

# Amino acids and fracture healing

## Citation for published version (APA):

Meesters, D. M. (2021). *Amino acids and fracture healing: Insights on the influence of the arginine-citrulline-nitric oxide metabolism during fracture healing and nonunion development*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20210708dm>

## Document status and date:

Published: 01/01/2021

## DOI:

[10.26481/dis.20210708dm](https://doi.org/10.26481/dis.20210708dm)

## 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

Globally, traumatic injuries are one of the major public health burdens and two thirds of all patient visits to an emergency department within the Netherlands are due to accidents, violence or other trauma and result in fractures of one or more bones.

In this thesis, the influence of amino acid metabolism, specifically the arginine-citrulline-nitric oxide metabolism is investigated during bone healing and during bone healing difficulties such as delayed union and nonunion development. In the Netherlands, about 250,000 people yearly attend the emergency department with one or more fractures. Approximately 5-10% of all these fractures will develop complications during the healing process resulting in delayed union or nonunion. The main hypothesis of this thesis was that the arginine-citrulline-nitric oxide metabolism has a crucial influence on an adequate fracture healing process and disturbances in the arginine substrate metabolism play an essential role in development of fracture nonunion, which subsequently can be improved by stimulating the substrate metabolism.

In **chapter 1**, a background on fracture and nonunion epidemiology is provided, and the (disturbed) healing process of fractures is described from a clinical and biological perspective.

**Chapter 2** consists of a literature review starting with a description of the arginine-citrulline-nitric oxide metabolism during normal physiological conditions. Subsequently, the influence of the arginine substrate metabolism is discussed during the complex bone healing process in the clinical setting as well as both the *in vivo* and *in vitro* research setting. A disturbed arginine-citrulline-nitric oxide metabolism resulting in altered concentrations of amino acids or expression of important enzymes was found to negatively influence the healing process.

**Chapter 3** provides the reader with an overview of the outline of this thesis and the different research objectives which were investigated in this thesis.

In order to be able to investigate the arginine-citrulline-nitric oxide metabolism during bone healing, a reproducible animal model was necessary. In **chapter 4**, results of the development of a novel mouse model of delayed union without a critically sized defect and with standardized biomechanical conditions were shown. The mice were followed for a period of 42 days, and it was observed that the non-critically sized induced mid-shaft femoral osteotomy which was induced in combination with cauterization of the periosteum resulted in diminished secondary fracture healing

with significant lower volumes of callus formation. This model enables reliable investigation into the biochemical and molecular biological processes which are ongoing during the bone healing period and additionally can provide an optimal continuum between normal fracture healing and the development of delayed unions and nonunions as a result of the periosteal cauterization.

In **chapter 5** the results of the first experimental animal study are described. Here it is shown that deletion of the essential nitric oxide synthase enzymes results in an almost complete lack of visible bone healing after 42 days. However, not only the decreased bone volumes on  $\mu$ CT imaging were found. Next to this, the arginine-citrulline-nitric oxide metabolism was found to be deregulated with significant differences in amino acid concentrations both in plasma as well as in femoral tissue. Finally, a disturbed inflammatory reaction was observed in animals with hampered bone healing, with increased and prolonged influx of neutrophils after 28 – 42 days of bone healing.

A study into the arginine substrate availability during bone healing complications in humans was presented in **chapter 6**. In 17 patients which underwent a RIA procedure for autologous bone grafting for atrophic long bone nonunion, reamed bone marrow aspirate was collected and investigated. The patients were subsequently divided regarding the success of the outcome of the RIA procedure. In patients with a successful outcome, arginine and ornithine concentrations were found to be higher when compared to patients with persisting nonunions after the treatment. Additionally, Nos2 expression was higher in all patients that underwent treatment for nonunion when compared to control samples from normally healed fractures. Statistical analysis showed that the determination of arginine concentrations and Nos2 expression levels was subsequently found to be useful as a predictor for successful treatment outcome of autologous bone grafting in nonunion treatment.

**Chapter 7** shows the results of our second animal experiment. Here, mice underwent the femur osteotomy which was described before and afterwards received amino acid supplementation for 14 days. Already after two weeks, a significantly increased callus volume was found in treated mice compared to the control group with placebo treated animals. Additionally, gene expression analysis observed decreased expression of inflammatory markers and increased expression of angiogenic and collagen-producing factors in the treated mice, further emphasizing the improved healing process. Although food intake in these mice did not show any difference between the groups,

citrulline-treated mice showed an increased weight gain over the 14 day period, suggesting a better post-operative recovery.

In the final **chapter 8** the obtained results in all studies presented in this thesis are combined and discussed with regards to all available recent literature. Also, it summarized on the main findings and it elaborates on the possibilities for the direction future research in the field of the arginine-citrulline-nitric oxide metabolism during bone healing and nonunion development.

In summary, this dissertation shows that the arginine substrate metabolism is of importance during fracture repair as genetic or pharmacologic inhibition results in inadequate healing responses with disturbed inflammation and decreased callus formation, whereas stimulation of the metabolism increases bone formation and results in a faster bone healing with beneficial biomolecular and biochemical responses.

## **NEDERLANDSE SAMENVATTING**

Traumatische verwondingen zijn wereldwijd een van de grootste gezondheidsproblemen. Ongeveer twee derde van alle patiëntbezoeken aan de spoedeisende hulp van de Nederlandse ziekenhuizen vindt plaats vanwege ongevallen, geweld of andere fysieke trauma's, waarbij een groot deel resulteert in een of meerdere botfracturen.

In deze dissertatie is de invloed van het aminozuurmetabolisme, specifiek het arginine-citrulline-stikstofmonoxide (NO) metabolisme onderzocht zowel tijdens normale botgenezing als tijdens gecompliceerde botgenezing zoals vertraagde genezing en de vorming van non-union (gestopte, onvolledige botgenezing van een fractuur, ook wel eens pseudoarthrose genoemd). De belangrijkste in deze thesis onderzochte hypothese was dat het arginine-citrulline-NO-metabolisme van cruciale invloed is op een adequaat botgenezingsproces en dat verstoringen van het arginine substraatmetabolisme een essentiële rol spelen in de ontwikkeling van non-unions. Verbetering van het substraatmetabolisme zou vervolgens de fractuurgenezing bevorderen.

In **hoofdstuk 1** wordt een achtergrond geschetst over het voorkomen van botfracturen en non-unions met de hierbij horende risicofactoren, en wordt tevens het (verstoorde) genezingsproces en beschreven vanuit zowel een klinisch and een biochemisch en biomedisch perspectief.

**Hoofdstuk 2** bevat een overzicht van de bekende literatuur omtrent eiwitten en aminozuren in relatie met botgenezing, en begint met een beschrijving van het arginine-citrulline-NO-metabolisme tijdens normale fysiologische omstandigheden. Vervolgens wordt het arginine substraatmetabolisme besproken tijdens het botgenezingsproces vanuit zowel de humane (klinische) context als vanuit de experimentele *in vitro* en *in vivo* invalshoek. Een verstoring van het arginine-citrulline-NO-metabolisme resulterend in veranderde concentraties van aminozuren en veranderde genetische expressie van enzymen is gerelateerd aan een verslechterde botgenezing.

**Hoofdstuk 3** toont de lezer een overzicht van de structuur van deze dissertatie en bespreekt de verschillende onderzoeksdoelen welke bestudeerd zijn.

Om het arginine-citrulline-NO-metabolisme te onderzoeken tijdens botgenezing is een betrouwbaar en reproduceerbaar diermodel gewenst. In **hoofdstuk 4** zijn de resultaten van de ontwikkeling van een nieuw muismodel met vertraagde botgenezing getoond, zonder dat gebruik wordt gemaakt van een groot segmentaal defect maar waarbij het periosteum wordt beschadigd

middels electrocauterizatie. De studie laat gestandaardiseerde biomechanische resultaten liet zien, onder andere in de resultaten van de onderzochte buigstijfheid van de femurs. De muizen werden gedurende een periode van 42 dagen opgevolgd en er werd gezien dat een midschacht femurostectomie in combinatie met electrocauterizatie van het periosteum resulteerde in verminderde secundaire botgenezing met significant verlaagde volumes van callus (botnieuwvorming) en een vertraging van de genezing van 14 tot 28 dagen. Het ontwikkelde model zorgt voor een betrouwbare onderzoeksmogelijkheid naar de biochemische en moleculaire aspecten tijdens de botgenezing en kan tevens een optimaal continuüm verzorgen tussen normale fractuurgenezing en de non-union-ontwikkeling als gevolg van het induceren van periosteale schade bij een onderbreking in de botstructuur zoals ook tijdens fracturen optreedt.

In **hoofdstuk 5** zijn de resultaten beschreven van de eerste dierstudie waarin het eerder beschreven diermodel is gebruikt. Het blokkeren van de essentiële stikstofmonoxide-synthase enzymen resulteert in een bijna volledige afwezigheid van botgenezing na 42 dagen. Naast de, via micro-CT, gevonden sterk verlaagde callusvolumes in deze muizen, werd er ook een ontregeld arginine-citrulline-stikstofmonoxide metabolisme ontdekt met significante afwijkende aminozuurconcentraties in zowel bloed als botweefsel. Tenslotte was er ook een verstoorde inflammatoire reactie te zien in de dieren met verstoorde botgenezing, waarbij een verhoogde en, in tijd verlengde, influx van neutrofielen nog zichtbaar was in de periode na 28 tot 42 dagen botgenezing.

Gerelateerd aan dit experimentele werk is de arginine substraatbeschikbaarheid tijdens verstoorde botgenezing bij patiënten beschreven in **hoofdstuk 6**. Van 17 patiënten die een RIA-procedure ondergingen voor autologe beenmergtransplantatie voor atrofische non-union van de lange pijpbeenderen werd reamed beenmergaspiraats verzameld en onderzocht. De verkregen resultaten werden vervolgens verdeeld in twee groepen afhankelijk van het uiteindelijke succes van de behandeling die zij hebben ondergaan. In patiënten waarbij de RIA behandeling zorgde voor een succesvolle botgenezing, waren arginine en ornithine concentraties hoger wanneer dit vergeleken werd met patiënten met persisterende non-unions na behandeling. Tevens was *Nos2* expressie hoger in alle patiënten die deze behandeling voor non-unions ondergingen wanneer dit werd vergeleken met controle weefsels die waren verzameld bij patiënten met een normale fractuurgenezing. Statistisch onderzoek toonde aan dat de determinatie van arginine concentraties en het expressieniveau van *Nos2* gebruikt kan worden als voorspelling voor een succesvolle behandeling van autologe beenmergtransplantatie voor pseudoarthroses.



In **hoofdstuk 7** worden de resultaten gepresenteerd van dierexperimenteel onderzoek naar de bevordering van fractuurgenezing. Muizen ondergingen wederom een femurosteotomie en kregen vervolgens gedurende 14 dagen extra suppletie van aminozuren. Na deze twee weken werden significant verhoogde callusvolumes gevonden in vergelijking met de groep die een placebo behandeling onderging. Tevens liet genexpressie-analyse verlaagde niveaus van inflammatoire markers zien waarbij juist de niveaus van angiogene (vaatnieuwvorming) en collageen (bindweefselvorming) factoren verhoogd waren. Hoewel de voedselinname in deze groepen vergelijkbaar was, lieten muizen die suppletie van citrulline kregen een verhoogde gewichtstoename zien, mogelijk wijzend richting een betere postoperatief herstel.

In het laatste **hoofdstuk 8** zijn alle verkregen resultaten uit de eerder getoonde studies gecombineerd en bediscussieerd aan de hand met alle recente beschikbare literatuur. Tenslotte worden hier de belangrijkste conclusies van ons onderzoek samengevat en worden de mogelijkheden voor toekomstig onderzoek in het onderwerp verder verdiept.

Samenvattend laat deze dissertatie zien dat het arginine substraatmetabolisme van belang is tijdens fractuurgenezing omdat genetische of farmacologische remming resulteert in een inadequaat genezingsproces met verstoorde inflammatie en verminderde callusvorming, en waar stimulatie van het metabolisme resulteert in verhoogde botvorming en versnelde genezing met voordelige biomoleculaire en biochemische reacties.