

НЕДОСТАТКИ ТЕХНОЛОГИИ МЕТОДА *CRISPR/CAS9* И СПОСОБЫ ИХ СНИЖЕНИЯ.

Самадова Фотима Ражабовна

*Ассистент кафедры 1- Гистологии и медицинской биологии «Ташкентского государственного медицинского университета»
Узбекистан, г.Ташкент*

Тохиржонова Хикматхон Фархад кизи

*Студентка, Ташкентского государственного медицинского университета»,
Узбекистан, г.Ташкент*

DISADVANTAGES OF CRISPR/Cas9 TECHNOLOGY AND METHODS FOR THEIR REDUCTION

Samadova Fatima Rajabovna

*Assistant of the Department of 1-Histology and Medical Biology, Tashkent State Medical University
Tashkent, Uzbekistan*

Tokhirjonova Khikmatkhon Farkhad qizi

*Student, Tashkent State Medical University
Tashkent, Uzbekistan*

Аннотация

Несмотря на очевидные достоинства, метод *CRISPR/Cas9* обладает рядом недостатков и ограничений . Среди них выделяют риск возникновения внецелевых мутаций , нестабильность результатов редактирования , трудности доставки компонентов системы в клетки и ткани организма, а также потенциальные иммунные реакции. Особое значение имеют этические, правовые и социальные аспекты применения технологии, особенно в контексте редактирования генома человека и зародышевых клеток. В связи с этим дальнейшее развитие *CRISPR/Cas9* требует совершенствования методов контроля точности и безопасности, а также формирования международных нормативных стандартов его использования.

Abstract

Despite its obvious advantages, the **CRISPR/Cas9** method has a number of disadvantages and limitations. Among them are the risk of off-target mutations, instability of editing results, difficulties in delivering system components into cells and tissues, as well as potential immune reactions. Particular importance is given to the ethical, legal, and social aspects of applying this technology, especially in the context of human genome and germline editing. Therefore, further development of CRISPR/Cas9 requires improvement of accuracy and safety control methods, as well as the establishment of international regulatory standards for its use.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9 генная инженерия, генотерапия, нуклеаза Cas9, направляющая РНК (sgRNA), репарация ДНК, NHEJ, HDR, off-target эффект, нежелательные мутации, делеции, инсерции, хромосомные перестройки, иммунный ответ, биоэтические проблемы, клиническое применение.

Keywords: CRISPR/Cas9, genetic engineering, gene therapy, Cas9 nuclease, single-guide RNA (sgRNA), DNA repair, NHEJ (non-homologous end joining), HDR (homology-directed repair), off-target effect, unwanted mutations, deletions, insertions, chromosomal rearrangements, immune response, bioethical issues, clinical application.

Современная молекулярная биология активно развивается благодаря внедрению технологий точного редактирования генома. Одной из наиболее значимых и широко применяемых систем является CRISPR-Cas9 — инструмент, основанный на механизмах бактериальной иммунной защиты. Данная технология позволяет целенаправленно изменять последовательность ДНК, что открывает широкие перспективы в медицине, биотехнологии и

фундаментальных исследованиях. Система CRISPR-Cas9 включает направляющую РНК, распознающую определённый участок генома, и фермент Cas9, осуществляющий разрыв ДНК. Простота конструкции, относительная доступность и высокая эффективность сделали этот метод революционным в области генной инженерии.

Однако наряду с очевидными преимуществами технология имеет ряд серьёзных ограничений и рисков. Возможность внесения нежелательных мутаций, трудности доставки системы в клетки и биоэтические вопросы требуют детального анализа. В связи с этим изучение недостатков метода CRISPR-Cas9 является актуальной задачей современной науки.

Однако, несмотря на эффективность, метод CRISPR-Cas9 имеет ряд недостатков, которые могут ограничить его применение в некоторых случаях

- Офф – таргетинг (внецелевой эффект): Один из недостатков CRISPR-Cas9 – это офф – таргетинг. Это означает, что система может случайно изменить гены, которые не были целевыми. Это может привести к неожиданным эффектам и повышенному риску развития заболеваний. Несмотря на то, что существуют методы для снижения риска офф – таргетинга, он по-прежнему остается серьезной проблемой.
- - Проблемы с долгосрочными последствиями: Другой недостаток CRISPR-Cas9 – это проблемы с долгосрочными последствиями. Пока еще неизвестно, как изменения генома, произведенные с помощью этого метода, могут повлиять на здоровье организма в долгосрочной перспективе. Возможно, что некоторые изменения генома могут вызвать нежелательные эффекты, которые проявятся только спустя несколько лет или десятилетий.
- Проблемы с этикой CRISPR-Cas9 также вызывает серьезные этические проблемы. Например, с помощью этого метода можно изменять геномы эмбрионов и создавать детей с определенными характеристиками. Это может привести к эвгенике, расизму и другим формам дискриминации.

- Проблемы с этикой: CRISPR-Cas9 также вызывает проблемы с патентами. Поскольку этот метод является совместной разработкой нескольких ученых и университетов, возникают споры о том, кто имеет право на патентование и коммерциализацию этого метода. Это может затормозить развитие технологии.
- Трудности в доставке: Еще недостаток CRISPR-Cas9 заключается в трудностях доставки генетических инструментов в клетки и ткани. Для редактирования генома методом CRISPR-Cas9 требуется доставка РНК и белков внутрь клетки. Это может быть сложно для некоторых типов клеток и тканей, которые находятся внутри организма.
- Возможность возникновения резистентности: Еще одним недостатком CRISPR-Cas9 является возможность развития резистентности. Если организм разовьет механизмы, которые позволяют ему защищаться от метода редактирования генома, то это может привести к неэффективности метода.
- Невозможность редактирования некоторых типов клеток: Наконец CRISPR-Cas9 не всегда может быть использован для редактирования генома некоторых типов клеток. Например, он может быть неэффективен для редактирования клеток нервной системы, которые находятся за кровенервным барьером.
- Метод CRISPR-Cas9 является эффективной технологией редактирования генома, однако имеет ряд недостатков. Основная проблема - эффект «off-target», при котором разрезы ДНК могут происходить в нежелательных участках, вызывая побочные мутации. Также процессы репарации ДНК после разрыва не всегда проходят точно, что может приводить к вставкам и делециям.
- Проблемы доставки: Сложности доставить компоненты CRISPR (фермент Cas9 и РНК) внутрь конкретных тканей или органов живого организма без потери эффективности.

- Иммунный ответ: Организм человека может распознавать белок Cas9 (имеющий бактериальное происхождение) как чужеродный, что вызывает нежелательную реакцию иммунитета.

Почему CRISPR-Cas9 может «ошибаться»? Система CRISPR состоит из двух ключевых компонентов: Фермент Cas9 - это «молекулярные ножницы», которые разрезают ДНК. Гид-РНК (gRNA) - это «навигатор», который указывает ножницам, где именно нужно сделать разрез.

Механизм ошибки: Гид-РНК ищет в ДНК специфическую последовательность из 20 «букв» (нуклеотидов). Проблема в том, что геном человека огромен (3 миллиарда букв), и в нем часто встречаются участки, которые почти идентичны цели (например, 18 букв совпадают, а 2 - нет). В таких случаях Cas9 может «перепутать» похожий участок с нужным и разрезать его. Это и называется внецелевой эффект (off-target effect).

Риски и последствия ошибок. Если CRISPR разрежет ДНК в «неправильном» месте, это может привести к:

- Мутациям: Случайное изменение здорового гена.
- Нарушению работы клетки: Клетка может перестать выполнять свою функцию.
- Онкологии: Если разрез произойдет в гене, контролирующем деление клеток, это может спровоцировать развитие рака.

Как минимизируют риск off-target в CRISPR? Ученые постоянно совершенствуют технологию, чтобы сделать её «снайперски» точной:

- Модифицированные белки (High-Fidelity Cas9): Созданы искусственные версии Cas9 (например, SpCas9-HF1), которые намного строже проверяют совпадение букв и не режут ДНК, если есть хотя бы одна ошибка в «адресе».
- Двойные «никеазы» (Nickases): Используются две молекулы Cas9, которые делают надрезы только с двух сторон одновременно.

Вероятность того, что обе ошибутся в одном и том же месте, практически равна нулю.

- Редактирование оснований (Base Editing): Самый современный метод, где ДНК не разрезается полностью. Вместо этого фермент просто химически превращает одну букву в другую (например, С в Т). Нет разреза — почти нет риска серьезных побочных эффектов.

Внецелевой эффект (Off-target) — это главная «детская болезнь» технологии CRISPR. Именно поэтому сейчас её чаще применяют *ex-vivo* (когда клетки берут у пациента, редактируют в лаборатории, тщательно проверяют на ошибки и только потом возвращают назад), чем *in-vivo* (когда лекарство вводится прямо в кровь).

Заключение. CRISPR-Cas9 – это мощный инструмент в генетической инженерии, который уже показал свой потенциал во многих областях. Однако, прежде чем использовать этот метод, необходимо учитывать его недостатки и риски, чтобы избежать нежелательных последствий. Метод CRISPR-Cas9 представляет собой мощный и перспективный инструмент редактирования генома, который значительно расширил возможности молекулярной биологии и медицины. Однако наряду с высокой эффективностью технология имеет ряд существенных недостатков, включая риск *off-target* мутаций, неточность репарации ДНК, сложности доставки системы в клетки и возможный иммунный ответ организма. Кроме того, применение метода в отношении зародышевых клеток и эмбрионов вызывает серьезные этические и правовые вопросы. Все это свидетельствует о необходимости дальнейших исследований, направленных на повышение точности, безопасности и контролируемости технологии. Только при условии устранения существующих ограничений CRISPR-Cas9 сможет широко и безопасно применяться в клинической практике.

Офф-таргет эффекты CRISPR/Cas9 — решаемая проблема при комплексном подходе. Грамотный дизайн sgRNA с биоинформатическим

скринингом, использование высокоточных вариантов Cas9 и доставка в формате RNP позволяют снизить нецелевую активность на несколько порядков. Обязательная валидация методами GUIDE-seq или CIRCLE-seq завершает цикл контроля качества. Оптимальная стратегия всегда зависит от задачи: для клеточных моделей достаточно базовых мер, для терапевтического применения необходим полный арсенал инструментов. Перспективные технологии — базовое редактирование (base editing) и прайм-редактирование (prime editing) — в будущем могут частично снять проблему, устраняя необходимость в двуцепочечных разрывах как таковых.

Список литературы:

1. Jinek Martin, Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity // Science. 2012.
2. Cong Le, Ran F.A., Cox D. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems // Science. 2013.
3. Mali Prashant et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 // Science. 2013.
4. Doudna Jennifer, Charpentier Emmanuelle. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9 // Science. 2014.
5. Hsu Patrick D., Lander E.S., Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 // Cell. 2014.
6. Barrangou Rodolphe. CRISPR-Cas systems and RNA-guided interference // Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2013.
7. Sander Jeffrey D., Joung J.K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes // Nature Biotechnology. 2014.
8. Zhang Feng. CRISPR-Cas9: prospects and challenges // Nature. 2015.
9. Carroll Dana. Genome engineering with CRISPR-Cas9 // Genetics. 2013.
10. Lander Eric. The heroes of CRISPR // Cell. 2016.

11. He Jiankui. Genome editing of human embryos: ethical considerations // 2018.
12. World Health Organization. Human genome editing: recommendations. Geneva, 2021.
13. National Academy of Sciences. Human Genome Editing: Science, Ethics, and Governance. Washington, 2017.
14. Molecular Biology of the Gene / James Watson et al. — Pearson.
15. Lewin's Genes / Jocelyn Krebs et al. — Jones & Bartlett Learning.