

## ROLUL DIMETILARGININELOR ÎN VINDECAREA PLĂGILOR CUTANATE

## THE ROLE OF DIMETHYLARGININES IN CUTANEOUS WOUND HEALING

SIMONA ROXANA GEORGESCU\*,\*\*, MIRCEA TAMPA\*,\*\*, CRISTINA IULIA MITRAN\*,\*\*\*,  
MĂDĂLINA IRINA MITRAN\*,\*\*\*, ILINCA NICOLAE\*\*

### Rezumat

Vindecarea plăgilor este un proces esențial pentru recuperarea întregului organism. Factorii care asigură o comunicare intercelulară adecvată în toate fazele de vindecare a plăgilor cutanate (faza inflamatorie, faza proliferativă, faza de remodelare tisulară) nu sunt cunoscute în totalitate. Dovezi experimentale, obținute atât din studiile la animale cât și la om, sugerează că dimetilargininele ar putea juca un rol cheie în repararea plăgilor cutanate. Cunoașterea mecanismelor moleculare care declanșează și perpetuează plăgile cronice ar putea reprezenta un mijloc de manipulare a metabolismului în direcția restaurării rapide a integrității cutanate.

**Cuvinte cheie:** leziuni cutanate, regenerare tisulară, dimetilarginine.

Intrat în redacție: 30.10.2019

Acceptat: 12.12.2019

### Summary

Wound healing is an essential process for whole body recovery. The factors that support an adequate intercellular communication in all wound healing phases (inflammatory, proliferative, tissue remodelling) are not fully known. Experimental evidence from research in both animals and humans suggest that dimethylarginines may have a key role in cutaneous wound healing. Knowledge of molecular mechanisms that initiate and promote chronic wounds may represent a way of manipulating the metabolism into fast restoration of skin integrity.

**Key words:** cutaneous wounds, tissue regeneration, dimethylarginines

Received: 30.10.2019

Accepted: 12.12.2019

### Introducere

Progresele recente obținute în vindecarea plăgilor cutanate și tratamentul acestora au arătat că o plagă acută se vindecă repede, vindecarea ei este bine controlată de către organism cauzând pierderi funcționale minime, pe când o plagă cronică nu se vindecă, rămâne blocată în faza

### Introduction

Recent progress in cutaneous wound healing and treatment showed that an acute wound heals rapidly, its healing well controlled by the organism and with minimal functional loss, while a chronic wound does not heal, remaining stuck in the inflammatory phase [1].

\* Universitatea de Medicină și Farmacie „Carol Davila”, București, România.

“Carol Davila” University of Medicine and Pharmacy, Bucharest, Romania.

\*\* Spitalul Clinic de Boli Infecțioase „Dr. Victor Babeș”, București, România.

“Victor Babeș” Clinical Hospital for Infectious Diseases, Bucharest, Romania.

\*\*\* Institutul Național Medico-Militar pentru cercetare și dezvoltare “Cantacuzino”, București, România.

“Cantacuzino” National Medico-Military Institute for Research and Development, Bucharest, Romania.

inflamatorie [1]. Identificarea factorilor care ar putea împiedica sau favoriza vindecarea plăgilor cutanate reprezintă un obiectiv major al comunității medicale din întreaga lume. Numeroase lucrări experimentale din ultimele două decenii au evidențiat că procesul de vindecare a plăgilor cutanate implică trei faze interconectate în timp și spațiu:

- a) faza inflamatorie;
- b) faza proliferativă;
- c) faza de remodelare tisulară [1].

Răspunsul inflamator este o reacție imediată de apărare a organismului la acțiunea factorilor nocivi (leziuni, infecții). Faza inflamatorie (eliminarea agenților patogeni și curățarea plăgii) se caracterizează prin:

- a) inflamație neurogenă cutanată;
- b) hemostază.

Aceste evenimente timpurii implică participarea celulară, modificări vasculare, alterări ale matricei extracelulare, sinteză a numeroși factori biochimici care acționează ca pro- și antioxidanți, modificând sau contribuind la întreținerea focarului inflamator.

Monocitele din sângele periferic și macrofagele rezidente tisulare sunt celulele inflamatorii dominante care orchestrează inițierea, evoluția și rezolvarea fazei inflamatorii în procesul de vindecare a plăgilor [1–10].

Faza proliferativă (granulație) este identificată prin:

- a) fibroplazie (proliferarea fibroblastelor și diferențierea în miofibroblaste, depunerea matricei extracelulare, contracția plăgii);
- b) reepitelizarea și interacțiunea epitelial-mezenchimală între keratinocite și fibroblaste);
- c) angiogeneza (proliferarea și formarea de noi vase);
- d) repararea nervilor periferici. Macrofagele sunt celulele inflamatorii dominante care orchestrează faza proliferativă a reparației plăgilor cutanate [1–10].

Faza de remodelare (restaurarea integrității pielii) este concretizată în:

- a) diminuarea treptată a țesutului de granulație;

Identification of factors that could hinder or foster cutaneous wound healing is a major objective of the medical community worldwide. Numerous experimental studies over the past two decades showed that the process of cutaneous wound healing involves three phases, interconnected over time and space:

- a) inflammatory phase;
- b) proliferative phase;
- c) tissue remodelling phase [1].

Inflammatory response is an immediate defence reaction of the body against the action of harmful factors (lesions, infections). The inflammatory phase (removal of pathogens and wound cleansing) features:

- a) cutaneous neurogenic inflammation;
- b) haemostasis.

These early events include cellular involvement, vascular changes, extracellular matrix alterations, synthesis of many biochemical factors acting as pro- and antioxidants, by modifying or promoting the inflammatory focus.

Monocytes in the peripheral blood and tissue-resident macrophages are the dominant inflammatory cells that orchestrate the initiation, evolution and resolution of the inflammatory phase in the wound healing process [1–10].

The proliferative (granulation) phase is identified through:

- a) fibroplasia (fibroblast proliferation and differentiation into myofibroblasts, extracellular matrix deposition, wound contraction);
- b) reepithelialisation and epithelial mesenchymal interactions between keratinocytes and fibroblasts;
- c) angiogenesis (proliferation and formation of new blood vessels);
- d) peripheral nerve repair. Macrophages are the dominant inflammatory cells that orchestrate the proliferative phase in the wound healing process [1–10].

The remodelling phase (skin integrity restoration) consists of:

- a) gradual reduction of granulation tissue;

- b) remodelarea epidermului, vascularizației dermice, terminațiilor nervoase și miofibrilelor, cu formare de țesut funcțional [1-10].

Modificarea procesului normal de vindecare a pielii conduce la complicații, precum:

- a) fibroză;
- b) plăgi cronice cutanate [1-10].

Fibroza este caracterizată prin producerea excesivă de matrice extracelulară. La nivel cutanat, fibroza este recunoscută prin keloid, cicatrice atrofice și cicatrice hipertrofice. Cicatricile atrofice sunt subdenivelate și determină o depresiune la nivel cutanat. Cele hipertrofice sunt proeminente și se remit în timp. Cicatricile keloide sunt tumori nonmaligne formate din țesut fibros care depășește limitele leziunii inițiale, sunt supradenivelate, expansive și continuă să crească. Majoritatea tipurilor de leziuni ale pielii se pot vindeca prin dezvoltarea unor cicatrici keloide. Dintre acestea amintim: acneea, arsuri, varicela, piercing în ureche, incizia chirurgicală, vaccinarea.

Plăgile cronice cu pierdere de țesut, care nu se vindecă spontan, sunt identificate ca ulcere venoase și arteriale, ulcere de decubit, ulceratii ale piciorului diabetic [1-10]. Apariția lor este favorizată de prezența unor tulburări circulatorii sanguine, diabet, boli inflamatorii ale pielii, vârstă [1]. Cunoașterea proceselor metabolice care declanșează și perpetuează plăgile cronice ar putea reprezenta un mijloc de manipulare a metabolismului în direcția soluționării acestor afecțiuni.

### **Statusul oxidului nitric în vindecarea plăgilor cutanate**

Dovezi experimentale, obținute atât din studiile la animale cât și la om, indică faptul că oxidul nitric (NO) joacă un rol cheie în repararea plăgilor cutanate necomplicate. NO este implicat în evenimente celulare și moleculare ale vindecării plăgilor, precum vasodilație, angiogeneză, inflamație, proliferare celulară, depunerea matricei, fibroza tisulară, răspunsuri imune și remodelare [11,12]. Importanța NO a fost demonstrată prin vindecarea întârziată a plăgilor la animale cu sinteză de NO afectată genetic. În plus, terapia cu NO este eficientă în vindecarea

- b) remodelling of the epidermis, dermal vascularity, nerve endings and myofibrils, with formation of functional tissue [1-10].

Changes in the normal skin healing process leads to complications, such as:

- a) fibrosis;
- b) cutaneous chronic wounds [1-10].

Fibrosis is described as excessive production of extracellular matrix. On the skin, fibrosis is recognized as keloid, atrophic and hypertrophic scar. Atrophic scars are depressed and take the form of a sunken recess in the skin. Hypertrophic scars are prominent and remit with time. Keloid scars are non-malignant tumours consisting of fibrous tissue that cross the limits of the initial lesions, are elevated, expansive and continue growing. Most of the skin lesions can heal through keloid development. Among these, we mention acne, burns, chickenpox, ear piercing, surgical incisions, vaccination.

Chronic wounds with tissue loss, that do not heal spontaneously, are identified as venous and arterial ulcers, decubitus ulcers, diabetic foot ulcers [1-10]. Their occurrence is promoted by circulation disorders, diabetes, inflammatory skin diseases, age [1]. Knowledge of metabolic processes that initiate and promote chronic wounds may represent a way of manipulating the metabolism into solving these afflictions.

### **Nitric oxide status in cutaneous wound healing**

Experimental proof for both animal and human studies indicate that nitric oxide (NO) plays a key part in the healing of uncomplicated skin wounds. NO is involved in cellular and molecular events concerning wound healing, such as vasodilation, angiogenesis, inflammation, cell proliferation, matrix deposition, tissue fibrosis, immune responses and remodelling [11,12].

The importance of NO was demonstrated through delayed wound healing in animals with genetic impairment of NO synthesis. In addition, NO therapy is efficient in ischemic and diabetic

ulcerelor ischemice și diabetice la animalele experimentale prin inducerea reepitelizării, angiogenezei și sintezei de colagen [1,11–15]. S-au descris numeroși factori care modulează nivelul și biodisponibilitatea NO în procesul de vindecare a plăgilor cutanate. Dintre aceștia enumerăm: substrat enzimatic, inhibitori enzimatici, mediatorii inflamatori și imunitari [1,11].

### **Oxidul nitric și pielea**

La mamifere, sinteza NO este catalizată de NO-sintetaza (NOS, E.C.1.14.13.39). NOS catalizează oxidarea aminoacidului nonproteinogenic L-arginină la citrulina și NO. Clonarea moleculară a evidențiat existența a trei izoforme NOS diferite: NOS neuronală (nNOS), NOS endotelială (eNOS) și NOS inductibilă (iNOS). Toate cele trei NOS sunt proteine homodimerice, a căror activitate depinde de cofactorii esențiali (NADPH, flavine reduse, hemoproteine cu fier, 6 (R) 5,6,7,8-tetrahidrobiopterină). Izoformele NOS exprimate în mod constitutiv în piele sunt activate prin creșterea nivelului de Ca<sup>2+</sup>/calmodulină. Expresia nNOS a fost observată în keratinocite și melanocite, expresia eNOS a fost detectată în keratinocitele stratului epidermic bazal, fibroblaste dermice, capilare endoteliale și glande eccrine, în timp ce iNOS poate fi indusă în keratinocite, fibroblaste, celule Langerhans și celule endoteliale. Așadar, NO ar putea regla melanogeneza mediată de ultravioletele B și menținerea barierei de protecție. În general, expresia iNOS a fost descrisă în boli inflamatorii ale pielii (psoriazis, lupus eritematos, dermatită atopică, dermatita de contact, sclerodermie, pemfigus vulgar, sindromul Sjogren, sindromul Stevens Johnson) [1,11–13].

### **Oxidul nitric ca agent antimicrobian**

NO exercită activitate antimicrobiană în mod bimodal, dependent de concentrație [11–15]. La concentrații scăzute, stimulează sistemul imunitar prin îmbunătățirea proliferării, diferențierii și apoptozei celulelor imune, sinteza de citokine și sinteza matricei extracelulare. În schimb, iNOS, ca o componentă a sistemului imunitar înăscut, produce cantități mari de NO atunci când este

ulcer healing in experimental animals, by inducing reepithelialisation, angiogenesis and collagen synthesis [1,11–15]. Numerous factors that modulate NO level and bioavailability in the cutaneous wound healing process were described. Among them: enzyme substrates, enzyme inhibitors, inflammatory and immune mediators [1,11].

### **Nitric oxide and the skin**

In mammals, NO synthesis is catalysed by NO synthase (NOS, E.C.1.14.13.39). NOS catalyses the oxidation of non-proteinogenic amino acid L-arginine to citrulline and NO. Molecular cloning highlighted the presence of three NOS isoforms: neuronal NOS (nNOS), endothelial NOS (eNOS) and inducible NOS (iNOS). All three NOS are homodimer proteins, their activity depending on essential cofactors (NADPH, reduced flavins, haemoproteins, 6 (R) 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin). Constitutive NOS isoforms expressed in the skin are activated by an increased level of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. nNOS expression was observed in keratinocytes and melanocytes, eNOS expression was detected in keratinocytes of the basal layer of the epidermis, in dermal fibroblasts, endothelial capillaries and eccrine glands, while iNOS can be induced in keratinocytes, fibroblasts, Langerhans and endothelial cells. Thus, NO may regulate melanogenesis mediated by ultraviolet B radiation, and maintenance of the skin barrier.

Generally, iNOS expression was described in skin inflammatory diseases (psoriasis, lupus erythematosus, atopic dermatitis, contact dermatitis, scleroderma, pemphigus vulgaris, Sjogren syndrome, Stevens-Johnson syndrome) [1,11–13].

### **Nitric oxide as an antimicrobial agent**

NO shows bimodal antimicrobial activity, depending on concentration [11–15]. At low concentrations, it stimulates the immune system by improving proliferation, differentiation and apoptosis of the immune cells, cytokine synthesis and synthesis of extracellular matrix. On the

activat de polizaharide și endotoxine bacteriene, precum și de citokine proinflamatorii. La concentrații mai mari de 1  $\mu\text{M}$ , utilitatea NO în combaterea agenților patogeni derivă în mare măsură din capacitatea sa de a reacționa cu intermediarii de oxigen reactiv pentru a genera specii reactive de oxid de azot (RNOS). Peroxinitritul (OONO-), cel mai reactiv și citotoxic RNOS, se formează atunci când NO interacționează cu superoxidul. RNOS deține numeroase proprietăți antimicrobiene prin inducerea stresului nitrosativ și oxidativ, inactivarea enzimelor esențiale, epuizarea depozitelor intracelulare de fier, deteriorarea ADN-ului microbial (prin generarea de agenți de alchilare și peroxid de hidrogen și inhibarea reparației ADN-ului), dezorganizarea membranei celulare microbiene prin peroxidarea lipidelor. Șoarecii knockout iNOS demonstrează o susceptibilitate crescută la infecția cu virusul herpes simplex, precum și o eliminare redusă a virusului latent. Șoarecii tratați cu un inhibitor iNOS s-au dovedit mai vulnerabili la infecțiile cu bacterii intracelulare [14,15].

#### ADMA / SDMA și plăgile cutanate

Activitatea enzimelor NOS este reglementată de derivații metilați ai argininei, dintre care dimetilarginina asimetrică (ADMA) și dimetilarginin simetrică (SDMA) sunt reglatori ai activității enzimatice [16,23]. Deși sunt stereozomeri, ADMA și SDMA se diferențiază prin comportamentul biologic și semnificația clinică (tabelul 1). În primul rând, ADMA este inhibitor competitiv puternic al NOS, iar SDMA este inhibitor competitiv slab al transportatorilor de aminoacizi cationici (CAT). În al doilea rând, ADMA și SDMA concurează cu L-arginina pentru transportatorii săi și, prin urmare, acumularea lor scade producția de NO prin diminuarea disponibilității L-argininei pentru NOS. ADMA și SDMA sunt reglate la nivelul sintezei de protein-arginin-metiltransferaze diferite (PRMT). ADMA este catabolizată în cea mai mare parte la L-citrulină și dimetilamină (DMA), prin dimetilarginină dimetilaminohidrolaze (DDAHs). SDMA este excretată în mod preferențial prin urină.

other hand, as a component of the innate immune system, iNOS produces large quantities of NO when activated by polysaccharides and bacterial endotoxins, as well as proinflammatory cytokines. At concentrations larger than 1  $\mu\text{M}$ , the utility of NO against pathogen agents derives largely from its capacity of reacting with reactive oxygen intermediates in order to generate reactive nitrogen oxide species (RNOS). Peroxynitrite (ONOO-), the most reactive and cytotoxic RNOS, is formed when NO reacts with superoxide. RNOS have many antimicrobial properties, through inducing nitrosative and oxidative stress, inactivating essential enzymes, depleting intracellular iron deposits, damaging microbial DNA (by generating alkylating agents and hydrogen peroxide, and by inhibiting DNA repair), disrupting microbial cellular membrane by peroxidation of lipids. iNOS knockout mice show increased susceptibility to herpes simplex virus infection, as well as decreased elimination of latent virus. Mice treated with an iNOS inhibitor proved more vulnerable to intracellular bacterial infections [14,15].

#### ADMA / SDMA and cutaneous wounds

The activity of NOS enzymes is regulated by methylated arginine derivatives, of which asymmetric dimethylarginine (ADMA) and symmetric dimethylarginine (SDMA) are of enzyme activity regulators. (16-23). Despite being stereoisomers, ADMA and SDMA have different biological behaviour and clinical significance (Table 1). Firstly, ADMA is a strong competitive inhibitor of NOS, while SDMA is a weak competitive inhibitor of cationic amino acid transporters (CAT). Secondly, ADMA and SDMA compete with L-arginine for its transporters, thus their accumulation decreases NO production by decreasing L-arginine availability for NOS. ADMA and SDMA syntheses are regulated by different protein arginine methyltransferases (PRMTs). ADMA is mainly catabolised to L-citrulline and dimethylamine (DMA), by dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAHs). SDMA is excreted through urine by choice.

Tabel 1 – ADMA și SDMA metabolism și implicații fiziopatologice [16–23]

Proveniență
<p>A. Sinteza posttranslațională intranucleară mediată de PRMTs (E.C.2.1.1.125) ADMA se obține prin dimetilarea NG-asimetrică a resturilor de L-Arg din proteine sub acțiunea PRMT tip 1 (PRMT-1, -3,-4, -6, -8), urmată de proteoliză; este eliberată și preluată de organe țintă via CAT. SDMA se obține prin dimetilarea NG-simetrică a resturilor de L-Arg din proteine, reacție mediată de PRMT tip 2 (PRMT-5, -9), urmată de scindarea proteolitică; este transportată extracelular.</p> <p>B. Absorbția exogenă din produse alimentare bogate în lipide și colesterol.</p>
Eliminare
<p>A. Excreția renală reprezintă calea secundară de eliminare a ADMA (sub 10% ) și calea majoră pentru SDMA (peste 90%).</p> <p>B. Degradarea intracelulară a ADMA, însă nu SDMA, prin conversie la citrulină și dimetilamină (peste 90%), sub acțiunea DDAH (E.C. 3.5.3.18), enzima exprimată în rinichi, creier, pancreas, ficat, celule imune.</p> <p>C. Transaminarea ADMA și SDMA la DMGV, sub acțiunea AGTX2 (E.C.2.6.1.44), enzima exprimată preferențial în rinichi.</p> <p>D. Conversia ADMA și SDMA prin butilare și metilare.</p>
Activitatea biologică
<p>A. ADMA și SDMA produc activarea NFκB cu inducerea expresiei citokinelor proinflamatorii.</p> <p>B. ADMA și SDMA afectează producția NO:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Compușii NG-metilați inhibă activitatea NOS (E.C. 1.14.13.39) MMA&gt;ADMA&gt;SDMA;</li> <li>• ADMA și SDMA sunt inhibitori ai absorbției celulare de L-Arg via CAT.</li> </ul> <p>C. ADMA și SDMA sunt inductori ai stresului oxidativ și inflamației:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimulare reciprocă ADMA - ROS prin creșterea activității PRMT1, reducerea DDAH, scăderea CAT;</li> <li>• SDMA crește producția ROS în monocite stimulate cu fMLP prin modularea influxului de calciu via SOC;</li> <li>• SDMA induce creșterea producției endoteliale de ROS, efect asociat cu reducerea absorbției de Arg și inhibiția producției de NO;</li> <li>• ADMA accelerează sinteza ROS.</li> </ul> <p>D. ADMA și SDMA exercită efect toxic asupra sistemului imun.</p> <p>E. Efect asupra lipoproteinelor:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SDMA produce modificări adverse asupra HDL cu activarea TLRs;</li> <li>• ADMA afectează oxidarea LDL-colesterolului.</li> </ul> <p>F. ADMA și SDMA sunt aminoacizi neproteinogenici, toxine uremice hidrosolubile, cu greutate moleculară scăzută (sub 0.5kDa), ușor de îndepărtat prin dializă, cu efecte asupra organismului incomplet demonstrate.</p> <p>G. ADMA este mediator al disfuncției endoteliale, SDMA este factor sensibil al funcției renale.</p> <p>H. ADMA și SDMA modulează biodisponibilitatea NO și influențează vindecarea plăgilor cronice cutanate.</p>

Rezultate recente [16,23] au arătat că la pacienții cu plăgi cronice au crescut atât concentrațiile ADMA cât și SDMA, comparativ cu persoanele sănătoase și pacienții cu boli cardiometabolice fără plăgi cronice. Creșterea ADMA este asociată cu factorii de risc cardiovascular. Explicația acestui fenomen este următoarea: ADMA interferează cu sinteza NO prin inhibarea enzimelor NOS și prin reducerea disponibilității de arginină, concurând pentru transportatorii săi de membrană. În plus, afectează semnalizarea NO prin inhibarea fosforilării eNOS. De asemenea, ADMA a fost crescută la pacienții cu ulceratii ale extremităților semnificativ mai mult decât la pacienții cu diabet fără neuropatie. SDMA afectează în mod negativ disponibilitatea argininei prin inhibarea transportului membranal, dar nu a câștigat la fel de

Recent results [16,23] showed an increase in both ADMA and SDMA concentrations, as compared with healthy people and cardiometabolic patients without chronic wounds. The increase in ADMA is associated with cardiovascular risk factors. The explanation of this phenomenon is the following: ADMA interferes with NO synthesis by inhibiting NOS enzymes and by reducing arginine availability, competing for its membrane transporters. In addition, it affects NO signalling by inhibiting eNOS phosphorylation. Furthermore, ADMA increases in patients with limb ulcerations significantly more than in diabetic patients without neuropathy. SDMA negatively affects arginine availability by inhibiting, but does not spark the same interest as ADMA because it is only a weak inhibitor of NOS. There is little information about SDMA in

Table 1 - ADMA and SDMA - metabolism and pathophysiology implications [16–23]

Origin
<p>A. Intranuclear posttranslational synthesis mediated by PRMTs (E.C.2.1.1.125) ADMA is obtained by NG-asymmetric dimethylation of L-Arg residues in proteins, under the action of type 1 PRMT (PRMT-1, -3, -4, -6, -8), followed by proteolysis; it is released and taken up by target organs via CAT. ; SDMA is obtained by NG-symmetric dimethylation of L-Arg residues in proteins, reaction mediated by type 2 PRMT (PRMT-5, -9), followed by proteolysis; it is transported outside the cell</p> <p>B. Exogen absorption from lipid and cholesterol-rich foods.</p>
Elimination
<p>A. Renal excretion is the secondary excretion route for ADMA (less than 10%) and the main route for SDMA (over 90%);</p> <p>B. Intracellular degradation of ADMA, but not SDMA, by conversion to citrulline and dimethylamine (over 90%), by action of DDAH (E.C. 3.5.3.18), enzyme expressed in kidneys, brain, pancreas, liver, immune cells;</p> <p>C. Transamination of ADMA and SDMA to DMGV, by action of AGTX2 (E.C.2.6.1.44), enzyme expressed by choice in the kidneys;</p> <p>D. Conversion of ADMA and SDMA by butylation and methylation.</p>
Biological activity
<p>A. ADMA and SDMA generate NFkB activation, through induction of proinflammatory cytokine expression;</p> <p>B. ADMA and SDMA impact NO production:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• NG-methylated compounds inhibit NOS activity (E.C. 1.14.13.39) MMA&gt;ADMA&gt;SDMA;</li> <li>• ADMA and SDMA are inhibitors of cell absorption of L-Arg via CAT.</li> </ul> <p>C. ADMA and SDMA are activators of oxidative stress and inflammation:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Mutual stimulation ADMA - ROS by increasing PRMT1 activity, reducing DDAH, decreasing CAT;</li> <li>• SDMA increases ROS production in fMLP-stimulated monocytes, by modulating calcium influx via SOC;</li> <li>• SDMA induces the increase in endothelial production of ROS, associated with a decrease in Arg absorption and inhibition of NO production;</li> <li>• ADMA accelerates ROS synthesis.</li> </ul> <p>D. ADMA and SDMA have a toxic effect on the immune system.</p> <p>E. Effect on lipoproteins:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• SDMA causes adverse changes in HDL with TLR activation;</li> <li>• ADMA impairs oxidation of LDL-cholesterol.</li> </ul> <p>F. ADMA and SDMA are non-proteinogenic amino acids, hydro soluble uremic toxins, with low molecular weight (less than 0.5KDa), easy to remove through dialysis, with incompletely demonstrated effects in the body.</p> <p>G. ADMA is a mediator of endothelial dysfunction, SDMA is a sensitive indicator of renal function.</p> <p>H. ADMA and SDMA modulate NO bioavailability and have an impact on the healing of chronic cutaneous wounds.</p>

multă atenție ca ADMA, deoarece este doar un inhibitor slab al NOS. Informațiile privind SDMA în plăgile cronice sunt reduse. În plus, datele obținute din metaanalize care leagă SDMA de riscul de mortalitate în boli cardiovasculare sunt contradictorii. Mai mult, studiile funcționale au arătat că SDMA elimină proprietățile anti-inflamatorii și antiaterogene ale HDL. În consecință, SDMA a fost revendicat a fi un marker al disfuncției HDL [23]. Alte evaluări arată că nivelurile ADMA și SDMA au fost crescute, raporturile Arg/ADMA și Arg/SDMA au fost semnificativ reduse la pacienții cu plăgi cronice, ceea ce indică o disponibilitate redusă de NO și, respectiv, arginină. Caracterul plăgilor pare să aibă un impact asupra biodisponibilității NO, deoarece raportul Arg/ADMA a fost redus semnificativ la pacienții cu ulcerații. La rândul

chronic wounds. In addition, data obtained from metaanalyses linking SDMA with mortality risk in cardiovascular disease are conflicting. Moreover, functional studies showed that SDMA eliminates anti-inflammatory and antiatherogenic properties of HDL. Consequently, SDMA was claimed to be a marker of HDL dysfunction [23]. Other evaluations show that ADMA and SDMA levels were elevated, and Arg/ADMA and Arg/SDMA ratios were significantly reduced in chronic wound patients, which indicated low NO and, respectively, arginine availability. Wound type seems to have an impact on NO availability, considering that Arg/ADMA ratio was significantly reduced in patients with ulcers. In turn, wound etiology affected arginine availability, as venostasis patients had high levels of SDMA and low levels of Arg/SDMA. ADMA and SDMA

său, etiologia plăgii a afectat biodisponibilitatea argininei, deoarece pacienții cu stază venoasă au avut valori crescute de SDMA și reduse de Arg/SDMA. Nivelul metaboliților ADMA și SDMA este reglementat în principal de ratele de sinteză ale acestora (PRMTs tip I pentru ADMA și PRMTs tip II pentru SDMA) și de rata degradării lor de către enzimele DDAH (pentru ADMA) și excreția renală (valabilă pentru SDMA). PRMTs și DDAH ar putea fi modificate mai puternic în rândul pacienților cu plăgi cronice decât fără, deoarece sunt pozitiv (PRMT) și negativ (DDAH) afectate de mediatorii inflamatori [16,23].

Citokinele inflamatorii sunt printre inițiatorii disfuncției endoteliale și jucători cheie în susținerea inflamației la nivelul plăgilor cronice. Induc expresia iNOS, dar o inhibă pe cea a eNOS și contribuie la acumularea ADMA. Recent, s-a documentat că plăgile cronice sunt însoțite de creșterea sistemică a IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, FGF-2, MIP-1 $\alpha$ , PDGF-BB și VEGF-A. De asemenea, CRP semnificativ crescut și HDL redus la pacienții cu plăgi cronice în comparație cu cei cu sarcină cardiometabolică similară indică un grad mai mare de inflamație. Concentrațiile ADMA au fost asociate în mod independent și invers cu nivelul VEGF-A, ceea ce indică impactul negativ al acumulării de ADMA asupra angiogenezei la pacienții cu plăgi cronice. De asemenea, relația strânsă între răspunsul inflamator, disponibilitatea NO, raportul Arg/ADMA și Arg/SDMA poate sugera complexitatea evenimentelor implicate în soluționarea plăgilor cronice [23,24].

## Concluzii

Datele relatate arată că pacienții cu plăgi cronice prezintă alterări ale homeostaziei NO și argininei, care rezultă din acumularea ADMA și SDMA. Nivelurile metaboliților, ADMA și SDMA, sunt invers asociate cu biodisponibilitatea NO și argininei. Ca atare, descoperirile recente nu susțin suplimentarea cu arginină sau citrulină la pacienții cu plăgi cronice și sugerează mai degrabă necesitatea tratamentului care vizează scăderea concentrațiilor de ADMA și SDMA.

levels are mainly regulated through their rates of synthesis (type 1 PRMTs for ADMA and type 2 PRMTs for SDMA) and degradation by DDAH enzymes (for ADMA), and renal excretion (for SDMA). In patients with chronic wounds, PRMTs and DDAH could be modified more, because they are positively (PRMTs) and negatively (DDAH) affected by inflammatory mediators [16,23].

Inflammatory cytokines are among the initiators of endothelial dysfunction and key players in supporting the inflammation in chronic wounds. They induce iNOS expression but inhibit eNOS expression and contribute to ADMA accumulation. Recently, it has been documented that chronic wounds are associated with systemic increase of IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, FGF-2, MIP-1 $\alpha$ , PDGF-BB and VEGF-A. Also, significantly increased CRP and low HDL in chronic wound patients, as compared to those with similar cardiometabolic burden, indicates a higher level of inflammation. ADMA concentrations were independently and inversely associated with VEGF-A levels, which indicates negative impact of ADMA accumulation on angiogenesis in chronic wound patients. In addition, the tight relationship between inflammatory response, NO availability, and Arg/ADMA and Arg/SDMA ratios may suggest the complexity of events involved in chronic wound repair [23]

## Conclusions

Reported data show that patients with chronic wounds present alterations in NO and arginine homeostasis, resulting from ADMA and SDMA accumulation. ADMA and SDMA levels are inversely related with NO and arginine bioavailability. Thus, recent discoveries do not support arginine or citrulline supplementations in chronic wound patients, and rather suggest the necessity of treatment aiming to lower the concentrations of ADMA and SDMA.



## Bibliografie/Bibliography

1. Dorantes LC, Ayala MC. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review, *Abs.Int.J.Inflamm.*, 2019, 15.
2. Pasparakis M, Haase I, Nestle FO, Mechanisms regulating skin immunity and inflammation, *Nature Reviews Immunology*, 2014;14( 5): 289-301, 2014.
3. Rousselle. P, Braye F, Dayan G. Re-epithelialization of adult skin wounds: cellular mechanisms and therapeutic strategies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2018.
4. Tracy LE, Minasian RA, Caterson EJ. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound, *Advances in Wound Care*, 2016; 5( 3):119-136.
5. Hinz B. The role of myofibroblasts in wound healing, *Current Research in Translational Medicine*, 2016; 64(4): 171-177.
6. Martins VL, Caley M, O'Toole EA. Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair, *Cell and Tissue Research*, 2013; 351( 2): 255-268.
7. Volk SW, Iqbal SA, Bayat A. Interactions of the extracellular matrix and progenitor cells in cutaneous wound healing, *Advances in Wound Care*, 2013; 2( 6): 261-272.
8. Klingberg F, Hinz B, White ES. The myofibroblast matrix: implications for tissue repair and fibrosis, *The Journal of Pathology*, 2013; 229,( 2):298-309.
9. Eming A, Martin P, Canic T. Wound repair and regeneration: mechanisms, signaling, and translation, *Science Translational Medicine*, 2014; 6 ,265.
10. Pakshir P, Hinz B. The big five in fibrosis: Macrophages, myofibroblasts, matrix, mechanics, and miscommunication, *Matrix Biology*, 2018; 68-69: 81-93.
11. Witte M, Barbul A. Role of nitric oxide in wound repair. *Am. J. Surgery*, 2002;183(4):406-412.
12. Luo J, Chen A. NO: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharm. Sinica*, 2005; 26, 259-264.
13. Frank S, Kampf C, Wetzler C et al. NO drives skin repair, *Kidney*, 2002; 61(3):882-888.
14. Durao J, Vale N, Gomes S et al. NO release from antimicrobial peptide hydrogels for wound healing, *Biomolecules*, 2019;9(1):4.
15. Adler B, Friedman A. NO therapy for dermatologic disease. *Future SciOA*, 2015. *Toxins (Basel)*. 2017 Mar; 9 (3): 92.
16. Tain YL, Hsu CN. Toxic dimethylarginines:ADMA and SDMA, *PMCID*, 2017.
17. Tsikas, D. Does the inhibitory action of asymmetric dimethylarginine (ADMA) on the endothelial nitric oxide synthase activity explain its importance in the cardiovascular system? The ADMA paradox. *J. Controversies Biomed. Res.* 2017, 3, 16-22.
18. Tsikas, D.; Bollenbach, A.; Hanff, E.; Kayacelebi, A.A. Asymmetric dimethylarginine (ADMA), symmetric dimethylarginine (SDMA) and homoarginine (hArg): The ADMA, SDMA and hArg paradoxes. *Cardiovasc. Diabetol.* 2018, 17, 1.
19. Blanc R.S., Richard S. Arginine Methylation: The Coming of Age. *Mol. Cell* 2017, 65, 8-24.
20. Schlesinger S, Sonntag SR, Lieb W, Maas R. Asymmetric and symmetric dimethylarginine as risk markers for total mortality and cardiovascular outcomes: A systematic review and meta-analysis of prospective studies. *PLoS ONE* 2016, 11.
21. Emrich IE, Zawada AM, Martens-Lobenhoffer J, Fliser D, Wagenpfeil S, Heine GH, Bode-Böger SM. Symmetric dimethylarginine (SDMA) outperforms asymmetric dimethylarginine (ADMA) and other methylarginines as predictor of renal and cardiovascular outcome in non-dialysis chronic kidney disease. *Clin. Res. Cardiol.* 2018, 107, 201-213.
22. Zobel E.H, von Scholten BJ, Reinhard H, Persson F, Teerlink T, Hansen TW, Parving HH, Jacobsen PK, Rossing P. Symmetric and asymmetric dimethylarginine as risk markers of cardiovascular disease, all-cause mortality and deterioration in kidney function in persons with type 2 diabetes and microalbuminuria. *Cardiovasc. Diabetol.* 2017, 16, 88.
23. Damaso EO, Damaso A, Esparragon FR et al, ADMA and SDMA in CKD:AclinicalApproach, *Molecular Sciences*, 2019;20, 3668.

24. Korpicka MK, Więcniewski J, Fleszar M et al. Metabolites of the Nitric Oxide (NO) Pathway Are Altered and Indicative of Reduced NO and Arginine Bioavailability in Patients with Cardiometabolic Diseases Complicated with Chronic Wounds of Lower Extremities: Targeted Metabolomics Approach (LC-MS/MS), *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019;13, 5965721.

Conflict de interese  
NEDECLARATE

Conflict of interest  
NONE DECLARED

*Adresa de corespondență:* Ilinca Nicolae  
Spitalul Clinic de Boli Infecțioase „Dr. Victor Babeș”, București, România.  
drnicolaei@yahoo.ro

*Correspondance address:* Ilinca Nicolae  
“Victor Babeș” Clinical Hospital for Infectious Diseases, Bucharest, Romania.  
drnicolaei@yahoo.ro