

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
İÇ HASTALIKLARI (VETERİNER) YÜKSEK LİSANS PROGRAMI

**KLİNOPTİLOLİT İÇEREN POLİMER
NANOPARTİKÜLLERİN *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*
ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI**

GAMZE KARAOĞLAN
YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından VTF-17026 proje numarası ile desteklenmiştir.

AYDIN-2017

KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner) Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı çerçevesinde Gamze KARAOĞLAN tarafından hazırlanan 'Klinoptilolit İçeren Polimer Nanopartiküllerin *Cryptosporidium parvum* Üzerine *in vitro* Etkinliğinin Araştırılması' başlıklı tez, aşağıdaki jüri tarafından Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28/07/2017

Üye (T.D.): Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye: Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ, Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

Üye: Doç. Dr. Ali Cesur ONMAZ, Erciyes Üniversitesi Veteriner Fakültesi

ONAY:

Bu tez Adnan Menderes Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsününtarih vesayılı oturumunda alınannolu Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ahmet CEYLAN
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgisinden faydalandığım, ilgisini hiç esirgemeyen, yanında çalışmaktan onur duyduğum değerli hocam Prof. Dr. Bülent ULUTAŞ'a,

Hücre kültür çalışmalarındaki yardımlarından dolayı Prof. Dr. Tülin KARAGENÇ'e,

Çalışmalarım sırasında sağladıkları bilimsel destek ve yardımları sebebiyle Prof. Dr. Hüseyin VOYVODA'ya, Prof. Dr. Serdar PAŞA'ya, Prof. Dr. Kerem URAL'a, Yrd. Doç. Dr. Hasan ERDOĞAN'a,

Öğrenimim süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Araş. Gör. Dr. Mehmet GÜLTEKİN'e, Araş. Gör. Dr. Gülten Emek TUNA'ya, Araş. Gör. Songul TOPLU'ya, Araş. Gör. Ceren DİNLER'e, Araş. Gör. Yasin PARLATIR'a Çalışmam sırasında arkadaşlığıyla zor günlerimi kolaylaştıran Gamze BALAT'a,

Çalışmalarım esnasında destekleri ile bana yardımcı olan ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum İç Hastalıkları Anabilim Dalı doktora ve yüksek lisans öğrencilerine, Her zaman desteğini yanımda hissettiğim beni bugünlere getiren sevgili aileme,

SONSUZ TEŞEKKÜRLERİMİ SUNARIM.

İÇİNDEKİLER

KABUL ONAY	i
TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
TABLolar DİZİNİ	viii
ÖZET	ix
ABSTRACT	xi
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1. Cryptosporidium	3
2.1.1. Morfoloji ve Yaşam Siklusu	6
2.1.2. Epidemiyoloji	7
2.1.3. Zoonotik Yönü	9
2.1.4. Patogenez ve Klinik Bulgu	11
2.1.5. Tanı	12
2.1.6. Sağaltım ve Korunma	13
2.2. Zeolitler	16
2.2.1. Zeolitlerin Sınıflandırılması	17
2.2.2. Klinoptilolit	18
2.2.2.1. Klinoptilolit'in Genel Kullanım Alanları	18
2.2.2.2. Klinoptilolit'in Medikal Kullanım Alanları	19
2.2.2.3. Klinoptilolit'in Kriptosporidiozis Sağaltım ve Korunmasında Kullanılabilirliği	22
2.3. Veteriner Hekimlikte Nanobiyoteknolojinin Kullanımı	24
2.3.1. İlaç Dağılım ve Taşınma Sistemleri	26
2.3.1.1. Nanopartiküller	27
2.3.1.1.1. Polimerik Nanopartiküller	28
2.3.2. Tanı ve Tedavi	30
2.3.3. Hayvan Beslenmesi	34
2.3.3.1. Sindirim ve Absorbsiyonun İyileştirilmesi	34

2.3.4. Yem İşleme.....	37
2.3.5. Besin Takviyeleri ve Teknolojileri	37
2.3.6. İşleme	38
2.3.7. Ambalaj ve Depolama	38
2.3.8. Yetiştirme ve Üremede Nanoteknoloji	39
3. GEREÇ VE YÖNTEM	40
3.1. <i>C. parvum</i> 'un Kaynağı ve Hazırlanması	40
3.2. Klinoptilolit İçeren Polimer Nanopartikülün Hazırlanması	43
3.3. <i>İn Vitro</i> Enfeksiyon	44
3.3.1. Konak Hücre.....	44
3.3.2. <i>İn Vitro</i> Hücre Kültürü	44
3.3.3. <i>İn Vitro</i> Hücre Kültüründe Enfeksiyonun İmmunofluoresense İle Belirlenmesi ve Ookist Sayımı	45
3.4. İstatistiksel Analiz	46
4. BULGULAR	47
5. TARTIŞMA	49
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	53
KAYNAKLAR.....	54
EKLER	74
ÖZGEÇMİŞ.....	75

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ELISA	: Indirect Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyon
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribo Nükleik Asit
mg/kg	: Miligram/kilogram
µm	: Mikrometre
g/kg	: Gram/kilogram
nm	: Nanometre
µg/ml	: Mikrogram/mililitre
ppm	: Milyonda bir birim
GİS	: Gastrointestinal sistem
IC50	: Yüzde elli inhibisyon yüzdesi
NTZ	: Nitazoxanide
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
PSA	: Prostat spesifik antijen
FBS	: Fötal Bovine Serum
DMEM	: Dulbecco's Modifiye edilmiş Eagle Besi ortamı
RFLP	: Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği
HBSS	: Hanks Balanced Salt Solution
BSA	: Bovine Serum Albumin
VVL	: Vicia Villosa Lectin

SPSS : Statistical Package for the Social Sciences

Na : Sodyum

K : Potasyum

Ca : Kalsiyum

Mg : Magnezyum

BN : Biyofonksiyonelleştirilmiş nanopartikül

Cu : Bakır



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: <i>Cryptosporidium</i> yaşam siklusu	7
Şekil 2: Nanoboyut ve mikroboyut	25
Şekil 3: Nanopartiküller	28
Şekil 4: Hayvan Beslemede Nanobiyoteknolojinin Uygulanması	34
Şekil 5: <i>Cryptosporidium parvum</i> ookistleri	40
Şekil 6: <i>Cryptosporidium parvum</i> 'un nested PCR ürününün SspI, VspI, MboII kesim enzimleri kullanılarak yapılan RFLP analizi....	42
Şekil 7: <i>Cryptosporidium parvum</i> sekans analiz sonucu	43
Şekil 8: Caco-2 hücrelerinin klinoptilolit içeren nanopartikül ile muamele edilen <i>C. parvum</i> ookistlerinin <i>in vitro</i> görünümü.....	47
Şekil 9: Klinopitilolit içeren polimer nanopartikülün inhibisyon konsantrasyon yüzdesi	48
Şekil 10: Klinopitilolit içeren polimer nanopartikülün %50 inhibisyon konsantrasyon (IC50) yüzdesi	48

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo 1: <i>Cryptosporidium</i> 'un geçerli türleri	4
Tablo 2: Tıbbi uygulamalarda kullanılan alüminosilikatlar	17
Tablo 3: Zeolitlerin çevresel çalışmaları	19
Tablo 4: Klinoptilolit'in deneysel bazı çalışmalarının sonuçları	20
Tablo 5: İlaç dağılımında nanotaşıyıcı olarak kullanılabilen protein, yağ ve sentetik polimer polisakkaritler	29
Tablo 6: <i>In vitro</i> doku kültüründe <i>C. parvum</i> 'a klinoptilolit'in yüzde etkisi	47



ÖZET

KLİNOPTİLOLİT İÇEREN POLİMER NANOPARTİKÜLLERİN *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* ÜZERİNE *İN VİTRO* ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Karaoğlu G. Adnan Menderes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü İç Hastalıkları (Veteriner) Programı Yüksek Lisans Tezi, Aydın, 2017.

Cryptosporidium spp., insan ve birçok hayvan türünde ishale neden olan, enterik protozoon patojenlerdir. *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonunun tedavisi için birçok ilaç kullanılmış; ancak tam bir parazitolojik iyileşme sağlanamamıştır. Günümüzde *C. parvum* için kesin bir korunma ve tedavi protokolü bulunmamaktadır. Bu kapsamda cryptosporidiosis için yeni tedavi protokolüne ihtiyaç duyulmaktadır. Klinoptilolit üzerine yapılan tıbbi çalışmalarda klinoptilolit'in antiviral, antitümöral ve antidiyarel olarak etkinliği araştırılmış ve bu alanlarda olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür. Bu çalışmada, klinoptilolit içeren polimer nanopartikül *C. parvum* üzerine *in vitro* etkinliğinin ortaya konması amaçlandı.

Bu çalışmada deneysel *in vitro* enfeksiyonu gerçekleştirmek için insan kolon adenocarcinoma (Caco-2) hücreleri kullanıldı. Doğal enfekte buzağı veya kuzu dışkılarından elde edilen *Cryptosporidium* ookistlerinin türünün ve tipinin belirlenmesi amacıyla DNA izolasyonu yapıldı. *Cryptosporidium parvum*'un tiplendirilmesi, nested PCR ve *SspI*, *VspI* ve *MboII* enzimleri kullanılarak RFLP analizi ile gerçekleştirildi. Deneysel *in vitro* enfeksiyon gerçekleştirmek için insan Caco-2 hücreleri kullanıldı. Enfeksiyon denemelerinde 12 well hücre kültürü plaklarının içine 18 mm steril yuvarlak lameller yerleştirilerek üzerlerine Caco-2 hücreleri ekildi. Hücreler lamellerin yüzeyini %80 kapladıktan sonra enkiste 1×10^6 *C. parvum* ookisti ile enfekte edildi.

Cryptosporidium parvum ile enfekte enterositlere 4 farklı konsantrasyonda (250, 500, 750, 1000 µg/ml) klinoptilolit içeren polimer nanopartikül ve bir gruba da su ilave edilip kontrol grubu oluşturuldu. İnkubasyon sonrası floresans mikroskopta 400X büyütmede, aynı hat üzerinde 20 yan yana mikroskop sahasındaki hücreler ve hücrelerdeki ookistler sayılarak yüzde enfeksiyon oranı belirlendi. Verilerin istatistiksel değerlendirmesi

Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19 paket programı kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi.

Bu kapsamda kontrol grubunda %23,46 olan enfeksiyon oluşma yüzdesi klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün farklı konsantrasyonlarında (1000µg/ml, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml) sırasıyla %15.6, %8.13, %10.33 ile %13.46 aralığında belirlendi. Klinoptilolit içeren nanopartikülün farklı konsantrasyonlarında (1000µg/ml, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml) sırasıyla inhibisyon yüzdesinin %33.54, %65.56, %55.99, %42.66 olduğu ortaya kondu.

Sonuç olarak *C. parvum* ile Caco-2 hücrelerinde oluşturulan *in vitro* enfeksiyonda klinoptilolit içeren polimer nanopartiküllerin antikriptosidal aktiviteye sahip oldukları belirlendi. Ancak bu etkinliğin dozla ilişkili olduğu ve inhibisyon yüzdesi (IC50) değerine sahip klinoptilolit içeren polimer nanopartikül konsantrasyonların 750µg/ml ve 500µg/ml olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: *Cryptosporidium parvum*, klinoptilolit, nanopartikül.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF *IN VITRO* EFFECTIVENESS OF POLYMERIC NANOPARTICLES CONTAINING CLINOPTILOLIT ON *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

Karaoglan G. Adnan Menderes University Institute of Medical Sciences Internal Medicine (Veterinary) Department Master's Thesis, Aydın, 2017.

Cryptosporidium spp is an enteric protozoan pathogen causing diarrhea in human and multi-species species. Several drugs have been used to treat *Cryptosporidium parvum* infection; However, a complete parasitological recovery has not been achieved. Currently, there is no definitive protection and treatment protocol for *C. parvum*. In this context, a new treatment protocol for cryptosporidiosis is needed. Antiviral, antitumoral and antidiarrheal activities of clinoptilolite investigated and found to have positive effects on these fields. In this study, it was aimed to reveal the *in vitro* efficacy of polymer nanoparticle containing clinoptilolite on *C. parvum*.

In this study, human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells were used to perform experimental *in vitro* infection. DNA isolation was performed to determine the strain and type of *Cryptosporidium* oocysts from natural infected calves or lambs. Typing of *Cryptosporidium parvum* was performed by RFLP analysis using nested PCR and SspI, VspI and MboII enzymes. Human colon adenocarcinoma (Caco-2) cells were used to perform experimental *in vitro* infection. In infectious experiments, 18 mm sterile round laminates were placed into 12 well cell culture plates and Caco-2 cells were plated on them. Cells were coated with 80% of the surface of the coverslips and then infected with 1×10^6 *C. parvum* oocysts.

Clinoptilolite-containing polymer nanoparticles and water in a group were added to the infected enterocytes at 4 different concentrations (250, 500, 750, 1000 µg / ml) and the control group was formed. Percent infection rate was determined by counting oocysts in cells and cells in 20 side-by-side microscope on the same line at 400x magnification on a fluorescence microscope after incubation. Statistical evaluation of the data was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19 package program. $p < 0.05$ was considered significant in all statistical evaluations.

In this context, the percentage of infection occurrence in the control group was

determined as 23,46%. Different concentrations of clinoptilolite-containing polymer nanoparticles (1000µg / ml, 750µg / ml, 500µg / ml, 250µg / ml) was determined as 15.6%, 8.13%, 10.33% and 13.46% respectively. It was revealed that the percent inhibition was 33.54%, 65.56%, 55.99%, 42.66% of the inhibition percentage at different concentrations of the clinoptilolite nanoparticle (1000µg / ml, 750µg / ml, 500µg / ml, 250µg / ml).

In conclusion, anticryptocidal activity of *in vitro* infection of *C. parvum* with Caco-2 cells, clinoptilolite-containing polymer nanoparticles was detected. However, it was determined that this activity was dose-related and the concentrations of clinoptilolite-containing polymer nanoparticles with inhibition percentage (IC50) values were 750µg / ml and 500µg / ml.

Key words: *Cryptosporidium parvum*, clinoptilolite, nanoparticle.

1. GİRİŞ

Bilimsel çabalar ve kemoterapötik yeni ilerlemelere karşın yeni doğan çiftlik hayvanlarında ishal olayları başlıca problemdir. Ülkemizde ishallerle bağlı direkt ve indirekt ekonomik kayıpların boyutu, yetiştiricilerin bilgi eksikliği ve ekonomik durumları nedeniyle daha da artmaktadır. İshalli hayvanların tedavilerinin fazla zaman, işgücü gerektirdiği ve pahalı olması; ishalin oluşmasının engellenmesini veya azaltılmasını ön plana çıkarmaktadır. Buzağı, kuzu ve keçi enteropatojenlerinden *Cryptosporidium spp*, gerek Türkiye ve gerekse Dünya'nın diğer ülkelerinde yenidoğan çiftlik hayvanlarının ishallerinin etiyolojilerinde ilk sıralarda yer almaktadır. Türkiye İstatistik Kurumu Eylül 2016 verilerine göre ülkemizde sağılan 5,5 milyon sığır ve 20 milyon koyun keçi bulunduğu bildirilmektedir. Türkiye'de kültür ırkı buzağı doğumunun 4 milyon, kayıpların %20 ve bir buzağının 2000TL olduğu düşünülürse yıllık 1 milyar 600 milyonTL 'lık bir zarar söz konusudur. Buna yaklaşık 10 milyon kuzu ve keçi kaybıda eklendiğinde rakamın boyutlarının ülke ekonomisine ve hayvancılığa verdiği zararın direkt boyutu yüksek düzeylerde dir. Bu ölümlerin yarısının ishale bağlı olması, ishalin önlenmesi ve tedavisini öncelikli bir konuma getirmektedir.

Günümüzde *C. parvum* için kesin bir koruyucu ve tedavi edici protokol bulunmamaktadır. *C. parvum* enfeksiyonunun korunmasında ve tedavisinde birçok ilaç kullanılmış; ancak tam bir başarı sağlanamamıştır. Bu kapsamda kriptosporidiozis için yeni tedavi protokolüne ihtiyaç duyulmaktadır. Doğal ürünlerin, özellikle ilaç keşfi ve kimyasal biyoloji aracılığıyla, insan ve hayvan sağlık sektörleri üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır.

Klinoptilolit içeren zeolitlerin en önemli komponentlerinden biri olan aliminyumsilikatların özellikle domuz, buzağı ve ratlarda barsak hastalıkları ile ilişkili ishalin azaltılmasında yararlı biyolojik özelliklere sahip olduğu bilinmektedir. Elde edilen araştırma sonuçları klinoptilolit içeren zeolitlerin en önemli komponentlerinden biri olan aliminyumsilikatların bağışıklık sisteminin regüle edilmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Klinoptilolit sindirim sisteminde çözünürlüğü düşük, emilmeyen, birbirlerine kanallarla bağlanan, düzgün gözeneklere sahip kristal yapıda bileşik olup Sodyum (Na), Potasyum (K), Kalsiyum (Ca), Magnezyum (Mg) gibi iyonları içermektedir. Klinoptilolit su kaybetme ve kazanma özelliği ile *C. parvum* etkeninin hidrostatik basıncını etkileyerek sporlanmasını ve enfektif olmasını sağlayan nem, beslenme gibi çevre faktörlerini değiştirebileceği düşünülmektedir. Gerek ookistin gelişmesi ve yaşaması için gerekli çevre

şartlarını etkileyebilme özelliği gerekse immün sistemin düzenlenmesinde ve immün stimulan olarak kullanılabilmesi klinoptilolitin *C. parvum* enfeksiyonunun önlenmesi ve tedavisinde önemli rol oynayabileceği öngörülmektedir.

Sağlık, gıda, tarım ve ilaç sanayi gibi alanlarda hızla yaşamımıza giren nanobiyoteknolojinin yakın geleceğimizin en etkili teknolojisi olacağı ve yaşamımıza doğrudan etki edeceği, yaşam standartlarımızı da oldukça arttırabilecek nitelikte üstün bir teknoloji olacağı kabul edilmektedir. Hazırlanılacak nanobiyoteknolojik ürünler, insan ve hayvan yaşamını ve ekonomik faaliyetleri kökten değiştirme gücüne sahiptir. Bu kapsamda, 2025 yılı itibariyle hayatımızı büyük ölçüde etkileyeceği düşünölen nanoteknoloji alanında üretir hale gelebilmek için Tübitak'ın 2023 Vizyon Programı'nda nanoteknoloji yer almış ve yol haritası oluşturulmuştur. 2006 yılında 22 ölkede nanoteknolojik ürün üreten 250 civarında şirket varken 2007 yılında 580 şirket, 2009 yılında ise 1015 şirket sayısına hızla artış göstermiş ve günümüzde hızla şirket sayısının artmakta olduğu bilinmektedir.

Bu kapsamda proje ile hayvan sağlığında ve beslenmesinde doğal bir zeolit olan klinoptilolitin nanobiyoteknolojik yöntemler kullanarak biyoaktif bir polimer haline getirilmesi ve elde edilen klinoptilolit içeren bu nanopartikölün *C. parvum* üzerine *in vitro* etkisinin araştırılması amaçlandı.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. *Cryptosporidium*

Evcil hayvanları ve insanları etkileyen *Cryptosporidium* ilk kez 1907'de gastrik mukozada ve daha sonra laboratuvar farelerinin ince bağırsağında tanımlanmıştır. Peru'dan koprolitler üzerine yapılan çalışmalar *Cryptosporidium*'un antik insan popülasyonlarında zaten yaygın olduğunu göstermektedir (Ortega ve Bonavia, 2003). Ancak insanlar bu parazitin klinik önemini 20. yüzyılın sonlarında kabul etmiştir. Kriptosporidiozis, günümüzde AIDS (Edinilmiş Bağışıklık Eksikliği Sendromu) hastalarında yaşamı tehdit eden bir hastalık olarak insanlarda, hem sporadik vakalarda hem de 1993'de Milwaukee'de suda bulaşan büyük kriptosporidiozis salgını (Mac Kenzie ve ark, 1994; Fayer, 2004) gibi salgınların yaygın bir nedeni olarak kabul edilmektedir. Kriptosporidiozis sık görülen su kaynaklı bir enfeksiyondur ve su tesisatları için büyük bir endişe kaynağıdır. Sosyo-ekonomik gelişme, özellikle gelişmekte olan ülkelerdeki etkisinden dolayı, *Cryptosporidium*, 2004 yılından bu yana Dünya Sağlık Örgütü tarafından "İhmal Edilmiş Hastalık Girişimi"ne dâhil edilmiştir (Savioli ve ark, 2006).

Veteriner hekimlikte *Cryptosporidium spp.* buzağılarda ishal etiyolojisinde önemli patojenler olarak kabul edilmekle birlikte, parazitin patojenitesi son yüzyılın sonuna kadar anlaşılamamıştır. Etkenin ilk defa 1971 yılında buzağılarda (Panciera ve ark, 1971), 1974 yılında kuzularda (Barker ve Carbonell, 1974) belirlenmesinden sonra bu etken farklı yönleriyle araştırılmış ve birincil patojenik etkisi daha sonra doğrulanmıştır (Tzipori ve ark, 1980b). O günden bu yana hem Avrupa'da hem de ABD'de ishalleri neonatal buzağılardan alınan dışkı örneklerinin %40-70'inde *Cryptosporidium spp.* tespit edilmiştir (Moore ve Zeman, 1991; Otto ve ark, 1995; de Graaf ve ark, 1999b; de la Fuente ve ark, 1999; Constant, 2001; Tartera, 2002). Bu nedenle *Cryptosporidium*, neonatal buzağı ishallerinin etiyolojisinde en önemli patojen olarak düşünülmektedir (de Graaf ve ark, 1999b). Yapılan moleküler çalışmalar *Cryptosporidium* epidemiyolojisinde daha farklı ve detaylı bir bakış açısı sağlamasıyla yeni doğan ruminantların bu yüksek prevalanslı parazitleri, insan enfeksiyonunda potansiyel bir kaynak olduğunu göstermektedir.

Son yıllarda önemi her geçen gün artan zoonotik özellikli *Cryptosporidium spp.*, memeli, kanatlı ve sürüngende sindirim sistemi epitel hücrelerine lokalize olmakta ve özellikle genç ve immun sistemi baskılanmış hayvanlarda enfeksiyon oluşturarak halk sağlığı

için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. *Cryptosporidium*'un günden güne bulunan tür sayısı artmış ve 26'ya ulaşmıştır (Ryan ve ark, 2014) (Tablo 1).

Tablo 1: *Cryptosporidium* 'un geçerli türleri (Ryan ve ark, 2014)

Tür Adı	Konakçı tipleri	Major Konakçı
<i>C. muris</i>	Evci fareler	Kemirgenler
<i>C. wrairi</i>	<i>Cavia porcellus</i> (Guinea domuzu)	Guinea domuzu
<i>C. felis</i>	<i>Felis catis</i> (Kedi)	Kedi
<i>C. serpentis</i>	<i>Elaphe guttata</i> , <i>E. subocularis</i> , <i>Sanzinia madagascarensis</i> (Yılanlar)	Yılanlar ve sürüngenler
<i>C. meleagridis</i>	<i>Meleagris gallopavo</i> (Hindi)	Kuşlar ve insanlar
<i>C. parvum</i>	<i>Bos taurus</i> (Sığır)	Ruminantlar
<i>C. baileyi</i>	<i>Gallus gallus</i> (Tavuk)	Kuşlar
<i>C. varanii</i>	<i>Varanus prasinus</i> (Monitör Kertenkele)	Sürüngenler
<i>C. andersoni</i>	<i>Bos taurus</i> (Sığır)	Ruminantlar
<i>C. canis</i>	<i>Canis familiaris</i> (Köpek)	Köpekler
<i>C. molnari</i>	<i>Sparus aurata</i> ve <i>Dicentrarchus labrax</i> (Balık)	Balıklar
<i>C. hominis</i>	<i>Homo sapiens</i> (İnsan)	İnsanlar
<i>C. gali</i>	Spermestidae, Frangillidae, <i>Gallus gallus</i> , <i>Tetrao urogallus</i> , <i>Pinicola enucleator</i> (Kuşlar)	Kuşlar
<i>C. suis</i>	<i>Sus scrofa</i> (Domuz)	Domuzlar
<i>C. bovis</i>	<i>Bos taurus</i> (Sığır)	Ruminantlar
<i>C. fayeri</i>	<i>Macropus rufus</i> (Kanguru)	Keseliler
<i>C. fragile</i>	<i>Duttaphrynus melanostictus</i> (İki yaşamlı)	İki yaşamlılar
<i>C. macropodum</i>	<i>Macropus rufus</i> (Kanguru)	Keseliler
<i>C. ryanae</i>	<i>Bos taurus</i> (Sığır)	Ruminantlar
<i>C. xiaoi</i>	<i>Ovis aries</i> (Koyun)	Koyun ve keçiler
<i>C. ubiquitum</i>	<i>Bos taurus</i> (Sığır)	Ruminantlar, kemirgenler, primatlar
<i>C. cuniculus</i>	<i>Oryctolagus cuniculus</i> (Avrupa tavşanı)	Tavşanlar
<i>C. tyzzeri</i>	<i>Mus musculus</i> (Fare)	Kemirgenler
<i>C. viatorum</i>	<i>Homo sapiens</i> (İnsan)	İnsanlar
<i>C. scrofarum</i>	<i>Sus scrofa</i> (Domuz)	Domuzlar
<i>C. erinacei</i>	<i>Erinaceus europaeus</i> (Batı Avrupa Kirpisi)	Kirpiler ve atlar

Araştırmalarda *C.parvum*'a ayrı bir önem verilmekte olup insan dh l olmak üzere çok çeşitli konakta tanımlanmıştır.  zoenzim ve moleküler analizleri, *C. parvum*'un insan genotipi (genotip 1 veya H) ve zoonotik sığır genotipi (genotip 2 veya C) olarak en az iki farklı genotip varlığını göstermektedir.  nsan genotipinin büyük ölçüde insana özgü olduğu bildirilmekte ve *C. hominis* olarak sınıflandırılmaktadır (Morgan-Ryan ve ark, 2002). Sığır genotipi ise *C. parvum* olarak anılmaktadır.

Cryptosporidium andersoni, ruminantlarda abomasuma yerleşmektedir. Bu bölgede mide bezlerinde yaptığı dilatasyon, mukozada hipertrofi ve epitelyumda atrofi ile protein sindiriminin bozulmasına yol açmaktadır (Olson ve ark, 2004). Önceleri nonpatojen olarak değerlendirilen etken, et ve süt veriminde önemli ekonomik kayıplara yol aması nedeniyle günümüzde yeni patojen olarak tanımlanmaktadır. Dünya çapında yaygınlığı düşüktür (%2-5) ve yalnızca sığırılarda bildirilmiştir (Santin ve ark, 2004). Hem erişkin hem de sütten yeni kesilmiş hayvanları etkilemektedir. Aylar hatta yıllar süren kronik enfeksiyonlara yol açmaktadır (Olson ve ark, 2004; Santin ve ark, 2004; Fayer ve ark, 2006; O’Handley ve Olson, 2006). Daha önceden bu etkeni almış olabilen hayvanlar sütten kesim sonrasında ya da daha ileri yaşlarda klinik bulgu gösterebilmektedirler (Kvac ve ark, 2011).

Cryptosporidium bovis yeni bir tür olarak Amerika Birleşik Devletleri’nde izole edilmiştir (Divers ve Peek, 2008). Genellikle 2-11 ay arası sığırılarda karşılaşılmaktadır (Fayer ve ark, 2006; O’Handley ve Olson, 2006). Sığırılarda neonatal buzağı ishallerinden sorumlu olup olmadığı tartışmalıdır (Divers ve Peek, 2008).

Bu üç temel türün dışında sütten kesilmiş 2-11 aylık buzağılarda klinik bulgu göstermeyen *C. ryanae* identifiye edilmiştir (Fayer ve ark, 2006; Kvac ve ark, 2011).

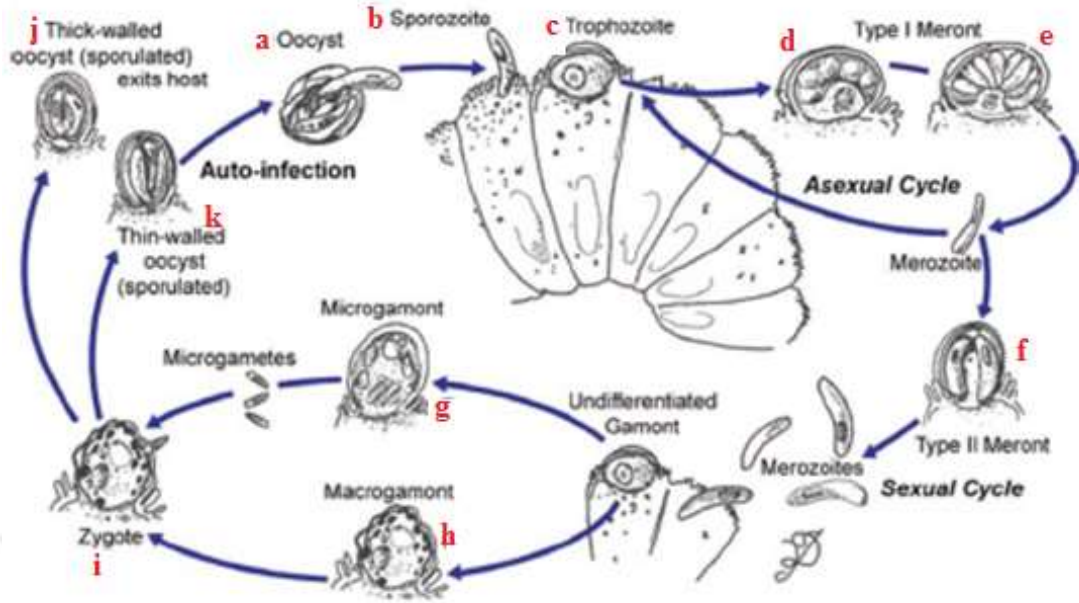
Bir ok *Cryptosporidium* türü içinden memeli hayvanlar için *C. parvum* en önemlisidir (Tzipori ve Ward, 2002) ve yenidoğanlarda çiftlik hayvanlarında sık karşılaşılan ve klinik bulgu gösteren türdür (Mendonça ve ark, 2007; Divers ve Peek, 2008; Imre ve ark, 2011; Kvac ve ark, 2011; Muhid ve ark, 2011). *C. parvum*’un yol açtığı enfeksiyonlarda genellikle sulu ishal görülürken diğer 3 türde klinik semptomlar çok nadir görülmekte ya da enfeksiyon subklinik seyretmektedir (Fayer ve ark, 2006; Hamnes ve ark, 2006; O’Handley ve Olson, 2006).

2.1.1. Morfoloji ve Yaşam Siklusu

Cryptosporidium, aseksüel ve seksüel gelişim evresi ile karmaşık bir yaşam döngüsüne sahiptir. Yaşam döngüsü konakçı ince bağırsağında 3-5 gün içinde tamamlanabilir. Yakın zamana kadar *Cryptosporidium* zorunlu bir hücreiçi parazit olarak kabul edilmiş, ancak *in vitro* çalışmalarla yaşam döngüsünün tamamının, konakçı hücrelere ihtiyaç duymadan tamamlanabileceğini, ancak kolaylıkla başarılmadığını ortaya koydu. *In vivo* amplifikasyon, konakçı hücrede gerçekleşir ve bu, *Cryptosporidium*'un sadece yakın zamanda kendi hücre içi yaşam alanına adapte olabileceğini düşündürülebilir (Hijjawi ve ark, 2004; Girouard ve ark, 2006).

Yaşam siklusu (Şekil 1)(Geurden, 2007), enfektif ookistin (a) yutulması ve uygun sıcaklık ve pH şartlarında 4 sporozoitin (b) eksistasyonu ile başlar (Hijjawi ve ark, 2002; Smith ve ark, 2005a). Hücreye invazyonu sırasında gelişme evreleri konakçı sitoplazmasında bulunmaz. Yani hücre içi ekstrasitoplazmik bir parazittir (Heine ve ark, 1984; Kaske ve Kunz, 2003). Parazit, parazitoforoz vaküölü olarak adlandırılan parazitin yerleştiği hücre zarı ile hücre sitoplazması arasında korunmaktadır. Bu hücre dışı fakat ekstra sitoplazmik konum *Cryptosporidium* için eşsizdir ve parazitin hem hücre dışı hem de hücreiçi konak savunma mekanizmalarından kaçmasına izin verir (Hijjawi ve ark, 2004).

Hücre invazyonundan sonra sporozoitler, konağın epitelyum hücreleri içine girmekte ve burada trofozoitlere dönüşmektedir (c). Döngünün ilk kısmı ardışık olarak birbirini takip eden iki merogoni kümesiyle ve eşeysiz çoğalarak merontları (d) oluşturur. Tip I meronontlar (e), genellikle, 4 yeni merozoitle tip II meront (f) oluşturmak üzere yeni konakçı hücrelere nüfuz eden 8 küçük merozoit içerir. Tip I merozoitlerin aynı zamanda sürekli olarak geri dönüşüm kabiliyetine sahip oldukları ve özellikle bağışıklığı baskılanmış insan hastalarda oto-enfeksiyondan sorumlu oldukları düşünülmektedir. Tip II merozoitler mikro ve makrogametlere dönüşen mikro ve makrogametler (g ve h) olarak bilinen seksüel gelişim evrelerine dönüşürler. Mikrogametler konakçı hücrelerden salınır ve makrogametlere sahip hücrelere nüfuz eder. Birleşmeleri, dirençli ookist duvarına sahip bir ookiste dönüşen bir zigota (i) neden olur. İki aseksüel bölünmeden (sporogoni) sonra ookist 4 sporozoiti içerir. Ookistlerin yaklaşık %80'i kalın bir duvara (j) sahiptir ve dışkı ile atılır. Bu kalın duvarlı ookist parazitin çevreye dirençli safhasıdır ve yeni konaklara enfeksiyonun bulaşmasını sağlar. Geriye kalan %20'lik kısım ince duvarlı ookistler (k) olarak bilinir ve bu ince duvarlı ookistlerin parçalanması sonucu sürekli olarak sporozoitler serbest kalır ve siklus yeniden başlayarak oto-enfeksiyona yol açar (Hijjawi ve ark, 2001).



Şekil 1: *Cryptosporidium* yaşam siklusu (a)enfektif ookist; (b)sporozoit ookistten salınır; (c)trofozoit; (d) ve (e)Tip I meront; (f)Tip II meron; (g)Mikrogamet; (h) Makrogamet; (I) Zigot (Guerden, 2007)

Cryptosporidium'un yaşam döngüsündeki çoğu hücre dışı aşama, ince bağırsağın koruyucu mekanizmalarına karşı çok daha duyarlıdır. Bu nedenle konakçı hücreden salındığında koruyucu mukus tabakasının altında kalırlar ve birkaç saniyede bitişik bağırsak hücrelerini enfekte ederler (Meloni ve Thompson, 1996). Bununla birlikte, genellikle *C. parvum* ve *C. andersoni*'nin yaşam döngüsünde ekstrasellüler trofozoit / gamont benzeri evreler olarak adlandırılan iki yeni hücre dışı aşama tanımlanmıştır. Bu yeni safhalar, hücre dışındaki varlığın uzamasına uyarlanmıştır ve *in vitro* kültürlerde tanımlanmıştır (Hijawi ve ark, 2002).

2.1.2. Epidemiyoloji

Kriptosporidiozis, neonatal buzağı ve kuzularda dünya genelinde görülen bir hastalıktır. Etkenin görülme sıklığı ırk, tanısal yöntem ve yaş grubuna göre değişmektedir. Farklı ülkelerde, değişik yaş gruplarında prevalansın buzağılarda %3.5 - %86, koyunlarda %1,45 - %77,4 arasında değiştiğini rapor edilmektedir (Santin ve Trout, 2008). Ülkemizde

prevelansın dünyadaki çalışmalarla uyumlu olduğu görülmektedir (Özer ve ark, 1990; Erman ve ark, 2000; Sevinç ve ark, 2003; Aştı ve ark, 2012).

Yenidoğan çiftlik hayvanları ookistlerin ağız yoluyla alınması ile enfekte olmaktadır. Oro-fekal bulaşma, enfekte olmuş hayvanlarla temas yoluyla direkt olabilir veya dolaylı olarak kontamine bir ortamda veya kontamine olmuş yem ve su içilmesi yoluyla olabilir. Aletler, bakıcılar, hatta eklembacaklılar ve kuşlar gibi vektörler yoluyla mekanik aktarım mümkündür (Graczyk ve ark, 1999; Fayer ve ark, 2000). Buzağılarda, doğumdan 3-5 gün sonra ookist atılmaya başlar ancak gram dışkıda 10^{10} 'a kadar ookist atılımı en yüksek 12 günlük yaşlarda gerçekleşmektedir. Ookist atılımı 6-14 gün sürmekte (O'Handley ve ark, 1999; Nydam ve ark, 2001; Castro-Hermida ve ark, 2002a) ve yüksek ookist atılımı, bir aydan küçük buzağılarda en sık görülmektedir (Fayer ve ark, 1998a; Maldonado-Camargo ve ark, 1998; O'Handley ve ark, 1999; Becher ve ark, 2004; Kvac ve ark, 2006). Yetişkin sığırlar tarafından ookistlerin atılımı genel olarak düşük olmakla birlikte, koyunlarda (Xiao ve ark, 1994) periparturient dönemde anneler potansiyel bir enfeksiyon kaynağı olarak savunulmuştur (Ralston ve ark, 2003b).

Enfeksiyon için dolaylı kaynaklar olarak, annenin maternal durumu ve buzağının barınakları gibi durumlar düşünülmelidir (Sturdee ve ark, 2003). Grup olarak yaşayan buzağılar arasındaki direkt temas bulaşmayı desteklemektedir (Castro-Hermida ve ark, 2002b). Aynı zamanda bireysel bulaşmada bakıcı gibi bir vektör ya da dışkı atığı ile bulaşma da sık görülmektedir. Ayrıca, ağıl koşulları ile sonraki buzağılara bulaşma da mümkündür (O'Handley ve ark, 1999). Genel olarak, kapalı buzağı ağıllarında barındırılan buzağılar, dışarıda barınaklarda bulunan buzağılara göre daha fazla enfeksiyon riski altındadırlar (Quigley ve ark, 1994).

Ookistler -4°C ve 20°C arasındaki sıcaklıklarda toprakta 12 hafta, suda 24 haftaya kadar hayatta kalabilirler. Ookistler sığır dışkılarında ve gübrede en az 70 gün enfektif halde kalırlar (Fayer ve ark, 1998c; Olson ve ark, 1999; Jenkins ve ark, 2002). Donma, ookistler için ölümcül olmasına rağmen, ookistlerin küçük bir kısmı donma sıcaklıklarında 2 aya kadar canlı kalabilir. Bu canlı ookistlerin hâlâ enfektif olup olmadıkları belirsizdir (Robertson ve ark, 1992; Walker ve ark, 2001). Kuruma 4 saat içinde % 100 öldürücüdür. Sıcaklık artıp 55°C 'nin üzerine çıkarttıktan sonra ookistte bulaşıcılık azalır (Fayer, 1994; Fujino ve ark, 2002). Sürü boyutu, yavru buzağı sayısı, stok oranı veya buzağılama sezonunun uzunluğu gibi yönetim faktörler de dahil olmak üzere enfeksiyon için çeşitli risk faktörleri tespit edilmiştir. Daha yüksek stok yoğunluklar, özellikle genç hayvanlar arasındaki temas oranını arttırarak, enfekte olmuş ve şüpheli hayvanlar arasındaki bulaşma ihtimalini artırır (Garber ve ark,

1994). Uzun buzağılama mevsimi veya yıl boyu buzağılama, duyarlı buzağuların uzun süre etkeni alması ile sonuçlanır (Atwill ve ark, 1999; Hoar ve ark, 2001). Yaygınlık ve ookist atılmasındaki mevsimsel dalgalanmalar insan ve yaban hayatı popülasyonlarında (Atwill ve ark, 2004; Roy ve ark, 2004) tespit edilmiştir, ancak sığırlarda buzağılama mevsimi ile çakıştığı sürece (Atwill ve ark, 1999; Wade ve ark, 2000b; Becher ve ark, 2004) daha yüksek atılım görülmektedir (Huetink ve ark, 2001; Sturdee ve ark, 2003; Lorino ve ark, 2005).

Epidemiyolojide önemli bir faktör buzağı yaşı gibi gözükmemektedir: *Cryptosporidium* pozitif çiftliklerde 9-12 günlük yaşta enfeksiyon riski en yüksek olan %100 insidans (O'Handley ve ark, 1999) göstermektedir. Bu pozitif çiftliklerde buzağuların %50'si 10 günlük yaştan önce enfekte olmaktadır. Bazen bir aydan büyük buzağılarda, *C. parvum* ile birincil bir enfeksiyon görülür, bunun sebebi çoğunlukla geçmişte enfeksiyon bulunmamasıdır (Huetink ve ark, 2001).

2.1.3. Zoonotik Yönü

Gelişmiş ülkelerde, bağışıklık sistemi oluşmuş konaklarda *Cryptosporidium* prevalansı asemptomatik kişilerde %0,2 iken, ishal olan hastalarda %2,2'ye kadar ulaşabilmektedir (Guerrant, 1997). Özellikle 5 yaşın altındaki çocuklar ve bez değiştirmenin enfeksiyon ile ilişkilendirilmesi sebebiyle anne-babalar da risk altındadır (Hunter ve ark, 2004). İnsanlarda *C. hominis* veya zoonotik *C. parvum* yoğun enfeksiyonlara, *C. meleagridis* ise sınırlı sayıda olguya (Pedraza-Diaz ve ark, 2001b) neden olabilmektedir. *C. canis*, *C. suis*, *C. muris* ve *C. felis* gibi diğer *Cryptosporidium* türleri, özellikle immün yetmezlikli hastalarda bildirilmektedir (Pedraza-Diaz ve ark, 2001a; Caccio ve ark, 2005).

Su, yaşam boyu hayatın, sürekliliğin, yerleşimlerin ve doğanın vazgeçilmez bir parçası olmuştur. Bütün canlıların olduğu gibi insanların da temel ihtiyacı olan su içilebilir ve kullanılabilir nitelikte olmalıdır. Tüm dünyada olduğu gibi Türkiye'de de temiz ve hijyenik şartlara uygun suyun sağlanması, bir sağlık problemi olarak gün geçtikçe önemini arttırmaktadır. İnsanların sağlığı, farklı kaynaklardan sağlanan sulardan etkilenmektedir. Bu etkilenme iki sebepten kaynaklanmaktadır. Bunlar zararlı biyolojik etkenler ile endüstri atıklarından doğan kimyasal ya da radyoaktif kirleticilerin sulara karışmasıdır. Suyun belli başlı zararlı biyolojik ajanları patojen bakteriler, viruslar, parazit ve diğer mikroorganizmalardır. Oral-fekal enfeksiyon zincirinin en önemli halkası içme suyudur. Bugüne kadar *C. parvum*'un içme suyu kaynaklarını kontamine etmesiyle onlarca salgın

gerçekleşmiştir. Bu salgınlardan ikisinde (Milwaukee ve Las Vegas) immünsistemi baskılanmış popülasyondaki ölüm oranları %52-68 arasında olmuştur (Mac Kenzie ve ark, 1994). 1987 yılında Amerika Carrolton'da yine *C. parvum*'un içme suyu kaynaklarını kontamine etmesiyle 13000 kişide *Cryptosporidium* enfeksiyonuna rastlanırken, 1992 yılında Amerika Jackson County ve Oregon'da 15000 kişinin sağlığını tehdit etmiştir (Stein, 2001). Bugüne kadar görülen en büyük salgın 1993 yılı Nisan ayında Milwaukee, Wisconsin'da (USA) gerçekleşmiş olup, 403000 semptomatik vaka saptanmıştır (Mac Kenzie ve ark, 1994). Bu bağlamda bakıldığında *C. parvum* enfeksiyonları salgın olarak ortaya çıkabilmekte ve toplum sağlığını önemli oranda etkilemektedir. Nitekim *C. parvum* B sınıfı bioterorizm ajanı olarak katagorize edilmekte (<http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>) ve özellikle suların kontamine edilmesiyle ciddi problemlerin ortaya çıkmasına ve kaos ortamlarının doğmasına yol açmaktadır. Toplum sağlığı için böylesine önemli *C. parvum* enfeksiyonunun profilaksisinin ve tedavisinin sağlanabilmesinin başarılması veya katkıda bulunulması, ülkemiz ve diğer ülkelerin dolaylı yoldan ekonomilerine ve toplum sağlığına katkılar sağlayacağı bir gerçektir. Bununla birlikte, moleküler bilgi çoğunlukla salgınlardan elde edilirken, insan cryptosporidial enfeksiyonların çoğu salgınla ilişkili değildir (Feltus ve ark, 2006). Her ne kadar sporadik vakalarda enfeksiyon kaynağı çoğunlukla bilinmese de, enfekte olmuş çiftlik hayvanlarıyla doğrudan temas art arda enfeksiyon ile ilişkilendirilmiştir (Hunter ve ark, 2004; Hunter ve Thompson, 2005). Diğer risk faktörleri yurt dışına seyahat etme, ishalleri hasta ile temas etme veya yüzmedir (Robertson ve ark, 2002; Roy ve ark, 2004).

Cryptosporidium parvum'un görülme sıklığı ve koşulları, enfekte olmuş ve duyarlı konakçılar arasındaki temasla bağlıdır. Dolayısıyla, *C. parvum* enfeksiyonlarının oranı kırsal alanlarda, hayvan barınaklarının yakınında kentsel alanlardan daha yüksektir (Learmonth ve ark, 2004). Avrupa'da, hayvancılık endüstrisi ile içme suyu kaynakları veya yerleşim yeri ve rekreasyon alanları arasındaki temas, insan hastalarında *C. parvum*'un yaygınlığını açıklarken, dünyanın diğer bölgelerinde insan enfeksiyonları *C. hominis*'e bağlıdır. Benzer şekilde, kırsal alanda sınırlı erişim ve büyükbaş hayvan katliamı da dâhil olmak üzere, 2001'de şap hastalıklarının ortaya çıkması sırasında uygulanan düzenlemeler, İskoçya'da insan kriptosporidial enfeksiyonlarının azalmasına neden olmuştur (Strachan ve ark, 2003). Bu nedenle, sığır ve özellikle genç buzağılar *C. parvum* için bir rezervuar olarak düşünülmelidir (Heitman ve ark, 2002). Ayrıca sığırlarda karışık *C. parvum* ve *C. hominis* enfeksiyonları (Tanrıverdi ve ark, 2003) ve tek *C. hominis* enfeksiyonları (Smith ve ark, 2005a) sıklıkla bildirilmiştir. İnsanlarda enfeksiyonun oluşmasında koyunlar ve diğer canlı hayvanların önemi sığırlara göre daha az gözükmemektedir (Ryan ve ark, 2005). Pet hayvanları muhtemelen

insan enfeksiyonu için rezervuar olarak önemsizdir (Hunter ve Thompson, 2005). Geyik, elk ve bizon gibi yabani hayvanlar sığır ve insanlarla aynı türle enfekte olmuş olsalar da (Olson ve ark, 2004), Kuzeybatı Avrupa'daki sığır veya insan kriptosporidiosis epidemiyolojisindeki vahşi yaşamın önemi belirsizdir. Bu nedenle sığırlar, zoonotik bulaşma için en önemli kaynaklardır (Hunter ve Thompson, 2005).

Buzağılarla doğrudan temas, çiftlik evlerinde (Miron ve ark, 1991; Lengerich ve ark, 1993), çiftlik ziyaretçilerinde (Evans ve Gardner, 1996; Sayers ve ark, 1996) veya veteriner hekimlerde (Preiser ve ark, 2003) enfeksiyonlara neden olmasına rağmen, zoonotik enfeksiyonların çoğu su veya gıda yoluyla dolaylı iletimden kaynaklanmaktadır (Sulaiman ve ark, 1999; Stantic-Pavlinic ve ark, 2003; Hunter ve ark, 2004). Ookistler, gübre depolama alanlarından drenaj, gübre yüklü topraklardan suyun doğrudan akarak yüzey sularına taşınmasıyla (Fayer ve ark, 1998b; Graczyk ve ark, 2000; Sicho ve ark, 2000; Jellison ve ark, 2002) çevreyi kontamine etmektedir. *Cryptosporidium* ookistleri tarım topraklarında yaygındır (Barwick ve ark, 2003) ve birkaç ay hayatta kalabilmektedir (Jenkins ve ark, 2002). Yağış ve akıntı, yüzey suları ve içme suyu rezervuarlarındaki toplam *Cryptosporidium* yüküne (Kistemann ve ark, 2002) büyük katkıda bulunurlar ve tarımsal yüzey sularındaki en yüksek ookist seviyeleri buzağılama mevsimi ile paralellik gösterir (Bodley-Tickell ve ark, 2002). Su arıtma tesislerinde en sık kullanılan dezenfeksiyon prosedürleri ookistleri tamamen ortadan kaldırmadığından, su, zoonotik enfeksiyonlar için önemli bir araç olarak düşünülmelidir.

2.1.4. Patogenez ve Klinik Bulgu

Cryptosporidium türleri, *C. bovis* ve *C. parvum*, ileumda ve jejunumda bazen de kolon, caecum ve duodenumda yaşam döngüsünü tamamlarlar (Sanford ve Josephson, 1982). *C. bovis*'in patojenitesinin muhtemelen bağışıklığa bağlı olarak sınırlı olduğu düşünülmektedir (Harp ve ark, 1990; Santin ve ark, 2004). Genç buzağılarda *C. parvum* baskındır ve oldukça patojen olduğu düşünülür. Etkenin epitel yüzeyine invazyon ve kolonizasyonu, epitel hücrelerinin ve mikrovillus sınırının kaybedilmesine neden olur. Ayrıca, villus atrofisi, villus dejenerasyonu sonucu epitelin geçirgenliği artar. Sonuç olarak bağırsak yüzey alanının azalması, laktaz gibi sindirim enzimlerinin kaybı, besin maddelerinin ve elektrolitlerin emiliminin bozulmasına yol açmaktadır. Histopatolojik preparatlarda villus atrofisi yanı sıra

kript hiperplazisi ve intra-epitel lenfositlerinde bir artış gözlemlenmektedir (Sanford ve Josephson, 1982; Tzipori ve ark, 1983; Fayer ve ark, 1998a; Robinson ve ark, 2003).

Klinik belirtiler en sık 5 gün ile 1 ay arasındaki buzağılarda görülmekte ve genellikle 2 hafta içinde kendini sınırlayan malabsorptif ve sekresyonlu bir ishal ortaya çıkmaktadır (O'Handley ve ark, 1999). İshal, açık sarımsı, pastözden sulu kıvama kadar değişen kıvamda, mukuslu olabilmektedir. Buzağılar dehidre, depresif ve anorektik olabilir. Klinik semptomların şiddeti ve süresi eşzamanlı viral, bakteriyel veya paraziter enfeksiyonlara ve konakçının direncine bağlı olarak oldukça değişkendir (Fayer ve ark, 1998a). Mortalite değişkendir ve çoğunlukla birden fazla enfeksiyona sahip buzağılarda, Belçika mavisı gibi bazı sığır cinslerinde yaygın görülmektedir (de Graaf ve ark, 1999b). Şiddetli kriptosporidiosisli buzağıkların tamamen iyileşmesi birkaç hafta sürebilir ve kilo kaybı ve tedavi masraflarından dolayı üretim üzerinde kesinlikle olumsuz etkisi bulunmaktadır. Yaşamın erken dönemindeki kriptosporidial enfeksiyonların uzun vadeli zararlı etkileri olup olmadığı belirsizdir. *Cryptosporidium spp* ilişkili ishalden kurtarılan buzağılarda genellikle tekrarlayan klinik enfeksiyonlar yoktur. Ookist atılımı da enfeksiyon sonrasında en az seviyede görülür.

Cryptosporidium andersoni ile enfeksiyon, dünya çapında süttten kesilmiş sığırlarda bildirilmiştir (Enemark ve ark, 2002; Olson ve ark, 2004). *C. andersoni*, mide mukozasında glandüler dilatasyon ve hipertrofiye neden olan abomasum peptik ve pilorik bezlerine invaze olur ve epitel tabakasının incelmelerini sağlar. Buna rağmen bildirilenlere göre (Daniel ve ark, 2005), *C. andersoni* ile enfeksiyon genellikle belirgin bir ishal ile sonuçlanmaz, ancak artan mide pH'sına bağlı olarak protein sindiriminin engellenmesi ve daha sonra gastrik proteolitik aktivitenin azalması nedeniyle büyük oranda proteolitik reaksiyona neden olur. Bu, kilo alımında orta ila ciddi düzeyde bozulma, azalmış yem verimi ve süt üretiminde azalma ile sonuçlanır (Anderson, 1987; Esteban ve Anderson, 1995; Ralston ve ark, 2003a).

2.1.5. Tanı

Cryptosporidium 'un teşhisi için en yaygın kullanılan teknik, fecal smear örneğinde natif ve ya boyama sonrasında ookistlerin saptanmasıdır. En sık kullanılan boyama yöntemleri, modifiye Ziehl-Neelsen boyaması (Henricksen ve Pohlenz, 1981) ve karbolfuksin boyamasıdır (Heine, 1982). *C. parvum*, *C. hominis* ve diğer birçok *Cryptosporidium* türü ve genotipi gibi intestinal gruptan alınan *Cryptosporidium* parazitlerinin ookistleri morfolojik

olarak ayırt edilemezler. Ortalama 5.0 ile 4.5µm arasında değişen (4.2-5.0 aralığında 4.5-5.4) (Upton ve Current, 1985; Fayer ve ark, 2005) elipsoidal kürelerdir. Genel olarak, mikroskopi, özellikle hafif enfeksiyonların teşhisi için immünolojik teknikler ve PCR ile karşılaştırıldığında düşük bir hassasiğe sahiptir. Konsantrasyondan sonra bile, düşük ookist atılımı olan enfeksiyonların çoğu mikroskopi ile teşhis edilmez (Fayer ve ark, 2000).

Poliklonal Florasan Antikor Testi, Latex Aglutinasyon Reaksiyonu, Monoklonal Antikorlu Immun Florasan, ELISA (enzyme linked), Reverse Pasif Haemaglutinasyon, İmmunokromatografi gibi immünolojik metodlar da parazitin identifikasyonunda kullanılmaktadır (Fayer ve ark, 2000). Kullanışlı olmalarına rağmen yüksek maliyetleri bu immünolojik metodların rutin kullanımını sınırlandırmaktadır (Tzipori ve Ward, 2002; O’Handley ve Olson, 2006).

Kriptosporidiozisin tanısında kopraantijen temelli ELISA kitleri daha spesifik ve duyarlı olmasına rağmen insan hekimliğinde kullanım olanağı daha fazladır (Garcia ve Shimizu, 1997; Thompson ve ark, 2008). *Cryptosporidium* türlerinin ayırımında ve epidemiyolojik çalışmalarda kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve diğer genetik teknikler tanıda ayrı değer taşımaktadırlar (Tzipori ve Ward, 2002; Divers ve Peek, 2008).

Sonuç olarak *Cryptosporidium spp* için rutin tanıda mikroskopik incelemeden yararlanılırken (Divers ve Peek, 2008), immunfloresans, ELISA ve PCR yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip tanı teknikleridir.

2.1.6. Sağaltım ve Korunma

Birçok kemoterapötik ajan sığır kriptosporidiozis tedavisi için test edilmiş, ancak hiçbirisi ookist atılımında %100 azalma sağlayamamıştır.

Avrupada yasal olarak yedi gün boyunca günlük 100 µg/kg vücut ağırlığı doz oranında, buzağılarda tedavi için kullanılan tek ilaç halofuginon laktattır (Kaske ve Kunz, 2003). Koruyucu tedavi için, halofuginon, doğumdan 48 saat sonra ve küratif tedavi için, klinik semptomların başlangıcından sonraki 24 saat içinde uygulanmalıdır. Halofuginon laktat ile tedavi ishal oluşumunu azaltır ve ookist atılımını erteler. Halofuginon sağaltımının sonuçları üzerine raporlar tartışmalıdır. Genel olarak, deneysel ortamlarda, yüksek çevresel enfeksiyon oranına sahip doğal koşullardakinden daha iyi sonuçlar alınmıştır (Villacorta ve ark, 1991b; Naciri ve ark, 1993; Lefay ve ark, 2001; Joachim ve ark, 2003; Jarvie ve ark,

2005). Enfeksiyon tamamen ortadan kaldırılmadığından, halofuginon laktat ile tedavi belirli bir bağıışıklığın gelişmesine izin verir (Peeters ve ark,1993).

Kriptosporidiosisin tedavisi için tescillenmiş olmasa da, paromomisin sülfat ile profilaksi, 10 veya 11 gün boyunca günde 100mg/kg canlı ağırlık doz oranında, ookist atılımını ve buzağılarda ve keçi yavrularında klinik bulgu ve mortaliteyi önlemede etkilidir. Halofuginona benzer şekilde, etkinlik, doğal koşullarla karşılaştırıldığında deneysel olarak (Fayer ve Ellis, 1993b; Mancassola ve ark, 1995) daha yüksekti (Chartier ve ark, 1996; Grinberg ve ark, 2002; Johnson ve ark, 2000).

Azitromisin, *Cryptosporidium*'a karşı terapötik etkililiğe sahip başka bir antibiyotiktir (Elitok ve ark, 2005), ancak buzağılarda kullanılmak üzere tescilli değildir. Ayrıca, sülfamidin (Moon ve ark, 1982b; Joachim ve ark, 2003) ve koksidiostatikler gibi çeşitli kemoterapötiklerin etkinliği, decoquinate gibi (Mancassola ve ark,1997; Lindsay ve ark, 2000b; Moore ve ark, 2003), test edilmiş ve ookist atılımı veya ishalin azaltılmasına yönelik olumlu bir etkisinin olmadığı görülmüştür. Bunlara ek olarak özellikle α ve β siklodekstrinin insanlarda nitazoksanid gibi ishalin şiddetini azalttığı ve ookist atılma süresini kısalttığı bildirilmektedir (Rossignol ve ark, 2006). Laktik asit üreten bakterilerin (Harp ve ark, 1996b) veya konsantre sarımsak preparatlarıyla (Hoflack ve ark, 2006) alternatif tedavisinin ookist atılımını ve klinik semptomları önlemede etkili olmadığı vurgulanmaktadır.

Kriptosporidiozis kontrolü; hayvan tedavisinin ve uygun hijyenik tedbirlerin yönetimin bir kombinasyonuna dayanır. Enfekte buzağların neden olduğu yüksek ookist atılımı, atılmış ookistlerin çevresel direnci ve asemptomatik taşıyıcıların varlığı gibi belirli parazit özelliklerinden dolayı kriptosporidiozis enfekte çiftliklerde endemik bir sorun olarak düşünülmelidir. Bu nedenle, hijyenik tedbirler, duyarlı buzağılara enfeksiyon yayılmasını önlemek ve iletim döngüsünü kırmak için çevresel enfeksiyon miktarını en aza indirmeyi hedeflemelidir. Yataklıkların sık sık alınması ve dezenfeksiyon ile kombine temizlik ortamdaki ookist yükünün azaltılmasına yardımcı olur (Garber ve ark, 1994; Castro-Hermida ve ark, 2002a). *Cryptosporidium* yaygın olarak kullanılan dezenfektanlara karşı oldukça dirençlidir (Carpenter ve ark, 1999). Kriptosporidial ookistlere karşı formalin, aldehit ve asitleri kapsayan birçok ticari dezenfektan bulunmaktadır. En etkili dezenfektanların; %5-10 amonyak, %6 hidrojen peroksit, %70 sodyum hipoklorit veya %10'luk formalin olduğu bildirilmektedir (Saini ve ark, 2000; Bopp, 2003). Ookistler aşırı sıcaklıklara ve kurumaya karşı duyarlıdırlar (Fujino ve ark, 2002). Bu nedenle, sıcak su ile temizleme, ardından kurutma, ookist enfektivitesini azaltmak için etkili bir yoldur (Harp ve ark, 1996a). Örneğin ookistlerin 55°C dereceye kadar ısıtılması ile enfeksiyon yeteneği 30 saniyede kaybolur. Bu

durum 60°C derecede 15 saniye, 70°C ise 5 saniye olarak bildirilmektedir (Olson ve ark, 2004).

İyi yönetim uygulamaları, dışarıda sıcak ve kuru bireysel buzağı koşullarını içermelidir (Castro-Hermida ve ark, 2002a; Quigley ve ark, 1994). Enfeksiyon yayılımını önlemek için, klinik olarak etkilenen buzağuları ayırmak için ayrı aletler, çizmeler ve örtülerle çiftlikte bir özel birim bulunmalıdır. Kolostral antikorlar buzağuları şiddetli klinik semptomların gelişmesinden koruduğu için, yeterli kolostrum alımı sağlamak da önemlidir (Mohammed ve ark, 1999). Selenyum yetersizliği olan buzağılarda şiddetli klinik bulgular görüldüğünden mikro besinler de kriptosporidiosis'in klinik sonucunda önemli bir rol oynayabileceği rapor edilmektedir (McAllister ve ark, 2005; Olson ve ark, 2004).

Aşılama, kemoterapötik tedaviye değerli bir alternatif sağlayabilir. Deney ortamında buzağılar, gama ışınlarına maruz bırakılmış (Jenkins ve ark, 2004) veya liyofilize ookistler (Harp ve Goff, 1995) ile aktif aşılamalardan sonra tek bir enfeksiyon dozuna karşı korunmuştur. Doğumdan sonraki günler içinde klinik semptomların ve ookist atılımının ortaya çıkması nedeniyle, buzağıların tek bir aşılması enfeksiyon öncesinde belirgin bir bağışıklık korumasına aracılık yapamamaktadır (Harp ve ark, 1996b). Ayrıca, maternal antikorlar, oral olarak temin edilen aşı antijenlerinde bloke edici bir etkiye sahiptir (de Graaf ve ark, 1999a). Doğum öncesi annenin aşılması yoluyla kolostral antikorlar yoluyla pasif bağışıklık sağlamanın, buzağılarda (Perryman ve ark, 1999) ve keçi yavrularında (Sagodira ve ark, 1999) etkili olduğu görülmüştür. Her ne kadar kolostral aşılama kemoterapötik tedavide en umut verici alternatif olsa da aşılarda başarıyla uygulanması, yaşamın ilk günlerinde buzağıların kriptosporidial ookistlere maruz kalmasını en aza indirmek ve koruyucu immun yanıtların üretilmesini sağlamak için hijyenik ve idare önlemleri ile desteklenmelidir.

Denenen 200'den fazla maddeden istenilen etkinliğin sağlanamaması üzerine, kriptosporidiosis'in profilaksi ve sağaltımında yeni arayışlar gündeme gelmiştir. Bu kapsamda bifosfonat bileşiklerinin etkili olabileceği düşünülmüş ve *in vitro* çalışmalardan umut verici bulgular elde edilmiştir.

2.2. Zeolitler

Zeolitler bir mineral grup ismidir. Doğada yaygın olarak bulunan volkanik küllerin ortamında başkalaşıma uğraması neticesinde meydana gelirler. Zeolitlerin bir mineral grubu olarak tanımlanması 1756 yılında yapılmıştır. 1930'lu yıllarda ise kristal yapılarının çözülmesi gerçekleştirilmiş ve 1948 de yapay olarak zeolit üretilmiştir. Yapay üretimdeki maliyet yüksekliği nedeniyle, doğal zeolit yataklarının aranmasına yoğunlaşılmıştır (Danabaş, 2009).

Zeolitin en küçük yapı birimi silikon tetraoksit ya da alüminyum oksit dörtyüzlüsüdür. Kristal yapıları ve nem çekme özellikleri bozulmadan, absorbe ettikleri suyu geri verebilir. (Wang ve Peng, 2010). Toz haline getirilen zeolitler oral olarak alındığında silikatlar gibi gıda veya vücut sıvılarıyla reaksiyona girmezler. Farelerle ve sıçanlarla yapılan toksikolojik çalışmalarda; 6-12 ay arası bir dönem içinde uygulanan zeolitin toksik etkisi bildirilmemektedir (Slavko ve ark, 2004).

Günümüzde dünyada zeolit üretiminde ilk sırada, Japonya yer alırken, zeolit üreten diğer ülkeler arasında; Amerika Birleşik Devletleri, Kanada, Avustralya ve Küba yer alır. Türkiye'nin zeolit rezervi 45.8 milyar ton olup, Ankara, İzmir, Manisa, Balıkesir, Kütahya ve Kapadokya'da zeolit rezervleri bulunmaktadır (Sarioğlu, 2005; Şentürk ve ark, 2010). Modern tıp uygulamasında birçok silisli veya kalsiyumlu inert bileşik vardır. Bunlar Tablo 2'de özetlenmiştir.

Tablo 2: Tıbbi uygulamalarda kullanılan alüminosilikatlar. (Laurino ve Palmieri, 2015)

	Kimyasal ve Fiziksel karakterler	Terapötik kullanımları
Klinoptilolit (Zeolit)	Doğal zeolit; Kristal yapı oksijen bağlarıyla bağlantılı iki SiO_4 ve AlO_4 tetrahedronundan oluşur. İskele, katyonların ve moleküllerin bulunabileceği çok sayıda boş alana ve kanallara sahiptir	• Immun sistemi sürdürme • Vücut pH'sının dengelenmesi • Serbest radikalleri azaltma • Zararlı maddeleri (toksinler, ağır metaller, amonyum, nitrosaminler) nötralize etme ve / veya yok etme • Doku oksijenasyonunu iyileştirme • Yara, cilt kızarıklıkları, sivilce ve sedef hastalığında cildin yenilenmesi • Genel sağlık durumunu iyileştirme • Kanseri gibi farklı patolojilerde yardımcı • Kemoterapi ve radyoterapinin yan etkilerini azaltma • Anti-hemoraji
Kil (Clay)	Granüller boyutları $<2 \mu\text{m}$ çapındadır; Çoğunlukla hidrat alüminosilikatlardan oluşur; Adsorbe özellikli su molekülleri; iyonik değişim özellikleri ve katyonların fisyonunu sağlar	• Gastrointestinal bozukluklar
Kaolin	Sedimente taşlar çoğunlukla kaolinit, killerin silisli bir minerali oluşturur	• Sentetik zeolit üretimi • Akut ishale yönelik terapötik tedavi • Farmakolojik yardımcı madde (anti-mikoz ve anti-emetik ilaçlar)
Bentonit	Filosilikat, alüminosilikatlar; Kil minerali çoğunlukla montmorillonit, kalsiyum ve sodyumdan oluşur	• Diyetle psyllium ile bağlantılı olarak mukus ve dışkı kalıntılarını bağırsaktan uzaklaştırmak için kullanılır
Diosmektit	Alüminyum ve magnezyum silikat, suda çözünmez	• Gastrointestinal bozuklukların (Özofagus, mide ve bağırsak ağrılı hastalıkların, GERD, hiatal herni, kolit, meteorizm, bulbitis, gastro duodenal ülser, kronik ve akut ishal) tedavisinde iyi emicilerdir
Attapulgit	Killerden oluşan magnezyum hidrat alüminosilikat minerali;	• Toksinler ve bağırsak bakterileri adsorbe edici özellikleri sayesinde antiasid ve anti-ishal

2.2.1. Zeolitlerin Sınıflandırılması

Yaklaşık 50 farklı doğal zeolit bilinmekte ve 150'den fazlası endüstriyel kataliz veya deterjan üretimi gibi uygulamalar için sentezlenmektedir. Dokuz zeolit mineralin doğada oldukça fazla saf rezervler olarak bulunmaktadır. Bunlar; klinoptilolit, analim, şabazit, eriyonit, ferriyonit, hōlandit, lomantit, mordenit ve filipsittir (Melenova ve ark, 2003).

2.2.2. Klinoptilolit

Dünyada rezerv olarak en çok bulunan ve teknolojik özellikleri en iyi olanlardan biri klinoptilolit olup, suyu, gazları ve metal iyonlarını bünyesinde değişebilir durumda tutabilen, zararlı elementler içermeyen, 750°C sıcaklığa, asit ve bazlara (pH:1,5-11) dayanabilen doğal bir mineraldir (Melenova ve ark, 2003). Klinoptilolit, göller ve deniz sularında milyonlarca yıldır bulunan volkanik küllerin devitrikasyonu (cam bir materyalin kristal bir materyale dönüşmesi gibi) ile oluşan doğal bir zeolittir ve bütün zeolitler içinde en çok araştırılan ve en yararlı olarak kabul görmüş olanıdır (Melenova ve ark, 2003).

Doğal zeolit mineralleri içinde klinoptilolit türü lifsi olmayan mineral yapısı, zararlı elementler içermemesi ve kalitesinin yüksekliği nedeniyle organik hayvancılıkta yaygın olarak kullanılmaktadır (Çelebi ve ark, 2004).

Doğal zeolit klinoptilolit mineralinin organik hayvancılıkta yem katkı maddesi olarak kullanımına Türkiye’de Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı Organik Tarımın Esasları ve Uygulanmasına İlişkin Yönetmeliğin 10 Haziran 2005 tarihli 25841 sayılı kanunun Ek7/D.6 maddesine göre; Avrupa Birliğinde ise Avrupa Yem Komisyonu tarafından 16 Haziran 1999 yılı 70/524/EEC direktifi ile izin verilmiştir (Anonim, 2001).

2.2.2.1. Klinoptilolitın Genel Kullanım Alanları

Doğal zeolitlerin eşsiz absorpsiyon, katyon değişimi, dehidrasyon-rehidratasyon ve katalitik özelliklerinden yararlanılarak birçok uygulama geliştirilmiştir.

Doğal zeolitler nükleer atık ve döküntülerden sezyum ve stronsiyum’un, kentsel, endüstriyel ve tarımsal atıklar ile içme sularından amonyağın uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır. Bilimsel tarım ve bahçecilikte toprak ıslahında, hayvan barınaklarında altlıklara eklenerek, ortaya çıkan amonyak gazını absorbe ederek amonyağın hayvan sağlığı üzerindeki olumsuz etkisini giderirler. Yem katkısı olarak yemlere eklenerek; mikotoksinleri ve mikroorganizmaları etkisiz hale getirip antibiyotik kullanımını azaltılırlar. Yemdeki besleyici maddeleri absorbe ederek daha etkin bir yem tüketimi sağlar ve böylece canlı ağırlığı, yumurta ve süt verimini artırma, doğum felcinin şiddetini azaltma gibi etkinlikler gösterirler. Kedi kumlarında koku giderici, solar soğutucularda enerji eşanjörü ve diyaliz ünitelerinde amonyak filtresi gibi kullanım alanları bulmuştur. Uzay çalışmalarında, topraksız bitki üretiminde ve son olarak kesik ve yara iyileşmesinde kullanım alanı bulmuştur.

Gelecekte kullanım alanının daha da genişleyecek olduğunun düşünülmesinden dolayı doğal zeolitler günümüzde çok önemli mineral ürünler olarak kabul edilir (Parlat ve ark, 1999; Oğuz ve ark, 2000; Oğuz ve Kurtoglu, 2000; Polat ve ark, 2004; Deligiannis ve ark, 2005; Demirel, 2008). Tablo 3’de zeolitlerin bazı kullanım alanlarında yapılan çalışmaların sonuçları verilmiştir.

Tablo 3: Zeolitlerin çevresel çalışmaları (Laurino ve Palmieri, 2015)

Uygulama	Zeolit konsantrasyonları	Örnek	Sonuçlar
Klinoptilolit kurşun toksisitesi üzerine etkileri (100-500-1000 mg dm ⁻³ , mantarlarda)	Klinoptilolit %3	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Botrytis cinerea</i> ve <i>Fusarium culmorum</i>	<i>A.niger</i> ve <i>B.cinerea</i> ’nın 1000 mg dm ³ ’de büyüme inhibisyonunu %25 azaltılmıştır; Araştırılan tüm konsantrasyonlarda <i>F.culmorum</i> ’un büyüme inhibisyonunun hemen hemen tamamında bir azalma
FeZW’nin su detoksifikasyonunda etkileri	FeZW %5 zeolit, 3 saat süreyle	<i>Euglena gracilis</i>	TBTCl’nin hücre içi konsantrasyonlarının azaltılması (22.50 µg/g hücre FeZW yokluğu, 7.53 µg/g hücre FeZW varlığı)
Su deperasyonunda zeolit etkisi (ev tipi filtreler)	Sentetik zeolit 4A	Su iyodür, iyodat, sezyum, baryum (konsantrasyonlar 40-50 µg/l)	İyodür % 85, iyodat % 40, sezyum % 75-90 ve baryum >% 85’lik bir azalma; P <0.05
Organik gübrede Zeolitin, NH ₄ ⁺ ’ın (amonyum) uzaklaştırılmasına etkileri	-	Organik gübre	NH ₄ ⁺ toplam hacimde % 98 azalma
Organik gübrede Zeolitin, ağır metal uzaklaştırılmasına etkileri	%25 zeolit	Organik gübre	Zeolit %12 Co, %27 Cu, %14 Cr, %30 Fe, %40 Zn, %55 Pb ve %60 Ni emmiştir
Zeolitin kirlenmiş topraklardan cıvarın uzaklaştırılmasına etkileri	Zeolit %1, %2 ve %5	Kirli topraklarda yaşayan bitkiler	Cıva konsantrasyonları, sürgünlerde %86’ya, kirli topraklarda yaşayan bitkilerdeki köklerde %58.2’ye düşürülmüştür, kontrollere göre tedavi edilmemiştir.

2.2.2.2. Klinoptilolit Medikal Kullanım Alanları

Klinoptilolit bilinen biyolojik bir yönü olmadığı gibi yüksek derecede toksik olan; kurşun, kadmiyum, cıva ve nikel gibi ağır metalleri bağlama özelliğinin olduğu bilinmektedir (Mondale ve ark, 1995). Klinoptilolit üzerine yapılan tıbbi çalışmalarda Klinoptilolit antiviral, antibakteriyel, antitümöral ve antidiyarel olarak etkinliği araştırılmış ve bu alanlarda olumlu etkilerinin olduğu görülmüştür. Klinoptilolit farklı virüsler üzerindeki etki mekanizması spesifik değildir ve bu durum bilinen antiviral ilaçlardan daha farklıdır (Hunter, 1985). Klinoptilolit viral partiküllerin inaktivasyonunda, oral olarak toksik etkisi olmadan

kullanılabilmesi enterovirüs ve adenovirüsler gibi sindirim kanalını etkileyen virüsler açısından önemlidir. Klinoptilolit içeren doğal silikat materyallerin farklı biyolojik aktiviteler sergilediği görülmüştür. Böylece iyi bir aşı adjuvantı olarak ve ishalin sağaltımında başarıyla kullanılmıştır (Pavelic ve ark, 2001). Tablo 4’de yapılan bazı çalışmalarının sonuçları verilmiştir.

Tablo 4: Klinoptilolit deneysel bazı çalışmalarının sonuçları (Laurino ve Palmieri, 2015)

Uygulama	Zeolit konsantrasyonları	Örnek	Sonuçlar
Klinoptilolit diyet takviyesinin etkileri	28 gün boyunca 50 g/kg klinoptilolit	120 tavuk	Yumurtlamada; yumurta sayısı, kabuk kalınlığı, gıdanın kullanımı ve dışkıların nem oranı üzerine önemli etkileri (P <0.01)
Klinoptilolit ve sentetik zeolit antianemik etkileri	31 gün süreyle %3 klinoptilolit ve sentetik zeolit (NaZ)	Sütten kesilmiş Landrace X Yorkshire domuzları	Cd düzeylerinin azaltılması (tedavi sonrası 11.4 ppm vs tedavi öncesi 16.6 ppm); Karaciğer Fe seviyeleri değişiklikleri görülmemiştir; Zn konsantrasyonları artmıştır (P <0.001)
Radyoaktif Cs-137 biyoyararlanımı üzerindeki etkiler	50 g/gün demir-zeolit (ZEOFe)	Koyun	Cs-137 denge konsantrasyonunu 15 ile 50 kat düşürmüştür
Diyete klinoptilolit takviyesinin etkileri	Klinoptilolit %1.25 ve %2.5	52 Holstein inek	İncelenen konsantrasyonlar, ineklerde Cu, Zn ve Fe'nin serum konsantrasyonlarını negatif olarak etkilememiştir
Aflatoksin konsantrasyonlarının azaltılmasında klinoptilolit etkileri	Klinoptilolit 4 hafta süreyle 50 g/kg	40 yeni doğan civciv	Klinoptilolit ile tedavi edilen grupta, kontrol grubuna göre, gıda tüketiminde azalma (%6); Klinoptilolit ile tedavi edilen grupta (%8) kontrol grubuna göre daha düşük vücut ağırlığı artışı (%27)
Zeolitteki Si'un, sodyum alüminyum silikat, magnezyum alüminyum silikat ve alüminyum hidroksitin biyoyararlanımını arttırması	Zeolit A 30 mg/kg, sodyum alümino silikat 16 mg/kg, magnezyum alümino silikat 20 mg/kg ve alüminyum hidroksit 675 mg/kg	12 Beagle köpek	Zeolit Plazmatik Si'nin önemli derecede arttığı (9.5 + 4.5 mg hr / L + SD; P = 0.041)
Klinoptilolit'in klinik ketozise etkisi	Klinoptilolit,%1.25 ve %2.5; 4 hafta boyunca	52 Holstein inek	Her iki klinoptilolit konsantrasyonunda ketozun anlamlı azalması (P <0.01)

Tablo 4: Klinoptilolit'in deneysel bazı çalışmalarının sonuçları (devamı)

Klinoptilolit'in dichlorvos zehirlenmesi üzerine etkileri	Klinoptilolit 1 g/kg	Ratlar	Farklı dokulardaki kolinesteraz enzim inhibisyonunda belirgin azalma (P <0.01)
Tf-zeolit'in VX zehirlenmesi üzerine etkileri	Tf-zeolit 1 g/kg (%61 klinoptilolit)	Ratlar	Farklı dokulardaki kolinesteraz enzim inhibisyonunda belirgin azalma (P <0.001)
Klinoptilolit'in kanserojen özelliklerinin değerlendirilmesi	Klinoptilolit 0, 30, 60 mg	100 Rat	Araştırılan organ ve dokulardaki tümör insidansında belirgin bir artış bulunmaması
Melanogenezin inhibisyonu	Zeolit 4A 0.16-100 g/ml	B16F10 melanoma hücreleri	Melanogenezin azaltılması (P <0.001)
Klinoptilolit'in anti-ışhal etkileri ve hematokrit düzeyleri, plazmatik fibrinojen ve toplam proteinde değişiklik	Klinoptilolit, %1,5 ve %3, 6 hafta boyunca	30 yenidoğan kuzu	İşhalin şiddetinin azaltılması indeksi (P <0.05)
Klinoptilolit ile diyet takviyesinin etkileri	45 gün boyunca %0.5 ve %1 klinoptilolit	200 tavuk	Mikrobiyal bağırsak enfeksiyonunun azaltılması (P<0.05); Büyüme hızının artması (P<0.05); Vücut ağırlığındaki artış (P<0.05); N-3 çok fonksiyonlu yağ asitleri seviyesinin yükselmesi (P<0.05)
Klinoptilolit'in aflatoksikoz üzerine etkileri	Klinoptilolit 15 g/kg, 42 gün boyunca	576 broiler	Etkilenen tavukların sayısı ve organ dejenerasyonu anlamlı olarak daha aşağıda idi (P<0.05).
Klinoptilolit'in sağlık durumunu iyileştirmede ve mikotoksin zehirlenmesi önlemedeki etkileri	Klinoptilolit 2 gün ve 14 gün boyunca %2	30 buzağı	Serum plazma fibrinojen, toplam albümin, beta ve gamma globulin 14 gün sonra anlamlı olarak yükseldi (P<0.05)
Klinoptilolit'in tümör hücreleri inhibisyonu üzerine etkileri	Klinoptilolit 24 saat boyunca %85	Fare fibrosarkom hücreleri, insan pankreası karsinom hücreleri	Canlı hücrelerin sayısı, DNA sentezi, EGF-R, pKB / Akt ve NFkB aktivitesi anlamlı olarak azalmıştır (P <0.01)

Klinoptilolit, antibakteriyal, antidiyaretik, antiviral ve antitümöral amaçla kullanımının yanında medikal olarak biyosensör, diyabetik hastalar (Rosabal ve ark, 1997), kontrast madde (Rubin ve ark, 1997), radyasyondan korunma (Valcke ve ark, 1997), ağır metallerin uzaklaştırılması (Mojzis ve ark, 1994), hemodiyaliz ve anestezi eksternal olarak yara sağaltımı (Mumpton, 1999) ve hücre kültürlerinde (Capiaumont ve ark, 1995) kullanılmıştır.

2.2.2.3. Klinoptilolitin Kriptosporidiozis Sağaltım ve Korunmasında Kullanılabilirliği

Günümüzde *C. parvum*'un önlenmesi ve tedavisi için kesin bir protokol bulunmamaktadır. Şimdiye kadar etiyolojik sağaltım konusunda denenilen pek çok ilaç tam bir parazitolojik iyileşme sağlamamıştır. Semptomatik uygulamalar klinik bulguların hafifletilmesi veya ortadan kaldırılmasına yöneliktir.

Cryptosporidium ookistlerin sporlanması ve yaşaması için uygun nem ve ısıнын sağlanması gerekmektedir. Mannitol hipotezi bu kapsamda en önemli mekanizma olarak gösterilmektedir (Schmatz ve ark, 1989; Nichols, 1992). *Cryptosporidium* ookistleri yaşam siklusu boyunca şekillerini, ookistin içindeki osmotik basınca bağlı hidrostatik basıncın dengelenmesi ile korumaktadır (Nichols, 1992). Ookistin vakuolünde depolanmış mannitol konsantrasyonları sayesinde ookist iç basınçlarının korunduğu ve buna bağlı olarak uzun süre ookistlerin şekillerini ve tenasitelerini koruyabildiği bildirilmiştir (Schmatz ve ark, 1989).

Cryptosporidium'un ookistinin duvarı bir ozmotik bariyer gibi görev yapmakta ve ookistlerin içindeki hidrostatik basınçtaki değişikliklerinin ookistlerin yıkımlanmasına karşı aşırı duyarlı hale getireceği ileri sürülmektedir (Nichols, 1992). Current ve Reese (1986), *Cryptosporidium* türlerinin bütün yaşam dönemlerinde elektron mikrograf yöntemi ve Nomarski mikroskopunu kullanarak parazitin iç ve dış membranları arasında parazitoforus vakuollerini, bu vakuollerin şekil değişikliklerini göstermiş ve bunların mannitol depoları olduğunu bildirmiştir. Ookistin iç hidrostatik basıncını düzenleyen temel madde şeker alkolü olan mannitoldür. Schmatz ve ark (1989), *C. parvum*'da osmotik basıncı sağlayan ana maddenin parazit vakuollerinde depolanan mannitol tarafından sağlandığını ve parazitin mannitol siklusunda mannitol 1 fosfat dehidrogenaz ve mannitol 1 fosfataz isimli iki enzime sahip olduğunu göstermiştir. Parazitin içine transport edilen şekerlerden bu iki enzim aracılığıyla mannitol sentezlendiği ve böylece parazit içindeki hidrostatik basıncın sağlandığı ileri sürülmektedir. *C. parvum* tarafından mannitolün sentezlenemediği durumlarda ookistlerin gelişmesinin engellendiği bildirilmektedir (Tzipori ve ark, 1980a; Nichols, 1992).

Mannitolün sentezlendiği şekerlerin *C. parvum* ookistlerinin dış membranlarından parazitinin içine geçişinde iyonların önemli rol oynadığı bildirilmektedir (Nichols, 1992). Klinoptilolit sindirim sisteminde çözünürlüğü düşük, emilmeyen, birbirlerine kanallarla bağlanan, düzgün gözeneklere sahip kristal yapıda bileşik olup Na, K, Ca, Mg gibi iyonlarını içermektedir. Yapısında büyük farklılaşma olmaksızın katyon değişim özelliği, su kaybetme ve kazanma özelliği ile karakterizedir. Klinoptilolit apikomlexia grubu parazitlerde etki mekanizması henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak yukarıda bahsedilen mekanizmalar kapsamında klinoptilolit *C. parvum* etkeninin hidrostatik basıncını etkileyerek sporlanmasını ve enfektif olmasını sağlayan nem, beslenme gibi çevre faktörlerini değiştirebileceği düşünülmektedir. Nitekim klinoptilolit koyunlarda apikopleksia ailesinden olan koksidiyoziste *in vitro* ookistlerin morfolojilerini etkilediği, *in vivo* ise ookistlerin atılımını ve çevre kontaminasyonunu azalttığı bildirilmektedir (Alcala-Canto ve ark, 2011). Klinoptilolit fizikokimyasal (iyon değiştirme, dehidrasyon ve rehidratasyon) özellikleri dikkate alındığında ve yukarıdaki mekanizmalar düşünüldüğünde, *C. parvum* ookistinin fizyolojik yapısını ve biyokimyasal reaksiyonlarını etkileyerek, enfeksiyonun tedavisi ve önlenmesinde etkili olabileceği düşünülmektedir. *C. parvum*'un yenidoğan ve immun yetmezliği olan çiftlik hayvanları açısından önemlilik göstermesi klinoptilolit önemini daha da artırmaktadır. Elde edilen araştırma sonuçları klinoptilolit içeren zeolitlerin en önemli komponentlerinden biri olan alüminyumsilikatların bağışıklık sisteminin regüle edilmesinde önemli rol oynadığını göstermektedir. Ueki ve ark (1994) ile Aikoh ve ark (1998); silika, silikatlar ve alüminyumsilikat türevlerinin süperantijenlere benzer olarak nonspesifik immun stimülasyonda rol oynadığını belirtmişlerdir. Süperantijenler immunsitimulan ve T hücre popülasyonunu uyararak hastalık tablosuna neden olan bakteriyel, viral ve paraziter orijinli proteinlerin bulunduğu antijenik sınıfta yer almaktadır. Süperantijenler T hücre reseptörleri ile majör histokompatibilite kompleks sınıf II molekülleri arasındaki etkileşim sonrası meydana gelmektedir (Ueki ve ark, 1994). Klinoptilolit içerdği fibrojenik silikat partikülleri majör histokompatibilite kompleks sınıf II moleküllerini aktifleştirir (Allison ve ark, 1966; Schimmelpfeng ve Seidel, 1991; Holian ve ark, 1997). Silikat partiküllerinin lenfositler dışındaki diğer hücrelerle etkileşimi tanımlanıp, literatürdeki yerini almıştır (Aikoh ve ark, 1998). Mineral partiküllerin genlere ekspresyonunda değişikliğe neden olarak gen transaktivasyonunu sağladığı tespit edilmiştir (Tsuda ve ark, 1997). Silikat partiküllerine maruz kalınması sonrası aktive edilmiş mitojen kaynaklı protein kinazların, protein kinaz C ve stres kaynaklı aktive protein kinazların uyarılması söz konusudur (Lim ve ark, 1997). Önemli transkripsiyon faktörleri olan aktivatör protein 1 ve nükleer faktör KB de eş zamanlı olarak

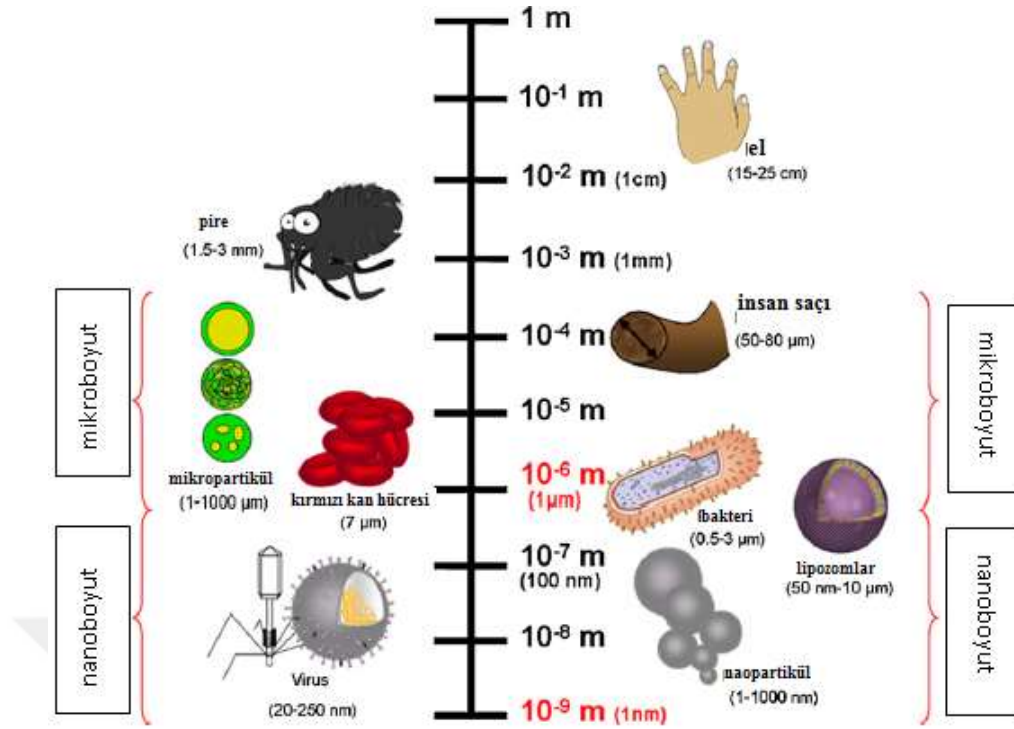
aktive edilir, böylelikle proinflatuvar yanıtta sorumlu interlöykin 1 α , interlöykin 6 ve tümör nekrozis faktör α açığa çıkmaktadır (Simeonova ve ark, 1997). Oluşan modifikasyondan reseptör aktivasyon kinetiği veya integrin aktivasyonu sorumlu tutulmaktadır. Alternatif olarak fagosite edilen partiküller reaktif oksijen türlerinin üretimini uyarmaktadır (Martin ve ark, 1997). Günümüzde yaygın bilgiler doğrultusunda, birçok hücrede gen ekspresyonunun, redoks regülasyonuna neden olduğu bilinmektedir. Bu mekanizmalar göz önüne alınarak doğal Klinoptilolitin *in vivo* yolla toksisite, antibakteriyel, antiviral, antiparaziter ve antikanser amaçlı kullanımı sağlanmıştır.

Gerek ookistin gelişmesi ve yaşaması için gerekli çevre şartlarını etkileyebilme özelliği gerekse yukarıda olası mekanizmalarla açıklanan immun sistemin düzenlenmesinde ve immunstimulan olarak kullanılabilmesi klinoptilolitin *C. parvum* enfeksiyonunun önlenmesi ve tedavisinde önemli rol oynayabileceği düşünülmektedir.

2.3. Veteriner Hekimlikte Biyoteknolojinin Kullanımı

Nano ve biyoteknoloji kavramlarını içinde barındıran nanobiyoteknoloji milimetrenin milyonda birine karşılık gelen bir büyüklükte biyoloji ve biyokimya temelli yöntemlerin uygulamalarını araştıran, ortaya koyan, onları ürüne dönüştüren, teknoloji temelli çalışma alanıdır (Şekil 2). Nanoteknoloji ile biyoteknolojinin birlikte gelişmesi ve moleküler biyoloji alanındaki çok hızlı bilgi birikiminin, bu iki gelişen alanı beslemesiyle; nanobiyoteknoloji araştırma alanı ortaya çıkmıştır. Bu sayede, bugüne kadar mümkün olmayan tanı ve tedavi artık insanda kullanılmaya başlanmıştır (Erat ve ark, 2010).

Birçok hastalığa (kanser, enfeksiyon ve allerji vb.) yönelik tedaviler, nanobiyoteknoloji sayesinde geliştirilmektedir. Araştırmalar, nanoimplantlardan akıllı ilaç salım sistemlerine, nanobiyomakinalardan, biyoinformatik vegenomik uygulamalar için DNA çiplerinin nanofabrikasyonuna ve kök hücreye dayanan organ mühendisliğine kadar uzanmaktadır.



Şekil 2: Nanoboyut ve mikroboyut (Irache ve ark, 2011)

Canlıların yapıtaşları hücreler nanometre ölçekteki moleküllerden oluşur. Nanoteknolojinin doğadaki işlevsel karşılığı olarak hücreyi göstermek mümkün, dolayısı ile bu konudaki anlayışımızı ilerlemek için canlıları ayrıntılı incelememiz kaçınılmazdır. Bu yapılara nanoölçekte bakıldığında fizik, kimya, biyoloji ile beraber (bilgisayar benzetişimlerinin) “simülasyon, modelleme” de uygulandığı disiplinler arası bir araştırma sahası ile karşılaşılır. Böylece disiplinler arası iş birliği nanobiyoteknoloji gibi sahalarda önemli gelişmeler yapılmasını sağlayacaktır. Veteriner hekimlikte bu alanların başında gelmektedir.

Hayvan sağlığı; hem çiftlik hayvanlarında hem de pet hayvanları dünyasında gün geçtikçe önemi artan bir konu haline gelmektedir. Yapılan birçok derleme veteriner hekimliğinde, veteriner hekimliği uygulama yollarında nanoteknolojinin büyük bir potansiyele sahip olduğunu göstermektedir (Feneque, 2003). Gıda güvenliği ve gıda kontrol noktalarında aynı zamanda artan pet hayvanları popülasyonlarında kontrol mekanizmalarının ve veteriner hizmetlerinin gün geçtikçe artan maliyetleri yeni çözümlerin üretilmesine neden olmaktadır. Tam da bu noktada nanoteknolojinin sahip olduğu potansiyeller çerçevesinde medikal dünyada ve veteriner hekimliğinde sunmuş olduğu fırsatlar önemli çözümler sağlamaktadır. Nanoteknolojinin rutinde uygulanabilmesinden

önce birçok multidisipliner çalışmanın gerçekleşmesi gerekmektedir (Kumar ve ark, 2010).

Hayatın yapıtaşları proteinler, nükleik asitler, lipitler, karbonhidratlar, ebatları ile kıvrımları ile dizilişleri ile belirli özellikleri olan nanoölçekteki malzemelere örnek sayılabilir. Günümüzde gen çalışmalarının zorluğunun nanoölçekteki aygıtlarla giderilebileceği görüşü yaygındır. Bu sahadaki gelişmelerin hem teşhiste hem de tedavide yeni yöntemlerin geliştirilmesini sağlayacağı düşünülmektedir.

Nanoteknoloji zirai ve çiftlik hayvanlarında devrim niteliğinde bir potansiyele sahiptir. Mikro akışkanlar, nanomateriyaller ve bioanalitik nanosensörler gibi nanoteknolojik araçlar hayvan hastalıklarının tedavi ve korunmasında, hayvansal üreme, hayvansal üretim ve hayvan sağlığında karşılaşılan birçok problemin çözülmesinde büyük bir potansiyele sahiptir. Gelecek yıllarda nanoteknoloji sunmuş olduğu olanaklar dâhilinde hayvan sağlığında ve çiftlik hayvanlarının üretiminde yeniliklere öncülük edecektir (Patel ve ark, 2006).

Nanopartiküllerin birçok uygulamaları hayvan sağlığında kullanılmaktadır. Nanoilaç formülasyonları; sahip oldukları minimum ölçüleri ile kan-beyin bariyerini geçebildikleri için beyin tümörlerinin tedavisinde ve intracelluler organizmalara karşı kullanılmaktadır. Nanomateriyallerin medikal uygulamalarının geliştirilmesi laboratuvar hayvanları üzerinde gerçekleştirilmekte ve onaylanmaktadır. Bu sebeple evcil hayvanlarda ekonomik öneme sahip birçok hastalığa karşı kullanılma potansiyeline sahiptir (Manuja ve ark, 2012). Veteriner hekimliğinde nanoteknolojinin geleceği;

- a) İlaç dağılım ve taşıma sistemleri,
- b) Hastalıkların tanı ve tedavisi,
- c) Hayvan beslenmesi alanlarında umut vaat etmektedir (Kumar, 2010).

2.3.1. İlaç Dağılım ve Taşıma Sistemleri

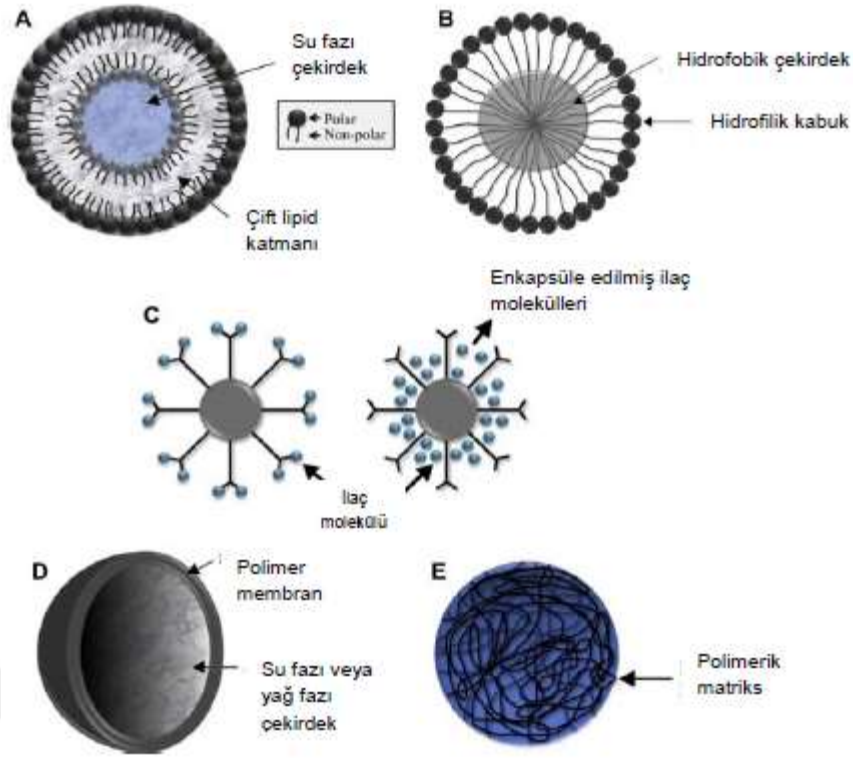
Nanopartiküller boyutları 10-1000 nm arasında olan partikül dispersiyonları veya katı partiküller olarak tanımlanabilir. İlaç, nanopartikül matriksi içinde çözündürülebilir, hapsedilebilir, adsorbe ettirilebilir, eklenebilir veya enkapsüle edilebilir. Son yıllarda, biyo parçalanabilen polimerik nanopartiküller, özellikle uzun süre dolaşımda kalabilen nanopartiküller olarak bilinen (*long circulating*), polietilen glikol gibi hidrofilik polimerlerle kaplı olanlar uzun süre dolaşımda kalabilme yetenekleri sayesinde özel bir organa hedeflenebilmeleri, gen terapisinde DNA taşıyıcısı olabilmeleri, proteinleri, peptid ve genleri iletme yetenekleri sayesinde potansiyel ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılmaktadır.

Nanopartiküllerin ilaç taşıyıcı sistemler olarak tasarlanmasındaki temel hedef partikül boyutu, yüzey özellikleri ve aktif farmasötik ajanların salımı kontrol edilerek ilacın hedeflenen bölgeye özel, terapötik olarak optimum dozda ve hızda etki etmesini sağlamaktır. İlaçları degradasyondan koruması, hedeflendirilebilmesi, toksisite veya yan etkileri azaltması gibi üstün avantajları ile lipozomlar potansiyel taşıyıcılar olarak kullanılmalarına rağmen düşük enkapsülasyon etkinliği, suda çözünen ilacın kan komponentlerinin varlığında ani salımı ve düşük saklama stabilitesi gibi problemler nedeniyle uygulamaları sınırlıdır. Buna karşılık, polimerik nanopartiküller lipozomlara kıyasla bazı spesifik avantajlara sahiptir.

Örneğin, ilaçların/proteinlerin stabilitesini arttırmaya yardım ederler ve kullanışlı kontrollü salım özelliklerine sahiptirler.

2.3.1.1. Nanopartiküller

Nanopartiküller çeşitli kompozisyonları, yapıları ve yüzey özellikleri nedeni ile ilaç taşınmasında ilgi çekmektedirler. Nanopartikül kompozisyonlarının ve yapılarının bu çeşitliliği taşıyıcıların spesifik uygulamalar ve hedefler için ayarlanabilir olmasına izin verir. Hedeflendirilmiş ilaç taşıyıcı sistemler içerisinde en sık kullanılanlar: lipozomlar, miseller, dendrimerler, nanoküreler ve nanokapsüllerdir (nanoteknolojinedir.com/upload/.../201303190540Nanoteknoloj-ve-uygulamalari.pdf). (Şekil 3).



Şekil 3: Nanopartiküller: (A) lipozom, (B) misel, (C) fonksiyonelleştirilmiş (solda) ve ilaç enkapsüle edilmiş (sağda) dendrimerler, (D) nanoküre ve (E) nanokapsül. (Steichen ve ark, 2012)

2.3.1.1.1. Polimerik Nanopartiküller

Polimerik nanopartiküller; doğal ya da sentetik yapıdaki polimerlerle hazırlanan, boyutları 10-1000 nm arasında değişen, hazırlama yöntemine göre nanoküre veya nanokapsül (Şekil 2) olarak adlandırılan ve etkin maddenin partikül içinde çözündürüldüğü, hapsedildiği ve/veya yüzeye adsorbe edildiği ya da bağlandığı matris sistemlerdir. Günümüzde en yaygın olarak araştırılan polilaktik asit, poliglikolik asit ya da bunların kopolimeri olan poli D,L-laktik-ko-glikolik asit gibi biyoparçalanabilir ve biyoyumlu polimerlerden üretilen nanopartiküler ilaç taşıyıcı sistemleridir.

Hastalık etkenine karşı oluşturulacak olan cevabın elde edilmesinde temel bariyer terapötik moleküllerin etkin dağılımının oluşturulmasındaki başarı oranından kaynaklanmaktadır. Birçok ilaç tedavide başarılı olmasına karşın birçoğu toksisite ve hücre içiresine aktif bir şekilde penetre olamamak gibi dezavantajlara sahiptir. İlgilenilen ilaçlar;

hedefe ulaşmada kesinlik, ilaç ayrışımının minimize edilmesi, ilacın yan etkilerinden korunma ve ihtiyaç duyulan bölgede ilacın ulaşılabilirliğinin artırılmasında başarıya ulaşmak için nanopartikül kalıplarında çözündürülebilmekte, tutundurulabilmekte, adsorbe edilebilmekte, penetrasyonu sağlanmakta ya da kapsülize edilebilmektedir. Nanotaşıyıcı olarak kullanılabilen bazı materyaller Tablo 5’ de sıralanmıştır. Fonksiyonel ilaç taşıyıcılar; hastalık etkenini görüntüleyebilen, molekülleri hedef alabilen ve/veya ilaca bağlanacak şekilde kontrol edilebilen nanoyapılardır.

Tablo 5: İlaç dağılımında nanotaşıyıcı olarak kullanılabilen protein, yağ ve sentetik polimer polisakkaritler (Manuja ve ark, 2012)

Protein	Polisakkaritler	Sentetik Polimerleri	Yağlar
Jelatin	Alginate	PECL ve PLA	Lipozom
Albumin	Dextran	PLGA	Lipid nanokapsüller
Lektin	Chitosan	Polystyrene	Solid lipid nanopartiküller
Legumin	Agarose		
Vicilin	Pullulan		

Nanomateryallerin kapsülizasyonu, difüzyon ve ayrışım olgularını geliştirebilmekte ve kapsülün ayrışımı esnasında ilacın difüzyonunun ve porlara ilacın salınımının zamansal olarak kontrolünü sağlamaktadır. Bu duruma ek olarak kapsülizasyon işlemi immun sistemin ilaç etkenlerine karşı vereceği cevaptan kurtulmada adeta bir kamuflaj görevi görmektedir ya da kimyasal olaylar ve hastalık etkenlerinin bazı moleküllere karşı vereceği katalizör reaksiyonlarından sıyrılmada yardımcı olmaktadır. Bu sistemler ilaçların absorpsiyon ve dağılım oranlarında, metabolizmada, ilaçların ya da diğer maddelerin organizmadaki salınımında etkiye sahiptir. Kapsülizasyon materyalleri ilacın hedef reseptöre bağlanmasına müsaade etmekte ve reseptörün aktivasyonunu etkilemektedir. Yapılan bir çalışmada, domuzlarda domuz somatotropinin kontrollü salınımını sağlamak amacı ile poli D,L-laktik-ko-glikolik asiti nanokapsül formülizasyonunda kullanmıştır. Kapsülize edilmiş hücrelerin organizmada kullanımının desteklenmesi, enzim ya da hormonal eksikliklerden kaynaklanan hastalıkların tedavisinde değerli olduğu düşünülmektedir. Nanoporlar, minik hücreleri kapsayan boşluklarda büyük moleküllerin geçişini engelleyip küçük moleküllerin geçişine

müsaade eden kristalin silikon külahları ile birlikte geliştirilmiştir. Fare pankreas hücreleri bu boşluklarda kapsülize edilip haftalarca ulaşılabilir bir şekilde kalmış, porlara doğru insülin salgılamış ve aynı zamanda immun sistemden korunmuş bir şekilde muhafaza edilmiştir (Leoni ve Desai, 2004). Materyallerin nanoporlara doğru akışı, iyon transportunun kesin kontrolünün sağlanmasında harici bir düzenlemeyi sağlayabilmektedir.

Akıllı ilaç dağılım sistemleri enfeksiyonların, beslenme noksanlıklarının ya da diğer sağlık problemlerinin semptomlar baş göstermeden tespitini ve tedavisinin gerçekleştirilebileceğini düşündürmektedir. Moleküler adres kodlanmış etiketler ilaç taşıyıcı nanotaşıyıcılara penetre edilerek ilaçların hedefte dağılmasına olanak sağlamaktadır. Bu akıllı ilaç dağılım sistemi aynı zamanda kimyasal tespiti ve kendi kendine kontrollü salınım yapma kapasitesine sahip formülasyonları ile ihtiyaç duyulan besin ya da ilacın dağılımına imkân vermektedir. Akıllı dağılım sistemleri farmasötiklerin, nutrasötiklerin, besinlerin, gıda takviyelerinin, bioaktif bileşiklerin, prebiyotiklerin, ilaçların ve aşıların dağılımlarının tespitinde olanak sağlamaktadır (Scott, 2007). Nanosheller, superparamagnetik nanopartiküller ve kuantum noktaları hastalık hücrelerinin yerinin tespit edilmesi, bu hücrelere bağlanıp yok edilmesi üzerine oluşturulmuş yöntemlerdir (Scott, 2005). Nükleik asit mühendisliği bazlı problemler ve barkodlama yöntemleri kısmi hastalıklardan korunma ve tedavide yeni yöntemler olarak geliştirilmektedir.

2.3.2.Tanı ve Tedavi

Hastalıkların kontrol stratejilerine zamanında yapılan tanı anahtar rol oynamaktadır. Geleneksel tanı yöntemlerinde sonuca ulaşmak saatler ya da günler alabilmektedir bu testler yoğun iş gücü gerektirmekte ve bazen patojenlerin amplifikasyonunu içerebilmektedir. Bu güçlükler spesifik antikor, peptid ve nükleik asitlerle bir araya getirilip üretilen nanopartiküllerin geliştirilmesi ile beraber taşınabilir testleri içerebilecek şekilde yüksek derecede duyarlı, spesifik, hızlı ve dirençli tanımlar ile ortadan kaldırılabilir. Nanoteknoloji hastalık semptomları görülmeye başlamadan önce çok erken etkenin tespitine olanak sağlayabilmesi yönünden potansiyelini elinde tutmaktadır.

Nanoteknoloji bioçiplerin optimizasyonu ve gelişimi ile beraber hastalıkların tanısı ve genetik yatkınlıkların tespitini mümkün kılmaktadır. Bu tanı çipleri eş zamanlı olarak binlerce genin analizini sağlayabilmektedir. Bioçipler bir hastalığa spesifik olan moleküllerin identifikasyonuna olanak sağlayan vücut sekret ve ekskretlerinde, kanda, plazmada, serumda,

semende ve diğ er v c t sıvılarında hızlı manipulasyonlar ve analizler gerçekleştirebilmektedir. Yüksek yoğ nluktaki nanodiziler dip pen nanlitografler kullanılarak oluşturulmuştur (Lee ve ark, 2003). DNA ve protein mikrodizileri hastalıkların tanısındaki biyomarkerlerin identifikasyonunda, gen ekspresyon çalışmalarında ve ilaç etkinlik testlerinde kullanılmaktadır. Biobarkodlar proteinlerin tespiti amacı ile kullanılmaktadır ve prostat spesifik antijenlerin (PSA) tespitinde kullanılmaktadır (Nam ve ark, 2003). PSA rutinde insanlarda prostat kanserinin tespitinde kullanılmaktadır. Oligonükleotidler üzerinde polimerize zincir reaksiyonunda kullanılarak 3 attometre konsantrasyonda PSA'lar tespit edilebilmektedir. Bu durum geleneksel tanı yöntemleri ile karşılaştırıldığında milyonlarca kez farklı oranlarda daha duyarlı olduğu kabul edilmektedir (Nam ve ark, 2003). Nanolitre ölçülerindeki örneklerde DNA'nın tespiti bütünleştirilmiş akışkan kanalları, ısıtıcılar, sıcaklık sensörleri ve florasan dedektörlerini içeren araçlar ile mümkündür. Lab-on-a-chip bütünleştirilmiş örneklerin tutulumunu ve hazırlanmasını, karıştırılmasını, ayrışımını, hücrelerin parçalanmasını ve tespitini sağlamakla avantajlarını gözler önüne sermektedir.

Nanoteknoloji son zamanlarda geliştirilen non-invaziv görüntüleme tekniklerine yaptėı katkılar dolayısı ile kullanışlı bulunmuştur. Perflorokarbon moleküllerinin nanopartikülleri ultrasonografi ve manyetik rezonans görüntüleme tekniklerinde fibrin ve trombusların görüntülenmesinde kullanılmaktadır (Tran ve ark, 2007). Paramanyetik demir oksid nanopartiküllerinin manyetik rezonans kontrast ajanı olarak kullanılması, spesifik doku ve organların daha etkin bir şekilde görüntülenmesinde faydalı olduğu tespit edilmiştir (Peng ve ark, 2008). Tanı yöntemlerinin görüntülenmesinde, 60 adet saf atomun bileşiminden meydana gelen fullerenler (buckyballs) gelecek vaat etmektedir. Radioaktif ajan taşıyan buckyball materyalleri kan dolaşım sisteminde seyahet edebilmenin yanında organizmadan atılabilmesi radyoaktif toksisite ihtimalini azaltmaktadır (Feneque, 2003). Sentetik olan Dendrimerler, 3-dimensionallar makromoleküller tek şekil elektronik, optikal, optoelektronik, manyetik, kimyasal ve biyolojik ekipmanlar içermektedir. Dendrimerler aynı zamanda tanı yöntemlerinde görüntüleme sistemlerinde kontrast ajan olarak kullanılmaktadır.

Kuantum nokta nanokristalleri beyaz ışık altında florasan ışığı yayma özellikleri ile beraber uzun ömürlü duyarlı proplara uyarlanabilen biyomoleküllerle beraber kullanılabilmesinin düşünülmesi heyecan uyandırmaktadır. Etiketli  ift biyomoleküllerin sahip oldukları özelliklerinden dolayı bilim adamları, karmaşık hücresel değişimlerin ve hastalık etkenlerinden kaynaklanan olayların görüntülenebileceği düşünülmektedir. Kuantum noktaları kanda protein biyomarkerlerinin varlığında ve farklı virüs etkenlerinin aynı anda görüntülenmesinde kolay ve ucuz bir yöntem olarak belirtilmektedir (Ernest ve Shetty, 2005).

Nano tabanlı tanı yöntemlerine yapılan diğer bir yaklaşım süperparamagnetik nanopartiküllerin dolaşımdaki dağılımı ve hastalık etkenindeki hedef hücre reseptörlerine bağlanabilmesine bağlıdır. Bu nanopartiküller demir oksit materyallerinden oluşmakta ve manyetik bir alanda hastalık etkenlerine bağlanabilme kabiliyetini yükseltmektedir (Scott, 2007). Aynı zamanda nanosheller tam kandan yapılacak olan immünojenik testler yönünden tanı amacı ile kullanılabilir. Bu oluşumlar dielektrik (tipik olarak altın sülfür ya da silika) çekirdekler ve metal (altın) kabuklardan oluşan konsantre nanopartiküler kürelerdir. Bu partiküller, tek örnek altın kolloidlerinin biyobağdaşılabilirlik özellikleri ile birlikte ısı optikal aktivitelerinden dolayı nanopartiküller arasında özel bir yere sahiptir. Altın nanosheller antikora konjuge olabilmekte ve morfolojik ölçüleri ayarlanabilmektedir. Tüm kan örneklerine tutunabilen, kızılötesi dalgalar yaymaktadırlar. Bu metot plazma ve tam kanda, mililitrede nanomiktarda bulunabilen immunglobulin miktarının tespitini olanak sağlamaktadır (Freitas, 2005).

Nanoölçülerdeki çok amaçlı sensörler fizyolojik parametrelerden toksik bileşenlere kadar neredeyse her parametreyi tespit edebilmek amacı ile geliştirilmektedir. Karbon nanokanalları glukoz, etanol, hidrojen peroksit, immunglobulinler ve elektrokimyasal DNA hibridizasyon biyosensörü olarak keşfedilmiştir (Ernest ve Shetty, 2005). PSA gibi protein analitlerinin tespiti amacı ile manyetik mikropartikül probalar hedef protein bağlayıcı antikora ve tek tür DNA sekansları ile kaplanıp yüksek derecede duyarlılık sağlanmıştır. Şap hastalığında virüsün tanısının gerçekleştirilmesi amacı ile hedef molekülün varlığında likid kristallerin hareketine duyarlı geliştirilmiş nano ölçekte hızlı bir test geliştirilmiştir. Tespit edilmek istenilen alana bağlanabilen likid kristallerin hareketleri ile test gerçekleştirilmektedir (Israel ve ark, 2010).

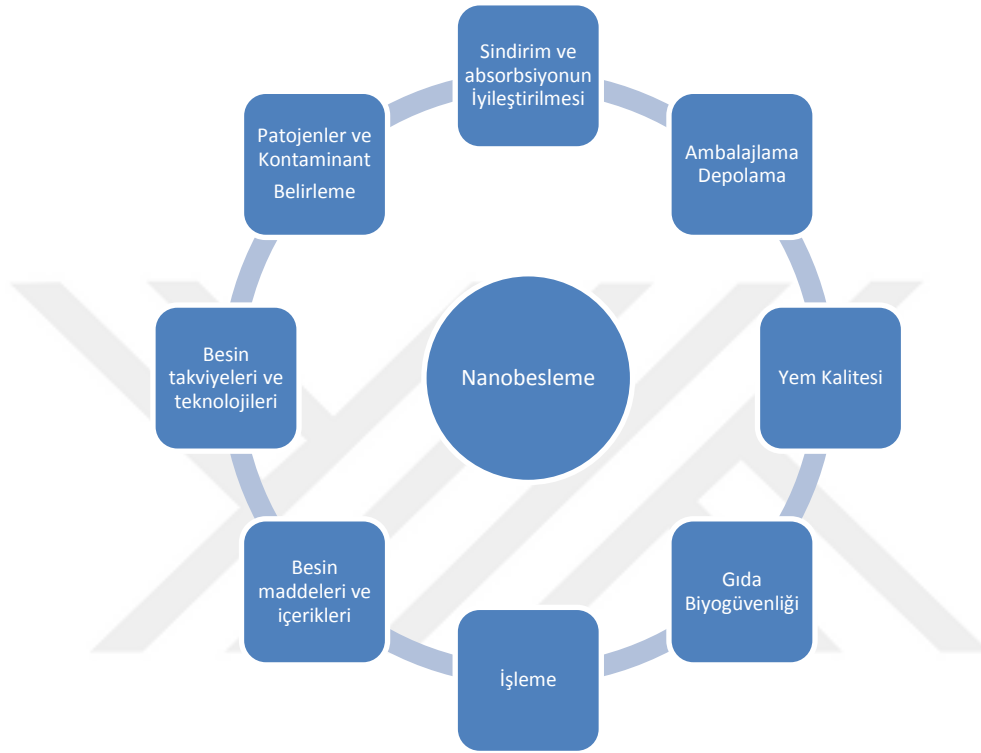
Akıllı ilaçlar, enfeksiyonun varlığında antibiyotiklerin salınımı gibi spesifik durumlarda medikal olarak aktif hale gelebilecek şekilde tasarlanmışlardır (Suzuki ve ark, 1998). Genel olarak yaygın kullanılan gentamisin molekülleri peptid bağlayıcılar kullanılarak hidrojel ile kaplanıp sadece *Pseudomonas aeruginosa* tarafından parçalanmakta ve bu organizma olmadığında salınımı gerçekleşmemektedir (Suzuki ve ark, 1998). Bakteri gerginliğine bağlı olarak aynı kalıplardan farklı spektrumlardaki antibiyotiklerin salınımı proteaz spesifik olan bazı bakteriler belirteç olarak kullanılabilir. Benzer şekilde *Staphylococcus aureus* ile enfekte yaralarda trombin aktivitesi ile tetiklenen yüksek spesifikite, uyarıcı cevaplı, kontrollü ilaç salınımı ile gerçekleştiren alternatif antibiyotik salınımının gerçekleştirildiği bir sistem başarılı bir şekilde test edilmiştir (Tanihara ve ark, 1999). Diğer uyarıcı cevaplı hidrojel sistemleri son zamanlarda çalışılmaya devam etmektedir.

Hidrojel kompozit membranlı insülin ve glikoz oksidaz enzim taşıyan sistemler glikoz solüsyonuna batırıldıklarında insülin oranında iki katı bir artış gerçekleştirerek kimyasal olarak kontrollü salınımın gerçekleştiğini göstermektedir (Soppimath ve ark, 2002; Brahim ve ark, 2002). Glikodendrimerler hücre yüzeyinin dışındaki elemanları taklit edebilecek şekilde düzenlenmiştir. Virüsler hücre yüzeyindeki komponentlere bağlanmak yerine dendrimerler ile taklit edilen yüzeylere bağlanarak inaktif edilebilmektedir. Bu sistem üzerinden bazı dendrimerler influenza virüs parçalarının inaktif edilmesinde kullanılmışlardır (Landers ve ark, 2002). Mikroelektromekanik sistem tabanlı mikrobotların hücre içi kullanılmaları için çalışmalar sürmektedir. Sitobotlar ve karyobotlar kablosuz bir şekilde hücre içi cerrahisinde, suni mekanik kırmızı kan hücreleri ya da respirositlerde ve mikrobivores olarak adlandırılan beyaz hücrelerde kullanılmak üzere geliştirilmektedir. Nanosheller, ilaç içeren hidrojel polimerlerin içine gömülerek hedef bölgede ilacın salınımını gerçekleştirmek üzere kullanılmaktadır. Kızılötesi lazerler ile ısıtılan nanosheller kızılötesi ışınları absorbe ederek polimer kabını eritip istenilen bölgede taşımış olduğu ilacın salınımını gerçekleştirebilmektedir (West ve Hallas, 2000).

Nanosheller, çok ince metalleri (altın) içeren dielektrik katmanlar ile kaplı ayarlanabilen yeni bir nanopartiküldür. Dolaşım sistemine verilen nanosheller, bünyesinde bulundurduğu hedef hücre antijenleri ile sistemde bağlanması gereken hücreyi bulup, bu antijenler yardımı ile hücrelere bağlanır. Bu sistem öncelikle kanser hücreleri üzerinden gerçekleştirilmiştir. Organizmaya kızıl ötesi ışınlar uygulandığında kanser hücrelerine bağlanan nanosheller hücrenin sıcaklığını 55°C çıkarmakta ve kanser hücrelerini yakarak yok etmektedir (Hirsch, 2003). Paramanyetik nanopartiküller “akıllı” olarak nitelendirilmektedir. Demir oksitten yapılan bu materyaller manyetik bir alanda hedef hücrenin türü ne olursa olsun yüksek spesifite gösterme eğilimindedir ve hedef hücrenin reseptörlerine bağlanmada yüksek afinite göstermektedir. Hedef hücreye bağlanmada göstermiş olduğu istek göz önünde bulundurularak bu nanopartiküller ilaç yüklemeleri ile istenilen bölgeye salınım gerçekleştirilip tedavinin sağlanmaktadır. Kuantum noktaları nanoskaladaki kristalleri ile birlikte optoelektronik uygulamalar ile çalışmaktadır. Dolaşıma verilmesi düşünülen bu noktaların anormal hücrelere kilitlenebileceği düşünülmektedir.

2.3.3. Hayvan Beslenmesi

Nanopartiküller, nanoparçacıkların kimyasal özelliklerine göre inorganik, organik, emülsiyonlar, dispersiyonlar ve nano killere geniş bir şekilde ayrılabilir. Hayvan beslemede esas olan nanobiyoteknoloji uygulamaları Şekil 4’de gösterilmiştir.



Şekil 4: Hayvan Beslemede Nanobiyoteknolojinin Uygulanması (The Food Safety Authority of Ireland, 2008)

2.3.3.1. Sindirim ve Absorpsiyonun İyileştirilmesi

Terapötik nano-ilaçların kullanımında; nanopartiküller gastrointestinal sisteme (GİS) gıda ve su alımı gibi farklı yollarla alınabilir. Solunan nanoparçacıklar da solunum yolundaki açıklıktan yutulabilir ve GİS'e girebilirler (Hoet ve ark, 2004). Ayrıca, GİS parçacık alımı ve GİS (oral yol) içine oral veya akıllı ilaç dağılımının difüzyonu ve ulaştırılabilirliği; mukus ve GİS hücreleri ile temas miktarına bağlıdır. Daha küçük parçacık boyutu, bağırsak epitelinin hücrelerine ulaşmak için GİS mukusundan difüzyonla daha hızlı geçer ve ardından kana ulaşmak için GİS bariyerini takip eder.

GİS'de absorpsiyon bağırsak yolu ile sağlanır ve nanoparçacıkların barsak yolundan alınması ile ilgili şu an az bilgi mevcuttur. Alım, mukozal hücreler arasında aktif aktarım mekanizmaları yoluyla ve hücrelerarası (O'Hagan, 1996) gerçekleşir, yutulmuş nanopartiküller er ya da geç bağırsak yoluna ulaşır. 300 nm'nin altındaki partiküller kan dolaşımına katılabilirken, 100 nm'den küçük partiküller çeşitli dokularda ve organlarda emilmektedir (Hett, 2004). Genel bir kural olarak, parçacıklar ne kadar küçükse, o kadar çok emilmekte ve vücutta daha derin dokulara ulaşmaktadırlar. Çözünmeyen nanopartiküllerin (başta inorganik, aynı zamanda polistiren gibi insan yapımı polimerik malzemeler ve fullerener gibi karbon esaslı nanoparçacıklar da dâhil olmak üzere) daha sınırlı bir dağılımı olduğu öngörülmektedir. GİS'den alındıktan sonra, nanoparçacıklar 100 nm veya daha düşük polistiren nanopartiküllerinde olduğu gibi (Jani ve ark, 1990), lenf sistemi yoluyla karaciğere ve dalağa translokasyon yapabilmektedir. Villüs epiteli tarafından alınabilen küçük parçacıklar (Hillery ve ark, 1994) doğrudan kan dolaşımına girebilmekte ve çoğu zaman karaciğer ile dalak tarafından temizlenmektedirler. Kazein miselleri gibi organik nanopartiküller mikro veya makro eşdeğerlerine benzer şekilde davranarak kolaylıkla emilebildikleri ve oldukça yüksek biyo-erişilebilirlikte oldukları düşünülmektedir. Vitamin B12-dekstran nanoparçacıklarında kapsülize edilmiş insülin son zamanlarda bozunmaya uğramadan GİS'den alınmıştır (Floransa ve Hussain, 2001).

Latour ve Clemson Üniversitesi'ndeki meslektaşları, son dönemlerde, biyofonksiyonelleştirilmiş nanopartiküller (BN) geliştirdiler (Taylor ve ark, 2004). BN, enterik enfeksiyonlar için bir tedavi olarak düşünülmüş, dağılım ve işleme başlamadan patojenlerin temizlenmesi için kullanılmışlardır. Bağırsak duvarı epitel dokularına yapışma, epitel üzerindeki reseptör bölgelerini tanıyan bir bakteri hücresindeki adezinler veya yüzey molekülleri tarafından kolaylaştırılmaktadır. BN geliştirilme amacı, bu bakteriyel adhesinlere bir afinite oluşturmaktır. Ayrıca, D-mannoz varlığının hem hayvan hem de insan bağırsak hücrelerine bakterilerin yapışmasını engellediği bildirilmektedir (Stanley ve ark, 2000). *Campylobacter jejuni*nin epitelyal hücrelere bağlanmasına; bakteriyel yüzey üzerinde manoz reseptör bölgelerine bağlanan mannoz spesifik, lektin benzeri adezinler aracılık etmektedir. BN'nin, enteropatojen *C. jejuni*'ye adezyona spesifik olduğu düşünülmektedir (Cinco ve ark, 1984). Önceki çalışmalar, BN'nin *Campylobacter* hücre yüzeyi üzerindeki mannoz reseptör siteleri için bir afiniteye sahip olduğunu ve bakteri ile BN arasındaki hücre agregasyonu veya bağlanmasının oluşabileceğini göstermektedir. Bu sayede, BN'nin *Campylobacter* hücre yüzeylerine yapışma kabiliyeti ile BN'nin konakçı hücre reseptörlerinin rekabet etmesini sağlayarak, kanatlı bağırsak duvarındaki bakteri kolonizasyonunu azaltması veya ortadan

kaldırması öngörülmektedir. BN sentezi, intra-polimer ikili sahte faz ayırma ile yapılandırılmış organik polimerlerin kendiliğinden bir araya getirilmesine dayanmaktadır (McSweegan ve Walker, 1986). Nanoparçacık yapısı patojenin yüzey yapışmalarıyla konakçı hücre reseptör grupları ile işlevsel olarak özdeş olan bir hidrofobik polistiren çekirdeği, polietilen glikol gibi bir hidrofilik bağ, şekerler veya peptidlerden oluşmaktadır. BN, nanoparçacıkların yüzeyindeki bu aynı fonksiyonel gruplar sayesinde, gastrointestinal sistemin mukozal duvarı ile mikrobiyal tutunmada etkili bir şekilde rekabet etmemektedir. Dahası, BN nispeten geniş bir yüzey yoğunluğu fonksiyonel alanlar içerdiğinden çok sayıda patojeni aglütinleştirebileceği, böylece konakçılara tutunmalarını önleyebileceği ve gastrointestinal sistemden atılmalarını sağlayabileceği düşünülmektedir.

Nanopartiküller, havadaki gaz molekülleri gibi davranarak, katı parçacıklardan daha kolay dağılmaktadırlar. Çözeltilerdeki büyük moleküller gibi, daha büyük parçacıklara oranla çökmeye daha az maruz kalmaktadırlar. Bu sayede, nanoparçacıkların dokudaki hareketi için de etkili olabilmektedirler. Nanoparçacıkların vücuda ve farklı organlara ulaşımı, insan sağlığı ve çevre üzerindeki etkileri için önem taşımaktadır. Bir parçacık translokasyon çalışmasında (Jani ve ark, 1990), dişi Sprague Dawley sıçanlara polistiren küreleri (50 nm-3 µm) sonda ile 10 gün boyunca uyguladıklarında, 50 ve 100 nm boyutundaki nanoparçacıkların sırasıyla %34 ve %26'sının absorbe edildiğini ve 300 nm'den daha büyük parçacıklar kan, kalp veya akciğer dokusunda görülmediklerini rapor etmektedir. Parçacık ne kadar küçükse, mukus bariyeri boyunca penetrasyon yeteneği o kadar fazladır.

Boyuta bağlı olarak, nanoparçacıklar dolaşıma alınmadan GİS'ten geçebilirler, hızla ortadan kaldırılabilirler (Oberdörster ve ark, 2005) veya GİS'nin epitelini geçerek kan dolaşımı yoluyla diğer organlara taşınırlar. GİS'den alımı takiben, 50 nm'den daha küçük altın nanopartiküller kan dolaşımına aktarılmakta ve vücudun her yerine dağıtılmaktadır. De Jong ve ark (2008), intravenöz uygulama sonrasında altın nanopartiküllerin doku dağılımının boyutuna bağlı olduğunu, en yaygın dağılımı gösteren nanopartiküllerin en küçük (10 nm) partiküllerle göstermiştir. Absorpsiyonda olduğu gibi, vücuttaki nanoparçacıkların dağılımı, parçalanma ve atılım, çözünabilirlik, yük ve boyut gibi fiziko-kimyasal özelliklerine bağlı olacaktır. Nanoparçacıkların vücut organlarına dağılımı/translokasyonunda, mikro veya makro boyuttaki eşdeğerlerinin özelliklerini yansıtmaları beklenir. Lipid nanopartikülleri gibi suda az çözünür ya da yağda çözünen organik nanomalzemeler vücuda yaygın olarak dağıtılır. Bu tür nanoparçacıkların, oluşturulduğu moleküllere dağılımının ve parçalanmasının, vücuttan hızla atıldığında verimli bir şekilde gerçekleştiği düşünülmektedir.

Nanopartiküllerin geniş yüzey alanı, ilaçlar, sondalar ve proteinler gibi bileşikler bağlamak, emmek ve taşımak için büyük bir avantaj sağlamaktadır (Borm ve Kreyling, 2004).

2.3.4. Yem İşleme

Nanoparçacıkların ultra ince boyutları ve bunun sonucu olarak çok geniş yüzey alana sahip olması, geleneksel makro ölçekli yapılara göre daha etkili bir şekilde işlev görmesini sağlar. Mikro ve nano-elekler de dâhil olmak üzere yeni geliştirilen membran tipleri gıda/yem işlenmesinde uygulama alanı bulabilir. Bu eleklerin gözenekleri mikrometre ve nanometre aralıktadır. Ayrıca, vücut tarafından emilimi arttırmak veya işlenmekte olan bu bileşenlerin kaybolmasını önlemek için, mineraller gibi herhangi bir maddenin kaplamasında gıda/yem içeriklerini kapsüllemek için kullanılabilirler. Vücudun gereksinimlerini karşılayan ve besin maddelerinin daha verimli şekilde kullanılabilmesini sağlayan nanobiyoteknoloji işlevsel gıdaların gelişimini etkilemektedir. Çeşitli araştırma grupları ayrıca, vücut içerisinde uykuda kalacak ve ihtiyaç duyulduklarında besin maddelerini hücrelere gönderecek yeni "talep üzerine" besinler geliştirmek için çalışmaktadır. Bu sektördeki en önemli unsur, besin maddeleri elde etmek için gıda/yemle birleştirilebilen nanokapsüllerin geliştirilmesidir. Gıda/yem işleme alanındaki diğer gelişmeler, besin maddelerinin artan emilimini sağlamak için mevcut gıdalara nanopartiküllerin eklenmesini içerir. Nanoşelatlar, 50 nm sarılmış nanopartiküller olup, gıdaların/yemlerin rengini veya tadını etkilemeksizin, vitaminler, likopen ve omega yağ asitleri gibi hücrelere daha verimli besinler sağlamak için kullanılabilir (Bunglavan ve ark, 2014).

2.3.5. Besin Takviyeleri ve Teknolojileri

Misellerin biyoyararlanımını sağlamak için uçucu yağlar, antioksidan, koenzim Q10, vitaminler, mineraller, fitokimyasallar gibi taşıyıcılar kullanılırlar (ElAmin, 2006).

Besin endüstrisinde protein, enzim ve antimikrobiyal bileşikler gibi besin maddelerinin ve fonksiyonel bileşenlerin kapsüllemesi ve verilmesi için lipozomal nano veziküllerin uygulanması gerçekleştirilmiştir (Wen ve ark, 2006). Minerallerin partikül boyutu, nanoparçacık formundaki yem katkı maddeleri olarak 100 nanometre'den daha küçük olduğu iddia edilmektedir. Bu nedenle, daha büyük parçacık boyutlu sıradan

minerallerden daha hızlı bir şekilde ilgili sindirim organı duvarından vücut hücrelerine geçebilirler.

Örneğin doğal kaynakları, sebze ve soya yağları olan E vitamini ışığa, ısıya ve oksijene duyarlıdır. Gıdada kısa sürelerde dahi depolandığında stabilitesi bozulabilen E vitamininin sentetik versiyonları daha ucuz olmasına rağmen daha düşük biyolojik aktiviteye sahiptir. 158 nanometre kalınlığa ve %65 geçirgenliğe sahip mezo-gözenekli silikon parçaları oda sıcaklığında değişen sürelerde %97 viskoziteli E vitaminine batırılarak dış yüzeyindeki biriken sıvı basınç ile koruma altına alınarak bozulmadan uzun süre korunmasının sağlanması gerçekleştirildi. (Canham, 2007).

Domuz yavrularının diyetine bakırın (Cu) nano boyutta 50 ppm oranında ilave edilmesi ile yavruların büyüme performansında istatistiksel olarak önemli gelişmelerin sağlandığı, domuzlarda ham yağ ve enerjinin sindirilebilirliğinin geliştirilmesinde önemli farklılıklar gözlemlendiği bildirilmektedir. Aynı zamanda immunglobulin G, gama-globulin ve toplam globulin seviyelerinde istatistiksel olarak önemli gelişmeler gözlenmiştir. (Eguia ve ark, 2009).

2.3.6. İşleme

Gıda üretim makinelerinde de nanobiyoteknolojik uygulamalar oluşmaktadır. Nano elek (filtre ve bakteri gibi) ve makine kaplama kullanımları nanoteknoloji örnekleridir. Ancak kaplama ya da filtre materyal tipleri dikkat gerektirmektedir.

2.3.7. Ambalaj ve Depolama

Nanopartiküllerin ambalaj materyallerinin bariyer özelliklerini (nanokompozit, çinko oksit ve nano gümüş gibi) arttırmak için dâhil edildiği söylenebilmektedir. Nanopartiküllerin migrasyonu ancak gıda ile direkt temas yoluyla mümkün olduğu halde, nanopartiküller gıda ambalaj materyallerine uygulanmaktadır. Gaz bariyer özellikleri için ambalajlama materyallerinde kullanılan kil ve nişasta nano kompozit filmleri migrasyonu en aza indirgenmesi öngörülmektedir.

2.3.8. Yetiştirme ve Üremede Nanoteknoloji

Deri altına yerleştirilen bir mikroçip yardımı ile gerçek zamanlı östrojen ölçümü vasıtası ile kızgınlık zamanının tayininde ve gen kaynaklı hastalıkların tesbitinde kullanılabileceği rapor edilmektedir.

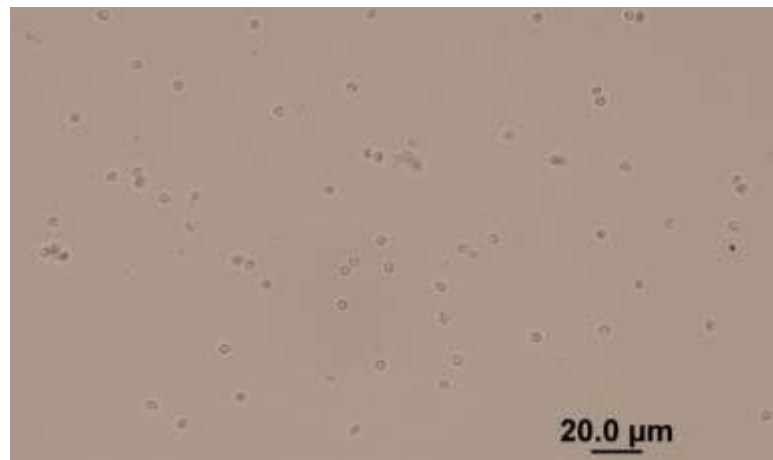


3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. *Cryptosporidium parvum* 'un Kaynağı ve Hazırlanması

Cryptosporidium ookistleri Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi İç Hastalıkları kliniğine getirilen, doğal enfekte kuzu ve buzağılardan, Lorenzo ve ark (1993) tarafından tarif edildiği şekilde toplandı. Toplama işlemi yapmadan önce hayvanlardan alınan dışkı örneklerinde *E. coli* K99, *Cryptosporidium*, *Coronavirus* ve *Rotavirus* enfeksiyonlarının varlığı BoviD-4 Ag test kiti (Anigen, Kore) kullanılarak test edildi.

Sadece *Cryptosporidium* enfeksiyonu tespit edilen kuzu ve buzağılardan toplanan dışkılar distile su ile sulandırıp, 45 µm delikli süzgeçlerden geçirilmesini takiben elde edilen sıvı kısım 1000 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edildi. Pelet; 20 ml distile su ve 20 ml dietileter ile karıştırılarak 1000 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek üsteki üç tabaka uzaklaştırıldı. Bu işlem dışkıdaki yağ tamamen uzaklaştırılana kadar tekrar edildi. Elde edilen sediment 1 ml distile suyla karıştırılarak dört farklı dansiteden oluşturulmuş (1.13, 1.09, 1.05 ve 1.01 g/ml, her biri 2,5 ml) Percoll gradientinin üzerine yayıldı. Karışım 650 x g'de 4°C'de 15 dakika santrifüj edildi. Ookist yumurtalarını içeren bant uzaklaştırılarak distile su ile 1000 x g'de 4°C'de 5 dakika santrifüj edilerek yıkandı ve yıkama işlemi üç kez tekrarlandı. Ookistler deneysel enfeksiyona kadar %2,5 (w/v) potasyum dikromat solusyonunda saklandı. Şekil 5'de dışkıdan toplanmış *Cryptosporidium* ookistleri gösterildi.



Şekil 5: *Cryptosporidium parvum* ookistleri (x400)

Cryptosporidium Ookistlerinin Türünün PCR ve RFLP ile Belirlenmesi

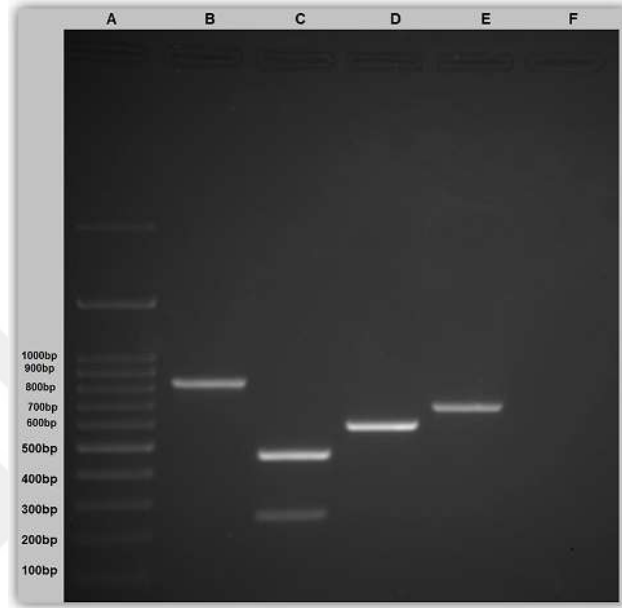
Elde edilen *Cryptosporidium* ookistlerinin türünün ve tipinin belirlenmesi amacıyla 100 µl süspansiyonunda fenol/kloroform metodu kullanılarak DNA izolasyonu yapıldı. Doğal olarak enfekte kuzulardan elde edilen ookistlerin türünü belirlemek için Nested PCR (Polimeraze Chain Reaction) ve RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) analizi yapıldı. Bu amaçla öncelikle elde edilen ookist süspansiyonundan 100 µl alınarak klasik fenol/kloroform yöntemiyle (Sambrook ve ark, 1989) DNA izole edildi. Nested PCR ve *SspI*, *VspI* ve *MboII* enzimleri kullanılarak RFLP analizi ile *C. parvum* türünün belirlenmesi gerçekleştirildi.

PCR, *Cryptosporidium* soyuna özel 18S ribozomal RNA genine ait primerler kullanılarak daha önce tarif edildiği şekilde yapıldı (Xiao ve ark, 1999; Aysul, 2009). Kısaca, *Cryptosporidium*'un 18S ribozomal DNA geninin 1325 bp bölümünü çoğaltan primerler (forward: 5'-TTC TAG AGC TAA TAC ATG CG-3' ve reverse: 5'-CCC TAA TCC TTC GAA ACA GGA-3') kullanılarak birinci PCR gerçekleştirildi. İkinci PCR, birinci PCR ürününün 826-864 bp'lik bölümünü çoğaltan primerler (5'-GGA AGG GTT GTA TTT ATT AGA TAA AG-3' ve 5'- AAG GAG TAA GGA ACA ACC TCC A-5') kullanılarak yapıldı. PCR karışımı, 1 x PCR buffer, 6 mM MgCl₂, 200 mM (her biri) deoksिनükleosid trifosfat, 100 nM primerler, 2.0 U of HotStartTaq DNA polimeraz içerdi.

PCR'ların son volume 25 µl olarak ayarlandı ve birinci PCR'da 2 µl DNA örneği, ikinci PCR da 1 µl birinci PCR ürünü kullanıldı. Her iki PCR da 35 döngüde gerçekleştirildi (denatürasyon 94°C 45 s, hibridizasyon 57°C 45 s, uzatma 72°C 1 min). Her iki PCR da başlangıçta 94°C 3 dakika ve sonunda 72°C 7 dakika döngülerini içerdi. PCR ürünlerinin analizleri Safeview ile boyanmış %1.5 agaroz jel elektorforez ile yapıldı.

Nested PCR ürünlerinde (yaklaşık 850 bp), *SspI*, *VspI* ve *MboII* enzimleri kullanılarak RFLP analizi daha önce tarif edildiği gibi yapıldı (Feng ve ark, 2007). Bu enzimler *C. parvum*, *C. bovis*, *C. andersoni* ve *C. ryanae* genotiplerini birbirinden ayırt etmektedir. Bu amaçla, ikinci PCR ürünü agaroz jelden QIAquick jel ekstraksiyon kiti yardımıyla izole edildi. *VspI*, *SspI* ve *MboII* enzimlerinin ayrı ayrı her biri için 40 µl PCR ürünü için 15 unite enzim, 5 µl buffer ve 2 µl steril de-ionize su ile karıştırıldı. Kesme işleminin tamamlanması için 2 saat 37°C de inkübe edildi. Karışım Safeview ile boyanıp, %3 agaroz jel üzerinde koşturularak görüntülendi. *SspI* enzimi *C. parvum* veya *C. bovis*'i 449, 267 ve 108 bp boyutlarında keserken *C. andersoni*'yi 448 ve 397 bp boyutlarında kesmektedir. *MboII*, *C. parvum*'u 771 ve 76 bp *C. bovis*'i ise 412, 185 ve 162 bp boyutlarında kesmektedir. *VspI* restriksiyon enzimi *C. parvum*'da 628, 115 ve 104 bp, *C. Ardesroni*'de ise 730 ve 115 bp

boyutlarında parçalar oluşturmaktadır. Bu çalışmada yapılan RFLP analizi sonucunda test edilen bütün DNA örneklerinin *C. parvum* olduğu tespit edildi. Agaroz jelin duyarlılığın düşük olması nedeniyle RFLP analizi sonucunda elde edilne 100 bp civarındaki ürünler jelde tespit edilmedi (Şekil 6).



Şekil 6: *Cryptosporidium parvum*'un nested PCR ürününün SspI, VspI, MboII kesim enzimleri kullanılarak yapılan RFLP analizi. A; Moleküler Boyut Belirleyici (abm 100bp plus), B; *C. parvum* nested PZR ürünü (847 bp), C; SspI ile kesilen nested PCR ürünü (449 ve 267 bp), D; VspI ile kesilen nested PCR ürünü (628 bp), E; MboII ile kesilen nested PCR ürünü (771 bp), F; Negatif control. %3 agarose gel SafeView (abm) ile boyanmıştır.

Ek olarak, *in vitro* denemede kullanılacak ookistlerin *C. parvum* olduğunu kesinleştirmek için nested PCR ürünü klonlanarak sekans analizi yaptırıldı. Nested PCR ile çoğaltılan DNA örnekleri içerisinde Safeview bulunan %2 agaroz jel elektroforezini takiben UV ışık altında görüntülendi. Yaklaşık 850 bp boyutundaki band jelden kesildi ve QIAquick jel ekstraksiyon kiti kullanılarak purifiye edildi. Daha sonra purifiye edilen ürün pCR4–TOPO plasmid vektörüne klonlanarak TOP10 *E. coli* hücrelerine ticari kitte belirtildiği şekilde transforme edildi. Seçilen koloniler bir gece boyunca üretildi ve hücrelerde bulunan plazmidler QIAGEN plasmid purification kiti kullanılarak purifiye edildi. EcoR1 enzimi ile

kesildikten sonra %1,5 agaroz jelde elektroforeze tabi tutuldu ve UV ışık altında içinde klonlanan DNA'yı içeren plasmidler belirlendi. Daha sonra bu plasmidlere ait DNA örnekleri sekans analizlerinin yapılması amacıyla İontek (İstanbul) firmasına gönderildi. Sonuçlar GenBank'ta depolanan sekanslarla karşılaştırılmış ve %99-100 oranlarında *C. parvum*'a benzerlik gösterdiği tespit edilmiştir. Sekans analiz sonucu aşağıda görülmektedir (Şekil 7).

```
1 ggaaggggttg tatttattag ataaagaacc aatataattg gtgactcata ataactttac
61 ggatcacatt aaatgtgaca tatcattcaa gtttctgacc tatcagcttt agacggtagg
121 gtattggcct accgtggcaa tgacgggtaa cggggaatta gggttcgatt ccggagaggg
181 agcctgagaa acggctacca catctaagga aggcagcagg cgcgcaaatt acccaatcct
241 aatacagga ggtagtgaca agaaataaca atacaggact ttttggtttt gtaattggaa
301 tgagttaagt ataaaccctt ttacaagtat caattggagg gcaagtctgg tgccagcagc
361 cgcggttaatt ccagctccaa tagcgtatat taaagttggt gcagttaaaa agctcgtagt
421 tggatttctg ttaataatth atataaaata ttttgatgaa ttttatata atattaacat
481 aattcatatt actatatatt ttagtatatg aaattttact ttgagaaaat tagagtgcct
541 aaagcaggca tatgccttga atactccagc atggaataat attaaagatt tttatctttc
601 ttattgggtc taagataaga atagtgatta atagggacag ttgggggcat ttgtatttaa
661 cagtcagagg tgaaattcctt agatttggtta aagacaaaact aatgcgaaag catttgccaa
721 ggatgttttc attaatcaag aacgaaagtt aggggatcga agacgatcag ataccgtcgt
781 agtcttaatc ataaactatg ccaactagag attggagggt gttccttact cctt
```

Şekil 7: *Cryptosporidium parvum* sekans analiz sonucu

3.2. Klinoptilolit İçeren Polimer Nanopartikülün Hazırlanması

Biyouyumlu mukoadheziv özelliği bilinen biyopolimer kullanılarak nanopartikül hazırlandı ve nanopartikül içerisine klinoptilolit enkapsülasyonu gerçekleştirildi. Bu kapsamda asetik asit içerisinde kitosan (%1), klinoptilolit içeren çözelti ve tiyaminpürofosfat kullanılarak sprey drier cihazında nanopartiküllerin sentezleri gerçekleştirildi. Nanopartikül sentezinin optimizasyonu değişen akış hızlarında enkapsülasyon gerçekleştirilerek nanoboyutlu partiküllerin sentezleri yapıldı. Nanopartikül sentezinin optimizasyonunda ve optimum koşullarda hazırlanmış nanopartiküllerin karakterizasyonunda boyut ölçümleri zetasizers ile gerçekleştirildi.

3.3. *In Vitro* Enfeksiyon

Klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün *C. parvum* ookistlerine *in vitro* etkinliğini belirlemek amacıyla hücre kültürü çalışması *in vitro* olarak aşağıdaki şekilde incelendi.

3.3.1. Konak Hücre

Deneyisel *in vitro* enfeksiyon gerçekleştirmek için insan kolon adenocarcinoma (Caco-2) hücreleri daha önce tarif edildiği gibi kullanıldı. Hücreler 37°C’de, %5 CO₂ inkübatörde, %10 Fötal Bovine Serum, 100U/ml penisilin, 100 µg/ml streptomisin ilave edilmiş DMEM besi ortamı (medyum) [(Dulbecco’s Modifiye edilmiş Eagle Besi ortamı; Sigma. Kat no: D6429), (4500 mg/L Glukoz, 110mg/L Sodyum prüvat, L-Glutaminin olduğu besi ortamı)] kullanılarak çoğaltıldı.

Enfeksiyon denemelerinde 12 well hücre kültürü plaklarının içine 18 mm steril yuvarlak lameller yerleştirilerek ve üzerlerine Caco-2 hücreleri ekildi. Hücreler lamellerin yüzeyini %80 kapladıktan sonra enkiste 1x10⁶ *C. parvum* ookisti ile enfekte edildi.

3.3.2. *In Vitro* Hücre Kültürü

Cryptosporidium parvum ile enfekte enterositlere 4 farklı konsantrasyonda (250, 500, 750, 1000 µg/ml) klinoptilolit içeren polimer nanopartikül eklenerek *C. parvum*’a karşı terapötik etkinliği *in vitro* incelendi. Aynı şekilde kontrol amacıyla *C. parvum* ile enfekte enterosit welline su ilave edildi. Karışımlar 28°C de 12 saat süreyle çalkalanarak inkübe edildi. Inkübasyonu takiben karışımlar ve nanopartikülleri uzaklaştırmak amacıyla 100 g ‘de 5 dk santrifüj edildi ve süpernatant başka bir falkon tüpe aktarılarak 10 dakika 1000 g’de santrifüj edildi.

Yüzeysel sterilizasyonu sağlamak amacıyla peletteki ookistlerin üzerine %10’luk çamaşır suyu (%5 sodyum hipoklorit içeren ev kullanımı için çamaşır suyu) ilave edilerek süspansiyon haline getirildi ve 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Üstteki sıvı, 8000 rpm’de 5 dakika santrifüj edilerek uzaklaştırıldı ve steril PBS ile aynı şekilde 6-7 kez yıkandı. Son yıkamadan sonra ookistler sayılarak ml’deki ookistler sayıldı.

Ookistlerin eksistasyonu başlatmak amacıyla önceden 37°C’de ısıtılmış, %0,75 sodium thaurocholic içeren HBSS (Hanks Balanced Salt Solution) içerisinde, 37°C’de 15 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında, her bir dilusyon için üç replikasyon olacak şekilde 1×10^6 ookist %80 kaplanmış hücrelerin üzerine ekildi. Plaklar 37°C’de, %5 CO₂ inkübatörde 3 saat inkübe edildi ve sonrasında enkist olmamış ookistler ve hücreye girmemiş sporozoitler plak kuyucuklarından uzaklaştırıldı. Kuyucuklar hücreler zarar vermeden iki kez DMEM medyum ile yıkandı ve sonrasında 2 ml medyum ilave edildi. Hücrelerin medyumunu 24 saat sonra değiştirilip, 54 saat inkübe edildi (Schupfner ve ark, 2013).

3.3.3. *In Vitro* Hücre Kültüründe Enfeksiyonun İmmunofluoresense İle Belirlenmesi ve Ookist Sayımı

Hücrelerde oluşan enfeksiyonun varlığı Vicia villosa lectin (VVL) kullanılarak daha önce tarif edildiği şekilde gerçekleştirildi (Varughese ve ark, 2014). İnkübasyonu takiben, kuyucuklardaki hücreler 3 kez PBS ile yıkandı ve sonrasında soğuk %4 paraformaldehid ile 4°C’de 10 dakika fikse edildi, sonrasında üç kez PBS ile yıkandı. %0,25 Triton X-100 ile 10 dakika oda ısısında bekletilerek permeabilizasyon sağlandı. Hücreler tekrar üç kez PBS ile yıkandı ve taze olarak hazırlandı. HBSS içinde %1 bovine serum albümin (BSA) ile 5 dakika inkübe edildi. Floresans ile konjuge edilmiş VVL, %1 BSA içeren HBSS ile 1/333 dilusyonu yapılarak hücrelerin üzeri kaplandı ve 37°C’de 2 saat inkübe edildi. İki PBS yıkaması sonrasında, hücre çekirdeği DAPI ile bir dakika süreyle boyandı ve bir kez daha PBS ile yıkandı. Daha sonra yuvarlak lameller plak kuyularından alınarak, lamaların üzerine aktarıldı ve üzerleri mounting medya ile kaplanarak floresans mikroskopta 400X büyütmede incelendi. Aynı hat üzerinde 20 yan yana mikroskop sahasındaki hücreler ve hücrelerdeki ookistler sayılarak yüzde enfeksiyon oranı belirlendi.

3.4. İstatistiksel Analiz

Verilerin istatistiksel değeriendirmesi Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) 19 paket programı kullanılarak, aritmetik ortalama ($\bar{x}$) ve standart hata değeri eri hesaplandı. Tabloda kontrol ve deneme gruplarının *in vitro* doku kùltüründe *C. parvum* enfeksiyon oluşma yüzdesi $\bar{x} \pm \text{SEM}$ olarak gösterildi.

Klinoptilolit içeren polimer nanopartikùlün *in vitro* kùltürdeki her bir dilüsyonu için *C. parvum* inhibisyon yüzdesi aşğıdaki formùle göre hesaplandı.

$$\text{İnhibisyon yüzdesi(\%)} = \frac{\text{Kontrol ookist sayısı} - \text{dilüsyondaki ookist sayısı}}{\text{Kontrol ookist sayısı}} \times 100$$

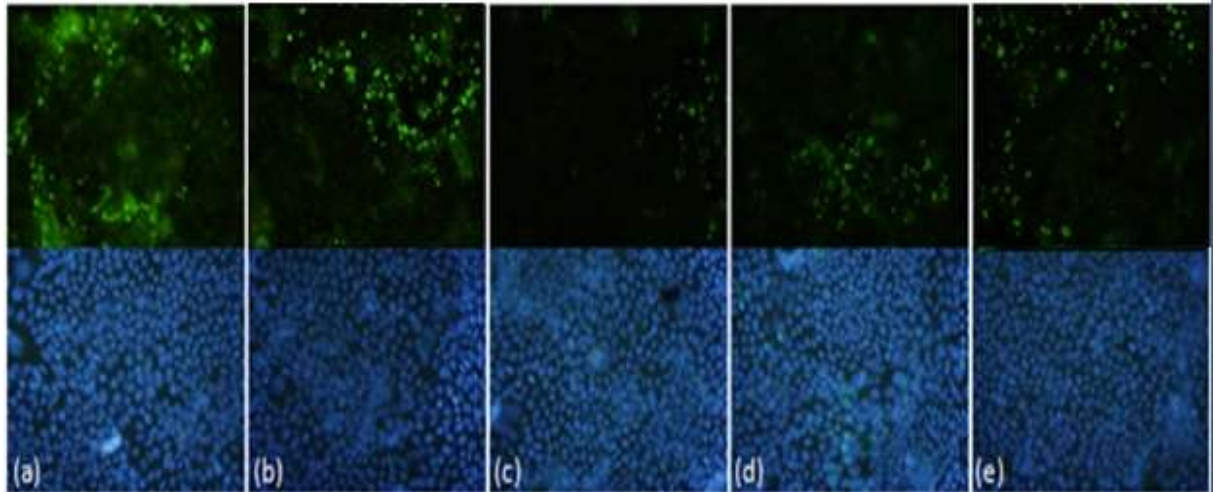
4. BULGULAR

Çalışmanın Caco-2 hücreleri ile gerçekleştirilen *in vitro* doku kültüründe, klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün *C. parvum* enfeksiyonunda yüzde etkisi Tablo 6'de gösterildi.

Tablo 6: *In vitro* doku kültüründe *C. parvum*'a klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün yüzde etkisi

Gruplar	Kontrol	Klinoptilolit Dilüsyon			
		1000µg/ml	750µg/ml	500µg/ml	250µg/ml
		$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	$\bar{x} \pm \text{SEM}$
Enfeksiyon oluşma yüzdesi (%)	23,46±5,50	15,6±2,54	8,13±1,40	10,33±1,70	13,46±2,06

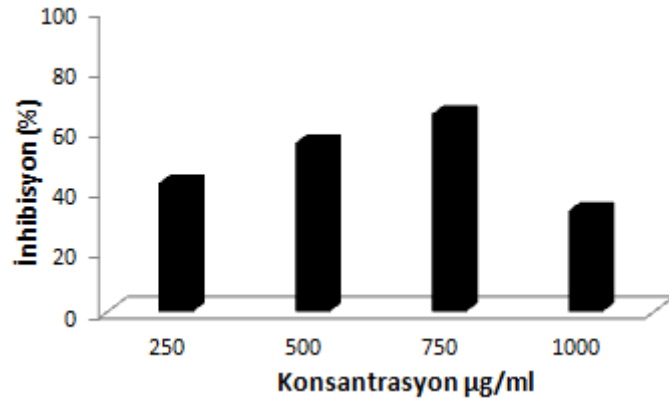
Caco-2 hücrelerinde gerçekleştirilen *Cryptosporidium parvum* enfeksiyonunda klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün, *in vitro* muamelesinde ookistlerin görünümü şekil 8'de gösterildi.



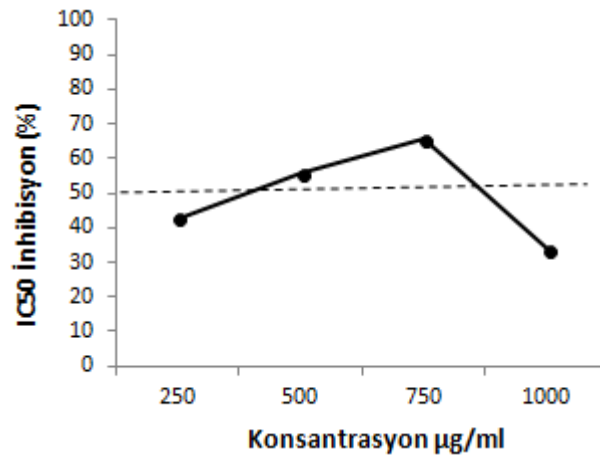
Şekil 8: Caco-2 hücrelerinin klinoptilolit içeren nanopartikül ile muamele edilen *C. parvum* ookistlerinin *in vitro* görünümü. Eş zamanlı DAPI hücre çekirdeği boyaması (400X)

Farklı konsantrasyonlarda klinopitolit içeren nanopartiküllerin Caco-2 hücrelerde gelişen Floresans ile konjuge edilmiş *C.parvum* ookistleri (a):pozitif kontrol (distile su), (b):1000µg/ml, (c):750µg/ml, (d):500 µg/ml, (e):250µg/ml.

Caco-2 hücrelerinde gerçekleştirilen *C.parvum* enfeksiyonunda, klinopitolit içeren polimer nanopartikülün inhibisyon konsantrasyon yüzdesi ve standart hata şekil 9 ve şekil 10 da gösterildi.



Şekil 9: Klinopitolit içeren polimer nanopartikülün inhibisyon konsantrasyon yüzdesi



Şekil 10: Klinopitolit içeren polimer nanopartikülün %50 inhibisyon konsantrasyon (IC50) yüzdesi

5. TARTIŞMA

Çiftlik hayvanlarında ishal son yıllarda profilaksi ve sağaltım alanındaki tüm gelişmelere rağmen yaygın olarak görülmekte ve ölümlerle doğrudan, gelişme geriliği, sağaltım giderleri ve laboratuvar harcamaları ile de dolaylı önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Özellikle neonatal dönemde ishale daha sık rastlanılmakta ve sonuçları daha ciddi olmaktadır. Ruminantlarda neonatal dönemde *E. coli*, *Rotavirus* ve *Coronavirus* yanında ishale neden olan ve önemi günümüzde daha da artan bir etken de zoonotik karakterdeki *C. parvum*'dur.

Cryptosporidium ile klinik enfeksiyonun oluşması veya oluşturulması için alınması gereken ookist sayısı, bireysel duyarlılık ve konakçı direncine bağlı olarak oldukça farklılık göstermektedir. Birçok araştırmacı (Viel ve ark, 2007; Schnyder ve ark, 2009; Al-Mathal ve Alsalem, 2012; Zambriski ve ark, 2013) farklı hayvan türlerinde 1×10^3 ile 1×10^7 arasında *Cryptosporium parvum* ookist verilmesiyle deneysel klinik enfeksiyonun oluştuğunu ortaya koymuştur. Enfektif bir hayvanın 1 gram dışkı ile milyonlarca ookist saçması enfeksiyonun hızla yayılıp bir sürü problemi haline gelmesini kolaylaştıran bir faktördür (de Graaf ve ark, 1999; Hammes ve ark, 2006; Divers ve Peek, 2008). *In vitro* çalışmalarda ise *in vivo* çalışmalara benzer oranda ookist uygulanarak *in vitro* enfeksiyon oluşturulmaktadır (Santin ve Trout, 2008) Bu çalışmada da diğer çalışmalara benzer şekilde 1×10^6 /ml dozunda bir kez verilen *C. parvum* ookistleri ile Caco-2 hücre kültüründe enfeksiyon oluşturuldu.

Cryptosporium parvum enfeksiyonunun tedavisi için birçok ilaç kullanılmış olmasına rağmen tam bir parazitolojik iyileşme sağlanamamıştır. Terapötik ve profilaktik amaçla insanlarda ve hayvanlarda kriptosporidiozise karşı 100'lerce madde denenmiş ancak etkili birkaç madde bulunmuştur. Ancak bu maddelerin toksik veya yan etkileri nedeniyle kullanımında belirli sınırlamalar bulunmaktadır. Gobel (1987), ionofor politerantibiyotiklerden Lasalocid Na'un akut kriptosporidiozisli buzağılara günde bir kez 3 gün süreyle 15 mg/kg dozda verildiğinde etkin olduğunu ve herhangi bir yan etkisinin olmadığını bildirirken; Pongs (1989), belirtilen etken maddenin aynı doz ve uygulama şeklinde toksik olduğunu belirtmektedir. Deneysel enfekte buzağılarda paromomisinin profilaktik uygulamasının ookist atılımını inhibe ettiği, ishallerin süresini azalttığı (Fayer ve Ellis, 1993) ancak ilacın bırakılması ile ishal ve ookist atılımının devam ettiği ve hastalıkta azalmanın sağlanamadığı (Grinberg ve ark, 2002) bildirilmektedir. Azitromisinin doğal

enfekte buzağılarda *Cryptosporidium spp.*'nin tedavisi üzerine kısmi etkisi olduğu ancak tam iyileşmeyi sağlayamadığı bildirilmektedir (Elitok ve ark, 2005). Halofuginone tedavisinin sonuçları üzerine raporlar tartışmalıdır. Bazı çalışmalarda buzağılarda önemli ölçüde ookist atılımının ve ishalin azaldığı (Joachim ve ark, 2003) ve mortalitenin düştüğü (Naciri ve ark, 1993) bildirilirken, diğer çalışmalarda halofuginone veya decoquinate'ın ishal veya dehidrasyon düzeyleri üzerinde hiçbir etkisinin olmadığı (Lallemant ve ark, 2006) bildirilmektedir. Halofuginone nispeten toksik olduğu bilinmektedir ve bu durum ayrı bir sakınca doğurmaktadır. Nitazoxanide (NTZ) köpek, kedi, koyun ve keçilerde antiparaziter tedaviler için uygulanmış antimikrobiyal bir maddedir. NTZ çocuklar ve yetişkinlerde kriptosporidiozis ve giardiasis tedavisi için beşeri kullanımı için FDA onaylıdır (Schnyder ve ark, 2009). *In vitro* çalışmalarda ve fare modellerinde kriptosporidioziste etkili bulunmuştur. Hayvan modellerinde parazit sayısını azaltmış; ancak, parazitolojik kür sağlayamamıştır. İshalli buzağılarda profilaktik ve terapötik olarak kullanılan NTZ'in ne ookist atılımını ne de hastalığın klinik ciddiyetini azaltmak üzerine pozitif bir etkisinin olmadığı gösterilmiştir (Schnyder ve ark, 2009).

Cryptosporidium parvum enfeksiyonunun sağaltımı için günümüze kadar denenen ajanların hiçbirisi klinik bulguların tam olarak kontrol altına alınmasını ve enfeksiyonun eliminasyonunu sağlamamıştır (Shadiduzzaman ve Dauschies, 2012). Bu nedenle de *C. parvum*'un profilaksisi ve sağaltımına yönelik çalışmalar devam etmekte ve farklı gruplardan birçok ajan halen denenmektedir. Birçok araştırmacı çiftlik hayvanlarında yemlere katılan klinoptilolit inishalleri önlediğini bildirmektedir. Barkto ve ark (1995), buzağı ishallerinde yemlere sağaltım amaçlı 2g/kg, koruma amaçlı 1g/kg canlı ağırlık dozunda klinoptilolit ilavesinin, ishali önlemedeki etkinliğinin olduğunu rapor etmektedir. Farklı oranlarda kolostrum ve süte klinoptilolit katılan buzağılarda 1g/kg klinoptilolit ilavesinin ishal oluşmasını azalttığı ancak pasif immunité üzerine bir etkisi olmadığı rapor edilmektedir (Sadeghi ve Shawrang, 2008). Sardinas ve ark (1991), büyüme dönemindeki domuzların ishallerinde diyete %20 oranında doğal klinoptilolit ilavesinin %71 oranında iyileşme sağladığını vurgulamaktadır. Doğum sonrası buzağuların ağız sütüne kg canlı ağırlık başına 1g klinoptilolit eklenmesinin; solunum, ishal problemleri ve antibiyotiklerin kullanımını azalttığını rapor etmektedir (Vrzgula ve ark, 1988). Sindirim sistemine gastrointestinal nematodların verildiği kuzu rasyonuna %3 klinoptilolit ilavesinin; nematodlarla mücadelede etkili olduğu bildirilmektedir (Deligiannis ve ark, 2005). Klinoptilolit in koyunlarda koksidiyozis'de *in vitro* ookistlerin morfolojilerini etkilediği, *in vivo* olarak da ookistlerin atılımını ve çevre kontaminasyonunu azalttığı bildirilmektedir (Alcala-Canto ve ark, 2011).

Klinoptilolit *Cryptosporium parvum*'a yönelik etkinliğinin incelendiği tek çalışmada (Ulutaş ve ark, 2015), *C. parvum* ile deneysel enfekte kuzularda klinoptilolit profilaktik etkinliğinin olduğunu ve bu etkinin ookistlerinin sporlanması ve enfektif olmasını sağlayan nem gibi çevre faktörlerini değiştirerek ve immun sistemi uyararak etkilediğini bildirmektedirler. Ayrıca bazı yazarlar (Sverko ve ark, 2004; Papaioannou ve ark, 2005); klinoptilolit içeren zeolitlerin en önemli komponentlerinden biri olan aliminyumsilikatların özellikle domuz, buzağı ve ratlarda barsak hastalıkları ile ilişkili ishalin azaltılmasında yararlı biyolojik özelliklere sahip olduğunu ve aliminyumsilikatların nitrik oksit ve süperoksid anyonların etkisiyle yangısal olaylarda ve immun sistemin düzenlenmesinde önemli role sahip olduğu ve özellikle immunsupresif hastalıkların önlenmesinde yeni bir alternatif yem takviyesi potansiyeline sahip olduğu rapor etmektedirler. Klinoptilolit çiftlik hayvanlarında ishalin önlenmesinde ve tedavisinde etkinliğinin bildirilmiş olmasına rağmen klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün gerek ishalde gerekse *C. parvum* enfeksiyonunda etkinliği ile ilgili bir çalışma bulunmamaktadır. Bu kapsamda bu çalışma ilk aşama olarak klinoptilolit polimer nanaopartikül formülasyonunun *C. parvum*'a karşı *in vitro* etkinliğinin değerlendirmesinin amaçlandığı ilk araştırmadır.

Doğal ürünlerin, özellikle ilaç keşfi ve kimyasal biyoloji aracılığıyla, insan ve hayvan sağlık sektörleri üzerinde önemli bir etkisi bulunmaktadır. Doğal ürün bazlı ilaçlar kanser, kardiyovasküler hastalıkların yanı sıra viral, bakteriyel, paraziter ve mantar enfeksiyonlarının tedavisi için kullanılmaktadır. Mevcut onaylanmış farmasötik ajanların belirgin büyük bir kısmı, doğal ürünlere dayalı ürünler veya bileşiklerdir. Klinoptilolit immunstimulan, antitumoral, antibakteriyel, antiviral, antiinflamatuvar, antiparaziter özellikleri hergeçen gün araştırılmakta ve yeni veriler ortaya konmaktadır. Nanobilim ve nanoteknoloji çok çeşitli alanlarda hızla yaşamımıza girmektedir. Nanobiyoteknolojinin yakın geleceğimizin en etkili teknolojisi olacağı ve sağlık, tarım, gıda ve ilaç sanayi gibi yaşamımıza doğrudan etki eden alanlarda köklü değişikliklere sebebiyet vereceği, yaşam standartlarımızı da oldukça arttırabilecek nitelikte üstün bir teknoloji olacağı tüm dünyada kabul görmektedir. Literatürde klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün *C. parvum*'a karşı etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışma bulunmaması, bu çalışmanın sonuçlarının tartışılmasını kısıtlamaktadır. Ancak farklı nanobiyoteknolojik ürünlerin *C. parvum* üzerine etkilerinin araştırılması son yıllarda ön plana çıkmıştır. Cameron ve ark (2016), gümüş nanopartiküllerin *C. parvum* ookistlerini yıkımladığını ve yaşamını doza bağlı azalttığını bildirmektedirler. Aynı şekilde Fallah ve ark (2017), nano nitazoxanide'in normal nitazoxanide göre daha etkili olduğunu ve nano ürünlerin *Cryptosporidium*'un tedavisinde kullanılabileceğini rapor etmektedir. Klinoptilolit

içeren polimer nanopartikülün *C. parvum* ookistlerine etkisinin *in vitro* olarak değerlendirildiği bu çalışmada klinoptilolit içeren nanopartikülün, farklı konsantrasyonlarında (1000µg/ml, 750µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml) sırasıyla inhibisyon yüzdesinin %33.54, %65.56, %55.99, %42.66 olduğu görüldü. *C. parvum* ile Caco-2 hücrelerinde oluşturulan *in vitro* enfeksiyonda klinoptilolit içeren polimer nanopartiküllerin antikriptosidal aktiviteye sahip oldukları ve *Cryptosporidium parvum* için %50 inhibisyonu sağlayan klinoptilolit içeren polimer nanopartikül konsantrasyonların (IC50) 750µg/ml ve 500µg/ml olduğu tespit edildiği görüldü. Klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün bu etkisinin, barsaklardaki geçiş süresinin uzatılması ve barsak mukozası ile temas süresinin artırılması ile ilişkili olarak farklı mekanizmalarla epitelyum hücrelerindeki *C. parvum*'a karşı etkinliğinin pozitif yönde etkilemesinden kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durumun paromomisin, halofuginon ve azitromisin gibi klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün de, doğrudan ve/veya dolaylı etkilerle *C. parvum* ookist sayısında azalmayı sağladığını, tek başına veya kombine *C. parvum* enfeksiyonunun tedavisinde kullanılabileceğini göstermektedir.

6.SONUÇ ve ÖNERİLER

Günümüzde *C. parvum* için kesin bir koruyucu ve tedavi edici protokol bulunmamaktadır. *C. parvum* enfeksiyonunun korunmasında ve tedavisinde birçok ilaç kullanılmış; ancak tam bir başarı sağlanamamıştır.

Bu çalışmada klinoptilolit içeren nanopartikülün farklı konsantrasyonlarının *C. parvum* ile Caco-2 hücrelerinde oluşturulan *in vitro* enfeksiyonda antikriptosidal aktiviteye sahip oldukları belirlendi.

Sonuç olarak; bu etkileri ile klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün, *C. parvum* enfeksiyonunda profilaktik ve tedavi amacıyla, diğer antikriptosidal ajanlara ekonomik bir alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bu amaçla klinoptilolit immunstimulan özelliğinde devreye girebileceği çiftlik hayvanlarında *C. parvum* enfeksiyonunda klinoptilolit içeren polimer nanopartikülün klinik ve parazitolojik iyileşme için *in vivo* araştırılmasının yapılmasının yararlı olacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Aikoh T, Tomokuni A, Matsukii T, Hyodoh F, Ueki H, Otsuki T, Ueki A.** Activation-induced cell death in human peripheral blood lymphocytes after stimulation with silicate in vitro, *International Journal of Oncology*, 1998, 12(6),1355-1364.
- Alcala-Canto Y, Gutierrez-Olvera L, Gutierrez-Olvera C, Sumano-Lopez H.** Effects of clinoptilolite on *Eimeria* spp. Infection in sheep, *Small Ruminant Research*, 2011, 100(2),184-188.
- Allison AC, Harington JS, Birbeck M.** An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages, *The Journal of Experimental Medicine*, 1966, 124(2), 141-154.
- Al-Mathal EM, Alsalem AA.** Pomegranate (*Punica granatum*) peel is effective in a murine model of experimental *Cryptosporidium parvum* ultrastructural studies of the ileum, *Experimental Parasitology*, 2013, 134(4),482-94.
- Anderson BC.** Abomasal kriptosporidiozis in cattle. *Veterinary Pathology*, 1987, 24, 235-238.
- Atwill ER, Johnson EM, Pereira MG.** Association of herd composition, stocking rate, and duration of calving season with fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in beef herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1999, 215, 1833-1838.
- Atwill ER, Phillips R, Pereira MD, Li X, McCowan B.** Seasonal shedding of multiple *Cryptosporidium* genotypes in California ground squirrels (*Spermophilus beecheyi*). *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70, 6748-6752.
- Aysul N, Ulutaş B, Ünlü H, Hoşgör M, Atasoy A, Karagenc T.** “Aydın ilinde ishali buzağılarda bulunan *Cryptosporidium* türlerinin moleküler karakterizasyonu.” 16. Ulusal Parazitoloji Kongresi, 1-7 Kasım 2009, SB-15, P208, Adana.
- Barker IK, Carbonell PL.** *Cryptosporidium agni* sp. n. from lambs and *Cryptosporidium bovis* sp. n. from a calf with observations on the oocyst. *Z Parasitenkd*, 1974, 44: 289–298.
- Bartko P, Seidel H, Kovác G.** Natural Zeolites '93, 1995, Sayfa 467-465.
- Barwick RS, Mohammed HO, White ME, Bryant RB.** Prevalence of *Giardia* spp. and *Cryptosporidium* spp. on dairy farms in southeastern New York state. *Preventive Veterinary Medicine*, 2003, 59, 1-11.

Becher KA, Robertson ID, Fraser DM, Palmer DG, Thompson RC. Molecular epidemiology of *Giardia* and *Cryptosporidium* infections in dairy calves originating from three sources in Western Australia. *Veterinary Parasitology*, 2004, 123, 1-9.

Bodley-Tickell AT, Kitchen SE, Sturdee AP. Occurrence of *Cryptosporidium* in agricultural surface waters during an annual farming cycle in lowland UK. *Water Research*, 2002, 36, 1880-1886.

Bopp SB. Calves and Cryptosporidiosis, *Bovine Veterinaria*, 2003, 4 – 8.

Borm PJA, Kreyling W. Toxicological Hazards of Inhaled Nanoparticles–Potential Implications for Drug Delivery. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 2004;4: 521-531.

Brahim S, Narinesingh D, Guiseppi-Elie. A Bio-smart hydrogels: co-joined molecular recognition and signal transduction in biosensor fabrication and drug delivery. *Biosensors and Bioelectronics* 2002;17:973-81

Bunglavan SJ, Garg AK, Dass RS, Sameer S. Use of nanoparticles as feed additives to improve digestion and absorption in livestock, 2014.

Caccio SM, Thompson RC, McLauchlin J, Smith HV. Unravelling *Cryptosporidium* and *Giardia* epidemiology. *Trends in Parasitology*, 2005, 21, 430-437.

Cameron P, Gaiser BK, Bhandari B, Bartley PM, Katzer F, Bridle H. Silver nanoparticles decrease the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied and environmental microbiology*, 2016, 82(2), 431-437.

Canham LT. Nanoscale semiconducting silicon as a nutritional food additive. *Nanotechnology*, 2007, 18: 1857-1864.

Capiaumont J, Legrand C, Carbonell D, Dousset B, Belleville F, Nabet P. Methods for reducing the ammonia in hybridoma cell cultures, *Journal of Biotechnology*, 1995, 39,49-58.

Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach MJ. Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*. *Emerging Infectious Diseases*, 1999, 5, 579-584.

Castro-Hermida JA, Gonzalez-Losada YA, Mezo-Menendez M, Ares-Mazas E. A study of kriptosporidiozis in a cohort of neonatal calves. *Veterinary Parasitology*, 2002, 106, 11-17.

Castro-Hermida JA, Gonzalez-Losada YA, Ares-Mazas E. Prevalence of and risk factors involved in the spread of neonatal bovine kriptosporidiozis in Galicia (NW Spain). *Veterinary Parasitology*, 2002a, 106, 1-10.

Chartier C, Mallereau MP, Naciri M. Prophylaxis using paromomycin of natural cryptosporidial infection in neonatal kids. *Preventive Veterinary Medicine*, 1996, 25, 357-361.

Cinco M, Banfi E, Ruaro E, Crevatin D, Crotti D. Evidence for L-fucose (6-deoxy-

Lgalactopyranose)- mediated adherence of *Campylobacter* spp. to epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*, 1984, 21: 347-351.

Constant F. Les cryptosporidies confirmées. *E. coli* toujours plus résistant. *Le Point Vétérinaire*, 2001, 219, 16-17.

Current WL, Reese NC. A comparison of endogenous development of three isolates of *Cryptosporidium* in suckling mice, *The Journal of Protozoology*, 1986, 33(1),98-108.

Çelebi Ş, Macit M, Karaca H. Yumurta Tavuğu Rasyonlarına Geç Dönemde Zeolit İlavesinin Performans ve Bazı Önemli Yumurta Kalite Özellikleri Üzerine Etkisi. 4. Ulusal Zootekni Bilim Kong, 2004, 405-409, Isparta

Danabaş D. "Farklı oranlardaki zeolit (Klinoptilolit)'in bazı su parametreleri ile gök kuşağı alabalığı (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1792)'nın gelişimi ve vücut kompozisyonuna etkileri", Çukurova Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi. Adana, Türkiye, 2009.

Daniel RG, Staak D, Robinson G, Thomas AL, Hadfield SJ, Elwin K, Chalmers RM. Detection of *Cryptosporidium andersoni* in a dairy cow with diarrhoea in the UK. *Veterinary Record*, 2005, 156, 423.

de Graaf DC, Spano F, Petry F, Sagodira S, Bonnin A. Speculation on whether a vaccine against kriptosporidiozis is a reality or fantasy. *International Journal for Parasitology*, 1999, 29, 1289-1306.

de Graaf DC, Vanopdenbosch E, Ortega-Mora LM, Abbassi H, Peeters JE. A review of the importance of kriptosporidiozis in farm animals. *International Journal for Parasitology*, 1999b, 29, 1269-1287.

de la Fuente R, Luzon M, Ruiz-Santa-Quiteria JA, Garcia A, Cid D, Orden JA, Garcia S, Sanz R, Gomez-Bautista M, *Cryptosporidium* and concurrent infections with other major enteropathogens in 1 to 30-day-old diarrheic dairy calves in central Spain. *Veterinary Parasitology*, 1999, 80, 179-185.

de Jong WH, Hagens WI, Krystek P, Burger MC, Sips AJAM, Geertsma RE. Particle sizedependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, 2008, 29: 1912-1919.

Deligiannis K, Lainas T, Arsenos G, Papadopoulos E, Fortomaris P, Kufidis D, Stamataris C, Zygyiannis D. The Effect of Feeding Clinoptilolite on Food Intake and Performance of Growing Lambs Infected or not with Gastrointestinal Nematodes, *Livestock Production Science*, 2005,96, 195-203.

Demirel D. Sıçan (Sprague Dawley) rasyonlarında farklı düzeylerde zeolit kullanımının büyüme performansı, kan parametreleri, deri ve karaciğer histolojisi üzerine etkilerinin

araştırılması. Doktora Tezi. Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Diyarbakır, Türkiye. 2008.

Divers TJ, Peek SF. Rebhun's Diseases of Dairy cattle (2nd edition), (pp. 217-219), St. Louis, Missouri, USA: Elsevier Inc., 2008, ISBN: 978-1-4160-3137-6.

Eguia AG, Fu CM, Lu FY, Lien TF. Effects of nanocopper on copper availability and nutrients digestibility, growth performance and serum traits of piglets. *Livestock Science*, 2009;126: 122-129.

ElAmin A. Nanotech database compiles consumer items on the market. Available from <http://www.foodproductiondailyusa.com/news/ng.asp?id=66516> 2006.

Elitok E, Elitok OM, Pulat H. "Efficacy of azithromycin dihydrate in treatment of kriptosporidiozis in naturally infected dairy calves", *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 2005, 19(4), 590-593.

Enemark HL, Ahrens P, Lowery CJ, Thamsborg SM, Enemark JM, Bille-Hansen V, Lind P. *Cryptosporidium andersoni* from a Danish cattle herd: identification and preliminary characterisation. *Veterinary Parasitology*, 2002, 107, 37-49.

Erat M ve Ark. Kimya Alanında Nanoteknoloji Uygulamaları, Ulusal Meslek Yüksekokulları Öğrenci Sempozyumu, 21-22 Ekim 2010.

Erman N, Beyazıt A, Öz İ. The prevalence of kriptosporidiozis in lambs and goat kids in Izmir province, Bornova Veterinary Control and Research Institute, 2000, 25, 33-38.

Ernest H, Shetty R. Impact of Nano - technology on Biomedical Sciences: Review of Current Concepts on Convergence of Nanotechnology with Biology. *Online Journal Nanotechnology*, 2005. Available from: <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=1242>

Esteban E, Anderson BC. *Cryptosporidium muris*: prevalence, persistency, and detrimental effect on milk production in a drylot dairy. *Journal of Dairy Science*, 1995, 78, 1068-1072.

Evans MR, Gardner D. Kriptosporidiozis outbreak associated with an educational farm holiday. *Communicable disease report. CDR review*, 1996, 6(3), R50-1.

Fayer R, Ellis W. Paromomycin is effective as prophylaxis for kriptosporidiozis in dairy calves, *Journal of Parasitology*, 1993, 79(5), 771-774.

Fayer R, Gasbarre L, Pasquali P, Canals A, Almeria S, Zarlenga D. *Cryptosporidium parvum* infection in bovine neonates: dynamic clinical, parasitic and immunologic patterns. *International Journal for Parasitology*, 1998a, 28, 49-56.

- Fayer R, Graczyk TK, Lewis EJ, Trout JM, Farley CA.** Survival of infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts in seawater and eastern oysters (*Crassostrea virginica*) in the Chesapeake Bay. *Applied Environmental Microbiology*, 1998b, 64, 1070-1074.
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ.** Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification. *International Journal for Parasitology*, 2000, 30, 1305-1322.
- Fayer R, Santin M, Trout JM, Greiner E.** Prevalence of species and genotypes of *Cryptosporidium* found in 1-2-year-old dairy cattle in the eastern United States. *Veterinary Parasitology*, 2006, 135, 105-112.
- Fayer R, Santin M, Xiao L.** *Cryptosporidium bovis* n. sp. (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) in cattle (*Bos taurus*). *Journal of Parasitology*, 2005, 91, 624-629.
- Fayer R, Trout JM, Jenkins MC.** Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *Journal of Parasitology*, 1998c, 84, 1165-1169.
- Fayer R.** *Cryptosporidium*: a water-borne zoonotic parasite. *Vet Parasitol*, 2004, 126, 37-56.
- Fayer R.** Effect of high temperature on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water. *Applied Environmental Microbiology*, 1994, 60, 2732-2735.
- Feltus DC, Giddings CW, Schneck BL, Monson T, Warshauer D, McEvoy JM.** Evidence supporting zoonotic transmission of *Cryptosporidium* spp. in Wisconsin. *Journal of Clinical Microbiology*, 2006, 44, 4303-8.
- Feneque J.** Brief Introduction to the Veterinary Applications of Nanotechnology. 2003. Available from: www.nanotechnow.com/Jose-Feneque/Veterinary-Applications-Nanotechnology.htm
- Feng Y, Ortega Y, He G, Das P, Xu M, Zhang X, Xiao L.** Wide geographic distribution of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in bovines. *Veterinary parasitology*, 2007, 144(1), 1-9.
- Florence AT, Hussain N.** Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001;50: S69-S89.
- Freitas RA.** Current status of nanomedicine and medical nanorobotics. *Journal of Computational Theoretical Nanoscience* 2005;2:1-25.
- Fujino T, Matsui T, Kobayashi F, Haruki K, Yoshino Y, Kajima J, Tsuji M.** The effect of heating against *Cryptosporidium* oocysts. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2002, 64, 199-200.

- Garber LP, Salman MD, Hurd HS, Keefe T, Schlater JL.** Potential risk factors for *Cryptosporidium* infection in dairy calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1994, 205, 86-91.
- Garcia LS, Shimizu RY.** Evaluation of Nine Immunoessay kits (Enzyme Immunoessay and Direct Fluorescence) for Detection of *Giardia lamblia* and *Cryptosporidium parvum* in Human Fecal Specimens", *Journal of Clinical Microbiology*, 1997, 35(6), 1526-1529.
- Girouard D, Gallant J, Akiyoshi DE, Nunnari J, Tzipori S.** Failure to propagate *Cryptosporidium* spp. in cell-free culture. *Journal of Parasitology*, 2006, 92, 399-400.
- Gobel E.** Diagnose und Therapie der akuten Kryptosporidiose beim Kalb, *Tierärztliche Umschau*, 1987, 42, 863-869.
- Graczyk TK, Cranfield MR, Fayer R, Bixler H.** House flies (*Musca domestica*) as transport hosts of *Cryptosporidium parvum*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 1999, 61, 500-504.
- Graczyk TK, Evans BM, Shiff CJ, Karreman HJ, Patz JA.** Environmental and geographical factors contributing to watershed contamination with *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Environmental Research*, 2000, 82, 263-271.
- Grinberg A, Markovics A, Galindez J, Lopez-Villalobos N, Kosak A, Tranquillo VM.** Controlling the onset of natural kryptosporidiozis in calves with paromomycin sulphate. *Veterinary Record*, 2002, 151, 606-608.
- Geurden, T.** *Cryptosporidium and Giardia in calves in Belgium*. Diss. Ghent University, 2007.
- Guerrant R.L.** Kryptosporidiozis: an emerging, highly infectious threat. *Emerging Infectious Diseases journal*, 1997, 3, 51-57.
- Hammes IS, Gjerde B, Robertson L.** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in dairy calves in three areas of Norway, *Veterinary Parasitology*, 2006, 140, 204 – 216.
- Harp JA, Fayer R, Pesch BA, Jackson GJ.** Effect of pasteurization on infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts in water and milk. *Applied Environmental Microbiology*, 1996a, 62, 2866- 2868.
- Harp JA, Goff JP.** Protection of calves with a vaccine against *Cryptosporidium parvum*. *Journal Parasitol*, 1995, 81, 54-57.
- Harp JA, Jardon P, Atwill ER, Zylstra M, Checél S, Goff JP, De Simone C.** Field testing of prophylactic measures against *Cryptosporidium parvum* infection in calves in a California dairy herd. *American Journal of Veterinary Research*, 1996b, 57, 1586-1588.

- Harp JA, Woodmansee DB, Moon HW.** Resistance of calves to *Cryptosporidium parvum*: effects of age and previous exposure. *Infection and Immunity*, 1990, 58, 2237-2240.
- Heine J.** A simple technic for the demonstration of cryptosporidia in feces. *Zentralbl Veterinarmed*, 1982, B 29, 324-327.
- Heitman TL, Frederick LM, Viste JR, Guselle NJ, Morgan UM, Thompson RC, Olson ME.** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* and characterization of *Cryptosporidium* spp. isolated from wildlife, human, and agricultural sources in the North Saskatchewan River Basin in Alberta, Canada. *Canadian Journal of Microbiology*, 2002, 48, 530-541.
- Henricksen SA, Pohlenz JFL.** Staining of cryptosporidia by a modified Ziehl-Neelsen technique. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 1981, 22, 594-596.
- Hett A.** Small matter, many unknowns. Zurich: Swiss Reinsurance Company 2004.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Morgan UM, Thompson RC.** Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *International Journal of Parasitology*, 2001, 31, 1048-1055.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Ng'anzo M, Ryan UM, Olson ME, Cox PT, Monis PT, Thompson RC.** Complete development of *Cryptosporidium parvum* in host cellfree culture. *International Journal of Parasitology*, 2004, 34, 769-777.
- Hijjawi NS, Meloni BP, Ryan UM, Olson ME, Thompson RC.** Successful *in vitro* cultivation of *Cryptosporidium andersoni*: evidence for the existence of novel extracellular stages in the life cycle and implications for the classification of *Cryptosporidium*. *International Journal of Parasitology*, 2002, 32, 1719-1726.
- Hillery AM, Jani PU and Florence AT.** Comparative, quantitative study of lymphoid and nonlymphoid uptake of 60nm polystyrene particles. *Journal of Drug Targeting*, 1994;2: 151-156.
- Hirsch LR.** A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Analytical Chemistry*, 2003;75 (10): 2377- 2381.
- Hoar BR, Atwill ER, Elmi C, Farver TB.** An examination of risk factors associated with beef cattle shedding pathogens of potential zoonotic concern. *Epidemiology & Infection*, 2001, 127, 147-155.
- Hoet P, Bruske HO.** Nanoparticles – known and unknown health risks. *Journal of Nanobiotechnology*,. 2004;2-12.
- Hoflack G, Geurden T, Daeleman S, Opsomer G, de Kruif A.** The preventive use of concentrated garlic in neonatal calf enteritis caused by *Cryptosporidium parvum*. Abstracts of the 24th World Buiatrics Congress, Nice, France, Octobre 15th-19th 2006, 2006, PS4-089.

Holian DB, Krebs TB, Walsh MH. "Constituency opinion, Ross Perot, and rollcall behavior in the US House: The case of the Nafta", *Legislative Studies Quarterly*, 1997, 369- 392.

Huetink RE, van der Giessen JW, Noordhuizen JP, Ploeger HW. Epidemiology of *Cryptosporidium* spp. and *Giardia duodenalis* on a dairy farm. *Veterinary Parasitology*, 2001, 102, 53- 67.

Hunter JM. Geophagy in Africa and in the United States: a culture-nutrition hypothesis, *Science*, 1985, 228, 1040.

Hunter PR, Hughes S, Woodhouse S, Syed Q, Verlander NQ, Chalmers RM, Morgan K, Nichols G, Beeching N, Osborn K. Sporadic kriptosporidiozis casecontrol study with genotyping. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10, 1241-1249.

Hunter PR, Thompson RC. The zoonotic transmission of *Giardia* and *Cryptosporidium*. *International Journal of Parasitology*, 2005, 35, 1181-1190.

Imre K, Lobo LM, Matos O, Popescu C, Genchi C, Dărăbus G. Molecular characterisation of *Cryptosporidium* isolates from preweaned calves in Romania: is there an actual risk of zoonotic infections?, *Veterinary Parasitology* (2010), 2011, doi:10.1016/j.vetpar.2011.04.042.

Irache JM, Esparza I, Gamazo C, Agüeros M, Espuelas S. Nanomedicine: novel approaches in human and veterinary therapeutics. *Veterinary parasitology*, 2011, 180(1), 47-71.

Israel B, Abbott N, Murphy C, Hollister K, Soltaninassab S, Hansmann D, Acharya BR (inventors) Platypus Technologies LLC assignee. Liquid crystal based analyte detection. US patent on 20100009344. 2010.

Jani P, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. Nanoparticle uptake by the rat gastrointestinal mucosa: quantitation and particle size dependency. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1990;42:821826.

Jarvie BD, Trotz-Williams LA, McKnight DR, Leslie KE, Wallace MM, Todd CG, Sharpe PH, Peregrine AS. Effect of halofuginone lactate on the occurrence of *Cryptosporidium parvum* and growth of neonatal dairy calves. *Journal of Dairy Science*, 2005, 88, 1801-1806.

Jellison KL, Hemond HF, Schauer DB. Sources and species of *Cryptosporidium* oocysts in the Wachusett Reservoir watershed. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68, 569-575.

Jenkins M, Higgins J, Kniel K, Trout J, Fayer R. Protection of calves against cryptosporiosis by oral inoculation with gamma-irradiated *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Journal of Parasitology*, 2004, 90, 1178-1180.

- Jenkins MB, Bowman DD, Fogarty EA, Ghiorse WC.** *Cryptosporidium parvum* oocyst inactivation in three soil types at various temperatures and water potentials. *Soil Biology Biochemistry*, 2002, 34, 1101-1109.
- Jenkins MB, Bowman DD, Ghiorse WC.** Inactivation of *Cryptosporidium parvum* Oocysts by Ammonia. *Applied Environmental Microbiology*, 1998, 64, 784-788.
- Joachim A, Krull T, Schwarzkopf J, Dauschies A.** "Prevalence and control of bovine kriptosporidiozis in German dairy herds", *Veterinary Parasitology*, 2003, 112, 277-288.
- Johnson EH, Windsor JJ, Muirhead DE, King GJ, Al-Busaidy R.** Confirmation of the prophylactic value of paromomycin in a natural outbreak of caprine kriptosporidiozis. *Veterinary Research Communications*, 2000, 24, 63-67.
- Kaske M, Kunz HJ.** Handbuch der Durchfallerkrankungen der Kälber. Osnabrück, Germany: Kamlage Verlag, 2003, Sayfa 9-17, 29-31, 36-80, 109-139.
- Kistemann T, Classen T, Koch C, Dangendorf F, Fischeder R, Gebel J, Vacata V, Exner M.** Microbial load of drinking water reservoir tributaries during extreme rainfall and runoff. *Applied Environmental Microbiology*, 2002, 68, 2188-2197.
- Kreuter J.** Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001: 47(1): 65-81.
- Kumar A, Yadav SK, Yadav SC.** Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2010;75; 1–18.
- Kvac M, Hromadová N, Květoňová D, Rost M, Sak B.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* spp. in pre-weaned dairy calves in the Czech Republic: Absence of *C. ryanae* and management-associated distribution of *C. andersoni*, *C. bovis* and *C. parvum* subtypes, *Veterinary Parasitology*, 2011, 177, 378 – 382.
- Kvac M, Kouba M, Vitovec J.** Age-related and housing-dependence of *Cryptosporidium* infection of calves from dairy and beef herds in South Bohemia, Czech Republic. *Veterinary Parasitology*, 2006, 137, 202-209.
- Lallemand M, Villeneuve A, Belda J, Dubreuil P.** "Field study of the efficacy of halofuginone and decoquinate in the treatment of kriptosporidiozis in veal calves", *Veterinary Record*, 2006, 159, 672–676.
- Landers JJ, Cao Z, Lee I.** Prevention of influenza pneumonitis by sialic acidconjugated dendritic polymers. *Journal of Infectious Disease* 2002;186:1222-30.
- Laurino C, Palmieri B.** Zeolite:“the magic stone”; main nutritional, environmental, experimental and clinical fields of application. *Nutricion Hospitalaria*, 2015, 32.2.

- Learmonth JJ, Ionas G, Ebbett KA, Kwan ES.** Genetic characterization and transmission cycles of *Cryptosporidium* species isolated from humans in New Zealand. *Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70, 3973-3978.
- Lee KB, Lim JH, Mirkin CA.** Protein nanostructures formed via direct-write dip-pen nanolithography. *Journal of American Chemical Society* 2003;125:5588-9.
- Lefay D, Naciri M, Poirier P, Chermette R.** Efficacy of halofuginone lactate in the prevention of kriptosporidiozis in suckling calves. *Veterinary Record*, 2001, 148, 108-112.
- Lengerich EJ, Addiss DG, Marx JJ, Ungar BL, Juranek DD.** Increased exposure to cryptosporidia among dairy farmers in Wisconsin. *Journal of Infectious Diseases*, 1993, 167(5), 1252-1255.
- Leoni L, Desai TA.** Micromachined biocapsules for cell-based sensing and delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2004;56:211-29.
- Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK.** Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice, *Cell*, 1997, 91(2), 197-208.
- Lindsay DS, Woods KM, Upton SJ, Blagburn BL.** Activity of decoquinate against *Cryptosporidium parvum* in cell cultures and neonatal mice. *Veterinary Parasitology*, 2000b, 89, 307-311.
- Lorenzo MJ, Ares-Maz'as ME, Villacorta I.** Detection of oocysts and IgG antibodies to *Cryptosporidium parvum* in asymptomatic adult cattle. *Veterinary Parasitology*, 1993, 47,9-15.
- Lorino T, Daudin JJ, Robin S, Sanaa M.** Factors associated with time to neonatal diarrhoea in French beef calves. *Preventive Veterinary Medicine*, 2005, 68, 91-102.
- Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, Kazmierczak JJ, Addiss DG, Fox KR, Rose JB.** A massive outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* infection transmitted through the public water supply. *New England Journal of Medicine*, 1994, 331, 161-167.
- Maeda T, Nosé Y.** A new antibacterial agent: antibacterial zeolite. *Artificial Organs*, 1999, 23(2), 129-130.
- Maldonado-Camargo S, Atwill ER, Saltijeral-Oaxaca JA, Herrera-Alonso LC.** Prevalence of and risk factors for shedding of *Cryptosporidium parvum* in Holstein Freisian dairy calves in central Mexico. *Preventive Veterinary Medicine*, 1998, 36, 95-107.
- Mancassola R, Reperant JM, Naciri M, Chartier C.** Chemoprophylaxis of *Cryptosporidium parvum* infection with paromomycin in kids and immunological study. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1995, 39, 75-78.

- Mancassola R, Richard A, Naciri M.** Evaluation of decoquinate to treat experimental kriptosporidiozis in kids. *Veterinary Parasitology*, 1997, 69, 31-37.
- Manuja A, Kumar B, Singh RK.** Nanotechnology developments: opportunities for animal health and production, *Nanotechnology Development* 2012;2:e4.
- Martin LD, Krunkosky TM, Dye JA, Fischer BM, Jiang NF, Rochelle LG, Akley NJ, Dreher KL, Adler KB.** "The role of reactive oxygen and nitrogen species in the response of airway epithelium to particulates", *Environmental Health Perspectives*, 1997, 105 (5), 1301.
- Mascaro C, Arnedo T, Rosales MJ.** Respiratory kriptosporidiozis in a bovine. *Journal Parasitology*, 1994, 80, 334-336.
- McAllister TA, Olson ME, Fletch A, Wetzstein M, Entz T.** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium* in beef cows in southern Ontario and in beef calves in southern British Columbia. *Canadian Veterinary Journal*, 2005, 46, 47-55.
- McSweegan E, Walker RI.** Identification and characterization of two *Campylobacter jejuni* adhesins for cellular and mucous substrates. *Infection and Immunity*, 1986,53: 141-148.
- Melenova L, Ciahotny K, Jirglova H, Kusa H, Ruzek P.** Removal of ammonia from waste gas by means of adsorption on zeolites and their subsequent use in agriculture (in Czech), *Chemické listy*, 2003, 97,562-568.
- Meloni BP, Thompson RC.** Simplified methods for obtaining purified oocysts from mice and for growing *Cryptosporidium parvum* *in vitro*. *Journal of Parasitology*, 1996, 82, 757-762.
- Mendonça C, Almeida A, Castro A, Delgado ML, Soares S, Costa JMC, Canada N.** Molecular characterization of *Cryptosporidium* and *Giardia* isolates from cattle from Portugal, *Veterinary Parasitology Porto, Portugal: Elsevier*, 2007.
- Miron D, Kenes J, Dagan R.** Calves as a source of an outbreak of kriptosporidiozis among young children in an agricultural closed community. *The Pediatric infectious disease journal*, 1991, 10.6: 438-440.
- Fallah M, Sedighi F, Abbasalipourkabi R, Maghsood A.** Comparison of the therapeutic effects of anti-*Cryptosporidium* nano nitazoxanide (NZT) with free form of this drug in neonatal rats, European Congress of Clinical Microbiology And Infectious Diseases, 7c, 24 Nisan 2017, Vienna, Austria.
- Mohammed HO, Wade SE, Schaaf S.** Risk factors associated with *Cryptosporidium parvum* infection in dairy cattle in southeastern New York State. *Veterinary Parasitology*, 1999, 83, 1-13.

- Mojzis F, Nistiar G, Kovac G, Mojzisova.** "Preventive Effects of Zeolite in Swerer- Rat Intoxication with Vx-Substance", *Veterinarni medicina*, 1994, 39(8),443-449.
- Mondale KD, Carland RM, Aplan FF.** The comparative ion Exchange capacities of natural sedimentary and synthetic zeolites, *Minerals Engineering*, 1995, 8,535.
- Moon HW, Woode GN, Ahrens FA.** Attempted chemoprophylaxis of kriptosporidiozis in calves. *Veterinary Record*, 1982b, 110, 181.
- Moore DA, Atwill ER, Kirk JH, Brahmbhatt D, Herrera Alonso L, Hou L, Singer MD, Miller TD.** Prophylactic use of decoquinate for infections with *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2003, 223, 839-845.
- Muhid A, Robertson I, Ng J, Ryan U.** Prevalence of and management factors contributing to *Cryptosporidium* sp. infection in pre-weaned and post-weaned calves in Johor, Malaysia, *Experimental Parasitology*, 2011, 127, 534- 538.
- Mumpton FA.** La roca magica : Uses of natural zeolites in agriculture and industry, Proceedings of the National Acedemy of Scienses of the U.S.A., 1999, 96, 3463-3470.
- Naciri M, Mancassola R, Yvoré P, Peeters JE.** The effect of halofuginone lactate on experimental *Cryptosporidium parvum* infections in calves, *Veterinary Parasitology*, 1993, 45(3-4),199-207.
- Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA.** Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* 2003;301:1884-6.
nanoteknolojinedir.com/upload/.../201303190540Nanoteknoloj-ve-uygulamalari.pdf
- Nichols GL.** The biology, epidemiology and typing of *Cryptosporium spp.* PhD thesis, Surrey University, Brighton, 1992.
- Nydam DV, Wade SE, Schaaf SL, Mohammed HO.** Number of *Cryptosporidium parvum* oocysts or *Giardia* spp cysts shed by dairy calves after natural infection. *American Journal of Veterinary Research*, 2001, 62, 1612-1615.
- O'Hagan DT.** The intestinal uptake of particles and the implications for drug and antigen delivery. *Journal of Anatomy*, 1996;189: 477-482.
- O'Handley RM, Olson ME.** Giardiasis and Kriptosporidiozis in Ruminants. Ballweber L. R., Smith R. A. (Editors), *Veterinary Clinics of North America, Food Animal Practice – Ruminant Parasitology*, 2006, 22, 623 – 639.
- O'Handley RM, Cockwill C, McAllister TA, Jelinski M, Morck DW, Olson ME.** Duration of naturally acquired giardiosis and kriptosporidiozis in dairy calves and their association with diarrhea. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 1999, 214, 391-396.

- Oberdorster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R and Kreyling W.** Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology*, 2004,16: 437-445.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J.** Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspectives*, 2005, 113: 823-839.
- Oğuz H, Keçeci T, Birdane Y.O, Önder F, Kurtoğlu V.** "Effect of clinoptilolite on serum biochemical and haematological characters of broiler chickens during aflatoxicosis", *Research in Veterinary Science*, 2000, 69(1),89-93.
- Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL.** Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *Journal of Infectious Diseases*, 1999, 180, 1275-1281.
- Olson ME, Goh J, Phillips M, Guselle N, McAllister TA.** *Giardia* cyst and *Cryptosporidium* oocyst survival in water, soil, and cattle feces. *Journal of Environmental Quality*, 1999, 28, 1991-1996.
- Olson ME, O'Handley RM, Ralston BJ, McAllister TA, Thompson RC.** Update on *Cryptosporidium* and *Giardia* infections in cattle. *Trends in Parasitology*, 2004, 20, 185-191.
- Ortega YR, Bonavia D.** *Cryptosporidium*, *Giardia*, and *Cyclospora* in ancient Peruvians. *Journal of Parasitology*, 2003, 89, 635-636.
- Otto P, Elschner M, Günther H, Schulze F.** Vergleichende Untersuchungen zum Nachweis von Rotaviren, Coronaviren, Kryptosporidien und enterotoxigenen E. coli im Kot durchfallkranker Kälber. *Tierärztl. Umschau*, 1995, 50, 80-86.
- Özer E, Erdoğan SZ, Köroğlu E.** Elazığ yöresinde buzağı ve kuzularda bulunan *Cryptosporidium*'un yayılışı üzerinde araştırmalar, *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 1990, 14, 439-445.
- Panciera RJ, Thomassen RW, Garner FM.** Cryptosporidial infection in a calf. *Veterinary Pathology*, 1971, 8, 479-484.
- Papaioannou D, Katsoulos PD, Panousis N, Karatzias H.** The role of natural and synthetic zeolites as feed additives on the prevention and/or the treatment of certain farm animal diseases: a review. *Microporous and mesoporous materials*, 2005, 84(1), 161-170.
- Parlat SS, Yıldız AO, Oğuz H.** Effect of Clinoptilolite on Performance of Japanese Quail (*Coturnix japonica*) During Experimental Aflatoxicosis, *British Popular Science*, 1999, 40, 495-500.

Patel J, Galey D, Jones J, Ray P, Woodward JG, Nath A, Mumper RJ. HIV-1 Tat-coated nanoparticles result in enhanced humoral immune responses and neutralizing antibodies compared to alum adjuvant. *Vaccine* 2006;24:3564–3573.

Pavelic K, Hadzija M, Bedrica L, Pavelic J, Ćikic I, Katic M, Kralj M, Herak Bosnar M, Kapitanovic S, Poljak-Blazi M, Krizanac S, Stojkovic R, Jurin M, Subotic B, Colic M. Immunostimulatory effect of natural clinoptilolite as a possible mechanism of its antimetastatic ability, *Journal of Molecular Medicine*, 2001, 78, 708.

Pedraza-Diaz S, Amar C, Iversen AM, Stanley PJ, McLauchlin J. Unusual *Cryptosporidium* species recovered from human faeces: first description of *Cryptosporidium felis* and *Cryptosporidium* 'dog type' from patients in England. *Journal of Medical Microbiology*, 2001a, 50, 293-296.

Pedraza-Diaz S, Amar CF, McLauchlin J, Nichols GL, Cotton KM, Godwin P, Iversen AM, Milne L, Mulla, JR, Nye K, Panigrahl H, Venn SR, Wiggins R, Williams M, Youngs ER. *Cryptosporidium meleagridis* from humans: molecular analysis and description of affected patients. *Journal Infection*, 2001b, 42, 243-250.

Peeters JE, Villacorta I, Naciri M, Vanopdenbosch E. Specific serum and local antibody responses against *Cryptosporidium parvum* during medication of calves with halofuginone lactate. *Infection and Immunity*, 1993, 61, 4440-4445.

Peng XH, Qian X, Mao H. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy. *Internal journal of Nanomedicine*, 2008;3:311-21.

Perryman LE, Kapil SJ, Jones ML, Hunt EL. Protection of calves against kriptosporidiozis with immune bovine colostrum induced by a *Cryptosporidium parvum* recombinant protein. *Vaccine*, 1999, 17, 2142-2149.

Polat E, Karaca M, Demir H, Onus AN. Use Of Natural Zeolite (Clinoptilolite) In Agriculture, *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, 2004, 12, 183-187.

Pongs P. Kryptosporidien Infektion beim Kalb Behandlungsversuch mit Lasalocid-Na unter Praxis-bedingungen, *Tierärztliche Umschau*, 1989, 44, 100-101.

Preiser G, Preiser L, Madeo L. An outbreak of kriptosporidiozis among veterinary science students who work with calves. *Journal of American College Health*, 2003, 51, 213-215.

Quigley JD, 3rd Martin KR, Bemis DA, Potgieter LN, Reinemeyer CR, Rohrbach BW, Dowlen HH, Lamar KC. Effects of housing and colostrum feeding on the prevalence of selected infectious organisms in feces of Jersey calves. *Journal of Dairy Science*, 1994, 77, 3124-3131.

- Ralston BJ, Cockwill C, Guselle N, Van Herk FH, McAllister TA, Olson ME.** Prevalence of *Giardia* and *Cryptosporidium andersoni* and their effect on performance in feedlot beef calves. *Canadian Journal of Animal Science*, 2003b, 83, 153-159.
- Robertson B, Sinclair MI, Forbes AB, Veitch M, Kirk M, Cunliffe D, Willis J, Fairley CK.** Case-control studies of sporadic kriptosporidiozis in Melbourne and Adelaide, Australia. *Epidemiology Infection*, 2002, 128, 419-431.
- Robertson LJ, Campbell AT, Smith HV.** Survival of *Cryptosporidium parvum* oocysts under various environmental pressures. *Applied Environmental Microbiology*, 1992, 58, 3494-3500.
- Robinson P, Okhuysen PC, Chappell CL, Weinstock JV, Lewis DE, Actor JK, White AC Jr.** Substance P expression correlates with severity of diarrhea in kriptosporidiozis. *Journal Infectious Diseases*, 2003, 188, 290-296.
- Rodriguez-Fuentes G, Barrios MA, Iraizoz A, Perdomo I, Cedre B.** Enterex: Anti-diarrheic drug based on purified natural clinoptilolite. *Zeolites*, 1997, 19(5-6), 441-448.
- Rommel M, Eckert J, Kutzer E, Körting W, Schnieder T, Boch J, Supperer R.** (Editors), *Veterinärmedizinische Parasitologie* Berlin, Germany: Parey, 2000, ISBN: 3-8263-3178-8, Pp.144 – 147.
- Rosabal BC, Rodriguez-Fuentes G, Simón-Carballo R.** Development and Featuring of the Zeolitic Active Principle FZ: A Glucose Adsorbent, *Zeolites*, 1997, 19(1),47-50.
- Rossignol JF, Kabil SM, el-Gohary Y, Younis AM.** Effect of nitazoxanide in diarrhea and enteritis caused by *Cryptosporidium* species. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 2006, 4, 320-324.
- Roy N, Merrill RM, Thibeault S, Gray SD, Smith EM.** Voice disorders in teachers and the general population: effects on work performance, attendance, and future career choices. *Journal of Speech, Language, and Hearing Research*, 2004, 47(3), 542-551.
- Roy SL, DeLong SM, Stenzel SA, Shiferaw B, Roberts JM, Khalakdina A, Marcus R, Segler SD, Shah DD, Thomas S, Vugia DJ, Zansky SM, Dietz V, Beach MJ.** Risk factors for sporadic kriptosporidiozis among immunocompetent persons in the United States from 1999 to 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, 2004, 42, 2944-2951.
- Rubin DL, Falk KL, Sperling MJ, Ross M, Saini S, Rothman B, Shellock F, Zerhouni E, Stark D, Outwater EK, Schmiedl U, Kirby LC, Chezmar J, Coates T, Chang M, Silverman JM, Rofsky N, Burnett K, Eugel J, Yoring SW.** A Multicenter clinical trial of Gadolite Oral Suspension as a contrast agent for MRI, *Journal of Magnetic Resonance*, 1997, 7, 865-872.

- Ryan U, Fayer R, Xiao L.** Cryptosporidium species in humans and animals: current understanding and research needs. *Parasitology*, 2014, 141.13: 1667-1685.
- Ryan UM, Bath C, Robertson I, Read C, Elliot A, McInnes L, Traub R, Besier B.** Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Applied Environmental Microbiology*, 2005, 71, 4992-4997.
- Sadeghi AA, Shawrang P.** Effects of natural zeolite clinoptilolite on passive immunity and diarrhea in newborn Holstein calves, *Livestock Science*, 2008, 113,307-310.
- Sagodira S, Buzoni-Gatel D, Iochmann S, Naciri M, Bout D.** Protection of kids against *Cryptosporidium parvum* infection after immunization of dams with CP15-DNA. *Vaccine*, 1999, 17, 2346-2355.
- Saini PK, Ransom G, McNamara M.** Emerging Public Health Concerns Regarding Cryptosporidiosis. Veterinary Medicine Today: Public Veterinary Medicine, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 2000, 217, 658-662.
- Sanford SE, Josephson GKA.** Bovine cyptosporidiosis - clinical and pathological findings in 42 scouring neonatal calves. *Canadian Veterinary Journal*, 1982, 23, 343-347.
- Santin M, Trout J.** Livestock. Cyptosporidium and Kriptosporidiozis. Editör: Fayer, R, Xiao, L. New York USA; CRC Press, 2008, Sayfa 458.
- Santin M, Trout JM, Xiao L, Zhou L, Greiner E, Fayer R.** Prevalence and agerelated variation of *Cryptosporidium* species and genotypes in dairy calves. *Veterinary Parasitology*, 2004, 122, 103-117.
- Sardinas JM, Perez M, Coronado G, Romeo JC.** Occurence Properties and Utilization of Natural zeolites. Editörler: Sand, L. B., Mumpton F. A. Havana, Cuba: Pergamon Press, 1991, Sayfa 319-322.
- Sarioğlu M.** Removal of ammonium from municipal wastewater using natural Turkish (Dogantepe) zeolite, *Separation and Purification Technology*, 2005, 41,1-11.
- Savioli L, Smith H, Thompson A.** *Giardia* and *Cryptosporidium* join the 'Neglected Diseases Initiative'. *Trends in Parasitology*, 2006, 22, 203-208.
- Sayers GM, Dillon MC, Connolly E, Thornton L, Hyland E, Loughman E, O'Mahony MA, Butler KM.** Kriptosporidiozis in children who visited an open farm. *Commun Dis Rep CDR Rev*, 1996, 6, R140-144.
- Schimmelpfeng J, Seidel A.** Cytotoxic effects of quartz and chrysotile asbestos: in vitro interspecies comparison with alveolar macrophages, *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1991, 33(2), 131-140.

Schmatz DM, Baginsky WF, Turner MJ. Evidence for and characterization of a mannitol cycle in *Eimeria tenella*, *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1989, 32(2), 263-270.

Schnyder M, Kohler L, Hemphill A, Deplazes P. Prophylactic and therapeutic efficacy of nitazoxanide against *Cryptosporidium parvum* in experimentally challenged neonatal calves, *Veterinary Parasitology*, 2009, 160, 149-154.

Schupfner R, Wagner W, Schneller A. Results of thoracic drainages placed in air rescue, *Interventional Medicine & Applied Science*, 2013, 5(4), 168-174.

Scott NR. Nanoscience in Veterinary Medicine. *Veterinary Research Community* 2007;31:139- 44.

Scott NR. Nanotechnology and Animal Health. *Revue Scientifique Technique Internal Office Epizootics*, 2005; 24:425-32.

Sevinc F, Irmak K, Sevinc M. The prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection in the diarrhoeic and non-diarrheic calves, *Revue de Médecine Vétérinaire*, 2003, 154, 357-361.

Shadiduzzaman MD, Dauschies A. Therapy and Prevention of Kriptosporidiozis, *Veterinary Parasitology*, 2012, 188: 203,214.

Simeonova PP, Toriumi W, Kommineni C, Erkan M, Munson AE, Rom WN, Luster MI. Molecular regulation of IL-6 activation by asbestos in lung epithelial cells: role of reactive oxygen species, *The Journal of Immunology*, 1997, 159(8), 3921-3928.

Sischo WM, Atwill ER, Lanyon LE, George J. Cryptosporidia on dairy farms and the role these farms may have in contaminating surface water supplies in the northeastern United States. *Preventive Veterinary Medicine*, 2000, 43, 253-267.

Slavko I, Ulrich D, Angelika S, Erwin W, Marcus M. Dietary Supplementation With the Tribomechanically Activated Zeolite Clinoptilolite in Immunodeficiency: Effects on the Immune System, *Advances in Therapy*, 2004, 21(2),135-147.

Smith HV, Nichols RA, Grimason AM. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. *Trends in Parasitology*, 2005a, 21, 133-142.

Soppimath KS, Aminabhavi TM, Dave AM. Stimulus-responsive "smart" hydrogels as novel drug delivery systems. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 2002;28:957-74.

Stanley SL, Doris LL. Glyconutritionals: Implications in Antimicrobial Activity. *GlycoScience*, 2000, 1(22): 1-4.

Stantic-Pavlinic M, Xiao L, Glaberman S, Lal AA, Orazen T, Rataj-Verglez A, Logar J, Berce I. Kriptosporidiozis associated with animal contacts. *Wien Klin Wochenschr*, 2003, 115, 125-127.

- Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA.** A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. *European Journal Pharmaceutical Sciences*, 2012. 48(3): p. 416-427.
- Stein PL.** The great Sydney water crisis of 1998. *Water, Air and Soil Pollution*, 2001, 123, 419-436.
- Strachan NJ, Ogden ID, Smith-Palmer A, Jones K.** Foot and mouth epidemic reduces cases of human kriptosporidiozis in Scotland. *Journal Infectious Diseases*, 2003, 188, 783-786.
- Sturdee AP, Bodley-Tickell AT, Archer A, Chalmers RM.** Long-term study of *Cryptosporidium* prevalence on a lowland farm in the United Kingdom. *Veterinary Parasitology*, 2003, 116, 97-113.
- Sulaiman IM, Xiao L, Lal AA.** Evaluation of *Cryptosporidium parvum* genotyping techniques. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, 65, 4431-4435.
- Suzuki Y, Tanihara M, Nishimura Y.** A new drug delivery system with controlled release of antibiotic only in the presence of infection. *Journal of Biomedical Maternal Research*, 1998; 42:112-6.
- Šverko V, Sobočanec S, Balog T, Colić M, Marotti T.** Natural micronised clinoptilolite and clinoptilolite mixtures with *Urtica dioica* L. extract as possible antioxidants. *Food Technology and Biotechnology*, 2004, 42(3), 189-192.
- Şentürk D, Demirel R, Doran İ.** Doğal Zeolitlerin Hayvancılıkta Kullanım Olanakları, *Harran Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 2010, 14,13-20.
- Tanihara M, Suzuki Y, Nishimura Y.** A novel microbial infection-responsive drug release system. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1999;88:510-4.
- Tanriverdi S, Arslan MO, Akiyoshi DE, Tzipori S, Widmer G.** Identification of genotypically mixed *Cryptosporidium parvum* populations in humans and calves. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2003, 130, 13-22.
- Tartera P.** *Cryptosporidium parvum* est présent chez 20 à 50% des veaux diarrhéiques. *L'hebdo Vétérinaire*, 2002, 109, 11-14.
- Taylor S, Qu L, Kitaygorodskiy A, Teske J, Latour RA, Sun YP.** Synthesis and characterization of peptide-functionalized polymeric nanoparticles. *Biomacromolecules*, 2004, 5: 245-248.
- Thomson RCA, Palmer CS, O'Handley R.** The public health and clinical significance of *Giardia* and *Cryptosporidium* in domestic animals, *The Veterinary Journal*, 2008, 177, 18 25.

- Tran TD, Caruthers SD, Hughes M.** Clinical applications of perfluorocarbon nanoparticles for molecular imaging and targeted therapeutics. *International Journal of Nanomed* 2007;2:515-26
- Tsuda E, Goto M, Mochizuki SI, Yano K, Kobayashi F, Morinaga T, Higashio K.** Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1997, 234(1), 137- 42.
- Tzipori S, Angus KW, Campbell I, Gray EW.** *Cryptosporidium*: evidence for a single-species genus. *Infection and Immunity*, 1980a, 30, 884-886.
- Tzipori S, Campbell I, Sherwood D, Snodgrass DR, Whitelaw A.** An outbreak of calf diarrhoea attributed to cryptosporidial infection. *Veterinary Record*, 1980b, 107, 579-580.
- Tzipori S, Smith M, Halpin C, Angus KW, Sherwood D, Campbell I.** Experimental kriptosporidiozis in calves: clinical manifestations and pathological findings. *Veterinary Record* ,1983, 112, 116-120.
- Tzipori S, Ward H.** Kriptosporidiozis: biology, pathogenesis and disease, *Microbes and Infection*, 2002, 4, 1047 – 1058.
- Ueki A, Yamaguchi M, Ueki H, Watanabe Y, Ohsawa G, Kinugawa K, Kawakami Y, Hyodoh F.** Polyclonal human T-cell activation by silicate *in vitro*, *Immunology*, 1994, 82(2), 332-335.
- Upton SJ, Current WL.** The species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) infecting mammals. *Journal of Parasitology*, 1985, 71, 625-629.
- Valcke E, Engels B, Cremers A.** The use of zeolites as amendments in radiocaesium-and radiostrontium-contaminated soils: A soil-chemical approach. Part II: Sr- Ca exchange in clinoptilolite, mordenite and zeolite, *Zeolites*, 1997, 3, 212-217.
- Varughese EA, Bennett-Stamper CL, Wymer LJ, Yadav JS.** A new *in vitro* model using small intestinal epithelial cells to enhance infection of *Cryptosporidium parvum*, *Journal of Microbiological Methods*, 2014, 106, 47-54.
- Viel H, Rocques H, Martin J, Chartier C.** Efficacy of nitazoxanide against experimental kriptosporidiozis in goat neonates, *Parasitology Research*, 2007, 102(1),163-6.
- Villacorta I, Peeters JE, Vanopdenbosch E, Ares-Mazas E, Theys H.** Efficacy of halofuginone lactate against *Cryptosporidium parvum* in calves. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 1991b, 35, 283-287.

- Viu M, Quilez J, Sanchez-Acedo C, del Cacho E, Lopez-Bernad F.** Field trial on the therapeutic efficacy of paromomycin on natural *Cryptosporidium parvum* infections in lambs. *Veterinary Parasitology*, 2000, 90, 163-170.
- Vrzgula L, Prosbova M, Blazovsky J, Jacobi U, Schubert, T, Kovac G.** The effect of feeding natural zeolite on indices of the internal environment of calves in the postnatal period. *Occurrence, Properties and Utilization of Natural Zeolites*, 1988, 747-752.
- Wade SE, Mohammed HO, Schaaf SL.** Prevalence of *Giardia* sp. *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium andersoni* (syn. *C. muris*) in 109 dairy herds in five counties of southeastern New York. *Veterinary Parasitology*, 2000b, 93, 1-11.
- Walker M, Leddy K, Hager E.** Effects of combined water potential and temperature stresses on *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Applied Environmental Microbiology*, 2001, 67, 5526-5529.
- Wang S, Peng Y.** Natural zeolites as effective adsorbents in water and wastewater treatment, *Chemical Engineering Journal*, 2010, 156, 11-24.
- Wen HW, DeCory TR, Borejsza-Wysocki W, Durst RA.** Development of neutravidin tagged liposomal nanovesicles as universal detection reagents in bioassay. *Talanta*, 2006, 68: 1264-1272
- West JL, Halas NJ.** Applications of nanotechnology to biotechnology. *Current Opinion Biotechnology*, 2000;11:215-7.
- Xiao L, Escalante L, Yang C, Sulaiman I, Escalante AA, Montali RJ, Fayer R, Lal AA.** Phylogenetic analysis of *Cryptosporidium* parasites based on the small subunit rRNA gene locus. *Applied Environmental Microbiology*, 1999, 65, 1578-1583.
- Xiao L, Herd RP, McClure KE.** Periparturient rise in the excretion of *Giardia* sp. cysts and *Cryptosporidium parvum* oocysts as a source of infection for lambs. *Journal of Parasitology*, 1994, 80, 55-59.
- Zambriski JA, Nydam DV, Bowman DD, Bellosa ML, Burton AJ, Linden TC, Liotta JL, Ollivett TL, Tondello-Martins L, Mohammed HO.** Description of fecal shedding of *Cryptosporidium parvum* oocysts in experimentally challenged dairy calves, *Parasitology Research*, 2013, 112(3), 1247-54.

EKLER



T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(ADÜ-HADYEK)



Aydın, 22,Aralık 2016

Sayı: 64583101/2016/186

Konu: Başvuru Hakkında Bilgilendirme

Sayın Bülent ULUTAŞ

Kurulumuzda 15 Aralık 2016 tarihinde başvuruda bulunduğunuz, "**Klnoptilolit İçeren Polimer Nanopartiküllerin Cryptosporidium Parvum Üzerine in Vitro Etkinliğinin**" Araştırılması konulu çalışmanız 22. Aralık 2016 tarih XI oturum toplantımızda gündeme alınmış ve değerlendirilmiştir.

Yapılan değerlendirme sonucunda; **canlı hayvan kullanılmadığı için (ADÜ-HADYEK) Hayvan Deneyleri Yerel Etik kurul belgesi'ne** gerekli olmadığı karar verilmiştir. Başvuru dosyanız kaldırılarak arşivlenmiştir.

Gereğini bilgilerinize rica ederim.


Prof. Dr. Mehmet Dinçer BİLGİN
ADÜ-HADYEK Başkanı

ÖZGEÇMİŞ

Soyadı, Adı : Karaoğlu Gamze

Uyruk : TC

Doğum yeri ve tarihi : Şişli/İSTANBUL 13.02.1991

Telefon : 05457990300

E-mail : gamze.krgln@gmail.com

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM

Derece :	Kurum :	Mezuniyet tarihi :
Lise	Nevzat Karalp Anadolu Lisesi DENİZLİ	2009
Lisans	Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi AYDIN	2015