tahna juurikanavassa (B) ja juurikanavassa oleva lääkeaine suojattuna tiiviillä väliaikaisella täytemateriaalilla (C).

rilla. Sen lisäksi jäännösjuuret otettiin näytteiksi. Kaikki näytteet viljeltiin elatusliemessä kahden vuorokauden ajan. Elatusliemen sameus analysoitiin spektrofotometrillä, ja näyte elatusliemestä viljeltiin viljelymaljalla kontrolloiksi. Juurikanavan seinämän sisäpinnan näytteistä (Gates-glidden #3) eniten puhtaita näytteitä todettiin klooriheksidiiniryhmässä ja toiseksi eniten HICA-ryhmässä. Syvemmältä otetuissa juurikanavan seinämän näytteissä (Gates-glidden #4) sekä jäännösjuurien näytteissä tulos oli päinvastainen. HICA-ryhmässä oli eniten näytteitä, joissa ei ollut bakteerikasvua ja klooriheksidiiniryhmässä toiseksi eniten. HICAn todettiin olevan jäännösjuurinäytteissä tilastollisesti merkitsevästi tehokkaampi kuin kalsiumhydroksidin.

Selis tutkimusryhmineen vertasi HICAn ja kalsiumhydroksidin aiheuttamaa sytotoksisuutta ja genotoksisuutta parodontiumin fibroblasteihin (33). HICA oli kyseisessä tutkimuksessa vähemmän toksinen kuin juurikanavalääkkeenä yleisesti käytössä oleva kalsiumhydroksidi 1 mg/ml:n pitoisuutena vuorokauden ja kahden vuorokauden kuluu. HICAn aiheuttamaa toksisuutta havaittiin ≥ 10 mg/ml:n pitoisuudessa vuorokauden kuluttua. Verma ym. osoittivat puolestaan klooriheksidiinin aiheuttavan toksisuutta parodontiumin fibroblasteille ≥ 10 mg/ml:n pitoisuudella jo lyhyissä altistuksissa (1 min, 5 min

ja 15 min) (34). Kirjallisuudessa klooriheksidiinin on kuvattu aiheuttavan allergisia reaktioita. HICAn ei ole sen sijaan havaittu aiheuttavan allergiaa.

Onko HICAlla antimikrobivaikutusta biofilmeihin?

Leelapornpisidin tutkimusryhmä tutki edellä kuvatulla menetelmällä poistettujen hampaiden juurikanavissa HICAn vaikutusta useiden lajien muodostamiin mikrobibiofilmeihin (35). Testiorganismeiksi oli valittu *Streptococcus gordonii*, *L. rhamnosus*, *E. faecalis* ja *C. albicans*. HICAn (400 mg/ml) vaikutusta verrattiin toiseen uuteen antimikrobiaineeseen alfa-mangostiiniin (10 mg/ml), kahteen kalsiumhydroksidipohjaiseen tuotteeseen (Calcicur® ja Odontopaste®) sekä steriiliin keittosuolaliuokseen. Lääkityksen jälkeen näytteistä tehtiin biofilmin määrällinen ja laadullinen analyysi. Juurikanavan seinämän sisäpinnan näytteistä (Gates-glidden #3) alfa-mangostiiniryhmässä havaittiin eniten puhtaita näytteitä. Toiseksi eniten puhtaita näytteitä saatiin HICA-ryhmässä, mutta juurikanavan seinämästä syvemmältä otetuissa (Gates-glidden #4) näytteissä ja jäännösjuurien ryhmässä tulos oli päinvastainen. HICA-ryhmässä oli eniten ja alfa-mangostiiniryhmässä toiseksi eniten näytteitä, joissa ei ollut bakteerikasvua. Ero oli tilastollisesti merkitsevä. Uusien antimikrobiaineiden ja kalsiumhydrok-

sidinäytteiden tulosten välillä todettiin myös tilastollisesti merkitseviä eroja. HICAn antimikrobiteho on havaittu hyväksi poistettujen hampaiden juurikanavissa sekä *E. faecalis*ta (31) että monilajisia mikrobiofilmejä (35) vastaan.

Mitä tiedetään HICAn antimikrobisesta toimintamekanismista?

C. albicans kykenee muodostamaan suotuisissa kasvuoloissa itiöputkia ja pidempiä rihmarakenteita, mitä pidetään merkittävänä virulenssitekijänä limakalvojen hiivainfektioissa sekä vakavissa yleistyneissä hiivainfektioissa. Niemisen tutkimusryhmä osoitti, että HICA (50 mg/ml) estää *C. albicans*-solujen hyyfinmuodostusta sekä heikentää *C. albicans*-biofilmien rihmarakenteita. Pyyhkäisyelektronimikroskoopin kuvissa nähdään, että HICA heikentää *C. albicansin* hyyfirakenteita etenkin pH 5,2:ssa, jossa nähtiin rakenteeltaan heikentyneitä ja katkenneita rihmoja (36). Lisäksi HICAn vaikutuksesta kuolleet *C. albicans*-solut muistuttavat ulkonäöltään klooriheksidiinin vaikutuksesta kuolleita soluja (26, 37).

Pahalagerada ym. tutkivat monipuolisesti HICAn potentiaalisia toimintamekanismeja antimikrobiaineena (38). Heidän tutkimustuloksensa grampositiivisten ja gramnegatiivisten bakteerien herkkyydestä HICAlle olivat linjassa aiemmin tässä artikkelissa kuvattujen tutkimustulosten kanssa. Ryhmä tutki *Bacillus cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* ja *E. coli*-bakteerikantojen solumembraanin yhtenäisyyttä sekä gramnegatiivisten bakteerien *E. coli* ja *P. aeruginosan* ulkomembraanin läpäisevyyttä. Samassa tutkimuksessa testattiin edellä mainittujen grampositiivisten ja gramnegatiivisten bakteerisolujen sytoplasmamembraanin potentiaalia HICA-altistuksen yhteydessä. Tutkimuksessa todettiin solumembraanin yhtenäisyyden heikentyneen HICAlla käsitellyissä soluissa. Myös gramnegatiivisten solujen ulompi membraanin läpäisevyys kasvoi

2-hydroxyisocaproic acid (HICA)

Resistance to antimicrobials is an increasing global problem. New natural antimicrobial agents possessing anti-inflammatory properties are needed for clinical use. 2-hydroxyisocaproic acid (HICA) is an amino acid derivative and a by-product of bacterial protein fermentation. It has anti-inflammatory, antiproteolytic, anti-catabolic and antimicrobial properties. HICA inhibits several proteolytic enzymes including MMPs and serum proteases contributing to excessive inflammatory responses. HICA as a safe, anti-inflammatory and antikatabolis agent has been shown in studies with mammals. It has a broad-spectrum antibacterial activity against obligately and facultatively anaerobic gram-positive and gram-negative bacterial species including

multi-drug resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*-isolates and dysbiotic periodontal pathogens. HICA has activity against several *Candida* and *Aspergillus* species. Human cells can produce and metabolise HICA, whereby it is well-tolerated in topical use as well as in systemic use. Considering the antimicrobial and anti-inflammatory profile of HICA, it exerts potential as a topical agent. Effective treatment of superficial infections with topical agents such as HICA eventually help to reduce the unnecessary use of systemic antimicrobials. The efficacy of HICA in the treatment of superficial infections will be assessed in future clinical trials.

huomattavasti jo 0,5 mg/ml:n HICA-pitoisuudella. Läpäisevyyden kasvuun vaikutti HICAn pitoisuus. Lisäksi bakteereilla todettiin sytoplasmamembraanin potentiaalin nopea kasvu kaikissa 4 mg/ml:n HICA-pitoisuudelle altistuneissa bakteerisoluuissa. Pyyhkäisy- ja transmissioelektronimikroskoopeilla voitiin osoittaa bakteerisolujen lisääntyneitä vaurioita ja solun sisärakenteiden purkautumista solun ulkopuolelle 60:n ja 120 minuutin inkubaation jälkeen. HICA vaikuttaa grampositiivisten ja gramnegatiivisten bakteerisolujen pintarakenteisiin ja sytoplasmamembraanin potentiaaliin aiheuttaen bakteerisolujen rakenteen vauriota (38).

Yhteenveto

Tutkimuksissa HICA on osoitettu hyvin siedetyksi aineeksi (3, 33), jolla on laajakirjoinen antibakteerinen ja antimykootinen teho (7, 23–25, 26, 36, 38). Se on bakterisidinen mikroaerofiliisiä ja obligatorisesti anaerobisia grampositivisia kokkeja ja sauvoja sekä gramnegatiivisia sauva bakteereita vastaan.

HICA on myös useita hiiva- ja rihmasienilajeja tappava aine. Pienemmällä testipitoisuuksilla se estää mikrobien kasvua aineen konsentraation mukaan. HICAn on lisäksi osoitettu olevan antiproteolyttinen ja anti-inflammatorinen aine (9, 11, 22).

HICAn kliinistä tehoa apikaaliparodontiitin hoitoon sekä regeneratiiviseen endodontiaan voisi myös tutkia, koska se tehoaa laajakirjoisesti ehdollisesti ja ehdottomasti anaerobisiin bakteerilajeihin (33, 39). Koska HICA on antibakteerinen monia ehdottomasti anaerobisia bakteerilajeja vastaan, sen vaikutusta tulisi tutkia myös vaikeiden parodontiittien hoidossa mekaanisen instrumentoinnin lisänä. Suun limakalvoinfektioiden hoidossa se voisi vaikuttaa antimikrobisesti sekä bakteereihin että hiivoihin ja voisi auttaa suun mikrobiflooran tasapainottamista yhdessä hyvien suhygieniatottumusten kanssa. HICAn antibakteerisen ja antimykootisen tehon vuoksi sen käytömahdollisuuksia voisi myös tutkia proteesien desinfiointiaineena. Uudel-



le paikalliselle antiproteolyttiselle antimikrobiaineelle soveltuvia käyttömahdollisuuksia voisi löytyä myös ihoinfektioiden sekä haavojen hoidosta.

Potilaiden pinnallisten infektioiden hoitoon tarvitaan uusia tehokkaita paikallisesti käytettäviä antiseptisiä aineita, jotta infektoita voitaisiin hoitaa tehokkaasti jo niiden varhaisvaiheessa ja samalla välttää antibioottien turhaa käyttöä. Kliinisiä tutkimuksia ja näyttöä HICAn tehokkuudesta paikallisena antimikrobiaineena tarvitaan kuitenkin ennen sen mahdollista käyttöä potilashoidossa. HICasta valmistettuja kliiniseen käyttöön tarkoitettuja tuotteita ei ole vielä markkinoilla saatavilla. ■

Marjut Sakko, HLT, EHL¹

Tuomo Karila, LT, EL²

Taina Tervahartiala, HLT, dosentti¹

Mikko Nieminen, HLT, LL, erikoistuva lääkäri³

Leo Tjäderhane, HLT, EHL, professori¹, tutkimusjohtaja⁴

Riina Richardson, HLT, EHL, dosentti, FRCPath⁵

Timo Sorsa, HLT, EHL, professori^{1,6}

¹ Suusairauksien poliklinikka, Suu- ja leukasairaudet, Pää- ja kaulakeskus, HUS ja Helsingin yliopisto, Helsinki

² Sairaala Orton, Helsinki

³ Korva-, nenä- ja kurkkutautien klinikka, Pää- ja kaulakeskus, HUS ja Helsingin yliopisto, Helsinki

⁴ Suun terveyden tutkimusyksikkö, Oulun yliopisto, ja Medical Research Center MRC, Oulun yliopisto ja Oulun yliopistollinen sairaala, Oulu

⁵ Mycology Reference Centre Manchester and Department of Infectious Diseases, Wythenshawe Hospital, Manchester University NHS Foundation Trust, Division of Evolution, Infection and Genomics, Faculty of Biology, Medicine and Health, University of Manchester, Manchester, UK

⁶ Department of Dental Medicine,

Karoliininen instituutti, Tukholma, Ruotsi

Kirjoittajien ilmoittamat sidonnaisuudet:

Marjut Sakko: Apurahat (Helsingin yliopisto ja Helsingin yliopistollinen sairaala, Apollonia, Suomen hammaslääketieteen säätiö, Suomen naishammaslääkärit, Helsingin yliopiston kirjaston open access -julkaisutuki).

Tuomo Karila: Osakas Salarusta Oy, Patentti (Suomi: FI 129515B).

Taina Tervahartiala: Patentti (Suomi: FI 129515B).

Mikko Nieminen: -

Leo Tjäderhane: Apurahat (Selma ja Maja-Liisa Selanderin Rahasto, Minervasäätiö).

Riina Richardson: Luentopalkkiot (Hammaslääkäripäivät).

Timo Sorsa: Patentit (Yhdysvallat: 5652223, 5736341, 6143476, 201770023571A1, WO2018/060593A1, Japani: 2016-554670, Etelä-Korea: 10-29016-7025378, Suomi: FI 129515B)

Tämä artikkeli on omistettu edesmenneelle FT Pentti Hietalalle.

KIRJALLISUUS

1. Ehling S, Reddy TM. Direct analysis of leucine and its metabolites β -hydroxy- β -methylbutyric acid, α -ketoisocaproic acid, and α -hydroxyisocaproic acid in human breast milk by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Agric Food Chem* 2015; 63(34): 7567–7573.

2. Begemann WJ, Harkes PD. Process for enhancing a fresh cheese flavour in foods. Yhdysvallat: Lever Brothers Co.; 1974.

3. European Food Safety Authority. Scientific opinion on flavouring group evaluation 10, revision 3 (FGE.10Rev3): Aliphatic primary and secondary saturated and unsaturated alcohols, aldehydes, acetals, carboxylic acids and esters containing an additional oxygenated functional group and lactones from chemical groups 9,13 and 30. EFSA panel on food contact materials enzymes, flavourings and processing aids (CEF). *EFSA J* 2012; 10(3): 2563.

4. Hamid A, Uematsu H, Sato N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Inhibitory effects of metronidazole on anaerobic metabolism of phenylalanine and leucine by *Peptostreptococcus anaerobius*. *J Antimicrob Chemother* 1997; 39(2): 129–134.

5. Ndagano D, Lamoureux T, Dortu C, Vandermoten S, Thonart P. Antifungal activity of lactic acid bacteria of the *Weissenella* genus isolated from food. *J Food Sci* 2011; 76(6): M305–M311.

6. Brooks JB, Nunez-Montiel OL, Wycoff BJ, Moss CW. Frequency-pulse electron capture gas-liquid chromatographic analysis of metabolites produced by *Clostridium difficile* in broth enriched with amino acids. *J Clin Microbiol* 1984; 20(3): 539–548.

7. Hietala PK, Westermarck HW, Jaarma M. Identification of antimicrobial alpha-hydroxy-

acids in *Lactobacillus plantarum*-fermented animal protein. *Nutr Metab* 1979; 23(3): 227–234.

8. Aoyagi A, Yano T, Kozuma S, Takatsu T. Pleofungins, novel inositol phosphorylceramide synthase inhibitors, from *Phoma* sp. SANK 13899. *J Antibiot* 2007; 60(2): 143–152.

9. Westermarck HW, Hietala P, Jaarma M, Sorsa T, Vaara M. Extracta Ltd, assignee. Use of alpha-hydroxy acids in the manufacture of medication for the treatment of inflammation. Patent no. EP 0871438 B1; 2008.

10. Westermarck HW, Hietala P, Jaarma M, Sorsa T, Vaara M. Use of alpha-hydroxy acids in the manufacture of a medicament for the treatment of inflammation, Oy Extracta Ltd., Finland; 1997.

11. Sorsa T, Tervahartiala T, Karila T, Cohen B.

- HICA for use in prophylaxis and/or treatment of a disease or condition involving degradation of cartilage and/or disruption of cartilage homeostasis and/or integrity. Patent no. 20220142956-1; 2022.
12. Hoffer LJ, Taveroff A, Robitaille L, Mamer OA, Reimer ML. Alpha-keto and alpha-hydroxy branched chain acid interrelationships in normal humans. *J Nutr* 1993; 123(9): 1513–1521.
 13. Lieblisch HM & Först C. Hydroxycarboxylic and oxocarboxylic acids in urine: products from branched-amino acid degradation and from ketogenesis. *J Chromatogr* 1984; 309 (2): 225–242.
 14. Kuhara T, Shinka T, Inoue Y, Matsumoto M, Yoshino M, Sakaguchi Y. Studies of urinary organic acid profiles of patient with dihydrolipoyl dehydrogenase deficiency. *Clin Chim Acta* 1983; 133(2): 133–140.
 15. Suryawan A, Hawes JW, Harris RA, Shimomura Y, Jenkins AE, Hutson SM. A molecular model of human branched chain amino acid metabolism. *Am J Clin Nutr* 1998; 68(1): 72–81.
 16. Holecek M. Relation between glutamine, branched-chain amino acids, and protein metabolism. *Nutr* 2002; 18(2): 130–133.
 17. Hietala PK, Karila TAM, Seppälä TA, Tähti-vuori K. Nutrient supplement and use of the same. O. E. Ltd. Finland, 2005.
 18. Mero, AA, Ojala T, Hulmi JJ, Puurtinen R, Karila TA, Seppälä T. Effects of alfa-hydroxyisocaproic acid on body composition, DOMS and performance in athletes. *J Int Soc Sports Nutr* 2010; 7: 1.
 19. Sumi K, Sakuda M, Munakata K, Nakamura K, Ashida K. α -Hydroxyisocaproic acid decreases protein synthesis but attenuates TNF α /IFN γ co-exposure-induced protein degradation and myotube atrophy via suppression of iNOS and IL-6 in murine C2C12 myotube. *Nutrients* 2021, 13(7), 2391.
 20. Apajalahti J, Hietala P, Jaarma M, Westermarck HW. Use of hydroxy acid or product containing it and preparation thereof. Oy Extracta Ltd., Finland; 1996.
 21. Westermarck HW, Hietala P, Jaarma M, Sorsa T, Vaara M. Antimicrobial and anti-inflammatory compounds. E.P. Office. EPO, Oy Extracta Ltd., Finland; 1996.
 22. Nieminen MT, Hernandez M, Novak-Frazer L, Kuula H, Ramage G, Bowyer P. ym. D,L-2-hydroxyisocaproic acid (HICA) attenuates inflammatory responses in murine *Candida albicans* biofilm model. *Clinical and Vaccine Immunology* 2014a; 21(9): 1240–1245.
 23. Sakko M, Tjäderhane L, Sorsa T, Hietala P, Järvinen A, Bowyer P. ym. 2-hydroxyisocaproic acid: a new potential topical antibacterial agent. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39(6): 539–540.
 24. Sakko M, Rautemaa-Richardson R, Sakko S, Richardson M, Sorsa T. Antibacterial Activity of 2-Hydroxyisocaproic acid (HICA) against obligate anaerobic bacterial species associated with periodontal disease. *Microbiol Insights* 2021; 14; 11786361211050086.
 25. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria; Approved standard – Fifth edition. Document M11–A5. Wayne PA; CLSI; 2001.
 26. Sakko M, Moore C, Novak-Frazer L, Rautemaa V, Sorsa T, Ramage G. ym. 2-hydroxyisocaproic acid (HICA) is fungicidal for *Candida* and *Aspergillus* species. *Mycoses* 2014; 57(4): 214–221.
 27. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth microdilution antifungal susceptibility testing of yeasts; Approved standard – Third edition. Document M27–A3. Wayne PA; CLSI; 2008.
 28. Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. EUCAST Technical Note on the method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia-forming moulds. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14(10); 982–984.
 29. Sakko M, Tjäderhane L, Sorsa T, Hietala P, Rautemaa R. Antimicrobial 2-hydroxyisocaproic acid and chlorhexidine resist inactivation by dentine. *Int Endod J* 2016; 49(4): 352–360.
 30. Portenier I, Haapasalo H, Rye A, Waltimo T, Ørstavik D, Haapasalo M. Inactivation of root canal medicaments by dentine, hydroxylapatite and bovine serum albumin. *Inter Endod J* 2001; 34(3); 184–188.
 31. Sakko M, Tjäderhane L, Sorsa T, Hietala P, Rautemaa R. 2-Hydroxyisocaproic acid is bactericidal in human dental root canals ex vivo. *Int Endod J* 2017; 50(5); 455–463.
 32. Basrani B, Tjäderhane L, Santos JM, Pascon E, Grad H, Lawrence HP. ym. Efficacy of chlorhexidine- and calcium hydroxide-containing medicaments against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(5): 618–624.
 33. Selis D, Pande Y, Smoczer C, Wheeler M, Alhabeil J, Paurazas S. ym. Cytotoxicity and genotoxicity of a new intracanal medicament, 2-hydroxyisocaproic acid – an in vitro study. *J Endod* 2019; 45(5); 578–583.
 34. Verma UP, Gupta A, Yadav RK, Tiwari R, Sharma R, Balapure AK. Cytotoxicity of chlorhexidine and neem extract on cultured human gingival fibroblasts through fluorescence-activated cell sorting analysis: an in-vitro study. *Eur J Dent* 2018; 12(3); 344–349.
 35. Leelapornpisid W, Novak-Frazer L, Qualtrough A, Rautemaa-Richardson R. Effectiveness of D,L-2-hydroxyisocaproic acid (HICA) and alpha-mangostin against endodontopathogenic microorganisms in a multispecies bacterial-fungal biofilm in an ex vivo tooth model. *Int Endod J* 2021; 54(12); 2243–2255.
 36. Nieminen MT, Novak-Frazer L, Rautemaa V, Rajendran R, Sorsa T, Ramage G. ym. A novel antifungal is active against *Candida albicans* biofilms and inhibits mutagenic acetaldehyde production in vitro. *PLoS One* 2014b; 9(5); e97864.
 37. Sakko M. Antimicrobial activity and suitability of 2-hydroxyisocaproic acid for the treatment of root canal infections. *Väitöskirja. Oulu: Oulun yliopisto; 2016.*
 38. Pahalagedara ASNW, Flint S, Palmer J, Brightwell G, Gupta TB. Antibacterial efficacy and possible mechanism of action of 2-hydroxyisocaproic acid (HICA). *Plos One* 2022; 17(4); e0266406.
 39. Usta SN, Eymirli A, Arias-Moliz MT. Evaluation of the removal of 2-hydroxyisocaproic acid from the root canal and its effect on the bond strength of MTA. *Aust Endod J* 2022; 00:1–7.