

# The role of arginine in human wound healing

## Citation for published version (APA):

Debats, I. B. J. G. (2011). *The role of arginine in human wound healing*.  
<https://doi.org/10.26481/dis.20110923id>

## Document status and date:

Published: 01/01/2011

## DOI:

[10.26481/dis.20110923id](https://doi.org/10.26481/dis.20110923id)

## Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

## Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

## General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

## Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## Summary and conclusions



## Summary and conclusions

The skin is the most important barrier against hostile attacks from outside our body. However, it also helps us to interact with our environment. When damaged, a complex cascade of repair mechanisms is initiated to restore its function. This is a well-balanced process, influenced by many mediators. Although research has led to new therapeutical interventions in wound healing, delayed wound healing still is a major burden for patients and society. One of the mediators for adequate skin regeneration is nutrition. The main objective of this thesis was to investigate the isolated role of the immunonutrient arginine in the healing of surgical and chronic wounds in men. We hypothesized that arginine supplementation improved human wound healing.

In the **first chapter**, a review of literature on the current knowledge of the role of arginine in wound healing is presented. Arginine was found to be an important nutrient for skin repair in animal studies and its supplementation significantly improved wound healing. Early results from few studies in men on experimental wounds were promising. As a consequence, arginine supplementation quickly found its way into clinical practice. Clinical studies followed, however they mainly used commercially available nutritional supplements containing, besides arginine, other nutrients such as nucleotides and  $\omega$ -3 fatty acids. The use of a mixture of nutrients and often the lack of a good control group, supplied with isonitrogenous and/or isocaloric amounts, make it difficult to conclude whether treatments should be attributed to the specific pharmaconutrients or simply to the addition of amino acids and/or calories in general. Furthermore, the parameters used to evaluate wound healing were indirect e.g. infection, or pain free removal of the dressing.

The first step in our thesis was to investigate whether human skin uses arginine for its regeneration, therefore in **chapter 2** the skin's transorgan metabolic routing of arginine was investigated, an opportunity given to us by free vascularized tissue surgery. Previously, arginine conversion was assessed indirectly. However, the studies presented here used labelled amino acids (isotopes) to study true metabolism. Patients undergoing reconstructive breast surgery received a skin flap named deep inferior epigastric artery (DIEP) flap. During this surgery an arginine tracer ( $^{15}\text{N}_2$ -arginine) was infused and blood was sampled from the DIEP-flap. Significant uptake of  $^{15}\text{N}_2$ -Arginine ( $p < 0.05$ ) was observed. Although we failed to prove the enzymatic conversion to  $^{15}\text{N}$  citrulline or  $^{15}\text{N}_2$  urea, arteriovenous concentration differences of citrulline and ornithine show that the skin produces both amino acids. Since both amino acids are not protein bound they must be generated endogenously within the skin flap by NOS and ASE-activity respectively. Although tracer data clearly show arginine uptake by the skin, net arginine release was observed. In line with the net release of most other amino acids this finding can be ascribed to net protein breakdown in these post-absorptive patients. The sole net uptake of the amino acid glutamate was remarkable.

Next step was to look at the expression of arginine-metabolic enzymes and arginine-metabolites, which were expected to be elevated in surgical wounds compared to normal skin. In **chapter 3** data are presented of our immunohistological study, in which several biopsies were taken from wounds during a period of ten days post-wounding. We observed that macrophages, polymorphonuclear neutrophils (PMN's), fibroblasts, keratinocytes and endothelial cells showed expression of inducible nitric oxide synthetase (iNOS) compared to no/sparse expression in normal skin. Furthermore, we observed constitutive expression of endothelial nitric oxide synthetase (eNOS) in vessels. After injury an increased number of vessels was observed expressing iNOS. Moreover, both arginase isoforms, arginase-1 (ASE-1) and arginase-2 (ASE2), were expressed during wound healing. ASE1 was uniquely expressed by neutrophils post-wounding, while ASE-2 staining was observed in endothelial cells, keratinocytes, fibroblasts, macrophages and PMN's. In addition to immunohistological evaluation of wounds, levels of arginine metabolites were measured. Increased levels of wound fluid citrulline, nitrite/nitrate (NOx) and ornithine were measured compared to plasma, indicating arginine conversion by NOS and ASE. Levels of ASE1 were significantly higher in wound fluid compared to plasma, while levels of ASE2 were higher in plasma. On the basis of our observations we conclude arginine consumption during healing of surgical wounds in men.

In **chapter 4** the expression of arginine metabolites/metabolic enzymes in chronic wounds were compared to acute wounds. Because infection complicates the course of wound healing, we related the presence of infection to altered arginine metabolism. Some significant differences were observed. First, infected chronic wounds showed significantly elevated wound fluid levels of citrulline and ornithine in comparison to acute wounds. As these amino acids are not released from protein degradation, this suggests elevated activity of the enzymes NOS and ASE. This is supported by the finding of significantly elevated wound fluid ASE1 in these wounds. In contrast decreased levels of NOx were observed in wound fluid of infected chronic wounds, indicating decreased nitric oxide synthesis. Furthermore, patients with infected chronic wounds showed decreased plasma arginine levels compared to patients with acute or non-infected chronic wounds.

In **chapter 5** we describe the results of a double blinded randomized clinical pilot study investigating the effect of oral arginine supplementation, as a single nutrient, on the healing of skin autograft donorsites. Wound healing was evaluated by measuring PMN-influx, neovascularisation and reepithelialization. In both groups equal NOS and ASE-activity was observed in the wound environment. Patients receiving arginine, showed no improvement of wound healing.

In **chapter 6** we tried to overcome possible shortcomings of the previously conducted pilot study, by enlarging the study population and supplying arginine intravenously. The same wound model and wound healing parameters were studied. Both groups were comparable in age, nutritional/metabolic and inflammatory state. We observed an adequate raise of plasma arginine after supplementation. However, no beneficial

effect was observed on PMN-influx, infection, angiogenesis or reepithelialization upon arginine supplementation.

### Final conclusions and future perspectives

The expression of NOS-isotypes and arginine metabolites in surgical wounds presented in this thesis supports previous experimental studies indicating the need for arginine in a NO-mediated repair of injured skin. In addition, we observed arginase expression during healing. Previous studies showed elevation of ASE1 in animal wound healing and overexpression of ASE1 in pathological skin conditions in men. However, our results suggest a more prominent role of ASE2 in normal healing in men. It is not unimaginable that different wound types have different needs at different time points. Our study on chronic wounds supports this hypothesis by showing elevated arginine conversion compared to acute wounds. Furthermore, a NO-depleted state was observed in the infected chronic wounds, possibly responsible for defective defense barrier, as NO is used by several inflammatory cells. This deficient NO production might be caused by bacterial arginine consumption. Another explanation might be a process called substrate competition known from *in vitro* experiments. A disturbance of the delicate balance of NOS and ASE expression, favoring one of both metabolic routes, might affect the availability of arginine. Remarkably, patients with infected chronic wounds had decreased levels of plasma arginine. Lowering of systemic arginine levels is also seen in patients subjected to trauma, burns or surgery and not beneficial for the immune system. As patients had no different systemic inflammatory response, no differences in nutritional state or co-morbidity compared to non-infected chronic wounds, we attributed this finding to a increased metabolic demand caused by the infection present in the wound.

We also conclude that arginine supplementation does not improve wound healing in acute surgical wounds. This is in sharp contrast to experimental studies. We used the donorsite of skin autografting as our model. The advantage of this model is that it is homogeneous and easy to access. Disadvantage can be that it can only be used to study reepithelialization. Although a clinically relevant model, a donor site heals quickly under normal circumstances with few complications. Therefore, differences might be difficult to observe. It could be that arginine supplementation is more effective in other wounds types, like chronic wounds with a NO-depleted state. Sequential activation of the different arginine metabolic pathways is observed in animal models. This might indicate a time course requirement for different arginine metabolites. Moreover, topical application of arginine might be explored, as topical NO-donors have shown beneficial effects on experimental wound healing. Although, arginine plasma levels rose adequately after supplementation, we also observed high levels of plasma ornithine. Bypassing the catabolization of arginine by the gastrointestinal tract should be considered. Citrulline is a natural precursor for L-arginine, it is converted to arginine in many tissues. Therefore it bypasses

metabolism in the liver and is not a substrate or inducer of arginase. Others already showed increased levels of plasma arginine accompanied by induction of bioactive NO upon citrulline supplementation.

Finally, from our study using stable isotopes we might conclude that arginine consumption by skin is not a substrate driven process. In the future, we should consider exploring the possibilities of manipulating the expression of arginine-metabolizing enzymes in wounds. Although the animal experimental data are compelling, there is need for more experimental and clinical trials in order to better define the role of arginine in the care of patients.

## Samenvatting en conclusie





## Samenvatting en conclusie

De huid is onze belangrijkste barrière tegen schadelijke invloeden van buitenaf. Tevens helpt ze ons in de communicatie met onze omgeving. Wanneer de huid beschadigd is, wordt een complexe cascade van herstelmechanismen in gang gezet om haar functie te herstellen. Dit goed uitgebalanceerde proces wordt beïnvloed door vele mediators. Hoewel onderzoek met betrekking tot wondgenezing heeft geleid tot vele nieuwe therapeutische interventies, blijft vertraagde wondgenezing een zware last voor de patiënt en de samenleving. Voeding is van essentieel belang voor een adequate wondgenezing, waarbij aminozuren de bouwstenen zijn. Aminozuren zijn de bouwstenen van onze voeding. Dit proefschrift beschrijft de rol van het aminozuur arginine als immunonutrient, bij de genezing van chirurgische en chronische wonden bij mensen. Onze hypothese is dat arginine suppletie humane wondgenezing zal verbeteren.

In het **eerste hoofdstuk** wordt een literatuuroverzicht van de huidige kennis over de rol van arginine in de wondgenezing gepresenteerd. Uit dierproeven blijkt dat arginine een belangrijke voedingsstof is voor het herstel van de huid. Als immunonutrient verbetert arginine de wondgenezing aanzienlijk. Ook de resultaten van enkele vroege studies met experimentele humane wonden waren veelbelovend. Naar aanleiding van deze resultaten vond suppletie van arginine al snel haar weg naar de kliniek. De daaropvolgende klinische studies vertoonden echter nogal wat beperkingen. Zo bevatten de toegediende voedingssupplementen naast arginine ook andere bestanddelen zoals nucleotiden en omega-3-vetzuren. Vaak ontbrak een goede controlegroep, gesuppleerd met isonitrogene en/of isocalorische hoeveelheden aminozuren. Moest het effect van deze behandelingen toegeschreven worden aan de specifieke immunonutriënten of aan de toevoeging van aminozuren en/of calorieën in het algemeen? Bovendien werden indirecte parameters gebruikt om de wondgenezing te evalueren zoals infectie of het pijnvrij verwijderen van verbandmiddelen. Deze beperkingen maakten het moeilijk conclusies te trekken uit deze studies.

De eerste stap voor dit proefschrift was het toetsen van de hypothese dat de menselijke huid arginine gebruikt. **Hoofdstuk 2** beschrijft de resultaten van de transorgane meting van arginine metabolisme in de huid. Dit werd ons mogelijk gemaakt doordat plastische chirurgie gebruik maakt van zogenaamde vrij gevasculariseerde weefsel transplantatie, waarbij het huidmetabolisme relatief geïsoleerd bestudeerd kan worden. Tot nu toe werd arginine metabolisme indirect beoordeeld. Echter voor onze studie werden gelabelde aminozuren (isotopen) gebruikt. Patiënten die een borstreconstructie ondergingen middels een vrij gevasculariseerde huidlap, genaamd Deep Inferior Epigastric Artery flap (DIEP-lap) werden geïncludeerd. Tijdens deze operatie werd een arginine tracer ( $^{15}\text{N}_2$ -arginine) toegediend en tevens werd bloed afgenomen uit de ader en slagader van de DIEP-lap. Een significante opname van  $^{15}\text{N}_2$ -arginine ( $p < 0,05$ ) werd waargenomen. Hoewel we de enzymatische omzetting naar  $^{15}\text{N}$  citrulline of  $^{15}\text{N}_2$  ureum niet konden aantonen,

kunnen we uit de arterioveneuze concentratieverschillen van citrulline en ornithine opmaken dat de huid deze aminozuren produceert. Omdat geen van beide aminozuren vrijkomt uit eiwitafbraak, moeten deze endogeen gegenereerd zijn in de huid door respectievelijk NOS en ASE-activiteit. Ondanks dat de tracer data duidelijk aantonen dat er arginine opname door de huid plaatsvindt, werd een netto arginine release waargenomen. In lijn met de netto release van de meeste andere aminozuren kan deze bevinding toegeschreven worden aan netto eiwitafbraak in deze katabole patiënten. Een opmerkelijk bevinding was dat het aminozuur glutamaat als enige een netto opname vertoonde.

De volgende stap was het bestuderen van de expressie van enzymen die betrokken zijn bij arginine metabolisme in zowel de normale huid als in de huid met chirurgische wonden. Hierbij werd een verhoogde expressie in chirurgische wonden ten opzichte van normale huid verwacht. **Hoofdstuk 3** beschrijft de resultaten van onze immunohistologische studie, waarbij biopten van wonden gedurende een periode van tien dagen na de operatie werden bestudeerd. We constateerden toegenomen expressie van induceerbaar stikstofoxide synthetase (iNOS) in macrofagen, polymorfonucleaire neutrofielen (PMN's), fibroblasten, keratinocyten en endotheelcellen in deze chirurgische wonden vergeleken met normale huid. Verder constateerden we een basale expressie van endotheliale stikstofoxidesynthetase (eNOS) in bloedvaten van de normale huid. In de wonden echter werd een verhoogd aantal bloedvaten waargenomen die tevens iNOS tot expressie brachten. Zowel de arginase isovormen, arginase-1 (ASE1) en arginase-2 (ASE2) bleken tot expressie te komen tijdens de wondgenezing. ASE1 komt alleen tot expressie in neutrofielen na verwonding, terwijl ASE2-aankleuring wordt waargenomen in endotheelcellen, keratinocyten, fibroblasten, macrofagen en PMN's.

In aanvulling op immunohistologische evaluatie van wonden, werden de waarden van arginine metabolieten gemeten in wondvocht en plasma. Hieruit kan men indirect arginine metabolisme afleiden. Er werden verhoogde waarden citrulline, nitriet / nitraat (NO<sub>x</sub>) en ornithine gemeten in wondvocht ten opzichte van plasma. Waarden van ASE1 waren significant hoger in wondvocht in vergelijking met plasma, terwijl de waarden van ASE2 hoger waren in het plasma. Deze waarnemingen suggereren arginine verbruik tijdens de humane wondgenezing. Om een potentiële verklaring te vinden voor de verstoorde heling van chronische wonden wordt in **hoofdstuk 4** de expressie van arginine metabolieten en metaboliserende enzymen in chronische wonden vergeleken met chirurgische wonden. Aangezien infectie het beloop van wondgenezing negatief beïnvloed, werd tevens de relatie tussen de aanwezigheid van een infectie en arginine-omzetting bestudeerd. Derhalve hebben we de chronische wonden in twee subgroepen verdeeld, te weten de niet- geïnfekteerde en de geïnfekteerde. Enkele significante verschillen werden waargenomen. Ten eerste, geïnfekteerde chronische wonden laten significant verhoogde citrulline en ornithine waarden zien in wondvocht ten opzichte van chirurgische wonden. Aangezien deze aminozuren niet uit eiwitafbraak vrijkomen, suggereert deze verhoging een

toegenomen omzetting van arginine door de enzymen NOS en ASE. Deze suggestie wordt ondersteund door de bevinding dat deze geïnfecteerde wonden significant hogere ASE1 concentratie bevatten. Er werden echter verlaagde waarden van NO<sub>x</sub> waargenomen in wondvocht van geïnfecteerde chronische wonden, hetgeen kan duiden op een verminderde aanmaak of verhoogd verbruik van stikstofmonoxide. Een NO deficiëntie kan nadelig zijn voor de afweer reactie. In tegenstelling tot de andere twee subgroepen werd er in de groep patiënten met geïnfecteerde chronische wonden verlaagde plasma argininespiegels geconstateerd. Aangezien er geen verschil was in systemische metabole of inflammatoire status tussen de subgroepen patiënten, wijzen deze bevindingen op het feit dat toegenomen lokaal verbruik van arginine in chronisch geïnfecteerde wonden leidt tot een verlaging van systemische arginine spiegels.

In **hoofdstuk 5** worden de resultaten van een pilotstudie beschreven. De opzet van de studie was een dubbelblinde gerandomiseerde klinische studie die het effect van orale arginine-suppletie, als mononutriënt, op de genezing van donorsites (van huidtransplantaten) bestudeert. De wondgenezing werd geëvalueerd door het meten van PMN-instroom, neovascularisatie en reëpithelialisatie. In zowel de controle als gesuppleerde groep werd een gelijke NOS en ASE-activiteit waargenomen in het wondmilieu. Patiënten in de arginine-groep, toonden geen verbetering van de wondgenezing.

In **hoofdstuk 6** werd gepoogd de mogelijke beperkingen van de eerder uitgevoerde pilotstudie te verbeteren door de studiepopulatie te vergroten en arginine intraveneus toe te dienen. Hetzelfde wondmodel en dezelfde parameters werden bestudeerd. Beide groepen waren vergelijkbaar in leeftijd, nutriële, metabole en inflammatoire status. Een adequate stijging van het plasma arginine werd na suppletie waargenomen. Een gunstig effect op de wondgenezing bleef echter uit.

## Definitieve conclusies en toekomstperspectieven

De expressie van NOS-isovormen en argininemetabolieten in chirurgische wonden zoals beschreven in dit proefschrift ondersteunt de eerdere experimentele studies waaruit blijkt dat het herstel van beschadigde huid gereguleerd wordt door NO. Daarnaast werd arginase expressie waargenomen tijdens de wondgenezing. Eerdere studies toonden een verhoging van ASE1 in dierlijke wondgenezing en een overexpressie van ASE1 in pathologische huidaandoeningen bij mensen aan. Echter, onze resultaten tonen een meer prominente rol van ASE2 in normale humane wondgenezing. Het is niet ondenkbaar dat verschillende typen wonden verschillende behoeften aan voedingsstoffen hebben op verschillende tijdstippen. Onze studie over chronische wonden ondersteunt deze hypothese door een verhoogde arginine conversie aan te tonen in vergelijking met chirurgische wonden. Verder werd een NO-deficiëntie waargenomen in de geïnfecteerde chronische wonden, mogelijk verantwoordelijk voor de gebrekkige afweer, aangezien NO wordt gebruikt door verschillende inflammatoire cellen. Een tekort aan NO zou ook veroorzaakt kunnen

worden door bacteriële arginine consumptie. Een andere verklaring kan gezocht worden in een proces genaamd “substraat competitie” en bekend van in-vitro experimenten. Dit is een verstoring van het evenwicht in NOS en ASE expressie, waarbij één van beide metabole routes de overhand krijgt. Deze verstoring kan dan invloed hebben op de beschikbaarheid van arginine. Verder was het opmerkelijk dat patiënten met geïnfecteerde chronische wonden verlaagde plasma arginine spiegels vertoonden. Verlaging van de systemische arginine spiegels wordt ook gezien bij patiënten die zijn blootgesteld aan een trauma, brandwonden of operatie en deze verlaging is niet bevorderlijk voor het immuunsysteem. Onze verschillende subgroepen patiënten lieten geen verschil zien in systemische inflammatoire response, voedingstoestand of comorbiditeit. Derhalve zijn wij van mening dat een verlaagde plasma arginine spiegel toegeschreven kan worden aan een verhoogde lokale metabole behoefte ten gevolge van een infectie.

Een andere belangrijke conclusie van dit proefschrift is dat arginine-suppletie de wondgenezing in acute chirurgische (schaaf)wonden niet verbetert. Dit staat in schril contrast met experimentele studies. Als wondmodel gebruikten we de donorsite van de huidtransplantaten. Het voordeel van dit model is dat het homogeen is en gemakkelijk toegankelijk. Nadeel kan zijn dat deze voornamelijk gebruikt kan worden om reëpithelialisatie te bestuderen. Hoewel het een klinisch relevant wondmodel is, geneest een donorsite snel onder normale omstandigheden, hetgeen een reden kan zijn dat verschillen moeilijk waar te nemen zijn. De bevindingen van deze studie sluiten niet uit dat arginine suppletie potentieel meer effect heeft op andere typen wonden. Mogelijk toekomstig onderzoek kan zich richten op de behoefte aan arginine in de verschillende fasen van wondgenezing. In diermodellen is reeds een sequentiële activering van de verschillende metabole routes van arginine waargenomen. Dit kan duiden op een tijdsafhankelijke behoefte aan verschillende arginine metabolieten. Daarnaast zou lokale applicatie van arginine kunnen worden onderzocht, aangezien het aanbrengen van een NO-donor op wonden in de vorm van een crème een gunstig effect heeft op experimentele wondgenezing. Citrulline suppletie kan eveneens onderzocht worden. Hoewel arginine plasmaspiegels adequaat stegen na suppletie, werden ook hoge plasmaspiegels van ornithine waargenomen. De omzetting van arginine door het gastro-intestinale kanaal dient hiervoor verantwoordelijk te worden gehouden. Citrulline is een natuurlijke precursor voor L-arginine en het wordt omgezet in arginine in vele weefsels. Citrulline omzeilt het metabolisme in de lever en is geen substraat of inductor van arginase. Verhoogde argininespiegels in plasma en tegelijkertijd inductie van het bioactieve NO zijn reeds aangetoond na citrulline suppletie. Tot slot kunnen we van onze studie met stabiele isotopen concluderen dat arginine consumptie door de huid niet een substraatgedreven proces is. Het lijkt daarom meer logisch te focussen op manipulatie van expressie van arginine-metaboliserende enzymen in wonden in plaats van substraat te suppleren. Ondanks de positieve experimentele data, is er meer behoefte aan klinische studies om de rol van arginine beter te definiëren in de zorg voor patiënten.