



Przykłady zastosowania nanocząsteczek w medycynie weterynaryjnej

Ewelina Szacawa, Katarzyna Dudek, Dariusz Bednarek

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Chorób Bydła i Owiec

Nanocząstki stwarzają nowe perspektywy i możliwości rozwoju lecznictwa weterynaryjnego, często bardzo odmienne od już istniejących, dając niepowtarzalną szansę na widoczną poprawę metod walki z chorobami zakaźnymi zwierząt, lepszą kontrolę bezpieczeństwa żywności oraz inną niż dotychczas stosowaną, formę terapii przeciwbakteryjnej i immunoprofilaktyki przeciw zakażeniom zwierząt.

Wiodące ośrodki naukowe na świecie nieustannie dążą do poprawy zdrowotności zwierząt i ludzi, zapobiegając chorobom oraz poprawiając jakość i bezpieczeństwo żywności i pasz, widząc i doceniając coraz częściej ich związek przyczynowy z powstawaniem zaburzeń zdrowotnych. W walce z bakteriami odpowiedzialnymi za choroby powszechnie stosuje się antybiotyki, których mechanizm polega na oddziaływaniu na kluczowe procesy zachodzące w komórce bakteryjnej, takie jak synteza ściany komórkowej białek i replikacja materiału genetycznego, a ingerencja w te procesy prowadzi do destrukcji komórki. Zbyt powszechne stosowanie antybiotykoterapii, a zwłaszcza antybiotyków o szerokim spektrum działania, w zwalczaniu chorób ludzi i zwierząt wywoływanych przez bakterie powoduje, że wykształcają one mechanizmy oporności na te związki. Antybiooporność może być kodowana zarówno w genomie drobnoustrojów jak i na ruchomych elementach genetycznych, tj. plazmidach i transpozonach (Frost i wsp., 2005). W niektórych krajach, w tym również w Polsce, rośnie odsetek drobnoustrojów, które wykształciły oporność nawet na więcej niż trzy grupy antybiotyków i nazywamy je mianem bakterii wieloopornych. Z takimi szczepami bakterii mamy do czynienia zarówno w przypadku licznych infekcji u

człowieka, jak i u zwierząt, a są to takie gatunki jak: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *Mycobacterium bovis* i *Mycoplasma bovis*. Problem wielolekooporności dotyczy również patogenów przenoszonych za pośrednictwem pożywienia, np.: *Campylobacter jejuni*, *E. coli*, *Salmonella*, *Enterococcus faecium*. W obliczu rosnącej oporności drobnoustrojów na stosowane antybiotyki istnieje potrzeba poszukiwania nowych, alternatywnych środków zwalczających drobnoustroje, po których stosowaniu ryzyko powstania oporności mogłoby być skutecznie minimalizowane.

Dzięki zastosowaniu nanocząsteczek różnych metali, ich tlenków oraz innych związków pokrewnych pojawiły się nowe możliwości użycia ich w medycynie ludzi i zwierząt. Pozwala to mieć nadzieję na skuteczniejszą walkę z różnymi czynnikami chorobotwórczymi zarówno o charakterze zakaźnym, jak też niezakaźnym. Dodatkowym udziałem tych cząstek jest możliwość zastosowania ich jako nośniki wielu substancji czynnych dając asumpt do rozwoju różnych alternatywnych dziedzin nauki, i to nie tylko w zakresie poszukiwania nowoczesnych leków przeciwdrobnoustrojowych innych niż antybiotyki, ale też szersze wykorzystanie ich jako nowe formy adiuwantów w składzie szczepio-

nek czy też bardziej skutecznych leków immunomodulujących.

Nanocząstki to molekuly, których średnica mieści się w zakresie od 1 do 100 nm. W procesie technologii możliwe jest manipulowanie m.in. ich wielkością i strukturą, co wpływa na ich powinowactwo, rozpuszczalność i inne właściwości fizykochemiczne. Odpowiednio przeprowadzony proces technologiczny pozwala kierować mechanizmem uwalniania leków z tak skonstruowanego nośnika bezpośrednio w miejscu docelowym. Możliwy jest też wpływ na działanie układu odpornościowego poprzez przyłączenie ich do efektorowych komórek odpornościowych, takich jak leukocyty. Obecnie jest już dostępnych wiele danych potwierdzających przeciwbakteryjną aktywność nanocząsteczek metali, głównie złota, srebra oraz tlenku cynku, tlenku miedzi, tlenku żelaza i dwutlenku tytanu (Usman i wsp., 2013; Yun i wsp., 2013; Besinis i wsp., 2014).

Nanocząsteczki srebra

Wśród nanocząsteczek metali, nanocząsteczki jonów srebra (AgNPs; Ag nanoparticles) stanowią najbardziej obiecującą alternatywę dla antybiotyków, gdyż wykazują najsilniejsze działanie w zwalczaniu infekcji bakteryjnych (Hajipour i wsp., 2012). Ich wykorzystanie jest szerokie i związane z możliwością tworzenia przez nie różnych nanokształtów o potencjalnie odmiennych właściwościach, jak: nanocyndry, nanotalerze, nanopręty, nanoopony, nanopasy (Rai i wsp., 2009). Mechanizm działania nanocząsteczek srebra na bakterie nie został do końca wyjaśniony, wiadomo jednak, że mogą one prowadzić do destrukcji bakterii poprzez wpływ na funkcje życiowe bakterii oraz utratę przez nie zdolności do replikacji DNA (Feng i wsp., 2000). Uważa się, że przyłączenie się ich bezpośrednio do błony komórkowej bakterii wpływa na hamowanie syntezy tej struktury bakteryjnej, a następnie jej dezintegrację. Z drugiej strony mogą one prowadzić do formowania się reaktywnych form tlenu (ROS), co jest uważane za jedną z głównych przyczyn naruszenia integralności błony komórkowej bakterii i prowadzi do obumarcia takiej komórki (Kim i wsp., 2007). Inne badania wykazały, że antybakteryjne właściwości nanosrebra związane są z łatwością łączenia się tego metalu z enzymami mikroorganizmów prowadząc do ich dezaktywacji (Rai i wsp., 2009).

W badaniach Yuan'a i wsp. wykazano, że nanocząsteczki srebra wykazują działanie bójcze również na wielolekooporne szczepy bakterii *S. aureus* oraz *P. aeruginosa*, które zostały wyizolowane od kóz z subklinicznych przypadków *mastitis*. W badaniach tych zastosowano kuliste cząstki srebra wyprodukowane z wykorzystaniem kwercyliny (należącej do flawonoidów) jako stabilizatora, mającej wielkość 11 nm. Dla *P. aeruginosa* osiągnięto MIC (minimalne stężenie hamujące) o wartości 1 µg/ml, z kolei dla *S. aureus* – 2 µg/ml. Badania te są obiecujące, ponieważ udało się uzyskać zahamowanie wzrostu tych lekoopornych bakterii już przy niskich wartościach MIC. Dzięki temu związkowi możliwa będzie skuteczniejsza walka z *mastitis*, chorobą, która stanowi istotny problem w hodowli bydła i kóz w wielu krajach. Wywołwana jest ona przez wiele drobnoustrojów, zarówno wirusowych, bakteryjnych, jak i grzybiczych. Głównymi czynnikami wywołującymi stany zapalne gruczołu mlekowego są: *S. aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Corynebacterium bovis* oraz *Bacillus cereus*. Choroba ta generuje znaczne straty ekonomiczne z powodu spadku produkcji mleka i pogorszenia jego jakości. Aby wyeliminować drobnoustroje chorobotwórcze z gruczołu mlekowego, w leczeniu *mastitis* często stosowana jest antybiotykoterapia, niejednokrotnie z wykorzystaniem antybiotyków o szerokim spektrum działania. Użycie takiego rodzaju antybiotyków sprzyja powstaniu szczepów wielolekoopornych, co utrudnia walkę z patogenami zaangażowanymi w rozwój *mastitis* (Yuan i wsp., 2017). W badaniach Zarei i wsp. zbadano wpływ nanocząsteczek srebra w różnych stężeniach oraz w różnym czasie ekspozycji na patogeny, które mogą pojawić się w żywności, tj.: *Listeria (L.) monocytogenes*, *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium i *Vibrio parahaemolyticus*. Badania te wykazały wysoką efektywność już po 5-7 godzinach ekspozycji tego związku na badane bakterie (Zarei i wsp., 2014). Z kolei w badaniach Saleem'a i wsp. nad zakażeniami wywołanymi przez drobnoustroje odporne na leki, zwłaszcza szczepy bakterii *S. aureus* odporne na metycylinę (MRSA; methicillin-resistant *S. aureus*), uzyskano dobre efekty dla penicyliny połączonej ze strukturami nanocząsteczek poliakrylu. Bowiem nanokompleksy penicyliny lub doksycyliny pozwalają na destrukcję komórek *Brucella melitensis* sfagocytowanych przez makrofagi (Seleem i wsp., 2009). Z kolei emulsje nanocząsteczek po-



liakrylu kowalennie skoniugowane z penicylinami cechuje w warunkach *in vitro* silna aktywność w stosunku do wielolekoopornych szczepów *S. aureus* (Turoś i wsp., 2007).

Nanocząsteczki w leczeniu ran

Przykładem zastosowania nanocząsteczek w medycynie weterynaryjnej jest wykorzystanie ich aktywności antybakteryjnej w leczeniu ran. Dowodzą tego badania *in vivo* w po chirurgicznej terapii serowaciej zapalenia węzłów chłonnych u owiec i kóz (*caseous lymphadenitis*) i u małych przeżuwaczy, choroby, której czynnikiem etiologicznym jest Gram-dodatnia bakteria *Corynebacterium pseudotuberculosis*. Do badań wykorzystano 29 kóz i owiec z klinicznymi objawami tej choroby. Zwierzęta poddano zabiegowi chirurgicznemu polegającemu na wycięciu zmian chorobowych, poczym na zaopatrzone rany zastosowano maść, w której składzie były nanocząsteczki srebra z mieszaniną naturalnych wosków i olejów. Z kolei u zwierząt z grupy kontrolnej pooperacyjne rany były leczone tradycyjnie 10% r. jodu. W wyniku przeprowadzonego doświadczenia wykazano, że terapia preparatem zawierającym nanocząsteczki srebra prowadzi do szybszego wyleczenia ran, zmniejsza odsetek wtórnych infekcji i dodatkowo nie wykazuje działania toksycznego na tkanki zwierząt (Santos i wsp., 2019).

Skuteczność nanocząsteczek srebra dowiedziono również poprzez zahamowanie żywotności wielo-

lekoopornych bakterii, takich jak *Prevotella melanogena* i *Trueperella pyogenes* oraz zdolności do tworzenia przez nie formy biofilmu. Bakterie te zostały wyizolowane z wydzielin z macic krów i są jednymi z najczęstszych czynników wywołujących infekcje w obrębie tego narządu u bydła. Eksperyment ten dowiódł, że srebro w formie nanocząsteczek w połączeniu z apigeniną, substancją pochodzenia roślinnego z klasy flawonów, może być skuteczną alternatywą dla antybiotykoterapii w przypadkach zapalenia macicy u bydła, nawet w tych o dominującym udziale bakterii opornych na wiele grup antybiotyków (Gurunathan i wsp. 2018).

Nie tylko nanocząsteczki srebra działają

Podobne właściwości posiadają również nanocząsteczki tlenku cynku (ZnO), które stosunkowo dobre właściwości przeciwbakteryjne zawdzięczają jonom cynku. Jony te wykazują m.in. szkodliwe działanie na ścianę komórkową bakterii oraz wpływają na produkcję reaktywnych form tlenu mających działanie toksyczne dla bakterii (Sirelkhatim i wsp., 2015). Ich efektywne hamujące działanie udokumentowano również przeciwko grzybom *Candida* spp., a zaletą ich stosowania jest kowalenne wiązanie z powierzchnią krzemionki, co w efekcie zmniejsza dostępność rozwoju bakterii zarówno w środowisku jak i w organizmie gospodarza (Donadio i wsp., 2019). Z kolei korzystne działanie magnetycznych nanocząsteczek srebra w połączeniu

REKLAMA

SILVECO



NanoMast

PRODUKT
POLSKI

PRODUKT DO PIELĘGNACJI I PROFILAKTYKI
WYMIENIA U KRÓW MLECZNYCH

- ✓ ZAWIERA AKTYWNE FORMY SREBRA
- ✓ SYSTEMATYCZNE STOSOWANIE PREPARATU ZMNIEJSZA RYZYKO WYSTĄPIENIA MASTITIS
- ✓ DZIĘKI SELEKTYWNE DOBRANEJ RECEPTURZE ZAPEWNIĄ ODPOWIEDNIE NAWILŻENIE STRZYKÓW, ZAPOBIEGAJĄC DZIĘKI TEMU ICH PRZESUSZENIU



POLECAMY:



smart
NANOTECHNOLOGIES

Smart Nanotechnologies S.A.
ul. K. Olszewskiego 25
32-566 Alwernia

+48 12 25 89 395

www.silveco.com.pl

kontakt@silveco.com.pl

z dwutlenkiem krzemu oraz związkami żelaza zostało udowodnione w przypadku hamowania wzrostu bakterii *S. aureus* i *E. coli*. Związek ten może znaleźć zastosowanie jako środek dezynfekujący do odkażania powierzchni laboratoryjnych i hodowlanych (Shatan i wsp., 2019). Nanocząsteczki jonów srebra wykazują też działanie przeciugrzybicze, czego dowiedziono w badaniach Panáček'a i wsp. nad wpływem tych jonów na grzybnię *Candida albicans* (Panáček i wsp., 2009). Nanocząsteczki krzemionki, charakteryzujące się niską toksycznością, łatwością produkcji i dostępnością wielu form morfologicznych, wykazują też działanie przeciwnowotworowe, pozwalając na zastosowanie różnych terapii celowanych w różnych rodzajach nowotworzenia (Castillo i wsp., 2019; Montalvo-Quirós i wsp. 2019). Z kolei nanocząsteczki dwutlenku krzemu ($Zn-d-SiO_2$) w połączeniu z nanocząsteczkami cynku wykazują działanie antybakteryjne i przeciugrzybicze. Udało się to m.in. wykazać w odniesieniu do wzrostu *Aspergillus niger*, *Candida prapasilosis*, *Bacillus subtilis* oraz *E. coli* (Arshada i wsp., 2018).

Nanocząsteczki złota wykazują działanie przeciwbakteryjne poprzez różne mechanizmy. Posiadają one m.in. aktywność analogiczną dla niektórych enzymów zwiększających produkcję reaktywnych form tlenu, których obecność wyzwała warunki zbliżone do stanu stresu oksydacyjnego wpływającego ostatecznie negatywnie na stabilność struktur komórkowych bakterii. Dodatkowo, nanocząsteczki złota przyłączają się bezpośrednio do struktur białkowych bakterii, zaburzając ich cykl tlenowy, a wywołując również stres oksydacyjny powodując w efekcie destrukcję bakterii (Zheng i wsp., 2017). Przeciwbakteryjne działanie nanocząsteczek złota, zarówno na bakterie Gram-dodatnie jak i Gram-ujemne, tj. *E. coli*, *P. aeruginosa* i *S. aureus*, stwierdzono w badaniach Hameeda i wsp. (2020). O ile antybiotyki działają na bakterie, które występują w postaci planktonicznej, duży problem, zarówno ekonomiczny jak i epidemiologiczny na całym świecie stanowi oporność bakterii żyjących w postaci biofilmu. Podczas gdy wystąpienie mechanizmów oporności na antybiotyki u bakterii planktonicznych, wolnożyjących, wynika z mutacji genowych lub wymiany genów antybiotykooporności, to u bakterii rozwijających się w postaci biofilmu oporność na antybiotyki wynika z ich struktury. Są one w stanie obronić się przed mechanizmami immunologicznymi gospodarza bardziej efektywnie niż

komórki planktoniczne, a tolerancja na antybiotyki wzrasta wraz z dojrzewaniem biofilmu (Lewis, 2008; Cox i Wright, 2013). Zdolność bakterii do tworzenia biofilmu utrudnia stosowanie konwencjonalnej terapii antybiotykowej, szczególnie w przebiegu chorób przewlekłych. Z tego powodu istnieje potrzeba wprowadzenia i testowania nowych, alternatywnych strategii walki z bakteriami lekoopornymi. Dostępne są doniesienia dokumentujące, że nanocząsteczki tlenku cynku mają działanie przeciwbakteryjne i degradujące biofilm takich bakterii, jak: *P. aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae*, *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis* oraz *E. coli* (Bhattacharyya i wsp., 2018; Jin i wsp., 2009). Wykazują one również działanie hamujące wzrost biofilmu grzybów, takich jak *Candida tropicalis* i *Aspergillus niger* (Applerot i wsp., 2012; Jothiprakasham i wsp., 2017). Działanie to polega na zmniejszeniu adhezji mikroorganizmów do podłoża, osłabieniu ich zdolności do namnażania i formowania biofilmu. Nanocząsteczki tlenku **cynku** niszczą ścianę bakteryjną poprzez produkcję reaktywnych form tlenu oraz wydzielanie jonów Zn^{2+} , ale na ich aktywność przeciwbakteryjną wpływają różne czynniki, tj. światło UV, naświetlenie, kształt, wielkość i modyfikacje powierzchniowe (Campoccia i wsp., 2013; Mahamuni-Badiger i wsp., 2020). Badania Azam'a dowiodły, że nanocząsteczki tlenku cynku wykazują maksymalną aktywność przeciwbakteryjną przeciwko Gram-dodatnim bakteriom *S. aureus* i *Bacillus subtilis* oraz Gram-ujemnym: *E. coli* i *P. aeruginosa*.

Zbadano również, że ich rozmiar ma wpływ na aktywność przeciwbakteryjną, a maksymalną strefę inhibicji wykazują cząstki o rozmiarze około 18 nm, przy zastosowaniu relatywnie niskiej ich koncentracji (Azam i wsp., 2012).

„Nanobiotyki”

Inną strategią jest zastosowanie tzw. nanosystemów określanych jako „nanoantybiotyki”. Podjęto już takie badania, w których sprawdzano aktywność nowych struktur stworzonych przez połączenie krzemu z antybiotykiem (lewofloksacyną), wykazując ich dużą aktywność przeciwko *S. aureus*. Szczególnie ważne wydaje się w tym przypadku odkrycie, że dzięki głębokiej penetracji tego związku do wnętrza biofilmu, ta bardzo oporna zwykle na inne środki antybakteryjne forma bakterii, uległa całkowitej degradacji (Pedraza i wsp., 2018).



Nanocząsteczki w żywieniu

W hodowli zwierząt gospodarskich, zwłaszcza bydła, duży problem stwarza obecnie występowanie mykotoksyn, produktów przemiany materii grzybów. Mogą one pojawić się w nieprawidłowo przechowywanych paszach, zarówno produkcji własnej jak i pochodzących z zakupu. Problem kontaminacji paszy dla zwierząt mykotoksynami występuje na całym świecie, ich spożycie może spowodować wystąpienie przewlekłych lub ostrych zatruc i objawia się utratą apetytu, pogorszeniem dobowych przyrostów masy ciała zwierząt, pojawieniem się biegunek, wymiotów, zmian skórnych i spadku odporności. Spożywanie przez zwierzęta dużej ilości mykotoksyn może wpłynąć na uszkodzenie ważnych narządów organizmu, takich jak nerki, wątroba, mózg a także wpływać niekorzystnie na układ rozrodczy, błonę śluzową przewodu pokarmowego oraz żołądek. Aflatoksyna to jedna z najbardziej pospolitych mykotoksyn, która powoduje przed wszystkim immunosupresję układu odpornościowego makroorganizmu. Nanokompozyty tlenku magnezu i dwutlenku krzemu (MgO-SiO₂) mają duże powinowactwo do adsorpcji aflatoksyny B₁. Dzięki temu mogą one znosić efekt toksyczny tej toksyny na układ immunologiczny zwierząt i prowadzić do zmniejszenia zmian histologicznych w ich wątrobie, śledzionie i jelitach (Essa i wsp., 2017).

Innym zastosowaniem nanocząsteczek różnych metali jest wykorzystanie ich jako dodatków paszowych dla zwierząt. Dzięki wpływowi nanocząsteczek stosowanych w dodatkach paszowych na poprawę parametrów produkcyjnych zwierząt, a zwłaszcza większe przyrosty masy ciała, czy też korzystny wpływ na skład mikroflory jelitowej, stać się one mogą w przyszłości naturalną alternatywą dla antybiotyków paszowych, których stosowanie było do niedawna (do 2006 r.) zalecane w postaci tzw. promotorów wzrostu. Wykazano na przykład, że jedna z form krzemionki (krzemionka pirogeniczna) wykazuje właściwości bakteriobójcze na wiele bakterii patogennych, w tym *E. coli*, *Salmonella* oraz *Clostridium* (Williams i wsp., 2015; Tyagi i wsp., 2016). Zastosowanie tej formy krzemionki jako dodatek paszowy dla prosiąt wraz z enzymami poprawiającymi trawienie spowodowało większe przyrosty masy ciała, a dodatkowo odnotowano mniejszy odsetek śmiertelności i przypadków biegunek w okresie odsadzenia badanych zwierząt (Szczurek i wsp., 2016). Korzystne działa-

nie nanocząsteczek w żywieniu zwierząt potwierdzają również badania Lecloux'a dotyczące zmian w składzie mikroflory jelit myszy, które polegały na zmniejszeniu ilości Gram-ujemnych bakterii należących do rodzaju *Bacteroides*, a zwiększeniu ilości Gram-dodatnich bakterii należących do typu *Firmicutes*. Z kolei po zastosowaniu żywienia zawierającego nanocząsteczki krzemu zaobserwowano zmniejszenie ilości *Actinobacteria* spp. (Lecloux i wsp., 2015). Korzystny wpływ nanocząsteczek seleniu na owce został zbadany przez Shi wykazując, że stosowanie tego preparatu w ilości 3 g/kg suchej masy spowodowało spadek pH żwacza do 6.68–6.80, poprawiając istotnie procesy trawienia u tych zwierząt (Shi i wsp., 2011). Z kolei podawanie 15 doświadczalnym świniom dodatku paszowego zawierającego nanocząsteczki srebra spowodowało zwiększenie ich dziennych przyrostów masy ciała (Fondevila i wsp., 2009). Efektem zastosowania nanocząsteczek tlenku cynku u odsadzonych prosiąt było również uzyskanie zwiększonych przyrostów masy ciała u tych zwierząt, a częstotliwość biegunek uległa zmniejszeniu. Dodatkową zaletą stosowania tych nanocząsteczek jako dodatku paszowego jest ich aktywność przeciwbakteryjna, którą zbadano zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* w odniesieniu do *E. coli* i *S. aureus* (Ouyang i wsp. 2021).

Nanocząsteczki a układ odpornościowy

Nanocząsteczki mogą również wykazywać właściwości usprawniające działanie układu odpornościowego, mają lepszą biodostępność, a więc mogą być stosowane w mniejszych dawkach. Na przykład podanie nanocząstek chromu w dawce 200 µg u świń spowodowało wzrost stężenia immunoglobulin klasy IgM i IgG w surowicy tych zwierząt (Wang i wsp., 2007). Istnieją też doniesienia potwierdzające, że zastosowanie nanocząsteczek chromu, miedzi lub tlenku cynku poprawiło parametry produkcyjne prosiąt (Wang i wsp., 2004; Gonzales-Eguia i wsp., 2009). W innych badaniach wykazano wpływ tych związków cynku na ilość bakterii tlenowych w węzłach chłonnych krezkowych oraz zwiększoną ekspresję niektórych cytokin (IL-1β, IL-10, TNF-α). Z kolei w doświadczeniu dotyczącym zastosowania tego związku u odsadzonych prosiąt wykazano wzmocnienie ich odpowiedzi immunologicznej (Li i wsp., 2016; Wang i wsp., 2018). Badania nad nanocząsteczkami cyn-

ku były przeprowadzone również u bydła mlecznego w kontekście przeciwdziałania zapaleniom gruczołu mlekowego. Dowiedziono korzystny wpływ tych związków cynku na układ odpornościowy w obrębie gruczołu mlekowego krów, prowadzący do obniżenia liczby komórek somatycznych, poprawy jakości i ilości produkowanego mleka w subklinicznych przypadkach *mastitis* (Rajendran i wsp., 2013).

Nanoszczepionki

Istotnym z punktu widzenia profilaktyki swoistej chorób zakaźnych bydła jest możliwość wykorzystania nanocząsteczek różnych pierwiastków do produkcji nowatorskich formułacji szczepionek podjednostkowych. Zastosowanie takie znalazły dla przykładu cząsteczki krzemu, które wykorzystano do produkcji szczepionki podjednostkowej nowej generacji, tzw. nanoszczepionki, skierowanej przeciwko zakażeniu wirusem wirusowej biegunki bydła (BVDV). W tym celu opracowano specjalny „nośnik” dla najbardziej immunogennego białka wirusa BVDV – glikoproteiny E2 (antygen), w oparciu o pęcherzyki krzemionkowe o średnicy 50 nm i cienkiej ścianie porów poniżej 6 nm, który miał spełniać dodatkowo funkcję adiuwantu. We wstępnych badaniach *in vitro* wykazano wysokie zdolności adsorpcyjne wspomnianego nośnika w odniesieniu do białka E2 BVDV, a także wystarczająco dobre właściwości absorpcyjne oraz brak toksycznego oddziaływania względem komórek nerki bydłowej. Z kolei badania dotyczące desorpcji wykazały zdolność do uwalniania antygeny szczepionkowego przez ww. pęcherzyki rzędu ponad 95% (Mody i wsp., 2014). Dotychczas wykazano bowiem, że zdolność do stopniowego uwalniania antygeny szczepionkowego przez pęcherzyki krzemionkowe możliwa jest dzięki specjalnej, sztywnej jej strukturze, która chroni antygen szczepionkowy przed degradacją w obrębie przewodu pokarmowego (Slowing i wsp., 2008). Omawiany nanonośnik nie wpływał również toksycznie na żywotność badanych linii komórkowych. Wszystkie te cechy, w połączeniu ze zdolnością omawianych pęcherzyków krzemionkowych do zachowania integralności własnej struktury, potwierdzają ich zakładane przeznaczenie jako efektywnego nośnika dla antygeny szczepionkowego. W oparciu o wyniki uzyskane w badaniach *in vitro* przeprowadzono doświadczenie w warunkach *in vivo* na myszach,

gdzie wykazano istotną stymulację wzrostu miana specyficznych przeciwciał klasy IgG w następstwie trzykrotnej iniekcji tej nanoszczepionki. Wzmocniona produkcja przeciwciał utrzymywała się aż do końca doświadczenia, tj. jeszcze w 6. tygodniu po immunizacji i była wyraźnie wyższa w porównaniu do zwierząt, które otrzymały szczepionkę na bazie konwencjonalnego adiuwantu jakim jest saponina (QuilA®) (Mody i wsp. 2014). Dodatkowo iniekcja nanoszczepionki nie wywoływała zmian w miejscu podania, co było dotychczas obserwowane w przypadku szczepionek opartych na niektórych konwencjonalnych adiuwantach (Reed i wsp., 2009). Zwierzęta immunizowane szczepionką opracowaną na bazie pęcherzyków krzemionkowych zachowywały prawidłowy stan kliniczny, a ich masa ciała utrzymywała się w zakresach wartości referencyjnych przez cały okres doświadczenia (Mody i wsp., 2014). Ponadto w następstwie trzykrotnego podania omawianej nanoszczepionki obserwowano wyraźnie większą liczbę komórek śledziony zdolnych do produkcji IFN- γ , co wskazywało na efektywną stymulację także komórkowej odpowiedzi immunologicznej u immunizowanych zwierząt, zależnej od limfocytów T pomocniczych typu 1 (Th1), ważnej również z punktu widzenia odporności przeciw wirusowej. Wyniki te potwierdziły zatem założenie, że opracowane pęcherzyki krzemionkowe spełniają funkcję zarówno odpowiedniego nośnika dla antygeny BVDV jak i efektywnego adiuwantu, przez co stanowią znacznie lepszą alternatywę dla powszechnie stosowanych konwencjonalnych adiuwantów. Dodatkowo w badaniach tych wykazano brak synergistycznego oddziaływania między nanonośnikiem stworzonym na bazie krzemionki a zastosowanym w badaniach tradycyjnym adiuwantem (Mody i wsp., 2014).

Kontynuacja badań z wykorzystaniem opracowanej już nanoszczepionki na bazie pęcherzyków krzemionkowych miała na celu redukcję liczby jej podań, wydłużenie czasu trwania odporności poszczepiennej, a także liberalizację wymagań związanych z przechowywaniem; dotychczasowe bowiem dość restrykcyjne zalecenia dla szczepionek podjednostkowych wymagają spełnienia bezwzględnych warunków chłodniczych. Dlatego też, dla omawianej szczepionki opracowano dodatkową jej liofilizowaną formę, co miało skutecznie pomóc w przewyciężeniu dotychczasowych trudności związanych z jej przechowywaniem. W tym celu przygotowano ją w postaci mieszaniny trehalozy



z glicyną i dowiedziono, że forma ta nie naruszała w żadnym stopniu pierwotnej struktury i spójności pęcherzyków krzemionkowych, jak też użytego w nanoszczepionce antygeny (Mody i wsp., 2015). Z kolei w celu zminimalizowania liczby podań szczepionki, przeznaczone do doświadczenia myszy immunizowano dwukrotnie, a nie jak dotychczas w kolejnych trzech iniekcjach, potwierdzając, że przyjęty schemat jest wystarczający (Mody i wsp., 2014, 2015). Potwierdzono też, że żadna z obu badanych postaci nanoszczepionki – czy to zliofilizowana czy niezliofilizowana – nie wpływały negatywnie na stan kliniczny immunizowanych zwierząt. Podobnie w obrazie sekcyjnym pobranych narządów nie obserwowano zmian patologicznych. Natomiast, niezależnie od zastosowanej formy nanoszczepionki, wykazano wyraźną stymulację humoralnej odpowiedzi immunologicznej u myszy poddanych immunizacji, która utrzymywała się jeszcze w 6. miesiącu po drugiej jej iniekcji. Podobnie kształtowała się komórkowa odpowiedź immunologiczna zależna od limfocytów Th1, co było wyrażone istotną stymulacją produkcji IFN- γ przez komórki śledziony, chociaż odporność ta była silniej aktywowana w przypadku szczepionki nie poddanej liofilizacji. Zaprezentowana szczepionka nowej generacji przygotowana w oparciu o pęcherzyki krzemionkowe jawi się zatem jako doskonały kandydat na odpowiedni nośnik dla antygeny szczepionkowego (Mody i wsp., 2015). Z drugiej strony, w połączeniu z odpowiednim antygenem spełnia funkcję adiuwantu, którego dodatek jest zwykle potrzebny dla szczepionek podjednostkowych w celu skutecznej aktywacji komórek dendrytycznych, prezentacji antygeny w obrębie narządów limfatycznych i w konsekwencji wytworzenia efektywnej odpowiedzi immunologicznej specyficznej dla danego drobnoustroju (Foged, 2011; Mody i wsp., 2015).

Ocenę efektywności szczepionki podjednostkowej opracowanej na bazie nanocząsteczek dwutlenku krzemu wzbogaconych o grupy aminowe oraz białka E2 BVDV-1, przeprowadzono na zwierzętach gospodarskich (owce). Badania te miały posłużyć do późniejszego, praktycznego wykorzystania prototypu badanej nanoszczepionki w immunoprofilaktyce zakażeń BVDV-1 u bydła w warunkach terenowych, z uwagi na powszechność jego występowania również w populacji owiec i potrzebę jego skutecznego zwalczania w oparciu o nowe, innowacyjne rozwiązania. Nanoszczepionkę opra-

cowano w dwóch postaciach, niezliofilizowanej oraz zliofilizowanej, otrzymanej po dodaniu mieszaniny trehalozy i glicyny. Punktem odniesienia dla obydwu nanoszczepionek była szczepionka powstała na bazie tego samego antygeny szczepionkowego oraz saponiny (Quil-A). Owce immunizowano trzykrotnie drogą podskórnej iniekcji (Mahony i wsp., 2015). Wyboru właśnie tej drogi podania nanoszczepionek dokonano w oparciu o wcześniejsze badania tego samego autora przeprowadzone na myszach (Mahony i wsp., 2014). W następstwie iniekcji obu postaci nanoszczepionek wykazano wyraźną stymulację miana specyficznych przeciwciał anti-E2, a otrzymane wartości nie różniły się statystycznie istotnie w porównaniu do szczepionki na bazie konwencjonalnego adiuwantu. W następstwie podania nanoszczepionki nie obserwowano zmian poszczepiennych w miejscu iniekcji, co oznacza, że była ona dobrze tolerowana przez owce. Dodatkowo nie obserwowano zaburzeń zdrowotnych u szczepionych zwierząt oraz zmian w masie ciała wykraczających poza zakresy referencyjne. Podanie nanoszczepionki powodowało również długotrwałą odpowiedź poszczepienną (ponad 4 miesiące po podaniu trzeciej dawki), wyrażoną również stymulacją odpowiedzi komórkowej zależnej od aktywności limfocytów Th1. Odpowiedź ta była najsilniej wyrażona u owiec immunizowanych liofilizowaną formą nanoszczepionki. Wyniki te w połączeniu z obserwacjami wskazującymi na dostateczną odpowiedź humoralną dowodzą skuteczności opracowanej nanoszczepionki, potwierdzając przy tym właściwe dobranie nośnika antygeny oraz efektywnego adiuwantu. Dodatkową korzyścią dla zliofilizowanej formy tej nanoszczepionki jest możliwość jej przechowywania w temperaturze pokojowej, co rozwiązuje problemy związane z tym aspektem (Mahony i wsp., 2015). Obiecujące wyniki wykazały też inne badania, tym razem nad szczepionką przeciwko leptospirozie bydła. Eksperymentalna szczepionka skonstruowana na bazie polimerowych mikrocząsteczek diaminosiarczku i antygeny *Leptospira* spowodowała stymulację odpowiedzi humoralnej i komórkowej, podobnej do tej otrzymanej w wyniku podania tradycyjnej szczepionki. Ponadto po zastosowaniu wyżej wymienionej szczepionki doświadczalnej u buhajów zaobserwowano pojawienie się komórek pamięci immunologicznej na antygeny *Leptospira* (Wilson-Welder i wsp. 2020).

Podsumowując należy podkreślić, że nanocząsteczki już teraz z powodzeniem znalazły zastosowanie w lecznictwie weterynaryjnym, poczynając od szerokiego wykorzystania ich właściwości przeciwbakteryjnych, poprzez wielopłaszczyznowe działania immunomodulujące, a na wakcynologii kończąc.

Piśmiennictwo:

1. Applerot G., Lellouche J., Perkas N., Nitzan Y., Gedanken A., Banin E.: ZnO nanoparticle-coated surfaces inhibit bacterial biofilm formation and increase antibiotic susceptibility. *RSC Adv* 2012, 2, 2314.
2. Arshada M., Qayyumb A., Sharc G.A., Soomroc G. A., Nazird A., Munire B., Iqbal M.: Zn-doped SiO₂ nanoparticles preparation and characterization under the effect of various solvents: Antibacterial, antifungal and photocatalytic performance evaluation. *J of Photochem & Photobiol B: Biology* 2018, 185.
3. Azam A., Ahmed A.S., Oves M., Khan M.S., Habib S.S., Memic A.: Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against Gram-positive and Gram-negative bacteria: a comparative study. *Int J Nanomed* 2012, 7, 6003–6009.
4. Besinis A., De Peralta T., Handy R.D.: The antibacterial effects of silver, titanium dioxide and silica dioxide nanoparticles compared to the dental disinfectant chlorhexidine on *Streptococcus mutans* using a suite of bioassays. *Nanotoxicol* 2014, 8, 1–16.
5. Bhattacharyya P., Agarwal B., Goswami M., Maiti D., Baruah S., Tribedi P.: Zinc oxide nanoparticle inhibits the biofilm formation of *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek* 2018, 111, 89–99.
6. Campoccia D., Montanaro L., Arciola C.R.: A review of the biomaterials technologies for infection-resistant surfaces. *Biomaterials* 2013, 34, 8533–8554.
7. Castillo R.R., Lozano D., González B., Manzano M., Izquierdo-Barba L., Vallet-Regi M.: Advances in mesoporous silica nanoparticles for targeted stimuli-responsive drug delivery: An update. *Expert Opin Drug Deliv* 2019, 16, 415–439.
8. Cox G., Wright G.D.: Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. *Int J Med Microbiol* 2013, 303, 287–292.
9. Donnadío A., Cardinali G., Latterini L., Roscini L., Ambrogi V.: Nanostructured zinc oxide on silica surface: Preparation, physicochemical characterization and antimicrobial activity. *Mater Sci & Eng C* 2019, 104, 109977.
10. Essa S.S., El-Saied E.M., El-Tawil O.S., Mahmoud M.B., Abd El-Rahman S.S.: Modulating effect of MgO-SiO₂ nanoparticles on immunological and histopathological alterations induced by aflatoxicosis in rats. *Toxicol* 2017, 140, 94e104.
11. Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O.: A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Biomed Mater Res* 2000, 52, 662–678.
12. Foged C.: Subunit vaccines of the future: the need for safe, customized and optimized particulate delivery systems. *Ther Deliv* 2011, 2, 1057–1077.
13. Fondevila M., Herrero R., Casalbas M.C., Abecia L., Ducia J.J.: Silver nanoparticles as a potential antimicrobial additive for weaned pigs. *Anim Feed Sci Technol* 2009, 150, 259–269.
14. Frost L.S., Leplae R., Summers A.O., Toussaint A.: Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol* 2005, 3, 722–32.
15. Garcia-Vallejo J.J., Ambrosini M., Overbeek A., Riel van V.R., Bloek K., Unger W.W., Chiodo F., Bolscher J.G., Nazmi K., Kalay H., van Kooyk Y.: Multivalent glycopeptide dendrimers for the targeted delivery of antigens to dendritic cells. *Mol Immunol* 2013, 53, 387–97.
16. Gonzales-Eguia A., Fu C.M., Lu F.Y., Lien T.F.: Effects of nanocopper on copper availability and nutrients digestibility, growth performance and serum traits of piglets. *Livestock Sci* 2009, 126, 122–129.
17. Gurunathan S., Yun-Jung C., Jin-Hoi K.: Antibacterial Efficacy of Silver Nanoparticles on Endometritis Caused by *Prevotella melaninogenica* and *Arcanobacterium pyogenes* in Dairy Cattle. *Int J Mol Sci* 2018, 19, 1210.
18. Hajjipour M.J., Fromm K.M., Ashkarran A.A., Aberasturi D.J., Larramendi I.R., Rojo T.: Antibacterial properties of nanoparticles. *Trends Biotechnol* 2012, 30, 499–511.
19. Hameeda S., Wang Y., Zhao L., Xie L., Ying Y.: Shape-dependent significant physical mutilation and antibacterial mechanisms of gold nanoparticles against foodborne bacterial pathogens (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) at lower concentrations. *Mater Sci & Eng C* 2020, 108, 110338.
20. Jin T., Sun D., Su J. Y., Zhang H., Sue H. J.: Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Enteritidis*, and *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Sci* 2009, 1750–1774.
21. Jothiprakasham V., Sambantham M., Chinnathambi S., Vijayaboopathi S.: Candida tropicalis biofilm inhibition by ZnO nanoparticles and EDTA. *Arch Oral Biol* 2017, 73, 21–24.
22. Kim J., Yu K., Kim J., Park S., Lee H., Kim S., Park Y., Hwang C., Kim Y., Lee Y., Jeong D., Cho M.: Antimicrobial effects of silver nanoparticle. *Nanomed* 2007, 3, 95–101.
23. Kim M.G., Park J.Y., Shon Y., Kim G., Shim G., Oh Y.K.: Nanotechnology and vaccine development. *Asian J Pharm Sci* 2014, 9, 227–235.
24. Lecloux H., Ibouraadaten S., Palmi-Pallag M., Marbaix E., van der Brule S., Lison D.: You Are What You Eat: Silica and Silver Nanoparticles in Food Affect the Gut Microbiota in Mice, by Causing a Dose-Dependent Increase in Firmicutes Counts and a Decrease in Bacterioides Counts. *Food Safety: Toxicology from farm to fork*. 4 grudnia 2014, Geel, Belgium.
25. Lewis K.: Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2008, 322, 107–131.
26. Li M.Z., Huang J.T., Tsai Y.H., Mao S.Y., Fu C.M., Lien T.F.: Nanosize of zinc oxide and the effects on zinc digestibility, growth performances, immune response and serum parameters of weaning piglets. *Anim Sci J* 2016, 87, 1379–1385.
27. Ma T., Wang L., Yang T., Ma G., Wang S.: Homogeneous PLGA-lipid nanoparticle as a promising oral vaccine delivery system for ovalbumin. *Asian J Pharm Sci* 2014, 9, 129–36.
28. Mahamuni-Badiger P.P., Patil P.M., Badiger M.V., Patel P.R., Thorat-Gadgil B.S., A. Pandit, Bohara R.A.: Biofilm formation to inhibition: Role of zinc oxide-based nanoparticles. *Mater Sci & Eng C* 2020, 108, 110319.
29. Mahony D., Cavallaro A.S., Mody K.T., Xiong L., Mahony T.J., Qiao S.Z., Mitter N.: In vivo delivery of bovine viral diarrhoea virus, E2 protein using hollow mesoporous silica nanoparticles. *Nanoscale* 2014, 6, 6617–6626.
30. Mahony D., Mody K.T., Cavallaro A.S., Hu Q., Mahony T.J., Qiao S., Mitter N.: Immunisation of Sheep with Bovine Viral Diarrhoea Virus, E2 Protein Using a Freeze-Dried Hollow Silica Mesoporous Nanoparticle Formulation. *PLoS One* 2015, 10(11):e0141870.
31. Mody K.T., Mahony D., Cavallaro A.S., Zhang J., Zhang B., Mahony T.J., Yu Ch., Mitter N.: Silica Vesicle Nanovaccine Formulations Stimulate Long-Term Immune Responses to the Bovine Viral Diarrhoea Virus E2 Protein. *PLoS One* 2015, 10(12):e0143507.
32. Mody K.T., Mahony D., Zhang J., Cavallaro A.S., Zhang B., Popat A., Mahony T.J., Yu C., Mitter N.: Silica vesicles as nanocarriers and adjuvants for generating both antibody and T-cell mediated immune responses to Bovine Viral Diarrhoea Virus E2 protein. *Biomaterials* 2014, 35, 9972–9983.
33. Montalvo-Quiros S., Aragoneses-Cazorla G., Garcia-Alcalde L., Vallet-Regi M., González B., Luque-García J.L.: Cancer cell targeting and therapeutic delivery of silver nanoparticles by mesoporous silica nanocarriers: Insights into the action mechanisms using quantitative proteomics. *Nanoscale* 2019, 7, 11, 4531–4545.
34. Ouyang Z., Ren P., Zheng D., Huang L., Wei T., Yang C., Kong X., Yin Y., He S., He Q.: Hydrothermal synthesis of a new porous zinc oxide and its antimicrobial evaluation in weaning piglets. *Livestock Sci*. 2021, 248, 104499.
35. Paňáček A., Kolár M., Vecerová R., Pucek R., Soukupová J., Krystof V., Hamal P., Zboril R., Kvitěk L.: Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida*. *Biomaterials* 2009, 30, 6333–6340.
36. Pedraza D., Diez J., Barba I.L., Colilla M., Vallet-Regi M.: Amine-Functionalized Mesoporous Silica Nanoparticles: A New Nanoantibiotic for Bone Infection Treatment. *Biomed Glas* 2018, 4, 1–12.
37. Rai M., Yadav A., Gade A.: Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol Adv* 2009, 27, 76–83.
38. Rajendran D., Kumar G., Ramakrishnan S., Thomas K.S.: Enhancing the milk production and immunity in Holstein Friesian crossbred cow by supplementing novel nano zinc oxide. *Res J Biotechnol* 2013, 8, 11–17.
39. Reed S.G., Bertholet S., Coler R.N., Friede M.: New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends Immunol* 2009, 30, 23–32.
40. Santos L.M., Stanisic D., Menezes U.J., Mendonça M.A., Barral T.D., Seyfert N., Azevedo V., Durán N., Meyer R., Tasic L.: Biogenic Silver Nanoparticles as a Post-surgical Treatment for *Corynebacterium pseudotuberculosis* Infection in Small Ruminants. *Front Microbiol* 2019, 10, 824.
41. Scheinberg D.A., McDevitt M.R., Dao T., Mulvey J.J., Feinberg E., Alidori S.: Carbon nanotubes as vaccine scaffolds. *Adv Drug Deliv Rev* 2013, 65, 2016–2022.
42. Selem M.N., Jain N., Pothayee N., Ranjan A., Riffle J.S., Sriranganathan N.: Targeting *Brucella melitensis* with polymeric nanoparticles containing streptomycin and doxycycline. *FEMS Microbiol Lett* 2009, 294, 24–31.
43. Shatan B., Vencliková K., Zasoňka B. A., Patsula V., Pop-Georgievski O., Petrovský E., Horák D.: Antibacterial Silver-Conjugated Magnetic Nanoparticles: Design, Synthesis and Bactericidal Effect. *Pharm Res* 2019, 36, 147.
44. Shi L., Xun W., Yue W., Zhang C., Ren Y.: Effect of elemental nano-selenium on feed digestibility, rumen fermentation and purine derivatives in sheep. *Anim Feed Sci Technol* 2011, 163, 136–142.
45. Sirelkhatim A., Mahmud S., Seeni A., Kaus N.H.M., Chuo A.L., Bakhori S.K.M., Hasan H., Mohamad D.: Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano Micro Letters* 2015, 7, 219–242.
46. Szczerk P., Kamyczek M., Pierzynowski S., Goncharova K., Michalowski P., Westrom B., Pryhodko O., Pieszka M.: Effects of the supplementation of creep-feed with pancreatic-like enzymes of microbial origin (PLEM) and highly dispersed silicon dioxide (hdSiO₂) on the performance of piglets. *J Anim Sci* 2016, 94, 62–65.
47. Turos E., Shim J.Y., Wang Y., Greenhalgh K., Reddy G.S., Dickey S., Lim D.V.: Antibiotic-conjugated polyacrylate nanoparticles: new opportunities for development of anti-MRSA agents. *Bioorg Med Chem Lett* 2007, 17, 53–56.
48. Tyagi P., Mishra M., Khan N., Tyagi S., Sirohi S.: Toxicological study of silver nanoparticles on gut microbial community probiotic. *Environ Nanotech Monit Manag* 2016, 5, 36–43.
49. Usman M.S., El Zowalaty M.E., Shameli K., Zainuddin N., Salama M., Ibrahim N.A.: Synthesis, characterization, and antimicrobial properties of copper nanoparticles. *Int J Nanomedicine* 2013, 8, 4467. Wang C., Zhang L., Ying Z., He J., Zhou L., Zhang L., Zhong X., Wang T.: Effects of dietary zinc oxide nanoparticles on growth, diarrhea, mineral deposition, intestinal morphology, and barrier of weaned piglets. *Biol Trace Elem Res* 2018, 185, 364–374.
50. Wang M.Q., Xu Z.R., Zha L.Y., Lindemann M.D.: Effects of chromium nanocomposite supplementation on blood metabolites, endocrine parameters and immune traits in finishing pigs. *Anim. Feed Sci Technol* 2007, 139, 69–80.
51. Wang M.Q., Xu Z.R.: Effect of chromium nanoparticle on growth performance, carcass characteristics, pork quality and tissue chromium in finishing pigs. *Asian Aust J Anim Sci* 2004, 17, 1118–1122. Williams K., Milner J., Boudreau M.D., Gokulan K., Cerniglia C.E., Khare S.: Effects of subchronic exposure of silver nanoparticles on intestinal microbiota and gut associated immune responses in the ileum of Sprague-Dawley rats. *Nanotoxicology* 2015, 9, 279–289.
52. Wilson-Welder J.H., Boggiatto P., Nally J.E., Wafa E.L., Alt D.P., Hornsby R.L., Frank A., Jones D.E., Olsen S.C., Bowden N.B., Salem A.K.: Bovine immune response to leptospira antigen in different novel adjuvants and vaccine delivery platforms. *Vaccine* 2020, 38, 18, 3464–3473.
53. Yuan Y.G., Peng Q.L., Gurunathan S.: Effects of silver nanoparticles on multiple drug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* from mastitis-infected goats: an alternative approach for antimicrobial therapy. *Int J Mol Sci* 2017, 18, 569.
54. Yun H., Kim J.D., Choi H.C., Lee C.W.: Antibacterial activity of CNT-Ag and GO-Ag nanocomposites against gram-negative and gram-positive bacteria. *Bull Kor Chem Soc* 2013, 34, 3261–3264.
55. Zarei M., Jamnejad A., Khajehali E.: Antibacterial effect of silver nanoparticles against four foodborne pathogens, Jundishapur J. Microbiol, 2014, 7, e8720.
56. Zheng K., Setyawati M.I., Leong D.T., Xie J.: Antimicrobial Gold Nanoclusters. *ACS Nano* 2017, 11, 6904–6910.