

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0273**

**Deoxyribonukleázová aktivita v plazme a jej význam pri odstraňovaní extracelulárnej DNA**

Zodpovedný riešiteľ **doc. MUDr. Peter Celec, DrSc., MPH**

Príjemca **Univerzita Komenského v Bratislave - Lekárska fakulta**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Ústav Molekulárnej Biomedicíny, Lekárska fakulta UK v Bratislave

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

Žiadne

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

Žiadne

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

1: Lauková L, Konečná B, Janovičová Ľ, Vlková B, Celec P. Deoxyribonucleases and Their Applications in Biomedicine. *Biomolecules*. 2020 Jul 11;10(7):1036. doi: 10.3390/biom10071036. PMID: 32664541; PMCID: PMC7407206.

2: Lauková L, Bertolo EMJ, Zelinková M, Borbélyová V, Čonka J, Gaál Kovalčíková A, Domonkos E, Vlková B, Celec P. Early Dynamics of Plasma Dna in a Mouse Model of Sepsis. *Shock*. 2019 Aug;52(2):257-263. doi: 10.1097/SHK.0000000000001215. PMID: 30052582.

3: Janovičová Ľ, Konečná B, Vokálová L, Lauková L, Vlková B, Celec P. Sex, Age, and Bodyweight as Determinants of Extracellular DNA in the Plasma of Mice: A Cross-Sectional Study. *Int J Mol Sci*. 2019 Aug 26;20(17):4163. doi: 10.3390/ijms20174163. PMID: 31454899; PMCID: PMC6747214.

4: Celec P, Vlková B, Lauková L, Bábíčková J, Boor P. Cell-free DNA: the role in pathophysiology and as a biomarker in kidney diseases. *Expert Rev Mol Med*. 2018 Jan 18;20:e1. doi: 10.1017/erm.2017.12. PMID: 29343314.

### Uplatnenie výsledkov projektu

Projekt mal charakter základného výskumu, takže uplatnenie je dominantne v identifikácii nových problémov na riešenie - nepoznáme faktory determinujúce variabilitu DNázovej aktivity v plazme, nevieme, ktorá z DNáz je za akých podmienok zodpovedná za odstránenie extracelulárnej DNA v rôznych modeloch chorôb asociovaných s uvoľnením DNA z buniek, nepoznáme fragmentáciu extracelulárnej DNA jej imunogenicitu v týchto

modeloch. Toto sú otázky, ktorým sa chceme venovať v následnom grantovom projekte. Priame uplatnenie je ale aj v lepšom pochopení patogenézy sepsy, pečeneňového zlyhávania, ale aj metabolického syndrómu, čo môže v ďalšom skúmaní viesť k novým hypotézam o terapeutických cieľoch.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)**

Predkladaný projekt mal nasledujúce 3 základné ciele, ktoré sme v rámci projektu stihli naplniť.

Cieľ 1: Popísať interindividuálnu a intraindividuálnu variabilitu DNázovej aktivity v plazme ľudí i experimentálnych zvierat

Realizovali sme dve prierezové štúdie. Jedna bola realizovaná na myšiach a bola unikátna svojim jednoduchým, ale zriedkavým dizajnom. Zistili sme, že myši často využívané v animálnych experimentoch majú mimoriadne vysokú interindividuálnu variabilitu extracelulárnej DNA i DNázovej aktivity. Z analyzovaných faktorov však len pohlavie ovplyvňovalo plazmatickú DNázovú aktivitu. U ľudí sme realizovali najväčšiu klinickú štúdiu zameranú na ecDNA a DNázovú aktivitu u mladých zdravých probandov. Hoci extracelulárna DNA súvisela ako s hematokritom, tak aj s množstvom neutrofilov, našli sme aj mimoriadne zaujímavú väzbu na skóre metabolického syndrómu. Cieľ na základe získaných výsledkov považujeme za splnený.

Cieľ 2: Otestovať možný vplyv modelovaných chorôb na DNázovú aktivitu a overiť význam variability endogénnej DNázovej aktivity na patogenézu sepsy, hepatorenálneho zlyhávania a metabolického syndrómu v animálnych experimentoch

Podľa plánu sme realizovali experimenty s indukciou modelov príslušných chorôb, pričom variabilitu v rámci modelov sme testovali v asociácii s DNázovou aktivitou na začiatku pokusu. Našli sme mimoriadne zaujímavé zistenie, že pri pečeneňovom zlyhaní endogénna DNázová aktivita ovplyvňuje dokonca aj prežívanie myší. Vysoká DNázová aktivita je pritom asociovaná s lepším prežívaním. Podobné výsledky sme ale nenašli pri modeli sepsy alebo metabolického syndrómu. To môže súvisieť s odlišnosťami ochrany extracelulárnej DNA. DNA uvoľnená z hepatocytov pri ich poškodení je zrejme citlivá voči nukleázam, nie je chránená vo vezikulách, resp. mitochondriách. Napriek tomu, že mechanizmus zodpovedný za rozdiely nemáme dokázaný, považujeme cieľ za splnený.

Cieľ 3: V následnom intervenčnom animálnom experimente zvýšiť DNázovú aktivitu pomocou génovej terapie a sledovať vplyv na ecDNA a prejavy indukovaných chorôb

V animálnom experimente sme aplikovali expresný plazmid hydrodynamickou intravenóznou injekciou. Napriek vysokým dávkam ale bol efekt na DNázovú aktivitu veľmi variabilný a detegovateľný len u niektorých zvierat. V klinicky relevantnom modeli cekálnej ligácie a punkcie sme nedosiahli týmto prístupom očakávaný pokles extracelulárnej DNA a teda ani benefit na úrovni septického skóre. Predpokladáme, že to môže byť spôsobené potrebou kombinovať DNázu 1 a DNázu 113. Aj cieľ 3 považujeme za splnený.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

The submitted project had the following 3 basic goals, which we managed to fulfill within the project.

Objective 1: To describe the interindividual and intraindividual variability of DNase activity in the plasma of humans and experimental animals

We performed two cross-sectional studies. One was realized on mice and was unique with its simple but rare design. We found that mice often used in animal experiments have extremely high interindividual variability in both, extracellular DNA and DNase activity. Of the factors analyzed only sex affected plasma DNase activity. In humans, we performed the largest clinical study focused on ecDNA and DNase activity in young healthy subjects. Although extracellular DNA was to be associated with both, hematocrit and neutrophil counts, we also found an extremely interesting link to the metabolic syndrome score. Based on the obtained results, we consider the goal to be fulfilled.

Objective 2: To test the possible influence of modeled diseases on DNase activity and to verify the significance of the variability of endogenous DNase activity on the pathogenesis of sepsis, hepatorenal failure and metabolic syndrome in animal experiments

According to the plan, we performed experiments with the induction of models of the

respective diseases, while we tested the variability within the models in association with DNase activity at the beginning of the experiment. We found an extremely interesting result that in hepatic failure, endogenous DNase activity affects even mouse survival. High DNase activity is associated with better survival. However, we did not find similar results in the models of sepsis or metabolic syndrome. This may be related to differences in the protection of extracellular DNA. DNA released from hepatocytes during their damage is probably sensitive to nucleases, it is not protected in vesicles or mitochondria. Although the mechanism responsible for the differences is not proven, we consider the goal to be met. Objective 3: To increase DNase activity using gene therapy in a subsequent interventional animal experiment and to monitor the effect on ecDNA and the manifestations of induced diseases

In an animal experiment, we applied the expression plasmid using hydrodynamic intravenous injection. However, despite high doses, the effect on DNase activity was very variable and detectable only in some animals. In a clinically relevant model of cecal ligation and puncture, we did not achieve the expected decrease in extracellular DNA and thus no benefit at the level of the septic score with this approach. We hypothesize that this may be due to the need to combine DNase 1 and DNase 113. We also consider goal 3 to be met.