

ПЕРСПЕКТИВИ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДУ CRISPR/CAS9 У ФУНДАМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕННЯХ, ДІАГНОСТИЦІ ТА ТЕРАПІЇ СОЦІАЛЬНО ЗНАЧУЩИХ ХВОРОБ У ДІТЕЙ ТА ПІДЛІТКІВ УКРАЇНИ

Боброва О. В.^{1,3}, Міхановська Н. Г.^{1,2}, Кривонос К. А.¹

1 - Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна,

2 - ДУ «Інститут охорони здоров'я дітей та підлітків НАМН України», Харків

3 - КП «Санепідсервіс» ХМР

oxana.v.bobrova@karazin.ua

Стаття присвячена застосуванню методу CRISPR/CAS9 у фундаментальних дослідженнях, діагностиці та терапії соціально значущих хвороб у дітей та підлітків України. Проведено аналітичний огляд публікацій, пов'язаний з цим методом, в електронних базах даних медичних публікацій, описані найбільш поширені соціально значущі нозологічні форми, запропоновані деякі шляхи вирішення існуючих проблем

Ключові слова: метод CRISPR/CAS9, діти, підлітки, соціально значущі хвороби

PROSPECTS OF THE APPLICATION OF THE CRISPR/CAS9 METHOD IN FUNDAMENTAL ADVANCED RESEARCH, DIAGNOSTICS AND THERAPIES OF SOCIALLY SIGNIFICANT ILLNESS IN CHILDREN AND ADOLESCENTS IN UKRAINE

Bobrova O. V.^{1,3}, Mikhanovska N. H.^{1,2}, Kryvonos K. A.¹

1 – V. N. Karazin Kharkiv National University,

2 – SI "Institute of Children and Adolescents Health Care of the NAMS of Ukraine", Kharkiv

3 – KP "Sanepodservice" KhMR

The article is devoted to the application of the CRISPR/CAS9 method in fundamental research, diagnosis and therapy of socially significant diseases in children and adolescents of Ukraine. An analytical review of publications related to this method was conducted in electronic databases of medical publications, the most common socially significant nosological forms were described, and some ways of solving existing problems were proposed.

Keywords: CRISPR/CAS9 method, children, adolescents, socially significant diseases

ВСТУП

Медицина більшості країн світу базується на 4-х основних принципах (4 П): передбачуваності, профілактичності спрямованості, персоналізованості, з доученням пацієнтів, які отримали право брати участь у процесі діагностики та лікування (Strasbourg, 28 June 2000, Конвенція прав людини) [1]. Новим методом ефективного сприяння прогресу медицини від вченого до клініциста є трансляційна медицина (ТМ). В Україні на даний час, щодо ситуації розвитку трансляційних технологій існує багато проблем, які посилюються з початком повномасштабного вторгнення росії. Термін «трансляційна медицина» використовується в назвах наукових медичних та біологічних статей з 1996 року [2]. Принципи ТМ актуальні й для вирішення проблеми соціально значущих хвороб (СЗХ).

Нові перспективні напрями відкриває редагування геному як вид генної інженерії, при якому може бути проведена спрямована зміна (включення, видалення або заміна) цільових фрагментів послідовності ДНК у геномі організму з використанням специфічних генетичних конструкцій та білків-ендонуклеаз, або «молекулярних ножиць», зокрема, на основі системи CRISPR/Cas9. Це є надзвичайно перспективним методом для розробки терапії низки моногенних важких ендокринних захворювань, насамперед, вроджена дисфункція кори надниркових залоз (ВДКНЗ) та адренолейкодистрофії (з варіантом надниркової недостатності). CRISPR/Cas9 має значний вплив на багато галузей медицини зокрема, генетику, онкологію та інфекційні захворювання. На теперішній час СЗХ є однією з основних загроз для здоров'я населення

більшості країн світу, являючись суттєвим тягарем для органів охорони здоров'я та суспільства в цілому. Більшість цих хвороб спричиняють тимчасову або стійку втрату працездатності, потребують значних фінансових витрат на профілактику, лікування, реабілітацію (а деякі з них і пожиттєвої терапії), впливаючи на якість і тривалість життя, спричиняючи передчасну смерть. СЗХ доволі часто пов'язані зі злочинністю та правопорушеннями. Поняття «соціально значущі хвороби» існує ще з XIX сторіччя, періоду активного економічного розвитку. Уперше термін СЗХ був застосований щодо захворювання на туберкульоз (ТБ). Соціально значущі хвороби (інфекційні та неінфекційні) — це хвороби, що мають медичне та соціальне значення, є загрозою для значної кількості людей, в тому числі, представляють загрозу для здоров'я та життя дітей та підлітків. Такі пацієнти часто потребують соціального захисту.

Основні ознаки СЗХ:

- значний рівень поширеності (в тому числі, значна кількість носіїв хвороби, що приховує компоненти епідемічного процесу);
- високі темпи щорічного приросту кількості хворих (відповідно, ризики швидкого поширення серед населення);
- обмеження прав і випадки дискримінації хворих в суспільстві;
- небезпека розповсюдження хвороб серед оточуючих;
- переважна поширеність захворювань серед дітей, підлітків і молоді;
- можливість профілактики і призупинення розвитку хвороб на їх початкових стадіях.

Таким чином, удосконалення сучасних методів діагностики та терапії соціально значущих хвороб у дітей та підлітків України, застосування передових медичних технологій є надзвичайно актуальним, передусім, для успішного майбутнього нашої країни.

Мета дослідження — охарактеризувати питання застосування методу редагування генів на основі CRISPR/Cas9 у діагностиці та терапії соціально значущих хвороб дітей та підлітків України.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Для виконання завдання було проведено аналітичний огляд публікацій за темою методу редагування генів на основі CRISPR/CAS 9 у діагностиці та терапії соціально значущих хвороб дітей та підлітків України, в електронних базах даних медичних і біологічних публікацій PubMed Medline Національної медичної бібліотеки США (NLM), Cochrane Database of Systematic Reviews, Google Scholar.

РЕЗУЛЬТАТИ

Довоєнні складнощі медичних послуг в Україні, пов'язані в першу чергу, з нестачею медикаментів, дефіцитом кадрів, недостатнім фінансуванням, пан-

демією коронавірусної хвороби, посилюлися з початком активних воєнних дій в 2022 році. Особливо складною є ситуація в прифронтових регіонах, де існують труднощі з допомогою хворим на онкопатологію, з постачанням препаратів інсуліну хворим на цукровий діабет, а також з високоспеціалізованою медичною допомогою. Постійно зазнають обстрілів з боку російської федерації установи медичної інфраструктури, внаслідок чого пошкоджено понад півтори тисячі медичних закладів, з них більше двох сотень не підлягають відновленню. Останнім часом пацієнти з серйозною медичною патологією долають великі відстані до престижних університетських медичних центрів та клінік у пошуках ефективних стратегій та рішень, в деяких випадках лише для уточнення діагностики свого стану. Часто за плановими операціями люди змушені їхати в центральні та західні області нашої країни. Слід зазначити, що нищівна ситуація в Україні в лютому 2022 року не була новим явищем, оскільки військовий конфлікт з росією розпочався ще у 2014 році, до того ж, українці століттями боролися за свою незалежність, знаходячись під гнобленням та зазнаючи втрат [3, 4]. Посилились складнощі з: 1) тестуванням на рідкісні захворювання, для діагностики та лікування яких серійний випуск та реєстрація медичних виробів є економічно недоцільним; 2) інноваційними технологіями в перші роки їх практичного застосування, коли їх ефективність, безпека та клінічна значимість вже доведені. Проте, серійний випуск та реєстрацію багатьох медичних виробів не завершено (зазвичай цей період становить близько 5 років). Вихід новітніх розробок на ринок стримується і відсутністю комерційної зацікавленості фірм-виробників реєструвати в даній юрисдикції виріб як медичний [5, 6]. В умовах інноваційної трансформації охорони здоров'я та переходу до персоналізованої та трансляційної медицини важлива роль належить фармацевтичній галузі, яка покликана забезпечити прискорене впровадження повного циклу обігу лікарського засобу від пошуку та розробки до застосування й просування, та генетичним дослідженням [7, 8]. На шляху впровадження інновацій у медицину певні перешкоди є природними, перш за все, не дозволяючи пройти в практику небезпечним і неефективним розробкам [7, 8]. Закон України «Про інноваційну діяльність» (Відомості Верховної Ради України (ВВР), 2002, № 36, ст. 266) із змінами, внесеними згідно з Законом № 1714-IX від 07.09.2021; ВВР, 2021, № 49, ст. 391, визначає правові, економічні та організаційні засади державного регулювання інноваційної діяльності в Україні, встановлює форми стимулювання державою інноваційних процесів, і спрямований на підтримку розвитку економіки України інноваційним шляхом. Згідно із цим Законом, державну підтримку одержують суб'єкти господарювання всіх форм власності, що реалізують в Україні інноваційні проекти, і

підприємства всіх форм власності, які мають статус інноваційних [9]. За складністю переходу «наука–медицина» відрізняться можуть як законодавства різних країн, так і адміністративні сектори всередині однієї юрисдикції. У більшості розвинених країн світу, таких, як США, країни ЄС та Австралія, оборот серійно-випущених комерційних медичних виробів та здійснення медичної лабораторної діяльності регулюються окремо [10–12]. Законодавчі обмеження переходу «наука–медицина» у деяких країнах ведуть до втрати відповідних ринків. Одним із прикладів подібної конкуренції є ситуація, коли протягом кількох років регулятори США і Великобританії забороняли роботу дослідників у сфері редагування геному людських ембріонів методом геномного редагування CRISPR/Cas9. Після виходу в 2015 р. роботи китайських вчених щодо редагування геному ембріонів в США та Британії дослідження геноміки було відновлено. В лютому 2016 року британським вченим було надано дозвіл на генетичну модифікацію людських ембріонів за допомогою CRISPR/Cas9 і методів «дизайнерських» нуклеаз [13, 14]. CRISPR — аббревіатура, яка розшифровується як «регулярно розташовані групами короткі паліндромні повтори, акронім від англ. CRISPR — Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, це прямі повтори та унікальні послідовності в ДНК бактерій і архей, що розділяють спільно з асоційованими генами, які було відкрито в 1987 році. У 2016 р. лабораторія ембріонів та стовбурових клітин людини з Інституту Ф. Крику (керівник К. Ніакан, Лондон, Великобританія) вперше отримала дозвіл на застосування технології CRISPR/Cas9 на ембріонах людини для вивчення ранніх стадій його розвитку. Завдяки цьому дослідницька група 88 спромоглася показати роль гена POU5F1 (OCT4) в ембріональному розвитку людини [13, 14]. Комплекс CRISPR дозволяє знаходити і редагувати певні послідовності ДНК за допомогою молекулярних «ножиць», які обрізають дефектні частини генів. Потім їх можна замінити новими ланцюгами нормальної ДНК. За винахід сучасної версії цієї технології Емманюель Шарпантьє і Дженніфер Дудна у 2020 році отримали Нобелівську премію з хімії [15]. «Цей генетичний інструмент має величезну силу, яка впливає на всіх нас. Це не тільки спричинило революцію у фундаментальній науці, але й сприяло появі інноваційних культур і призведе до нових революційних методів лікування», — оголосив голова Нобелівського комітету [15]. Подібно до конструктора, технологія CRISPR/Cas9 складається з декількох складових: нуклеази, прямої (гідової) РНК та опціонально матриці для рекомбінації. На теперішній час відома велика кількість варіантів цих трьох компонентів. Наприклад, серед нуклеаз використовують Cas9 (як дикого типу, так і з мутаціями, що знижують офф-таргетну активність), Cpf1, Cas13 та ін. Крім того, існують модифікації Cas9, що перетво-

рюють нуклеазу на ніказу, а також на неактивну форму; можна з'єднати Cas9 з іншим білком, який буде активним у зоні зв'язування Cas9 з ДНК. Напрямна РНК підбирається до таргетного локусу ДНК за принципом комплементарності, тому її послідовність виходить завжди різною. Ґрунтуючись на тому, що ефект он-таргет залежить від прямої РНК, що використовується, логічно припустити, що і активність офф-таргет безпосередньо залежить від sgRNA. В якості матриці для рекомбінації можна використовувати різні молекули як короткі одноланцюгові (від 60 до 200 нуклеотидів), так і довгі фрагменти в складі донорської ДНК (кільцевої або ліанеризованої). Комбінація цих компонентів відрізнятиметься не тільки для кожного конкретного захворювання, але й для кожної конкретної мутації, у кожній конкретній дослідницькій групі та для кожного об'єкта, що піддається редагуванню [16–19]. У майбутньому, за необхідності корекції мутацій у статевих клітинах або зиготі як фундаментальний (пошук закономірностей освіти он- та офф-таргета), так і прикладної (підвищення ефективності он-таргетної активності та розробка методів пошуку офф-таргетів) цілях доцільним є проведення первинних досліджень на ембріонах людини. Окремим сегментом системи є етичні аспекти застосування нових розробок (особливо у сфері зміни геному людини) [14, 20]. У рамках роботи етичних комітетів та уповноважених державних органів необхідно фіксувати та уточнювати аспекти, що впливають на клінічну реалізацію новітніх технологій [20, 21]. Для розробки методу лікування захворювань на основі CRISPR/Cas9 необхідно проведення експериментів з використанням певної конфігурації CRISPR/Cas9 на релевантній моделі.

Редагування успадкованого геному. В даний час технологія редагування геному не дозволяє зі 100% ефективністю внести зміни до всіх клітин організму, тому, для системних захворювань, якими є більшість спадкових хвороб, можна використовувати підхід, спрямований на зміну геному статевих клітин або зиготи, з розрахунком на те, що, здійснивши корекцію мутації на такому ранньому етапі розвитку ембріона, вдасться досягти виправлення мутації у всіх клітинах дорослого організму [20, 21]. Важливими є як прикладні, так і фундаментальні дослідження з редагування ембріонів людини, які дозволять не тільки зрозуміти, де і як утворюється так званий офф-таргет, тобто, неспецифічна дія нуклеаз, але й розробити більш досконалі методи пошуку оф-таргету та оцінки його функціонального значення. Експерименти на мишачих ембріонах не дадуть відповіді на ці питання, оскільки процеси репарації у різних біологічних об'єктів відбуваються по-різному. Ефективність редагування тих самих генів відрізняється навіть у різних клітинних культурах [21, 22]. Нові перспективні напрями відкріє Лабораторія редагування геному. Редагування геному як вид генної інженерії,

при якому може бути проведена спрямована зміна (включення, видалення або заміна) цільових фрагментів послідовності ДНК у геномі організму з використанням специфічних генетичних конструкцій та білків-ендонуклеаз, або «молекулярних ножиць», зокрема, на основі системи CRISPR/Cas9, є надзвичайно перспективним методом для розробки терапії низки моногенних важких ендокринних захворювань, насамперед, вроджена дисфункція кори надниркових залоз (ВДКНЗ) та адренолейкодистрофії (з варіантом надниркової недостатності). В даний час концепція редагування геному як інноваційного спрямування, що реалізується із застосуванням методу високопродуктивного ДНК-секвенування, нерідко розглядається як шлях необхідного прямого генетичного маніпулювання практично у всіх клітинах організму *in vivo*. В рамках роботи лабораторії планується спільне виконання досліджень, насамперед з лабораторією клітинних технологій, а також проведення експериментальних розробок *in vivo* на моделі дефіциту 21 гідроксилази (CYP21) наскільки можна редагувати геном при ВДКН. CRISPR являє собою «імунну систему» бактерій. При зараженні вірусом активується CRISPR РНК. Вона за допомогою пов'язаних із CRISPR білків (cas-нуклеази) шукає «записану» про вірус інформацію. При виявленні збігу CAS-нуклеаза «розрізає» ДНК вірусу. Такий непростий процес отримав прикладне застосування з двох причин: система CRISPR/Cas9 існує як у бактерій, так і у вищих організмів, зокрема, у людини виявлено специфічну нуклеазу Cas9, що виконує відразу кілька функцій: зв'язок з РНК-гідом (gRNA), розпізнавання чужорідної ДНК та її знищення. Технологія редагування геному, що складається з РНК-гіду та нуклеази Cas9, отримала назву «геномні ножиці». Програма обробки тексту, яка знаходить, видаляє чи замінює слова чи літери, комплекс CRISPR/Cas шукає певні послідовності ДНК, вирізує їх і дозволяє вставити новий геном. Технологія CRISPR/Cas9 для редагування генів дозволяє не тільки «вирізати» з ДНК гени з помилками, а й «вставляти» ті гени, що бракують. Це дає великі можливості щодо лікування генетичних захворювань, перш за все, спадкових хвороб, зумовлених точковою мутацією в генах: вроджений амавроз Лебера 10 (ураження сітківки ока), синдром Ушера (глухота з поступовою втратою зору), м'язова дистрофія Дюшена, муковісцидоз (кістозний фіброз, що вражає дихальну і травну системи), дефіцит транстиретину (ураження периферичної нервової системи), амілоїдоз альфа-1, первинна гіпероксалурія І типу (ураження нирок). Важливою є розробка нових методів доставки терапевтичних засобів до специфічної ділянки геному. Наукові дослідження, проведені на ембріонах людини, дозволяють наблизитись до розробки ефективної етіотропної терапії тяжких та невиліковних до цього захворювань, покращуючи уявлення з питань ембріогенезу.

Застосування методу CRISPR-Cas в терапевтичних підходах до соціально значущих захворювань дітей та підлітків.

Традиційний захист від вірусів включає вакцинацію, профілактику, противірусне лікування для запобігання реплікації вірусу та зменшення симптомів. Однак, для деяких вірусів часто не існує ефективних вакцин для запобігання інфекції, а в деяких випадках противірусне лікування також обмежується запобіганням більш серйозних симптомів [23–25]. Крім того, численні віруси людини, включаючи вірус імунodefіциту людини (ВІЛ), вірус простого герпесу (ВПГ), вірус Епштейна-Барра (EBV), цитомегаловірус людини (HCMV) і асоційований із саркомою Капоші вірус герпесу (KSHV), викликають латентні інфекції [24, 25]. Кілька вірусів людини, зокрема, віруси гепатиту В (HBV), HSV і HIV-1, зазвичай, викликають хронічної інфекції, які включають стадії як тихої, так і продуктивної інфекції, зі стійкою реплікацією вірусу на низькому рівні [26, 27]. Націлювання на вірусний геном при латентних і хронічних інфекціях є доволі складним, оскільки геном зберігається всередині клітини-хазяїна у вигляді вільно плаваючих вірусних мініхромосом, або як інкорпорований у геном хазяїна [24–27]. Система CRISPR-Cas9 є новою технікою захисту від вірусних інфекцій, яка використовується для більш детального вивчення взаємодії вірус-господар, і для розробки більш швидких та точних діагностичних методик, ніж існуючі поточні. Технологію CRISPR-Cas9 можна використовувати для редагування генів у профілактиці та лікуванні шляхом націлювання на вірусний геном і сам геном хазяїна, щоб запобігти проліферації вірусу, або проникненню в клітини хазяїна [28]. Принцип запобігання вірусним інфекціям за допомогою системи CRISPR-Cas9 має наступні основні механізми: 1) модифікація рецепторів для проникнення вірусу шляхом взаємодії між вірусними білками та рецепторами клітинної мембрани, що дозволяє вірусу проникнути в клітину хазяїна; 2) індукване CRISPR-Cas9 редагування генів рецепторів може запобігти зв'язуванню вірусу з рецептором клітин хазяїна, обмежуючи проникнення та поширення вірусу; 3) модифікація цих рецепторів, які також сприяють реплікації та упаковці вірусного геному, може перешкоджати розмноженню вірусу; 4) сегментація факторів вірусу хазяїна: для реплікації та розмноження вірусу, в основному, залежить від білків хазяїна. Деякі з генів, які кодують білки, необхідні для вірусів, можна заглушити за допомогою CRISPR-Cas-індукованого нокауту, запобігаючи реплікації вірусу; 5) індукція фактору обмеження транскрипції хазяїна — ці фактори обмежені зчепленням неактивного Cas9 і вірусної РНК, що блокує реплікацію та призводить до зниження навантаження вірусної РНК; видалення інтегрованого вірусного геному — вірусні гени можуть бути вирізані за допомогою CRISPR-Cas9 у випадках,

коли віруси інтегрують свою ДНК у геном господаря через видалення та інактивацію генів [28, 29].

Терапія ВІЛ-інфекції. ВІЛ є РНК-містким вірусом, який використовує зворотну транскрипцію для отримання ДНК, необхідної для реплікації та виживання, потім втручаючись в геном хазяїна, викликаючи приховану інфекцію. ВІЛ атакує CD4+ Т-клітини інфікованого господаря, що призводить до синдрому набутого імунodefіциту (СНІД), який нейтралізує імунну відповідь господаря, залишаючи господаря вразливим до вторинних інфекцій [29, 30]. Високоактивна антиретровірусна терапія (ВААРТ), комбінація трьох або більше препаратів значно зменшує реплікацію ВІЛ, але не може знищити провірус у спочиваючих CD4+ Т-клітинах, і не впливає на латентну інфекцію [29, 30]. Рецептор хемокіну С-Х-С типу 4 (CXCR4) і рецептор хемокіну С-С типу 5 (CCR5) є корецепторами, необхідними для проникнення ВІЛ-1 у CD4+ Т-клітини [29, 30]. Для запобігання ВІЛ-інфекції можна використовувати CRISPR-Cas9 зі створенням дефекту в цьому рецепторі, а порушення генів, що кодують корецептори, не виявило очевидного цитотоксичного впливу на життєздатність клітин, також мав місце значний захисний ефект проти ВІЛ-1 інфекції в порівнянні з немодифікованими клітинами [29, 31]. Для лікування латентної ВІЛ-інфекції необхідно інактивувати провірусну ДНК, інтегровану в геном господаря. Націлювання CRISPR-Cas9 на довгу кінцеву область (довгі кінцеві повтори, LTR, long terminal repeat) дозволяє це зробити. Результати редагування генів області U3 LTR ВІЛ-1 показали, що Cas9/gRNAs повністю вирізали фрагмент інтегрованої провірусної ДНК довжиною 9709 bp, що охоплює від 5 до 3 LTR, що призвело до інактивації експресії вірусного гена та латентного обмеження реплікації вірусу у ВІЛ-1 інфіковані клітини. Націлена на CRISPR-Cas9 провірусна ДНК запобігає новим ВІЛ-інфекціям [32, 33]. Редагування РНК ВІЛ-1 за допомогою CRISPR-Cas13 є ще одним ефективним методом ліквідації ВІЛ. Результати свідчать про те, що система CRISPR-Cas13 може ефективно пригнічувати ВІЛ-1 у первинних CD4+ Т-хелперних клітинах, зменшуючи реактивацію ВІЛ-1 у латентно інфікованих клітинах [33, 34]. Активація експресії фактору обмеження в клітинах-господарях може бути альтернативним методом запобігання реплікації ВІЛ-1. Очікується, що фактори обмеження, знайдені нещодавно, в тому числі, концентратор глушіння людини (HUSH) і NONO, ефективно пригнічують реплікацію ВІЛ шляхом реактивації за допомогою CRISPR-Cas9 [33, 34]. Вірусологічні дослідження доказали, що ВІЛ інтегрується в геном деяких клітин хазяїна, де може перебувати в дормантному (сплячому) стані і бути недоступним для антиретровірусних препаратів. Науковці прийшли до висновку, що для остаточного знищення вірусу лікування, ймовірно, потребує компонента для редагування генів, і видалення ДНК

ВІЛ із геному клітини-господаря. Метод CRISPR Cas9 призводить до поширення редагуючих молекул, і точного розщеплення та видалення фрагментів інтегрованої провірусної ДНК з геному інфікованих клітин крові та тканин, які є вірусними резервуарами, включаючи лімфатичні вузли, селезінку, кістковий мозок та головний мозок. Дослідники звільнили від генетичного матеріалу вірусу імунodefіциту людини першого типу (ВІЛ-1) мишей з інфікованими людськими Т-лімфоцитами, зробивши це за допомогою системи CRISPR та антиретровірусної терапії (АРТ), при цьому окремо один від одного методи не дали такого ж ефекту. Подібні результати були отримані і в дослідженнях на приматах. Таким чином, лікування за допомогою ВААРТ у комбінації з CRISPR призводить до зниження відсотка провірусної ДНК у крові та тканинах. Спостереження є основою для подальшого вивчення та модернізації технології редагування генів, являючись багатообіцяючим кроком на шляху ліквідації ВІЛ у клітинах людини [32, 35].

Тяжкий гострий респіраторний синдром, коронавірусна хвороба (SARS-CoV-2).

Пандемія COVID-19 створила серйозну загрозу для охорони здоров'я та економіки в усьому світі. Першим кроком у боротьбі з появою нового вірусу, який швидко поширюється, є розуміння характеристик нового вірусу та точне й швидке виявлення інфекції. Після відкриття SARS-CoV-2 дослідники використовували широкий аналіз геному CRISPR, щоб визначити, що SARS-CoV-2 проник на поверхню клітини-господаря через ангіотензинперетворюючий фермент 2 (ACE2) [36, 37]. Для діагностики система CRISPR використовується для створення діагностичного аналізу, який виявляє нуклеїнову кислоту SARS-CoV-2. Схематичне зображення спеціального високочутливого ферментативного репортерного розблокування (SHERLOCK), яке базується на CRISPR-Cas13a, забезпечує швидку діагностику та було схвалено CDC у Сполучених Штатах. Відтоді було розроблено простіший і швидший діагностичний метод на основі CRISPR-Cas 12a, який називається «універсальний подвійний CRISPR-Cas12a» («AIOD-CRISPR») [37, 38]. Профілактичний протівірусний CRISPR у клітинах людини (PAC-MAN), який є технікою на основі CRISPR-Cas13, виявився успішним у націленні на висококонсервативні послідовності SARS-CoV-2. В епітеліальних клітинах легень людини метод PAC-MAN ефективно розщеплює фрагменти SARS-CoV-2. Аналіз показав, що група лише з шести crRNA може націлюватися на понад 90% коронавірусів [39, 40]. Іншим варіантом є використання системи CRISPR-Cas для індукції мутацій у геномі хазяїна, що експресує ACE2 клітини, яка зв'язується під час вторгнення SARS-CoV-2, що свідчить про можливість послаблення зв'язування SARS-CoV-2 модифікацією структури білка без втрати наявної функції шляхом зміни існуючих генів, що

експресують ACE2 [40, 41].

Застосування методу CRISPR-Cas9 в терапії герпесвірусних інфекцій дітей та підлітків. Вірус Епштейн-Бара (ВЕБ, EBV, 4й тип вірусу герпесу) не продукує вірусне потомство під час латентної інфекції та експресує лише невелику кількість вірусних білків, а також некодуючих РНК, включаючи кілька мікроРНК. Подальші дослідження показали, що гРНК CRISPR/Cas9, націлені на вірусні мікро-РНК, такі як BART5, BART6 або BART16, ефективно направляють мікро-РНК, і що пряме редагування латентного геному EBV у EBV-позитивних пухлинних клітинах стало можливим. Крім того, дані показують, що націлювання CRISPR-Cas9 на ядерний антиген 1 вірусного EBV (EBNA1) і різні ділянки в межах початку реплікації EBV (OriP) значно зменшує вміст вірусного геному в латентно інфікованих EBV-інфікованих клітинах [42, 43]. За винятком UL84, сім критичних генів, які беруть участь в ініціації реплікації вірусної ДНК, включаючи UL54, UL44, UL57, UL70, UL105, UL86 і UL84, були спрямовані за допомогою CRISPR-Cas9 і успішно пригнічували реплікацію вірусу [43]. Інше дослідження створило два противірусних методи CRISPR-Cas9 для націлювання на ген UL122/123, який є ключовим регулятором літичної реплікації та реактивації затримки. Метод одинарного комплексу націлює стартовий кодон за допомогою однієї гРНК, що призводить до зниження експресії білка негайного раннього (IE). Мультиплексний метод використовує три гРНК для вирізання всього гена UL122/123, який вирізає ген IE у 90% вірусних геномів і таким чином пригнічує експресію білка IE [43, 44]. Для вірусу простого герпесу більшість гРНК, спрямованих на критичні гени HSV-1, ефективно інгібували реплікацію вірусу. Недавні дослідження продемонстрували, що CRISPR-Cas9, який націлений на гени UL52 і UL29 комплексу праймаза-геліказа HSV-1, ефективно пригнічує реплікацію вірусу без цитотоксичного ефекту в клітинах веро [43, 44]. В іншому дослідженні була розроблена названа модель лентивірусних частинок, що стирають HSV-1 (HELPS), для запобігання реплікації HSV-1 і для успішного пригнічення утворення герпетичного стромального кератиту (HSK) у моделі миші [44].

Обмеження та виклики. Поточна терапія CRISPR все ще має обмеження. По-перше, найбільш серйозне занепокоєння щодо терапії редагування геному викликає можливість нецільового мутагенезу. Рівень і тривалість експресії Cas9/gRNA також впливає на ризик [45]. Було докладено багато зусиль для покращення специфічності, включаючи розробку високопріоритетного конструктора sgRNA, який включає в себе численні фактори [45, 46]. По-друге, цільовий мутагенез часто відбувався у дволанцюгових розривах, спричинених односпрямованою РНК/Cas9, наприклад, великими делеціями на багатьох кілобазах і складних геномних перебудовах

у цільових сайтах, викликаючи віддалені наслідки транскрипції та потенційно патогенні наслідки [45, 46]. Контроль активності CRISPR-Cas9 у клітинах і складних умовах, таких як клітинно-специфічні промотори, активація/інгібування малих молекул, біочутливі носії доставки та умовна активація системи CRISPR-Cas9, буде корисною та перспективною [45, 46]. По-третє, ефективна, безпечна та цільова доставка системи CRISPR/Cas9 in vivo також є серйозною клінічною проблемою через різні фізіологічні бар'єри [46, 47]. По-четверте, ще однією перешкодою для застосування CRISPR/Cas9 є імуногенність організму людини до білка Cas9, отриманого з бактерій [46, 47]. По-п'яте, ризик репарації або геномної перебудови після індукованих sgRNA дволанцюгових розривів також викликає занепокоєння в терапевтичних втручаннях на основі CRISPR-Cas9 [46, 47]. Хоча технологія CRISPR-Cas9 може викликати бажані зміни в геномних послідовностях, погано вивчений і менш контрольований механізм відновлення ДНК пов'язаний з ризиком біологічної дисфункції [47]. Неочікувані наслідки механізмів репарації ДНК включають видалення кількох кілобаз у сусідній ніказній активності CRISPR-Cas9, вставку (неправильну або часткову) послідовності донорської ДНК до місця інтеграції та інверсію [47, 48], що може призвести до неочікуваних мутацій [48, 49].

ОБГОВОРЕННЯ

Постійні зусилля та клінічні випробування проводяться для подолання обмежень терапії CRISPR-Cas. Наразі зареєстровані інтервенційні клінічні випробування з редагуванням генів на основі CRISPR-Cas9 в США, Китаї, Швеції. Метод CRISPR/Cas9 з'явився як ефективна та проста технологія редагування генів протягом останніх 9–10 років. CRISPR/Cas9 має значний вплив на багато галузей медицини, включаючи генетику, онкологію та інфекційні захворювання. Слід зазначити, що висока вартість препаратів на основі CRISPR на даний час є перешкодою для їх широкого використання в більшості країн, відповідно, державні бюджети та страхові компанії не готові до подібних витрат. Крім того, технологія CRISPR/Cas9 має низку недоліків, а саме: велика кількість помилок редагування, неефективність редагування ДНК поза межами клітини, значний розмір ензиму Cas9, що ускладнює його доставку в клітину, викликаючи сильні імуногенні властивості. Тим не менш, природничі науки продовжують стрімко розвиватись у всьому світі, і технологія CRISPR/Cas9 є революційною, на неї чекає велике майбутнє. З відкриттям CRISPR/Cas9 з'явилося безліч можливостей для вирішення наболілих проблем людства, з якими наука досі не могла впоратися. Однак, щоб реалізувати ці можливості повною мірою, необхідно зробити цю технологію більш безпечною: виключити побічні ефекти, та вдосконалити систему доставки ком-

понентів CRISPR/Cas9 до клітин. Коли це буде зроблено, ідея застосування CRISPR/Cas9 до ембріонів людини для позбавлення від тяжких захворювань, ймовірно, вже не буде видаватися такою сумнівною. Експериментальний дизайн та аналіз даних технології редагування генів CRISPR/Cas9, дозволяють терапевтичному редагуванню генів отримувати корисні та довгострокові результати в діагностиці та комплексній терапії багатьох складних захворювань. Доцільним є підвищення використання потенціалу соціальних медіа та месенджерів щодо впровадження в клінічну практику нашої країни сучасних досягнень трансляційної медицини, в тому числі, методу CRISPR-Cas9 [50]. На даний час система редагування генів має певні недоліки та обмеження у їхньому використанні, але, в найближчі роки технології редагування геномів будуть більш ефективними та безпечними. Цілком ймовірно, що втручання в геном людини з плином часу стане буденною справою. Цікаве висловлювання Девіда Лю, присвячене цьому напрямленню: «Якщо CRISPR схожий на ножиці, редактори основ нагадують олівець, то прайм-редактори — це текстовий процесор, придатний для точного пошуку та заміни. Всі інструменти редагування геному відіграватимуть власні ролі... Це лише початок, а не кінець» [51].

ВИСНОВКИ

На даний час CRISPR-Cas9 є технологією, що розвивається, використовуючись на пацієнтах із загрозливими для життя станами.

1. Назріла необхідність в навчанні й виховуванні нових поколінь лікарів, які володітимуть не тільки клінічними підходами, а й навичками фундаментальних досліджень, що сприятиме поліпшенню методів діагностики та лікування різних захворювань, забезпечуючи перехід від уніфікованої до персоналізованої медицини.

2. Потрібне впровадження в освітньому медичному просторі України інноваційної освітньої програми, спрямованої на підготовку фахівців та дослідницьких кадрів нового покоління для роботи у різних галузях медицини та біофармації, молекулярної та клітинної біології, медичної генетики, біоінформатики та ін. З метою створення умов для отримання громадянами необхідної медичної допомоги на сучасному рівні, а також запобігання відставанню України від світового рівня в галузі інноваційної медицини, доцільним є внесення поправок до законодавства, передусім, до ст. 266 № 36, щодо умов встановлення вимог до системи внутрішнього контролю в організації інноваційної діяльності.

3. Методи редагування генів CRISPR/Cas9 як наукові досягнення ТМ, спрямовані на підвищення ефективності новітніх методів обстеження і лікування, задля персоналізованого підходу до обстеження та терапії пацієнтів, в тому числі, дитячого та підліт-

кового віку.

БІБЛІОГРАФІЧНІ ПОСИЛАННЯ

1. CDBI/INF (2000) [cdbi/plénier/docs publics/inf/travaux préparatoires Conv. (2000.1)]. Available from: https://www.coe.int/t/dg3/healthbioethic/texts_and_documents/CDBI-INF%282000%291PrepConv.pdf
2. Geraghty J. Adenomatous polyposis coli and translational medicine. *Lancet*. 1996 Aug 17;348(9025):422. DOI: 10.1016/S0140-6736(05)64535-7.
3. Pinchuk I, Yachnik Y, Kopchak O, Avetisyan K, Gasparian K, Ghazaryan G. [et al.] The Implementation of the WHO Mental Health Gap Intervention Guide (mhGAP-IG) in Ukraine, Armenia, Georgia and Kyrgyz Republic. *Int. J. Environ. Res. Public Health*.;18(9):4391. Available from: 2021 Apr 21. DOI: 10.3390/ijerph18094391. PMID: 33918985; PMCID: PMC8122418.
4. Hyland P, Vallières F, Shevlin M, Karatzias T, Ben-Ezra M, McElroy E, Vang ML, Lorberg B, Martsenkovskiy D. Psychological consequences of war in Ukraine: assessing changes in mental health among Ukrainian parents. *Psychol. Med.* [Internet].:1-3. Available from: 2023 Apr 5. DOI: 10.1017/S0033291723000818. Epub. ahead of print. PMID: 37016786.
5. Christopher P. Austin. Opportunities and challenges in translational science. National Center for Advancing Translational Sciences. Bethesda, MD, USA: NCATS; 12 April 2021. *Clin. Transl. Sci.* 2021;14:1629–1647. Available from: <https://ncats.nih.gov/translation/spectrum>.
6. Supporting the Transformative Impact of Research Infrastructures on European Research. 2020. Available from: https://ec.europa.eu/info/sites/info/files/research_and_innovation/strategy_on_research_and_innovation/documents/ec_rtd_transformative-impact-ris-on-euro-research.pdf
7. Краснов В. В. Зміни в системі підготовки медичних кадрів в умовах реформування сфери охорони здоров'я / В. В. Краснов, О. Є. Січкоріз, О. С. Щербінська // Актуальні питання якості медичної освіти : матеріали XIV Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю (з дистанційним під'єднанням ВМ(Ф) НЗ України за допомогою відеоконференц-зв'язку) (Тернопіль, 18–19 трав. 2017 р.). Тернопіль, 2017. Т. 1. с. 121-122.
8. Лінчевський О. В. Шляхи реформування системи вищої медичної освіти в Україні в сучасних умовах / О. В. Лінчевський, В. М. Черненко, Ю. С. П'ятиницький, І. Є. Булах // Актуальні питання якості медичної освіти : матеріали XIV Всеукр. наук.- практ. конф. з міжнар. участю (з дистанційним під'єднанням ВМ(Ф)НЗ України за допомогою відеоконференц-зв'язку) (Тернопіль, 18–19 трав. 2017 р.). Тернопіль, 2017. Т. 1. С. 3-5.
9. Закон України «Про інноваційну діяльність» (Відомості Верховної Ради України (ВВР), 2002, № 36, ст.266, редакція від 12.04.2022). Доступний за посиланням: <https://zakon.rada.gov.ua/go/40-15>.
10. National Center for Advancing Translational Sciences. Bethesda, MD, USA: NCATS; [updated 2016. Dec. 22; cited 2016 Dec.]. *Translational Science Spectrum*; [about 2 screens]. Available from: <https://ncats.nih.gov/translation/spectrum>.
11. Trochim W, Kane C, Graham MJ, Pincus HA. Evaluating translational research: a process marker model. *Clin. Transl. Sci.*

2011 Jun;4(3):153–62. DOI: 10.1111/j.1752-8062.2011.00291.x.

12. NCATS Programs & Initiatives. National Center for Advancing Translational Sciences. 2015-03-16. Retrieved 2021-09-28.

13. Baltimore D, Berg P, Botchan M, Carroll D, Charo RA, Church G, et al. A prudent path forward for genomic engineering and germline gene modification. *Science*. 2015. Apr. 3;348(6230):36–3. DOI: 10.1126/science.aab1028.

14. Knapton S. British scientists granted permission to genetically modify human embryos. *The Daily Telegraph*. 2016. Feb. 1. <https://www.telegraph.co.uk/science/2016/03/12/british-scientists-granted-permission-to-genetically-modify-huma/>

15. https://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjzPy89aSJAXUm7AIHHW4iGpQQFnoECBYQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.bbc.com%2Fukrainian%2Fnews-54446554&usg=AOvVaw2Qvsc9j62r1GN_fmXy0Ik&opi=89978449

16. Li, J.; Li, Y.; Pawlik, K.M.; Napierala, J.S.; Napierala, M. A CRISPR-Cas9, Cre-lox, and Flp-FRT cascade strategy for the precise and efficient integration of exogenous DNA into cellular genomes. *CRISPR J*. 2020, 3, 470–486.

17. Bukhari, B.; Naveed, M.; Makhdoom, S.I.; Jabeen, K.; Asif, M.F.; Batool, H.; Ahmed, N.; Chan, Y.Y. A comparison between organic and inorganic nanoparticles: Prime nanoparticles for tumor curation. *Nano* 2021, 16, 2130011.

18. Ahmad, A.; Baig, A.A.; Hussain, M.; Saeed, M.U.; Bilal, M.; Ahmed, N.; Chopra, H.; Hassan, M.; Rachamalla, M.; Putnala, S.K. Narrative on Hydrogen Therapy and its Clinical Applications: Safety and Efficacy. *Curr. Pharm. Des.* 2022, 28, 2519–2537.

19. Bharathkumar, N.; Sunil, A.; Meera, P.; Aksah, S.; Kannan, M.; Saravanan, K.M.; Anand, T. CRISPR/Cas-Based modifications for therapeutic applications: A review. *Mol. Biotechnol.* 2022, 64, 355–372.

20. Kulshrestha, S.; Chauhan, S.; Singh, G. With CRISPR/Cas9, Fighting against the Dark Empire of Diseases. *Guident* 2022, 15, 29–32.

21. Khan, Z.; Ali, Z.; Khan, A.A.; Sattar, T.; Zeshan, A.; Saboor, T.; Binyamin, B. History and Classification of CRISPR/Cas System. In *The CRISPR/Cas Tool Kit for Genome Editing*; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2022; pp. 29–52.

22. Shams, F.; Bayat, H.; Mohammadian, O.; Mahboudi, S.; Vahidnezhad, H.; Soosanabadi, M.; Rahimpour, A. Advance trends in targeting homology-directed repair for accurate gene editing: An inclusive review of small molecules and modified CRISPR-Cas9 systems. *BioImpacts* 2022, 12, 371.

23. Shaun D. Tyler, Geoffrey A. Peters, Alberto Severini, Complete genome sequence of cercopithecine herpesvirus 2 (SA8) and comparison with other simplexviruses, *Virology*, Volume 331, Issue 2, 2005, P. 429–440. DOI: 10.1016/j.virol.2004.09.042.

24. Davison, A.J. Herpesviruses: General Features; Mahy, B.W.J., Van Regenmortel, M.H.V., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2008; pp. 430–436. ISBN 978-0-12-374410-4. DOI:10.1002/9780470688618.taw0231.

25. Heming JD, Conway JF, Homa FL. Herpesvirus Capsid Assembly and DNA Packaging. *Adv Anat Embryol Cell Biol*. 2017;223:119–142. DOI: 10.1007/978-3-319-53168-7_6. PMID: 28528442; PMCID: PMC5548147.

26. Bennett N.J. Pediatric mononucleosis and Epstein-Barr virus infection / N.J. Bennett. 2012. <http://emedicine.medscape.com/article/963894>.

27. Cunha B.A. Infectious mononucleosis / B.A. Cunha // *Medscape*. 2013. <http://emedicine.medscape.com/article/222040-overview>.

28. Van Cleemput J, Koyuncu OO, Laval K, Engel EA, Enquist LW. CRISPR/Cas9-Constructed Pseudorabies Virus Mutants Reveal the Importance of UL13 in Alphaherpesvirus Escape from Genome Silencing. *J Virol*. 2021 Feb 24;95(6):e02286–20. DOI: 10.1128/JVI.02286–20. PMID: 33361431; PMCID: PMC8094956.

29. Dai H, Wu J, Yang H, Guo Y, Di H, Gao M, Wang J. Construction of BHV-1 UL41 Defective Virus Using the CRISPR/Cas9 System and Analysis of Viral Replication Properties. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 8;12:942987. DOI: 10.3389/fcimb.2022.942987. PMID: 35873151; PMCID: PMC9304932.

30. Dinoso JB, Rabi SA, Blankson JN, Gama L, Mankowski JL, Siliciano RF, Zink MC, Clements JE. A simian immunodeficiency virus-infected macaque model to study viral reservoirs that persist during highly active antiretroviral therapy. *J Virol*. 2009 Sep;83(18):9247–57. DOI: 10.1128/JVI.00840–09. Epub. 2009 Jul 1. PMID: 19570871; PMCID: PMC2738256.

31. Liu CY, Jin M, Guo H, Zhao HZ, Hou LN, Yang Y, Wen YJ, Wang FX. Concurrent Gene Insertion, Deletion, and Inversion during the Construction of a Novel Attenuated BoHV-1 Using CRISPR/Cas9 Genome Editing. *Vet Sci*. 2022 Mar 30;9(4):166. DOI: 10.3390/vetsci9040166. PMID: 35448664; PMCID: PMC9029512.

32. Mancuso P, Chen C, Kaminski R, Gordon J, Liao S, Robinson JA, Smith MD, Liu H, Sariyer IK, Sariyer R, Peterson TA, Donadoni M, Williams JB, Siddiqui S, Bunnell BA, Ling B, MacLean AG, Burdo TH, Khalili K. CRISPR based editing of SIV proviral DNA in ART treated non-human primates. *Nat. Commun*. 2020. Nov. 27;11(1):6065. DOI: 10.1038/s41467-020-19821-7. PMID: 33247091; PMCID: PMC7695718.

33. Kim TH, Lee SW. Therapeutic Application of Genome Editing Technologies in Viral Diseases. *Int J Mol Sci*. 2022 May 12;23(10):5399. DOI: 10.3390/ijms23105399. PMID: 35628210; PMCID: PMC9140762.

34. Nasrallah A, Sulpice E, Kobaisi F, Gidrol X, Rachidi W. CRISPR-Cas9 Technology for the Creation of Biological Avatars Capable of Modeling and Treating Pathologies: From Discovery to the Latest Improvements. *Cells*. 2022. Nov. 15;11(22):3615. DOI: 10.3390/cells11223615. PMID: 36429042; PMCID: PMC9688409.

35. Gurrola TE, Effah SN, Sariyer IK, Dampier W, Nonnemacher MR, Wigdahl B. Delivering CRISPR to the HIV-1 reservoirs. *Front Microbiol*. 2024 May 15;15:1393974. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1393974. PMID: 38812680; PMCID: PMC11133543.

36. Jackson, C.B., Farzan, M., Chen, B. et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 23, 3–20 (2022). DOI: 10.1038/s41580-021-00418-x.

37. Ebrahimi S, Khanbabaei H, Abbasi S, Fani M, Soltani S, Zandi M, Najafimemar Z. CRISPR-Cas System: A Promising Diagnostic Tool for Covid-19. *Avicenna J Med Biotechnol*. 2022. Jan-Mar;14(1):3–9. DOI: 10.18502/ajmb.v14i1.8165. PMID: 35509363; PMCID: PMC9017467.

38. Li J, Zhang K, Lin G, Li J. CRISPR-Cas system: A promising tool for rapid detection of SARS-CoV-2 variants. *J Med Virol*. 2024.

Jan;96(1):e29356. DOI: 10.1002/jmv.29356. PMID: 38180237.

39. Zhan Y, Li XP, Yin JY. COVID-19 one year later: a retrospect of CRISPR-Cas system in combating COVID-19. *Int J Biol Sci*. 2021 May 13;17(8):2080-2088. DOI: 10.7150/ijbs.60655. eCollection 2021. PMID: 34131407.

40. Yin L, Man S, Ye S, Liu G, Ma L. CRISPR-Cas based virus detection: Recent advances and perspectives. *Biosens Bioelectron*. 2021. Dec. 1;193:113541. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113541. Epub. 2021 Aug 8. PMID: 34418634; PMCID: PMC8349459.

41. Hu F, Liu Y, Zhao S, Zhang Z, Li X, Peng N, Jiang Z. A one-pot CRISPR/Cas13a-based contamination-free biosensor for low-cost and rapid nucleic acid diagnostics. *Biosens Bioelectron*. 2022. Apr. 15;202:113994. DOI: 10.1016/j.bios.2022.113994. Epub. 2022 Jan 13. PMID: 35042129; PMCID: PMC8755463.

42. Dalton T, Doubrovina E, Pankov D, Reynolds R, Scholze H, Selvakumar A, et al. Epigenetic reprogramming sensitizes immunologically silent EBV+ lymphomas to virus-directed immunotherapy. *Blood*. (2020). 135:1870–81. DOI: 10.1182/blood.2019004126.

43. Chavez, M., Chen, X., Finn, P.B. et al. Advances in CRISPR therapeutics. *Nat Rev Nephrol* 19, 9–22 (2023). DOI: 10.1038/s41581-022-00636-2.

44. Yin D, Ling S, Wang D, Dai Y, Jiang H, Zhou X, Paludan SR, Hong J, Cai Y. Targeting herpes simplex virus with CRISPR-Cas9 cures herpetic stromal keratitis in mice. *Nat Biotechnol*. 2021. May;39(5):567-577. DOI: 10.1038/s41587-020-00781-8. Epub. 2021 Jan 11. PMID: 33432198; PMCID: PMC7611178.

45. Uddin F, Rudin CM, Sen T. CRISPR Gene Therapy: Applications, Limitations, and Implications for the Future. *Front Oncol*. 2020. Aug. 7;10:1387. DOI: 10.3389/fonc.2020.01387. PMID: 32850447; PMCID: PMC7427626.

46. De A, Biswas AR. Nanotechnology and Computational tool based study of CRISPR/Cas-9 research in Biomedical Engineering. *J Nano Res Adv Mater Polym. Sci*. 2020;1:6–1.

47. Shumega AR, Pavlov YI, Chirinskaite AV, Rubel AA, Inge-Vechtormov SG, Stepchenkova EI. CRISPR/Cas9 as a Mutagenic Factor. *International Journal of Molecular Sciences*. 2024; 25(2):823. DOI: 10.3390/ijms25020823.

48. Nambiar TS, Baudrier L, Billon P, Ciccio A. CRISPR-based genome editing through the lens of DNA repair. *Mol Cell*. 2022 Jan 20;82(2):348-388. DOI: 10.1016/j.molcel.2021.12.026. PMID: 35063100; PMCID: PMC8887926.

49. Hunt JMT, Samson CA, Rand AD, Sheppard HM. Unintended CRISPR-Cas9 editing outcomes: a review of the detection and prevalence of structural variants generated by gene-editing in human cells. *Hum Genet*. 2023 Jun;142(6):705-720. DOI: 10.1007/s00439-023-02561-1. Epub 2023 Apr 24. PMID: 37093294; PMCID: PMC10182114.

50. Chan T, Trueger NS, Roland D, Thoma B. Evidence-based medicine in the era of social media: scholarly engagement through participation and online interaction. *Can J. Emerg. Med*. 2018;20:3–8. DOI: 10.1017/cem.2016.407.

51. Fan S. Everything You Need to Know About Superstar CRISPR Prime Editing. <https://singularityhub.com/2019/11/05/everything-you-need-to-know-about-superstar-crispr-prime-editing/>