نانوحامل‌های کاتیونی جهت ژن‌درمانی با سیستم ویرایش ژن CRISPR/Cas9

محمد امیری[۱]، اکبر شجاعی[۲*]، مهدی کریمی[۳]، شهره مشایخان[۴]

۱- مرکز علوم و فناوری نانو، پژوهشکده جامع علوم وفناوری همگرا، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

۲- گروه کامپوزیت‌های پلیمری، دانشکده مهندسی شیمی ونفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

۳- گروه نانوفناوری پزشکی، دانشکده فناوری‌های نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران

۴- گروه نانوبیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی و نفت، دانشگاه صنعتی شریف، تهران

چکیده

پیشرفت و بهره برداری از علم همواره به عنوان اهرمی برای افزایش کیفیت و غلبه بر مشکلات جامعه انسانی مورد استفاده قرار گرفته است. در سال‌های اخیر با افزایش بیماری‌هایی همچون سرطان، پژوهشگران هم به مبارزه با آن پرداخته‌اند. ظهور نانوتکنولوژی به عنوان یک علم فراگیر، پتاسیل بزرگی را در علوم مختلف، از جمله حوزه سلامت و پزشکی به ارمغان آورده است. استفاده از نانوحامل‌ها به منظور رسانش هوشمند و هدفمند دارو یا ژن به نقطه‌ای خاص، از جمله پژوهش‌های بسیار زیاد به منظور مقابله با بیماری‌ها بوده است. در این بین نانوساختارهایی بر پایه پلیمرها به دلیل تطابق زیستی با محیط بدن، امکان سنتز و اصلاح دلخواه ساختار، در بین سایر نانوساختارهای دارو/ژن‌رسان توجه پژوهشگران را به خود جلب کرده است. از سال ۲۰۱۶ با معرفی سیستم CRISPR/Cas9 به عنوان یک ابزار ویرایش ژن که در درمان سرطان ریه به کار رفت، تغییر مسیر تحقیقات به سمت ژن‌رسانی بر مبنای ویرایش ژن آغاز شده است. در این مقاله پس از معرفی مختصر از تمایزات درمان در دارو و ژن‌رسانی، مقایسه انواع نانوحامل‌ها، مروری بر نانوحامل‌های کاتیونی غیر ویروسی با محوریت در سیستم ویرایش ژن CRISPR/Cas9 انجام شده است.

واژه‌های کلیدی: *ژن‌رسانی، نانوحامل،پلیمر کاتیونی، ویرایش ژن، CRISPR/Cas9*

ایمیل نویسنده مسئول: akbar.shojaei@sharif.edu

تاریخ دریافت : ۱۴۰۳/۱۱/۷ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۴/۳۴/۱۷ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۳/۱۹

۱-مقدمه

توسعه نانوتکنولوژی در سلامت تحت عنوان نانوپزشکی انقلاب بزرگی را در نانوتکنولوژی به ارمغان آورده است. چندین نانوحامل دارو توانسته‌اند مراحل برون‌تنی (*in-vitro*)، درون‌تنی (*in-vivo*)، تست‌های کلینیکی (فاز ۱، ۲ و ۳) را پشت سر بگذارند و نهایتاً با اخذ تأییدیه FDA[1] یا EMA[2] تحت عنوان نانوداروهای هوشمند و سیستم‌های هدفمند دارورسانی، وارد بازار سلامت شوند. از معروفترین این نانوداروها می‌توان دوکسوروبیسین[3] (DOX) و ابراکسین[4] را نام برد. این نانوداروها این پتانسیل را دارند که بر محدودیت‌های موجود در درمان‌های سنتی سرطان، مانند شیمی‌درمانی غلبه کنند، چراکه این نانوداروها با رسیدن هدفمند به تومور یا سلول مورد نظر، به بافت‌های سالم آسیبی وارد نمی‌کنند و بدین ترتیب عوارض جانبی را به حداقل می‌رسانند. علیرغم پژوهش‌های صورت گرفته بسیار، سیستم‌های دارورسانی معدودی توانسته‌اند مراحل اولیه را طی کنند و وارد بازار شوند. این درحالی است که پژوهشگران با وقفه زمانی کوتاهی به این فکر افتادند که نانوحامل‌ها را با ژن مسلح کنند. به این ترتیب که به جای مبارزه با بیماری، یک قدم جلوتر، به داخل سلول رفته و در آنجا ژن مورد نظر را انتقال و بیان دهند، تا بدین ترتیب با سرمنشاء بیماری مبارزه کرده باشند. لذا انواع ساختار اسید نوکلئیک[5] مثل پلاسمید DNA (pDNA)، اسیدریبونوکلئیک[6] (RNA)، RNA خاموشگر[7] (siRNA) یا پیام‌رسان[8] (mRNA) به عنوان محموله‌هایی بودند که در نانوحامل سوار شده‌اند. نانوحامل‌های ویروسی معایبی از جمله آلوده کردن سایر نقاط بدن و توانایی حمل پایین ژن را دارند. در ادامه مسیر، نانوحامل‌های غیر ویروسی همچون کاتیون‌های پلیمری، با مزایایی از جمله ظرفیت بارگیری زیاد از DNA و جذب سلولی[9] بالا به عنوان نانوحامل‌های ژن‌رسانی معرفی شدند (۱, ۲).

از سال ۲۰۱۳، جرقه سیستم CRISPR/Cas9[10] برای سلول‌های پستانداران از اسید نوکلئیک‌های siRNA به عنوان پتانسیلی برای انقلابی در ویرایش ژن معرفی شد. کریسپر نوعی سیستم ایمنی تطابق‌پذیر در باکتری‌ها است که آن‌ها را قادر به کشف DNA ویروس و سپس نابودیشان می‌کند. بخشی از سیستم کریسپر، پروتئینی به نام Cas9 است. Cas9 در حقیقت یک قیچی پروتئینی است، که قابلیت جستجو، برش زدن و برداشتن ژنوم معیوب و حذف آن را دارد. قابلیت جستجو به وسیله کوپل کردن Cas9 با sgRNA به دست می‌آید. در حقیقت CRISPR/Cas9 قادر است با کمک sgRNA محل دقیق برش در ژنوم را شناسایی کند و در نتیجه ویرایش ژنی را با دقت بسیار بالایی انجام دهد (۳).

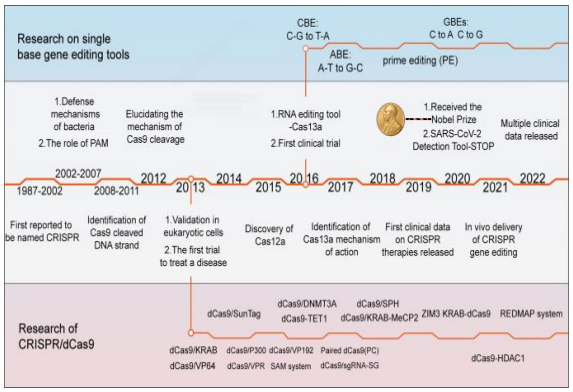
همانگونه که اشاره شد، پژوهشگران از دارو برای از بین بردن بیماری مانند حذف کردن تومورها و کشتن آن‌ها استفاده می‌کرده‌اند و این در حالیست که در ژن‌درمانی به سراغ هسته سلول می‌روند. فرق ژن‌درمانی با ژن‌درمانی با سیستم CRISPR/Cas9 در این است که: در اولی با فرض اینکه ژن سالم به خوبی بیان گردد، اما باز هم نسخه‌ای کپی شده از ژن معیوب در داخل سلول در کنار نسخه ژن سالم موجود است. اما در سیستم

[1] US Food and Drug Administration
[2] European Medicine Agency
[3] Doxorubicin
[4] Abraxane
[5] Nucleic Acid
[6] Ribonucleic Acid
[7] Small Interfering RNA
[8] Messenger RNA

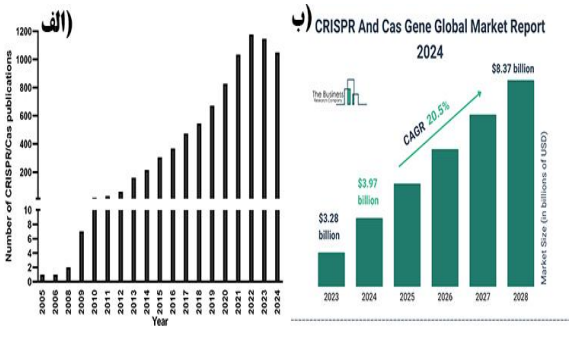
[9] Cellular Uptake
[10] Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats

CRISPR/Cas9 اول ژن معیوب با بیشترین دقت و کمترین خطا در محل توسط Cas9 برش داده و حذف می‌شود و بعد از آن ژن سالم بیان می‌شود. این توانایی CRISPR/Cas9 را به عنوان یک اَبردرمانگر قوی برای بیماری‌های مهلک مانند سرطان معرفی کرده است و به نظر می‌رسد که پژوهش‌های زیادی بر مبنای CRISPR/Cas9 آغاز شده است (۳).

شکل ۱ روندی از سیستم CRISPR/Cas9 و شکل ۲ روند صعودی مقالات چاپ شده در سال‌های اخیر و بازار جهانی آن را نشان می‌دهد.



شکل ۱. روندی از شناسایی و گسترش CRISPR/Cas9 (٤)



شکل ۲. الف) روند صعودی مقالات و ب) بازار جهانی مرتبط با CRISPR/Cas9 (٥, ٦)

در این مقاله، مروری بر نانوحامل‌های مورد استفاده در ژن‌رسانی با تأکید بر نانوحامل‌های کاتیونی انجام شده است و مسائل پایه ای مانند انواع وکتورها، اصول و عملکرد ویرایش ژن CRISPR/Cas، مکانیزم‌ها و فعالیت‌های صورت گرفته جهت ارتقای راندمان ژن‌رسانی ذکر شده است.

۲- نانوحامل‌های ژن‌رسانی

هدف اصلی ژن‌درمانی تحویل دادن و بیان ژن در سلول‌های هدف است، تا بدین وسیله بتوان بیماری را درمان کرد. جهش‌های ژنتیکی نقش کلیدی در بروز برخی بیماری‌ها، به‌ویژه تومورهای سرطانی، ایفا می‌کنند. در این حالت ژن به طور صحیح بیان نمی‌گردد و با اخلال در رونویسی ژن[1]، علاوه بر تولید سلول سرطانی، سیستم ایمنی بدن و مسیرهای متابولیکی معیوب می‌شوند. مزیت ژن‌درمانی نسبت به دارودرمانی این است که در ژن‌درمانی مستقیماً سراغ مبدأ و منشأ بیماری رفته می‌شود. از سال ۲۰۰۶ با درمان سرطان ملانوما توسط ژن‌درمانی زمینه‌های تحقیقاتی بیشتری آغاز گردید. لازم به ذکر است که ملانوما نوعی سرطان پوست است. روش‌های زیادی به منظور رسانش ژن به سلول ارائه شده است. اما در اینجا هم مهم‌ترین بحث هدفمند بودن ژن‌رسانی توسط نانوحاملی است که اولاً DNA، RNA، siRNA و چنین اسیدنوکلئیک‌هایی را بتواند به خوبی بارگیری کند، ثانیاً پایداری و طول عمر آن در محیط بدن بالا باشد، یعنی به سرعت توسط سیستم ایمنی بدن پاکسازی نشود، ثالثاً در زمان مناسب به محل دقیق برسد و در نهایت محتویات خود را به صورت کنترل شده رها سازد. سایر شرایط مثل عدم سمیت، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری نیز برای این نانوحامل‌ها مثل نانوحامل‌های موجود در دارورسانی صادق است. ضمناً نانوحامل‌های ژن‌رسان می‌بایست بیان ژن بالایی داشته باشند. تا کنون غالباً به منظور رسانش

[1] Gene Transcription

ژن از وکتورهای ویروسی و یا غیر ویروسی استفاده شده است که در ذیل به صورت مختصر به این وکتورها و نقاط ضعف وقوت آن‌ها پرداخته می‌شود (۷).

۱-۲- وکتورهای ویروسی

آدنوویروس‌ها[1] (AD)، ویروس‌های تقویت شده آدنو[2] (AAV)، رتروویروس‌ها[3] (RV) و لنتی‌ویروس‌ها[4] (LV) معروف‌ترین وکتورهای ویروسی هستند که در ژن‌رسانی برای درمان بیماری‌هایی همچون انواع سرطان و ایدز مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این وکتورها پروتئین پوششی در سطح (کپسید[5]) ویروس در هدف ویروسی را شناسایی می‌کنند و به صورت اختصاصی به آن می‌چسبند. یکی از معایب وکتورهای ویروسی استفاده از دوز بالای این ویروس‌ها است. به دو دلیل از دوز بالا استفاده می‌شود. ۱) در برخی از سلول‌های هدف تعداد گیرنده‌های این ویروس کمتر است و ۲) پس از تزریق یا استفاده به صورت خوراکی، چون با ویروس سروکار داریم، ویروس سریعاً پخش می‌شود، که این امر هم استفاده از دوز بالاتر را می‌طلبد و در نتیجه مجدداً بحث پاسخ سیستم ایمنی بدن و عوارض جانبی مطرح می‌گردد. مشکل دیگر این است که این ویروس‌ها ممکن است سایر سلول‌ها را هم آلوده کنند که این امر مطلوب نیست. یکی از مزایای RV نسبت به AV این است که RVها به صورت پیوسته ژنوم خود را هنگام تکثیر به میزبان‌های جدید منتقل می‌کنند و این امر بدین معنی است که به طور پیوسته بافت‌ها و سلول‌های سرطانی مورد هدف قرار می‌گیرند. البته این امر در حقیقت یک چاقوی دو لبه است، چرا که دیگر سلول‌های بدن که گیرنده RV دارند، ممکن است توسط این ویروس آلوده شوند. از آنجاییکه مولکول DNA یک مولکول بزرگ به حساب می‌آید، ویروس‌هایی مانند AAV و LV توانایی بارگیری و حمل DNA را ندارند. اگرچه راندمان وکتورهای ویروسی به منظور رساندن ژن بالا است ولیکن با توجه به معایب فوق‌الذکر، عموماً کاربری این وکتورها را محدود کرده است (۷-۹).

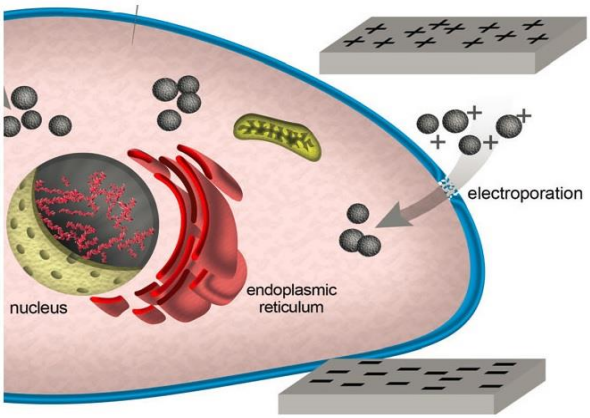
در ادامه به بررسی وکتورهای غیر ویروسی که در دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته اند، پرداخته می‌شود.

۲-۲- وکتورهای غیر ویروسی

وکتورهای غیر ویروسی را می‌توان به دو خانواده فیزیکی و شیمیایی تقسیم بندی کرد:

در گروه فیزیکی تفنگ ژنی[6]، الکتروپوریشن[7]، میکروتزریق[8] و امواج فراصوت[9] رایج‌ترین روش‌ها برای رسانش ژن می‌باشند. در تفنگ ژنی، DNA توسط پوشش‌هایی از طلا، تنگستن یا نقره پوشش داده می‌شود و سپس به بافت تزریق می‌شود. در الکتروپوریشن ابتدا دو الکترود در محل مورد نظر کاشته می‌شود، سپس با اعمال میدان الکتریکی نانوذره شامل DNA تحت فشار به صورت موقت حفراتی را در سلول ایجاد کرده و وارد سیتوپلاسم سلول می‌شود (شکل ۳). این روش به گیرنده خاصی نیاز ندارد ولی ولتاژ اعمالی ممکن است به بافت‌های بدن آسیب وارد کند (۷, ۱۰).

[1] Adenoviral
[2] Adeno-Associated Virus
[3] Retrovirus
[4] lentivirus
[5] Capsid
[6] Gene Gun
[7] Electroporation
[8] Microinjection
[9] Sonoporation



شکل ۳. فرآیند وارد کردن ژن به داخل سلول توسط روش فیزیکی الکتروپوریشن (۱۰)

وکتورهای غیر ویروسی برای ژن‌رسانی بر پایه عملیات شیمیایی، شامل استفاده از پلیمرها، لیپوزوم‌ها، دندریمرها و لیپیدهای کاتیونی است. از آنجا که بار DNA منفی است، استفاده از پلیمرهای کاتیونی یکی از چشمگیرترین انتخاب‌ها می‌باشد. این بار منفی DNA و پلیمرهای کاتیونی یک کلید اصلی برای بارگیری DNA توسط پلیمرهای کاتیونی است. در این حالت نانوساختار بر پایه پلیمر کاتیونی DNA را در بر گرفته و علاوه بر حفاظت آن در محیط بدن، فرآیند اندوسیتوز به داخل سلول را فراهم می‌کنند. لیپوزوم‌ها هم با توجه به دارا بودن دو فاز آبی و فسفولیپیدی، نانوساختار جذابی برای انتقال ژن محسوب می‌گردند. وجود شاخه‌های زیاد در دندریمرها علاوه بر اینکه قابلیت بارگذاری را در این نانوساختار افزایش می‌دهد، به عامل‌دار کردن و افزایش هدف‌گیری و هوشمندی کمک می‌کند. لیپیدهای کاتیونی شامل سرهای آبدوست و دم‌های آبگریز هم به عنوان کاندیدی دیگر، برای رسانش ژن به کار رفته است. اگرچه پایداری ضعیف در بدن و چرخه عمر پایین و راندمان پایین بیان ژن استفاده از این لیپیدها را برای ژن‌رسانی محدود ساخته است (۱۱, ۱۲). با توجه به مباحث صورت گرفته، می‌توان به این جمع‌بندی رسید که استفاده از وکتورهای غیر ویروسی در مقایسه با وکتورهای ویروسی در ژن‌رسانی کارایی بهتری دارند. همچنین در وکتورهای غیر ویروسی روش‌های شیمیایی هوشمندتر و استفاده از نانوساختارهای پلیمری بر پایه پلیمرهای کاتیونی می‌تواند در ژن‌رسانی بهترین گزینه قلمداد گردد، که در قسمت ۲-۳ به طورکامل به آن پرداخته شده است.

۳-۲- نانوساختارهای پلیمری بر پایه پلیمرهای کاتیونی

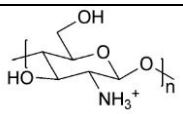
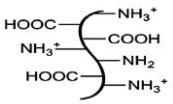
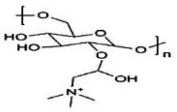
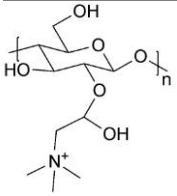
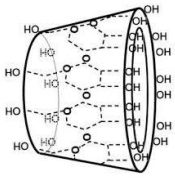
در دهه اخیر تحقیقات زیادی بر روی پلیمرهای کاتیونی به عنوان سازنده نانوحامل‌های کاتیونی به منظور مهندسی بافت، رسانش دارو و علی‌الخصوص ژن‌رسانی صورت گرفته است. در مورد پلیمرهای آنیونی با توجه به دارا بودن بار منفی، می‌توان از نانوساختارهای برپایه این پلیمرها در رسانش داروهای کاتیونی، بایومولکول‌های کاتیونی همچون پپتیدها و پروتئین‌های خونی استفاده کرد. برعکس پلیمرهای آنیونی، با توجه به حضور بار مثبت در پلیمرهای کاتیونی، می‌توان از این پلیمرها در سنتز نانوساختارهایی به منظور بارگیری و رسانش بایومولکول‌های با بار منفی همچون اسید نوکلئیک‌ها (DNA، siRNA، pDNA) بهره برد. انعطاف‌پذیری، فرآیند سنتز راحت و بازدهی بالا در انتقال ژن از جمله خواص چشمگیر این پلیمرها می‌باشد، که نظر پژوهشگران را به خود جلب کرده است. نانوساختارهای متشکل از این پلیمرها علاوه بر دارا بودن خواص فیزیکی و شیمیایی مطلوب، توانایی اعمال اصلاحات سطحی و عامل‌دار کردن به منظور افزایش هوشمندی را دارا می‌باشند. علاوه بر توانایی عامل‌دار

شـدن، خواصـی چـون پاسـخ دادن بـه محـرک‌هـا، آنتی‌باکتریال، ضد التهاب بودن، سمیت کم (بـه صـورت عمومی)، استفاده از این پلیمرها را بـه منظـور ژن‌رسـانی فراگیر کرده است. نانوحامل پلیمر کاتیونی کـه DNA را بارگیری می‌کند، از تخریـب آن در محـیط بـدن توسـط آنزیم‌ها جلوگیری می‌کند و تا رسیدن به محل مورد نظر پایـدار اسـت. از طرفـی غالباً جـذب سـلولی بـرای ایـن نانوحامل‌های پلیمـری بـه راحتـی صـورت مـی‌گیـرد. در سـایر پلیمرهـا مـی‌تـوان بـا افـزودن گـروه‌هـای کـاتیونی همچون دکستران و سیکلودکسترین[1] خواص کـاتیونی را ایجـاد کـرد. ایـن پلیمرهـا خـواص کـاتیونی خـود را از گروه‌های آمینی خود کسب می‌کننـد کـه بسـته بـه نـوع پلیمر، تعداد و نوع آن‌ها متفاوت است. گروه‌های آمینـی قابلیت پروتونه شدن دارند و ایـن امـر در پاسـخگویی بـه pH یـک نقـش اساسـی قلمـداد مـی‌گـردد. سـاختار ایـن پلیمرها به صورت خطـی[2]، شـاخه‌ای[3] و دنـدریمر شـکل هست کـه در طراحـی نانوحامـل نهـایی مـی‌تـوان از هـر ساختار برای کاربرد خاصی بهره برد و یـا نانوحـاملی بـه صورت کوپلیمر سنتز کـرد. بـه عنـوان مثـال پلـی آمیـدو آمـین[4] (PAMAM) بـه صـورت دنـدریمر، پلـی‌ال‌لیـزین (PLL) دارای ساختار خطـی و پلـی‌اتـیلن ایمـین (PEI) بـا وزن مولکـولی‌هـای مختلـف، هـر دو سـاختار خطـی و شاخه‌ای را دار می‌باشد (۱۳-۱۵).

پلیمرهای کاتیونی به دو گروه اصلی پلیمرهـای طبیعـی و سنتزی تقسیم می‌شوند.

غیـر سـمی بـودن، اسـتخراج از منـابع تجدیـد پـذیر، زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری، ایمنی‌زایی پایین در بـدن و دارا بـودن سـایت‌هـای فعـال ذاتـی بـه منظـور عامل‌دار کردن از جمله مزایای پلیمرهای کاتیونی طبیعی مـی‌باشـد. پلیمرهـای کـاتیونی کیتوسـان[5]، ژلاتـین[6]، دکسـتران، سیکلودکسـترین و سـلولوز[7] از جملـه معروفترین این پلیمرها می‌باشد. اگرچه تغییرات احتمالی در هر دسته، که ذات مواد طبیعی است می‌تواند به عنوان یک چالش بـرای ایـن پلیمرهـا در نظـر گرفتـه شـود. در جدول ۲-۱ معروفترین پلیمرهای طبیعـی در نانوپزشـکی به همراه ساختار و کاربردشان دیده می‌شود.

جدول ۲-۱: پلیمرهای کاتیونی به کار رفته در نانوپزشکی (۱۳)

پلیمر	ماهیت	ساختار	کاربرد
کیتوسان	پلی‌ساکارید		رهایش دارو مهندسی بافت رهایش ژن
ژلاتین	پروتئین		
دکستران	پلی‌ساکارید		
سلولوز	پلی‌ساکارید		
سیکلودکسترین	پلی‌ساکارید		

بـرای پلیمرهـای سـنتزی، PEI ۲۵ کیلودالتـون (۲۵ kDa PEI) با قابلیت بالای بیان ژن بـه عنـوان پیشـاهنگ و سـر دسته ایـن گـروه قلمـداد مـی‌گـردد. پلیمرهـای کـاتیونی

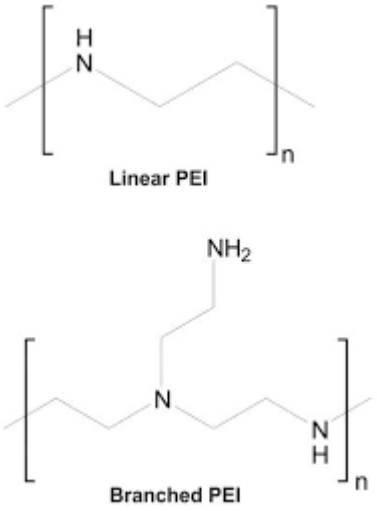
[1] Cyclodextrin
[2] Linear
[3] Branched
[4] Poly(Amidoamine)
[5] Chitosan
[6] Gelatin
[7] Cellulose

همچـون PLL، (PAMAM)، پلـی‌آمینواسـتر[1] (PAE) و PDMAEMA[2] نیز به عنوان سازنده نانوحامل‌هـای ژن یـا دارورسانی به کار می‌روند (۱۳, ۱۶). لازم به ذکر اسـت افزودن گروه‌های عاملی، طراحی کنترل شده و مهندسی برای پلیمرهای سنتزی عملیاتی‌تر است.

در ادامـه بـه معرفـی و بررسـی خـواص دو پلیمـر PEI و PAMAM به عنوان رایج‌تـرین پلیمرهـای موجـود جهـت سنتز نانوحامل‌های ژن‌رسان پرداخته می‌شود.

۱-۳-۲- پلی‌اتیلن‌ایمین (PEI)

همانطور که پیش‌تر ذکر شد PEI بیشترین پلیمر کـاتیونی مـورد مصـرف بـرای سـاخت نانوحامـل‌هـای ژن‌رسـان می‌باشد. این پلیمر به دو گرید خطی (LPEI) و شـاخه‌دار (BPEI) تقسیم می‌شود. ساختار LPEI و BPEI در شـکل ۴ دیده می‌شود.

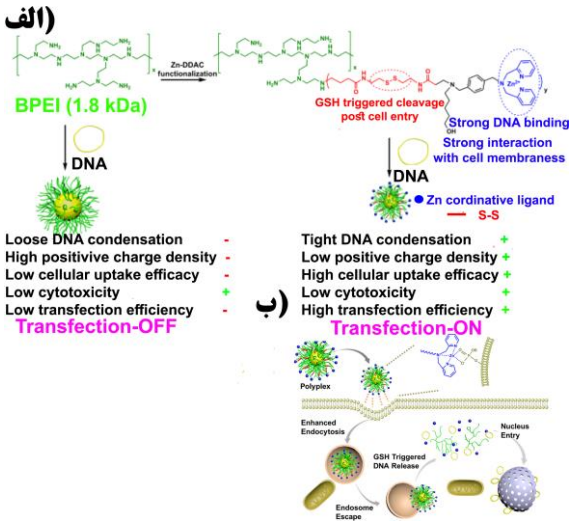


شکل ٤. ساختار LPEI و BPEI (۱۳)

با توجه به حضور گروه‌های آمین در سـاختار ایـن پلیمـر برای هر دو گرید، این گروه‌ها که قابلیت پروتونـه شـدن هم دارند، با بایومولکولی که بار منفی داشته باشـد (مثـل DNA) بـه صـورت الکترواسـتاتیک بـرهم کـنش انجـام مـی‌دهنـد و بـه اصـطلاح بـایومولکول را در خودشـان بارگـذاری مـی‌کننـد و پلـی‌پلـیکس[3] تشـکیل مـی‌دهنـد. تعریف پلی‌پلیکس بـه معنـی پلیمـر حـاوی DNA اسـت. همچنین گروه‌های آمینی قابلیت عامل‌دار کـردن PEI را افزایش می‌دهند. در دمای اتاق، LPEI به صورت جامد و BPEI به صورت مـایع بـا ویسـکوزیته بسـیار زیـاد اسـت. جرم مولکولی LPEI کمتر از BPEI است. معمولاً LPEI با جرم مولکـولی ۱/۸ kDa و BPEI بـا جـرم مولکـولی kDa ۲۵ در سامانه‌های ژن‌رسان به کار می‌رود. با افزایش جرم مولکولی، شاخه‌ها و گروه‌های آمینی افزایش و علاوه بر پایداری پلی‌پلیکس، توانایی PEI در بارگیری و بیـان ژن افزایش می‌یابد. پس از این دیدگاه BPEI نسبت بـه LPEI برتری دارد. اما نقطه ضعف قابل‌توجه BPEI کـه کـاربرد آن را چـالش‌برانگیـز مـی‌کنـد، زیسـت‌سـازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری پایین و سمیت آن است. اما توانایی BPEI در بیان ژن آنقدر اغواکننده است که پژوهشـگران را بر آن داشته است که علیرغم این معایب، با اصلاحاتی بتوانند از توانایی بالای آن در بیان ژن بهـره ببرنـد (۸, ۹, ۱۳). پس به منظور بهینـه کـردن خـواص PEI از اصـلاح سـطحی PEI بـا سـایر مـواد اسـتفاده مـی‌کننـد. یکـی از رایج‌ترین این اصلاحات ، استفاده از زنجیره‌هـای PEG و بـه اصـطلاح پگیلـه‌کـردن[4] PEI اسـت. از آنجاییکـه پلی‌پلیکس حاصل از PEI بار سـطحی مثبـت دارد و ایـن امر منجر به هدف‌گیری سلول‌های غیر هـدف مـی‌شـود، ژان و همکـاران (۱۷) از PEG کـه آبدوسـت اسـت بـه عنوان اصلاح‌کننده در ساختار PEI استفاده کردند، تـا بـا این امر علاوه بـر افـزایش هـدف‌گیـری، توزیـع مناسـب نانوحامل پلی‌پلیکس، زیست‌سازگاری، پایـداری آن در

[1] Poly(Amino-Co-Ester)
[2] Poly(2-N,N-dimethylaminoethylmethacrylate)
[3] Polyplex
[4] Pegylation

چرخه خون را افزایش و سمیت را کاهش دهند. آن‌ها همچنین از پپتیدهای RGD که پروتئین‌هایی روی سطح سلول هستند به عنوان گیرنده‌هایی استفاده کردند که با چسبیدن به PEG دقت هدف‌گیری و جذب سلولی را افزایش می‌داد. یکی دیگر از راهکارها به منظور افزایش زیست‌تخریب‌پذیری BPEI، گنجاندن لینکرهای اسیدی، کتالی، استری یا دی‌سولفیدی در ساختار BPEI است. این لینکرها با توجه به سایت مورد نظر، شکسته شده و زیست‌تخریب‌پذیری BPEI را به ارمغان می‌آورند. به نظر می‌رسد با توجه به غلظت بالای گلوتاتیون (GSH) در داخل سلول، لینکرهای دی‌سولفیدی که در اثر GSH شکسته می‌شوند، بهترین لینکرها هستند. اصلاح PEI با جفت‌های آبگریز همچون کلسترول، اسید استئاریک و اسید لیپوئیک یکی دیگر از راهکارها به منظور افزایش جذب سلولی PEI می‌باشد (۱۸). همانطور که ذکر شد LPEI به دلیل وزن مولکولی کمتر نسبت به BPEI، دارای بیان ژن و توانایی کمتر در بارگیری DNA نسبت به BPEI است. اما در پژوهشی جالب، لیو و همکاران (۱۹) به منظور ارتقاء خواص BPEI با وزن مولکولی کم (kDa ۱/۸) از لینکر دی‌پیکول‌آمین[1] استفاده کردند (شکل ۵). دی‌پیکول‌آمین از یک طرف با فلز روی دو ظرفیتی (Zinc (II)) کیلیت شده است که Zinc (II) با توجه به تمایلش به برهم‌کنش با فسفات‌های DNA توانایی بارگیری نانوحامل را بالا می‌برد. همچنین حضور گروه‌های فسفات روی سطح خارجی سلول، چسبندگی و جذب سلولی نانوحامل مسلح شده به Zinc (II) را ارتقاء می‌داد. دی‌پیکول‌آمین از طرف دیگر با یک پیوند دی‌سولفیدی قابل شکست در سیتوپلاسم، به BPEI با وزن مولکولی پایین متصل می‌شد. یعنی طبق طراحی هوشمندانه این نانوحامل، DNA تا رسیدن به سلول به خوبی حفظ می‌شد. پس از نفوذ پلی‌پلیکس به داخل سلول، پیوند دی‌سولفیدی توسط GSH شکسته می‌شد و در این مرحله LPEI که توانایی کمی از محافظت DNA را داشت، به راحتی DNA را داخل سلول آزاد می‌کرد. یعنی در این حالت از ضعف LPEI به طور جالبی برای آزادسازی ژن در داخل سلول استفاده گردید.



شکل ۵. الف) طراحی نانوحامل بر پایه BPEI با وزن مولکولی کم، اصلاح شده با Zinc (II) و ب) چسبندگی به غشای سلولی از سر Zinc (II) (۱۹)

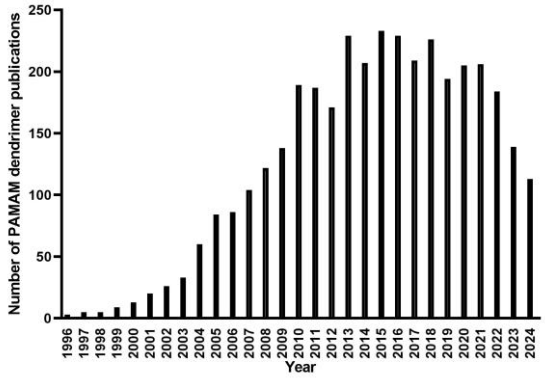
۲-۳-۲- پلی آمیدو آمین (PAMAM)

دندریمرها از جمله پلیمرهای سه بعدی با ابعاد نانومتر هستند که با ساختار فشرده در محلول شناخته می‌شوند. وجود شاخه‌ها با انشعابات زیاد وابسته به یک هسته در این نانوساختار ویژگی‌های متفاوتی را نسبت به پلیمرهای سنتی ایجاد کرده و همین امر موجب می‌شود که بتوان انواع لیگاندها یا گروه‌های عاملی را بر این نانوساختار سوار کرد و به اصطلاح خواص آن را مهندسی کرد. همچنین می‌توان از این شاخه‌ها به عنوان هدف‌گیری‌های چندگانه بهره برد. ابعاد در حد نانومتر

[1] Dipicolylamine

در این نانوحامل موجب عبور آسانتر آن از سدهای بیولوژیک، افزایش انحلال واختلاط دارو و واکنش پذیری می‌شود. فضاهای بین دندریمرها یا سر شاخک‌ها می‌توانند فضای مناسبی برای بارگیری محموله‌های ژنتیکی یا محلهایی برای عامل‌دار شدن با ترکیبات مختلف مانند آمینو اسیدها باشند (۲۰).

اولین بار در سال ۱۹۹۳، دندریمرهای PAMAM به عنوان یک پلیمر کاتیونی حامل ژن توسط هانسلر و همکاران (۲۱) معرفی شد. پروتونه شدن آمین‌های نوع یک در PAMAM به بارگیری DNA کمک می‌کند. این در حالیست که آمین‌های نوع دو در PAMAM، جذب سلولی را افزایش می‌دهند. اگرچه بیان ژن، PAMAM در حد PEI نیست، اما زیست‌سازگاری، زیست‌تخریب‌پذیری و سمیت پایین، این پلیمر کاتیونی را به عنوان یک پلیمر محبوب در خانواده پلیمرهای کاتیونی قرار داده است. ساختار دندریمری PAMAM پیوندهایی قوی با DNA برقرار می‌کند و قابلیت حمل و بیان ژن را دارد و به طور کلی نسبت به PEI سیمتش کمتر است. اگرچه وجود دندریمرها در PAMAM امکان عامل‌دار کردن آن را راحت‌تر می‌کند. حضور گروه‌های کتال و استال[1] در زنجیره اصلی PAMAM به هیدرولیز شدن آن در محیط مورد هدف و تبدیل آن به ترکیبات سبک‌تر و رهایش ژن کمک می‌کند. با توجه به مطالب ذکر شده، استفاده از PAMAM در دهه اخیر به عنوان یک نانوحامل برای دارورسانی، ژن‌درمانی، تصویربرداری پزشکی و شناسایی بیماری‌ها به طور کلی روند افزایشی داشته است (شکل ۶) (۵).



شکل ٦. تعداد نشریات چاپ شده مرتبط با PAMAM از سال ۱۹۹٦ (۵, ۲۲)

در پژوهشی از گروه ۲-آمینوایمیدازول[2] (AM) به منظور ارتقاء خواص ژن‌رسانی PAMAM استفاده گردید. مشخص گردید که استفاده از گروه AM، توزیع پلی‌پلکس PAMAM-DNA را یکنواخت می‌کند. نانوذرات ۸۰ نانومتری PAMAM اصلاح شده با AM، توانستند بیان ژن در رده سلولی HEK-293 تا ۲۰۰ برابر و جذب سلولی را تا ۱۰ برابر افزایش دهند. علت این امر به ظرفیت بافری بیشتر در حضور AM نسبت داده شد. یعنی نانوحامل PAMAM-AM در اطراف سلول ملتهب که pH کم می‌شود، نسبت به محیط اسیدی مقاومت می‌کند و ساختار خود را باز نمی‌کند. ولی پس از ورود به غشای سلولی در محیط اسیدی زیاد دچار تغییر در ساختار شده و این بار کل محموله ژن خود را آزاد می‌سازد. در حالت بدون استفاده از AM می‌توان ادعا کرد که مقدار قابل توجهی از ژن قبل از ورود به درون سلول، از بین رفته است (۲۳).

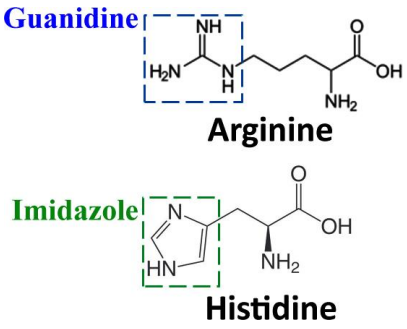
۳- اصلاح سطحی

همانطور که در قسمت‌های پیشین اشاره گردید، اصلاحات مختلفی روی PAMAM، PEI و سایر پلیمرها یا ترکیبات آنها به منظور اهداف مختلف جهت ارتقای کارایی ژن‌رسانی توسط محققان انجام شده است. به

[1] Acetal

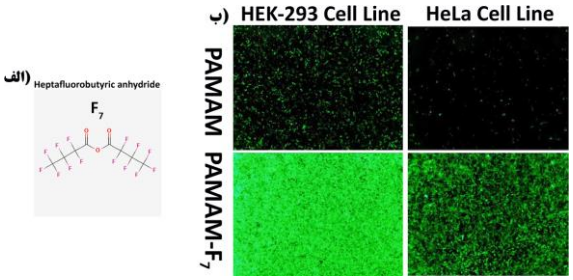
[2] 2- Aminoimidazole

عنوان مثال از پپتید RGD (۲۴) و اسید فولیک (۲۵) با هدف افزایش تارگتینگ در PAMAM نسل ۵ استفاده شده است. آمینو اسید[1]هایی مانند آرژنین[2] (۲۶) به دلیل دارا بودن جفت گوانیدین[3] با بار مثبت در ساختار، منجر به ناپایداری غشای سلولی شده و ورود پلی‌پلکس به سلول را تسهیل می‌کند؛ یا هیستیدین[4] (۲۷) که به سبب حلقه ایمیدازول[5] و گروه‌های آمین در ساختار، فرار اندوزمی[6] را افزایش داده و باعث افزایش جذب و ورود سلولی و نهایتاً افزایش راندمان ژن‌رسانی می‌گردد. مکانیزم‌های افزایش ترنسفکت در پژوهش‌های مختلف توسط محققان بررسی گردیده است (۲۸-۳۰). آمینو اسیدهای فوق‌الذکر معروفترین عامل‌ها در اصلاح‌سطحی پلیمرهای کاتیونی می‌باشند (شکل ۷).



شکل ۷. ساختار شیمیایی آرژنین و هیستیدین (۳۱)

ترکیبات فلوئور یکی دیگر از عامل‌هایی است که برای اصلاح ساختار پلیمر جهت سنتز نانوحامل‌های ژن رسان استفاده شده است. در شکل ۸الف ساختار شیمیایی انیدرید هپتافلئوربوتیریک[7] به عنوان یک ترکیب فلوئوردار (F_7) دیده می‌شود. گروه وانگ و همکاران (۳۲-۳۷) تحقیقات گسترده ای بر پایه اصلاح (مدیفیکیشن)، به خصوص ترکیبات فلوئوردار روی انواع پلیمرهای کاتیونی انجام دادند. در یکی از معروفترین پژوهشها در حوزه نانوحامل‌های ژن‌رسان، آنها نشان دادند که با فلوئوردار کردن PAMAM و رسانش ژن روی رده سلولی HEK-293، بیان ژن ۹۰٪ در نسبت n/p=۱/۵ را به نمایش گذاشت که این مقدار ۵ برابر ذره پایه (یعنی PAMAM) و ۳۰٪ بیشتر از لیپوفکتامین به عنوان نانوحامل تجاری معروف، بود. همچنین برای رده سلولی HeLa، ترکیب عاملدار شده با ۸۰٪ بیان ژن در نسبت n/p=۳، علاوه بر اینکه از ذره پایه، لیپوفکتامین و سوپرفکت بیشتر بود؛ حدود ۱۰ برابر بیان ژن بیشتری نسبت به PEI ۲۵ kDa به عنوان کنترل مثبت از خود نشان داد (شکل ۸ب).



شکل ۸. الف) ساختار ترکیب فلوئوردار (F_7) و ب) اثر اصلاح PAMAM با F_7 در رده سلولی HEK-293 و HeLa (۳۳)

٤- سیستم ویرایش ژن CRISPR/Cas9

٤-١- ساختار ونحوه عملکرد

CRISPR (تناوب‌هایِ کوتاهِ پالیندرومِ فاصله‌دارِ منظمِ خوشه‌ای) نام یک منطقه ژنی است. این منطقه ژنی در شناسایی ویروسهای مهاجم و فعال کردن آنزیم‌های نوکلئازی[8] برای نابود کردن ژنوم آن‌ها، فعالیت می‌کند. سیستم CRISPR/Cas9 در حقیقت یک ابزار است.

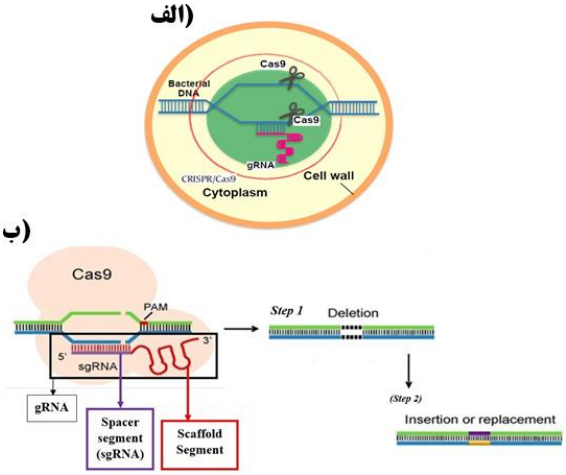
[1] Amino Acid
[2] Arginine
[3] Guanidine
[4] Histidine
[5] Imidazole
[6] Endosomal Escape
[7] Heptafluorobutyric anhydride
[8] Nuclease

CRISPR سابقاً به عنوان سیستم ایمنی باکتریایی علیه ویروس‌های مهاجم شناخته می‌شد. امروزه ظرفیت قابلیت برنامه‌ریزی آنزیم نوکلئازی Cas9، انقلابی در زمینه‌های مختلف پزشکی، بیوتکنولوژی و کشاورزی به وجود آورده است. به طور مشخص سال‌ها قبل CRISPR در ابتدا به عنوان یک توالی تکراری DNA پروکاریوتی[1] خاص معرفی شد. سپس چندین دهه پس از آن به عنوان سیستم ایمنی باکتری شناخته شد، و در نهایت پس از گذراندن این دو مرحله در حال حاضر به عنوان یک ابزار قدرتمند قابل برنامه‌ریزی و ویرایش ژن به کار گرفته می‌شود. پژوهشگران با به‌کارگیری ابزارهای مولکولی این سیستم دفاعی میکروبی، روش‌هایی را ابداع کرده‌اند که توسط آن می‌توان با کارایی بسیار بالایی، مناطق ژنی مختلفی را نشانه‌گیری کرد. از این روش می‌توان جهت دستکاری ژن، روشن یا خاموش کردن ژن‌ها، نشانه‌گذاری و رهگیری منطقه خاصی از ژنوم و بسیاری موارد دیگر، در سطح DNA موجودات زنده استفاده نمود. این شیوه سریعتر، ارزانتر و دقیق‌تر از شیوه‌های رایج ویرایش ژن (TALEN[2] و ZNFs[3]) است. فن‌آوری ویرایش ژن CRISPR/Cas9، از یک پروتئین تشکیل شده است به نام Cas9. Cas9 دو نقش اساسی دارد: ۱) هدف قرار دادن DNA به وسیله کوپل کردن Cas9 با RNA هدایتگر[4] (gRNA). ۲) ویرایش DNA. منظور از ویرایش DNA توسط Cas9 این است که این آنزیم پروتئینی بخش هدف قرار گرفته از ژنوم DNA را حذف می‌کند. این بخشی که می‌بایست حذف شود، همان توالی بیماری مورد نظر در DNA است. پس از مرحله حذف، این بار نوبت به انتقال و بیان ژن سالم در توالی مورد نظر می‌رسد. به طور خلاصه با استفاده از این ابزار قابلیت برنامه‌ریزی و هوشمند سازی در درون زنجیره DNA به دست می‌آید. پس می‌توان CRISPR/Cas9 را به عنوان یک چاقو یا قیچی به عنوان برش یا جراحی در محدوده مولکولی در نظر گرفت. این یک راه برای ایجاد تغییری دقیق در یک موجود زنده، مانند تغییر یک ژن جهش یافته بیماری‌زا به یک توالی بی‌ضرر است. سهولت استفاده از روش CRISPR/Cas9 همچنین می‌تواند به یک پردازنده کلمات تشبیه شود که کلمه را در متن ویرایش و جایگزین می‌کند یا به تعمیرکاری که قطعه معیوب را در محل تعمیر می‌کند. آنزیم Cas9 به همراه gRNA در کنار هم قرار می‌گیرند و با تشکیل اتصالات غیرکوالان، یک کمپلکس عملکردی را ایجاد می‌کنند. gRNA دارای دو بخش داربستی[5] و حد فاصل[6] است. با ورود pDNA مورد نظر به سیتوپلاسم و بیان پروتئین Cas9 توسط pDNA، بخش داربستی gRNA به بخشی از سطح قابل دسترس و دارای بار مثبت از Cas9 متصل می‌شود. وظیفه بخش حد فاصل هم هدف‌گیری قسمت DNA مورد نظر توسط sgRNA[7] است. چراکه توالی‌های معیوب در این بخش با توالی‌های سالم متفاوت هستند. در اثر این کوپل شدن و تشکیل کمپلکس، ساختار فضایی Cas9 و بالتبع خواص آن تغییر می‌یابد. در این حالت Cas9 از حالت غیرفعال (حالت متصل نشده به DNA) به حالت فعال (متصل شده به DNA) تبدیل می‌شود. فلذا CRISPR/Cas9 می‌تواند با همراهی یک gRNA، توالی ژنی مکمل آن را در DNA میزبان شناسایی نماید و توسط فعالیت نوکلئازی کمپلکس

[1] Prokaryote
[2] Transcription Activator-like Effector Nuclease
[3] Zinc Finger Nuclease
[4] Guide RNA
[5] Scaffold
[6] Spacer
[7] Single Guide RNA

Cas9 ژن از پیش تعیین شده را هدف قرار دهد و منهدم[1] نماید. شکل ۹ به صورت شماتیک سیستم CRISPR/Cas9 را نشان می‌دهد (۲, ۳, ۳۸, ۳۹).

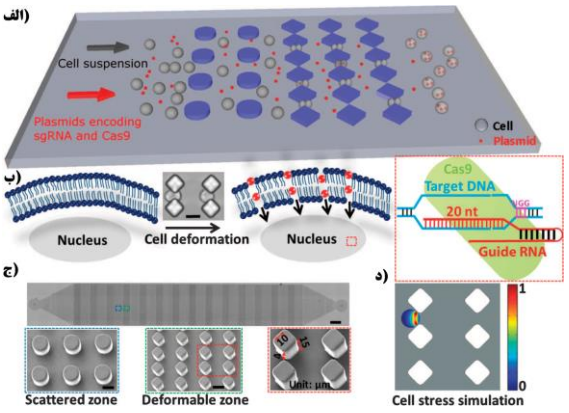
مهمترین مزیت ویرایش ژن با سیستم CRISPR/Cas9 این است که توالی معیوب در هسته سلول حذف می‌شود. این مرحله گام اول و کلیدی‌ترین مرحله سیستم CRISPR/Cas9 است. این یک مزیت بسیار منحصر بفرد برای این سیستم نسبت به ژن‌رسانی‌های معمولی است، که فقط ژن سالم برای بیان شدن به DNA وارد می‌شود. در گام بعدی می‌توان توالی سالم را به منظور بیان شدن و رونویسی به جای توالی معیوب حذف شده، جایگزین کرد. نظر به اینکه پلی‌پلکس‌های ساخته شده از CRISPR/cas9، به عنوان بایومولکول‌هایی با ظرفیت و وزن مولکولی زیاد محسوب می‌شوند، عموماً وکتورهای ویروسی در بارگیری این بایومولکول‌ها از خود ضعف نشان داده و نانوحامل‌های غیر ویرسی بر پایه پلیمرها توانایی بارگیری، حفاظت، هدف‌گیری و رسانش این بایومولکول‌ها را دارند. در پژوهش‌های بسیاری از پلیمرهایی همچون PEI، PAMAM، PLL، PEG و غیره بهره برده اند (۴۰, ۴۱).



شکل ۹. الف) اصول اولیه سیستم CRISPR/Cas9 به صورت شماتیک. ب) قیچی آنزیمی Cas9 و برش توالی نامطلوب، پاکسازی و جایگذاری یا رونویسی ژن مطلوب (۲, ۳۸)

۲-٤- رسانش CRISPR/Cas9

همانگونه که ذکر گردید ویرایش ژن یکی از راهبردهای امیدوارکننده برای درمان بیماری‌ها است که تحقیقات توسط پژوهشگران روی آن انجام می‌شود، تا جایی که سیستم CRISPR/Cas9 در سال ۲۰۲۰ میلادی جایزه نوبل شیمی را به خود اختصاص داد (۴۲). در اینجا هم از انواع نانوحامل‌ها یا سامانه‌های آزمایشگاهی جهت رسانش CRISPR/Cas استفاده شده است که بیان و ناک‌اوت (خاموشی) ژن بین ۲ تا ۹۰٪ گزارش شده است. به عنوان مثال هان و همکاران (۴۳) که سامانه خود را به صورت پتنت (۴۴) هم ثبت کردند، با طراحی یک چیپ بر پایه اصول تغییر شکل‌پذیری مکانیکی (شکل ۱۰)، ۷۰ و ۹۰٪ خاموشی ژن به ترتیب در رده سلولی لنفوم SU-DHL-1 و سلول‌های سرطانی سینه گزارش کردند.



شکل ۱۰. الف) فرآیند رسانش داخل CRISPR از طریق فلو جریان سلول‌ها داخل چیپ. ب) رهایش طبق تغییر شکل‌پذیری مکانیکی چیپ. ج) تصویر میکروسکوپی داخل چیپ و متعلقات. د) شبیه‌سازی تنش سلولی (۴۳)

[1] Knock-down

در پژوهشی دیگر به وسیله ذرات لنتی‌فلش[1]، به عنوان یک وکتور ویروسی تجاری، ۹۰٪ خاموشی ژن برای رده سلولی hiPSC[2] اعلام گردید (۴۵).

علاوه بر موارد فوق که به عنوان مثال‌هایی از حامل‌های فیزیکی و وکتورهای ویروسی بیان گردید، می‌توان گفت برای رسانش CRISPR/Cas هم غالباً از وکتورهای غیر ویروسی بر پایه انواع PEI با وزن مولکولی مختلف استفاده می‌گردد. به عنوان مثال چنگ و همکاران (۴۶) ۲٪ ناک‌اوت ژن را در رده سلولی CT26 با استفاده از PEI ۶۰۰ دالتون گزارش کردند. در پژوهشی دیگر که منحصراً از PEI ۲۵ kDa برای بیان CRISPR/Cas9 در رده سلولی Neuro2a استفاده گردید، ریو و همکاران (۴۷) گزارش کردند که CRISPR/Cas9 در نسبت n/p=۱۲ حدود ۷۰٪ بیان داشته است و این مقدار تقریباً برابر مقادیر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ بوده است. این پژوهشگران مدعی شدند که در نسبت مذکور زنده‌مانی سلولی ۹۵٪ بوده است. نانوحامل PEI ۱/۸ kDa پوشش‌داده شده با BSA[3] در نسبت وزنی ۸۰x، ۸۴٪ پلاسمید px458 و ۹۲٪ ریبونوکلئوپروتئین[4] (RNP)، به عنوان سیستم CRISPR/Ca9 در رده سلولی MDA-MB-231 بیان کرد که این راندمان از نانوحامل تجاری DNAفکتامین[5] هم بالاتر بود. این راندمان به خاصیت پروتون اسفنج PEI و جذب سلولی آلبومین توسط سلول‌های سرطانی نسبت داده شد (۴۸). گروه تحقیقاتی نانوفناوری پزشکی (۴۹, ۵۰). راندمان ۲۲ و ۳۲٪ ناک‌اوت ژن در رده سلولی HEK-293، با استفاده از نانوحامل‌های کربن‌دات ۲۵ kDa PEI و کربن‌دات ۱/۸ kDa PEI اصلاح شده با آرژنین را گزارش کرده است. لازم به اشاره است که جهت رسانش و بیان CRISPR/Cas9، ترکیب ۲۵ kDa PEI با سایر مواد مانند CNT[6] (۵۱)، پلی‌دوپامین[7] و هیالورونیک اسید[8] (۵۲) نیز به عنوان نانوحامل توسط پژوهشگران مورد استفاده قرار گرفته است. همچنین نانوحامل‌های غیر ویروسی مستقل از PEI برای ناک‌اوت ژن سنتز شده است، که می‌توان از نانوحامل بر پایه پلی(بتا آمینو استر)[9] نام برد، که موجب ۷۰٪ خاموشی ژن روی رده سلولی HEK-293 گردید (۵۳).

٤. نتیجه گیری

در این پژوهش، نانوحامل‌های مورد استفاده در ژن‌رسانی معرفی گردید. همچنین تقسیم‌بندی آنها بر اساس وکتورهای ویروسی و غیر ویروسی، مزایا ومعایب هر کدام توضیح داده شد و چنین جمع‌بندی گردید که نانوحامل‌های پلیمری کاتیونی به دلیل قابلیت طراحی و مهندسی در ساخت، پتانسیل ذاتی برای بارگیری مواد ژنتیکی با بار منفی، و عوارض جانبی کم، پر کاربردترین نانوحامل‌های ژن‌رسان محسوب می‌شوند. اگرچه پلی‌اتیلن‌ایمین ۲۵ کیلودالتون با بیان ژن بالا در رده‌های سلولی مختلف به عنوان پیشاهنگ این گروه محسوب می‌گردد، اما نگرانی‌های ناشی از سمیت می‌تواند تا حدودی کاربرد آن را با مشکل مواجه کند. سنتز ساختارهای ترکیبی پلی‌اتیلن‌ایمین ۲۵ کیلودالتون با سایر پلیمرها مانند PAMAM، یا ایجاد لایه محافظ مانند پلی‌اتیلن گلیکول از جمله روش‌هایی بودند که در این مقاله به آن اشاره گردید که در عین حفظ کارایی بیان ژن، نگرانی‌های ناشی از سمیت و عوارض جانبی

[1] LentiFlash
[2] Human induced pluripotent stem cells
[3] Bovine Serum Albumin
[4] Ribonucleoprotein
[5] DNAfectamin
[6] Carbon nanotube
[7] polydopamine
[8] Hyaluronic acid
[9] poly(beta-amino ester)

به حداقل رسانده شود. همچنین نقش بعضی از گروه‌ها مثل آرژنین، هیستیدین و ترکیبات فلوئوری در افزایش راندمان ژن‌رسانی اشاره گردید.

ژن‌رسانی به عنوان گامی جلوتر نسبت به دارورسانی معرفی گردید. همچنین سیستم CRISPR/Cas9 به عنوان یک ابزار قدرتمند در ویرایش ژن با قابلیت برنامه‌ریزی دقیق برای شناسایی و حذف توالی‌های معیوب ژنوم از طریق gRNA و جایگزینی آن‌ها با ژن‌های سالم معرفی گردید. پژوهش‌های انجام شده نشان داده‌اند که استفاده از نانوحامل‌های غیر ویروسی، به ویژه نانوحامل‌های پلیمری، در انتقال سیستم CRISPR/Cas9 که ماده ژنتیکی سنگینی نیز محسوب می‌شود، نتایج موفقیت‌آمیزی را به همراه داشته است.

تلاش‌های مستمر پژوهشگران برای بهبود ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانوحامل‌های کاتیونی و بهینه‌سازی سیستم CRISPR/Cas9، منجر به افزایش راندمان و ایمنی ژن‌درمانی شده است. با توجه به نتایج به دست آمده، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که آینده ژن‌درمانی با استفاده از نانوحامل‌های کاتیونی و سیستم CRISPR/Cas9 بسیار روشن و امیدوارکننده است و پژوهش‌های بیشتر در این زمینه می‌تواند به بهبود بیشتری در درمان بیماری‌های ژنتیکی و سرطان‌ها منجر شود.

۵. منابع

1. Pillai G. Nanotechnology toward treating cancer: A comprehensive review. Applications of targeted nano drugs and delivery systems. 2019:221-56.
2. Kang YK, Kwon K, Ryu JS, Lee HN, Park C, Chung HJ. Nonviral genome editing based on a polymer-derivatized CRISPR nanocomplex for targeting bacterial pathogens and antibiotic resistance. Bioconjugate chemistry. 2017;28(4):957-67.
3. Li L, Hu S, Chen X. Non-viral delivery systems for CRISPR/Cas9-based genome editing: Challenges and opportunities. Biomaterials. 2018;171:207-18.
4. Li T, Yang Y, Qi H, Cui W, Zhang L, Fu X, et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. Signal Transduction and Targeted Therapy. 2023;8(1):36.
5. https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/. 2024.
6. Company TBR. CRISPR And Cas Gene Market Definition. wwwthebusinessresearchcompanycom. 2024.
7. سرکندی مک. مقدمه ای بر رسانش هدفمند دارو، ژن و سلول. ماهنامه مهندسی پزشکی و تجهیزات آزمایشگاهی. ۱۳۹۶;۲۰۲.
8. Li L, He Z-Y, Wei X-W, Gao G-P, Wei Y-Q. Challenges in CRISPR/CAS9 delivery: potential roles of nonviral vectors. Human gene therapy. 2015;26(7):452-62.
9. Li L, Song L, Liu X, Yang X, Li X, He T, et al. Artificial virus delivers CRISPR-Cas9 system for genome editing of cells in mice. ACS nano. 2017;11(1):95-111.
10. Behzadi S, Serpooshan V, Tao W, Hamaly MA, Alkawareek MY, Dreaden EC, et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. Chemical society reviews. 2017;46(14):4218-44.
11. Rajeev A, Siby A, Koottungal MJ, George J, John F. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. ChemistrySelect. 2021;6(46):13350-62.
12. Whitehead KA, Langer R, Anderson DG. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nature reviews Drug discovery. 2009;8(2):129-38.
13. Samal SK, Dash M, Van Vlierberghe S, Kaplan DL, Chiellini E, Van Blitterswijk C, et al. Cationic polymers and their therapeutic potential. Chemical Society Reviews. 2012;41(21):7147-94.
14. Neurath AR, Strick N, Li Y-Y. Anti-HIV-1 activity of anionic polymers: a comparative study of candidate

dendrimer. Organic & Biomolecular Chemistry. 2018;16(24):4464-70.
24. Shukla R, Thomas TP, Peters J, Kotlyar A, Myc A, Baker Jr JR. Tumor angiogenic vasculature targeting with PAMAM dendrimer–RGD conjugates. Chemical communications. 2005(46):5739-41.
25. Cui S-h, Zhi D-f, Zhao Y-n, Chen H-y, Meng Y, Zhang C-m, et al. Cationic lioposomes with folic acid as targeting ligand for gene delivery. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2016;26(16):4025-9.
26. Liu C, Liu X, Rocchi P, Qu F, Iovanna JL, Peng L. Arginine-terminated generation 4 PAMAM dendrimer as an effective nanovector for functional siRNA delivery in vitro and in vivo. Bioconjugate chemistry. 2014;25(3):521-32.
27. Wen Y, Guo Z, Du Z, Fang R, Wu H, Zeng X, et al. Serum tolerance and endosomal escape capacity of histidine-modified pDNA-loaded complexes based on polyamidoamine dendrimer derivatives. Biomaterials. 2012;33(32):8111-21.
28. Dehshahri A, Sadeghpour H. Surface decorations of poly (amidoamine) dendrimer by various pendant moieties for improved delivery of nucleic acid materials. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. 2015;132:85-102.
29. Yellepeddi VK, Kumar A, Palakurthi S. Surface modified poly (amido) amine dendrimers as diverse nanomolecules for biomedical applications. Expert opinion on drug delivery. 2009;6(8):835-50.
30. Yang J, Zhang Q, Chang H, Cheng Y. Surface-engineered dendrimers in gene delivery. Chemical reviews. 2015;115(11):5274-300.
31. Alsalhi MS, Royall PG, Chan KLA. Mechanistic study of the solubilization effect of basic amino acids on a poorly water-soluble drug. RSC advances. 2022;12(30):19040-53.
microbicides. BMC Infectious Diseases. 2002;2:1-11.
15. Putnam D. Polymers for gene delivery across length scales. Nature materials. 2006;5(6):439-51.
16. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. Advanced drug delivery reviews. 2010;62(1):83-99.
17. Zhan C, Meng Q, Li Q, Feng L, Zhu J, Lu W. Cyclic RGD–Polyethylene Glycol–Polyethylenimine for Intracranial Glioblastoma- Targeted Gene Delivery. Chemistry–An Asian Journal. 2012;7(1):91-6.
18. Sawant RR, Sriraman SK, Navarro G, Biswas S, Dalvi RA, Torchilin VP. Polyethyleneimine-lipid conjugate-based pH-sensitive micellar carrier for gene delivery. Biomaterials. 2012;33(15):3942-51.
19. Liu S, Zhou D, Yang J, Zhou H, Chen J, Guo T. Bioreducible zinc (II)-coordinative polyethylenimine with low molecular weight for robust gene delivery of primary and stem cells. Journal of the American Chemical Society. 2017;139(14):5102-9.
20. Fatemi SM, Fatemi SJ, Abbasi Z. PAMAM dendrimer-based macromolecules and their potential applications: recent advances in theoretical studies. Polymer Bulletin. 2020;77(12):6671-91.
21. Haensler J, Szoka Jr FC. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. Bioconjugate chemistry. 1993;4(5):372-9.
22. Li J, Liang H, Liu J, Wang Z. Poly (amidoamine)(PAMAM) dendrimer mediated delivery of drug and pDNA/siRNA for cancer therapy. International journal of pharmaceutics. 2018;546(1-2):215-25.
23. Wang J, Hu X, Wang D, Xie C, Lu W, Song J, et al. 2-Aminoimidazole facilitates efficient gene delivery in a low molecular weight poly (amidoamine)

42. Ledford H, Callaway E. Pioneers of CRISPR gene editing win chemistry Nobel. Nature. 2020;586(7829):346-7.
43. Han X, Liu Z, Jo MC, Zhang K, Li Y, Zeng Z, et al. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. Science advances. 2015;1(7):e1500454.
44. Qin L, Han X, Liu Z, Ma Y, Zhang K. Crispr-cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. Google Patents; 2018.
45. Mianné J, Nasri A, Van CN, Bourguignon C, Fieldès M, Ahmed E, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene knockout and interallelic gene conversion in human induced pluripotent stem cells using non-integrative bacteriophage-chimeric retrovirus-like particles. BMC biology. 2022;20:1-15.
46. Cheng W-J, Chen L-C, Ho H-O, Lin H-L, Sheu M-T. Stearyl polyethylenimine complexed with plasmids as the core of human serum albumin nanoparticles noncovalently bound to CRISPR/Cas9 plasmids or siRNA for disrupting or silencing PD-L1 expression for immunotherapy. International Journal of Nanomedicine. 2018:7079-94.
47. Ryu N, Kim M-A, Park D, Lee B, Kim Y-R, Kim K-H, et al. Effective PEI-mediated delivery of CRISPR-Cas9 complex for targeted gene therapy. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine. 2018;14(7):2095-102.
48. Rahimi H, Zaboli KA, Thekkiniath J, Mousavi SH, Johari B, Hashemi MR, et al. BSA-PEI nanoparticle mediated efficient delivery of CRISPR/Cas9 into MDA-MB-231 Cells. Molecular Biotechnology. 2022;64(12):1376-87.
49. Hasanzadeh A, Radmanesh F, Hosseini ES, Hashemzadeh I, Kiani J, Nourizadeh H, et al. Highly photoluminescent nitrogen-and zinc-doped carbon dots for efficient delivery of CRISPR/Cas9 and mRNA. Bioconjugate Chemistry. 2021;32(8):1875-87.
32. Wang M, Cheng Y. The effect of fluorination on the transfection efficacy of surface-engineered dendrimers. Biomaterials. 2014;35(24):6603-13.
33. Wang M, Liu H, Li L, Cheng Y. A fluorinated dendrimer achieves excellent gene transfection efficacy at extremely low nitrogen to phosphorus ratios. Nature communications. 2014;5(1):3053.
34. Wang M, Cheng Y. Structure-activity relationships of fluorinated dendrimers in DNA and siRNA delivery. Acta Biomaterialia. 2016;46:204-10.
35. Wang F, Hu K, Cheng Y. Structure–activity relationship of dendrimers engineered with twenty common amino acids in gene delivery. Acta Biomaterialia. 2016;29:94-102.
36. He B, Wang Y, Shao N, Chang H, Cheng Y. Polymers modified with double-tailed fluorous compounds for efficient DNA and siRNA delivery. Acta biomaterialia. 2015;22:111-9.
37. Liu H, Wang Y, Wang M, Xiao J, Cheng Y. Fluorinated poly (propylenimine) dendrimers as gene vectors. Biomaterials. 2014;35(20):5407-13.
38. Wang H-X, Li M, Lee CM, Chakraborty S, Kim H-W, Bao G, et al. CRISPR/Cas9-based genome editing for disease modeling and therapy: challenges and opportunities for nonviral delivery. Chemical reviews. 2017;117(15):9874-906.
39. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. Nature communications. 2018;9(1):1911.
40. Peng Y-Y, Diaz-Dussan D, Kumar P, Narain R. Tumor microenvironment-regulated redox responsive cationic galactose-based hyperbranched polymers for siRNA delivery. Bioconjugate Chemistry. 2018;30(2):405-12.
41. Zhang Z, Wan T, Chen Y, Chen Y, Sun H, Cao T, et al. Cationic polymer- mediated CRISPR/Cas9 plasmid delivery for genome editing. Macromolecular rapid communications. 2019;40(5):1800068.

50. Hashemzadeh I, Hasanzadeh A, Radmanesh F, Khodadadi Chegeni B, Hosseini ES, Kiani J, et al. Polyethylenimine-functionalized carbon dots for delivery of CRISPR/Cas9 complexes. ACS Applied Bio Materials. 2021;4(11):7979-92.
51. Men JL, Zhang YT, Pei YB, Li N, Xiang JH, Zhou HL. Development of a PEI-coated SWNTs Nanocarrier for efficient delivery of CRISPR/Cas9 in early embryos of Litopenaeus vannamei. Aquaculture. 2024;581:740424.
52. Ma K, Li W, Zhu G, Sun S, Chi H, Yin Y, et al. Functionalized PDA/DEX-PEI@ HA nanoparticles combined with sleeping-beauty transposons for multistage targeted delivery of CRISPR/Cas9 gene. Biomedicine & Pharmacotherapy. 2021;142:112061.
53. Rui Y, Varanasi M, Mendes S, Yamagata HM, Wilson DR, Green JJ. Poly (beta-amino ester) nanoparticles enable nonviral delivery of CRISPR-Cas9 plasmids for gene knockout and gene deletion. Molecular Therapy-Nucleic Acids. 2020;20:661-72.

فصلنامه ISC انجمن نانو فناوری ایران

Cationic Nanocarriers for Gene Therapy Using the CRISPR/Cas9 Gene Editing Systemll

Mohammad Amiri[1], Akbar Shojaei[2,*], Mahdi Karimi[3], Shohreh Mashayekhan[4]

[1] Center for Nanoscience and Nanotechnology, Institute for Convergence Science & Technology, Sharif University of Technology, Tehran
[2] Department of Polymeric Composite, Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran

[3] Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran
[4] Department of Nanobiothechnolgy, Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran

Abstract:
Advancement and utilization of science have always been leveraged as a means to enhance quality and overcome societal challenges. In recent years, with the increasing prevalence of diseases such as cancer, researchers have focused on combating them. The advent of nanotechnology as a pervasive science has brought significant potential to various fields, including health and medicine. The use of nanocarriers for intelligent and targeted delivery of drugs or genes to specific sites has been among the extensive research efforts to combat diseases. Among these, polymer-based nanostructures have attracted researchers' attention due to their biological compatibility with the body environment, the possibility of customized synthesis and modification, and their versatility in drug/gene delivery systems. Since 2016, with the introduction of the CRISPR/Cas9 system as a gene editing tool used in the treatment of lung cancer, research focus has shifted towards gene delivery based on gene editing.

Keywords: *Gene delivery, Nanocarrier, Cationic polymer, Gene editting, CRISPR/Cas9*