

# Primjena biljaka, kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, algi i bakterija u proizvodnji jestivih cjepiva

---

**Puškaš, Dora**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2024**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:543702>

*Rights / Prava:* [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-07**



*Repository / Repozitorij:*

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija**

**Dora Puškaš**  
0125161391

**PRIMJENA BILJAKA, KVASCA *Saccharomyces cerevisiae*, ALGI I BAKTERIJA  
U PROIZVODNJI JESTIVIH CJEPIVA**

**ZAVRŠNI RAD**

**Predmet: Biotehnologija 4**

**Mentor: prof. dr. sc. Blaženka Kos**

**Zagreb, 2024. godina.**

## TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu  
Prehrambeno-biotehnološki fakultet  
Sveučilišni prijediplomski studij Biotehnologija

Zavod za biokemijsko inženjerstvo  
Laboratorij za tehnologiju antibiotika, enzima, probiotika i starter kultura

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti  
Znanstveno polje: Biotehnologija

Primjena biljaka, kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, algi i bakterija u proizvodnji jestivih  
cjepiva

Dora Puškaš, 0125161391

**Sažetak:** Jestiva cjepiva novi su suvremeni pristup obrane od određenih uzročnika bolesti. Iako još nisu u primjeni u humanoj medicini, pokazuju veliki potencijal u rješavanju mnogih problema povezanih s postojećim cjepivima tako što smanjuju rizik od prijenosa infekcije, nema potrebe za medicinskim osobljem za njihovu primjenu i manje su rigorozne mjere zaštite prilikom proizvodnje, izolacije, obrade, pakiranja, transporta i skladištenja. Jestiva cjepiva mogu se proizvesti integracijom odgovarajućeg transgena u odabranu biljnu stanicu, a osim biljaka, potencijal za proizvodnju ove vrste cjepiva pokazuju bakterije, kvasci i alge. Neke od biljaka korištenih za njihovu proizvodnju uključuju mrkvu, rižu, krumpir, rajčicu, salatu, soju, grašak. Bez obzira na sve prednosti, jestiva cjepiva moraju još detaljno biti istražena i ispitivana da bi postala sigurna za ljudsku konzumaciju.

**Ključne riječi:** jestiva cjepiva, GM biljke, transgeni, *Agrobacterium tumefaciens*, GM alge, kvasci i bakterije

**Rad sadrži:** 22 stranice, 3 slike, 1 tablica, 22 literaturnih navoda

**Jezik izvornika:** hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Prehrambeno-biotehnološkoga fakulteta, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** prof. dr. sc. Blaženka Kos

**Datum obrane:** 16. rujna 2024.

## BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb  
Faculty of Food Technology and Biotechnology  
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical engineering  
Laboratory for the technology of antibiotics, enzymes, probiotics and starter cultures

Scientific area: Biotechnical Sciences  
Scientific field: Biotechnology

The application of plants, the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, algae and bacteria  
in the production of edible vaccines  
Dora Puškaš, 0125161391

**Abstract:** Edible vaccines are a modern approach to defending against certain disease-causing agents. Although they are not yet used in human medicines, they show great potential by addressing many issues associated with existing vaccines, such as reducing the risk of infection transmission, eliminating the need for medical personnel for administration, and requiring less stringent protective measures during production, isolation, processing, packaging, transportation, and storage. Edible vaccines can be produced by integrating an appropriate transgene into a selected plant cell. Besides plants, bacteria, yeasts and algae also show potential for producing this type of vaccine. Some of the plants used for their production include carrots, rice, potatoes, tomatoes, lettuce, soybeans, and peas. Despite all their advantages, edible vaccines still need to be thoroughly researched and tested to ensure they are safe for human consumption.

**Keywords:** edible vaccines, GM plants, transgenes, *Agrobacterium tumefaciens*, GM algae, yeasts and bacteria

**Thesis contains:** 22 pages, 3 figures, 1 table, 22 references

**Original in:** Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

**Mentor:** Blaženka Kos, PhD, Full Professor

**Thesis defended:** September 16, 2024

## Sadržaj

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. RAZLOZI RAZVOJA JESTIVIH CJEPIVA I DEFINICIJA.....	2
2.2. KRATKI POVIJESNI PREGLED .....	2
2.3. PROIZVODNJA JESTIVIH CJEPIVA .....	3
2.3.1. IZRAVNA METODA INTEGRACIJE GENA – BIOLISTIČKA METODA	4
2.3.2. IZRAVNA METODA INTEGRACIJE GENA – ELEKTROPORACIJA	4
2.3.3. NEIZRAVNA METODA INTEGRACIJE GENA – UZ POMOĆ BAKTERIJA IZ RODA <i>AGROBACTERIUM</i>	5
2.3.4. GENETIČKI MODIFICIRANI BILJNI VIRUSI	6
2.4. PREDNOSTI JESTIVIH CJEPIVA U ODNOSU NA KONVENCIONALNA.....	6
2.5. OGRANIČENJA I NEDOSTATCI JESTIVIH CJEPIVA.....	7
2.6. BOLESTI ZA KOJE SE UPOTREBLJAVA ILI JE U ISTRAŽIVANJU JESTIVO CJEPIVO.....	8
2.6.1. HEPATITIS B	9
2.6.2. NORWALK BOLEST	10
2.6.3. OSPICE	10
2.6.4. BJESNOĆA	10
2.6.5. KOLERA	10
2.6.6. ANTRAKS	11
2.6.7. MALARIJA	11
2.6.8. ROTAVIRUSNA BOLEST	11
2.6.9. AUTOIMUNE BOLESTI	11
2.6.10. LIJEČENJE MALIGNIH TUMORA	12
2.6.11. KONTRACENCIJA	12
2.7. ČIMBENICI KOJI UTJEČU NA UČINKOVITOST JESTIVIH CJEPIVA.....	12
2.8. GENETIČKI MODIFICIRANE BAKTERIJE KAO JESTIVA CJEPIVA .....	13
2.9. BILJKE UZGAJANE KAO JESTIVA CJEPIVA .....	13
2.9.1. KRUMPIR	14
2.9.2. RAJČICA	14

2.9.3. TREŠNJE	14
2.9.4. SALATA	14
2.9.5. SOJA	15
2.9.6. GRAŠAK	15
2.9.7. BANANA	15
2.9.8. MRKVA	15
2.9.9. RIŽA	16
2.10. ALGE KAO JESTIVA CJEPIVA .....	16
2.11. PLASTIDI U PROIZVODNJI JESTIVIH CJEPIVA.....	16
2.12. KVASCI KAO JESTIVA CJEPIVA .....	17
2.13. BUDUĆNOST JESTIVIH CJEPIVA.....	18
3.ZAKLJUČCI.....	20
4.POPIS LITERATURE .....	21

## 1. UVOD

Populacija ljudi na Zemlji raste ogromnom brzinom; procjenjuje se da će do 2050. godine dostići čak 9 milijardi. Veći broj ljudi znači i veći broj međusobnih interakcija i susreta pa tako i lakšeg načina širenja zaraza i prijenosa infekcija. Za velik broj uzročnika zaraznih bolesti u primjeni su odgovarajuća cjepiva, ali problem se javlja zbog sve većeg broja novih sojeva bakterija i virusa za koje cjepivo ne postoji, kao i njihove (ne)dostupnosti čitavoj populaciji.

Što je uopće cjepivo? Cjepivo je imunološki lijek koji čine živi, dovoljno oslabljeni ili mrtvi uzročnici zaraznih bolesti (bakterije, virusi ili paraziti), njihove izlučevine (toksini), dijelovi (antigeni) ili upute za biosintezu antigena zapisane u nukleinskoj kiselini (glasničkoj RNA ili DNA) ili rekombinantnom virusu. Primjenom cjepiva potiče se aktivna imunost stvaranjem vlastitih protutijela protiv uzročnika određenih bolesti. Cjepiva se razvrstavaju u skupine prema namjeni, tj. uzročniku, stupnju oslabljenosti uzročnika, načinu proizvodnje (podrijetlu djelatne tvari), načinu primjene, broju antigena s obzirom na uzročnike i dr. (mrežno izdanje Hrvatske enciklopedije, 2024).

Iako dosadašnji način cijepjenja i već postojeća cjepiva zadovoljavaju mnoge kriterije, znanstvenici i biotehnološki inženjeri nastoje pronaći još bolje načine, tj. nastoje optimizirati i olakšati čovjekovo stjecanje imunosti protiv uzročnika bolesti, kao i samu proizvodnju cjepiva. Jedan od tih suvremenih pristupa jest upravo proizvodnja jestivih cjepiva.

Primjenom jestivih cjepiva znatno bi se olakšala, čak i riješila, većina problema povezanih s primjenom konvencionalnih cjepiva, što je detaljnije opisano u daljnjem tekstu.

Cilj ovog rada je dati prikaz načina proizvodnje jestivih cjepiva, njihovu široku mogućnost primjene, velike prednosti, ali i određene nedostatke u njihovoj primjeni, proučiti koje biljke i kvasci se mogu koristiti za proizvodnju jestivih cjepiva te kakva ih budućnost očekuje.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1. Razlozi razvoja jestivih cjepiva i definicija

Svima nam je dobro poznat problem cijepljenja, odnosno stjecanja imunosti bakterija na već poznata cjepiva, kao i problem transporta, dostave, skladištenja i manevriranja cjepivima (Kurup i Thomas, 2020). Velik se problem javlja i u nerazvijenim zemljama ili zemljama u razvoju, posebice zemljama Afrike gdje stanovništvo nema pristup konvencionalnim cjepivima koja su im potrebna jer su takva cjepiva vrlo često skupa i zahtijevaju medicinsko osoblje za primjenu (Saxena i sur., 2013). Svjetska zdravstvena organizacija (*engl.* world health organization, WHO) cilja na pronalaženje relativno jeftinih cjepiva koja će biti dostupna svim stanovnicima, lako se skladištiti i distribuirati i cjepiva koja neće imati potrebu za hlađenjem. Upravo iz tih, a i mnogih drugih, kasnije navedenih razloga, biotehnolozi posljednjih tridesetak godina nastoje pronaći, osmisliti i patentirati nove načine stjecanja imunosti. Jedan od tih novih načina razvijen od strane biotehnologa su i tzv. jestiva cjepiva (Miranda i sur., 2020).

Pojam 'jestivo cjepivo' odnosi se na korištenje, tj. konzumaciju genetički modificiranih jestivih dijelova biljaka, algi, kvasca *Saccharomyces cerevisiae*, bakterija mliječne kiseline i stanica insekata, s ciljem proizvodnje antigenskih proteina, a sve u svrhu zaštite od bolesti, bez patogenog učinka (Kurup i Thomas, 2020; Miranda i sur., 2020).

Ne smijemo smetnuti s uma i to da jestiva cjepiva, osim što su alternativna metoda cijepljenja, također su i izvor hranjivih tvari poput vitamina, proteina, aminokiselina i dr. Relativno niski troškovi proizvodnje, pogotovo u usporedbi s tradicionalnim cjepivima, niski troškovi uzgoja i gotovo pa nikakvi procesi purifikacije i pročišćavanja još više naglašavaju važnost razvoja ovog tipa cjepiva (Miranda i sur., 2020).

Od početaka razvoja do današnjeg dana mnoge biljne vrste korištene su za proizvodnju jestivih cjepiva. Odabir vrste iznimno je važan, ako ne i najvažniji faktor. Ako se biljku planira jesti u sirovom stanju, logično, potreban je odabir jestive i ukusne biljke, ali osim tog faktora, postoji niz drugih, kasnije spomenutih u radu (Miranda i sur., 2020).

### 2.2. Kratki povijesni pregled

Hiatt i suradnici inspirirani navedenim razlozima su tako već 1989. godine pokušali proizvesti antitijela u biljkama koja bi onda poslužila svrsi pasivne imunizacije. Prvo izvješće o jestivom cjepivu (površinski protein iz roda *Streptococcus*) u duhanu, s udjelom od 0,02 % ukupne razine proteina u listu, pojavilo se 1990. godine u obliku patentne prijave objavljene prema međunarodnom ugovoru o suradnji u području patenata (Saxena i sur., 2013).

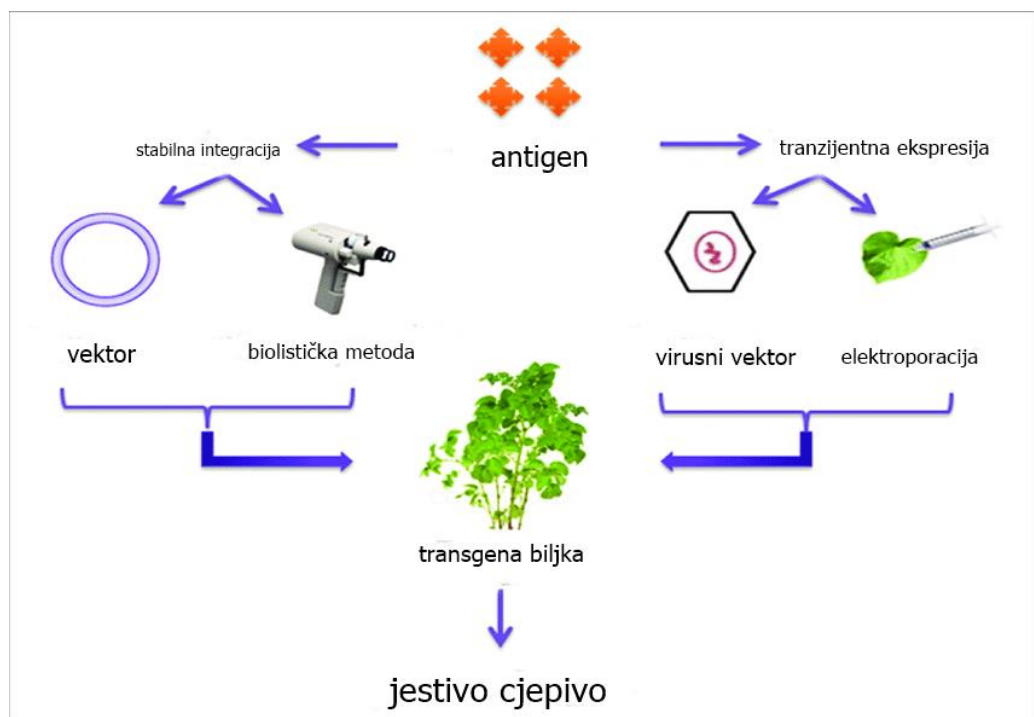


Zatim je ideju jestivog cjepiva pokušao realizirati dr. Charles Arntzen. 1992. godine Arntzen i njegovi suradnici uveli su koncept transgeničnih biljaka kao sustava za proizvodnju i isporuku cjepiva baziranih na podjedinicama (jer umjesto cijelih uzročnika infektivnih bolesti sadrže samo njihove dijelove), u kojima su se koristila jestiva tkiva transgeničnih usjeva. Time je započeto detaljnije proučavanje i istraživanje jestivih cjepiva koja bi mogla prevladati ograničenja tradicionalnih i postupno ih zamijeniti (Saxena i sur., 2013).

Tijekom 1990-ih, Mason i suradnici prvi su put uspješno eksprimirali površinski proteinski antigen A bakterije *Streptococcus mutans* u duhanu. Ista skupina znanstvenika također je bila začetnik u ovom području radom vezanim za hepatitis B i termolabilni toksin u biljkama duhana i krumpirovim gomoljima. U otprilike isto to vrijeme postignuta je i uspješna ekspresija površinskog antigena hepatitisa B (HBsAg) u biljkama duhana (Saxena i sur., 2013).

### 2.3. Proizvodnja jestivih cjepiva

Jestiva cjepiva mogu se proizvesti integracijom odgovarajućeg transgena u odabranu biljnu stanicu. Integracija transgena može se odraditi bez kombiniranja s odgovarajućim vektorom izravnom metodom ugradnje gena ili kombinacijom s odgovarajućim vektorom neizravnom metodom ugradnje gena (Kurup i Thomas, 2020). Slikovni prikaz metoda integracija antigena prikazan je na slici 1.



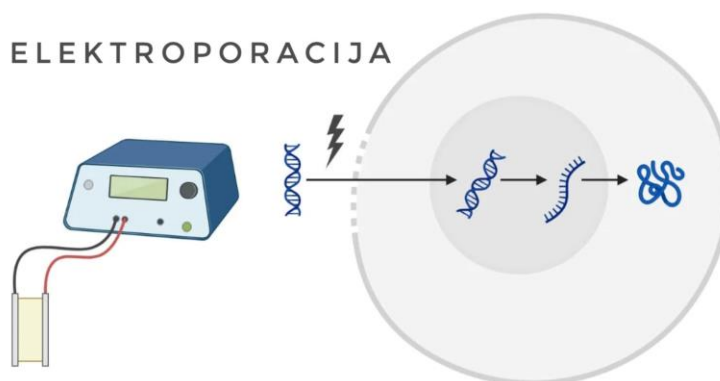
Slika 1. Metode integracije antigena u biljku (prema Hirlekar i sur., 2017)

### 2.3.1. Izravna metoda integracije gena – biolistička metoda

Izravna metoda ugradnje gena u principu je vrlo jednostavna. U njoj se odabrani dio nukleinske kiseline, DNA ili RNA, izravno unosi u biljnu stanicu. Najčešći način na koji se to izvodi jest upravo ova, biolistička metoda, poznata još i kao genska puška ili metoda bombardiranja mikroprojektilima. Kao što je već i napisano, ova metoda ne uključuje upotrebu vektora, a koristi se kada prijenos gena uz pomoć bakterija iz roda *Agrobacterium* nije moguć (detaljnije opisano dalje u tekstu). Izvodi se na način da se sekvenca DNA ili RNA obloži volframom ili zlatom koji služi kao nosač, a zatim se takva obložena DNA ili RNA stavlja u gensku pušku te se izloži visokom tlaku plina, najčešće helija. Zbog tog visokog tlaka obložena DNA se pokreće, prodire do ciljane biljne stanice i na taj način transformira jezgru stanice. Stanice kod kojih je došlo do transformacije identificiraju se pomoću genskog markera, a zatim se uzgajaju s ciljem umnažanja ugrađene sekvence i mogućeg kloniranja ako je potrebno. Ovom metodom mogu se provesti transformacija jezgre, ali i plastida (Kurup i Thomas, 2020; Sahoo i sur., 2020). Prednost ove metode je ta da se jako puno čestica istovremeno ubrzava i unosi u velik broj stanica, a zbog svoje univerzalnosti u primjeni, tip stanice, njezina veličina i oblik te prisutstvo/odsutstvo stanične stijenke ne utječu značajno na njezinu učinkovitost. Iako je sama izvedba vrlo jednostavna, ova je metoda vrlo skupa, a velik nedostatak joj je i da može oštetiti biljku. Primjeri cjepiva proizvedenih ovom metodom uključuju cjepiva protiv antraksa, kuge, tetanusa, rotavirusa i kolere (Saxena i sur., 2013).

### 2.3.2. Izravna metoda integracije gena – elektroporacija

Elektroporacija je još jedna, ali manje upotrebljavana metoda izravne ugradnje gena u kojoj se željena sekvenca DNA unosi u stanice koje su izložene kratkim električnim impulsima visokog napona. Takvi impulsi, kao što je prikazano na slici 2., stvaraju privremene pore u membrani stanice kroz koje željena sekvenca DNA onda može prodrijeti (Sahoo i sur., 2020).



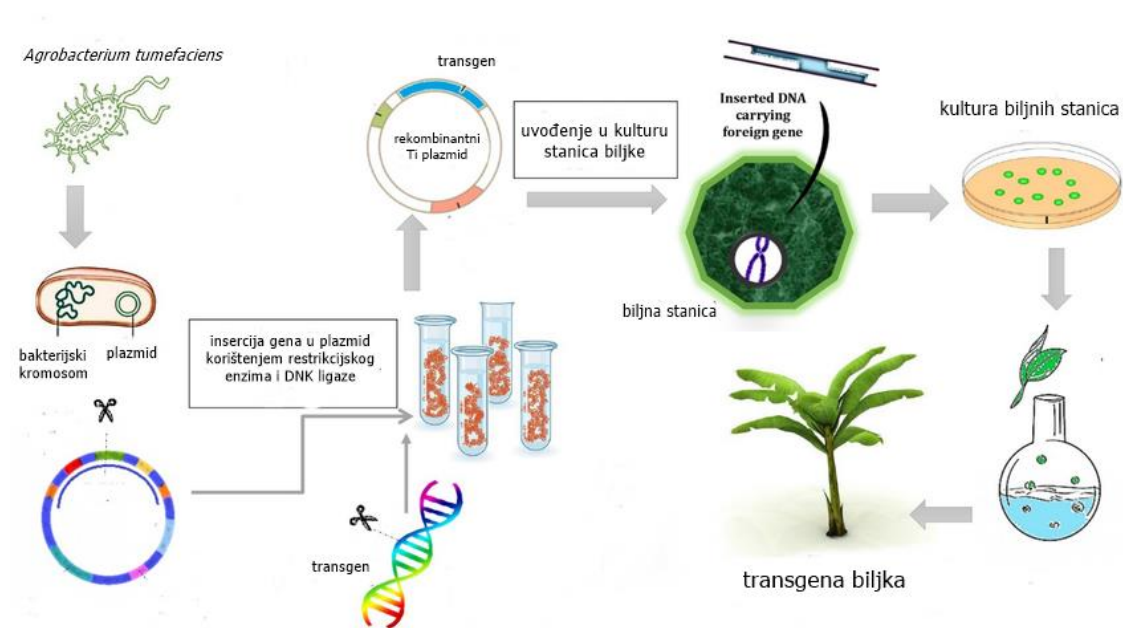
**Slika 2.** Elektroporacija i nastajanje pora u membrani stanice (prema Tamang, 2023)

### 2.3.3. Neizravna metoda integracije gena – uz pomoć bakterija iz roda *Agrobacterium*

U ovoj metodi, posredovanoj vektorom, ciljane biljne stanice inficiraju se biljnim bakterijama ili biljnim virusima kako bi se proizveo željeni protein, tj. kako bi došlo do njegove ekspresije. Najpoznatiji način za izvođenje ove metode je uz pomoć bakterija iz roda *Agrobacterium* (Azizi i sur., 2023). Bakterije tog roda su gram-negativne, nesporogene, štapičaste bakterije. Pokretne su, žive u tlu, nepatogene su za čovjeka, a kemotaksijom dolaze do ozljede na biljci, ulaze u međustanični prostor i uzrokuju tumor vrata korijena koji počinje proizvoditi opine (Svetec, 2024).

Najpoznatije vrste su *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*. *A. tumefaciens* nosi u sebi tumor inducirajući plazmid, dok *A. rhizogenes* nosi Ri plazmid koji inducira korijenje. Pri proizvodnji cjevica, geni koji kodiraju za auksin i citokinin se u Ti plazmidima uklanjaju (Kurup i Thomas, 2020).

U svojim počecima, metoda je bila ograničena na biljku duhana i još nekoliko drugih biljnih vrsta, ali je kasnije proširena na većinu povrtnih vrsta, uključujući žitarice i mahunarke. Unatoč sporij izvedbi procesa i niskom prinosu, metoda je jednostavna, jeftina i vrlo isplativa, moguć je prijenos većih fragmenata DNA, a rezultira i stabilnom integracijom željene sekvence (antigena) u genom biljke (Azizi i sur., 2023). Iz tih razloga, bakterije roda *Agrobacterium* postale su najučinkovitiji vektori za transformaciju gena u biljnoj biotehnologiji. Primjeri cjevica proizvedenih ovom metodom uključuju cjevica protiv tuberkuloze, proljeva, virusa ptičje gripe, ebole i denga groznice (Kurup i Thomas, 2020). Pojednostavljeni proces ove metode prikazan je na slici 3.



**Slika 3.** Integracija gena uz pomoć *Agrobacterium tumefaciens* (prema Akram i sur. 2022)

#### 2.3.4. Genetički modificirani biljni virusi

Osim *A. tumefaciens*, kao vektor mogu se koristiti i biljni virusi. U ovoj se metodi odgovarajući biljni virus modificira s ciljem ugradnje kimernog gena virusnog proteinskog omotača te na taj način služi kao vektor za prijenos genetičke informacije u biljne stanice. Korištenje ove metode dovodi do prolazne, odnosno tranzijentne ekspresije antigena (Kurup i Thomas, 2020). Stabilno transfecirane biljne stanice rastu i prenose sposobnost ekspresije proteina na svoje potomke, dok u tranzijentnoj, tj. prolaznoj transfekciji novi geni ulaze u biljne stanice, preuzimaju određenu sposobnost ekspresije proteina, ali ne postanu dio genoma domaćina, zbog čega potomci biljke nemaju sposobnost ekspresije tog unešenog proteina (DePalma, 2018).

Rekombinantni virus je proizvod virusne replikacije tijekom virusne infekcije biljaka koje imaju sposobnost ekspresije željenog proteina, a epitopi cjepiva mogu se sintetizirati i nakupljati promjenom proteina virusnog omotača (Kurup i Thomas, 2020). Virusno inducirane biljne infekcije imaju puno prednosti, poput visokog stupnja ekspresije rekombinantnog proteina vrlo brzo nakon bolesti, jednostavnu generaciju više antigenskih kopija i mogućnost izazivanja velikih infekcija u biljci.

Biljne virusno inducirane infekcije imaju mnoge prednosti, uključujući visok stupanj ekspresije rekombinantnog proteina ubrzo nakon bolesti, jednostavnu generaciju više antigenskih kopija na sloju virusne čestice i omogućavanje velikih infekcija u biljci (Kurup i Thomas, 2020). Unatoč svim svojim prednostima, veliki nedostatak ove metode je potreba za pročišćavanjem proizvoda, tj. proteina iz zaraženih biljaka prije no što se oni mogu iskoristiti za cjepivo, a problem nastaje i zbog smrti biljke nakon infekcije. Iz tih razloga, kad se cjepivo dobije, mora se inficirati druga biljka te se ovakav način reinfekcije mora stalno ponovno provoditi s ciljem kontinuirane proizvodnje cjepiva (Kurup i Thomas, 2020). Ranija postignuća vezana su uglavnom uz RNA viruse, npr. virus mozaične bolesti duhana, virus mozaika lucerne, virus krumpira Y (PVY) te citomegalovirus (CMV) kao ekspresijski vektor. Sustavi ekspresije biljnih virusa uglavnom se sastoje od modificiranih virusa, poput RNA virusa CMV. Virusi tog tipa ne mogu se umnažati u stanicama sisavaca, što ih čini vrlo prihvatljivim alternativnim vektorom za proizvodnju cjepiva (Fujiki i sur., 2008).

#### **2.4. Prednosti jestivih cjepiva u odnosu na konvencionalna**

Jedna od najvažnijih prednosti jestivih cjepiva jest oralna primjena. Takav način primjene je manje kompliciran, smanjuje se ili uklanja potreba za obrazovanim i obučanim medicinskim

osobljem, a smanjuje se i rizik od prijenosa infekcija. Obrada, pročišćavanje, izolacija, sterilizacija, pakiranje, transport i dostava ne zahtijevaju stroge i rigorozne mjere zaštite, što najviše pogoduje financijskom aspektu proizvodnje cjepiva. Održavanje i skladištenje ne zahtijeva sustav hladnog lanca, a od velikog je značaja i to što transgene biljne sjemenke, koje će se tek uzgojiti kao jestivo cjepivo, sadržavaju mnogo manje vode, relativno su otporne na toplinu i stoga stabilnije (Sahoo i sur., 2020).

WHO je snažni promotor ideje o jestivim cjepivima ponajprije zato jer bi na taj način zemlje s niskim prihodima, tj. manje razvijene zemlje, bez odgovarajuće zdravstvene infrastrukture i s velikim nedostatkom industrijskih kapaciteta za proizvodnju konvencionalnih cjepiva, imale masovan pristup cijepljenju. Pri tom bi se koristili lokalni, domaći usjevi, resursi i poljoprivredne površine što bi smanjilo financijske troškove transporta, a lokalno stanovništvo bi dobilo nove prilike za rad.

Što se tiče transgenih biljnih sjemena, za njihov je uzgoj potrebno jedino plodno tlo i odgovarajući vremenski uvjeti, nema sofisticirane opreme, strojeva, bioreaktora i pogona koji se inače koriste pri proizvodnji konvencionalnih cjepiva (Miranda i sur., 2020). Također, scale – up i povećanje količine cjepiva koja se uzgaja vrlo je jednostavan (Jan i sur., 2016).

Ako pitamo roditelje male djece, jestiva cjepiva dobivaju na važnosti jer kod njih nema 'strašnih' igala i, ili šprica i samim time je smanjen strah i otpor djece prema cijepljenja.

## **2.5. Ograničenja i nedostaci jestivih cjepiva**

Globalna potražnja za lako dostupnim jeftinijim izvorima farmaceutskih proizvoda, uključujući i cjepiva raste iz godine u godinu. Navodeći sve prednosti jestivih cjepiva u paragrafu prije, postavlja se pitanje zašto ova vrsta stjecanja imunosti nije već svjetski rasprostranjena i u upotrebi na svim kontinentima, a posebice tamo gdje je najpotrebnija. Odgovor se krije u svim nedostacima i ograničenjima vezanima uz njihovo učinkovito i sigurno korištenje. Od regulatornih, etičkih i znanstvenih do političkih i logističkih, u pitanju je mnogo, ali u budućnosti potencijalno savladivih prepreka (Miranda i sur., 2020).

Vrlo je često nemoguće potpuno točno odrediti odgovarajuće doze cjepiva koje pacijent treba primiti, pogotovo ako se cjepivo prima u više doza i ciklusa. Dob i masa pacijenta također imaju učinak na dozu cjepiva (Jan i sur., 2016). Ne samo da je to problem s medicinske strane, već se zbog toga povećavaju i konačni troškovi primjene. Poznato je i da koncentracija proteina i peptida može znatno varirati, od generacije do generacije, biljke do biljke, ali i od ploda do ploda. Neke od biljaka, poput krumpira i određenih vrsti mahunarki ne smiju se konzumirati sirove, već se moraju termički obraditi, skuhati ili ispeći, što može dovesti do

uništavanja strukture proteina i gubitka njihove aktivnosti (Sahoo i sur., 2020).

Nejasnoće oko regulacije jestivih cjepiva uočene su vrlo brzo nakon početka njihova razvoja. Znanstvenici ne znaju u koju bi kategoriju jestiva cjepiva trebala biti svrstana i na koji točno dio biljke se treba obratiti pažnja pri regulaciji. Jesu li jestiva cjepiva sami protein, tj. antigen, dio biljke koji se konzumira, cijela genetički modificirana biljka ili pak njezino transgeno sjeme i je li ta biljka onda genetički modificirani organizam ili je to cjepivo (Sahoo i sur., 2020). Još 2005. godine Svjetska zdravstvena organizacija je održala sastanak s temom regulacije i evaluacije jestivih cjepiva, tj. cjepiva dobivenih iz biljaka. Zaključak je bio da pri proizvodnji jestivih cjepiva temelj trebaju biti već postojeće smjernice i pravilnici za razvoj, regulaciju i upotrebu konvencionalnih cjepiva (Kurup i Thomas, 2020). Klinička se ispitivanja moraju provesti u skladu sa svim zahtjevima za istraživanjem novog lijeka u SAD-u te se moraju poštovati svi regulatorni aspekti i dobra proizvođačka praksa (Sahoo i sur., 2020).

Prihvatanje od strane stanovništva je još jedna od, ako ne i najbitnija prepreka koju je potrebno savladati. U mnogim dijelovima svijeta još je uvriježeno mišljenje da su genetički modificirani organizmi neka vrsta prijetnje, da nisu zdrava ili da ostavljaju negativne posljedice na ljudski organizam. U suzbijanju takvog mišljenja ključnu ulogu imaju vlasti i političari koji bi u cilju trebali imati probuditi svijest javnosti, poučiti i jasno argumentirati prednosti ovakvog načina cijepljenja, a i genetički modificiranih organizama općenito (Sahoo i sur., 2020). Potrebno je pažljivo i strogo nadzirati uzgoj biljaka za jestiva cjepiva jer u protivnom, tijekom oprašivanja može doći do unakrsne kontaminacije 'običnih' i GM biljaka. Osim toga, može se dogoditi i kontaminacija vodenih površina GM biljkama uzrokovana prijenosom insektima i pticama. Takva kontaminacija može dovesti do nenamjernog unosa transgena u ljudski lanac prehrane, može uzrokovati onečišćenje okoliša ili negativno utjecati na divlje životinje (Kurup i Thomas, 2020).

Što se tiče problema sa znanstvene strane, jedan od njih povezan je s mukoznom imunološkom tolerancijom. Ona se javlja i djeluje protiv stranih antigena, potencijalno unešenih u tijelo hranom, a djeluje tako da sprječava imunološke odgovore koji su nepotrebni i koji bi mogli biti štetni za sluznicu crijeva. Rješenje je u većoj koncentraciji antigena s ciljem postizanja učinkovitog imunološkog odgovora (Miranda i sur., 2020).

## **2.6. Bolesti za koje se upotrebljava ili je u istraživanju jestivo cjepivo**

Da bi neki lijek ili cjepivo moglo biti upotrijebljeno, prvo mora proći kroz temeljita pretklinička i klinička ispitivanja koja se sastoje od raznih biomedicinskih i bihevioralnih istraživanja na životinjama, a u kasnijim fazama i na ljudima. Takva vrsta ispitivanja daje informacije o

učinkovitosti i sigurnosti lijekova (Sahoo i sur., 2020). Mnoge biljke pokazale su uspješna svojstva i antigensku ekspresiju, od kojih su neke, zajedno sa svojim statusom kliničkog ispitivanja, prikazane u tablici 1. Osim za proizvodnju cjepiva i antitijela, znanstvenici genetički modificiraju biljke i s ciljem proizvodnje rekombinantnih proteina, uključujući dijagnostičke proteine, enzime korištene u industriji, enzime korištene u proizvodnji farmaceutika, terapijske proteine i dodatke prehrani. (Streatfield, 2006) Neki od primjera su interleukin-10 za liječenje Crohnove bolesti i angiotenzin-I za snižavanje krvnog tlaka (Sahoo i sur., 2020).

**Tablica 1.** Status kliničkog ispitivanja nekih jestivih cjepiva (Sahoo i sur., 2020)

patogeni mikro-organizam	antigen	domaćin	bolest	status kliničkog ispitivanja
<i>Vibrio cholerae</i>	toksin B kolere (CTB)	riža	kolera	faza 1
<i>Norwalk virus</i>	polisaharid kapsule virusa (CP)	krumpir	proljevi	rana faza 1
enterotoksigena <i>E. coli</i>	termolabilna podjedinica enterotoksina B (LT-B)	krumpir	proljevi	rana faza 1
Virus hepatitisa B	HBsAg	krumpir	hepatitis B	faza 1
enterotoksigena <i>E. coli</i>	termolabilna podjedinica enterotoksina B (LT-B)	kukuruz	proljevi	rana faza 1
Virus hepatitisa B	glikoprotein/proteinski omotač virusa (GP/NP)	špinat	bjesnoća	rana faza 1
Virus hepatitisa B	površinski antigen hepatitisa B (HbsAg)	zelena salata	Hepatitis B	rana faza 1

### 2.6.1. Hepatitis B

Virus hepatitisa B (HBV) glavni je uzročnik bolesti hepatitisa B. Odlični rezultati dobiveni su ispitivanjem cjepiva protiv hepatitisa B korištenjem krumpira kao jestivog cjepiva. Specifični antigeni inducirani su kod miševa uz pomoć VLP-ova (*engl.* virus like particles). Zabilježeno je i da u jednom krumpiru postignuta ekspresija može dostići razinu jedne doze HBsAg-a (Lal i sur., 2007). Jača ekspresija plazmidnog HBsAg podtipa ayw zabilježena je u korijenu u

odnosu na listove transgenog krumpira kad je kloniran s CaMv (virus mozaika karfiola) (Sahoo i sur., 2020). Procesi pročišćavanja ovog rekombinantnog antigena provedena su afinitetnom kromatografijom, a zatim elektronskim mikroskopom provjereno i ispitano. Potrebno je provesti daljnja istraživanja s ciljem povećanja ekspresije antigena u krumpiru, a jedan od primjera je uz pomoć patatinskog promotora. Također, dobiveno je i oko 4000 doza cjepiva uzgojem samo tridesetak biljaka rajčice u zaštićenom stakleniku, a razvija se i biljka zelene salate (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.6.2. Norwalk bolest

Norovirusi su enterovirusi iz porodice *Caliciviridae* i glavni su uzrok gastroenteritisa, a Norwalk virus je jedan od tih virusa. U jednom istraživanju, 20 je osoba hranjeno transgenim krumpirom koji eksplicira antigen Norwalk virusa. U njih 19 uspješno su razvijena antitijela. Osim krumpira, za ekspresiju antigena protiv ovog virusa, u razvoju su i banane i rajčice (Lal i sur., 2007; Hirlekar i sur., 2017).

#### 2.6.3. Ospice

Kod miševa hranjenih duhanom koji eksplicira MV-H (hemaglutinin virus ospica) došlo je do razvijanja antitijela u koncentraciji čak i do pet puta većoj od potrebne za zaštitu ljudi. Koristeći strategiju 'prime booster' i kombinirajući parentalne i naknadne oralne MV-H pojačivače, titrovi su povećani i do 20 puta više od koncentracije potrebne za zaštitu ljudi. Nakon istraživanja na miševima, znanstvenici su započeli istraživanja na primatima i uočili da postoji učinkovita odgovarajuća doza zelene salate, ali uz dodatak adjuvansa, a kao najbolji izbor za jestivo cjepivo protiv ospica pokazala se transgena biljka mrkve (Sahoo i sur., 2020; Lal i sur., 2007).

#### 2.6.4. Bjesnoća

Uz pomoć antigena bjesnoće ekspliciranih u rajčicama, moguća je ekspresija protutijela kod miševa, a moguće je koristiti i biljku duhana (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.6.5. Kolera

Što se kolere tiče, kad je gen za toksin B kolere (CT-B) iz bakterije *Vibrio cholerae* prebačen u krumpir, pokazao se efektivnim u miševa. Samo jedan krumpir tjedno u periodu od mjesec



dana, uz povremeni dodatak pojačivača, pruža imunitet. Podjedinica A mutiranog toksina kolere i termolabilna podjedinica enterotoksina B (LT-B) u sjemenu pokazuju se uspješnima i učinkovitima kad se ekspimiraju zajedno (Lal i sur., 2007).

#### 2.6.6. Antraks

Listovi duhana bombardirani PA genom (zaštitni antigen toksina antraksa), ekspimirali su protein identičan glavnom proteinu prisutnome u već postojećem konvencionalnom cjepivu. U jestivom cjepivu nije bilo nikakvih toksičnih supstanci. Umjesto duhana, mogu se koristiti i rajčice, a znanstvenici su otkrili i da bi mnogi antraks antigeni mogli biti proizvedeni na ovaj način. U razvoju je također i transformacija špinata koji bi ekspimirao PA gen jer je on sigurniji kao cjepivo (Sahoo i sur., 2020; Hirlekar i sur., 2017).

#### 2.6.7. Malaria

Veliki naponi ulagani su u razvitak cjepiva protiv malarije. Tri su antigena odabrana za razvoj jestivog cjepiva protiv ove bolesti: proteini MSP 4 i MSP 5 (*engl. macrophage stress protein*) iz uzročnika malarije *Plasmodium falciparum* i *Plasmodium yoelii*. Oralna primjena tih rekombinantnih proteina inducirala je određenu razinu odgovora antitijela, ali velike količine antigena je potrebno ugraditi u biljke da bi se mala količina antigena ekspimirala (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.6.8. Rotavirusna bolest

Veliki broj djece barem jednom u životu do svoje pete godine bude zaraženo rotavirusom, a glavni simptom je proljev. 10 vrsta rotavirusa postoji, označeni slovima abecede, od A do J, ali je najvećem broju infekcija uzročnik upravo rotavirus A. Sinteza i insercija gena s optimiziranim kodonom koji kodira za VP6 strukturni protein rotavirusa skupine A (sVP6) izvedena je u genom lucerne pomoću transformacije posredovane bakterijama roda *Agrobacterium*. Dobiveni pBsVP6 transgen lucerne potencijalno je sredstvo za imunizaciju djece od teškog oblika ove bolesti (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.6.9. Autoimune bolesti

Što se tiče autoimunih bolesti, npr. dijabetesa tipa I, pokazalo se vrlo korisnim uzimati autoantigene. Iz još nepoznatog razloga, njihova oralna primjena može suzbiti aktivnost

imunološkog sustava i time stvoriti imunološku toleranciju. Inzulin je glavni lijek kod ovog tipa dijabetesa, ali on ne može potpuno izliječiti bolest. Mnoga su znanstvena istraživanja provedena upravo s ciljem pronalaženja alternative 'običnom' inzulinu. Znanstvenici su tako otkrili da u dijabetičnih miševa krumpir koji sadrži inzulin ili dekarboksilazu glutaminske kiseline, skupa s bezopasnom podjedinicom toksina B iz *V. cholerae* daje mnogo bolje rezultate, pri čemu dolazi do suzbijanja imunološkog odgovora i održavanja potrebne doze inzulina. Kod ovakve vrste terapije, vrlo je važno paziti na odabir i primjenu biljaka, određivanje doze i raspored hranjenja. Još neke od autoimunih bolesti čija cjepiva su u istraživanjima uključuju multiplu sklerozu, reumatoidni artritis i lupus (Lal i sur., 2007).

#### 2.6.10. Liječenje malignih tumora

Mnoge biljke genetički su modificirane s ciljem proizvodnje monoklonskih antitijela za učinkovitu primjenu u terapiji raka (malignih tumora). Soja se pokazala kao dobar izbor u liječenju raka jajnika, dojki, debelog crijeva i pluća (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.6.11. Kontracepcija

Otkriveno je da se oplodnja jajašca kod ženki miševa može spriječiti. Kad se primjeni virus mozaične bolesti duhana, dolazi do ekspresije proteina koji se nalazi u zoni pellucida (struktura koja veže za sebe spermij) ženke miša (Sahoo i sur., 2020).

### 2.7. Čimbenici koji utječu na učinkovitost jestivih cjepiva

Snaga i učinkovitost cjepiva značajno ovise o prirodi i svojstvima pomoćne tvari tzv. adjuvansa. Adjuvansi su biomolekule, lektini i saponini, koje ne izazivaju imunološki odgovor, već samo pojačavaju postojeći imunološki odgovor kada se primjenjuju skupa s antigenom. Pojačavaju imunološki odgovor djelujući kao skladište iz kojeg se onda antigeni usmjeravaju na ciljana mjesta, štite antigene od razgradnje i kontroliraju njihovo oslobađanje (Saurabh i sur. 2015). Imunološki inertni adjuvansi koji su i biorazgradivi, poput polisaharida, lipida i proteina djeluju kao transportna vozila. Dvije su najbitnije metode povezivanja antigena i adjuvansa: vezanje na površinu kemijskom konjugacijom ili fizičkom adsorpcijom i inkapsulacija antigena u čestice.

Osim adjuvansa, na učinkovitost jestivih cjepiva utječe i sami izbor antigena, izbor biljne vrste, učestalost doziranja, način oslobađanja (kontinuirani i kontrolirani), percepcija stanovništva

povezana s genetičkim modifikacijama općenito i sama učinkovitost antigena (Sahoo i sur., 2020).

## 2.8. Genetički modificirane bakterije kao jestiva cjepiva

Genetički modificirane bakterije na tri su načina korištene kao cjepiva. Prvi je način da su živa cjepiva ili mutirana ili im je uklonjen određeni gen čime se sprječava infekcija stanica ljudi, tj. sisavaca, drugi način uključuje proizvodnju proteina i korištenje bakterija kao 'tvornice' proteina i treći, unos bakterija koje eksprimiraju antigene.

Primjeri bakterijskih vektora koje se najviše koriste za proizvodnju cjepiva su: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* i bakterije mliječne kiseline (Gunasekaran i sur., 2020).

Za poticanje imunološkog odgovora mogu se koristiti i probiotici koji još mogu biti i genetički modificirani za primjenu kao mukozalna cjepiva. Probiotici su živi mikroorganizmi koji, kad se primjenjuju u odgovarajućoj količini, pružaju zdravstvenu korist domaćinu (Bermdez-Brito i sur., 2012). Najčešći mikroorganizmi korišteni kao probiotici, od onih koji se mogu naći u gastrointestinalnoj mikrobioti, pripadaju rodovima *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* i *Enterococcus*. Od ostalih tu su rodovi *Leuconostoc*, *Streptococcus* i *Lactococcus*. Jedini kvasac korišten kao probiotik je *Saccharomyces boulardii* (Sahoo i sur., 2020; Plaza-Diaz i sur., 2019). Zašto je uopće došlo do razvoja ovog koncepta? Probiotici doprinose učinkovitosti cjepiva, poboljšavaju metabolizam laktoze, stimuliraju imuno sustav, suzbijaju različite infekcije i alergijske reakcije, a imaju čak i antitumornu aktivnost (Kos, 2023). Korištenje probiotičkih bakterija kao jestivog cjepiva ili za poticanje imunološkog odgovora novi je koncept u svjetskom razvoju cjepiva te se još mnoge nalaze tek u kliničkim ispitivanjima. Osim navedenih prednosti, postoje i neka ograničenja koja uključuju teškoće vezane za praćenje složenog imunološkog odgovora i relativno niska prirodna imunogenost probiotika (Sahoo i sur., 2020). Točan mehanizam kojim probiotici postižu navedene korisne učinke nije u potpunosti jasan i utvrđen, no postoje neki pretpostavljeni mehanizmi djelovanja poput adhezije na crijevnu sluznicu, istodobnu inhibiciju adhezija patogena, jačanje epitelne barijere, proizvodnje antimikrobnih tvari i modulacije imunološkog odgovora (Sahoo i sur., 2020).

## 2.9. Biljke uzgajane kao jestiva cjepiva

Mnogo je biljaka proučavano i istraživano za proizvodnju jestivih cjepiva, od kojih je s krumpirom izvedeno najviše eksperimenata, no ta se biljka ipak nije pokazala najboljim

odabirom zbog potrebne termičke obrade koja može dovesti do smanjenja ili gubljenja aktivnosti proteina. Iz tog razloga, u istraživanjima su druge namirnice poput kukuruza, mrkve, rajčice, kikirikija, trešanja, banane. Takve biljke imaju obećavajući potencijal jer su vrlo rasprostranjene po svijetu, lako dostupne, mogu se jesti sirove i mogu se relativno lako genetički modificirati (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.9.1. Krumpir

Mason i sur. prvi su proveli ispitivanje jestivog cjepiva proizvedenog u krumpiru, lat. *Solanum tuberosum*, za zaštitu protiv enteritisa uzrokovanog sojem *E.coli* u miševa. Nedugo nakon toga otkrivena je učinkovitost antigena proizvedenog također u krumpiru prema netoksičnoj podjedinici endotoksina *V. cholerae* i patogenu kapside Norwalk virusa. Početkom 2000.-ih predložena je upotreba jestivog cjepiva u obliku krumpira za zaštitu od hepatitisa B jer je dotadašnji način cijepjenja uzrokovao jako crvenilo i svrbež na mjestu uboda (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.9.2. Rajčica

Latinski *Solanum lycopersicum*, rajčica je poslužila kao prva biljka za uzgoj učinkovitog cjepiva protiv SARS-a uzrokovanog koronavirusom. Osim toga, rajčica je pokazala i bolju uspješnost protiv Norwalk virusa nego cjepivo proizvedeno u krumpiru. Cijela biljka rajčice, od stabljike do ploda, ima sposobnost ekspresije CT-B proteina iz B toksina *V. cholerae*, a koristi se i za ekspresiju HBsAg proteina. Iz rajčice su razvijena i cjepiva protiv upale pluća i bubonske kuge. Velik potencijal i prednost rajčica je što brzo rastu, a sadrže i visoku koncentraciju vitamina A, što dodatno pojačava imunološki odgovor, međutim, velik nedostatak je i u njihovom lakom i relativno brzom kvarenju (Kurup i Thomas, 2020)

#### 2.9.3. Trešnje

Ova biljka, lat. *Physalis philadelphica* također je genetički je modificirana za ekspresiju antigena hepatitisa B, a zanimljivo je da su određene razine ekspresije izmjerene u cijeloj biljci, s najvišim koncentracijama u svježim listovima i plodovima. U listovima čak 300 ng/g, a u plodovima 10 ng/g. Ovakve visoke koncentracije čine trešnje obećavajućim kandidatom u razvoju jestivih cjepiva (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.9.4. Salata

Salata je još 2005. godine korištena za ekspresiju glikoproteina E2 virusa svinjske groznice, a uspješno je genetički modificirana za ekspresiju B podjedinice termolabilnog toksina iz

*E.coli*. S obzirom da je jestiva cijela biljka salate, odličan je odabir za daljnja istraživanja i primjenu kao jestivo cjepivo i pokazuje velik potencijal u tom području (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.9.5. Soja

Ova biljka također je korištena za ekspresiju B podjedinice termolabilnog toksina iz *E. coli* i to ekspresije u endoplazmatskom retikulumu. Rezultat je bila razina ekspresije antigena do 2,4% od ukupne koncentracije proteina u sjemenu soje, a toliko koncentracija je postignuta i nakon obrade i sušenja (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.9.6. Grašak

Transgeni grašak najviše se koristi za ekspresiju proteina kapside Norwalk virusa. Taj protein se značajno nakuplja u još nezrelom plodu, s nešto manjom koncentracijom u zreloom plodu. Otkriveno je i da biljka graška može ekspimirati zaštitne antigene protiv goveđe kuge, ali potrebna su daljnja ulaganja u razvoj i istraživanje ove biljke kao jestivog cjepiva (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.9.7. Banana

Četiri različite ekspresijske kasete korištene su za ekspresiju površinskog antigena hepatitisa B u genetički modificiranim bananama. Razine ekspresije su bile vrlo zadovoljavajuće, čak do 19,92 ng/g (Kurup i Thomas, 2020). Iako su banane široko rasprostranjene, ne trebaju termičku obradu za konzumaciju, jeftine su u usporedbi s drugim biljkama, zbog njenog dugog vremena sazrijevanja, ova biljka nije najbolji odabir za proizvodnju jestivih cjepiva (Sahoo i sur., 2020).

#### 2.9.8. Mrkva

Lat. *Daucus carota*, mrkva se koristi za razvoj jestivog cjepiva s ciljem ekspresije površinskog antigena HIV-a. Eksperimenti su izvođeni na štakorima i kod onih hranjenih transgenom mrkvom uočeni su pozitivni efekti cjepiva. Prednost mrkve je u njenoj visokoj razini karotenoida koji mogu poboljšati imunološki odgovor. Međutim, ova vrsta cjepiva se treba još istražiti i klinička ispitivanja trebaju biti provedena (Sahoo i sur., 2020).

### 2.9.9. Riža

I u biljci riže, u istraživanju iz 2007. godine, otkriveno je da transgena riža, koja eksprimira B podjedinicu toksina iz *E. coli*, inducira značajnu proizvodnju antigena te podjedinice. Riža je dobar odabir i za ekspresiju površinskog antigena hepatitisa B, što je potvrđeno PCR-om i Southern blot analizama (Sahoo i sur., 2020). Prednost korištenja riže naspram drugih biljaka je ta što je riža vrlo rasprostranjena, a često se koristi i kao dječja hrana (Kurup i Thomas, 2020).

### 2.10. Alge kao jestiva cjepiva

Osim biljaka, za proizvodnju jestivih cjepiva, u razvoju su i alge, posebice zelene mikroalge. Najkorištenija vrsta algi koja se koristi za dobivanje velikog broja proteina za ljudske i životinjske terapijske svrhe jest *Chlamydomonas reinhardtii*, koja ima GRAS status, a može ekspimirati i složene antigene koji se koriste u proizvodnji cjepiva (Kurup i Thomas, 2020). Zelene mikroalge vrlo su obećavajući izvor proteina i za industrijske svrhe. Mikroalge općenito imaju visoku stopu rasta, mogu se čak uzgajati i u bioreaktorima i cijela biomasa može se koristiti kao sirovina za jestivo cjepivo. Lako su dostupne i rasprostranjene, može se reći čak i da zelene alge imaju sve prednosti kopnenih biljnih sustava, plus još neke pogodnosti u usporedbi s kopnenim biljkama. Rast im ne ovisi o plodnosti i svojstvima tla i rastu tijekom cijele godine, neovisno o sezoni. Što se tiče uzgoja u bioreaktorima, velika je prednost nemogućnost kontaminacija sojeva međusobno jer se mogu uzgajati u bioreaktorima zatvorena tipa (Kurup i Thomas, 2020). Alge se mogu jednostavno obraditi liofilizacijom i takve osušene mogu se skladištiti do 20-ak mjeseci bez gubljenja učinkovitosti antigena, što značajno doprinosi mogućnosti globalne distribucije. Međutim, postoje i neka ograničenja poput niske razine ekspresije i nedostatka glikozilacije antigena ekspimiranih u kloroplastu algi (Sahoo i sur., 2020).

### 2.11. Plastidi u proizvodnji jestivih cjepiva

Inženjerstvo plastida uvelike je uznapredovalo posljednjih godina i omogućena je ekspresija transgena u njima (Yarra, 2020). Plastidi su organele u stanicama biljaka i algi koji imaju dvostruku membranu. Odgovorni su za proizvodnju i skladištenje hranjivih tvari poput fitohormona, vitamina, aminokiselina, nukleotida i ostalih, tj. imaju sposobnost sinteze složenih bioloških molekula, što ih čini vrlo privlačnima i zanimljivima za biotehnoška

istraživanja. Plastom je plastidni genom. Dakle, postoje transformacija jezgre i transformacija plastida. Plastidna transformacija ima značajne prednosti koje uključuju višu razinu ekspresije gena, tj. transgena, integraciju homolognom rekombinacijom i nepostojanje utišavanja gena. Od velikog je značaja tehnologija transformacije plastida vezana uz povrtne kulture. Opskrba hranom sve je nestabilnija u svijetu, poljoprivrednih površina sve je manje, a i klimatski uvjeti značajno, većinom nepovoljno, utječu na uzgoj voća, povrća i žitarica. S ciljem rješavanja tih problema, potrebno je postizanje učinkovitije i održivije poljoprivredne proizvodnje koja uključuje istraživanje novih tehnologija i mogućnosti kako bi se postigla stabilizacija i povećanje proizvodnje poljoprivrednih kultura. Bitan dio novih tehnologija je genetička transformacija biljaka, točnije transformacija plastida koja ima prednost u odnosu na transformaciju jezgre jer ona nosi opasnost prijenosa gena na susjedne biljke i usjeve.

Znanstvenici su genetičkim inženjerstvom plastoma uveli u DNA biljaka neke vrlo korisne značajke, poput poboljšanog razvoja i rasta, većih prinosa, otpornosti na insekte, otpornosti na herbicide, otpornost na sušu, otpornosti na različite bolesti (Yarra, 2020).

Ova tehnologija je od velike važnosti za dobivanje rekombinantnih proteina, a prva biljka s transformiranim plastidom bila je biljka duhana, *Nicotiana tabacum*. Transformacija plastida uspješna je još kod nekoliko vrsta: krumpira, patlidžana, salate, rajčice, soje, mrkve i kupusa, ali kao biljke s najviše akumuliranih proteina pokazale su se rajčica i salata.

Vrlo bitan dio cijelog postupka transformacije odabir je mjesta u plastomu povoljnog za integraciju stranog gena i ključan je za postizanje zadovoljavajuće razine ekspresije ciljanog transgena. Najviša razina ekspresije transgena postignuta je integracijom u transkripcijski aktivna mjesta međugenske razmaknice (trnI/trnA) (Yarra, 2020).

Iako je postignut značajan uspjeh u inženjerstvu i uzgoju transplastomskih biljaka, još uvijek je ograničeno na premali broj vrsta, većinom iz razloga jer nedostaje informacija o sekvencama plastoma drugih biljnih vrsta. Stoga, potrebni su još značajni napor da bi se postigla ekspresija transgena u plastidima ostalih vrsta biljaka (Yarra, 2020).

## **2.12. Kvasci kao jestiva cjepiva**

Kvasci predstavljaju još jedan od odličnih izvora jestivih cjepiva zbog svojeg GRAS statusa, mogućnosti posttranslacijskih modifikacija proteina, mogućnosti zaštite proizvedenog antigena za vrijeme prolaska kroz gastrointestinalni trakt i jeftine i jednostavne kultivacije (Kurup i Thomas, 2020).

Primjena kvasaca za proizvodnju heterolognih proteina u industrijske svrhe, kao i sposobnost stanica kvasca da generira imunološki odgovor vrlo su dobro proučene (Kumar i sur., 2019).

Široko su dostupne informacije o genetici, molekularnoj biologiji i fiziologiji zbog čega je ovaj mikroorganizam idealan za daljnje razvijanje u jestivo cjepivo.

Međutim, izostanak sustava za popravak DNA, potreba za domaćinom ili staničnim okruženjem i visoka stopa mutacija predstavljaju određene izazove u razvoju cjepiva protiv virusnih infekcija. Želeći riješiti ove probleme, znanstvenici su se posvetili razvitku cjepiva temeljenog na cijelim stanicama kvasca i došli do zanimljivih spoznaja. Npr., cijeli mrtvi rekombinantni kvasac koji eksprimira Rv1886c ima sposobnost aktivacije antigen specifične T stanice i tako može smanjiti populaciju mikobakterija. Primjena cijelog *S.boulardii* može potaknuti humoralni imunološki odgovor. Provedena su pretklinička ispitivanja u kojima su upotrebljavane stanice *S. cerevisiae* kao jestiva cjepiva za upotrebu protiv HPV-a i *Actinobacillus pleuropneumoniae* te je dokazano da mogu inducirati zaštitu sluznice (Kumar i sur., 2019).

Trenutno su u razvoju i dva klinička ispitivanja: GS-4774 za liječenje infekcije virusa hepatitisa B i GI-5005 za liječenje hepatitisa C.

Povećana imunogenost moguće je i posljedica adjuvantne aktivnosti  $\beta$ -glukana u staničnoj stijenci kvasca (Kurup i Thomas, 2020).

Međutim, još značajniji pristup od cjepiva temeljenima na cijelim stanicama kvasca u razvijanju jestivih cjepiva, je tzv. „yeast display“ ili „yeast surface display“, tehnika proteinskog inženjerstva kojom se provodi ugradnja i ekspresija rekombinantnih proteina u stanicu ili staničnu stijenu kvasca. Na primjer, jestivo cjepivo protiv kandidijaze uvedeno je korištenjem ovog sustava sa *S. cerevisiae* (Kumar i sur., 2019).

Ovaj pristup zahtijeva još dodatnih istraživanja i tek je u početnoj fazi razvoja, ali dosadašnje studije pokazuju njegov ogromni potencijal za razvoj i primjenu kao jestivo cjepivo.

### **2.13. Budućnost jestivih cjepiva**

Proizvodnja jestivih cjepiva ima veliki potencijal u suzbijanju, ako ne i iskorjenjivanju zaraznih bolesti diljem svijeta, posebice zbog svoje jednostavnosti primjene i indukcije obje vrste imuniteta. Međutim, budućnost uvelike ovisi o otporu, odnosno prihvaćanju genetički modificirane hrane od strane stanovništva. Jedan od primjera neprihvatanja je Zambija koja je, unatoč prijetnji gladi koja je prevladavala među stanovništvom, odbila genetički modificirani kukuruz iz SAD-a (Lal i sur., 2007). Također, transgena kontaminacija je gotovo pa neizbježna. Transgeni se, osim peludi, mogu prenositi insektima, mogu se prenijeti na mikroorganizme u tlu, a može doći i do onečišćenja podzemnih i površinskih voda. Stoga, potrebno je riješiti sve probleme i zabrinutosti od strane WHO-a povezane sa osiguravanjem



kvalitete jestivih cjepiva i njihovim učinkom na okoliš. Genetički modificirane usjeve treba uzgajati u strogo kontroliranim uvjetima, maksimalno izoliranim ili barem udaljenim od ostalih usjeva (Lal i sur., 2007).

U vezi budućnosti jestivih cjepiva, često se spominje i problem bioterorizma. Naime, genetičari diljem svijeta mogu vrlo lako, relativno jednostavno i brzo stvoriti rekombinantne visokozarazne viruse koji se mogu zloupotrijebiti kao biološko oružje (Sahoo i sur., 2020).

Unatoč svim problemima i ograničenjima, broj zemalja u kojima je dozvoljen uzgoj transgenih sojeva je u stalnom porastu, kao i površina korištenih za njihov uzgoj, što nam ukazuje na sve veće prihvaćanje populacije (Lal i sur., 2007).

Još je puno posla i bit će potrebna opsežna, dugotrajna istraživanja i testiranja na životinjama i ljudima prije nego se ovaj način borbe protiv zaraznih i autoimunih bolesti odobri za sigurnu humanu primjenu.

### 3. ZAKLJUČCI

1. Zbog problema u proizvodnji, transportu, skladištenju i primjeni postojećih, konvencionalnih cjepiva, globalna potreba za razvojem novog načina stjecanja imunosti i za razvojem jestivih cjepiva sve je veća.
2. Biolistička metoda, elektroporacija i primjena bakterije *Agrobacterium tumefaciens* kao vektora najčešće su korišteni načini za integraciju transgena u ciljane stanice odabrane biljne vrste.
3. Prednosti jestivih cjepiva uključuju smanjen rizik od prijenosa infekcija i manje komplikiranu primjenu koja ne zahtijeva medicinski obučeno osoblje, a izolacija, pročišćavanje, obrada, pakiranje, transport i dostava ne zahtijevaju toliko rigorozne mjere zaštite kao što je to slučaj kod već postojećih, uobičajenih cjepiva.
4. Osim biljaka, ogroman potencijal za razvoj i proizvodnju jestivih cjepiva pokazuju bakterije, kvasci i alge.
5. Razvoj jestivih cjepiva još je u svojim počecima; potrebna su još mnoga istraživanja, ispitivanja i ulaganja da bi jestiva cjepiva bila sigurna za primjenu i prihvaćena od strane stanovništva.

#### 4. POPIS LITERATURE

Akram F, Jabbar Z, Aqeel A, Haq IU, Tariq S, Malik K (2022) A Contemporary Appraisal on Impending Industrial and Agricultural Applications of Thermophilic-Recombinant Chitinolytic Enzymes from Microbial Sources. *Mol Biotechnol* **64**, 1055-1075. <https://doi.org/10.1007/s12033-022-00486-0>

Azizi-Dargahlou S, Pouresmaeil M (2023) *Agrobacterium tumefaciens*-Mediated Plant Transformation: A Review. *Mol Biotechnol* **66**, 1563-1580. <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00788-x>

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A (2012) Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab* **61**, 160-174. <https://doi.org/10.1159/000342079>

Cebadera Miranda E, Castillo Ruiz-Cabello MV, Cámara Hurtado M (2020) Food biopharmaceuticals as part of a sustainable bioeconomy: Edible vaccines case study. *New Biotechnol* **59**, 74-79. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2020.06.005>

Hrvatska enciklopedija, mrežno izdanje. Cijepljenje. Leksikografski zavod Miroslav Krleža, Pristupljeno: 1.9.2024. <https://www.enciklopedija.hr/clanak/11816>

DePalma (2018) Biocompare - Transient Protein Expression <https://www.biocompare.com/Editorial-Articles/349373-Transient-Protein-Expression/> Pristupljeno: 24. kolovoza 2024.

Fujiki M, Kaczmarczyk JF, Yusibov V, Rabindran S (2008) Development of a new cucumber mosaic virus-based plant expression vector with truncated 3a movement protein. *Virology* **381**, 136-42. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.08.022>

Gunasekaran B, Gothandam KM (2020) A review on edible vaccines and their prospects. *Braz J Med Biol Res* **53**, e8749. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20198749>

Hirlekar R, Bhairy S (2017) Edible vaccines: An advancement in oral immunization. *Asian J Pharm Clin Res* **10**, 82-88. <https://doi.org/10.22159/ajpcr.2017.v10i2.15825>

Jan N, Shafi F, bin Hameed O, Muzaffar K, Dar SM, Majid I i sur. (2016) An Overview on Edible Vaccines and Immunization. *Austin J Nutri Food Sci* **4**, 1078. <https://austinpublishinggroup.com/nutrition-food-sciences/fulltext/ajnfs-v4-id1078.php>

- Kos B (2023/2024) Predavanja iz predmeta Blotehnologija 4, predavanje 5. Pristupljeno: 17. kolovoza 2024. <https://moodle.srce.hr/2023-2024/course/view.php?id=165590>
- Kumar R, Kumar P (2019) Yeast-based vaccines: New perspective in vaccine development and application. *FEMS Yeast Res* **19**, foz007. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foz007>
- Kurup VM, Thomas J (2020) Edible Vaccines: Promises and Challenges. *Mol Biotechnol* **62**, 79-90. <https://doi.org/10.1007/s12033-019-00222-1>
- Lal P, Ramachandran VG, Goyal R, Sharma R (2007) Edible vaccines: current status and future. *Indian J Med Microbiol* **25**, 93-102. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.32713>
- Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil (2019) A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr* **10**, 49-66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>
- Sahoo A, Mandal AK, Dwivedi K, Kumar V (2020) A cross talk between the immunization and edible vaccine: Current challenges and future prospects. *Life Sci* **261**, 118343. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118343>
- Saurabh B, Dahiya R (2015) Chapter 8 - Plant-Based Biotechnological Products With Their Production Host, Modes of Delivery Systems, and Stability Testing. *Academic press*, 293-331. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802221-4.00008-X>
- Saxena J, Rawat S (2013) Advances in Biotechnology. U: Edible Vaccines. 207-226. [https://doi.org/10.1007/978-81-322-1554-7\\_12](https://doi.org/10.1007/978-81-322-1554-7_12)
- Streatfield SJ (2006) Mucosal immunization using recombinant plant-based oral vaccines. *Methods* **38**, 150-157. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2005.09.013>
- Svetec IK (2024) Predavanja iz predmeta Genetičko inženjerstvo, predavanje 12. Pristupljeno: 8. kolovoza 2024. <https://moodle.srce.hr/2023-2024/course/view.php?id=165592>
- Tamang S (2023) Electroporation: Definition, Principle, Steps, Uses - Microbe notes. <https://microbenotes.com/electroporation-principle-steps-uses/> Pristupljeno: 17. kolovoza 2024.
- Yarra R (2020) Plastome engineering in vegetable crops: current status and future prospects. *Mol Biol Rep* **47**, 8061-8074. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05770-3>

### **Izjava o izvornosti**

Ja, Dora Puškaš, izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

---

Vlastoručni potpis