

Simultaneous targeting of three human papillomavirus type 16 oncoproteins using gene editing in a C57BL/6 mouse model of C3 epithelial tumor

Ali Anvar¹, Azam Bolhassani², Iman Salahshoorifar¹, Shiva Irani¹

¹Faculty of Converging Sciences and Technologies, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

²Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Abstract

Background: Human papillomavirus type 16 (HPV16) is a leading cause of cervical cancer, with its oncoproteins E5, E6, and E7 playing pivotal roles in tumor development. This study aimed to investigate the effect of simultaneous targeting of these three oncogenes using CRISPR/Cas9 technology delivered via the HR9 peptide in a mouse model of solid epithelial tumors.

Materials and methods: Female C57BL/6 mice (4–6 weeks old, weighing approximately 15–20 g) were divided into five groups. Subcutaneous injection of HPV16-positive C3 tumor cells was performed. After tumor formation, intratumoral administration of PX460-based CRISPR/Cas9 vectors containing E5, E6, or E7 sgRNAs, complexed with HR9 peptide, was carried out on days 7, 14, and 21. On day 60, apoptosis was assessed using H&E staining, immunohistochemistry (IHC), and caspase-3 expression analysis.

Results: Mice treated with E6-PX460 + E7-PX460 nanoparticles exhibited a statistically significant reduction in tumor size and an increased rate of apoptosis compared to those treated with the triple combination (E5+E6+E7-PX460) or E5-PX460 alone ($p < 0.0001$). These findings indicate the superior therapeutic efficacy of dual targeting of E6 and E7.

Conclusion: Simultaneous targeting of E6 and E7 oncogenes using CRISPR/Cas9 technology delivered via the HR9 peptide effectively induced apoptosis and suppressed tumor growth in C57BL/6 mice. This approach shows promise as a novel targeted strategy for HPV16-related tumor therapy and warrants further investigation.

Keywords: HPV16, Oncoproteins, CRISPR/Cas9, Gene editing, C3 tumor cells.

Cited as: Anvar A, Bolhassani A, Salahshoorifar I, Irani, S. Simultaneous targeting of three human papillomavirus type 16 oncoproteins using gene editing in a C57BL/6 mouse model of C3 epithelial tumor. Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch 2025; 35(4): 426-435.

Correspondence to: Azam Bolhassani

Tel: +98 9125373264

Email: A_bolhasani@pasteur.ac.ir

ORCID ID: 0000-0001-7363-7406

Received: 4 Feb 2025; **Accepted:** 8 Jun 2025

هدف گیری همزمان سه انکوپروتئین ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ با استفاده از ویرایش ژن در مدل موشی C57BL/6 تومور اپیتلیالی C3

علی انوار^۱، اعظم بوالحسنی^۲، ایمان سلحشوری فر^۱، شیوا ایرانی^۱

^۱ دانشکده علوم و فناوری های همگرا، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

^۲ واحد هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: ویروس پاپیلومای انسانی نوع ۱۶ (HPV16) از عوامل اصلی سرطان دهانه رحم است. انکوپروتئین های E5، E6 و E7 این ویروس نقش مهمی در سرطان زایی دارند. این مطالعه با هدف بررسی اثر هدف گیری همزمان این سه انکوژن با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 و انتقال توسط پپتید HR9 در مدل موشی مبتلا به تومور اپیتلیالی جامد انجام شد.

روش بررسی: موش های ماده C57BL/6 (۴ تا ۶ هفته، با وزن تقریبی ۱۵ تا ۲۰ گرم) به پنج گروه تقسیم شدند. سلول های توموری C3 به صورت زیر جلدی به پهلوی تزریق شد. پس از تشکیل تومور، تزریق نانوذرات DNA/HR9 حاوی وکتورهای نوترکیب E5، E6 و E7-PX460 در سه نوبت (روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱) به صورت داخل توموری انجام شد. در روز ۶۰، ارزیابی آپوپتوز با رنگ آمیزی IHC، H&E و بررسی بیان کاسپاز-۳ انجام شد.

یافته ها: گروه تیمار شده با نانوذرات حاوی E6-PX460 + E7-PX460، کاهش معنی دار آماری در اندازه تومور و افزایش قابل توجه آپوپتوز در مقایسه با گروه های E5+E6+E7-PX460 و E5-PX460 نشان داد ($p < 0.0001$). این نتایج نشان دهنده اثربخشی بیشتر هدف گیری همزمان E6 و E7 نسبت به سایر ترکیبات درمانی است.

نتیجه گیری: هدف گیری همزمان انکوپروتئین های E6 و E7 ویروس HPV16 با استفاده از CRISPR/Cas9 و انتقال توسط پپتید HR9، اثربخشی بالایی در القای آپوپتوز و کاهش رشد تومور در مدل موشی C57BL/6 نشان داد. این روش به عنوان یک راهکار نوین درمانی هدفمند قابل بررسی بیشتر است.

واژگان کلیدی: HPV16، انکوپروتئین، CRISPR/Cas9، ویرایش ژن، رده سلول های توموری C3.

مقدمه

سرطان گردن رحم چهارمین سرطان شایع در زنان در سطح جهانی است و همچنین شایع ترین تومور بدخیم سیستم تولیدمثل زنان است. بررسی ها نشان دادند که عفونت با ویروس های پاپیلومای انسانی (HPV: Human papillomavirus) با خطر

بالا، عامل اصلی سرطان گردن رحم است (۱، ۲). ژنوم HPV شامل هشت پروتئین است که به دو دسته "زودرس" یا "دیررس" تقسیم بندی می شوند. بخش "زودرس" شامل شش پروتئین (E1، E2، E4، E5، E6 و E7) است که نقش هایی در تعدیل ایمنی و تکثیر ژنوم HPV دارند. از طرف دیگر، منطقه "دیررس" شامل پروتئین های کپسیدی L1 و L2 است که مسئول انتقال ویروس هستند (۱). حدود ۴۰ نوع مختلف HPV با عفونت ناحیه تناسلی مرتبط هستند و در میان این انواع، HPV 16 و 18 قوی ترین نوع های پرخطر هستند که تقریباً ۵۰ درصد از ضایعات پیش سرطانی شدید گردن رحم را ایجاد

آدرس نویسنده مسئول: تهران واحد هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران، اعظم بوالحسنی
(email: A_bolhasani@pasteur.ac.ir)

ORCID ID: 0000-0001-7363-7406

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۱۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۳/۱۹

از هیستیدین (Histidine-rich nona-arginine, HR9)، یک پپتید غنی از آرژنین، عملکرد فوق العاده‌ای در انتقال DNA داخل سلول با حداقل سمیت نسبت به سایر پپتیدها نشان داده است. پپتید HR9 عمدتاً برای انتقال ژن‌های گزارشگر مانند پروتئین فلورسانس سبز استفاده شده است (۱۳).

در این مطالعه، سیستم کریسپر برای هدفگیری و غیرفعال سازی ژن E5 در سلول‌های توموری مرتبط با HPV به کار گرفته شده است. هدف این تحقیق، بررسی تأثیر غیر فعال سازی ژن E5 روی کاهش تکثیر تومور و القای آپوپتوز بود. بعلاوه، هدفگیری همزمان انکوژن E5 با دو انکوژن دیگر E6 و E7 توسط ویرایش ژنی به منظور بررسی اثرات ضد توموری ارزیابی شد. نتیجه حاصل از مطالعه حاضر نشان داد که هدفگیری همزمان دو انکوژن E6 و E7 با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 و انتقال آن توسط پپتید HR9، منجر به کاهش معنی‌دار رشد تومور و افزایش القای آپوپتوز در مدل موشی شد. این یافته‌ها، اثربخشی نسبی پایین‌تر ژن E5 در مقایسه با E6 و E7 را نیز نشان دادند و بر ضرورت بررسی بیشتر نقش مجزای آن تأکید دارند.

مواد و روشها

طراحی و ارزیابی sgRNA برای هدفگیری ژن‌های E5، E6 و

E7 و ویروس پاپیلوما انسانی نوع ۱۶

با استفاده از پایگاه داده مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI: National Center for Biotechnology Information)، توالی‌های مرجع ژن E5 (NC_001526.4)، E6 (NC_001526.4) و E7 (NC_001526.4) از HPV16 به دست آمد. کاندیداهای sgRNA برای ژن‌های E5، E6 و E7 در ابتدا با استفاده از ابزار طراحی CHOPCHOP شناسایی شدند. پس از آن، سه کاندیدی برتر با استفاده از CRISPOR، یک ابزار دیگر برای ایجاد sgRNA به منظور تأیید نتایج ارزیابی شدند. بعلاوه، شناسایی مکان‌های احتمالی غیرهدف از طریق ابزار Cas-Offinder برای تأیید کاندیداهای انتخاب شده، ارزیابی شد. پس از تحلیل دقیق داده‌های به دست آمده از ابزارهای CRISPOR، Cas-Offinder و CHOPCHOP، یک sgRNA بالقوه برای هر ژن انتخاب شد. کاندیداهای انتخاب شده مؤثرترین و دقیق‌ترین گزینه‌ها بودند (جدول ۱).

تهیه نانوذرات DNA/پپتید HR9 و ارزیابی خصوصیات

فیزیکوشیمیایی

در ابتدا، توالی‌های gRNA با طول ۲۰ جفت باز (GenScript Biotech Co, USA) سنتز شد و به داخل مکان‌های هضم شده با

می‌کنند (۲، ۳). وجود پروتئین‌های E5، E6 و E7 در حفظ وضعیت تغییر یافته سلول‌های سرطانی حیاتی است. بنابراین، ژن‌های E5، E6 و E7 به عنوان انکوژن‌های کلیدی در نظر گرفته می‌شوند که می‌توانند به عنوان اهدافی برای ویرایش ژن عمل کنند (۴). ژن E5 به عنوان یکی از انکوژن‌های ویروس پاپیلوما انسانی، نقش کلیدی در ایجاد و پیشرفت تومورهای بدخیم دارد، اما نسبت به ژن‌های E6 و E7 کمتر مورد بررسی قرار گرفته است (۵). پروتئین E5 با تأثیر بر مسیر پیام رسان سلولی مانند ریسپتور فاکتور رشد اپیدرمی (EGFR: Epidermal growth factor receptor)، مسیر فسفاتیدیل اینوزیتول-3-کیناز (PI3K/AKT) و همچنین مهار ارائه آنتی ژن در سطح سلول‌های آلوده، نقش مهمی در فرار ایمنی و تسهیل تومورزایی ایفا میکند (۶) (۷). مطالعات اخیر نشان داده اند که ژن E5 می‌تواند از طریق افزایش بیان EGFR و تنظیم منفی MHC کلاس I، بقای سلولی و رشد تومور را تحریک کند (۸). با وجود این، جزئیات مکانیزم‌های مولکولی دخیل در عملکرد E5 همچنان به تحقیقات بیشتری نیاز دارد.

ویرایش ژن، رویکردی انقلابی برای درمان عفونت HPV، ترکیب ژنتیکی سلول‌های آسیب‌دیده را تغییر می‌دهد. تکنیک کریسپر (CRISPR: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) یکی از کارآمدترین و دقیق‌ترین روش‌های ویرایش ژن شناخته شده است (۹). انکوژن‌های E6/E7 با استفاده از روش CRISPR تغییر یافته‌اند که باعث کاهش تولید انکو پروتئین‌های E6/E7 و مهار تکثیر سلول‌های سرطانی گردن رحم می‌شود. با این حال، به دلیل اثرات غیرهدفمند و نیاز به حداقل سمیت سیستمیک در حین توزیع، استفاده درمانی از این تکنیک محدود شده است. برای مقابله با این محدودیت، ابزارهای متعددی توسعه یافته‌اند تا ویرایش دقیق ژن را در حالی که اثرات غیرهدفمند را به حداقل می‌رسانند، محقق کنند. چالش اصلی، تحویل مؤثر اجزای CRISPR به سلول‌های هدف در میزان مناسب است. بنابراین، توسعه راهبردهایی که بتوانند اجزای CRISPR را به طور مؤثر به سلول‌های خاص منتقل کنند، به عنوان یک تمرکز پیشگام برای پیشبرد استفاده از فناوری CRISPR ظهور کرده است (۱۳-۱۰). با توجه به این محدودیت‌ها، محققان اخیراً پپتیدهای نفوذکننده سلولی (CPPs: Cell-penetrating peptides) را به عنوان ابزاری جدید برای انتقال ژن بررسی کرده‌اند که می‌توانند از غشاء سلولی نفوذ کرده و بار را به داخل سلول منتقل کنند (۱۴). CPPها به طور گسترده‌ای برای بهبود فرمولاسیون واکسن‌ها، سیستم‌های تحویل دارو و انتقال DNA داخل سلولی استفاده شده‌اند. در میان CPPها، نونا-آرژنین غنی

جدول ۱. توالی های راهنمای تعیین شده

نام ژن	توالی gRNA (۵'-۳')	توالی PAM (۵'-۳')	امتیاز CHOPCHOP	درصد GC	امتیاز CFD	شناسایی نواحی غیرهدف
E6	AAAGCACGCCAGTAATGTTG	TGG	2	45%	91	0
E6	GCAACAGTTACTGCGACGTG	AGG	1	55%	97	0
E7	TTCCTAGTGTGCCCATTAAC	AGG	3	45%	93	0

جدول ۲. گروه بندی های مورد مطالعه

گروه	جایگاه هدف	نوع تزریق	تزریق اول (۷ روز بعد از تلقیح)	تزریق دوم (۱۴ روز بعد از تلقیح)	تزریق سوم (۲۱ روز بعد از تلقیح)
A1	HPV16 E5	داخل توموری	E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9
A2	HPV16-E6 + HPV16-E7	داخل توموری	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E6-PX460 CRISPR/Cas9+ E7-PX460 CRISPR/Cas9/HR9
A3	HPV16-E6 +HPV16-E7 +HPV16-E5	داخل توموری	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9 + E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9 + E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9	E6-PX460 CRISPR/Cas9 + E7-PX460 CRISPR/Cas9 + E5-PX460 CRISPR/Cas9/HR9
A4	کنترل	داخل توموری	PX460 CRISPR/Cas9 / HR9	PX460 CRISPR/Cas9 / HR9	PX460 CRISPR/Cas9 / HR9
A5	کنترل	داخل توموری	PBS	PBS	PBS

(TESCAN / ZEISS, KYKY-EM3200 model, SEM Germany) ارزیابی شد.

ایجاد مدل حیوانی موش C57BL/6 مبتلا به تومور اپی تلیالی ناشی از سلول های C3

برای ایجاد مدل تجربی تومور اپی تلیالی مرتبط با HPV16، موش های ماده C57BL/6 در سن ۴ تا ۶ هفته (با وزن تقریبی ۱۵ تا ۲۰ گرم) از مرکز حیوانات آزمایشگاهی انستیتو پاستور کرج تهیه شدند. موش ها در شرایط استاندارد حیوان خانه شامل دمای ثابت (۲۳ درجه سانتی گراد)، رطوبت نسبی ۵۵٪، و چرخه های ۱۲ ساعته روشنایی/تاریکی با دسترسی آزاد به غذا و آب نگهداری شدند. پس از یک دوره سازگاری ۷ روزه، موش ها به صورت تصادفی به ۵ گروه تقسیم شدند (هر گروه شامل ۵ موش). برای القای تومور، ۱ × ۱۰^۵ سلول توموری C3 (HPV16-positive, murine epithelial tumor cell line) در حجم ۱۰۰ میکرولیتر PBS (Phosphate-buffered saline) به صورت زیرپوستی در ناحیه پهلوی راست بدن هر موش تزریق شد. در روز هفتم پس از تزریق، تومورهایی با حجم حدود ۵۰ میلی متر مکعب در ناحیه تزریق مشاهده شد که ورود به فاز درمان را ممکن ساخت (۴۳).

آنزیم *BbsI* (New England Biolabs, USA) و کنور پلاسمید PX460 و PX460 (Addgene, USA) کلون شدند. پلاسمیدهای نوترکیب (E6-PX460، E7-PX460 و E5-PX460) به داخل سلولهای مستعد DH5α ترانسفورم شدند و برای ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. استخراج پلاسمیدها از کلونی های بدست آمده توسط کیت استخراج پلاسمید (یکتا تجهیز آزما، ایران) صورت گرفت و توسط توالی یابی سنکر تأیید شد. برای تهیه نانوذرات DNA/پپتید HR9، محلول پپتید (HR9, GenScript, USA) به یک میکروگرم از PX460، E5-PX460، E6-PX460 یا E7-PX460 در نسبت های N/P (Nitrogen to Phosphate ratio) یعنی نسبت تعداد گروه های آمینی (N) در مناسبت کاتیونی به تعداد گروه های فسفات (P) در مولکول DNA مختلف (۱:۱، ۲:۱، ۵:۱ و ۱۰:۱) اضافه شد و تشکیل کمپلکس ها توسط الکتروفورز ژل تأخیری بررسی شد. سپس در نسبت تعیین شده تشکیل کمپلکس بر اساس الکتروفورز ژل تأخیری، بار سطحی ذرات توسط زتا سایزر (Malvern Zetasizer Nano ZS device, England Instruments) و اندازه آنها با استفاده از میکروسکوپ الکترونی

تحلیل آماری

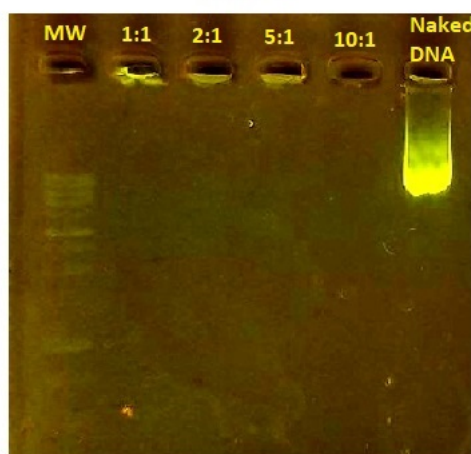
نتایج آپتوز و کاسپاز بین گروه‌های مختلف مورد بررسی در این مطالعه، با استفاده از روش ANOVA یک طرفه (نرم افزار GraphPad، Prism 9.0) تحلیل شد. تفاوت معنی دار آماری با p -value کمتر از ۰/۰۵ تعیین شد.

یافته‌ها

تشکیل کمپلکس‌های HR9/DNA و تعیین خواص فیزیکی و شیمیایی

تشکیل کمپلکس بین پپتید HR9 و وکتورهای نو ترکیب PX460 در نسبت‌های مختلف N/P مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج ما نشان داد که مولکول‌های DNA در نسبت N/P برابر با ۲ بر روی ژل آگارز مهاجرت نکردند که نشانگر تشکیل کمپلکس‌های پپتید/DNA است (شکل ۱). علاوه بر این، بارهای سطحی مثبت ۱۹/۴، ۱۸/۹ و ۱۸/۷ میلی‌ولت برای HR9/E7-PX460، HR9/E6-PX460 و HR9/E5-PX460 به ترتیب توسط زتاسایزر به دست آمد، در حالی که بار منفی ۶/۷۹ میلی‌ولت برای وکتور خالی تعیین شد. اندازه نانوذرات HR9/E5-PX460، HR9/E7-PX460 و PX460 بین ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر توسط میکروسکوپ الکترونی تعیین شد (شکل ۲).

PX460-E5

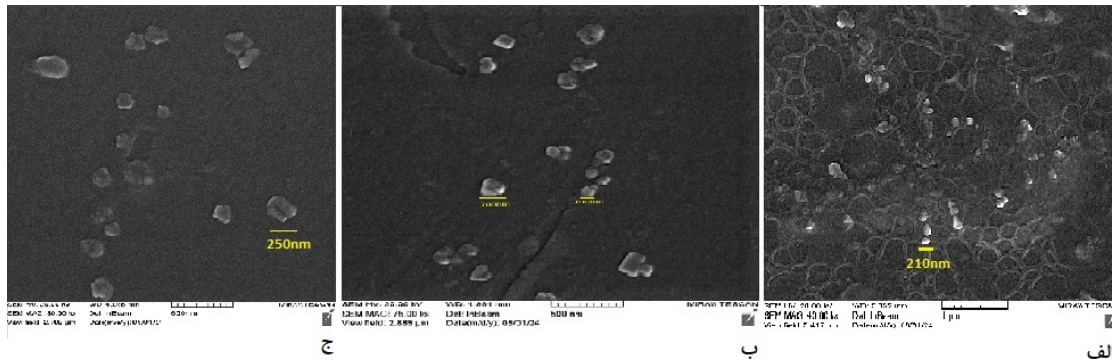


شکل ۱. تشکیل کمپلکس‌های با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز: چاهک شماره ۱: شاخص وزن مولکولی / چاهک‌های شماره ۲ الی ۵: کمپلکس‌های HR9/PX460-E5 در نسبت‌های N/P برابر با ۱:۱، ۲:۱، ۵:۱ و ۱۰:۱ / چاهک شماره ۶: پلاسمید PX460-E5 (کنترل آزاد)؛ بر روی ژل آگارز ۱٪.

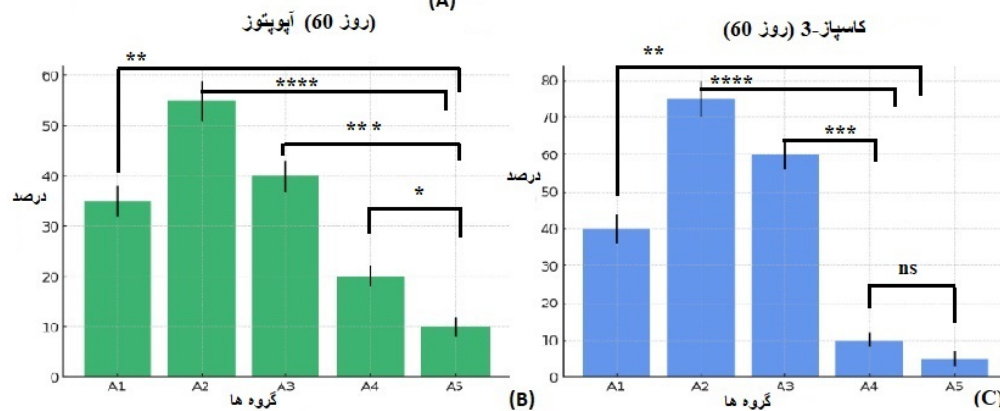
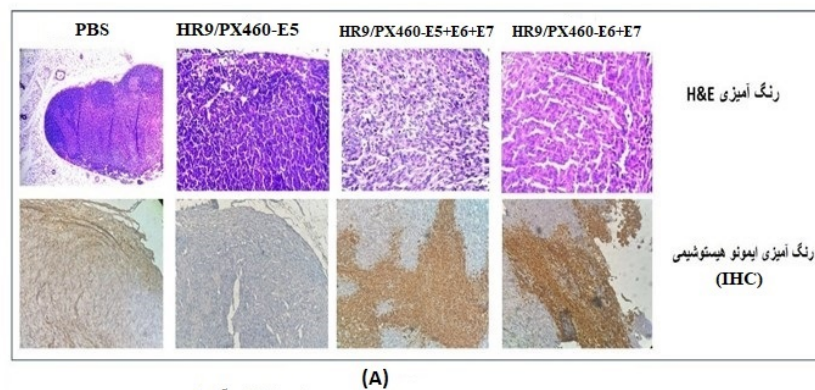
تمامی مراحل تحقیق مطابق با اصول اخلاقی و دارای مجوز رسمی از کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی (شناسه: IR.IAU.SRB.REC.1403.022)، انجام گرفت.

بررسی اثرات ضد توموری نانوذرات PX460/HR9 و ارزیابی بافت‌شناسی

برای بررسی اثرات ضد توموری نانوذرات HR9/PX460 حاوی وکتورهای CRISPR/Cas9، موش‌های ماده C57BL/6 به صورت زیرپوستی با رده سلول توموری C3 در ناحیه فلانک راست بدن، با غلظت 1×10^5 سلول در ۱۰۰ میکرولیتر PBS، تزریق شدند. پس از تشکیل تومور با حجم تقریبی ۵۰ میلی‌متر مکعب (در حدود روز هفتم)، تزریق‌های داخل توموری نانوذرات HR9/PX460 دوز ۱۰ میکروگرم DNA و نسبت N/P برابر ۲ در سه بازه زمانی ۷، ۲۱ و ۳۰ روز پس از تزریق سلول توموری انجام گرفت (مطابق جدول ۲). نانوذرات تهیه شده حاوی وکتور PX460 دارای توالی‌های اختصاصی sgRNA برای هدف‌گیری ژن‌های انکوژنیک E5، E6 و E7 ویروس HPV16 بودند. در روز ۶۰ پس از تزریق سلول توموری و تکمیل مراحل درمان، موش‌ها قربانی شده و تومورهای برداشت شده برای تحلیل‌های بافت‌شناسی مورد پردازش قرار گرفتند. نمونه‌های بافتی ابتدا با فرمالین ۱۰٪ فیکس و سپس در پارافین قالب‌گیری شدند. از بلوک‌های پارافینه، برش‌های ۳ میکرومتری تهیه و اسلایدهای شیشه‌ای آماده گردید. برای رنگ‌آمیزی ایمنوهیستوشیمی (IHC: Immunohistochemistry)، ابتدا دپارافینه‌سازی با زایلن و سپس رفیق‌سازی‌های متوالی با اتانول جهت هیدراته‌سازی انجام شد. پس از آن، استخراج آنتی‌ژن (Antigen Retrieval) با استفاده از محلول بافر سیترات (pH=6) در دمای بالا انجام گرفت تا اپی‌توپ‌های پروتئینی جهت اتصال آنتی‌بادی در دسترس قرار گیرند. اسلایدها با آنتی‌بادی مونوکلونال خرگوشی ضد کاسپاز-۳ (Cleaved Caspase-3) تیمار و سپس با محلول مسدودکننده پراکسیداز به منظور حذف فعالیت آنزیمی غیراختصاصی و کاهش نویز زمینه‌ای، پیش‌پردازش شدند. از پلیمرهای ثانویه چندظرفیتی برای شناسایی آنتی‌بادی اولیه استفاده شد. در رنگ‌آمیزی H&E (Hematoxylin and eosin stain) نیز از هماتوکسیلین جهت رنگ‌آمیزی هسته‌ها بهره گرفته شد که شدت رنگ‌پذیری آن با مقدار DNA در هسته ارتباط مستقیم دارد. برای تحلیل کمی، از هر اسلاید پنج میدان تصادفی در بزرگ‌نمایی ۴۰۰X توسط میکروسکوپ نوری AmScope T490B (AmScope, USA) بررسی شد و تعداد سلول‌های مثبت با استفاده از نرم‌افزار تحلیل تصویری ImageJ (NIH, USA) شمارش و ثبت شد.



شکل ۲. تصویر SEM از نانوذرات (الف) HR9/PX460-E7، (ب) HR9/PX460-E5 و (ج) HR9/PX460-E5-PX460 با بزرگنمایی 7×10^4 . قطر نانوذرات در نسبت N/P برابر با 2، حدود رنج ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر بود.



شکل ۳. (A) رنگ آمیزی ایمنو هیستوشیمی مقاطع بافتی تومورهای حاصل از سلول‌های C3 در گروه‌های مختلف، با استفاده از آنتی‌بادی مونوکلونال ضد کاسپاز-۳ و هماتوکسیلین/ئوزین (H&E). به دلیل شباهت ظاهری بین گروه کنترل ۴ (وکتور خالی PX460) و گروه کنترل ۵ (PBS)، تنها تصویر یکی از آن‌ها به نمایش درآمده است. (B) درصد سلول‌های آپوپتوتیک در گروه‌های تحت تیمار با نانوذرات CRISPR/Cas9 در روز ۶۰ بر اساس ارزیابی ایمنو هیستوشیمی. (C) میزان بیان کاسپاز-۳ فعال شده در بافت‌های توموری در گروه‌های درمانی مختلف (A1 تا A5) در روز ۶۰، به عنوان شاخصی از القای آپوپتوز. گروه‌ها: A1: HR9/PX460-E5، A2: HR9/PX460-E6+E7، A3: HR9/PX460-E5+E6+E7، A4: وکتور خالی PX460، A5: PBS. داده‌ها به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (SD) از سه تکرار مستقل گزارش شده‌اند. تحلیل آماری با آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه (One-way ANOVA) انجام شده است. $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ ، $p < 0.001$ ، $p < 0.0001$ ؛ ns: اختلاف آماری غیرمعنی‌دار.

بحث

سیستم CRISPR/Cas9 در درمان سرطان‌های مرتبط با ویروس پاپیلومای انسانی (HPV) مورد ارزیابی قرار گرفته است. با استفاده از CRISPR/Cas9 برای هدفگیری خاص انکوژن‌های E5، E6 و E7، محققان به طور مؤثری آپوپتوز را تحریک کرده و رشد سلول‌ها را هم در محیط آزمایشگاهی و هم در حیوانات زنده مهار کرده‌اند (۱۷-۱۴). نفوذ مؤثر CRISPR/Cas9 برای موفقیت این فناوری به عنوان یک ابزار درمانی ضروری برای این تحقیق است. مطالعات آزمایشگاهی نشان داده‌اند که برداشت DNA خارجی با استفاده از پپتید HR9 برای ترنسفکت کردن سلول‌های توموری بهبود یافته است (۴۲). کارایی ترنسفکشن پلاسمیدهای CRISPR/Cas9 به دلیل اندازه بزرگ آن‌ها (بیش از ۹ کیلو باز) محدود است، به ویژه در سلول‌های توموری که ترنسفکت کردن آن‌ها دشوار است. بنابراین، پپتید HR9 برای تحویل مستقیم وکتورهای CRISPR/Cas9 نو ترکیب به تومورها تحت شرایط درون تنی استفاده شد. در حال حاضر، تحقیقات جدیدی در حال انجام است تا مکانیزم‌هایی که سلول‌ها از طریق آن‌ها پپتیدهای نفوذکننده سلولی (CPPs) را برداشت می‌کنند، بررسی شود. علاوه بر این مشخص شده است که اکثر پپتیدهای نفوذکننده سلولی (CPPs) از روش‌های مختلفی برای ورود به سلول‌ها استفاده می‌کنند، همان‌طور که توسط تحقیقات مختلف نشان داده شده است (۲۳-۲۲). انتقال مستقیم غشایی، که به عنوان نفوذ مستقیم نیز شناخته می‌شود، یک مکانیزم سریع و مستقل از انرژی است، در حالی که اندوسیتوز که شامل فاگوسیتوز و پینوسیتوز می‌شود، یک فرآیند وابسته به انرژی است (۲۴). عزیزاده و همکاران نشان دادند که حمل و نقل DNA کد کننده ژن NS3 هیپاتیت C به داخل سلول‌های HEK-293T با استفاده از پپتید HR9 افزایش یافته است. علاوه بر این، نشان داده شد که هم پپتید HR9 و هم کمپلکس‌های HR9/DNA دارای سمیت کم هستند (۲۷). در این مطالعه، کارایی درمان در موجودات زنده با تزریق رده سلول‌های توموری C3 به موش‌های C57BL/6 و انتقال وکتورهای CRISPR/Cas9 نو ترکیب ارزیابی شد. رده سلولی C3 از بین مجموعه‌ای از رده‌های سلولی سرطان گردن رحم HPV16 انتخاب شد زیرا دارای کل ژنوم HPV16 شامل همان پروموتور و تمام ژن‌های اولیه مانند E5، E6 و E7 بود (۳۱-۲۸). نتایج تحقیق ما نشان داد که گروه درمان شده با E6+E7-PX460/HR9 کاهش قابل توجهی در حجم تومور نسبت به

بررسی اثرات ضد توموری نانوذرات HR9/PX460

تأثیر وکتورهای نو ترکیب PX460/CRISPR-Cas9 حاوی gRNAهای هدفگیرنده ژن‌ها E6+E7، E5+E6+E7 و E5 به تنهایی، بر رشد تومور و نرخ بقای موش‌ها، به مدت ۶۰ روز پس از تلقیح زیر پوستی سلول‌های توموری C3 (HPV16-positive) ارزیابی شد. زمانی که حجم تومور به حدود ۵۰ میلی‌متر مکعب رسید (تقریباً در روز هفتم پس از تزریق سلول)، تزریق داخل توموری نانوذرات حاوی ۱۰ میکروگرم DNA پلاسمیدی با پپتید HR9 در نسبت N/P 2=، در روزهای ۷، ۱۴ و ۲۱ انجام گرفت. نتایج نشان داد که گروه درمانی (E5+E6+E7-PX460/HR9) A3 در ۲۱ روز اول پس از تلقیح هیچ نشانه‌ای از تشکیل تومور نشان نداد، اما رشد تومور از روز ۲۱ به بعد آغاز شد. در مقابل، گروه‌های کنترل A4 (وکتور خالی PX460) و A5 (PBS) علائم رشد تومور را در هفته اول نشان دادند و تمامی حیوانات این دو گروه تا روز ۴۲ تلف شدند. در حالی که گروه‌های درمانی A1 تا A3 همگی تا پایان دوره آزمایش (روز ۶۰) زنده ماندند. تحلیل آماری نشان داد که گروه A2 (E6+E7-PX460/HR9) کاهش معنی‌دار آماری در اندازه تومور نسبت به سایر گروه‌ها داشت ($p < 0.001$) و بهترین پاسخ درمانی را نشان داد. همچنین، تحلیل‌های هیستوپاتولوژیک (H&E) و ایمنو هیستوشیمی (IHC) نشان دادند که در گروه‌های درمانی، سلول‌ها از حالت چندهسته‌ای غیرطبیعی به سلول‌های تک‌هسته‌ای با هسته و سیتوپلاسم مشخص تبدیل شده‌اند. تغییرات بافتی مانند حضور سلول‌های استرومال آتروفیک، غدد کوچک با هایپرپلازی، سلول‌های اپی‌لیال پراکنده و کاهش چگالی هسته‌ای در گروه‌های درمانی مشاهده شد. این در حالی است که گروه‌های کنترل، رشد تومور پیشرفته‌تری با سلول‌های چندهسته‌ای، هسته‌های متراکم، سلول‌های مکعبی بدخیم، و حضور واضح فیبروبلاست‌های کروی شکل با هسته‌های تیره نشان دادند. از نظر میزان القای آپوپتوز، گروه A2 (E6+E7-PX460/HR9) بالاترین میزان سلول‌های مثبت برای کاسپاز-۳ را داشت ($p < 0.001$)، که به صورت معنی‌دار از سایر گروه‌ها بیشتر بود. پس از آن، گروه A3 (E5+E6+E7-PX460/HR9) با اختلافی کمتر، در رتبه دوم قرار گرفت ($p < 0.01$). این نتایج بیانگر اثر معنی‌دار درمان‌های هدفمند بر کاهش رشد تومور و افزایش آپوپتوز در مقایسه با گروه‌های کنترل است (شکل ۳).

حجم تومور مشاهده شده با وکتورهای نو ترکیب، افزایش آپوپتوز و مرگ سلولی است. سطوح رنگ آمیزی پروتئین کاسپاز-۳ در نواحی مرکزی و محیطی بدخیمی افزایش یافته است. گروه تیمار شده با E6+E7-PX460 (A2) به عنوان مؤثرترین درمان در میان گروههای تحت تیماردیگر و کنترل تعیین شد.

کمیت سنجی سلولهای بدخیم نشان داد که گروه کنترل ۵ (PBS1X) بیشترین تعداد سلولهای توموری را نشان داد که عدم مداخله درمانی را برجسته می کند. پس از آن گروه E5 (A1) قرار داشت، که نشان می دهد E5 به تنهایی تأثیر محدودی بر کاهش تکثیر تومور دارد. گروه E5+E6+E7 (A3) کاهش متوسطی در تکثیر تومور نشان داد. گروه E7+E6 (A2) بیشترین تأثیر درمانی را نشان داد. تجزیه و تحلیل سلولهای آپوپتوتیک نشان داد که گروه E7+E6 بالاترین القای آپوپتوز را داشت. این امر نشان دهنده اثر قوی پروآپوتوتیک نانوذرات E6+E7-PX460/HR9 (A2) بر روی سلولهای توموری است. این امر نشان دهنده اثر قابل توجه پروآپوتوتیک نانوذرات E6+E7-PX460/HR9 (A2) بر روی سلولهای توموری است. این یافته با مسیرهای انکوژنیک شناخته شده همخوانی دارد؛ به طوری که مهار پروتئین رتینوبلاستوما (pRb) توسط E7 منجر به اختلال در چرخه سلولی، و تخریب پروتئین p53 توسط E6 مانع از القای طبیعی آپوپتوز می شود (۴۱). هرچند این نتایج اولیه نشان دهنده پتانسیل درمانی قابل توجه این ترکیب هستند، اما برای مقایسه قطعی آن با درمانهای رایج مانند شیمی درمانی (از جمله سیس پلاتین)، انجام مطالعات بیشتر و جامع تر ضروری است.

نتیجه گیری کلی

در این مطالعه، کارایی سیستم CRISPR/Cas9 در هدف گیری همزمان سه انکو پروتئین کلیدی ویروس HPV16 (E5، E6 و E7) در یک مدل توموری موش C57BL/6 بررسی شد. نتایج نشان داد که استفاده از پپتید نفوذکننده HR9 برای انتقال نانوذرات حاوی وکتور PX460/CRISPR به طور مؤثر موجب انتقال ژن به بافت توموری در شرایط درون تنی گردید و این روش انتقال، از نظر زیستی، پایدار، کم سم و انتخاب گر عمل کرد. توانایی HR9 در عبور از غشای سلولی و تحویل مؤثر کمپلکس های نو ترکیب بدون نیاز به ناقل های ویروسی، آن را به گزینه ای ارزشمند در توسعه روش های نوین درمان ژنی تبدیل می کند. بر اساس نتایج پاتولوژیکی و ایمنو هیستوشیمی، گروه درمانی دریافت کننده CRISPR هدف گیرنده ژن های E6+E7 (گروه A2) بیشترین القای

سایر گروه ها داشت. به علاوه، با توجه به نتایج، پپتید HR9 توانست با تشکیل کمپلکس های پایدار با وکتورهای PX460 در نسبت N/P برابر با ۲ به طور مؤثری وارد سلول های توموری شود. اندرسون و همکاران تحقیقی انجام دادند که در آن آنزیم NfnB-Cys را با CPP HR9 ترکیب کردند که منجر به افزایش مرگ سلولی در آزمایش زنده مانی شد. پپتید HR9 تأثیر قابل توجهی در ورود NfnB-Cys داشت. علت این تأثیر ممکن است به بار مثبت بالای کمپلکس ایجاد شده نسبت داده شود (۳۳). ارزیابی های کمی متعدد نشان دادند که کارایی ترنس فکشن سه CPP غنی از آرژنین: HR9، PR9 و SR9 متفاوت بوده است (HR9>PR9>SR9). از بین تمام سلول ها/موجودات آزمایش شده، HR9 بالاترین کارایی ترنس فکشن را داشت. زیرا می تواند مستقیماً به غشاها نفوذ کند. تصور می شود که پپتید HR9 نقش منحصر به فردی در حمل و نقل سلولی دارد (۱۸، ۳۴، ۳۵). تحقیقات بیشتر نشان داد که DNA پلاسمیدی به طور مؤثر توسط CPP های غنی از آرژنین (SR9، HR9 و PR9) به داخل سلول های Sf9 (مربوط به باکلو ویروس) منتقل شد و سپس DNA در داخل سلول ها بیان شد (۳۵، ۳۶). مطالعه ما نشان داد که HR9 توانست وکتورهای CRISPR/Cas9 را وارد سلول های توموری C3 کند.

مطالعات متعددی نشان داده اند که پتانسیل زتا (Zeta potential) کمپلکس ها تأثیر عمده ای بر کارایی ترنس فکشن دارد. از سوی دیگر، نفوذ پذیری سلولی تحت تأثیر اندازه ذرات قرار نمی گیرد. در این تحقیق، پپتید HR9 با وکتورهای خالی و نو ترکیب CRISPR/Cas9 نانوذرات پایداری با نسبت N/P برابر با ۲ ایجاد کرد. کمپلکس های CRISPR/HR9 به اندازه ۱۰۰ تا ۲۵۰ نانومتر، دارای بار مثبت بودند. این نتایج نشان داد که اندازه کمپلکس CRISPR/HR9 و بارهای مثبت از اجزای مهم برای عبور پروتئین از غشای سلول های توموری هستند. نمازی و همکاران نشان دادند که pEGFP-Nef با بار منفی که با HR9 با بار مثبت ترکیب شده، کمپلکس های با بار مثبت تولید می کند که قادر به عبور از غشای سلولی هستند (۳۸). نتایج آن ها همچنین نشان داد که اندازه و بار مثبت کمپلکس های pEGFP-Nef/HR9 در تسهیل حمل و نقل از طریق غشای سلول های HEK-293T بسیار مهم است. علاوه بر این، سمیت ناچیز کمپلکس های HR9/DNA در نسبت N/P مشخص برابر با ۲ را نشان دادند (۳۸). تحقیقات قبلی نشان داده اند که تعادل بین تکثیر سلولی و مرگ ممکن است در محدود کردن رشد تومور حیاتی باشد (۳۹، ۴۰). تجزیه و تحلیل داده های IHC نشان داد که علت اصلی کاهش

همزمان E6 و E7 با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 انتقال‌یافته توسط HR9 می‌تواند یک راهکار درمانی مؤثر در کاهش رشد تومور و القای آپوپتوز باشد. با این حال، برای اعتبارسنجی این یافته‌ها در سایر مدل‌های حیوانی و همچنین بررسی عملکرد HR9 در ترکیب با دیگر بارهای ژنی، مطالعات گسترده‌تری مورد نیاز است.

آپوپتوز و کاهش رشد تومور را نشان داد ($p < 0.001$)، که پس از آن، گروه درمانی با ترکیب سه‌گانه E5+E6+E7 (A3) با کارایی نسبتاً پایین‌تر قرار گرفت. گروه هدف‌گیرنده E5 به‌تنهایی (A1) نیز نسبت به گروه‌های کنترل (A4 و A5) پاسخ بهتری داشت، اما از نظر آماری تفاوت معنی‌دار کمتری نشان داد. در مجموع، این نتایج بیانگر آن است که هدف‌گیری

REFERENCES

- Choi S, Ismail A, Pappas-Gogos G, Boussios S. HPV and cervical cancer: A review of epidemiology and screening uptake in the UK. *Pathogens* 2023;12:298.
- Na J, Li Y, Wang J, Wang X, Lu JL, Han S. The correlation between multiple HPV infections and the occurrence, development, and prognosis of cervical cancer. *Front Microbiol* 2023;14:1220522.
- Münger K, Baldwin A, Edwards KM, Hayakawa H, Nguyen CL, Owens M, et al. Mechanisms of human papillomavirus-induced oncogenesis. *J Virol* 2004;78:11451-60.
- Moody CA, Laimins LA. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. *Nat Rev Cancer* 2010;10:550-60.
- Torres AD, Spurgeon ME, Bilger A, Blaine-Sauer S, Uberoi A, Buehler D, et al. The human papillomavirus 16 E5 gene potentiates MmuPV1-Dependent pathogenesis. *Virology* 2020;541:1-12.
- Collins NB, Al Abosy R, Miller BC, Bi K, Zhao Q, Quigley M, et al. PI3K activation allows immune evasion by promoting an inhibitory myeloid tumor microenvironment. *J Immunother Cancer* 2022;10:e003402.
- Scott ML, Woodby BL, Ulicny J, Raikhy G, Orr AW, Songock WK, et al. Human Papillomavirus 16 E5 Inhibits Interferon Signaling and Supports Episomal Viral Maintenance. *J Virol* 2020;94:e01582-19.
- Brea EJ, Oh CY, Manchado E, Budhu S, Gejman RS, Mo G, et al. Kinase Regulation of Human MHC Class I Molecule Expression on Cancer Cells. *Cancer Immunol Res* 2016;4:936-47.
- Bonami JR, Widada JS. Viral diseases of the giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*: a review. *J Invertebr Pathol* 2011;106:131-42.
- Jendoubi-Ferchichi M, Satouri L, Ghouf F, Malek-Mellouli M, Derbel AM, Makni MK, et al. Phylogeny and classification of human papillomavirus (HPV) 16 and HPV18 variants based on E6 and L1 genes in Tunisian women with cervical lesions. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018;19:3361.
- Sausen DG, Shechter O, Gallo ES, Dahari H, Borenstein R. Herpes simplex virus, human papillomavirus, and cervical cancer: Overview, relationship, and treatment implications. *Cancers* 2023;15(14):3692.
- Zhang A, Zheng X, Chen S, Duan G. In vitro study of HPV18-positive cervical cancer HeLa cells based on CRISPR/Cas13a system. *Gene* 2024;921:148527.
- Zhan X, Zhou J, Jiang Y, An P, Luo B, Lan F, et al. DNA tetrahedron-based CRISPR bioassay for treble-self-amplified and multiplex HPV-DNA detection with elemental tagging. *Biosens Bioelectron* 2023;229:115229.
- Zhao Y, Chen D, Xu Z, Li T, Zhu J, Hu R, et al. Integrating CRISPR-Cas12a into a microfluidic dual-droplet device enables simultaneous detection of HPV16 and HPV18. *Anal Chem* 2023;95:3476-85.
- Öktem M, Mastrobattista E, de Jong OG. Amphipathic cell-penetrating peptide-aided delivery of Cas9 RNP for in vitro gene editing and correction. *Pharmaceutics* 2023;15:2500.
- Liu Q, Yang J, Xing Y, Zhao Y, Liu Y. Development of delivery strategies for CRISPR-Cas9 genome editing. *BMEMat* 2023;1:e12025.
- Chong ZX, Yeap SK, Ho WY. Transfection types, methods and strategies: a technical review. *PeerJ* 2021;9:e11165.
- Liu MJ, Chou JC, Lee HJ. A gene delivery method mediated by three arginine-rich cell-penetrating peptides in plant cells. *Adv Stud Biol* 2013;5:71-88.
- Hasannejad-Asl B, Pooremaeil F, Takamoli S, Dabiri M, Bolhassani A. Cell penetrating peptide: A potent delivery system in vaccine development. *Front Pharmacol* 2022;13:4834.
- Sinclair F, Begum AA, Dai CC, Toth I, Moyle PM. Recent advances in the delivery and applications of nonviral CRISPR/Cas9 gene editing. *Drug Deliv Transl Res* 2023;13:1500-19.

21. Azadbakht N, Doosti A, Jami MS. CRISPR/Cas9-mediated LINC00511 knockout strategies, increased apoptosis of breast cancer cells via suppressing antiapoptotic genes. *Biol Proced Online* 2022;24:8.
22. Moret I, Esteban Peris J, Guillem VM, Benet M, Revert F, Dasi F, et al. Stability of PEI-DNA and DoTAP-DNA complexes: Effect of alkaline pH, heparin and serum. *J Control Release* 2001;76:169-82.
23. Sadeghian F, Hosseinkhani S, Alizadeh A, Hatefi A. Design, engineering and preparation of a multi-domain fusion vector for gene delivery. *Int J Pharm* 2012;427:393-9.
24. Zhen S, Li X. Oncogenic human papillomavirus: application of CRISPR/Cas9 therapeutic strategies for cervical cancer. *Cell Physiol Biochem* 2018;44:2455-66.
25. Borrelli A, Tornesello AL, Tornesello ML, Buonaguro FM. Cell penetrating peptides as molecular carriers for anti-cancer agents. *Molecules* 2018;23:295.
26. Hooshmand SE, Sabet MJ, Hasanzadeh A, Kamrani Mousavi SM, Haeri Moghaddam N, Hooshmand SA, et al. Histidine-enhanced gene delivery systems: The state of the art. *J Gene Med* 2022;24:e3415.
27. Alizadeh S, Irani S, Bolhassani A, Sadat SM. HR9: An important cell penetrating peptide for delivery of HCV NS3 DNA into HEK-293T cells. *Avicenna J Med Biotechnol* 2020;12:44.
28. Sahab Z, Sudarshan SR, Liu X, Zhang YY, Kirilyuk A, Kamonjoh CM, et al. Quantitative measurement of human papillomavirus type 16 e5 oncoprotein levels in epithelial cell lines by mass spectrometry. *J Virol* 2012;86:9465-73.
29. Paolini F, Amici C, Carosi M, Bonomo C, Di Bonito P, Venuti A, et al. Intrabodies targeting human papillomavirus 16 E6 and E7 oncoproteins for therapy of established HPV-associated tumors. *J Exp Clin Cancer Res* 2021;40:1-11.
30. Li LL, Wang HR, Zhou ZY, Luo J, Wang XL, Xiao XQ, et al. C3-Luc cells are an excellent model for evaluation of cellular immunity following HPV16L1 vaccination. *PLoS One* 2016;11:e0149748.
31. Jubair L, Lam AK, Fallaha S, McMillan NAJ. CRISPR/Cas9-loaded stealth liposomes effectively cleared established HPV16-driven tumours in syngeneic mice. *PLoS One* 2021;16:e0223288.
32. Liu BR, Lin MD, Chiang HJ, Lee HJ. Arginine-rich cell-penetrating peptides deliver gene into living human cells. *Gene* 2012;505:37-45.
33. Anderson SD, Hobbs RJ, Gwenin VV, Ball P, Bennie LA, Coulter JA, et al. Cell-penetrating peptides as a tool for the cellular uptake of a genetically modified nitroreductase for use in directed enzyme prodrug therapy. *J Funct Biomater* 2019;10:45.
34. Liu BR, Chiou SH, Huang YW, Lee HJ. Bio-membrane internalization mechanisms of arginine-rich cell-penetrating peptides in various species. *Membranes* 2022;12:88.
35. Huang YW, Lee HJ, Tolliver LM, Aronstam RS. Delivery of nucleic acids and nanomaterials by cell-penetrating peptides: opportunities and challenges. *Biomed Res Int* 2015;2015:834079.
36. Liu BR, Chen HH, Lo S, Huang YW, Lee HJ. Effects of surface charge and particle size of cell-penetrating peptide/nanoparticle complexes on cellular internalization. *Cell Membranes* 2013:43-57.
37. Laufer S, Restle T. Peptide-mediated cellular delivery of oligonucleotide-based therapeutics in vitro: quantitative evaluation of overall efficacy employing easy to handle reporter systems. *Curr Pharm Des* 2008;14:3637-55.
38. Namazi F, Bolhassani A, Sadat SM, Irani S. In vitro delivery of HIV-1 Nef antigen by histidine-rich nona-arginine and latarcin 1 peptide. *J Med Microbiol Infect Dis* 2019;7:107-15.
39. Mattern J, Volm M. Imbalance of cell proliferation and apoptosis during progression of lung carcinomas. *Anticancer Res* 2004;24:4243-6.
40. Khairkhan N, Bolhassani A, Rajaei F, Najafipour R. Systemic delivery of specific and efficient CRISPR/Cas9 system targeting HPV16 oncogenes using LL-37 antimicrobial peptide in C57BL/6 mice. *J Med Virol* 2023;95:e28934.
41. Lei J, Sun L, Huang S, Zhu C, Li P, He J, et al. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res* 2019;11:3919-31.
42. Manteghi M, Can O, Kocagöz T. Peptosome: A New Efficient Transfection Tool as an Alternative to Liposome. *Int J Mol Sci* 2024;25:6918.
43. Kim JH, Park HS, et al. CRISPR/Cas9-mediated targeting of HPV16 E6 and E7 induces apoptosis and growth inhibition in cervical cancer cells via p53 reactivation. *Int J Mol Sci* 2019;20:4763.