

# Biljni virusi - nova generacija nanočestica

---

**Vidović, Anja**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2022**

*Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj:* **University of Split, Faculty of Science / Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:166:876076>

*Rights / Prava:* [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-11-04**

*Repository / Repozitorij:*

[Repository of Faculty of Science](#)



Sveučilište u Splitu

Prirodoslovno-matematički fakultet

Odjel za biologiju

Anja Vidović

**BILJNI VIRUSI - NOVA  
GENERACIJA NANOČESTICA**

Završni rad

Split 2022.

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju

Anja Vidović

**BILJNI VIRUSI - NOVA  
GENERACIJA NANOČESTICA**

Završni rad

Split 2022.

Ovaj rad, izrađen pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Elme Vuko, predan je na ocjenu Odjelu za biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu radi stjecanja zvanja sveučilišne prvostupnice biologije (*univ. bacc. biol.*)

## Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Splitu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Odjel za biologiju  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

Završni rad

# Biljni virusi - nova generacija nanočestica

Anja Vidović

Biotehnologija je znanost koja koristi biološke procese za dizajniranje novih proizvoda. Danas sve veću pozornost u biotehnologiji privlače biljni virusi. Biljni virusi su se pokazali kao izvrsna baza za stvaranje virusnih nanočestica (*virus nanoparticles*, VNP) i virusima nalik nanočestica (*virus like nanoparticles*, VLP), nove generacije nanonosaa. Biljni virusi su specifični s obzirom na to s kojim stanicama stupaju u kontakt. Specifična građa biljnih virusa omogućuje interakcije sa stanicama zdravih i bolesnih tkiva. Nanočestice na bazi biljnih virusa je moguće modificirati i tako ciljati druge stanice s jednakom specifičnošću. U liječenju karcinoma biljni virusi se istražuju kao dostavljači kemoterapije. U razvoju cjepiva, biljne virusne nanočestice se istražuju kao baza proteinskih cjepiva. Cjepiva za COVID-19 na bazi biljnih virusa su u kliničkim i predkliničkim fazama testiranja. Primjena virusnih nanočestica u metodama molekularnog oslikavanja daje čistiju sliku i u odnosu na konvencionalne metode smanjuje toksičnost potrebnih kemikalija. Zato je istraživanje VNP-ova i VLP-ova jedan od temelja medicine budućnosti.

**Ključne riječi:** biljni virusi, VNP, VLP, nanočestice, cjepiva; TMV

Rad je pohranjen u knjižnici Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Splitu

**Rad sadrži:** 36 stranica, 12 grafičkih prikaza, 21 literaturna navoda.

**Mentor:** izv. prof. dr. sc. Elma Vuko

**Ocjenjivači:** izv. prof. dr. sc. Elma Vuko

prof. dr. sc. Ivana Bočina

doc. dr. sc. Željana Fredotović

**Rad prihvaćen:** Rujan, 2022

## Basic documentation card

University of Split  
Faculty of Science  
Department of Biology  
Ruđera Boškovića 33, 21000 Split, Hrvatska

B. Sc. Thesis

# Plant viruses – a new generation of nanocarriers

Anja Vidović

Biotechnology is a branch of science that uses biological processes to develop new products. Today, biotechnology is increasingly focusing its attention on plant viruses. Plant viruses have proven to be an excellent basis for the development of virus nanoparticles (VNP) and virus-like nanoparticles (VLP), the new generation of nanocarriers. Plant viruses are very specific about the cells with which they interact. The specific structure of plant viruses enables interactions with healthy and diseased cells in tissues. Nanoparticles made from plant viruses can be modified to target different cells with the same specificity. In cancer treatment, plant viruses are being explored as carriers for chemotherapeutic agents. In vaccine development, plant nanoparticles are being explored as the basis for protein vaccines. Vaccines against COVID - 19 using plant viruses are in preclinical and clinical trials. The use of plant nanoparticles in molecular imaging provides a cleaner image and reduces the toxicity of chemicals compared to conventional methods. For this reason, research into VNP-s and VLP-s is one of the foundations for the future of medicine.

**Key words:** plant viruses, VNP, VLP, nanoparticle, vaccines, TMV

Thesis deposited in library of Faculty of Science, University of Split.

**Thesis consists of:** 36 pages, 12 graphic figures, 21 references.

**Supervisor:** Ph.D Elma Vuko, *Associate professor*

**Reviewers:** Ph.D Elma Vuko, *Associate professor*

Ph D Ivana Bočina, *Full professor*

Ph D Željana Fredotović, *Assistant Professor*

**Thesis accepted:** September, 2022.

## **IZJAVA**

*kojom izjavljujem s punom materijalnom i moralnom odgovornošću da sam završni rad s naslovom BILJNI VIRUSI – NOVA GENERACIJA NANOČESTICA izradila samostalno pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Elme Vuko. U radu sam primijenila metodologiju znanstveno-istraživačkog rada i koristila literaturu koja je navedena na kraju završnog rada. Tuđe spoznaje, stavove, zaključke, teorije i zakonitosti, koje sam izravno ili parafrazirajući navela u završnom radu, na uobičajen i standardan način citirala sam te povezala fusnotama s korištenim bibliografskim jedinicama. Rad je pisan u duhu hrvatskog jezika.*

*Studentica*

*Anja Vidović*

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Elmi Vuko na strpljenju, savjetima i pomoći u pisanju ovog završnog rada.



## Sadržaj

[OBI]

|   |           |
|---|-----------|
| 1.1. Općenito o virusima.....   | 1         |
| 1.2. Građa biljnih virusa .....   | 1         |
| 1.3. Životni ciklus virusa i infekcija domaćina.....                    | 3         |
| 1.4. Karakteristike biljnih virusa važne za biotehnološku upotrebu..... | 5         |
| <b>2. RAZRADA TEME .....</b>  | <b>10</b> |
| <b>2.1. Modifikacije virusa za prijenos željenih molekula.....</b>      | <b>10</b> |
| 2.1.1. Samosastavljanje.....  | 10        |
| 2.1.2. Infuzija molekula u unutrašnjost nanočestice .....               | 11        |
| 2.1.3. Genetske modifikacije .....                                      | 12        |
| 2.1.4. Biokonjugacija.....  | 13        |
| <b>2.2. Interakcije nanočestica s domaćinom.....</b>                    | <b>14</b> |
| 2.2.1. Unos lijekova virusnim nanočesticama u organizam .....           | 14        |
| 2.2.2. Kako biljni virusi prepoznaju stanice .....                      | 15        |
| 2.2.3. Ulazak biljnog virusa u željenu stanicu .....                    | 16        |
| 2.2.4. Biljne nanočestice u stanici .....                               | 17        |
| 2.2.5. Biljne nanočestice u organskom sustavu .....                     | 19        |
| <b>2.3. Moguće primjene virusnih nanočestica .....</b>                  | <b>21</b> |
| 2.3.1. Liječenje karcinoma i zaraznih bolesti .....                     | 21        |
| 2.3.2. Cjepiva.....   | 22        |
| 2.3.3. Slikanje i teranostika.....                                      | 23        |
| <b>3. ZAKLJUČCI .....</b>   | <b>25</b> |
| <b>4. LITERATURA .....</b>  | <b>26</b> |

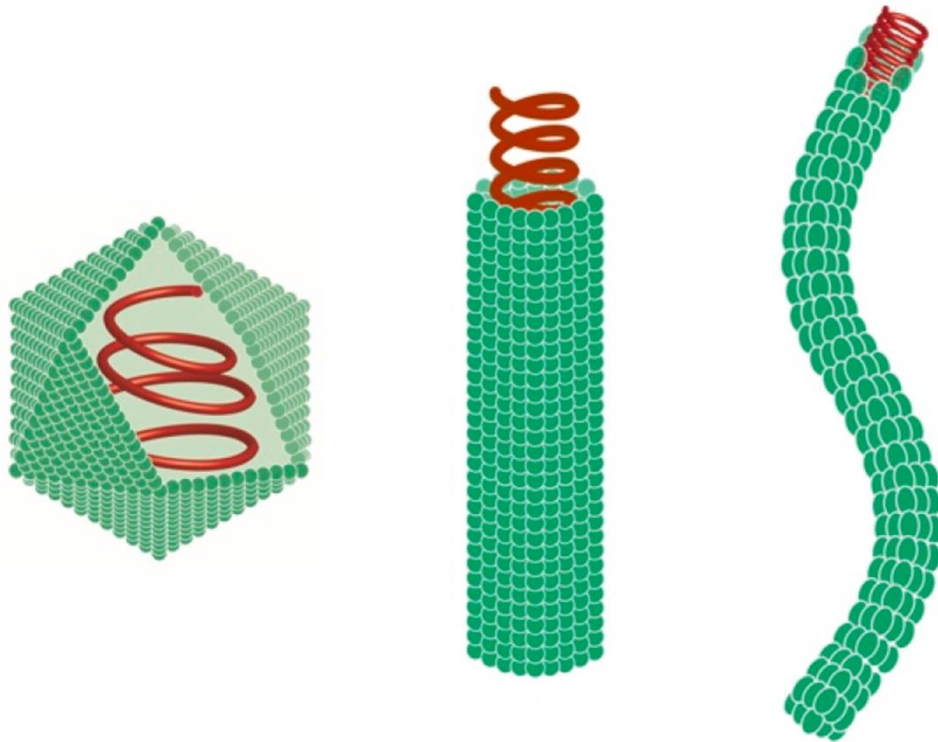
# 1. UVOD

## 1.1. Općenito o virusima

Virusi su infektivne čestice koje se mogu dijeliti samo u stanicama domaćina. Građeni su od virusnog genoma (DNK ili RNK) i virusne kapside. Izvan domaćina virusna čestica nije metabolički aktivna. Virusni se smatraju granicom živog i neživog svijeta zbog toga što su virusne čestice aktivne samo u domaćinu i nemaju vlastiti metabolički sustav. Molekularna evolucija procjenjuje da su se virusi pojavili u razdoblju ordovicija (prije više od 450 milijuna godina), iako pojava prvog virusa nije točno datirana. Svaki živi organizam ima barem jednu vrstu virusa kojem je domaćin. Virusne čestice su veličine između 20 i 1000 nm. Zbog svoje veličine mogu se vidjeti isključivo elektronskim mikroskopom. Stanice koje su zaražene virusom pokazuju citopatološke promjene koje su važne za detekciju virusa. Primjer takvih promjena u biljnom tkivu je mozaični uzorak na listovima inficiranih biljaka duhana. Bolest koja je uzrokovala ovakve promjene na duhanu opisana je u 19. stoljeću. Ruski student Dimitrij Josifović Ivanovski je cijedio sok inficiranih biljaka i više puta ga filtrirao kroz filter papir koji zadržava bakterije. Filtrirani sok je i dalje bio infektivan kada bi se utrljao u zdrave biljke. Ivanovski je time objasnio da se u filtriranom biljnom soku nalaze toksini bakterija koji uzrokuju zarazu. Nizozemski mikrobiolog Martinus Willem Beijerinck, izvodi isti eksperiment i na osnovi svojih zapažanja govori o novom tipu infektivnog uzročnika, pri čemu pretpostavlja da se radi o proteinskim molekulama koje se razmnožavaju. Prvi otkriveni, snimljeni i kristalizirani virus bio je virus mozaične bolesti duhana (*tobacco mosaic virus*, TMV)[1].

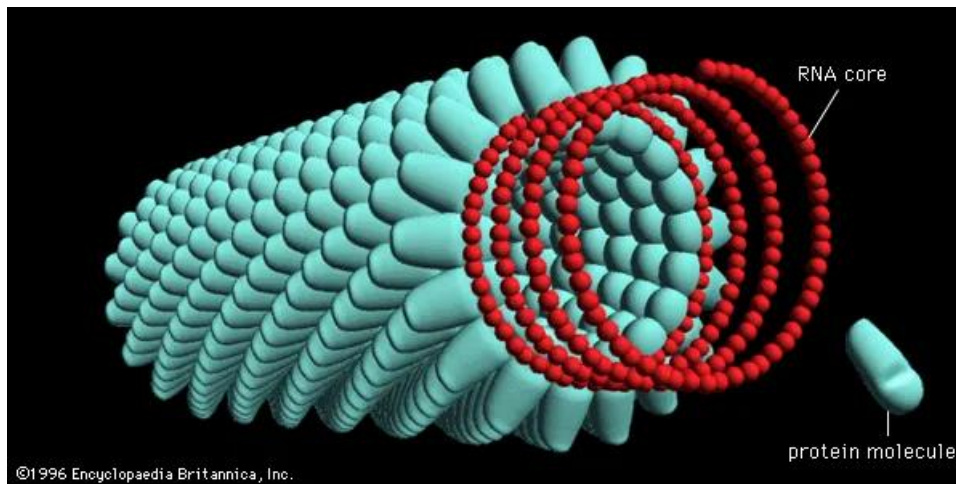
## 1.2. Građa biljnih virusa

Većina biljnih virusnih čestica ima ikozaedran oblik (poliedrična ili izometrična građa), produžen oblik (anizometralan ili oblik štapića) ili rjeđe oblik koji je sličan bakterijama (npr. oblik metka).



Slika 1. Oblici virusnih čestica: ikozaedralni, štapićasti i filamentni [2]

Biljni virusi mogu imati sve poznate oblike nukleinskih kiselina, ali prevladavaju jednolančani RNK virusi i dvolančani RNK virusi. Virusne nukleinske kiseline su smještene unutar virusnog proteinskog omotača ili kapside. Nukleinska kiselina zajedno sa kapsidom naziva se nukleokapsidom ili virusnim nukleoproteinom. Kapsida se sastoji od većeg broja najčešće istovrsnih proteinskih molekula (proteinskih podjedinica). Proteinske podjedinice se pravilno udružuju u veće tvorbe odnosno kapsomere (morfološke jedinice). Kapsomere su najčešće sastavljene od pet podjedinica (pentamere) ili od šest (heksamere). Kod složenih virusa oko kapside dolazi još jedan sloj, odnosno virusna ovojnica, koja osim proteina sadrži lipide i ugljikohidrate. Ovojnica najvećim dijelom potječe od stanične membrane domaćina. Kod animalnih virusa ovojnica je česta, dok je kod biljnih virusa izuzetak. Mnogi virusi imaju zrakaste izrasline iz ovojnice (projekcije ili peplomere), koje mogu biti različitog oblika, ali se najčešće pri vrhu kuglasto proširuju [1].



Slika 2. Čestica virusa mozaika duhana (*tobacco mosaic virus*, TMV) [web 1]

### 1.3. Životni ciklus virusa i infekcija domaćina

Postoje dva osnovna tipa virusnih infekcija: vegetativni (produktivni) tip i virogeni tip (virusi koji ugrađuju svoju nukleinsku kiselinu u DNK domaćina). Nije poznat niti jedan biljni virus koji se koristi virogenim tipom infekcije. Vegetativni tip infekcije postoji kao:

- Litički ciklus, u kojem virus nakon ulaska u stanicu skida omotač i koristi stanicu kako bi stvorio nove virusne dijelove za sastavljanje novih čestica. Nastale čestice razaraju stanicu i izlaze iz nje.
- Perzistentni ciklus, u kojem se virus u inficiranoj stanici kontinuirano razmnožava, a izlazi iz nje da pritom ne razgradi stanicu. Inficirana stanica se normalno dijeli i otpušta nove virusne čestice. Ovakav ciklus imaju svi biljni virusi.

Životni ciklus virusa može se podijeliti u pet faza :

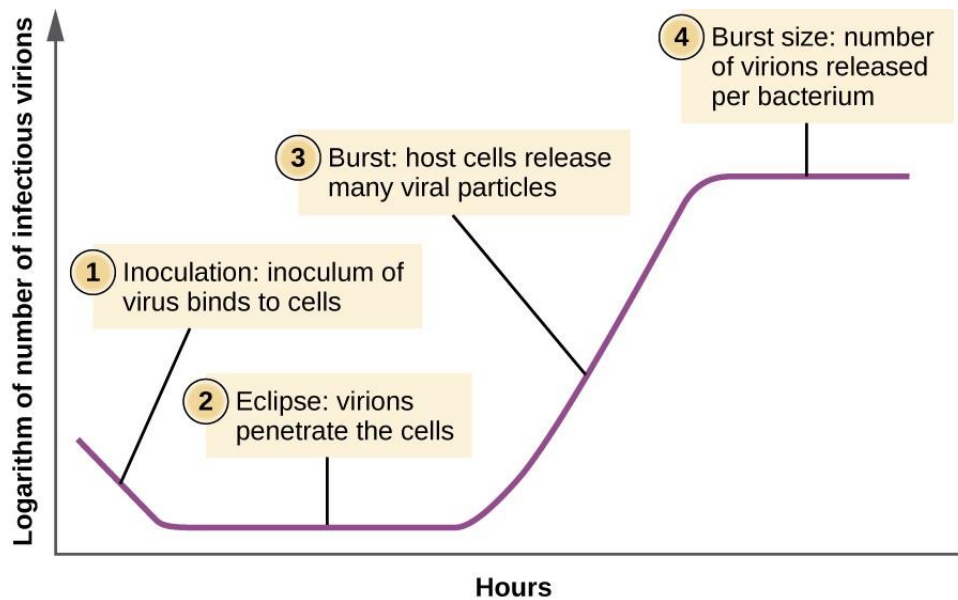
1. Faza adsorpcije virusa na površinu stanice
2. Faza ulaska virusa u stanicu
3. Faza sinteze osnovnih građevnih dijelova virusa
4. Faza sastavljanja sintetiziranih virusnih dijelova u nove čestice
5. Faza izlaženja virusnih čestica iz stanice

Zbog specifične građe površine biljne stanice virusi ne prolaze kroz prvu fazu ciklusa. Pretpostavka je da ne prolaze niti kroz drugu fazu ciklusa. Nije poznat točan proces ulaska virusa u biljnu stanicu. Postoje različite teorije, pri čemu su dvije prevladavajuće. Biljni virusi nemaju pričvrstna mjesta, a biljne stanice na svojoj površini nemaju receptore, već celuloznu stjenku. Pretpostavka prve teorije je nužno probijanje stanične stijenke i prolazak virusa kroz nastale rane. Tako virusi dolaze do stanične membrane, a zatim i u stanični protoplast. Bez rana u stijenci virus ne može zaraziti biljnu stanicu, iako postoji mogućnost da virus uđe u neoštećenu stanicu preko nekog vektora (npr. kukci, gljivice...). Prema drugoj teoriji virus ulazi u stanicu kroz ektodezmije (protoplazmatske otvore u staničnoj stijenci). Nedostatak ove teorije je činjenica da virusi nisu nađeni u ektodezmijama. Nije poznato ni kako virus prolazi staničnu membranu pri čemu postoje tri prevladavajuće teorije:

1. Rana koju virusi koriste za prolazak zahvaća staničnu stijenku i membranu, što osigurava put do protoplasta. Nakon prolaska virusa stijenka i membrana se oporavljaju.
2. Virusi prolaze na mjestu rane kroz staničnu stijenku. Dolaze na staničnu membranu, a zatim ulaze u protoplast stanice fagocitozom. Nedostatak ove teorije je činjenica da kod stanica koje imaju normalan unutarnji stanični tlak (turgor) ne nastupa fagocitoza.
3. Virus prolazi kroz staničnu membranu pomoću elektronskih zona ili mjehurića. Elektronske zone nastaju kao posljedica ravnjanja i zacjeljivanja površine stanične stijenke nakon što virus stvori ranu. „Mjehurići“ dolaze u kontakt sa staničnom membranom, privremeno se vežu s vodom i staničnim strujanjem ulaze u stanicu.

Ostatak životnog ciklusa biljnog virusa je sličan animalnim virusima. Nakon ulaska u protoplast, virusna kapsida se razgrađuje i oslobađa genom. Virusni genom ulazi u jezgru zaražene stanice gdje stvara vlastite glasničke RNK (mRNK). Virusne mRNK dolaze na ribosome koji sintetiziraju dijelove virusne čestice, odnosno proteinske podjedinice koje se

povezuju u kaspidu. Kada se novonastali dijelovi virusne čestice sastave i sazriju, čestice su spremne za izlazak iz stanice. Zaražena stanica ne stupa u litički ciklus već se zreli virusi šire plazmodezmijama. Period u kojem stanica zaražena virusom stvara nove virusne čestice se zove period pomrčine. Funkcionalna i infektivna virusna čestica se naziva virion [1].



Slika 2. Grafički prikaz životnog ciklusa virusa [web 2]

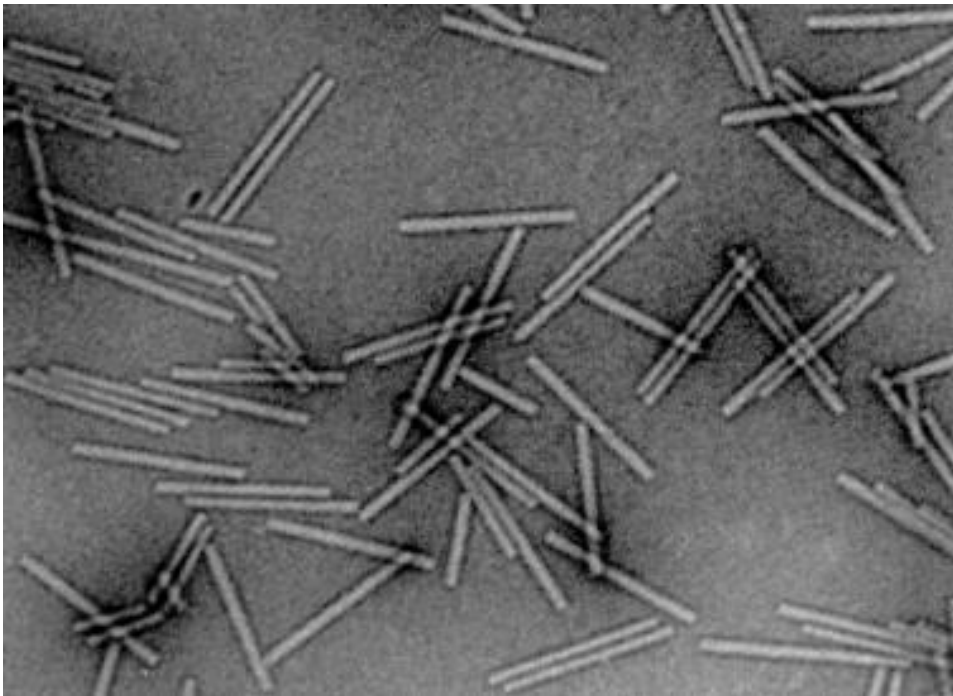
#### 1.4. Karakteristike biljnih virusa važne za biotehnološku upotrebu

Najvažnija karakteristika materijala korištenih u biotehnologiji je biokompatibilnost. Taj pojam opisuje kompatibilnost materijala sa živim tkivom. Kako bi se materijal nazvao biokompatibilnim, ne smije proizvoditi toksine i/ili izazivati imunološki odgovor dok se nalazi u tkivu. Materijali koji su biokompatibilni primarno se koriste za medicinske implantate i u protetici kako bi se izbjeglo odbacivanje implantata od strane tkiva. Biljni virusi su biokompatibilni zbog toga što ne izazivaju bolesti ljudi i nisu toksični za ljude. Čovjek često dolazi u kontakt s biljnim virusima jedući zaražene biljke pri čemu ne dolazi do zaraze. Biljne nanočestice mogu tolerirati nepovoljna okruženja, kao što je primjerice želučana kiselina i pri tome ostati biokompatibilni. Kada biljni virus uđe u stanicu brzo i potpuno se razgrađuje proteolitičkom aktivnošću lizosoma. Produkti razgradnje biljnih virusa nisu toksični, što je prednost u odnosu na sintetičke nanočestice. Biljni virusi se razgrađuju na aminokiseline i proteine koji nisu štetni za stanicu. Biljne virusne nanočestice su lako raspršive u vodi, što omogućava laku zarazu biljaka. U području biotehnologije ovo svojstvo omogućava nove

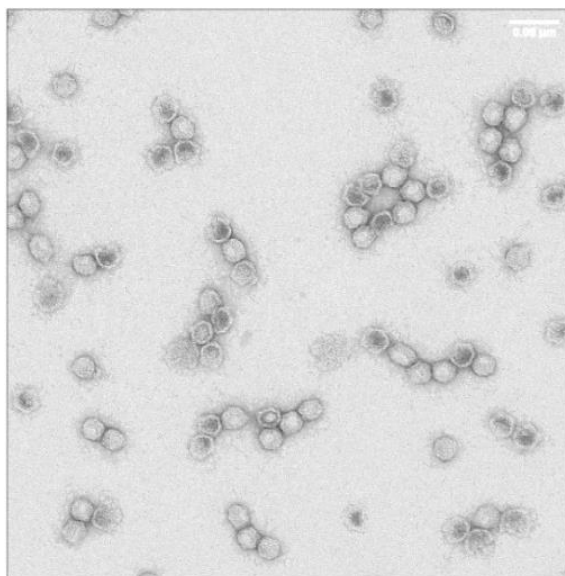
načine formulacije lijekova s biljnim virusima, npr. cjepiva koja se primjenjuju oralno ili intranazalno. Ovakva primjena biljnih virusa ima brojne prednosti, primjerice laka dostupnost, brza proizvodnja i lako pročišćavanje u velikim količinama. Kultiviraju se u biljkama, što je prednost u odnosu na animalne ili bakterijske viruse jer su uvjeti za održavanja biljaka jednostavniji. Virusi koji se najčešće proučavaju u području biotehnologije su:

- virus mozaične bolesti duhana (TMV)
- virus mozaika crnog graha (CPMV)
- virus klorotične pjegavosti crnog graha (CCMV)
- virus pjegavosti fizalisa (PhMV)
- virus mozaične bolesti sesbanie (SeMV)
- virus krumpira X (PVX)

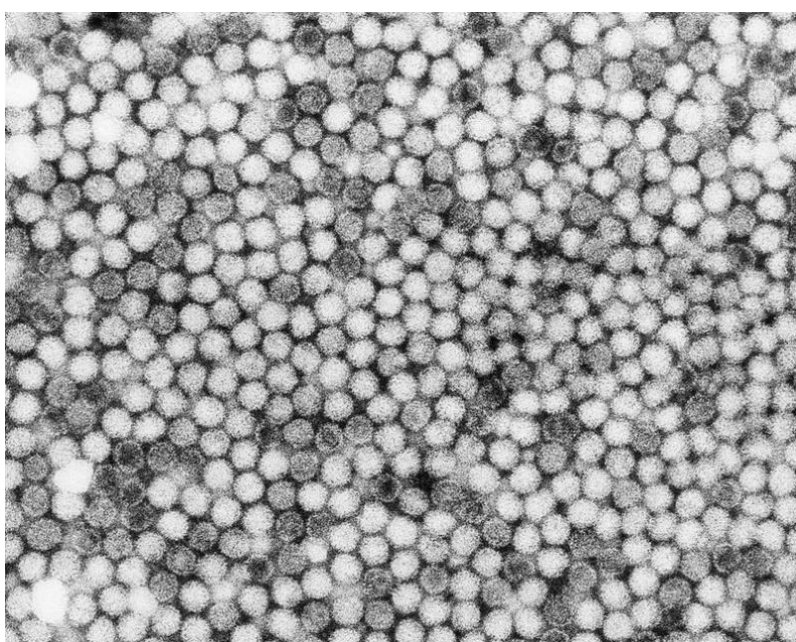
Navedeni virusi imaju ikozaedralnu, štapičastu ili filamentnu strukturu, jer iste pokazuju najbolju distribuciju u organizmu [2, 3, 4, web 3].



Slika 3. Elektronmikroskopska snimka čestica virusa mozaika duhana (*tobacco mosaic virus*, TMV) [web 4]

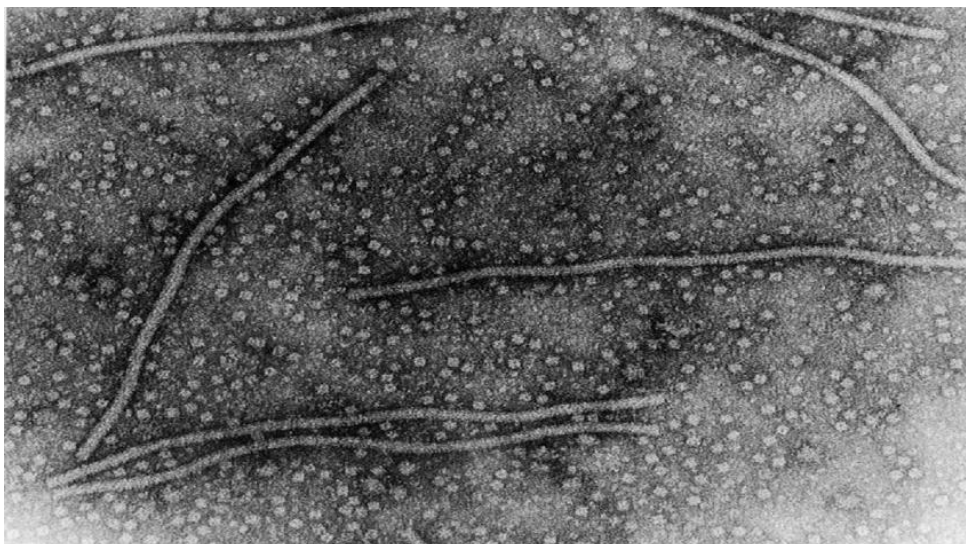


Slika 4. Elektronmikroskopska snimka čestica virusa mozaika crnog graha (*cowpea mosaic virus*, CPMV) [web 5]



Slika 5. Elektronmikroskopska snimka čestica virusa klorotične pjegavosti crnog graha (*cowpea chlorotic mottle virus*, CCMV) [web 6]





Slika 6. Elektronmikroskopska snimka čestica virusa krumpira X (*potato virus X*, PVX)  
[web 7]

Virusima koji se primjenjuju u biotehnologiji, potrebno je detaljno poznavati građu kapside, genetički sastav i ponašanje u živom tkivu. Virusi korišteni u biotehnologiji imaju jednostavnu kapsidu i organizaciju genoma. Najčešće se koriste virusi koji su detaljno istraženi kao što je virus mozaične bolesti duhana (*tobacco mosaic virus*, TMV). Proučavanjem građe biljnih virusa, otkrivene su regije kapside povoljne za modifikacije. Morfološka uniformnost virusa bitna je za biotehnologiju jer modifikacijom željenog mjesta na jednoj virusnoj čestici, isto mjesto se modifikira na drugoj čestici. Virusne čestice koje nastaju kao rezultat modifikacija nazvane su virusne nanočestice (*virus nanoparticles*, VNP) ili virusima nalik nanočestice (*virus like nanoparticles*, VLP). Razlika između VNP-ova i VLP-ova je u tome što VLP-ovi nemaju genom i ne mogu se replicirati u živim stanicama. Eliminacija genoma virusa može za posljedicu imati i promjenu morfološkog izgleda kapside. Na primjeru TMV-a, uklanjanje genoma iz kapside mijenja oblik kapside iz karakterističnog štapičastog u “double-disk” oblik. Oblik kapside TMV-a se može dodatno modifikirati termičkom obradom, nakon koje kapsida poprima sferičan oblik. Modifikacije morfološke strukture virusne kapside su poželjne, zbog toga što mijenjaju interakcije čestice virusa i stanice. Time je moguće od jednog početnog virusa napraviti niz VNP-ova ili VLP-ova koji ciljaju širok spektar stanica. Čak i ako su pripadnici iste vrste, virusi koji imaju različit omjer stranica kapside ciljaju različite stanice [3, 3, 4].

Uz eliminaciju genoma i promjenu morfološke strukture kapside, najčešće modifikacije biljnih virusa vezane su uz modifikacije za ciljanje specifičnih stanica. Ovakve modifikacije omogućene su i nedostatkom tropizma biotehnoloških biljnih virusa. Virusni tropizam ovisi o

osjetljivosti (stanica mora posjedovati receptore potrebne za ulazak virusa) i permisivnosti (stanica mora dopustiti ulazak virusa). Virusima je moguće zaraziti samo osjetljive i permisivne stanice. Osjetljivost stanice se zove i tropizam domaćina. Tropizam slučaja bolesti opisuje proces kojim su različiti virusi (patogeni) evoluirali kako bi ciljali specifične vrste domaćina i specifične stanice unutar domaćina [3, web 8]. Biotehnološki biljni virusi ne pokazuju tropizam zbog toga što nemaju dodatnu ovojniciu i na kapsidi nemaju pričvrstna mjesta kojima se vežu za stanice.

Još jedna prednost biljnih virusa važna za biotehnologiju je mogućnost samosastavljanja virusnih čestica. Samosastavljanje virusa je proces u kojem se istovremeno stvara kapsida i unutar nje se inkapsulira virusni genom. Proces samosastavljanja olakšava i ubrzava proizvodnju velikog broja nanočestica, Povoljni uvjeti samosastavljanja se najčešće postižu dodavanjem pufera u otopinu u kojoj se nalazi virusna čestica. Proces samosastavljanja je jedan od glavnih načina inkapsulacije željenih molekula u virusnu kapsidu [5].

## 2. RAZRADA TEME

### 2.1. Modifikacije virusa za prijenos željenih molekula

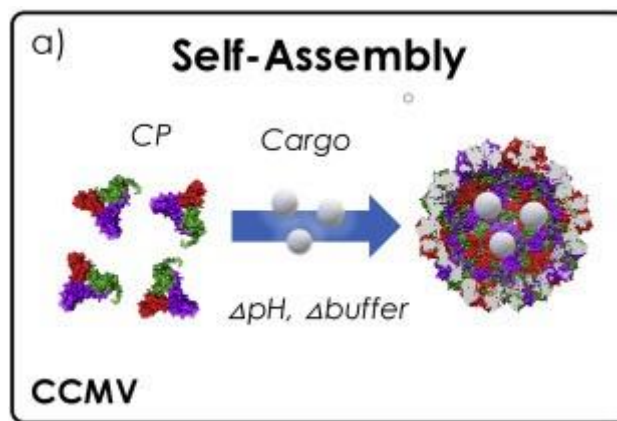
#### 2.1.1. Samosastavljanje

Samosastavljanje je jedan od najefikasnijih načina inkapsulacije željenih molekula u virus. Koju metodu virusna čestica koristi za samosastavljanje ovisi o omjeru ukupne jačine protein-protein interakcija i protein-genom interakcija [5]. Iako su istraživanja o ovom procesu oskudna, poznata su dva procesa sastavljanja viriona:

- Samosastavljanje koje se sastoji od dva dijela: nukleacija i elongacija. Nukleacija počinje stvaranjem slabih protein-protein ili hidrofobnih veza između proteinskih podjedinica virusne kapside. Skupljanjem više proteinskih podjedinica stvara se podjedinica s više od 50% mogućnosti za daljnji rast (kristalizaciju) kapside. Nakon stvaranja podjedinice koja omogućava daljnju kristalizaciju (ishodište kristalizacije), počinje faza elongacije (faza rasta). Na ishodište kristalizacije se nastavljaju dodavati proteinske podjedinice dok se kapsida ne zatvori. Neki autori smatraju da je zatvaranje virusne kapside zaseban korak zbog drugačijih kinetičkih parametara ovog procesa [5].
- Samosastavljanje koje se temelji na interakcijama kapsidnih proteina s genetičkim materijalom virusa. U ovom procesu se formiraju elektrostatske veze protein-genom, koje su jače od protein-protein veza. Proteinske podjedinice su pozitivno nabijene, a virusni genom negativno nabijen. Veliki broj proteinskih podjedinica se veže za virusni genom. Skupljanjem velikog broja podjedinica stvaraju se protein-protein veze između podjedinica, što daje pravilan oblik virusnoj kapsidi i zatvara je oko genetskog materijala [5].

Proces samosastavljanja je važan za inkapsulaciju željenih molekula u česticu biljnog virusa. Jedna od metoda stvaranja VLP-ova je promjena pH, uvjeta pufera i ionske jakosti otopine u kojoj se nalazi čestica biljnog virusa. Promjene uvjeta okoline u kojoj se virusna čestica nalazi, uzrokuje rastavljanje kapside i uklanjanje virusnog genoma. Virusna kapsida se ponovno može sastaviti oko molekula koje želimo dostaviti metodom izmjene pufera. Primjerice, kapsida CCMV-a se rastavlja i otpušta genom pri fiziološkom pH ili visokoj ionskoj jakosti otopine. Kapsida se može ponovno sastaviti pri niskom pH ili niskoj ionskoj jakosti otopine. Proces samosastavljanja se može postići i povećavanjem koncentracije proteinskih podjedinica virusne

kapside u otopini čime prolazimo kritičnu koncentraciju otopine. To je koncentracija iznad koje se formiraju čestice i započinje proces samosastavljanja. Druga metoda samosastavljanja koristi interakcije proteinska podjedinica - virusni genom. Zbog pozitivnog naboja proteinske podjedinice moguće je formirati virusnu kapsidu oko negativno nabijene molekule. Negativno nabijene molekule koje se žele prenijeti virusnim nanočesticama imitiraju negativan naboj genoma i stvaraju elektrostatske veze s proteinskim podjedinicama. U slučaju prenošenja neutralnih ili pozitivnih molekula, neutralne i pozitivne molekule se miješaju s molekulama negativnog naboja kako bi naboj smjese molekula bio ukupno negativan [4, 5].

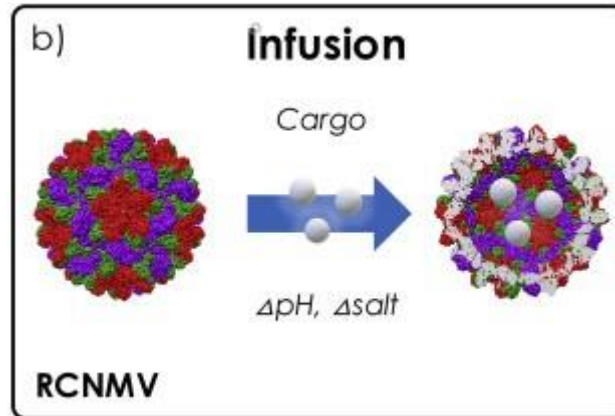


Slika 7. Shematski prikaz samosastavljanja na primjeru virusa klorotične pjegavosti crnog graha (*cowpea mottle virus*, CCMV) [4]

### 2.1.2. Infuzija molekula u unutrašnjost nanočestice

Kapsida biljnih virusa je porozna pa šupljine u kapsidi omogućuju prolazak malih molekula u unutrašnjost. Pri određenim uvjetima moguće je povećati šupljine u kapsidi biljnih virusa. Kod virusa nekrotičnog mozaika crvene djeteline (*red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV), moguće je povećati poroznost čestica uklanjanjem iona metala iz otopine u kojoj se nalaze. Uklanjanjem iona kalcija i magnezija iz otopine, stvaraju se pore veličine 11–13 Å u virusnoj kapsidi. Ponovnim dodavanjem iona kalcija i magnezija u otopinu s RCNMV-om, veličina pora kapside se smanjuje na veličinu prije uklanjanja. U čestice RCNMV-a je metodom infuzije ubačen kemoterapijski lijek doksorubicin (DOX). Čestice RCNMV-a s DOX-om su dodatno modificirane dodavanjem CD46-ciljajućih peptida na virusnu kapsidu. CD46 je protein stanične membrane i dio je imunološkog sustava. Ovako modificirana čestica RCNMV-a je pokazala citotoksičnost na tumorske HeLa stanice. Virus RCNMV s ubačenim DOX-om i

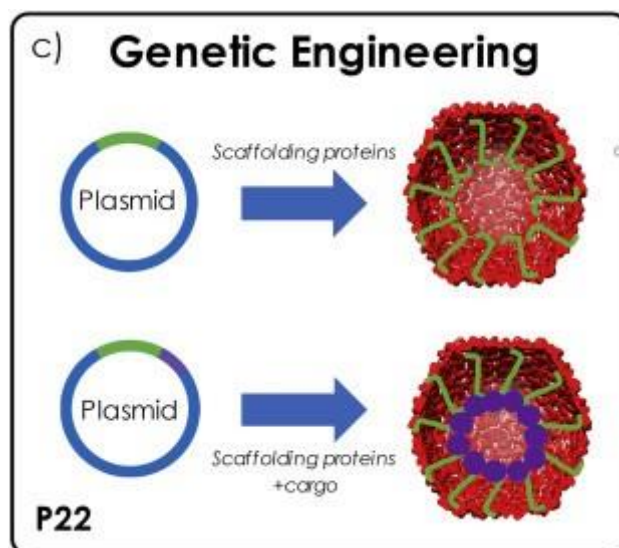
CD46-ciljajućim peptidima dobar je primjer usklađenosti različitih metoda koje se koriste za modifikaciju biljnih virusa u biotehnologiji [2, 6].



Slika 8. Shematski prikaz infuzije molekula u unutrašnjost virusne kapside na primjeru virusa nekrotičnog mozaika crvene djeteline (*red clover necrotic mosaic virus*, RCNMV) [4]

### 2.1.3. Genetske modifikacije

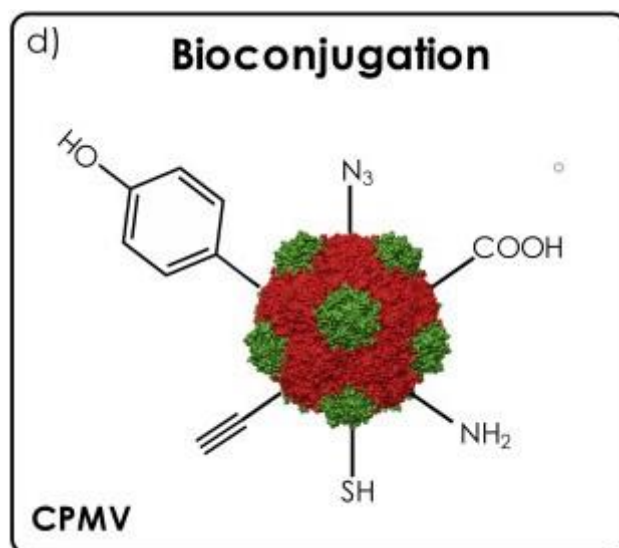
Genetske modifikacije biljnih virusa u biotehnologiji se koriste za izmjenu virusnog genoma. Izmjena genoma omogućava integraciju nenativnih struktura u kapsidu. Najčešće se u kapsidu dodaju ligandi za ciljanje specifičnih stanica, antigeni, aminokiseline i proteini. Cilj dodavanja nenativnih struktura u kapsidu je stvaranje povoljnih mjesta za daljnje modifikacije npr. funkcionalizaciju (spajanje dodatnih komponenti na viralnu kapsidu). Jedan način izmjene genoma biljnih virusa je promjena kvarterne i tercijarne strukture RNK. Time nastaju RNK petlje koje dalje omogućuju specifično vezanje molekula koje želimo prenjeti. Virusna RNK s petljama još uvijek stvara elektrostatske veze s proteinskim podjedinicama virusne kapside, pa proces smosastavljanja virusne čestice nije poremećen [2, 4].



Slika 9. Shematski prikaz genetskog modificiranja na primjeru bakteriofaga P22; ista metoda se koristi i za biljne viruse [4]

#### 2.1.4. Biokonjugacija

Biokonjugacija je proces vezanja dviju molekula od kojih je barem jedna biomolekula npr. ugljikohidrati, nukleinske kiseline, proteini. U biotehnologiji biljnih virusa biokonjugacija se koristi za dodavanje struktura na površinu virusne kapside npr. proteina za ciljanje stanica ili lijekova. U biokonjugaciji molekula na kapsidu koriste se bočni lanci aminokiselina koje grade proteinske podjedinice kapside, pri čemu se koriste sljedeće aminokiseline: Lizin (Lys), Asparaginska kiselina (Asp), Glutaminska kiselina (Glu), Cistein (Cys), Tirozin (Tyr), Triptofan (Trp). Određene proteinske podjedinice virusne kapside imaju bočne lance aminokiselina lako dostupne za biokonjugaciju. Primjerice, CCMV virus ima 540 bočnih ogranaka amino skupina i 560 bočnih ogranaka karboksilnih skupina koje se mogu modificirati biokonjugacijom. Virus ima ikozaedralnu građu, dok virusi koji imaju štapičastu ili filamentnu građu, primjerice TMV nemaju dostupnih bočnih ogranaka aminokiselina za biokonjugaciju. Biokonjugacija na kapsidu štapičastih ili filamentnih biljnih virusa se odvija putem N- i C-terminalnih krajeva aminokiselina. Različite kemijske reakcije se koriste za biokonjugaciju na kapsidu biljnih virusa pri čemu odabir biokonjugacijske reakcije ovisi o različitim faktorima, npr. u kakvoj se otopini virus nalazi, konjugira li se na bočni ogranak ili terminalni kraj, koriste li se dodatne reakcije biokonjugacije nakon ove, itd. [2, 4, 7, web 9].



Slika 10. Shematski prikaz biokonjugacije na primjeru virusa mozaika crnog graha (*cowpea chlorotic mottle virus*, CPMV) [4]

## 2.2. Interakcije nanočestica s domaćinom

### 2.2.1. Unos lijekova virusnim nanočesticama u organizam

Način unosa biljnih nanočestica u organizam vezan je uz tip stanica i tkiva s kojima ciljano stupaju u interakciju. Čestice CPMV-a unesene intravenozno primarno ulaze u dendritičke stanice imunološkog sustava, dok čestice unesene oralno ulaze u limfocite. Lijekovi s biljnim nanočesticama se unose u organizam načinom koji promovira njihovu interakciju sa željenim tkivom [2, 4].

Biljne virusne nanočestice (VNP) i virusima nalik nanočestice (VLP) su raspršive u vodi i često se daju putem otopina VNP-a ili VLP-a u puferu. Uspješno se unose intravenoznim, potkožnim, intramuskularnim, intraperitonealnim, intratrahealnim i intratumorskim injekcijama. Postoji mogućnost i uzimanja lijekova s biljnim nanočesticama oralno, zbog visoke stabilnosti nanočestica pri simuliranim gastrointestinalnim uvjetima. Biljni virusi su postojani pri različitim pH vrijednostima, širokom rasponu temperatura i različitim otapalima u organizmu, što ih čini izvrsnim nanonosacima [4].

Novija tehnologija unosa VNP-ova i VLP-ova u organizam je putem hidrogel kompozita. Hidrogelovi su unakrsno povezane hidrofilne polimerne mreže s visokim sadržajem vode zbog čega pokazuju biokompatibilnost i imaju različite medicinske primjene. Hidrogelovi koji su napunjeni biljnim nanočesticama sporo otpuštaju čestice što omogućava dulju prisutnost i stimulaciju tkiva lijekovima koje prenose. Tretmani hidrogelovima i biljnim nanočesticama korisni su u regenerativnoj medicini i liječenju karcinoma jer djeluju lokalno [4, 8].

Biljne nanočestice se mogu uzimati i respiratorno čime se lokaliziraju u dišnim organima. Trenutno se istražuje cjepivo protiv gripe na bazi mozaičnog virusa papaje (*papaya mosaic virus*, PapMV) koje se unosi intranazalno. Eksperimenti s miševima pokazali su da cjepivo na bazi PapMV nanočestica stvara više antitijela i jači mukozni imunitet od standardnog cjepiva protiv gripe. Mukozno tkivo je tanak i mekan sloj tkiva koje oblaže organe očnog, respiratornog, oralnog, gastrointestinalnog i genitourinarnog sustava. Mukozno tkivo je i prva linija obrane protiv patogena koji ulaze u organizam putem mukozne membrane. Detekcijom patogena u mukoznom sloju i njihovom brzom eliminacijom sprječava se razvoj bolesti. Stimuliranje stanica mukoznog tkiva biljnim nanonosačima omogućuje brže prepoznavanje i eliminaciju patogena. CPMV se pokazao kao idealan nosač kroz mukozni sloj jer se ne lijepi za glikoproteine koji grade mukoza zbog svojih pozitivno i negativno nabijenih bočnih ogranaka aminokiselina. Načini stimulacije mukoznog tkiva još nije poznat, ali rezultati daju novu perspektivu u borbi protiv plućnih bolesti [2, 4, web 10].

### 2.2.2. Kako biljni virusi prepoznaju stanice

Dokazano je da se biljni virusi mogu vezati za i ući u animalne i humane stanice. Smatra se da svaki virus ima drukčiji način prepoznavanja ciljnih stanica. Primjerice virus CPMV prepoznaje protein vimentin koji gradi citoskelet i nukleoskelet stanica. Prepoznavanjem vimentina, CPMV je mogao ući u zdrave stanice imunološkog sustava, upaljene stanice endotela i stanice karcinoma koje imaju vimentin. Uz prepoznavanje vimentina, građa i genom čestice CPMV-a imaju ulogu u ulasku u stanicu. Morfološka i genetička struktura CPMV-a je slična animalnim virusima iz obitelji *Picornaviridae*, od kojih je najpoznatiji virus prehlade. CPMV i virus prehlade su ikozaedralne građe i sadrže jednolančanu RNK. Primjer korelacije oblika kapside i vrsta stanica koju virus prepoznaje je virus PVX koji specifično cilja maligne B-limfocite Non-Hodgkinovog limfoma, a zaobilazi zdrava tkiva. Još uvijek nije poznato kakva



je korelacija između morfologije virusne kapside i virusnog genoma na tip stanica koje biljni virusi ciljaju [2, 4, 9, 10, web 11].

### 2.2.3 Ulazak biljnog virusa u željenu stanicu

Kada biljni virus prepozna stanicu, u nju može ući različitim staničnim putevima ili kombinacijom više njih. Primjeri su:

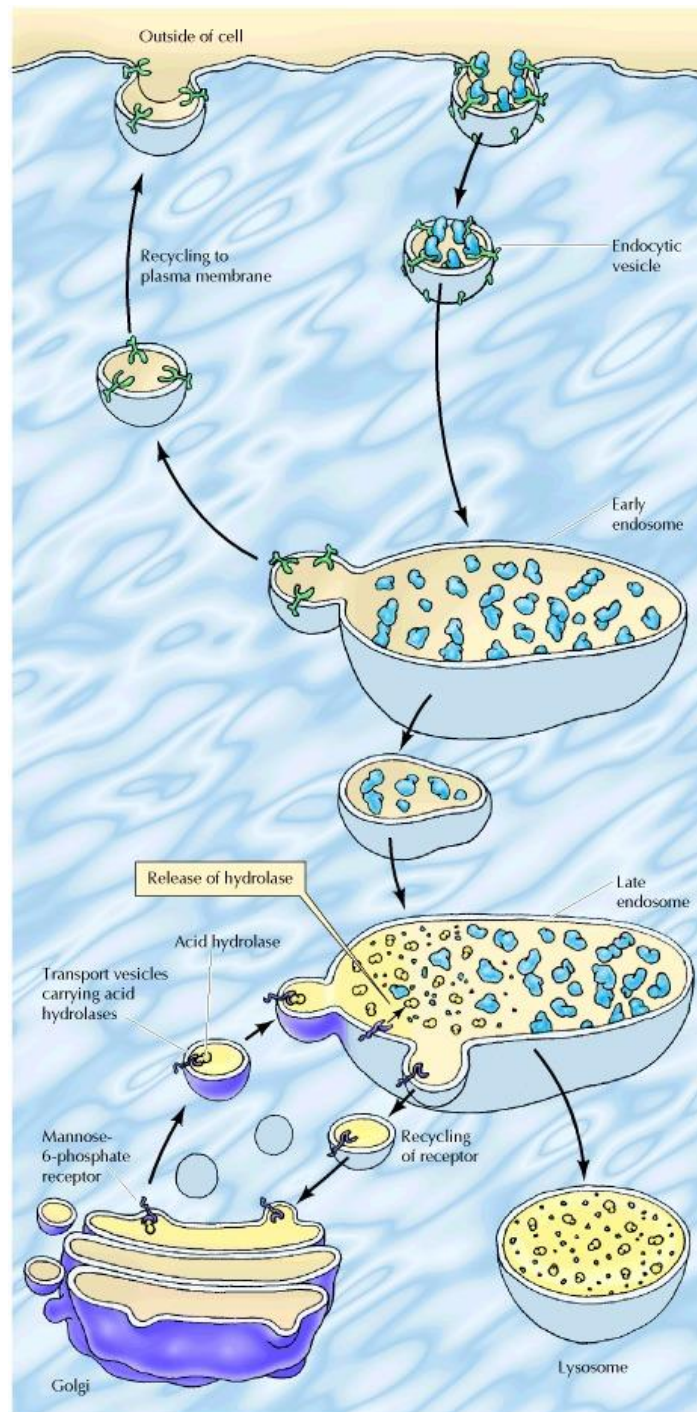
- Transport mikrotubulima: Virusi u stanicu ulaze putem vezikula koje se prenose kroz stanicu mikrotubulima. Mikrotubuli kao dijelovi citoskeleta kroz stanicu prenose različite organele i vezikule. Dužinom mikrotubularnih staza su prisutni kinezinski i dineinski proteini koji služe kao molekularni motori za kretanje. Kompleksi kinezinskih i dineinskih proteina također vežu teret za filamente mikrotubula, olakšavajući njihovu interakciju. Molekularni motori imaju dvije važne funkcije u unutarstaničnom transportu. Primarna funkcija je isporuka tereta na zadana mjesta u stanici kao odgovor na različite fiziološke podražaje. Molekularni motori također olakšavaju molekularne izmjene i kemijske interakcije između organela na membrani stanice [11].
- Endocitoza posredovana kaveolinskim, klatrinskim i integrinskim proteinima: Proces započinje uvrtnjem citoplazmatske membrane prema unutra što stvara jamicu u membrani. U jamici se nakupljaju tvari koje stanica želi unijeti u unutrašnjost. U staničnoj membrani se na mjestu gdje se stvara jamica skupljaju proteini koji će sudjelovati u endocitozi (klatrin, kaveolin ili integrin). Citoplazmatska membrana se nastavlja uvrtati dok se dvije strane membrane ne dotaknu. Zatim se kida veza između jamice i ostatka citoplazmatske membrane. Krajevi jamice, koja se sad zove vezikula, se spoje i stvore membranu koja je izvana obložena proteinima npr. klatrinom. Citoplazmatska membrana se vraća u prvobitni oblik dodatnim stvaranjem proteina aktina, koji služi kao potpora staničnoj membrani [11].

Smatra se da omjer veličine biljne nanočestice i površine stanice utječe na način kojim čestica ulazi u stanicu. Na način ulaska biljne nanočestice utječe i površinska struktura same stanice. Kao dokaz za korelaciju omjera veličine biljnih virusa, površine i površinske strukture stanice korišten je virus mozaične bolesti duhana s omjerom 17 (divlji tip), 8 i 4. Stanice na kojima je *in vitro* testiran način ulaska virusa su bile stanice karcinoma epitela (HeLa) i karcinoma endotela (HUVEC). TMV nanočestice omjera 4 i 8 su u HeLa stanice ulazile putem

mikrotubula. Nanočestice omjera 8 i 4 su u HUVEC stanice ulazile endocitozom posredovanom klatrinom. Nanočestice omjera 17 su HeLa i HUVEC stanice ulazile kombinacijom endocitoze posredovane kaveolarnim receptorima i transportom mikrotubula. Time je potvrđena hipoteza da omjer veličine nanočestice i površine stanice, kao i struktura površine same stanice utječe na metodu ulaska biljne nanočestice u stanicu. Pokus nije utvrdio zašto dolazi do promjene načina transporta nanočestica mijenjanjem parametara [2,4].

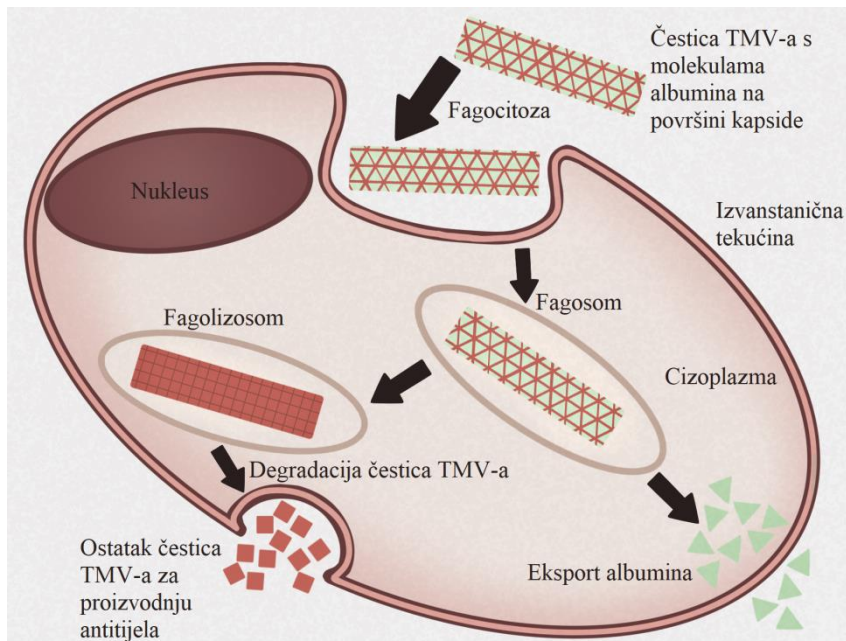
#### 2.2.4. Biljne nanočestice u stanici

Nanočestice biljnih virusa se u stanici metabolički razgrađuju u lizosomima. Lizosomi su organeli koji služe za razgradnju različitih makromolekula (DNK, RNK, proteini, polisaharidi i lipidi). Endocitoza je jedan od glavnih načina ulaska virusa u stanicu. Kao rezultat endocitoze biljni virus se nalazi u vezikuli. Vezikule s nanočesticama se spajaju se s ranim endosomima. Endosomi su stanični organeli uključeni u razvrstavanje i transport materijala preuzetog endocitozom do lizosoma. Nakon spajanja endosoma s vezikulom, dijelovi vezikula koji su podrijetlom iz stanične membrane se vraćaju u staničnu membranu. Rani endosomi sazrijevaju u kasne endosome. Glavna razlika između ranih i kasnih endosoma je pH unutar vezikule. Sazrijevanjem endosoma se spušta vezikularni pH na 5.5, što je potrebno za aktivaciju lizosomalnih enzima. Dodatna razlika ranih i kasnih endosoma je činjenica da membrana kasnih endosoma nema proteine koji pomažu u endocitozi, već proteine za prepoznavanje receptora lizosomalnih hidrolaza. Hidrolaze su enzimi koji razgrađuju makromolekule. Kada endosomi sazriju i dijelovi stanične membrane koji se recikliraju dođu u membranu, iz Golgijevog aparata izlaze vezikule pune lizosomalnih hidrolaza. Vezikule prepoznaju receptore kasnih endosoma i otpuštaju hidrolaze u kasne endosome što je konačni korak sazrijevanja endosoma u lizosome. U endosomima se tokom cijelog procesa sazrijevanja nalaze biljne nanočestice [2, 4, 12].



Slika 11. Proces metaboliziranja tvari koje su u stanicu unesene endosomima. Označeni dijelovi su: vanstanični matriks, vezikula, rani i kasni endosomi, Golgijev aparat, receptori lizosomalnih hidrolaza, vezikula lizosomalnih hidrolaza i lizosomi. Označeni procesi su recikliranje dijelova stanične membrane iz ranih endosoma, otpuštanje hidrolaza u unutrašnjost kasnih endosoma i recikliranje receptora lizosomalnih hidrolaza u Golgijevom aparatu [12]

Nanočestice u lizosomima otpuštaju molekule koje su prenosile zbog proteolitičke aktivnosti hidrolaza. Molekule koje su nanočestice prenosile izlaze iz lizosoma i dalje se transportiraju do ciljanog mjesta u stanici. Produkti razgradnje kapside i genoma biljnog virusa su aminokiseline i proteini. Produkti razgradnje biljnog virusa nisu toksični, ali sam proces razgradnje može uzrokovati oksidativni stres stanici. U usporedbi s sintetičkim nanočesticama čiji su produkti razgradnje toksični, biljni virusi su biokompatibilniji [2, 4].



Slika 12. Shematski prikaz metaboličkog puta kojim prolaze biljni virusi s označenim dijelovima [2]

Dokazano je da se biljne nanočestice metaboliziraju kada uđu u stanicu, iako to nije uvijek slučaj. Naime, činjenica da su nukleinske kiseline uspješno prenesene biljnim nanočesticama ukazuje na postojanje drugačijeg procesa otpuštanja zadanih molekula. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se identificirao proces otpuštanja molekula iz nanočestica koji zaobilazi metabolizam [2, 4].

#### 2.2.5. Biljne nanočestice u organskom sustavu

Kada biljne nanočestice dospiju u krvotok stupaju u interakciju s proteinima krvne plazme. Interakcija između nanočestice i proteina plazme rezultira formiranjem proteinske korone oko čestice. Formiranje proteinske korone mijenja ponašanje nanočestice *in vivo* jer se mijenja omjer veličina i površinski naboj kapside. Zbog ovih promjena nanočestice stupaju u

kontakt s drugačijim tipovima stanica. Promjena ciljnih stanica može dovesti do neefikasnosti i nuspojava molekula koje prenose. Ova pojava je češća kod sintetičkih naspram biljnih nanočestica. Problem se zaobilazi modifikacijom nanočestica s proteinima koje imunološki sustav ne smatra stranim proteinima, kao npr. polietilen glikol (PEG) ili albumin. Nanočestice TMV-a u usporedbi sa sintetičkim česticama imaju šest puta manju vjerojatnost formacije proteinske korone. [2, 4, 13]

Vrijeme cirkulacije i eliminacije biljnih virusa iz organizma varira. Cirkulacija je vrijeme koje nanočestica provede u organizmu dok ne dođe do ciljanog tkiva. Oblik biljne nanočestice ima utjecaj na duljinu cirkulacije u organizmu. Na primjer nativna štapičasta struktura TMV-a ima vrijeme cirkulacije od 3.5 minute. "Double disk" struktura TMV-a ima vrijeme cirkulacije od 2.3 minute. Modifikacije kapside također utječu na vrijeme cirkulacije tako što najčešće produžuju vrijeme cirkulacije biljnih virusa u organizmu. Štapičaste čestice TMV-a na koje je dodan PEG imaju vrijeme cirkulacije od 6.3 minute [2, 4].

Važna činjenica je poznavanje mjesta na kojem se sakupljaju biljne nanočestice koje nisu stigle do ciljanog tkiva. Tkivo u kojem će se biljne nanočestice sakupljati ovisi o metodi uzimanja nanočestica, fiziologiji organizma u kojem se nalaze i o morfologiji i modifikacijama virusne kapside. Nakon intravenoznog unosa, virus mozaika crnog graha se akumulira primarno u jetri, dok se X virus krumpira akumulira u slezeni. U slučaju dužeg zadržavanja nanočestica u ciljnom i neciljnom tkivu, može doći do toksičnosti za tkivo. Biljne nanočestice nisu toksične za bilo koje tkivo u kojem se nalaze jer se kratko zadržavaju u tkivima. Vrijeme zadržavanja biljnih virusa u tkivu jednako je vremenu zadržavanja sintetičkih nanočestica. Oblik kapside biljne nanočestice utječe na duljinu zadržavanja u tkivu. Virusne čestice ikozaedralnog oblika se zadržavaju u organizmu 24 sata, dok štapičasti i filamentni oblici nanočestica se zadržavaju u organizmu 96 sati. Biljni virus koji se najduže zadržava u organizmu je virus pjegavosti fikalisa, koji se u organizmu može zadržati i deset dana. Biljne viruse koji se sakupljaju u neciljnom tkivu imunološki sustav smatra stranim tijelima te se uklanjaju iz organizma retikuloendotelnim sustavom čija je glavna funkcija odstranjivanje otpadnih i stranih tvari fagocitozom [2,4, web 12].

## 2.3. Moguće primjene virusnih nanočestica

### 2.3.1. Liječenje karcinoma i zaraznih bolesti

Imunoterapija je vrsta liječenja koja koristi imunološki sustav oboljele osobe u borbi protiv karcinoma. Imunoterapija modificira imunološki sustav kako bi mogao prepoznati, ciljati i uništavati stanice raka. Prednost imunoterapije je u tome što ne šteti zdravim stanicama. Na primjer, kemoterapija koja se koristi u liječenju karcinoma uništava i zdrave i karcinomske stanice. Mnogi biljni virusi imaju visok potencijal izazivanja imunoloških reakcija. Intratumorska injekcija biljnih nanočestica potiče urođeni imunološki sustav na borbu protiv karcinoma. Istraživanja na virusu mozaične bolesti crnog graha pokazuju obećavajuće rezultate u imunoterapiji. Za tretiranje plućnih melanoma miševa, intranazalno je primjenjen CPMV što je rezultiralo stvaranjem antitumorske imunosti protiv melanoma pluća i dužim preživljenjem miševa. Čestice CPMV-a su pokazale jednaku učinkovitost kod karcinoma jajnika, dojke i debelog crijeva kod miševa [4].

Osim imunoterapije, biljni virusi se istražuju kako bi se kombinirali s brojnim antitumorskim lijekovima. Istraživanje na miševima s melanomom u kojem je uspoređen učinak X virusa krumpira, kemoterapijskog lijeka doksorubicina (DOX-a), i DOX-a koji je unesen u čestice PVX-a, pokazalo je najveću stopu preživljavanja miševa tretiranih česticama PVX-a u koje je unesen DOX. Biljni virusi ne utječu na snagu samih kemoterapeutika. Biljne nanočestice prenose kemoterapijske lijekove do stanica karcinoma i stimuliraju imunološki odgovor organizma. Prenosjenjem kemoterapijskih lijekova do karcinoma smanjuje se toksičnost lijeka za ostala tkiva. Smanjenje toksičnosti karcinomske terapije omogućava njeno duže uzimanje bez pauza [4].

U svrhu liječenja karcinoma i zaraznih bolesti, biljni virusi se istražuju u kombinaciji s monoklonskim antitijelima. Monoklonska antitijela su uvijek iste strukture i uvijek se vežu za iste strane antigene. Kombinirana terapija monoklonskim antitijelima i česticama virusa mozaične bolesti crnog graha se pokazala uspješnom kod miševa s rakom jajnika i kod pasa s melanomima. Za vrijeme epidemija ebole u Africi 2014. godine, lijek Zmapp, na bazi monoklonskih antitijela i biljnih virusa, bio je u eksperimentalnoj fazi. Zmapp je primijenjen

na šestero ljudi koji su obolili od ebole, od čega su se petorica oporavila. Rezultati, iako nedovoljni da bi govorili o efikasnosti lijeka u tretiranju ebole, nude perspektivu za budućnost [4, 16].

### 2.3.2. Cjepiva

Biljni virusi se primarno koriste za proizvodnju podjediničnih cjepiva. To su cjepiva koja koriste mali dio mikroorganizma ili proizvode mikroorganizama za razvoj imunosti. Dijelovi mikroorganizama, npr. površinski proteini stanične membrane, se vežu na odabrani nosač. Površinske proteine prepoznaju T-leukociti imunološkog sustava. Kako podjedinična cjepiva ne sadrže čitave mikroorganizme, mogućnosti loše imunološke reakcije na cjepivo su male. Podjedinična cjepiva na bazi biljnih virusa ne mogu uzrokovati bolest protiv koje je napravljeno cjepivo. Biljne nanočestice su stabilne u širokom rasponu temperatura, pa podjediničnim cjepivima na bazi biljnih virusa nije potrebno hlađenje. Problem podjediničnih cjepiva je da stvaraju slabiji imunološki odgovor naspram cjepiva s oslabljenim ili mrtvim česticama virusa. Kako bi se stvorio jednak imunološki odgovor kao u cjepivima s čitavim virusnim stanicama potrebno je dodavanje adjuvansa u podjedinično cjepivo, ili više doza cjepiva. Adjuvansi su komponente koje induciraju snažniji imunološki odgovor kada se dodaju cjepivu [2, 4, 14, web 13, web 14].

Podjedinična cjepiva koja koriste biljne viruse najčešće se proizvode na jedan od dva načina: uzgojem u biljkama ili uzgojem u suspenziji biljnih stanica. Obje metode uzgoja cjepiva na bazi biljnih virusa počinju stvaranjem komplementarne DNK (cDNK). cDNK se stvara kako bi se proizvele biljne nanočestice sa specifičnim površinskim proteinima mikroorganizma protiv kojeg se cjepivo radi. cDNK se u laboratoriju transkribira u RNK. RNK se prenosi u suspenziju biljnih stanica ili biljku. Najčešće se koriste vrste *Nicotiana benthamiana*, *N. tabacum* i crni grah. U biljku se RNK s uputama za nanočestice unosi putem rane na listu ili preko bakterije *Agrobacterium tumefaciens* u koju je stavljen plazmid s željenom RNK. Unesena RNK uzrokuje zarazu biljke. Time se reprogramiraju biljne stanice na stvaranje komponenti željenih nanočestica. Nakon jednog do dva tjedna nanočestice se pročišćavaju iz biljnih tkiva. Proces ovakve proizvodnje biljnih nanočestica rezultira velikim brojem nanočestica specifično napravljenih za podjedinično cjepivo. Proces proizvodnje u biljnim stanicama onemogućava ulazak humanih patogena i kontaminaciju cjepiva [15].

Od pet cjepiva protiv COVID-19 koja su trenutno u kliničkim istraživanjima, jedno nanočestično cjepivo na bazi biljnih virusa je u trećoj fazi kliničkog istraživanja. Baza cjepiva je helikalna kapsida biljnog virusa na koju su dodani površinski proteini COVID-19 koji imitiraju kapsidu COVID-a i ujedno uzrokuju najjači imunološki odgovor kod oboljelih od SARS-CoV-2. Uz modificirane biljne nanočestice u cjepivo je dodan i adjuvans (ASO3). Takvo cjepivo nazvano je CoVLP. Rezultati druge faze kliničkog testiranja cjepiva CoVLP pokazuju deset puta veću razinu antitijela protiv COVID-a naspram razine antitijela kod ljudi koji su prebolili SARS-CoV-2. CoVLP cjepivo je uzrokovalo blage do umjerene, prolazne nuspojave koje uključuju bol na mjestu injekcije, bol u mišićima i kratkotrajni umor. CoVLP se prima u dvije doze. Efikasnost cjepiva CoVLP je iznosila 69,6% protiv simptomatske zaraze i 78,8% protiv umjerene do teške bolesti uzrokovane virusom COVID-19 [14, 16].

### 2.3.3. Slikanje i teranostika

Molekularno snimanje je rastuća biomedicinska disciplina koja omogućava vizualizaciju, karakterizaciju i kvantifikaciju bioloških procesa *in vivo*. Razvijene su različite tehnike molekularnog snimanja, od kojih su najpoznatije:

- optičko snimanje
- kompjuterizirana tomografija (CT)
- magnetska rezonancija (MRI)
- pozitronska emisijska tomografija (PET)

Tehnike molekularnog snimanja se koriste za prikaz staničnih i molekularnih puteva i mehanizama bolesti. Idealna tehnika molekularnog snimanja bi osigurala:

- Brz dolazak molekula koje se koriste za snimanje na ciljno mjesto
- Optimalan omjer signala i šuma na dobivenoj slici
- Minimalnu toksičnost za snimano tkivo

Biljni virusi se pokazuju kao idealni nosači za dostavu kemikalija za molekularno snimanje zbog kratkog vremena cirkulacije i zadržavanja virusa u organizmu. Biljni virusi mogu prenositi širok spektar kemikalija za snimanje. Modifikacijama kapside biljnog virusa dodavanjem proteina za ciljanje poboljšava se točnost ciljanja stanica tkiva koje se želi snimiti. U području molekularnog slikanja karcinoma intenzivno se istražuje virus mozaične bolesti crnog graha (*cowpea chlorotic mottle virus*, CPMV). Čestice CPMV-a stupaju u interakciju sa stanicama



koje na svojoj površini imaju protein vimentin. Pomoću CPMV nanočestica u kojima se nalazila fluorescentna boja uspješno je snimljena vaskularizacija tumora miševa. Biljni virusi, koji se koriste za molekularno snimanje, se mogu uzgojiti u biljkama. Postoji uvjet uzgoja fluorescentnih biljnih nanočestica u biljkama, a taj je da fluorescentne molekule moraju biti vezane za kapsidu biljnog virusa. Fluorescentne čestice X virusa krumpira uzgojene u biljkama uspješno su oslikale stanice raka debelog crijeva miševa. Osim za snimanje karcinoma, biljne nanočestice se mogu koristiti i za snimanje kardiovaskularnih bolesti. Na primjer, virus mozaične bolesti duhana (TMV) se istražuje za snimanje ateroskleroze i tromboze. Na kapsidu TMV-a su dodani proteini koji ciljaju molekularne markere u aterosklerotskim nakupinama. Oslikavanje nakupina koje su sklone pucanju omogućava bolje predviđanje i prevenciju srčanih i moždanih udara [4].

Kontrastne kemikalije koje se koriste u molekularnim snimanjima su toksične za tkiva. Biljne nanočestice se mogu napuniti MRI, PET ili CT kontrastnim sredstvima. U jednu biljnu nanočesticu moguće je unijeti stotine do tisuće kontrastnih molekula. Povećana koncentracija kontrastnog sredstva u tkivu koje se želi snimiti poboljšava omjer šuma i slike u snimci. Korištenjem biljnih nanočestica moguće je usmjeriti kontrastne kemikalije na specifični dio tkiva koji se želi snimiti. Usmjeravanjem kontrastnih molekula na točan dio tkiva smanjuje se potrebna količina molekula i toksičnost za okolna tkiva. U testnim snimanjima s TMV nanočesticama, potrebna količina kontrastnih kemikalija je bila 400 puta manja nego ona u standardnoj kliničkoj proceduri. Biljne nanočestice se ne zadržavaju dugo u organizmu, što znači da je i smanjena toksičnost za tkivo koje se snima. Čestice CPMV-a na koje je dodan sloj zlata skraćuju vrijeme CT snimanja. Novija molekularna snimanja u nosače molekula za snimanje dodaju i lijekove. Istovremeno dijagnosticiranje i liječenje je koncept koji se zove teranostika. Jedna od teranostičkih terapija je fototermalna terapija (PTT) koja koristi elektromagnetsku radijaciju za stvaranje topline koja izaziva ablaciju stanica raka. PTT obećava visoku specifičnost, minimalnu invazivnost i povećanu selektivnost u odnosu na postojeće terapije. Biljni virusi se istražuju za prijenos molekula koje, kada su ozračene, stvaraju toplinu. Biljne nanočestice koje se istražuju u svrhu PTT terapije i dijagnostike pokazuju bolju učinkovitost u pretvaranju radijacije lasera u toplinu naspram sintetičkih nanočestica [4, web 15].

### 3. ZAKLJUČCI

- Biljni virusi su baza za stvaranje virusnih nanočestica (*virus nanoparticles*, VNP) i virusima nalik nanočestica (*virus like nanoparticles*, VLP), nove generacije nanonosača.
- Nanočestice na bazi biljnih virusa je moguće modificirati i ciljati različite stanice s visokom specifičnošću.
- Omjer veličina stranica virusne kapside važan je za specifičnost interakcije virusa i stanice.
- Nanočestice na bazi biljnih virusa nemaju štetni učinak na ljudski organizam i brzo se uklanjaju iz tkiva.
- Biljne nanočestice su stabilne pri različitim pH vrijednostima, širokom rasponu temperatura i različitim otapalima u organizmu.
- U liječenju karcinoma virusne nanočestice se istražuju kao dostavljači kemoterapije.
- Biljne virusne nanočestice se istražuju kao baza proteinskih cjepiva. Cjepiva na bazi ovakvih čestica se brže proizvode nego cjepiva s drugim bazama i jednako su učinkovita.
- Biljne virusne nanočestice smanjuju toksičnost terapija koje se koriste u liječenju karcinoma i kemikalija u molekularnim snimanjima.

## 4. LITERATURA

1. Juretić N. (2002). Osnove biljne virologije, Školska knjiga, Zagreb.
2. Nkanga C. I., Steinmetz N. F. (2021). The pharmacology of plant virus nanoparticles, *Virology*, 556, str. 39-61.
3. Venkataraman S, Hefferon K. (2021). Application of Plant Viruses in Biotechnology, Medicine, and Human Health. *Viruses*, 13(9):1697.
4. Chung Y. H., Cai H., Steinmetz N. F. (2020). Viral nanoparticles for drug delivery, imaging, immunotherapy, and theranostic applications, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 156, 214-235.
5. Buzón, P., Maity, S., & Roos, W. H. (2020). Physical virology: From virus self-assembly to particle mechanics. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology*, 12(4), e1613.
6. Liszewski K., Atkinson J. (2015). Complement regulator CD46: Genetic variants and disease association, *Human genomics*. 9(1), 7.
7. Lomonosoff, G. P., Evans, D. J. (2014). Applications of plant viruses in bionanotechnology, *Current topics in microbiology and immunology*, 375, 61–87.
8. Mandal, A., Clegg, J. R., Anselmo, A. C., Mitragotri, S. (2020). Hydrogels in the clinic. *Bioengineering & translational medicine*, 5(2), e10158.
9. Kidd, M. E., Shumaker, D. K., & Ridge, K. M. (2014). The role of vimentin intermediate filaments in the progression of lung cancer. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 50(1), 1–6.
10. Yin-Murphy M., Almond J. W. (1996). Medical Microbiology. 4th edition. University of Texas Medical Branch at Galveston, Galveston, Texas, chapter 53.
11. Barlan, K., Gelfand, V. I. (2017). Microtubule-Based Transport and the Distribution, Tethering, and Organization of Organelles. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 9(5), a025817.
12. Cooper G. M. (2000). The Cell: A Molecular Approach. 2nd edition, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.

13. Lembo A. J., Ullman S. P.(2010). Sleisenger and Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease (Ninth Edition), Chapter 18 - Constipation, 259-284.e6,
14. Maharjan P. M., Choe S. (2021). Plant-Based COVID-19 Vaccines: Current Status, Design, and Development Strategies of Candidate Vaccines. *Vaccines*; 9(9):992.
- 15.. Lebel, M. È., Chartrand, K., Leclerc, D., & Lamarre, A. (2015). Plant Viruses as Nanoparticle-Based Vaccines and Adjuvants. *Vaccines*, 3(3), 620–637.
16. Hager, K. J., Pérez Marc, G., Gobeil, P., Diaz, R. S., Heizer, G., Llapur, C., Makarkov, A. I., Vasconcellos, E., Pillet, S., Riera, F., Saxena, P., Geller Wolff, P., Bhutada, K., Wallace, G., Aazami, H., Jones, C. E., Polack, F. P., Ferrara, L., Atkins, J., Boulay, I., ... CoVLP Study Team (2022). Efficacy and Safety of a Recombinant Plant-Based Adjuvanted Covid-19 Vaccine. *The New England journal of medicine*, 386(22), 2084–2096.

Mrežne stranice:

web 1: <https://www.britannica.com/science/virus/The-protein-capsid>

web 2: <https://courses.lumenlearning.com/suny-microbiology/chapter/the-viral-life-cycle/>

web 3: <https://www.spine-health.com/glossary/biocompatibility>

web 4: <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1364-3703.2001.00064.x>

web 5: <https://www.leafexpressionsystems.com/product/cpmv-cowpea-mosaic-virus/>

web 6: <https://www.sciencephoto.com/media/864708/view/cowpea-chlorotic-mottle-virus-tem>

web 7: [https://www.researchgate.net/figure/Fig-1-PVX-potexvirus-particles-ICTVdB-Descriptions-International-Committee-on\\_fig1\\_317401766](https://www.researchgate.net/figure/Fig-1-PVX-potexvirus-particles-ICTVdB-Descriptions-International-Committee-on_fig1_317401766)

web 8:

[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A\\_Microbiology\\_\(Boundless\)/9%3A\\_Viruses/9.5%3A\\_Viral\\_Replication/9.5C%3A\\_Tissue\\_Tropism\\_in\\_Animal\\_Viruses](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Boundless)/9%3A_Viruses/9.5%3A_Viral_Replication/9.5C%3A_Tissue_Tropism_in_Animal_Viruses)

web 9:

[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Organic\\_Chemistry\)/Reactions/Introduction\\_to\\_Bioconjugation](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Supplemental_Modules_(Organic_Chemistry)/Reactions/Introduction_to_Bioconjugation)

web 10: <https://www.news-medical.net/health/What-is-Mucosal-Immunity.aspx>

web 11: <https://www.nih.gov/news-events/nih-research-matters/understanding-common-cold-virus>

web 12: <https://proleksis.lzmk.hr/43802/>

web 13: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/subunit-vaccine>

web 14: <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/vaccine-adjuvant>

web 15: <https://my.clevelandclinic.org/health/diagnostics/4808-ct-computed-tomography-scan>