



Kharazmi University

Genetic manipulation of stem cells for clinical applications

Behnaz Bakhshandeh^{1*} , Alireza Shafizadeh² , Mohammadhossein Karimi² , Negin Kiaei² 1. Corresponding author, Faculty of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran. E-mail: b.bakhshandeh@ut.ac.ir

2. School of Biology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran.

Article Info

ABSTRACT

Article type:

Review Article

Article history:

Received 20 October 2024

Received in revised form 20 December 2024

Accepted 6 January 2025

Available online 25 March 2025

Keywords:

Stem cells have garnered significant attention in the medical industry due to their unique capabilities and potential for personalized medicine. To optimize and modify the behavioral characteristics of these cells for various clinical and research applications, genetic alterations—either permanent or transient—are often required. In the past, random mutations in the genome were primarily induced using radiation and chemicals. However, with the advancement of targeted genetic modification tools such as various nucleases, it is now possible to specifically alter the gene or trait of interest, either within the genome or in an episomal manner. Gene transfer to cells is achieved through various biological delivery methods, including viral, chemical, or physical carriers. This review article explores the necessity and significance of stem cell manipulation, the different methods of genetic modification of stem cells, the advantages and disadvantages of each approach, and the solutions available to enhance the efficiency and safety of these methods for medical use. It also highlights the importance of addressing the challenges in this field, particularly in clinics, efficiency, genetic modifications, stem cells, viral areas such as transplantation and cancer. vectors.

Cite this article: Bakhshandeh, Behnaz., Shafizadeh, Alireza., Karimi, Mohammadhossein., & Kiaei, Negin. (2025). genetic manipulation of stem cells for clinical applications. *Nova Biologica Reperta*, 12 (X), 1-20. <http://doi.org/00000000000000000000>

Kharazmi :Publisher

.The Author(s) ©



.University

DOI: <http://doi.org/00000000000000000000>

Stem cells have garnered significant attention in the medical industry due to their unique capabilities and potential for personalized medicine such as self-renewal, differentiation into various cell types, and microenvironment-dependent behavior regulation. These cells are primarily classified into two categories: pluripotent (e.g., embryonic and induced pluripotent stem cells) and tissue-specific (e.g., mesenchymal stem cells). To optimize and modify the behavioral characteristics of these cells for various clinical and research applications, genetic alterations—either permanent or transient—are often required. Advances in genetic editing technologies now enable precise genome manipulation of stem cells for therapeutic, research, and artificial organ development purposes. The goals of genetic manipulation of stem cells are: 1-Reducing transplant rejection and immune response: one of the main challenges in stem cell transplantation is the host immune response. With genetic manipulation, immune system-related genes such as HLA-G, PD-L1, and CD47 can be modified to reduce the likelihood of transplant rejection for example, using engineered stem cells to produce human organs in the bodies of other species, such as pigs, with the aim of reducing the shortage of organ donors. 2-Fabrication of organ-like structures and drug screening: 3D organ-like structures derived from stem cells provide better models for studying diseases and testing drugs than animal models or 2D cultures for example, producing organoids of the intestine, heart, and brain to study the effects of specific drugs and diseases. 3-Creating new capabilities in stem cells: Through genetic manipulation, stem cells can be engineered to secrete therapeutic factors such as VEGF for angiogenesis or to transfer mitochondria to damaged cells for example, the use of engineered stem cell exosomes for tissue repair after a heart attack. In general, gene editing technologies include random methods such as using waves (such as ultrasound) or chemicals (such as cell-penetrating peptides) and targeted methods such as ZFN, TALEN, CRISPR-Cas9 systems. In order to transfer genes to stem cells, biological methods such as using adenoviruses, lentiviruses, and retroviruses, chemical methods such as lipids and cationic polymers, and physical methods such as microinjection, electroporation, and nucleofection are used. The advantages of using cationic polymers compared to cationic lipids include their biocompatibility and greater stability. Also, to reduce the toxicity of these compounds, their molecular weight can be reduced. In addition, natural polymers such as chitosan are less immunogenic and toxic and are biodegradable. Genetic manipulations may lead to off-target changes in the genome and complications such as cancer. In addition to vectors, chemical reagents used for transfection or transduction, core sequences of vectors, reporter genes, and antibiotic resistance may also lead to errors in genetic manipulation. Strategies to mitigate the challenges include the use of non-viral vectors such as plasmids to reduce integration into the genome, optimization of genetic editing enzymes (such as Cas9) to increase accuracy, and control of the expression of manipulated genes with self-regulatory mechanisms. While stem cell genetic engineering holds transformative potential for regenerative medicine, disease treatment, and organ biofabrication, challenges like immune responses, oncogenic risks, and editing inaccuracies require further research. In the case of cell therapy and injection of engineered stem cells, despite the fact that most of the genes involved in the process of combating rejection by the immune system and the apoptosis induced in them, genes involved in the production of engineered exosomes from them and the interaction of these cells with other cells, have been able to increase the efficiency of treatment using these cells without increasing the cost of treatment and the risks associated with embolism; however, the safety of stem cell manipulation in terms of immune and inflammatory responses in the host, as well as the risk of carcinogenesis through integration of the viral genome into the host genome, is the biggest obstacle to their clinical use as cell manipulation *in vivo*. Therefore, the safety and quality control aspects of manipulating genes that are to be overexpressed must be carefully considered. In addition, the degree of efficiency and long-term genetic stability must be

thoroughly investigated. There are still many unresolved issues for the clinical and in vivo application of engineered stem cells, including the number of modified stem cells to inject or the best method of delivering the modified stem cells to the target site. This review article explores the necessity and significance of stem cell manipulation, the different methods of genetic modification of stem cells, the advantages and disadvantages of each approach, and the solutions available to enhance the efficiency and safety of these methods for medical use. Integrating advanced genome-editing tools with safe delivery systems will be critical for clinical translation. Engineered stem cells and their derivatives may revolutionize therapies for intractable diseases.

دستکاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی به منظور کاربردهای بالینی

بهناز بخشنده^{۱*}، علیرضا شفیع زاده^۲، محمد حسین کریمی^۲، نگین کیائی^۲

۱. دانشکده بیوتکنولوژی، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران. رایانامه: b.bakshshandeh@ut.ac.ir

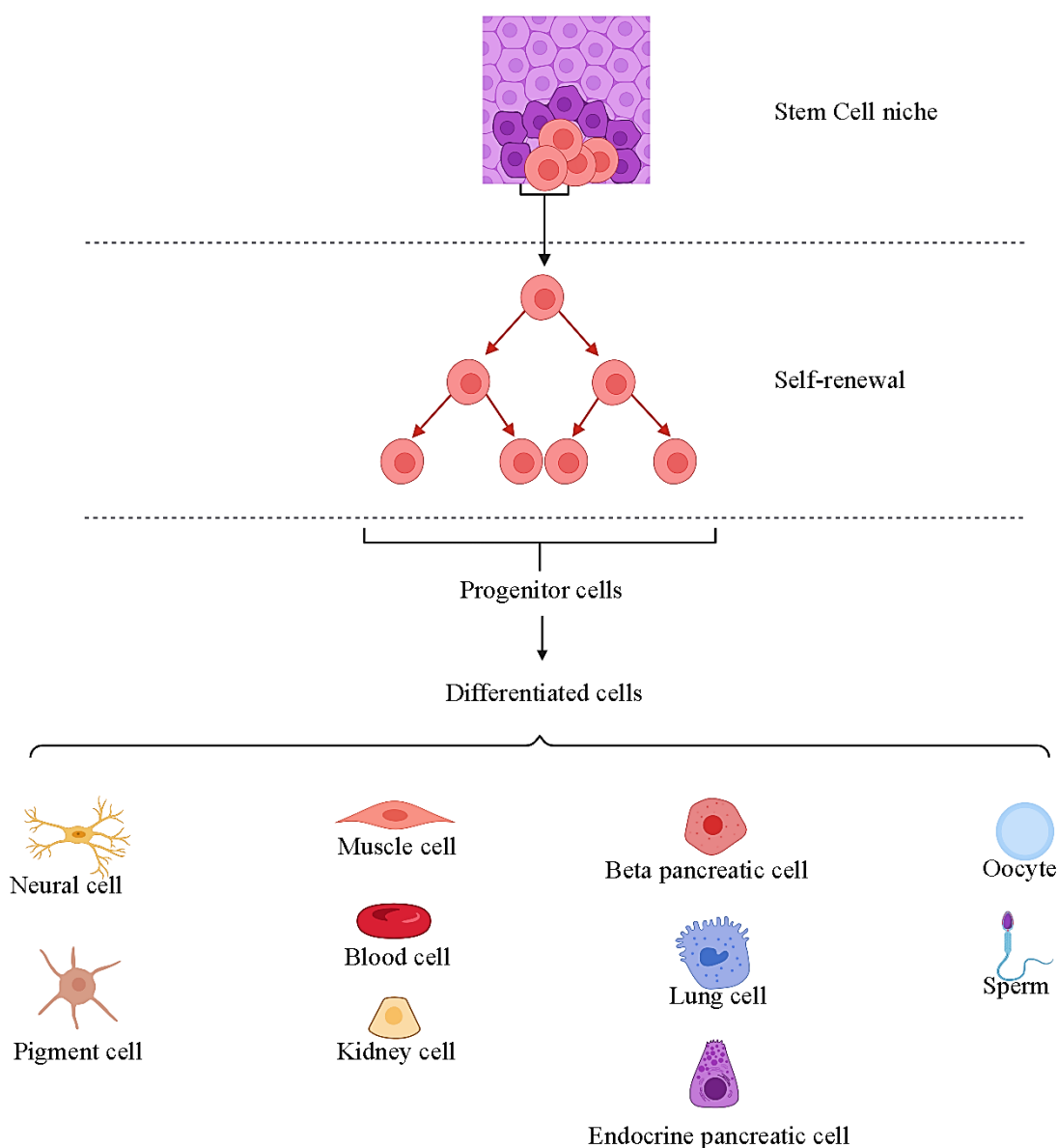
۲. دانشکده زیست شناسی، دانشکده‌گان علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران.

اطلاعات مقاله	چکیده
نوع مقاله: مقاله مروری تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۷/۲۹ تاریخ بازنگری: ۱۴۰۳/۰۹/۳۰ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۱/۱۷ تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۱/۰۵	سلول‌های بنیادی به دلیل ویژگی‌ها و توانمندی‌های منحصر به فرد خود، به طور جدی در صنعت پزشکی برای کاربردهای پزشکی مورد توجه قرار گرفته‌اند. به منظور بهینه‌سازی و اصلاح ویژگی‌های رفتاری این سلول‌ها برای استفاده‌های بالینی و تحقیقاتی، معمولاً نیاز به ایجاد تغییرات فنوتیپی از طریق دستکاری‌های ژنتیکی دائمی یا گذرا در این سلول‌ها وجود دارد. در گذشته بیشتر از امواج و مواد شیمیایی برای ایجاد جهش‌های تصادفی در ژنوم استفاده می‌شد، اما امروزه با پیشرفت ابزارهای هدفمند تغییر ژنتیکی مانند انواع نوکلئازها، می‌توان به طور دقیق ژن یا صفت مورد نظر را در داخل ژنوم یا به صورت اپی‌زومال تغییر داد. انتقال ژن مورد نظر به ویروسی، سلول‌ها با استفاده از روش‌ها و واسطه‌های مختلف زیستی مانند حامل‌های ویروسی، شیمیایی و یا سلول‌های فیزیکی انجام می‌شود. مقاله حاضر به بررسی ضرورت و اهمیت دستکاری سلول‌های بنیادی، انواع روش‌های دستکاری ژنتیکی این سلول‌ها و مزایا و معایب هر یک از این روش‌ها می‌پردازد. همچنین به راه‌حل‌های موجود برای ارتقای کارایی و امنیت این روش‌ها در پزشکی، با تاکید بر حل چالش‌های موجود در زمینه‌های مختلف مانند پیوند و سرطان، اشاره می‌کند.
استناد: بخشنده، بهناز؛ شفیع زاده، علیرضا؛ کریمی، محمدحسین؛ و کیائی، نگین (۱۴۰۴). دستکاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی به منظور کاربردهای بالینی. یافته‌های نوین در علوم زیستی، ۱۲ (۱)، ۲۰-۱. http://doi.org/10.22034/NBR.12.1.5 ناشر: دانشگاه خوارزمی. © بهناز بخشنده؛ علیرضا شفیع زاده؛ محمدحسین کریمی؛ نگین کیائی.	



سلول های بنیادی

سلول های بنیادی، بر اساس ویژگی های رفتاری خود در ریز محیط سلولی، دارای چهار ویژگی اصلی و شناخته شده هستند: خودنوزایی، توانایی ایجاد سلول های پیش ساز از طریق تقسیمات نامتقارن و تمایز، رشد و بقای نامحدود و امکان کنترل این ویژگی ها توسط محیط اطراف (Pyle & Hicks, 2023; Slack, 2017). با در نظر گرفتن این چهار ویژگی، سلول های بنیادی را می توان به دو دسته پرتوان و مختص بافت تقسیم کرد. سلول های بنیادی پرتوان را می توان از منابع جنینی به دست آورد یا با استفاده از فاکتورهای یاماناکا (c-Myc, KLF4, SOX2, OCT4) و القای تمایززدایی، از سلول های بالغ به سلول های پرتوان تبدیل کرد (Zare et al., 2015). این سلول ها را می توان به صورت نامحدود در شرایط برون تنی کشت داد و رده های سلولی متنوعی ایجاد نمود (شکل ۱) (Rasekhi et al., 2017).



شکل ۱. تصویر شماتیک از ویژگی های رفتاری و تمایزی سلول های بنیادی (Rasekhi et al., 2017).

Figure 1. Schematic illustration of the behavioral and differentiation properties of stem cells (Rasekhi et al., 2017).

سلول‌های بنیادی مختص بافت به شدت به شرایط محیطی ناحیه خود در بدن وابسته هستند و هر یک از این سلول‌ها تنها قادرند سلول‌های پیش‌ساز خاصی را تولید کنند. از آنجا که ژنوم سلول‌های بنیادی پرتوان القائی دقیقاً مشابه ژنوم سلول‌های بدنی است که از آن‌ها به‌دست آمده‌اند، وجود ناهنجاری‌های ژنتیکی یا اپی‌ژنتیکی در این سلول‌ها می‌تواند استفاده از آن‌ها یا محصولات آن‌ها را با ریسک بالایی همراه کند (Bakhshandeh et al., 2023). به همین دلیل برای تضمین ایمنی استفاده از این سلول‌ها برای کاربردهای بالینی، باید این سلول‌ها به طور منظم در طول تولید و تمایز از نظر ویژگی‌های ژنتیکی و رفتاری بررسی شوند (Havasi et al., 2013; Poetsch et al., 2022). با این حال، به‌منظور تحقیقات انسانی، ترجیح بر استفاده از سلول‌های بنیادی بالغ یا سلول‌های بنیادی پرتوان القائی است، زیرا استفاده از سلول‌های بنیادی پرتوان جنینی انسانی با مشکلات اخلاقی مرتبط با استفاده ایزاری از جنین همراه است (Slack, 2022; Lazar & Hu, 2017).

بررسی‌ها نشان می‌دهند که بسته به منبع سلول بنیادی (اتولوگ، آلوژن و زئوژن)، نوع سلول بنیادی و همچنین بافت استخراج سلول بنیادی (مانند مغز استخوان، بافت چربی، بند ناف و غیره)، میزان اثرگذاری و احتمال رد درمان توسط سیستم ایمنی متفاوت است. بنابراین، دستیابی به سلول‌های بنیادی برای استفاده عمومی در درمان انواع مختلف آسیب‌های بافتی همچنان با چالش‌های فراوانی روبه‌روست (Hoang et al., 2022; Li et al., 2021). در میان انواع مختلف سلول‌های بنیادی، سلول‌های بنیادی مزانشیمی به دلیل دسترسی بیشتر به منابع آن‌ها، مسائل اخلاقی کمتر مرتبط با استفاده از آن‌ها، و ظرفیت بالاتر تکثیر و تمایز به سلول‌های مختلف نسبت به سایر سلول‌های بنیادی، در مطالعات ترجیح داده می‌شوند (Vahdat et al., 2019; Zhang et al., 2022).

اهداف ایجاد دستکاری ژنتیکی در سلول‌های بنیادی

اهداف درمانی: کاهش رد پیوند و پاسخ ایمنی

سلول‌های بنیادی پرتوان این پتانسیل را دارند که انقلابی در پزشکی بازساختی ایجاد کنند. یکی از موانع اصلی برای استفاده گسترده از سلول‌های بنیادی پرتوان در سلول درمانی و یا پیوند، رد پیوند آنها توسط پاسخ سیستم ایمنی است (Meissner et al., 2022). افزایش بروز نارسایی در اندام‌های حیاتی و از طرف دیگر، در دسترس نبودن اهداکنندگان به میزان مورد نیاز، شکاف بزرگی بین عرضه و تقاضا ایجاد کرده است که منجر به انتظار طولانی بیماران در لیست انتظار پیوند می‌شود. در این شرایط، پیوند از حیوانات می‌تواند به رفع کمبود عرضه اعضای مختلف کمک کند. به‌عنوان مثال، خوک‌ها در حال حاضر به‌عنوان حیوانات ایده‌آل برای پیوند به انسان در نظر گرفته می‌شوند. علی‌رغم شباهت‌های بین خوک و اندام‌های انسان از نظر اندازه اعضا و فیزیولوژی، رد پیوند بین‌گونه‌ای که شدیدتر از رد پیوند آلوژنیک است و همچنین خطر عفونت‌های بین‌گونه‌ای، موانع اصلی در استفاده بالینی از این نوع پیوندها هستند.

با این حال در سال‌های اخیر، به دلیل پیشرفت تکنیک‌های آزمایشگاهی برای غلبه بر بسیاری از این موانع، دستکاری سلول‌های بنیادی جنینی با استفاده از روش‌های مختلف ویرایش ژنتیکی، پیشرفت زیادی کرده است. به دلیل توانایی‌های این سلول‌ها، می‌توان از آن‌ها برای درمان بیماری‌های مختلف، به‌ویژه بیماری‌های مرتبط با سیستم ایمنی، پوست و خون، یا تولید اندام‌های انسانی در بدن گونه‌های دیگر از طریق فناوری تکمیل بلاستوسیست و به منظور کاهش پاسخ ایمنی و رد پیوند استفاده کرد. برای دستیابی به این هدف، بخش‌های مختلف سیستم ایمنی با استراتژی‌های مختلف هدف قرار گرفته‌اند. (جدول ۱) (Lamsfus-Calle et al., 2020; Lei et al., 2022).

جدول ۱. استراتژی‌های مختلف بهبود کارایی سلول درمانی با استفاده از دستکاری سلول‌های بنیادی

Table 1. Different strategies to improve the efficacy of cell therapy using stem cell manipulation

منابع	نتیجه	تغییر بیان ژن	محصول ژن	نوع پاسخ ایمنی	سیستم ایمنی
Hara et al., (2013)	کاهش رد پیوند	حذف آنتی‌ژن ناسازگار و جایگزین کردن آن با آنتی‌ژن گیرنده پیوند	آنتی‌ژن لکوسیت	رد پیوند	سلولی
Buermann (et al., 2018)	کاهش رد پیوند	افزایش بیان	PD-L1, CD47, HLA-G		

Martinez-) Alarcon et al., (2021)	مهار رد پیوند	افزایش بیان	CD55	رد پیوند	کمپلمان ها و سیستم ایمنی ذاتی
et Kuwaki) (al., 2005	مهار رد پیوند	حذف ژن GGTA1	alpha-1,3 galactosyltransferase		
Watanabe) et al., 2018; Yan et al., (2018	مهار فاگوسیتوز، کاهش ترشح سیتوکین های پیش التهابی و افزایش ترشح سیتوکین های ضد التهابی	افزایش بیان	لیگاندهای مهار کننده (SIRP- α), SP-D, Siglecs, CD 200 HHLA-, HHLA-G1, TIGIT (E)	رد پیوند	ماکروفاژها
Rao et al.,) (2021	مهار پاسخ ایمنی و مهار بیان IFN- γ	افزایش بیان	HLA-E و β 2M, HLA-G1	رد پیوند	NK cell ها و لنفوسیت- B و T های
) Rodríguez-Gago et al., (2001	آپوپتوز و مهار پاسخ این سلول ها	افزایش بیان	hFasL	رد پیوند	$\gamma\delta$
.T.H) Wang et al., (2018	مهار پاسخ ایمنی نوتروفیل ها	افزایش بیان	CD 31	نتوزیز (نوعی مرگ برنامه ریزی شده خاص نوتروفیل ها) و التهاب	نوتروفیل ها
Ahrens et) (al., 2015	اثرات ضد التهابی و مهار آپوپتوز وابسته به TNF- α و FasL	افزایش بیان	هم اکسیژناز انسانی-1	التهاب سیستمیک	کل سیستم ایمنی
Niu et al.,) (2017	کاهش التهابات	حذف ژن های تولید کننده این ساختارها	ساختارهای رتروویروسی	التهابات زئونوتیک	کل سیستم ایمنی

(HLA-G: Human Leukocyte Antigen G, CD: Cluster of Differentiation, PD-L1: Programmed cell Death Ligand 1, GGTA1: Alpha-1,3-Galactosyl transferase, SIRP- α : Signal Regulatory Protein α , Siglecs: Sialic acid binding immunoglobulin like lectins, SP-D: Surfactant Protein D, TIGIT: T cell immunoreceptor with Ig and ITIM domains, HHLA-G1: HERV-H LTR-associating protein Homolog G1, HHLA-E: HERV-H LTR-associating protein Homolog E, NK cell: Natural Killer Cell, β 2M: β -2 Microglobulin, IFN- γ : Interferon γ , hFasL: human Fas Ligand, TNF- α : Tumour Necrosis Factor α)

ساخت شبه اندامها و غربالگری دارویی در مطالعات پیش بالینی و پزشکی شخصی

امروزه پزشکی با چالش فزاینده بیماری های غیرقابل درمان و همچنین کمبود داروهایی که بتوانند به مراحل بالینی و بازار درمانی برسند، مواجه است (Lazar & Baptista et al., 2022; Hu, 2022). در حال حاضر، برای بررسی اثر داروهای جدید در مرحله پیش بالینی، بیشتر مطالعات همچنان از مدل های کشت سلولی دوبعدی استفاده می کنند. با این حال، بسیاری از ترکیبات که نتایج امیدوارکننده ای در مدل های آزمایشگاهی به دست می آورند، در شرایط درون تنی نتایج دقیقی را نشان نمی دهند. در جامعه علمی، این نظر وجود دارد که پیش بینی ضعیف این مدل ها ناشی از تفاوت های ژنتیکی، اپی ژنتیکی، متابولیسمی و توپولوژیکی در مدل های کشت دوبعدی با شرایط واقعی بدن انسان است. همچنین تفاوت های فیزیولوژیکی بین گونه ای، طول عمر متفاوت، پاسخ های متفاوت به دارو و ملاحظات اخلاقی در استفاده از مدل های حیوانی و تعمیم نتایج به انسان، از دیگر محدودیت های این مدل ها هستند. این مسائل باعث می شوند که توسعه بسیاری از محصولات و داروهای جدید همچنان در مرحله آزمایشگاهی باقی بماند و نتوانند وارد آزمایشات بالینی شوند (Baptista et al., 2022). به همین دلیل، جدیدترین پیشرفت ها به استفاده از کشت سه بعدی و تمایز سلول های بنیادی انسانی بر روی داربست ها برای تولید شبه اندامها به منظور بررسی اثرات دارویی معطوف شده است. این مدل ها می توانند جایگزین بهتری برای شبیه سازی ریزمحیط سلولی باشند و نتایج دقیق تری در مقایسه با مدل های دوبعدی آزمایشگاهی ارائه دهند (Lazar & Cho et al., 2022; Hu, 2022). این مدل های سه بعدی انسانی به طور دقیق معماری بافت سه بعدی و رفتار سلول ها در شرایط فیزیولوژیکی را برای مدل های سالم و بیمار شبیه سازی می کنند به طوری که در آینده، می توانند در پزشکی شخصی به منظور تولید بافت ها و اندامها و بهبود

درمان‌های فردی مورد استفاده قرار گیرند (Ren et al., 2022). برای تبدیل شدن این روش‌ها به یک مدل معیار برای توسعه دارو و روش‌های درمانی، فناوری شبه‌اندام نیاز به استفاده از تکنیک‌های پیشرفته لیتوگرافی، میکروفلوئیدیک و مهندسی بافت به منظور کشت و پایش سلول‌ها و همچنین تعاملات آنها با ریزمحیط ساخته شده دارد (Baptista et al., 2022). مدل‌سازی‌هایی که با استفاده از این استراتژی‌ها انجام شده، در مطالعات مختلف فیزیولوژیکی و بررسی اثر داروها و تمایز کنترل‌شده سلول‌های بنیادی دستکاری‌شده برای تولید اندام‌هایی مانند پوست، قلب ضربان‌دار، کبد، ریه، معده، کلیه و مغز موفقیت‌آمیز بوده‌اند (Lazar & Baptista et al., 2022; Hu, ۲۰۲۲). علاوه بر این، تلاش‌های زیادی برای استخراج سلول از بیماران و سپس مهندسی و تولید شبه‌اندام از آن‌ها به منظور ارائه درمان‌های شخصی‌سازی‌شده یا ایجاد مدل‌هایی برای بررسی ویژگی‌های بیماری و نحوه پاسخ آن به داروها به‌طور اختصاصی برای هر فرد انجام شده است (Lazar & Hu, ۲۰۲۲). به عنوان مثال، واتسون و همکاران یک شبه‌اندام روده ای مشتق شده از سلول‌های بنیادی پرتوان انسانی را به موش میزبان پیوند زدند و دریافتند که شبه‌اندام پیوندی به خوبی می‌تواند عملکرد هضم و جذب مواد و پاسخ به هورمون‌های درون‌ریز را نشان دهد (Watson et al., 2014). همچنین مک‌لاند و همکاران نشان دادند که پیوند صفحه شبه‌اندام شبکیه می‌تواند اتصالات سیناپسی گسترده در موش‌های میزبان مبتلا به اختلالات شبکیه ایجاد کند (McLelland et al., 2018). چن و همکاران نیز مشاهده کردند که شبه‌اندام‌های سلول‌های بنیادی ریه طی ۵ ماه می‌توانند منجر به بازسازی کامل مورفولوژی بافت ریه شوند (Chen et al., 2017). وانگ و همکارانش شبه‌اندام‌های مغزی را در مدل موش سگته مغزی کاشتند که با ادغام با مدارهای عصبی مغز توانست منجر به کاهش حجم ناحیه دچار هیپوکسی مغزی و بهبود عملکرد حرکتی عصبی شود (Wang et al., 2020). همچنین به منظور شبیه‌سازی ریزمحیط سلول‌های بنیادی سرطان از سلول‌های بنیادی دستکاری شده به منظور تولید این مدل‌ها و مطالعه روی آن و یافتن درمان برای آن پرداخته شده است (Ren et al., 2022). با این حال، از چالش‌های استفاده از شبه‌اندام‌ها در فازهای بالینی می‌توان به فقدان ساختارهای تبادل مواد مانند عروق، رشد کند و ناهماهنگ با گرادیان غلظت مورفون‌های طبیعی تکوین، و در نتیجه عدم تشکیل کامل عضو اشاره کرد. امروزه تلاش‌ها بر این است که با استفاده از روش‌های نوین مهندسی بافت، مانند شبیه‌سازی ریزمحیط سلول‌ها و برهم‌کنش‌های آن‌ها با یکدیگر، و همچنین کشت سلول‌ها در شبه‌اندام‌های ترکیبی یا کامپوزیتی، بر این مشکلات غلبه شود (Tang et al., 2022).

ایجاد یک توانمندی جدید در سلول بنیادی

یکی از چالش‌های استفاده از سلول‌های بنیادی، مرتبط با روش انتقال سلول بنیادی به بافت موردنظر و حفظ بقای آن در بافت، بدون اثر پاسخ سیستم ایمنی بر این سلول‌ها است (Hoang et al., 2022; Labusca et al., 2018). با این حال، برای دستیابی به بازدهی درمانی مطلوب، افزایش دوز تزریق سلول‌های بنیادی یا افزایش تعداد دفعات تزریق آن‌ها راه‌حل مناسبی به نظر نمی‌رسد، زیرا علاوه بر افزایش هزینه درمان، خطر بروز آمبولی را نیز به دنبال دارد (Li et al., 2022). به همین دلیل یکی از استراتژی‌های جایگزین پیشنهاد شده به منظور دستیابی به بازدهی مطلوب، استفاده از سلول‌های بنیادی دستکاری شده و یا فراورده‌های آنها است (Labusca et al., 2018; Li et al., 2022). در این روش، سلول‌های بنیادی با فعال‌سازی مسیرهای سیگنالینگ خاص و ترشح بیش از معمول سکرئوم‌ها با تعامل با ریزمحیط خود پاسخ ایمنی را تنظیم می‌کنند و به تسریع فرایند بازسازی بافت و یا مبارزه با تومور کمک می‌کنند. همچنین این سلول‌های بنیادی می‌توانند با ترشح فاکتورهای رگرایی مانند VEGF، موجب القای رگرایی شوند و از طرف دیگر می‌توانند با انتقال میتوکندری به سلول‌های بافت آسیب دیده، در ترمیم بافت نقش داشته باشند. علاوه بر این موارد، چندین مطالعه نشان می‌دهد که سلول‌های بنیادی مزانشیمی دستکاری شده، پتانسیل درمانی بهتری نسبت به سلول‌های بنیادی مزانشیمی دستکاری نشده دارند (Almasi, ۲۰۲۲; Y; Salehi et al., 2022; Li et al., 2022; Gao et al., 2022; Zhang et al., 2022). برای مثال، استاینبرگ و همکاران او از سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان ترانسفکت شده با پلاسמיד که به طور موقت Notch-1 را بیان می‌کردند، برای درمان ناحیه دچار انفارکتوس مغز استفاده نمودند که این اقدام به طور قابل توجهی به بهبودی عملکردی پس از سگته مغزی کمک کرد (Steinberg et al., 2016). مطالعات مشابه نیز برای اختلالات کبدی، به افزایش سرعت بازسازی بافت کبد کمک کرده‌اند (Gao et al., 2022).

یکی از استراتژی موجود برای هدفمندسازی اگزوزوم های سلول های بنیادی دستکاری ژنتیکی سلول های بنیادی تولید کننده آنها است (Chen et al., 2022). مزایای استفاده از اگزوزوم های سلول های بنیادی مهندسی شده، شامل تنظیم التهاب، ترمیم آسیب های بافتی و سرکوب تومورها، به خوبی نشان داده شده است (Zhao et al., 2020). برای مثال، از این روش برای مهندسی اگزوزوم های سلول های بنیادی به منظور اتصال به لیگاند پپتیدی کوچک cTnl که پس از انفارکتوس در محل ضایعه تجمع می یابد، استفاده شد. هدف از این کار، بهبود ترمیم بافت پس از انفارکتوس میوکارد بود که منجر به تکثیر سریع تر سلول های عضله قلبی و بهبودی سریع تر عملکرد قلب شد (Wang et al., 2018, Y). همچنین از اگزوزوم های سلول های بنیادی دستکاری شده علیه سلول های سرطانی و همچنین پاسخ های ایمنی حین رد پیوند استفاده شده است (Chen et al., 2021). در ادامه فناوری های کنونی جهت ایجاد دستکاری ژنتیکی در سلول های یوکاریوتی درج شده است.

فناوری های کنونی به منظور دستکاری ژنتیکی سلول های یوکاریوتی

روش های دستکاری تصادفی ژنوم

روش های دستکاری تصادفی ژنوم به طور کلی در مطالعات پیش بالینی و به ندرت مورد استفاده قرار می گیرد. از این مطالعات به عنوان روش های جایگزین در محدودیت های مطالعاتی استفاده می شود و استفاده از آنها در سیستم بالینی منوط به دریافت تاییدیه های متعدد و مجوزهای گوناگونی است که عملاً استفاده از آنها را در بالین غیر ممکن کرده است. استفاده از این روش ها در بالین بسته به تحقیق و توسعه فراوان از سوی دانشمندان می باشد که به اختصار به توضیح این روش ها پرداخته شده است. در جدول ۲ به اختصار به این موارد پرداخته شده است.

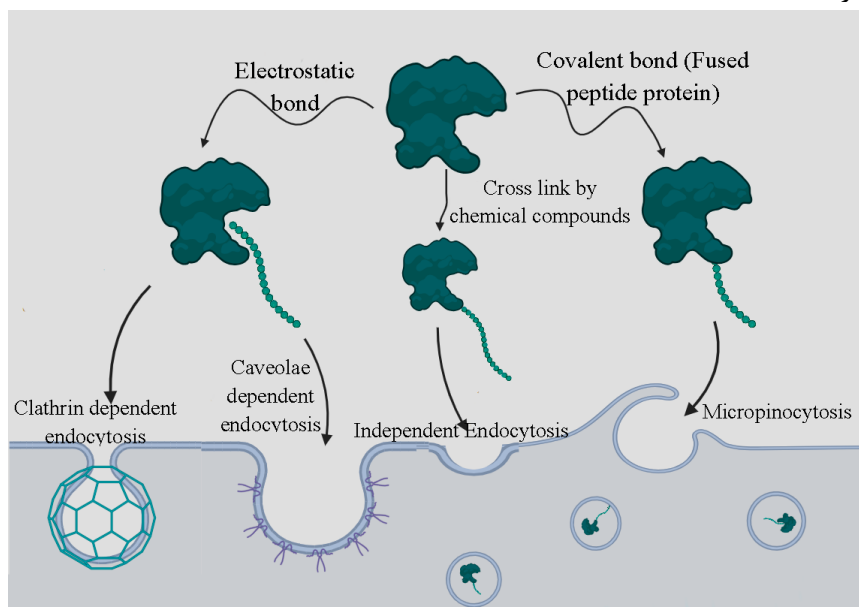
استفاده از امواج

امواج به طور کلی کاربرد های متنوعی در دستکاری ژنوم از تغییرات ساختاری ژنوم تا چگونگی وارد شدن حامل های ژن به سلول داشته اند. در گذشته استفاده از امواج الکترومغناطیسی با طول موج کوتاه در القای تصادفی جهش ها در ژنوم به منظور ایجاد سلول نوترکیب با بازدهی بسیار پایینی صورت می گرفت. امواج الکترومغناطیس مانند UV قابلیت جهش زایی اثبات شده ای دارند به طوریکه می توانند موجب ایجاد انواع ملانوما ی پوستی شوند اما استفاده از این امواج در القای جهش تصادفی در ژنوم سلول های بنیادی انجام نمی شود (Sarasim & Daya-Grosjean, 2005). از این امواج می توان در ایجاد ساختارهای صفحه ماندی که موجب تکثیر بیشتر سلول های بنیادی جنینی انسانی می شود استفاده نمود. امواج صوتی در ارتباط با سلول های بنیادی طیف وسیعی از کاربردها را دارند. استفاده همزمان از فراصوت و لیپوزوم می تواند یک روش موثر در انتقال مواد ژنتیکی به سلول های بنیادی مزانشیمی باشد. در این روش با استفاده از امواج فراصوت ریزحباب های حامل قطعات اسیدنوکلئیک به سمت حفره ایجاد شده در سلول یوکاریوتی هدایت می شوند (Chen et al., 2018). روش های مبتنی بر فراصوت بازدهی بالایی دارند، اما معمولاً با مرگ سلولی زیادی همراه هستند. برای حل مشکل سمیت و افزایش بازدهی انتقال ژن به سلول های بنیادی خون ساز و سلول های پیش ساز آنها، امواج صوتی با فرکانس پایین تر به سمت سلول ها در یک سیستم میکروفلوئیدیک طراحی شده هدایت شدند. این اقدام باعث شد سلول ها به دیواره لوله متصل شوند و تنش برشی در آنها افزایش یابد. نتایج نشان داد که این روش علاوه بر ایجاد منافذ در غشا، موجب افزایش نفوذپذیری غشا و کاهش آسیب به سلول ها می شود (Belling et al., 2020). در مطالعه ای دیگر نشان داده شد که می توان به کمک ریزحباب ها و هدایت امواج فراصوت DNA پلاسمیدی کد کننده BMP-6 را به سلول های مزانشیمی موجود در داریست ترمیمی پیوند زده شده به استخوان، وارد نمود (Bez et al., 2017).

استفاده از مواد شیمیایی

گستره وسیعی از ساختارهای شیمیایی می توانند در ساختار ژنوم تغییر ایجاد کنند و یا اینکه در طی فرآیندهای مهندسی ژنتیک برای انتقال DNA هدف به ژنوم عمل کنند. امروزه با گسترش روش های هدفمند تغییر در ساختار ژنوم، استفاده از این ساختارها جهت انتقال ژن به سلول محدود شده است. پپتیدهای نافذ سلولی (CPP Penetrating Cell Peptides) یکی از این مثال هاست (شکل ۲). با استفاده از این پپتیدها می توان پاسخ ایمنی را کاهش داده و بازدهی انتقال ژن را افزایش داد. علاوه بر این، این پپتیدها قادرند سایر ترکیبات مانند پروتئین ها (آنزیم ها، مورفوزن ها و ...) را وارد سلول کنند. هرچند چگونگی این انتقال هنوز به طور کامل مشخص نشده است، اما مدل های مختلفی برای انتقال مواد به کمک CPP ها پیشنهاد

شده است، از جمله اندوسیتوز با واسطه کدهرین یا caveolae، میکروپینوسیتوز و اندوسیتوز بدون واسطه. CPPها معمولاً پپتیدهایی کوچک‌تر از ۳۰ آمینواسید و غنی از آمینواسیدهای بازی هستند که به دلیل بار مثبت خود به سطح سلول متصل شده و باعث ورود پپتید و محموله به سلول می‌شوند. CPPها می‌توانند به محموله خود از طریق اتصال شیمیایی عرضی (پیوند کووالان) یا پیوندهای الکترواستاتیک متصل شوند. روش اول برای حامل‌های بدون بار و روش دوم برای مولکول‌های باردار مانند پروتئین‌ها یا RNAiها کاربرد دارند (Zimmer & Ruseska, ۲۰۲۰). بازدهی انتقال حامل-CPP به غلظت آن‌ها وابسته است اما می‌توان با تغییر در توالی این پپتیدها بازدهی این انتقال را به شدت تغییر داد، به عنوان مثال اضافه کردن یک موتیف اتصال به هپاران سولفات به توالی این پپتیدها نقش مهمی در افزایش بازدهی انتقال به طیف گسترده‌ای از سلول‌های بنیادی پرتوان دارد (Dixon et al., 2016).



شکل ۲. اتصال پروتئین با CPP و راه‌های ورودی پیشنهادی آن به سلول (Zimmer & Ruseska, ۲۰۲۰)

Figure 2. Protein binding to CPP and its proposed entry routes into the cell (Ruseska & Zimmer, 2020)

روش‌های دستکاری هدفمند ژنوم

استفاده از سیستم *Cre-lox P*

در استفاده از نوکلئازها، ویرایش ژنی در لوکوس خاصی انجام می‌شود و دستکاری‌های غیرهدف در ژنوم کاهش می‌یابد. امروزه استفاده از اندونوکلازهایی که در سلول زنده لوکوس مشخصی از ژنوم را برش می‌دهند، رو به افزایش است. ویرایش ژنومی به کمک فرآیند سلولی به نام Repair (HDR Directed Homology) یا نوترکیبی وابسته به همولوگ‌ها صورت می‌پذیرد. مشکل این روش آنجاست که گاهی شکست دو رشته‌ای (DSB) Break Strand Double در نواحی هدف به شکل کاملاً تصادفی رخ می‌دهد که این بازدهی ویرایش را بسیار کم می‌کند. اما امروزه به کمک گروهی از اندونوکلازها می‌توان به صورت کاملاً اختصاصی در توالی هدف شکست دو رشته‌ای ایجاد نمود تا بازدهی این روش افزایش یابد. ZFN، CRISPR و TALEN سه اندونوکلاز اصلی این روش در پستانداران هستند. از آنجایی که HDR فقط طی تقسیم سلولی رخ می‌دهد و ویرایش ژنی را در سلول‌های تمایز یافته نهایی ناممکن می‌کند، در سلول‌های خارج از چرخه تقسیم به جای فرآیند ترمیمی HDR از فرآیند دیگری به نام پیوست انتهای غیرهمولوگ یا Joining (NHEJ End Homologous Non استفاده می‌شود که فرآیندی مستعد خطا است که از رشته‌ی همولوگ برای ترمیم استفاده نمی‌کند (Bai, ۲۰۲۰). نوع دیگر اندونوکلازهای موجود در ویرایش ژنی مگانوکلازها هستند که به شکل طبیعی به شکل یک عنصر متحرک ژنتیکی شبیه به ترانسپوزون‌ها یافت می‌شوند و می‌توانند موجب ایجاد DSB در DNA شوند. مزیت اصلی این آنزیم‌ها در جایگاه شناسایی طولی آنهاست، جایگاه شناسایی آنها بین ۱۴-۴۰ نوکلئوتید است و به همین خاطر اختصاصیت بسیار بالایی دارند. این پروتئین‌ها معمولاً یک یا دو موتیف لوسین-آلانین-گلیسین-لوسین-ایزولوسین-آسپارات-آلانین-آسپارات-گلیسین برای

شکست DNA پالیندرومی در جایگاه شناسایی خود دارند و در دو مدل اصلی I-SceI و I-CreI یافت می شوند. مشکل اساسی آنها در تنوع پایین آن هاست که در کنار اختصاصیت بالای آن ها استفاده از آن را در مطالعات و مهندسی آن ها هزینه بر می کند (Zheng et al., 2020). در جدول ۳ برخی از نوکلئازها با هم مقایسه شده اند. سیستم Cre-lox P از معمول ترین روش های دستورزی ژنوم پستانداران است که معمولاً در تحقیقات و مطالعات پیش بالینی استفاده می شود. این روش در سلول های تمایز یافته نهایی نیز به تعدد استفاده می شود و به کمک آن می توان در محل (سلول مشخصی) و زمان (مرحله ی خاصی از تکوین جاندار) مشخصی دستورزی ژنومی را صورت داد. این سیستم معمولاً با جدا شدن قطعه خاصی از DNA ژن را مهار می کند. به کمک آنزیم Cre (cyclization recombinase) دو توالی یکسان از DNA به نام loxP locus of X-) loxP (over P1 شناسایی میشود و DNA بین این دو ناحیه خمیده شده (فرآیند floxing) و از ساختار مستقیم DNA جدا می شود که بیان ژن از روی آن را ناممکن می کند. هر جایگاه loxP از ۳۴ باز ساخته شده که از دو توالی پالیندرومی در طرفین و یک مرکز ۸ بازی تشکیل شده است. برای استفاده از سیستم Cre-lox P در ویرایش ژنومی کافی است دو طرف ژن مورد نظر قطعات loxP وارد شده و ژن Cre نیز در سلول بیان شود. بیان Cre تحت پروموتور خاصی است که در زمان و سلول خاصی بیان می شود. برای مثال در سلول های نورونی هیپوکامپ در مرحله خاصی از تکوین جاندار این آنزیم بیان می شود و نو ترکیبی را صورت می دهد (Kim et al., 2018). علاوه بر این، می توان این سیستم را تحت کنترل های خارج سلولی نیز قرار دارد. به عنوان مثال در مطالعه ای نور فروسرخ به عنوان این فاکتور خارجی برای فعال کردن آنزیم های شبه Cre استفاده شده است تا بیان ژن خاصی را در سلول های اولیه موشی هدف قرار دهد (Kasatkina et al., 2022). به کمک Cre-lox P روش به نام بازآرایی و اصلاح کروموزوم مصنوعی به واسطه ی فرآیند تکاملی با واسطه loxP توسعه داده شده است که موجب ایجاد فنوتیپ های جدید و افزایش بازدهی صنعتی در سلول های یوکاریوتی می شود. در این روش در پایین دست تمامی ژن های غیرضروری (non-canonical) یک توالی lox P اضافه می شود و سپس به کمک بیان کنترل شده آنزیم Cre جمعیتی از سلول ها که به شکل تصادفی دچار وارونگی، جابجایی و حذف ژنی شده اند به وجود می آید. در آخر فنوتیپ هدف توسط کشت های افتراقی غربال می شود. گرچه بازدهی این روش پایین است اما شکل کروماتین، پلئیدی و فراوانی آنزیم Cre در چگونگی این فرایند موثر است و با تغییر این پارامترها می توان بازدهی این روش را نیز افزایش داد (Zhang et al., 2022).

جدول ۲. چند روش دستکاری تصادفی ژنوم در سلول های بنیادی

Table 2. Several methods of random genome manipulation in stem cells

منبع	مکانیسم دستکاری	سلول	هدف مطالعه
& Daya-Grosjean) (Sarasin, ۲۰۰۵)	موج UV	سلول بنیادی جنینی انسانی	تولید صفحات کشت برای تکثیر بیشتر
(Bez et al., 2017)	امواج صوتی	سلول بنیادی مزانشیمی	وارد کردن ژن BMP-4
(Dixon et al., 2016)	موتیف اتصال به هپاران سولفات در پپتیدهای نافذ سلولی CPP	انواعی از سلول های بنیادی پرتوان	انتقال پروتئین به داخل سلول
(Brunet et al., 2009)	نوکلئاز ZFN	سلول بنیادی سرطانی	القای جابه جایی کروموزومی
(Walters et al., 2021)	نوکلئاز ZFN	بیماران سلول بنیادی خون ساز مغز استخوان	افزایش تولید هموگلوبین در
(Fleischer et al., 2020)	نوکلئاز TALEN	شبه اندام های ساخته شده از iPS	ویرایش ژنومی ژن CFTR
Choi et al., 2023;) (Madrigal et al., 2023)	CRISPR-Cas9	به سلول بنیادی پرتوان انسانی	تمایز سلول های بنیادی پرتوان انسانی EOMES ژن واسطه ژن

استفاده از ZFN

این اندونوکلیئازها می توانند با ایجاد DSB در DNA، شرایط ایجاد HDR و ویرایش ژنی به کمک نسخه های صحیح وارد شده یا NHEJ و خاموش شدن ژن مورد نظر را فراهم کنند. ZFN یا zinc finger nuclease اندونوکلیئاز هایی مصنوعی

هستند که از دو بخش اتصال به DNA و اندونوکلازی تشکیل شده‌اند. بخش اول از موتیف‌های انگشت روی (ZF) و بخش دوم از یک آنزیم محدودکننده مانند FokI تشکیل شده است. دومین اتصال به DNA به کمک چندین روش مهندسی شده ساخته می‌شود. این دومین اختصاصیت ZFN را در اتصال به توالی مورد نظر ایجاد می‌کند و معمولاً از واحدها (modules) ساخته شده است که از اتصال چندین ZF ساخته می‌شوند. این واحدها توسط سه روش ساخته می‌شوند: روش اول OPEN است که به کمک two-hybrid system از مجموعه‌ای از اتصالات رندوم بین ZFها ترکیب مناسب برای اتصال به توالی هدف انتخاب می‌شود. هر ZF به یک توالی سه نوکلئوتیدی متصل می‌شود و معمولاً واحد نهایی ۳ تا ۶ موتیف ZF دارد. روش دوم شبیه به روش OPEN بوده اما با ایجاد کتابخانه‌های ژنومی متفاوت صورت می‌گیرد. روش سوم از اتصالات تصادفی بین چندین واحد برای رسیدن به ترکیبی که بیشترین تمایل اتصال با توالی هدف دارد استفاده می‌شود. دومین اندونوکلازی ZFN معمولاً به شکل دایمر فعال می‌شود و هر بخش آن به یک واحد متصل شونده به DNA متصل می‌شوند و تنها در صورتی فعال می‌شوند که هر واحد به DNA متناظر خود متصل شده باشد. حتی بازدهی برش دومین نوکلئازی نیز میتواند به شکل مهندسی شده افزایش یابد (Guo et al., 2010). پروتئین‌های دارای موتیف ZFN که به شکل طبیعی در سلول‌های انسانی یافت می‌شوند مانند ZFN384 که نقش مهمی در ایجاد شکست دو رشته‌ای و فراخوانی فرآیند NHEJ دارند (Singh et al., 2021) که در نهایت منجر به حذف چند نوکلئوتید و خاموش شدن ژن هدف می‌شود (Chandrasegaran, 2017). به عنوان مثال در مطالعه‌ای که فاز بالینی خود را گذارنده است، نشان داده شده که می‌توان ژن خاصی را که مهار آن به افزایش تولید هموگلوبین در سلول‌های بنیادی خون‌ساز می‌انجامد را توسط ZFN خاموش کرد و از این سلول‌ها برای انتقال خون به بیماران دارای تالاسمی بتا استفاده کرد (Walters et al., 2021). از این ZFNها برای جابجایی کروموزومی در سلول‌های بنیادی به منظور مطالعه روی سلول‌های بنیادی سرطانی متاستازی استفاده می‌شود. با همه این تفاسیر ZFN مقابل دو نوکلئاز دیگر در ویرایش ژنی اختصاصیت کمتری دارد (Brunet et al., 2009).

استفاده از TALEN

TALEN نیز مانند ZFN از دو بخش نوکلئازی و دومین متصل شونده به DNA تشکیل شده است. بخش دوم که به اختصار TALE نامیده می‌شود در انتهای آمین خود به DNA متصل می‌شود. در حالی که بخش وسطی آن که از چندین توالی تکراری آمینواسیدی ساخته شده است، مسئول اتصال اختصاصی به DNA است. نوکلئوتید ۱۲ و ۱۳ هر تکرار به DNA اتصال می‌یابد و می‌توان این تکرارها را به نحوی طراحی کرد که با اختصاصیت بالایی به DNA متصل شود. آن کربوکسیل این پروتئین نیز معمولاً به خاطر اتصال ناحیه نوکلئازی به صورت هدفمند کوتاه می‌شود. TALEN با مکانیسم منحصر به فردی به دور DNA می‌پیچد و با سرعت بالایی توالی مورد نظر را پیدا می‌کند. این ساختارها می‌توانند توانایی تمایز یک نوکلئوتید و حتی متیلاسیون نوکلئوتیدها را نیز داشته باشد. در حالی که بسته به نوع طراحی می‌توانند در اتصال به یک تا چهار عدم تطابق (mismatch) در نوکلئوتیدها منعطف باشند. مکانیسم عملکردی آن‌ها شبیه دیگر نوکلئازها ایجاد DSB است اما برخلاف ZFN معمولاً در اثر عملکرد این نوکلئازها حذف نوکلئوتیدی رخ می‌دهد (Sander & Joung, 2013; Kim & Kim, 2014). مثلاً در مطالعه‌ای که به منظور درمان لوکمی انجام شده بود از این ساختار به منظور تخریب ژن‌های CCR5 و NTF3 استفاده شد. این ساختارها به منظور ویرایش ژنی سرطان‌های مختلف استفاده می‌شوند (Li et al., 2020). برای مثال در مطالعه‌ای توانستند شبه اندام‌های ساخته شده از iPS بیماران دارای سیستمیک فیبروز ۱ را با کمک TALEN در ژن CFTR ویرایش کنند (Fleischer et al., 2020).

استفاده از CRISPR

سیستم‌های ویرایش ژنی مبتنی بر RNA مانند سیستم CRISPR می‌توانند با دقت و اختصاصیت بسیار بالایی در ویرایش ژنی عمل کنند. این روش که در حالت طبیعی در واقع نوعی دفاع باکتریایی در مقابل باکتریوفاژ است می‌تواند به عنوان یک ابزار قدرتمند در ویرایش ژنی استفاده شود. در این روش sgRNA که خود متشکل از دو RNA است به همراه یک آنزیم ویرایش ژنی به درون سلول منتقل می‌شود. در مجموع این سیستم اختصاصیت و بازدهی بالایی برای ویرایش ژنی دارد. به عنوان مثال Cas9 که یک آنزیم اندونوکلاز است می‌تواند طی مکانیسم‌های HDR و NHEJ موجب ویرایش ژنی شود. در حالی که dCas9 که همان Cas9 بدون فعالیت اندونوکلازی است به عنوان مهار کننده بیان ژن عمل می‌کند.

آنزیم های ویرایشگر بازی (آدنین و سیتوزین) مثل دآمینازها نیز می توانند به عنوان یک پروتئین مزدوج شده با کمپلکس Cas9 و sgRNA بدون عملکرد همراه شوند و ویرایش تک نوکلئوتیدی را ممکن کنند. Cas9n موجب برش تک رشته ای DNA و Cas12a موجب ایجاد انتهای چسپنده در برش دورشته ای خود می شود. استفاده از این سیستم در درمان بیماری های ژنتیکی با اصلاح سلول های بنیادی روده بیماران سیستمیک فیبروز در فاز بالینی شروع شد (Li et al., 2023; T). علاوه بر این موارد از این سیستم ها در حوزه شناخت مکانیسم ها و اصلاح ژنوم سلول های بنیادی نیز استفاده می شود. به عنوان مثال در دو مطالعه محققان به کمک این ساختارها توانستند به نقش Sox15 در حفظ قابلیت پرتوانی و تمایز نورونی و نقش ژن EOMES در تمایز سلول های بنیادی پرتوان انسانی به اندودرم آگاه شوند (Choi et al., 2023; Madrigal et al., 2023).

جدول ۳. انواع نوکلئازها و مزایا و معایب آن

Table 3. Types of nucleases and their advantages and disadvantages

منبع	توانایی ویرایش ژنتیکی	توانایی ویرایش ژنی	توانایی سرکوب ژنی	عملکرد اختصاصی	نوکلئاز
Singh et al., (2021)	ندارد	القای ویرایش به کمک ژن همولوگ	دارد	ضعیف	ZFN
Sander & Joung, Li et al., ۲۰۱۳ (2020)	ندارد	القای ویرایش به کمک ژن همولوگ	دارد	بسته به نوع طراحی اختصاصیت بسیار بالا	TALEN
Li et al., 2023; T. (et al., 2022 Xi)	دارد	ویرایش دقیق به کمک RNA راهنما	دارد	اختصاصیت بسیار بالا	CRISPR

دستکاری ژنتیکی سلول های بنیادی

انتقال ژن به سلول های بنیادی با استفاده از روشهای زیستی، روشهای شیمیایی و روشهای فیزیکی انجام می شود. هریک از روشها و مزایا و چالشهای آنها در ادامه مورد بحث قرار می گیرد (Tabar et al., 2015).

روش های زیستی

به صورت کلی روش های زیستی اغلب شامل استفاده از رتروویروس، آدنوویروس یا ویروس های وابسته به آدنوویروس ها می باشد (Psatha et al., 2022). هر یک از این ناقلین مزایا و معایب خود را دارند و با توجه به تفاوت های آنها، می توان بهترین گزینه را برای انتقال ماده ژنتیکی مدنظر انتخاب کرد. برای مثال نشان داده شده است که از هر سه نوع ناقل ویروسی می توان به منظور ورود کارآمد ژن مدنظر به سلول های بنیادی اسپرماتوگونی استفاده نمود در حالیکه ویروس های وابسته به آدنوویروس ها و رتروویروس ها به دلیل توانایی وارد کردن ژن مدنظر به ژنوم سلول میزبان و ماندگاری بیان بالاتری نسبت به سایر ناقلین دارند (Kanatsu-Shinohara & Nowakowski et al., 2013; Shinohara, ۲۰۲۰). در جدول ۴ به صورت خلاصه مقایسه ای میان کارایی عملکردی استفاده از ناقلین ویروسی و ناقلین غیرویروسی (مانند لیپوزومها و یا دندیرمها) آورده شده است.

جدول ۴. مقایسه ویژگی های عملکردی ناقلین ویروسی و غیرویروسی

Table 4. Comparison of functional characteristics of viral and non-viral vectors

منبع	ناقلین ویروسی	ناقلین غیرویروسی (لیپوزومها و دندیرمها)
et Psatha (al., 2022)	ظرفیت بارگیری کم به خصوص در ویروس های وابسته به آدنوویروس	ظرفیت بارگیری بالاتر
	ایمنی زایی بالا و تحریک سیستم ایمنی هورمونی و سلولی	ایمنی زایی کمتر
	احتمال بالای تخریب ژن ورودی به دلیل افزایش فعالیت سیستم ایمنی	احتمال کمتر تخریب ژن ورودی
	احتمال ایجاد سرطان به دلیل ورود به ژنوم میزبان	احتمال بسیار کم سرطان زایی به دلیل عدم ورود به ژنوم میزبان
Lim et al., 2010; Zhao et al., 2022	کارایی انتقال بالاتر	کارایی انتقال پایین تر
Li et al., X.	هزینه تهیه بالا	هزینه تهیه معقول

(2023)		
--------	--	--

استفاده از ناقلین زیستی دارای معایبی نیز هست که استفاده از آن‌ها را در کلینیک با چالش‌هایی روبه‌رو می‌کند. برای مثال در استفاده از ناقل ویروسی از نوع آدنوویروسی به این دلیل که این نوع ویروس‌ها جزو ویروس‌های دارای توانایی ایجاد بیماری و پاسخ ایمنی در انسان هستند؛ ممکن است پاسخ ایمنی شدیدی ایجاد کنند که در نسل‌های جدید این نوع ناقل، این مشکل تا حد زیادی برطرف شده است (Li et al., 2015). یکی دیگر از چالش‌های مهم در استفاده از این ناقل‌ها، توانایی آن‌ها در ورود به ژنوم در ناقل‌هایی مثل ویروس‌های وابسته به آدنوویروس و لنتی ویروس‌هاست. به دلیل آن‌که با ورود آن‌ها به ژنوم احتمال جهش‌های ناخواسته افزایش می‌یابد، بنابراین استفاده از آن‌ها در بالین توصیه نمی‌شود (Li et al., 2015). قیمت بالا نیز یکی از مسائل و چالش‌های تهیه این وکتورهاست که در بالین به علت تحمیل هزینه بالا، بیمار را با مشکلاتی مواجه می‌کند (X. Li et al., 2023).

آدنوویروس‌ها

آدنوویروس‌ها، ویروس‌های بدون غشاء با سایز متوسط و حدود ۹۰ الی ۱۰۰ نانومتر هستند که کپسید ۲۰ وجهی دارند و DNA دورشته‌ای در آن قرار گرفته است (Nowakowski et al., 2013; Paolini Sguazzi et al., 2021; Psatha et al., 2022). آدنوویروس‌ها ۵۷ سروتیپ انسانی دارند که می‌توان آن‌ها را در ۷ گروه a تا g تقسیم‌بندی کرد. بیشتر آن‌ها از جمله گروه c از طریق پروتئین‌های سطحی خود به گیرنده کوکساکسی روی سلول میزبان اتصال می‌یابند و از این طریق وارد سلول هدف می‌شوند (Lieber & Li, ۲۰۱۹; Psatha et al., 2022). سلول‌های بنیادی خونساز مغز استخوان به دلیل اینکه گیرنده کوکساکسی کافی برای اتصال به این ویروس را ندارند به صورت مؤثر با آدنوویروس آلوده نمی‌شوند (Lieber & Li, ۲۰۱۹; Nowakowski et al., 2013). درحالی‌که آدنوویروس‌های گروه b به دلیل داشتن نوع دیگری از گیرنده‌ها، می‌توانند به شیوه مؤثری، این سلول‌ها را آلوده کنند (Psatha et al., 2022). از مزایا و معایب استفاده از آدنوویروس‌ها می‌توان به جدول ۵ اشاره کرد.

جدول ۵. مزایا و معایب استفاده از ناقلین آدنوویروسی در دستکاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی مختص بافت

Table 5. Advantages and disadvantages of using adenoviral vectors in the genetic manipulation of tissue-specific stem cells

سلول بنیادی	مزایا	منبع	معایب	منبع
سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان	عدم ورود به ژنوم و کاهش احتمال سرطان‌زایی	(Lieber & Li, ۲۰۱۹; et al., 2013 Nowakowski)	بیان‌گذار به دلیل عدم ورود به ژنوم	(Lieber & Li, ۲۰۱۹; et al., 2013 Nowakowski)
سلول بنیادی مزانشیمی مغز استخوان	هر دو نوع سلول تقسیم‌شونده و غیرتقسیم‌شونده را آلوده می‌کنند.	(Lieber & Li, ۲۰۱۹)	تحریک شدید سیستم ایمنی اکتسابی	(Lieber & Li, ۲۰۱۹; et al., 2013 Nowakowski)

از مهندسی آدنوویروس‌ها سه نسل ناقلین آدنوویروسی ایجاد شده است. اکثر ژن‌های آدنوویروس‌های نسل سوم حذف شده‌اند و ظرفیت حمل آن‌ها تا ۳۸ کیلو جفت باز افزایش یافته است و همچنین این حذف‌ها منجر به کاهش ایمنی زایی این ناقلین نیز شده است (Nowakowski et al., 2013).

ویروس‌های وابسته به آدنوویروس (AAV)

این ویروس‌ها جزو ویروس‌های غیربیماری‌زا هستند و در حضور ویروس‌های کمکی مثل آدنوویروس می‌توانند تکثیر شوند و به صورت کلی در عدم حضور این ویروس‌های کمکی ژنوم آن‌ها وارد بخش خاصی از کروموزوم شماره ۱۹ به نام AAVS1 می‌شود (Nowakowski et al., 2013). این ویروس‌ها اندازه‌ای در حدود ۲۳ نانومتر دارند و ژنوم آن‌ها DNA خطی تک رشته‌ای است (Paolini Sguazzi et al., 2021). در نوع نوترکیب این ویروس‌ها ژن‌های cap و rep حذف شده‌اند و به جای آن‌ها به ترتیب راه‌انداز مخصوص بافت هدف، ژن مورد نظر، ژن گزارشگر و توالی پلی آدنیلایسون انتهایی قرار می‌گیرد (Cho et al., 2022). از مزایا و معایب ناقلین AAV می‌توان به جدول زیر اشاره کرد.

جدول ۶. مزایا و معایب استفاده از ناقلین AAV در دستکاری ژنتیکی سلول‌های بنیادی مختص بافت

Table 6. Advantages and disadvantages of using AAV vectors in the genetic manipulation of tissue-specific stem cells

منبع	مزایا	معایب	منبع
Paolini) Sguazzi et al., 2021 et al., Psatha et al., (2022	ایمونی زایی کم	طول کوتاه ژنوم و ظرفیت کم انتقال	Cho et) (al., 2022
Paolini) Sguazzi et al., 2021 et al., Psatha et al., (2022	توانایی آلوده کردن هر دو نوع سلول تقسیم شونده و غیر تقسیم شونده	اندازه محدود کپسید و ظرفیت انتقال کم	et Psatha) (al., 2022

این ناقلین نوترکیب توانایی انتقال ژن به صورت مؤثر به سلول های بنیادی مزانشیمی خون بند ناف و مغز استخوان را دارند (Nowakowski et al., 2013). از این ناقلین به صورت گسترده در درمان و انتقال ژن به سلول های بنیادی خونساز استفاده می شود. برای مثال از AAV6 به صورت خارج تنی برای انتقال ژن به سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی استفاده شده است و کارایی بالای آن نشان داده شده است (Psatha et al., 2022).

رتروویروس ها

رتروویروس ها RNA دو رشته ای، رونوشت بردار معکوس، پوشش لیپیدی و گیرنده های پروتئینی دارند. این ویروس ها عموماً تمایلی به آلوده کردن سلول های خارج از چرخه تقسیم مانند نورون ها و میوسیت ها ندارند. از آنجایی که ژنوم این ویروس ها وارد ژنوم میزبان می شود و البته جایگاه خاصی برای ورود ندارند می توانند سبب ایجاد سرطان شوند (Nowakowski et al., 2013).

لنتی ویروس ها یکی از اعضای خانواده رتروویروس ها هستند که می توانند تا ۹ کیلو جفت باز را نیز منتقل کنند (Nowakowski et al., 2013). همچنین این ویروس ها می توانند سلول های بنیادی و غیرتقسیم شونده را نیز آلوده کنند (Kanatsu-Shinohara & Paolini Sguazzi et al., 2021; Shinohara, ۲۰۲۰). لنتی ویروس ها روش های معیار انتقال ژن به سلول های بنیادی خونی به صورت خارج تنی هستند و به دلیل توانایی در انتقال ژن به سلول های غیرتقسیم شونده و الگوی امن ورود به سلول میزبان با کمترین احتمال سرطان زایی، نسبت به گاما رتروویروس ها مزیت دارند (Nowakowski et al., 2013; Psatha et al., 2022). در واقع با تغییر ژن اینتگراز آنها می توان مانع ورود ژنوم این ویروس ها به ژنوم سلول میزبان شد که در این صورت ژنوم ویروس به صورت اپی زومی باقی می ماند و در نتیجه نمی تواند باعث ایجاد سرطان شود (Nowakowski et al., 2013). در سلول های بنیادی خونساز و سلول های بنیادی مزانشیمی ژن های این ویروس ها به صورت طولانی مدت بیان نمی شوند که احتمالاً به دلیل متیله شدن این ژن ها پس از ورود به ژنوم سلول است (Nowakowski et al., 2013).

روش های شیمیایی

این روش ها عبارتند از استفاده از پلیمرها و لیپیدهای کاتیونی که در ادامه به تفصیل در مورد هر یک از این روش ها پرداخته خواهد شد (Lim et al., 2010).

لیپیدهای کاتیونی

انتقال از طریق لیپوفکشن یکی از پرتعدادترین روش های انتقال ژن به روش شیمیایی است که به وسیله لیپیدهای کاتیونی انجام می گیرد (Jahanafrooz et al., 2023). این روش انتقال قطعه DNA به این صورت است که سر مثبت این لیپیدها با بار منفی فسفات های DNA ساختاری به نام لیپوپلکس ایجاد می کنند و سپس به گلیکوپروتئین های سطح سلول متصل می شوند که باعث جذب راحت تر آنها می شود. سپس میان فسفولیپیدهایی که به صورت دو لایه تجمع یافته اند قرار می گیرند و وارد سلول می شوند. وجود ترکیبات لیپیدی دیگر در ساختار لیپوزوم مانند لیپیدهای یونیزه شونده نیز سبب

جذب یون‌های پروتونی داخل اندوزوم به خود و عدم تخریب لیپیدهای کاتیونی در اندوزوم می‌شوند (Nowakowski et al., 2004; Tinsley et al., 2019; Rai et al., 2021; Paolini Sguazzi et al., 2013). مزایای استفاده از لیپیدهای کاتیونی این است که در مقایسه با سایر روش‌های انتقال غیرزیستی راحت‌تر تولید می‌شوند و کارایی انتقال بالاتری دارند. علاوه بر این برخلاف روش‌های بیولوژیکی مثل روش‌های ویروسی، از نظر تجاری در دسترس‌تر هستند (Cui et al., 2018).

از مثال‌های استفاده از این ترکیبات برای انتقال ژن به سلول‌های بنیادی می‌توان به بهره‌گیری از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ به منظور وارد کردن ژن foxa2 به سلول بنیادی مزانشیمی اشاره کرد. از لیپوفکشن همچنین به منظور وارد کردن siRNAها و miR-181a به سلول بنیادی مزانشیمی نیز استفاده شده است. اما به صورت کلی انواع خاصی از لیپوزوم‌های کاتیونی مانند ایمنولیپوزوم‌ها وجود دارند که در انتقال ژن به یک سلول بنیادی خاص به صورت اختصاصی و هدفمند مورد استفاده قرار می‌گیرند (Ziraksaz et al., 2013).

پلیمرهای کاتیونی

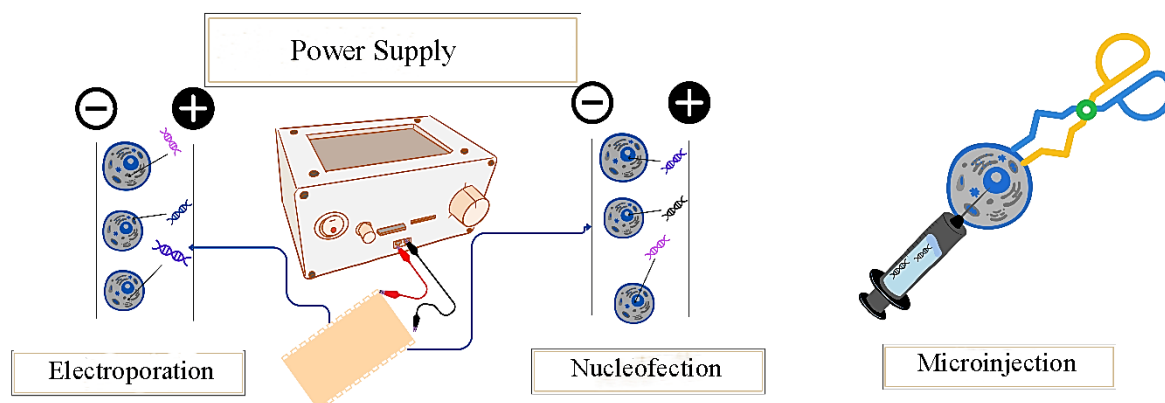
این ناقلین با استفاده از بار مثبت خود، ژن را به سلول هدف منتقل می‌کنند. در این روش حامل‌های کاتیونی با DNA کمپلکس فشرده‌ای تشکیل می‌دهند. سپس در اثر اتصال به مولکول‌های سطحی سلول‌ها از طریق اندوسیتوز وارد سیتوپلاسم می‌شوند. این کمپلکس فشرده مانع عملکرد نوکلئازها روی قطعه DNA می‌شود؛ اما در اکثر موارد غشای هسته اجازه ورود این ترکیبات را نمی‌دهد. به همین دلیل استفاده از mRNA که برای عملکرد خود نیازی به ورود به هسته ندارد پیشنهاد می‌شود (Bakhshandeh et al., 2012; Rejman et al., 2010). این ناقلین به دو دسته سنتزی و طبیعی تقسیم می‌شوند. در حالت کلی پلیمرهای کاتیونی طبیعی مانند کیتوزان، دکستران و ژلاتین سمی نیستند و تجزیه پذیر هستند؛ در حالی که انواع سنتزی آن مانند پلی ال لایزین، پلی ال اورنیتین، پلی اتیلن ایمین، دی اتیل آمینو متیل دکستران و درخت‌سان‌های پلی آمیدوآمینی معمولاً تجزیه ناپذیر هستند و سمیت بالاتری دارند (Di Gioia et al., 2014; Tinsley et al., 2004).

روش‌های متنوعی به منظور بهینه‌سازی این ترکیبات کاتیونی انجام می‌شود. برای مثال: از ترکیب پلیمرهای کاتیونی با PEG ترکیبات پایدارتری حاصل می‌شود (Yang et al., 2023). همچنین پلیمرهای کاتیونی برخلاف لیپیدهای کاتیونی دم هیدروفوب ندارند. بنابراین پس از اندوسیتوز نمی‌توانند از اندوزوم فرار کنند. به همین دلیل امروزه انواعی از این پلیمرها طراحی شده‌اند که قابلیت فرار از اندوزوم را دارند. این پلیمرها عبارتند از درخت‌سان‌های پلی آمیدوآمینی، پلی اتیلن ایمین و پلی آمیدوآمین.

مطالعات به دلیل بازدهی بالا، استفاده از پلیمرهای کاتیونی سنتزی مانند پلی اتیلن آمین و پلی ال لایزین به منظور انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مزانشیمی را مؤثر دانسته‌اند (Di Gioia et al., 2014; Nowakowski et al., 2013). مهم‌ترین مشکل پلیمرهای کاتیونی سمیت بالای آنها و به هم زدن انسجام غشا می‌باشد (Paolini Sguazzi et al., 2021). از مزیت‌های استفاده از پلیمرها کاتیونی در مقایسه با لیپیدهای کاتیونی می‌توان به قابلیت دستورزی آنها و پایداری بیشتر اشاره کرد. همچنین به منظور کاهش سمیت این ترکیبات می‌توان وزن مولکولی آنها را کاهش داد. علاوه بر این پلیمرهای طبیعی مانند کیتوزان، ایمنی‌زایی و سمیت کمتری دارند و تجزیه پذیر هستند (Cai et al., 2023).

روش‌های فیزیکی

به طور کلی این روش‌ها عبارتند از الکتروپوریشن، نوکلئوفکشن و ریزتزریقی که در ادامه به تفصیل به توضیح هر یک از این موارد پرداخته خواهد شد (شکل ۳)



شکل ۳. شکل شماتیک مربوط به سه روش متفاوت ریز تزریق، نوکلئوفکشن و الکتروپوریشن در انتقال ژن به سلول بنیادی (Nowakowski et al., 2013)

Figure 3. Schematic diagram of three different methods of microinjection, nucleofection, and electroporation in gene transfer to stem cells (Nowakowski et al., 2013)

الکتروپوریشن

نام‌های دیگر این روش، الکترواینجکشن و الکتروترانسفر است. در این روش در نتیجه اختلاف پتانسیل الکتریکی و ایجاد میدان در دو طرف غشا به صورت موقت منافذ ایجاد می‌شود که با استفاده از آنها مواد می‌توانند از غشا عبور کنند (Nowakowski et al., 2013). کارایی این روش به اندازه سلول، میزان تکثیر آن و دما بستگی دارد. الکتروپوریشن کاربردهای زیادی در انتقال ژن به سلول‌های بنیادی مزانشیمی و چربی دارد. اما یکی از اصلی‌ترین معایب آن نرخ بالای مرگ سلولی است. به هر حال هنوز یافته‌های متناقض زیادی در مورد بازدهی انتقال ژن و اثرگذاری این روش بر بقای سلول‌های بنیادی وجود دارد که نشان‌دهنده وجود متغیرهای مؤثر متعدد در کارایی این روش است (جدول ۷) (Nowakowski et al., 2013; Tabar et al., 2015).

جدول ۷. یافته‌های متغیر از کارایی روش الکتروپوریشن در انتقال ماده ژنتیکی به سلول‌های بنیادی

Table 7. Variable findings on the effectiveness of electroporation in transferring genetic material to stem cells

منبع	کارایی ورود به سلول	نوع سلول بنیادی
(۲۰۱۹, al et Hamann)	80%	سلول‌های بنیادی مزانشیمی مشتق از بند ناف انسان
(۲۰۱۵, al et Tabar)	17%	سلول‌های بنیادی جنینی انسان
(۲۰۱۰, al et Cao)	2.1%	سلول‌های بنیادی جنینی انسان

نوکلئوفکشن

نوکلئوفکشن نیز در واقع یک روش فیزیکی بر پایه الکتروپوریشن است که منافذ ریزی در غشای سلول ایجاد می‌کند (Agostini et al., 2021; Nowakowski et al., 2013). ریز تزریقی اولین بار توسط شرکت Amaxa ابداع شد. در این روش در واقع ژن مورد نظر به طور مستقیم وارد هسته می‌شود (Nowakowski et al., 2013). این راهکار انتقال در مورد سلول بنیادی مزانشیمی نسبت به سایر روش‌های انتقال مثل الکتروپوریشن و میکروپوریشن مؤثرتر است و تغییری در ویژگی‌های سلول بنیادی مزانشیمی ایجاد نمی‌کند (Nowakowski et al., 2013). از این روش به منظور انتقال miRNA نیز

استفاده می‌شود (Nowakowski et al., 2013). پیش از این، از این راهکار به منظور ایجاد تغییر در سلول‌های بنیادی مزانشیمی بافتی استفاده شده است که منجر به تقویت عملکرد آنها شده است (Agostini et al., 2021).
ریزنرزی

ریزنرزی مستقیم‌ترین روش برای انتقال پربازده درشت‌مولکول‌ها مانند پپتیدها، DNA، RNA و آنتی‌بادی‌ها به تک سلول است (Matsuoka et al., 2005). این روش به دلیل دقت بالای انتقال ژن به داخل هسته و سیتوپلاسم تنها یک سلول بازدهی بالایی دارد و منجر به ایجاد سمیت سلولی نمی‌شود (Nowakowski et al., 2013). از محدودیت‌های این روش زمان‌بر بودن آن به منظور دستکاری تعداد زیاد سلول است. علاوه بر آن، این روش به مهارت بالایی نیاز دارد. با این حال اتوماسیون این روش موجب کاهش زمان انجام آن و افزایش دقت می‌شود. در این روش‌ها به منظور شناسایی سلول‌هایی که به درستی دچار دستورزی شده‌اند، از تزریق همزمان رنگ قرمز دکستران تگزاس یا پروتئین فلورسنت استفاده می‌شود. روش‌های خودکار پیش از این برای سلول‌های بنیادی موشی مورد استفاده قرار گرفته‌اند (Matsuoka et al., 2005). به منظور دستکاری سلول‌های بنیادی خونساز، در روش ریزنرزی آنها را در ظرف کشت پوشیده شده با ماتریکس خارج سلولی به صورت چسبنده کشت می‌دهند و از سوزن‌های با نوک حدود ۰/۲ میکرومتری استفاده می‌کنند که آسیب کمتری به سلول وارد می‌کند (Nowakowski et al., 2013).

روش‌های بهینه‌سازی دستکاری ژنتیکی و راه‌های کاهش دستکاری ناخواسته

با وجود پیشرفت‌های حاصل در تکامل فناوری‌های دستکاری ژنتیکی و بهینه‌سازی روش‌های ویرایش ژنوم، هنوز نگرانی‌هایی در مورد استفاده از این روش‌ها وجود دارد. در واقع، این واقعیت که ابزارهای دستکاری ژنوم ممکن است خطاهای ناخواسته ایجاد کنند، همیشه مانعی برای استفاده گسترده از آنها در درمان بوده است (Khalil, 2020). به همین دلیل در سیر تکاملی این ابزارهای دستکاری ژنوم توجه زیادی به کاهش میزان دستکاری ناخواسته شده است تا این مشکلات برطرف شوند (Danaeifar, 2022). دستکاری ناخواسته به دلیل ویرایش غیراختصاصی DNA به دلیل تشابه قابل توجه توالی در مکان‌هایی غیر از هدف مدنظر، اتفاق می‌افتد که در اثر آن نه تنها ممکن است تناسب بیان ژن‌های سلول و عملکرد آنها تغییر کند که حتی ممکن است به مرگ سلول منجر شود (Huang et al., 2022; Psatha et al., 2022).

سیستم‌های انتقال ژن ویروسی بر اساس توانایی ویروس‌ها به منظور وارد کردن مواد ژنتیکی به سلول میزبان طراحی شده‌اند و در نظر گرفتن توانایی هر یک از این ناقلین ویروسی از این نظر به منظور کنترل خطای ناخواسته مهم است (Bulcha et al., 2012; Nayerossadat et al., 2021). برای مثال همانطور که پیش از این هم ذکر شد معمولاً استفاده از رتروویروس‌ها منجر به ورود ژن‌های خارجی به ژنوم سلول میزبان در اکثر موارد می‌شوند (Gutierrez-Guerrero et al., 2020). در حالی که ویروس‌های آدنو به عنوان اپی‌زوم‌های خارج کروموزومی پایدار باقی می‌مانند و با ژنوم میزبان ادغام نمی‌شوند و بنابراین خطر مرتبط با ادغام شدن توالی وارد شده به این ناقلین به جای دیگر روی ژنوم در مورد آنها مطرح نیست (Mulia et al., 2021). از طرف دیگر می‌توان از پلاسمیدهای یوکاریوتی به منظور بیان موقت استفاده کرد که نگرانی‌های کمتری در مورد عوارض جانبی نامطلوب ناشی از دستکاری ناخواسته دارند (Psatha et al., 2022; Salehi et al., 2022) با این حال، کاربرد بالینی آنها به دلیل بازدهی انتقال پایین‌تر از ناقلین ویروسی محدود است (Salehi et al., 2022).

علاوه بر ناقلین، معرف‌های شیمیایی مورد استفاده برای ترانسفکشن و یا ترانسداکشن، توالی‌های پیکره اصلی ناقلین، ژن‌های گزارشگر و مقاومت آنتی‌بیوتیکی نیز ممکن است منجر به خطا در دستکاری ژنتیکی شوند (Salehi et al., 2022). با توجه به اینکه میزان خطای دستکاری ژنتیکی به عوامل مختلفی بستگی دارد، اخیراً روشی به منظور اندازه‌گیری و مقایسه میزان خطای دستکاری ژنتیکی پیشنهاد شده است که طی این روش یک توالی ژنوم در شرایط یکسان در آزمایشگاه و شرایط درون‌تنی تحت تأثیر عوامل ویرایش ژنتیکی قرار می‌گیرد و سپس میزان موفقیت و خطای ویرایش ژنتیکی برای هر یک از عوامل ویرایش ژنتیکی در شرایط آزمایشگاهی و درون‌تنی برای ژنوم خاص بررسی می‌شود (Psatha et al., 2022).

استراتژی‌های مورد استفاده برای کاهش خطای دستکاری ژنتیکی شامل افزایش اختصاصیت هسته‌های آنزیمی با مهندسی آنزیم مورد استفاده جهت دستکاری ژنتیکی، بهینه‌سازی توالی شناسایی کننده هدف (در سیستم CRISPR-Cas: بهینه‌سازی RNA راهنما)، کنترل محل فعالیت آنزیم و یا ناقلین آن به منظور فعالیت در محل موردنظر (هسته/ سیتوپلاسم/

میتوکندری)، کنترل میزان بیان mRNA تولیدکننده پروتئین با استفاده از مکانیسم های خودتنظیمی بیان ژن است. در میان این استراتژی ها، بیشترین تمرکز مطالعات روی بهینه سازی پروتئین های Cas9 در سیستم Cas9-CRISPR به منظور کاهش میزان خطای آن با مهندسی مستقیم (جهش هدفمند) یا غیرمستقیم (جهش های تصادفی و بررسی میزان خطای آنزیم حاصل از آن) است. به لطف پیشرفت سریع در کاهش خطا با استفاده از استراتژی های بیان شده، اکنون انواع آنزیم های دستکاری ژنوم با اختصاصیت بالا به ویژه آنزیم های بر پایه Cas9، نیکازها و dCas9-FokI نو ترکیب، در دسترس هستند (Huang et al., 2022).

نتیجه گیری

پتانسیل سلول های بنیادی برای خودنوزایی و تمایز به انواع سلول ها، آنها را برای مدل سازی بیماری ها، بررسی تیمارهای دارویی مختلف و پزشکی بازساختی جذاب می کند. اما گاهی سلول های بنیادی به منظور دستیابی به اهداف مدنظر مناسب نیستند و لازم است دستکاری هایی روی آنها انجام شود. این استراتژی هنوز در ابتدای راه است و بسیاری از پتانسیل ها و چالش های آن برای کاربردهای مختلف بررسی نشده اند. برای مثال در حوزه پیوند با وجود موفقیت های اولیه در استفاده از سلول های بنیادی دستکاری شده و افزایش بیان ژن های دخیل در مقابله با رد پیوند و آپوپتوز و همچنین ژن های دخیل در تولید سکرئوم های دارای خاصیت ضدسرطانی، هنوز چالش های مرتبط با رد پیوند به دلیل پاسخ های تأخیری وجود دارد. به همین دلیل پیگیری سلامت گیرنده پیوند با استفاده از روش های حساس تشخیصی مانند PCR و تست های حساس سرولوژیکی به منظور شناسایی عفونت ضروری است.

از طرف دیگر در مورد سلول درمانی و تزریق سلول های بنیادی دستکاری شده با وجود اینکه بیان بیشتر ژن های دخیل در فرایند مقابله با رد توسط سیستم ایمنی و آپوپتوزی که به آنها القا می شود، ژن های دخیل در تولید آگزوزوم های مهندسی شده از آنها و تعامل این سلول ها با سایر سلول ها، توانسته است بازدهی درمان با استفاده از این سلول ها را بدون افزایش هزینه درمان و خطرهای مرتبط با آمبولی افزایش دهد؛ اما ایمنی دستکاری سلول های بنیادی از نظر پاسخ ایمنی و التهابی در میزبان و همچنین خطر سرطان زایی از طریق ادغام ژنوم ویروس در ژنوم میزبان بزرگترین مانع برای استفاده بالینی از آنها به صورت دستکاری سلول در شرایط درون تنی است. بنابراین باید جنبه های ایمنی و کنترل کیفیت دستکاری ژن هایی که قرار است بیش از حد بیان شوند به دقت در نظر گرفته شود. علاوه بر این، میزان بازدهی و پایداری ژنتیکی در طولانی مدت باید به طور کامل بررسی شود. بنابراین هنوز مسائل حل نشده زیادی برای کاربرد بالینی و درون تنی سلول های بنیادی دستکاری شده وجود دارد. برای مثال هنوز پاسخ پرسش هایی از قبیل این که چه تعداد سلول بنیادی اصلاح شده باید تزریق شود و یا بهترین روش ارسال سلول های بنیادی اصلاح شده کدام است داده نشده است. به همین دلایل امروزه گرایش به سمت دستکاری سلول های بنیادی در شرایط آزمایشگاهی و در مقیاس صنعتی به منظور دستیابی به فراورده های آنها و کاربرد درمانی آنها وجود دارد. بنابراین می توان گفت بدون شک ترکیب فناوری های ویرایش ژنوم در صورتی که موارد مرتبط با خطای دستکاری ژنتیکی در نظر گرفته شوند و فناوری استفاده از سلول های بنیادی در حوزه درمان تأثیر عمیقی روی علم پزشکی خواهد داشت.

تعارض منافع

بنا بر اظهار نویسندگان این مقاله تعارض منافع ندارد.

سپاسگزاری

نگارندگان بر خود لازم می دانند از خانم دکتر بهناز بخشنده به خاطر حمایت مالی، معنوی و همکاری در مطالعه و بازبینی متن مقاله حاضر و ارائه نظرهای ساختاری ارزشمند تشکر و قدردانی نمایند.

منابع

- Agostini, F., Vicinanza, C., Biolo, G., Spessotto, P., Da Ros, F., Lombardi, E.,...Mazzucato, M. (2021). Nucleofection of Adipose Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Improved Transfection Efficiency for GMP Grade Applications. *Cells*, 10(12), 3412. <https://doi.org/10.3390/cells10123412>

- Ahrens, H. E., Petersen, B., Ramackers, W., Petkov, S., Herrmann, D., Hauschild-Quintern, J.,...Niemann, H. (2015). Kidneys From alpha1,3-Galactosyltransferase Knockout/Human Heme Oxygenase-1/Human A20 Transgenic Pigs Are Protected From Rejection During Ex Vivo Perfusion With Human Blood. *Transplant Direct*, 1(6), e23. <https://doi.org/10.1097/TXD.0000000000000533>
- Almasi, R. (2022). Stem Cells and Their Therapeutic Applications for Human Diseases: A Review. *J Stem Cell Rep*, 4, 1-18.
- Bai, X. (2020). Stem Cell-Based Disease Modeling and Cell Therapy. *Cells*, 9(10). <https://doi.org/10.3390/cells9102193>
- Bakhshandeh, B., Soleimani, M., Hafizi, M., & Ghaemi, N. (2012). A comparative study on nonviral genetic modifications in cord blood and bone marrow mesenchymal stem cells. *Cytotechnology*, 64(5), 523-540. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9430-9>
- Bakhshandeh, B., Sorboni, S. G., Ranjbar, N., Deyhimfar, R., Abtahi, M. S., Izady, M.,...Pennisi, C. P. (2023). Mechanotransduction in tissue engineering: Insights into the interaction of stem cells with biomechanical cues. *Exp Cell Res*, 431(2), 113766. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113766>
- Baptista, L. S., Porri, C., Kronemberger, G. S., Kelly, D. J., & Perrault, C. M. (2022). 3D organ-on-a-chip: The convergence of microphysiological systems and organoids [Mini Review]. *Front Cell Dev Biol*, 10, 1043117. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1043117>
- Belling, J. N., Heidenreich, L. K., Tian, Z., Mendoza, A. M., Chiou, T.-T., Gong, Y.,...Park, J. H. (2020). Acoustofluidic sonoporation for gene delivery to human hematopoietic stem and progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(20), 10976-10982. <https://doi.org/10.1073/pnas.1917125117>
- Bez, M., Sheyn, D., Tawackoli, W., Avalos, P., Shapiro, G., Giaconi, J. C.,...Awad, H. A. (2017). In situ bone tissue engineering via ultrasound-mediated gene delivery to endogenous progenitor cells in mini-pigs. *Science translational medicine*, 9(390), eaal3128. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aal3128>
- Brunet, E., Simsek, D., Tomishima, M., DeKever, R., Choi, V. M., Gregory, P.,...Jasin, M. (2009). Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(26), 10620-10625.
- Buermann, A., Petkov, S., Petersen, B., Hein, R., Lucas-Hahn, A., Baars, W.,...Schwinzer, R. (2018). Pigs expressing the human inhibitory ligand PD-L1 (CD 274) provide a new source of xenogeneic cells and tissues with low immunogenic properties. *Xenotransplantation*, 25(5), e12387. <https://doi.org/10.1111/xen.12387>
- Bulcha, J. T., Wang, Y., Ma, H., Tai, P. W. L., & Gao, G. (2021). Viral vector platforms within the gene therapy landscape. *Signal Transduct Target Ther*, 6(1), 53. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00487-6>
- Cai, X., Dou, R., Guo, C., Tang, J., Li, X., Chen, J., & Zhang, J. (2023). Cationic Polymers as Transfection Reagents for Nucleic Acid Delivery. *Pharmaceutics*, 15(5). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15051502>
- Cao, F., Xie, X., Gollan, T., Zhao, L., Narsinh, K., Lee, R. J., & Wu, J. C. (2010). Comparison of gene-transfer efficiency in human embryonic stem cells. *Molecular imaging and biology*, 12, 15-24.
- Chandrasegaran, S. (2017). Recent advances in the use of ZFN-mediated gene editing for human gene therapy. *Cell Gene Ther Insights*, 3(1), 33-41. <https://doi.org/10.18609/cgti.2017.005>
- Chen, H., Wang, L., Zeng, X., Schwarz, H., Nanda, H. S., Peng, X., & Zhou, Y. (2021). Exosomes, a New Star for Targeted Delivery [Review]. *Front Cell Dev Biol*, 9, 751079. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.751079>
- Chen, S., Sun, F., Qian, H., Xu, W., & Jiang, J. (2022). Preconditioning and Engineering Strategies for Improving the Efficacy of Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes in Cell-Free Therapy. *Stem Cells Int*, 2022, 1779346. <https://doi.org/10.1155/2022/1779346>
- Chen, Y.-W., Huang, S. X., De Carvalho, A. L. R. T., Ho, S.-H., Islam, M. N., Volpi, S.,...Bhattacharya, J. (2017). A three-dimensional model of human lung development and disease from pluripotent stem cells. *Nature cell biology*, 19(5), 542-549. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5777163/pdf/nihms860304.pdf>

- Chen, Z., Du, M., & Yan, F. (2018). Recent Advances about Local Gene Delivery by Ultrasound. In *Gene Expression and Control*. IntechOpen.
- Cho, A. N., Bright, F., Morey, N., Au, C., Ittner, L. M., & Ke, Y. D. (2022). Efficient Gene Expression in Human Stem Cell Derived-Cortical Organoids Using Adeno Associated Virus. *Cells*, 11(20), 3194. <https://doi.org/10.3390/cells11203194>
- Choi, E.-B., Vodnala, M., Saini, P., Anugula, S., Zerbato, M., Ho, J. J.,...Roels, M. (2023). Transcription factor SOX15 regulates stem cell pluripotency and promotes neural fate during differentiation by activating the neurogenic gene Hes5. *Journal of Biological Chemistry*, 102996. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.102996>
- Cui, S., Wang, Y., Gong, Y., Lin, X., Zhao, Y., Zhi, D.,...Zhang, S. (2018). Correlation of the cytotoxic effects of cationic lipids with their headgroups. *Toxicology Research*, 7(3), 473-479. <https://doi.org/https://doi.org/10.1039%2Fc8tx00005k>
- Danaeifar, M. (2022). Recent advances in gene therapy: genetic bullets to the root of the problem. *Clin Exp Med*. <https://doi.org/10.1007/s10238-022-00925-x>
- Daya-Grosjean, L., & Sarasin, A. (2005). The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: an overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat Res*, 571(1-2), 43-56. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2004.11.013>
- Di Gioia, S., Trapani, A., Carbone, A., Castellani, S., Colombo, C., Trapani, G., & Conese, M. (2014). Cationic Polymers for Gene Delivery into Mesenchymal Stem Cells as a Novel Approach to Regenerative Medicine. *Cationic Polymers in Regenerative Medicine*. London: Royal Society of Chemistry, 386-437. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1039/9781782620105-00386>
- Dixon, J. E., Osman, G., Morris, G. E., Markides, H., Rotherham, M., Bayoussef, Z.,...Shakesheff, K. M. (2016). Highly efficient delivery of functional cargoes by the synergistic effect of GAG binding motifs and cell-penetrating peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(3), E291-E299. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518634113>
- Fleischer, A., Vallejo-Díez, S., Martín-Fernández, J. M., Sánchez-Gilabert, A., Castresana, M., Del Pozo, A.,...Gáinza, E. (2020). iPSC-derived intestinal organoids from cystic fibrosis patients acquire CFTR activity upon TALEN-mediated repair of the p. F508del mutation. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, 17, 858-870.
- Gao, Y., Yin, X., & Ren, X. (2022). Advance of Mesenchymal Stem Cells in Chronic End-Stage Liver Disease Control. *Stem Cells Int*, 2022, 1526217. <https://doi.org/10.1155/2022/1526217>
- Guo, J., Gaj, T., & Barbas III, C. F. (2010). Directed evolution of an enhanced and highly efficient FokI cleavage domain for zinc finger nucleases. *Journal of molecular biology*, 400(1), 96-107. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2010.04.060>
- Gutierrez-Guerrero, A., Cosset, F. L., & Verhoeven, E. (2020). Lentiviral Vector Pseudotypes: Precious Tools to Improve Gene Modification of Hematopoietic Cells for Research and Gene Therapy. *Viruses*, 12(9). <https://doi.org/10.3390/v12091016>
- Hamann, A., Nguyen, A., & Pannier, A. K. (2019). Nucleic acid delivery to mesenchymal stem cells: a review of nonviral methods and applications. *Journal of biological engineering*, 13, 1-16.
- Hara, H., Witt, W., Crossley, T., Long, C., Isse, K., Fan, L.,...Starzl, T. E. (2013). Human dominant-negative class II transactivator transgenic pigs - effect on the human anti-pig T-cell immune response and immune status. *Immunology*, 140(1), 39-46. <https://doi.org/10.1111/imm.12107>
- Havasi, P., Nabioni, M., Soleimani, M., Bakhshandeh, B., & Parivar, K. (2013). Mesenchymal stem cells as an appropriate feeder layer for prolonged in vitro culture of human induced pluripotent stem cells. *Mol Biol Rep*, 40(4), 3023-3031. <https://doi.org/10.1007/s11033-012-2376-3>
- Hicks, M. R., & Pyle, A. D. (2023). The emergence of the stem cell niche. *Trends Cell Biol*, 33(2), 112-123. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2022.07.003>
- Hoang, D. M., Pham, P. T., Bach, T. Q., Ngo, A. T. L., Nguyen, Q. T., Phan, T. T. K.,...Nguyen, L. T. (2022). Stem cell-based therapy for human diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 7(1), 272. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01134-4>
- Hu, W., & Lazar, M. A. (2022). Modelling metabolic diseases and drug response using stem cells and organoids. *Nat Rev Endocrinol*, 18(12), 744-759. <https://doi.org/10.1038/s41574-022-00733-z>
- Huang, X., Yang, D., Zhang, J., Xu, J., & Chen, Y. E. (2022). Recent Advances in Improving Gene-Editing Specificity through CRISPR–Cas9 Nuclease Engineering. *Cells*, 11(14), 2186. <https://www.mdpi.com/2073-4409/11/14/2186>

- Jahanafrooz, Z., Bakhshandeh, B., & Shirzadi, E. (2023). Comparative Evaluation of Lipofectamine and Dendrimer for Transfection of Short RNA Into Human T47D and MCF-10A Cell Lines. *Adv Pharm Bull*, 13(2), 385-392. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.022>
- Joung, J. K., & Sander, J. D. (2013). TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature reviews Molecular cell biology*, 14(1), 49-55. <https://doi.org/10.1038/nrm3486>
- Kasatkina, L. A., Ma, C., Matlashov, M. E., Vu, T., Li, M., Kaberniuk, A. A.,...Verkhusha, V. V. (2022). Optogenetic manipulation and photoacoustic imaging using a near-infrared transgenic mouse model. *Nature communications*, 13(1), 2813. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30547-6>
- Khalil, A. M. (2020). The genome editing revolution: review. *J Genet Eng Biotechnol*, 18(1), 68. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00078-y>
- Kim, H., & Kim, J.-S. (2014). A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nature Reviews Genetics*, 15(5), 321-334. <https://doi.org/10.1038/nrg3686>
- Kim, H., Kim, M., Im, S.-K., & Fang, S. (2018). Mouse Cre-LoxP system: general principles to determine tissue-specific roles of target genes. *Laboratory animal research*, 34(4), 147-159. <https://doi.org/10.5625/lar.2018.34.4.147>
- Kuwaki, K., Tseng, Y. L., Dor, F. J., Shimizu, A., Houser, S. L., Sanderson, T. M.,...Cooper, D. K. (2005). Heart transplantation in baboons using alpha1,3-galactosyltransferase gene-knockout pigs as donors: initial experience. *Nat Med*, 11(1), 29-31. <https://doi.org/10.1038/nm1171>
- Labusca, L., Herea, D. D., & Mashayekhi, K. (2018). Stem cells as delivery vehicles for regenerative medicine-challenges and perspectives. *World J Stem Cells*, 10(5), 43-56. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v10.i5.43>
- Lamsfus-Calle, A., Daniel-Moreno, A., Urena-Bailen, G., Raju, J., Antony, J. S., Handgretinger, R., & Mezger, M. (2020). Hematopoietic stem cell gene therapy: The optimal use of lentivirus and gene editing approaches. *Blood Rev*, 40, 100641. <https://doi.org/10.1016/j.blre.2019.100641>
- Lei, T., Chen, L., Wang, K., Du, S., Gonelle-Gispert, C., Wang, Y., & Buhler, L. H. (2022). Genetic engineering of pigs for xenotransplantation to overcome immune rejection and physiological incompatibilities: The first clinical steps [Review]. *Front Immunol*, 13, 1031185. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.1031185>
- Li, C., & Lieber, A. (2019). Adenovirus vectors in hematopoietic stem cell genome editing. *FEBS Lett*, 593(24), 3623-3648. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.13668>
- Li, C., Zhao, H., Cheng, L., & Wang, B. (2021). Allogeneic vs. autologous mesenchymal stem/stromal cells in their medication practice. *Cell Biosci*, 11(1), 187. <https://doi.org/10.1186/s13578-021-00698-y>
- Li, H., Yang, Y., Hong, W., Huang, M., Wu, M., & Zhao, X. (2020). Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 5(1), 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>
- Li, L., Zhang, D., Li, P., Damaser, M., & Zhang, Y. (2015). Virus integration and genome influence in approaches to stem cell based therapy for andro-urology. *Advanced drug delivery reviews*, 82, 12-21.
- Li, M., Jiang, Y., Hou, Q., Zhao, Y., Zhong, L., & Fu, X. (2022). Potential pre-activation strategies for improving therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells: current status and future prospects. *Stem Cell Res Ther*, 13(1), 146. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02822-2>
- Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X.,...Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 36. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01309-7>
- Li, X., Le, Y., Zhang, Z., Nian, X., Liu, B., & Yang, X. (2023). Viral vector-based gene therapy. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(9), 7736.
- Lim, J. Y., Park, S. H., Jeong, C. H., Oh, J. H., Kim, S. M., Ryu, C. H.,...Jeun, S.-S. (2010). Microporation is a valuable transfection method for efficient gene delivery into human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *BMC biotechnology*, 10, 1-13. <https://doi.org/10.1186%2F1472-6750-10-38>
- Madrigal, P., Deng, S., Feng, Y., Milioti, S., Goh, K. J., Nibhani, R.,...Brown, S. (2023). Epigenetic and transcriptional regulations prime cell fate before division during human pluripotent stem cell differentiation. *Nature communications*, 14(1), 405.

- Martinez-Alarcon, L., Liarte, S., Quereda, J. J., Saez-Acosta, A., Torre-Minguella, C., Mendonca, L.,...Ramis, G. (2021). Profiling Human CD55 Transgene Performance Assist in Selecting Best Suited Specimens and Tissues for Swine Organ Xenotransplantation. *Biology (Basel)*, 10(8), 747. <https://doi.org/10.3390/biology10080747>
- Matsuoka, H., Komazaki, T., Mukai, Y., Shibusawa, M., Akane, H., Chaki, A.,...Saito, M. (2005). High throughput easy microinjection with a single-cell manipulation supporting robot. *J Biotechnol*, 116(2), 185-194. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2004.10.010>
- McLelland, B. T., Lin, B., Mathur, A., Aramant, R. B., Thomas, B. B., Nistor, G.,...Seiler, M. J. (2018). Transplanted hESC-derived retina organoid sheets differentiate, integrate, and improve visual function in retinal degenerate rats. *Investigative ophthalmology & visual science*, 59(6), 2586-2603.
- Meissner, T. B., Schulze, H. S., & Dale, S. M. (2022). Immune Editing: Overcoming Immune Barriers in Stem Cell Transplantation. *Curr Stem Cell Rep*, 8(4), 206-218. <https://doi.org/10.1007/s40778-022-00221-0>
- Mulia, G. E., Picanco-Castro, V., Stavrou, E. F., Athanassiadou, A., & Figueiredo, M. L. (2021). Advances in the Development and the Applications of Nonviral, Episomal Vectors for Gene Therapy. *Hum Gene Ther*, 32(19-20), 1076-1095. <https://doi.org/10.1089/hum.2020.310>
- Nayerossadat, N., Maedeh, T., & Ali, P. A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Adv Biomed Res*, 1, 27. <https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152>
- Niu, D., Wei, H. J., Lin, L., George, H., Wang, T., Lee, I. H.,...Yang, L. (2017). Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 357(6357), 1303-1307. <https://doi.org/10.1126/science.aan4187>
- Nowakowski, A., Andrzejewska, A., Janowski, M., Walczak, P., & Lukomska, B. (2013). Genetic engineering of stem cells for enhanced therapy. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 73(1), 1-18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23595280>
- Paolini Sguazzi, G., Muto, V., Tartaglia, M., Bertini, E., & Compagnucci, C. (2021). Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs) and Gene Therapy: A New Era for the Treatment of Neurological Diseases. *Int J Mol Sci*, 22(24), 13674. <https://doi.org/10.3390/ijms222413674>
- Poetsch, M. S., Strano, A., & Guan, K. (2022). Human Induced Pluripotent Stem Cells: From Cell Origin, Genomic Stability, and Epigenetic Memory to Translational Medicine. *Stem Cells*, 40(6), 546-555. <https://doi.org/10.1093/stmcls/sxac020>
- Psatha, N., Paschoudi, K., Papadopoulou, A., & Yannaki, E. (2022). In Vivo Hematopoietic Stem Cell Genome Editing: Perspectives and Limitations. *Genes (Basel)*, 13(12), 2222. <https://doi.org/10.3390/genes13122222>
- Rai, R., Alwani, S., & Badea, I. (2019). Polymeric Nanoparticles in Gene Therapy: New Avenues of Design and Optimization for Delivery Applications. *Polymers (Basel)*, 11(4), 745. <https://doi.org/10.3390/polym11040745>
- Rao, J. S., Hosny, N., Kumbha, R., Naqvi, R. A., Singh, A., Swanson, Z.,...Burlak, C. (2021). HLA-G1(+) Expression in GGTA1KO Pigs Suppresses Human and Monkey Anti-Pig T, B and NK Cell Responses [Original Research]. *Front Immunol*, 12, 730545. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.730545>
- Rasekhi, M., Soleimani, M., Bakhshandeh, B., & Sadeghizadeh, M. (2017). A novel protocol to provide a suitable cardiac model from induced pluripotent stem cells. *Biologicals*, 50, 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.biologicals.2017.09.003>
- Rejman, J., Tavernier, G., Bavarsad, N., Demeester, J., & De Smedt, S. C. (2010). mRNA transfection of cervical carcinoma and mesenchymal stem cells mediated by cationic carriers. *J Control Release*, 147(3), 385-391. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2010.07.124>
- Ren, X., Chen, W., Yang, Q., Li, X., & Xu, L. (2022). Patient-derived cancer organoids for drug screening: Basic technology and clinical application. *J Gastroenterol Hepatol*, 37(8), 1446-1454. <https://doi.org/10.1111/jgh.15930>
- Rodríguez-Gago, M., de Heredia, A., Ramírez, P., Parrilla, P., Aparicio, P., & Yélamos, J. (2001). HUMAN ANTI-PORCINE $\gamma\delta$ T-CELL XENOREACTIVITY IS INHIBITED BY HUMAN FasL EXPRESSION ON PORCINE ENDOTHELIAL CELLS1. *Transplantation*, 72(3), 503-509. https://journals.lww.com/transplantjournal/Fulltext/2001/08150/HUMAN_ANTI_PORCINE_T_CELL_XENOREACTIVITY_IS.24.aspx

- Ruseska, I., & Zimmer, A. (2020). Internalization mechanisms of cell-penetrating peptides. *Beilstein journal of nanotechnology*, 11(1), 101-123. <https://doi.org/10.3762/bjnano.11.10>
- Salehi, M. S., Safari, A., Pandamooz, S., Jurek, B., Hooshmandi, E., Owjifard, M.,...Borhani-Haghighi, A. (2022). The Beneficial Potential of Genetically Modified Stem Cells in the Treatment of Stroke: a Review. *Stem Cell Rev Rep*, 18(2), 412-440. <https://doi.org/10.1007/s12015-021-10175-1>
- Shinohara, T., & Kanatsu-Shinohara, M. (2020). Transgenesis and Genome Editing of Mouse Spermatogonial Stem Cells by Lentivirus Pseudotyped with Sendai Virus F Protein. *Stem Cell Reports*, 14(3), 447-461. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2020.02.001>
- Singh, J. K., Smith, R., Rother, M. B., de Groot, A. J., Wiegant, W. W., Vreeken, K.,...Krawczyk, P. M. (2021). Zinc finger protein ZNF384 is an adaptor of Ku to DNA during classical non-homologous end-joining. *Nature communications*, 12(1), 6560.
- Slack, J. M. W. (2017). What is a Stem Cell? In *The Science of Stem Cells* (pp. 1-11). <https://doi.org/10.1002/9781119235293.ch1>
- Steinberg, G. K., Kondziolka, D., Wechsler, L. R., Lunsford, L. D., Coburn, M. L., Billigen, J. B.,...Schwartz, N. E. (2016). Clinical Outcomes of Transplanted Modified Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in Stroke: A Phase 1/2a Study. *Stroke*, 47(7), 1817-1824. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.116.012995>
- Tabar, M. S., Hesarak, M., Esfandiari, F., Samani, F. S., Vakilian, H., & Baharvand, H. (2015). Evaluating electroporation and lipofectamine approaches for transient and stable transgene expressions in human fibroblasts and embryonic stem cells. *Cell Journal (Yakhteh)*, 17(3), 438. <https://doi.org/https://doi.org/10.22074%2Fcellj.2015.5>
- Tang, X.-Y., Wu, S., Wang, D., Chu, C., Hong, Y., Tao, M.,...Liu, Y. (2022). Human organoids in basic research and clinical applications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 7(1), 168. <https://doi.org/10.1038/s41392-022-01024-9>
- Tinsley, R. B., Vesey, M. J., Barati, S., Rush, R. A., & Ferguson, I. A. (2004). Improved non-viral transfection of glial and adult neural stem cell lines and of primary astrocytes by combining agents with complementary modes of action. *J Gene Med*, 6(9), 1023-1032. <https://doi.org/10.1002/jgm.584>
- Vahdat, S., Pahlavan, S., Mahmoudi, E., Barekat, M., Ansari, H., Bakhshandeh, B.,...Baharvand, H. (2019). Expansion of Human Pluripotent Stem Cell-derived Early Cardiovascular Progenitor Cells by a Cocktail of Signaling Factors. *Sci Rep*, 9(1), 16006. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-52516-8>
- Walters, M. C., Smith, A. R., Schiller, G. J., Esrick, E. B., Williams, D. A., Gogleva, T.,...Vercellotti, G. M. (2021). Updated results of a phase 1/2 clinical study of zinc finger nuclease-mediated editing of BCL11A in autologous hematopoietic stem cells for transfusion-dependent beta thalassemia. *Blood*, 138, 3974.
- Wang, H. T., Maeda, A., Sakai, R., Lo, P. C., Takakura, C., Jiaravuthisan, P.,...Miyagawa, S. (2018). Human CD31 on porcine cells suppress xenogeneic neutrophil-mediated cytotoxicity via the inhibition of NETosis. *Xenotransplantation*, 25(5), e12396. <https://doi.org/10.1111/xen.12396>
- Wang, S.-N., Wang, Z., Xu, T.-Y., Cheng, M.-H., Li, W.-L., & Miao, C.-Y. (2020). Cerebral organoids repair ischemic stroke brain injury. *Translational Stroke Research*, 11, 983-1000. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7496035/pdf/12975_2019_Article_773.pdf
- Wang, Y., Ding, N., Guan, G., Liu, G., Huo, D., Li, Y.,...Zhu, C. (2018). Rapid Delivery of Hsa-miR-590-3p Using Targeted Exosomes to Treat Acute Myocardial Infarction Through Regulation of the Cell Cycle. *J Biomed Nanotechnol*, 14(5), 968-977. <https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2493>
- Watanabe, H., Sahara, H., Nomura, S., Tanabe, T., Ekanayake-Alper, D. K., Boyd, L. K.,...Yamada, K. (2018). GalT-KO pig lungs are highly susceptible to acute vascular rejection in baboons, which may be mitigated by transgenic expression of hCD47 on porcine blood vessels. *Xenotransplantation*, 25(5), e12391. <https://doi.org/10.1111/xen.12391>
- Watson, C. L., Mahe, M. M., Múnera, J., Howell, J. C., Sundaram, N., Poling, H. M.,...Sun, Y. (2014). An in vivo model of human small intestine using pluripotent stem cells. *Nature medicine*, 20(11), 1310-1314. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4408376/pdf/nihms679814.pdf>

- Xi, Z., Vats, A., Sahel, J.-A., Chen, Y., & Byrne, L. C. (2022). Gene augmentation prevents retinal degeneration in a CRISPR/Cas9-based mouse model of PRPF31 retinitis pigmentosa. *Nature communications*, 13(1), 7695. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35361-8>
- Yan, J. J., Koo, T. Y., Lee, H. S., Lee, W. B., Kang, B., Lee, J. G.,...Yang, J. (2018). Role of Human CD200 Overexpression in Pig-to-Human Xenogeneic Immune Response Compared With Human CD47 Overexpression. *Transplantation*, 102(3), 406-416. <https://doi.org/10.1097/TP.0000000000001966>
- Yang, H., Shang, Z., Shi, Q., Gao, J., Wang, X., & Hu, F. (2023). Combination of PEG-b-PAA Carrier and Efficient Cationic Photosensitizers for Photodynamic Therapy. *Chemistry–An Asian Journal*, 18(10), e202300212.
- Zare, M., Soleimani, M., Akbarzadeh, A., Bakhshandeh, B., Aghaee-Bakhtiari, S. H., & Zarghami, N. (2015). A Novel Protocol to Differentiate Induced Pluripotent Stem Cells by Neuronal microRNAs to Provide a Suitable Cellular Model. *Chem Biol Drug Des*, 86(2), 232-238. <https://doi.org/10.1111/cbdd.12485>
- Zhang, H., Fu, X., Gong, X., Wang, Y., Zhang, H., Zhao, Y., & Shen, Y. (2022). Systematic dissection of key factors governing recombination outcomes by GCE-SCRaMbLE. *Nature communications*, 13(1), 5836. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33606-0>
- Zhang, Y., Dong, N., Hong, H., Qi, J., Zhang, S., & Wang, J. (2022). Mesenchymal Stem Cells: Therapeutic Mechanisms for Stroke. *Int J Mol Sci*, 23(5), 2550. <https://doi.org/10.3390/ijms23052550>
- Zhao, A. G., Shah, K., Cromer, B., & Sumer, H. (2020). Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Their Therapeutic Potential. *Stem Cells Int*, 2020, 8825771. <https://doi.org/10.1155/2020/8825771>
- Zhao, Z., Anselmo, A. C., & Mitragotri, S. (2022). Viral vector-based gene therapies in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*, 7(1), e10258.
- Zheng, N., Li, L., & Wang, X. (2020). Molecular mechanisms, off-target activities, and clinical potentials of genome editing systems. *Clinical and Translational Medicine*, 10(1), 412-426. <https://doi.org/10.1002/ctm2.34>
- Ziraksaz, Z., Nomani, A., Soleimani, M., Bakhshandeh, B., Arefian, E., Haririan, I., & Tabbakhian, M. (2013). Evaluation of cationic dendrimer and lipid as transfection reagents of short RNAs for stem cell modification. *Int J Pharm*, 448(1), 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.03.035>