T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOVINE ROTAVİRUSUN SERUMSUZ VASAT VE MİKROTAŞIYICI SİSTEMLERDE ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeliha ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman
Prof.Dr. Sibel YAVRU

.

KONYA -2016

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BOVINE ROTAVİRUSUN SERUMSUZ VASAT VE MİKROTAŞIYICI SİSTEMLERDE ÜRETİMİNİN ARAŞTIRILMASI

Zeliha ARSLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

VETERİNERLİK VİROLOJİSİ ANABİLİM DALI

Danışman

Prof.Dr. Sibel YAVRU

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 14202002 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA -2016

ÖNSÖZ

Rota ve coronavirus nedenli buzağı ishalleri önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadırlar. Yapılan araştırmalara göre ABD' de 1970-1976 yılları arasında yeni doğan buzağı ishalleri nedeniyle 95 milyon dolar/yıl ekonomik kayıp olduğu ve bu değerin 3,1 ve 8,7 milyon dolarının rotavirus enfeksiyonu; 16,7 milyon dolarının ise coronavirus nedenli ishal enfeksiyonları nedeniyle oluştuğu bildirmiştir.

Türkiye'de yeni doğanlarda ishal olgularına bağlı ekonomik kayıplara ait kesin bilgiler bulunmamakla birlikte, rota- ve coronavirus enfeksiyonu ile ilgili çalışmalarda bildirilen enfeksiyon oranları, bu enfeksiyonlara bağlı ekonomik kayıpların küçümsenemeyecek düzeyde olduğunu ortaya koymaktadır.

Doğal enfekte sığırlardan doğan buzağılarda pasif bağışıklığın enfeksiyondan korunmada genellikle yetersiz olması, özellikle enfeksiyonun yoğun olarak görüldüğü işletmelerde erişkin gebe sığırların aşılanması ve kolostrum ile aktarılan antikorlar ile sağlanan pasif bağışıklığa bağlı olarak yeni doğanların enfeksiyondan korunmasının amaçlandığı ticari aşıların kullanımını gündeme getirmiştir.

Sığır rotavirus enfeksiyonunun moleküler epidemiyolojisi konusunda ülkemizde yapılan çalışmalar, enfeksiyondan korunmak için kullanılacak aşıların üretimi ya da ticari aşı tercihleri konusunda verileri ortaya koymuştur. Bu bilgilerden hareketle, ülkemizde rotavirus nedenli enfeksiyonların en aza indirilmesi ve ekonomik kayıpların önlenmesi amacıyla saha suşları ile uyumlu aşı suşlarını içeren bir aşının hazırlanması planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda büyük hacimde rotavirusu üretimi gerçekleştirilmiş ve çalışma ile elde edilen sonuçlar aşı üretimi için bize yol göstereci bir ön çalışma olmuştur.

Bu tez çalışmasında yardım, öneri ve desteğini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Sibel Yavru'ya, yüksek lisans dönemi boyunca yardımını esirgemeyen Arş. Gör. Dr. Oğuzhan Avcı, Araş. Gör. Kamil Atlı ve Araş.Gör. Irmak Dik'e, tez çalışmamın başından sonuna kadar bana her konuda destek olan değerli büyüğüm Dr. Nilay Ünal'a, tez çalışması için gerekli olan tüm laboratuar olanaklarını sunan Dollvet Veteriner Aşı ilaç Biyolojik Madde Üretimi Sanayi ve Ticaret A.Ş yetkililerine, tez çalışmam için herkesten çok sabır gösteren, hep yanımda olan

biricik eşim Zeki Arslan, canım çocuklarım Senasu ve İbrahim Senai Arslan‘a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

SİMGELER VE KISALTMALAR v

ÖZET vi

SUMMARY vii

1. GİRİŞ **1**

1. 1. Genel Bilgiler 1

1. 2. Etiyoloji 2

1 .2. 1. Sınıflandırma 2

1. 2. 2. Morfoloji 2

1. 2. 3. Patogenez 3

1. 2. 4. İmmunoloji 5

1. 2. 5. Tedavi 6

1. 2.6. Kimyasal Durum 7

1. 2 .7. Virusun Üretildiği İn vivo ve İn vitro Sistemler 7

1. 2. 8. Virolojik Teşhis 8

1. 2. 9. Hücre Kültürü Üretimi ve Serumsuz Vasatlar 9

1. 2. 10. Hücre Kültürü Biyoreaktörleri 10

1. 2. 11. Mikro Taşıyıcı Sistemler 12

2. GEREÇ ve YÖNTEM **18**

2. 1. Gereç 18

2. 1. 1. Hücre Kültürü ve Bovine Rota Virus Üretimi İçin Gerekli Vasatlar ve Solüsyonların Hazırlanması 18

2. 1. 2. Toz Vasatların Sulandırılarak Hazırlanması 18

2. 1. 3. Feotal Bovine Serum 19

2. 1. 4. Phospate Buffer Solusyonun Hazırlanması 19

2. 1. 5. Dulbecco’s Phospate Buffer Solusyonunun Hazırlanması 19

2. 1. 6. Trypsin Solusyonunun Hazırlanması 20

2. 1. 7. EDTA % 2 Stok Solusyonunun Hazırlanması 20

2. 1. 8. Antibiyotik Stok Solusyonunun Hazırlanması 20

2. 1. 9. Kontrol Amaçlı Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanması 21

2. 1. 10. Mikro Taşıyıcı Sistemler 21

2. 1. 11. Glikoz – Laktat Kiti 21

2. 2. Yöntem 22
2. 2. 1. Hücre Kültürü Üretimi 22
2. 2. 2. Hücre Muhafazası 22
2. 2. 3. Sterilite Kontrolleri 22
2. 2. 4. Mikro Taşıyıcıların Karakterizasyonu ve Kültür için Hazırlanması 23
2. 2. 5. Hücre Üremesinin Belirlenmesi 24
2. 2. 6. Hücre ve Virus Kültürü Çalışmaları 26
2. 2. 7. Durgun Ortam Çalışmaları 26
2. 2. 8. MTT Analizi 26
2. 2. 9. Hücrelerin Kristal Viole ile Boyanması 28
2. 2. 10. Hücrelerin Giemsa ile Boyanması 28
2. 2. 11. Glikoz ve Laktat Analizleri 28
2. 2. 12. Rota Virusun Üretilmesi ve Titresinin Saptanması 29
2. 2. 13. Üreyen Virusun $DKID_{50}$'sinin Hesaplanması 29
2. 2. 14. Biyoreaktör Çalışmaları 30
3. BULGULAR 33
3. 1. Durgun Ortam Hücre ve Virus Kültürü Çalışmaları 33
3. 1. 1. Mikroskobik İnceleme 33
3. 2. Hücre Sayımı 36
3. 3. MTT Analizi 36
3. 4. Glikoz Tüketimi ve Laktat Üretimi 37
3. 5. Virus Kültürü Çalışmaları 39
4. TARTIŞMA 40
5. SONUÇ ve ÖNERİLER 46
6. KAYNAKLAR 48
7. EKLER 52
EK.A: Anket Formu Etik Kurul Kararı 52
8. ÖZGEÇMİŞ 53

SİMGELER VE KISALTMALAR

BRV:Bovine Rotavirus

CF: Burker faktörü 10000 veya 5000

CPE : Sitopatik etki (Cytopathic effect)

DMSO : Dimetil sülfoksit

Da: Dalton

ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

FAT: Floresan Antikor Tekniği

FBS: Feotal Bovine Serum

MA- 104: Fetal Kidney Rhesus Monkey

µm: Mikrometre

MDBK : Madin Darby Bovine Kidney

MOI : Multiplicity Of Infection (herbir hücreye göre ortalama plak sayısı)

MTT : 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

NWPF : Dokunmamış poliester fabrik disk (Nonwoven polyester fabric discs)

PAGE: Poliakrilamid Gel Elektroforez

PBS : Fosfat tampon çözeltisi (Phosphate buffer solution)

PET : Polietilen teraftalat

RNA : Ribonükleik asit

TCPS : Doku kültürü polistiren (Tissue culture polystyrene)

ÖZET

T.C
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Bovine Rotavirusun Serumsuz Vasat ve Mikrotaşıyıcı Sistemlerde Üretiminin Araştırılması

Zeliha Arslan

Viroloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA- 2016

Bu tez çalışmasında çeşitli serumsuz besi yeri ortamlarında, mikro taşıyıcılı hücre kültürü teknolojisi kullanılarak bovine rotavirusun üremesi incelenmiştir. Çalışmada, PET (Polipropilen örgülerle desteklenmiş) Fibra-cel® disk taşıyıcılar üzerinde üretilen MA 104 hücre kültürü ve bovinerotavirus(BRV) Grup A-B223 VR-1290 kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk aşaması durgun ortamda, Fibra-cel® diskli ve disksiz 24 gözlü TCPS kaplarında gerçekleştirilmiştir. Toplam hücre sayısı ve özgül üreme hızının belirlenmesi için hemositometrik yöntem ve MTT analizi kullanılmıştır. Ayrıca, glikoz tüketimi ve laktat üretimi saptanmıştır.

Çalışmanın ikinci aşaması 0,5 L ve 10 L çalışma hacimli biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Çalışmalarda başlangıç hücre sayısı, taşıyıcı konsantrasyonu ve kültür süresinin hücre ve virus verimi üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Kültürdeki hücre sayıları indirek yöntemler kullanılarak tahmin edilmiştir. Bu amaçla besiyerinin kimyasal analizleriyle glikoz ve laktata ait özgül hızlardan yararlanılmış ve ayrıca hücrelerin üremeleri hücre boyama ile gözlenmiştir.

Çalışmada serumsuz vasatta hücre ve virus üretimin serumlu besi yerleriyle karşılaştırıldığında paralel sonuçlar elde edildiği görülmüştür. Ayrıca serumsuz vasatlarda serum içerenlere göre daha fazla sayıda hücre elde edilmiş ve virus titresinde de buna bağlı olarak daha yüksek titre elde edilmiştir.

Çalışma sonunda mikrotaşıyıcılı, serumsuz besi yeri içeren kültürlerde bovine rotavirus üretiminin daha az işçilik ve malzeme maliyeti olan, kontaminasyon riski düşük ve yüksek verimde gerçekleştirilebileceği saptanmıştır ve bu ön çalışma endüstriyel ölçekli üretime yol gösterecektir.

Anahtar Sözcükler: Bovine rotavirus üretimi, hücre kültürü, mikrotaşıyıcı, serumsuz besi yeri

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The investigation of bovine rotavirus production in serum free media and microcarrier system

Zeliha Arslan

Department of Virology
MASTER THESIS / KONYA-2016

In this study, the production of bovine rotavirus (BRV) was investigated in the serum-freemedia by the micro carrier cell technology. Forth is purpose, MA- 104cellculture growing on Fibra-cel® discs and bovine rotavirus(BRV) Grup A-B223 VR-1290 were used.

The first part of the study was conducted in stationary cultures using 24-well TCPS plates in the presence and absence of Fibra-cel® discs. MTT staining was used forthe quantitative estimation of total cell number and the specific growth rate. Also, the average specific glucose consumption and lactate production rates were calculated.

These second part of the study, were carried out in the bioreactor which has 0,5 Land 10 L working volume. The effects of initial cell density, microcarrier concentration and incubation time on cell and virus yields were investigated. The cell yield was estimated by indirect methods. Indirect methods of cell estimation involve the chemical analysis of a culture media for glucose and lactate concentrations and cell dye.

It was seen that cell and virus production in serum-freemedia were compatableas compared with the media including sera. Furthe rmore, this method also provide high-yield production of bovine rotavirus with advantages of reduction in the cost of laborand materials, easy-to-operate, low contamination risk and hightiter.

Keywords: Bovine rotavirus production, cellculture, microcarrier, serum-freemedia

1. GİRİŞ

1. 1. Genel Bilgiler

Yeni doğan buzağı ishalleri, süt sığırcılığı işletmelerinde yaygın şekilde görülmekte ve önemli ekonomik kayıplara yol açmaktadır. Hastalık çeşitli viruslar, bakteriler, protozoalar, kötü hijyen koşulları, kolostrum alamama ve kötü beslenme gibi çeşitli faktörler sonucu oluşmaktadır (Çabalar 2004).

Yeni doğan buzağı ishallerine neden olan enfeksiyöz etkenler arasında en sık rastlanılanlar rotaviruslardır. Rotavirus enfeksiyonları hayvanlarda viremi dönemi oluşturmadan lokal olarak seyreden bir enfeksiyondur. Enfeksiyonun önlenmesinde, ince bağırsaklarda gelişen lokal bağışıklık etkilidir. Rotavirusa bağlı diyarede risk süresi 14 gün kadardır ve 7-8 günde pik düzeye ulaşır. Bu süre içinde ince bağırsaklarda rotavirusa karşı antirotavirus antikorları salgılanır (Çabalar 2004).

Rotavirusa karşı aşılanmış annelerden elde edilen kolostrumla beslenen buzağılarda pasif bir immunite gelişir (Kuroki ve ark 1997). Kolostrum yolu ile enfeksiyona karsı bir korunma sağlanabilmesi için kolostral antikorların belirli bir titre düzeyine ulaşması gerekmektedir (McNulty 1978, Blood ve ark 1983). Kan dolaşımın (serum)'da bulunan antikorlar ise korunmada o kadar etkili bir role sahip değildir. Bu antikorlar ancak çok yüksek titreye ulaştığı zaman bağırsak lümenine geçebilirler (Besser ve ark 1988). Çabalar ve ark (2000) yaptığı süt sığırcılığı işletmelerinde rotavirus enfeksiyonunun serolojik araştırmalarında rotavirus yönünden seropozitif saptanan tüm sığırların nötralizan antikor titrelerinin geometrik ortalaması 1/15,6 olarak hesaplanırken, isletmelere göre geometrik ortalamaların 1/10,0 ile 1/21,7 arasında oldugu belirlenmistir (Çabalar 2004).

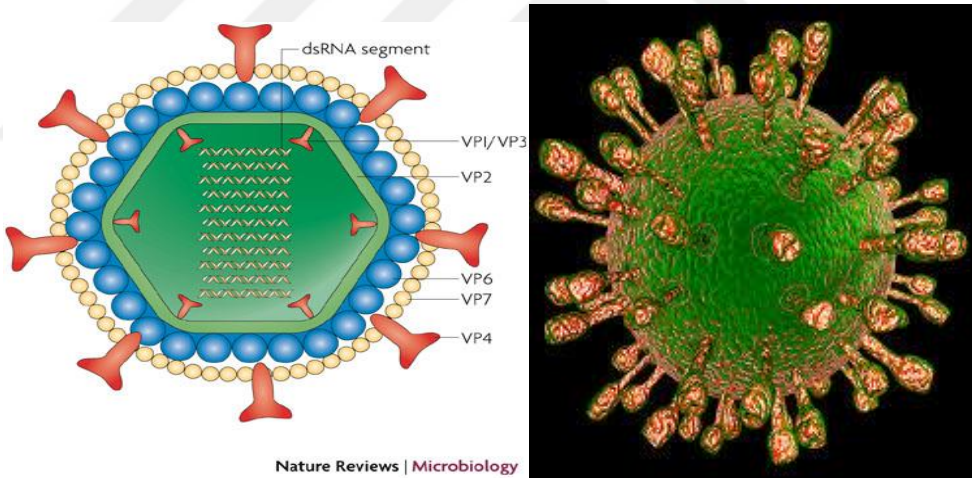
Perk ve ark (2000), buzağıların yaşamlarının ilk günlerinde diyarenin ortaya çıkısını önlemede, buzağı aşılarının kullanımının pratik olmadığını, bu dönemde aktif immunitenin yeterince gelişmediğini tespit etmişlerdir. Ayrıca buzağıların korunmasında en önemli kriterlerin gebe sığırların aşılanması ve yavru doğduktan sonra kolostrumla sağlanan pasif immunitenin olduğunu ifade etmişlerdir.

1. 2. ETİYOLOJİ

1. 2. 1. Sınıflandırma

Rotaviruslar ilk kez Mebus ve ark (1971)'nın, yapmış oldukları bir çalışmada ishalli buzağılardan alınan gaitalar ile kolostrum almamış buzağılarda deneysel olarak enfeksiyonu oluşturmuşlar ve hastalık etkeninin filtre sisteminden geçebildiğini saptamışlardır.

Reoviridae familyası içinde yer alan Rotaviruslar, aynı morfolojik ve biyokimyasal özelliklere sahiptirler. Elektron mikroskop (EM)' ta, kısa çubukları ile merkezi geniş bir araba tekerleğine benzetilmesi nedeniyle bu virusa Latince terminolojide tekerlek anlamına gelen ''rota''ismi verilmiştir (Şekil 1.1.). Morfolojik olarak Reoviridae familyasındaki diğer viruslara benzeyen Rotaviruslar, dış kenarlarının daha belirgin olması ile onlardan ayrılmaktadır (Doneli ve Superti 1994).



Şekil 1.1. Rotavirusun elektron mikroskobik görüntüsü.

1. 2. 2. Morfoloji

Rotaviruslar 60-80 nm boyutlarında, çift katlı ikozahedral protein kapsit (iç ve dış tabaka) ve öz (core) kısmından oluşmaktadır (White ve Fenner 1986). Protein yapısındaki kapsit 32 kapsomerden meydana gelmiştir. Virus ribonükleik asid (RNA)'de bağlı polimeraz içerir. Virusun genomu 11 segmentli çift zincirli RNA (ds RNA)'dır. Virus enfekte ettiği hücrelerin sitoplazmasında replike olur. Virusun invitro kültivasyonunda, dış kapsit polipeptidinin yarılıp infektivitenin artması amacıyla, proteolitik enzimlere (tripsin, elastin) ihtiyaç duyulur (Makabe ve ark

1985). Zarsız olan rotaviruslar, hücre lizisi ile enfekte hücreden ayrılırlar (Estes ve ark 1989).

Rotaviruslar A, B, C, D, E, F ve G olmak üzere 7 farklı gruptan oluşurlar. Grup A, B ve C rotavirusları hem insan hem de hayvanlarda enfeksiyona neden olurken, grup D, E ve F rotavirusları ise sadece hayvanlarda etkilidirler (Paul ve Lyoo 1993). Grup A'da yer alan rotaviruslar VP4 (P tipi) ve VP7 (G tipi) olarak kodlanan iki yüzey proteinine sahiptirler. Her yüzey proteini serotiplendirme, nötralizan antikorların oluşumu ve koruyucu immunitede önemlidir (Lu ve ark 1995). Bugüne kadar, VP7 antijeni için 14 farklı serotip (G1-G14),VP4 antijeni için ise 8 farklı serotip (P1-P8) tanımlanmıştır (White ve Fenner 1986, Lee ve ark 1998).

Çift iplikçikli ve 11 segmentli RNA içeren rotaviruslarda, bu segmentlerin molekül ağırlığı $11x10^6$-$14x10^6$ Dalton (Da) arasında değişmektedir. RNA segmentlerinin dış ölçüleri EM olarak, dört segment sınıfına ayrılmıştır. Daha sonra Poliakrilamid Gel Elektroforez (PAGE) tekniği ile 11 segment, migrasyon kabiliyetlerine göre, 4 adet geniş, 2 adet orta, 3 adet küçük ve 2 adet daha küçük segment olacak şekilde sınıflandırılmıştır (House 1978).

Tüm bu araştırmalara (House 1978) rağmen RNA migrasyon numuneleri bazı rotavirus gruplarından tanımlanabilecek kadar karakteristik değildir. Örnek olarak buzağı rotaviruslarında 11. segment farklıdır ve 6. ile 7. segment arasına yerleşmiştir (Kapikian ve Chonock 1990).

1. 2. 3. Patogenez

İntestinal sistem rotavirusların çoğalma bölgesidir ve virus sadece gaitada bulunur. Enfekte hayvanların gaitalarından %60-80 oranında virus izole edilebilmektedir. Enfekte bir gaita ile 1016 partikül/g virus saçılabildiği tespit edilmiştir. İnsan ve hayvanlarda enfeksiyon, enfekte bireylerle ve kontamine malzemelerle temas sonucu oluşur. Rotaviruslar dışkıda uzun süre kalabilirler (McNulty 1978).

Rotaviruslar ince bağırsaktaki epitel hücrelerini enfekte ederek, hücre transportunun bozulmasına neden olurlar (Blood va ark 1983). Farklı hayvan türleri ile yapılan deneysel enfeksiyonlarda virusun, özellikle ince bağırsağın olgun,

fonksiyonel, absorbsiyon yeteneğine sahip, villi uçlarındaki epitel hücrelerini etkilediği belirlenmiştir (Bridger ve ark 1992).

Rotaviruslar olgun enterositleri etkileyerek villilerin yüzeyine lokalize olurlar. Partiküller sitoplazmada görülür, genellikle endoplazmik retikulum boşluğunu genişletirler. Viruslar, granüler yığınlar veya ince fibriler virus prekürsörleri olarak (viroplasm) bu boşlukların dışında bulunur ve partiküller boşluklardan geçerek serbest kalır. Bazen de endoplazmik retikulumdan tomurcuklanarak zarlı bir yapı kazanabilirler.

Viral çoğalma, çok fazla miktarda hücrenin füzyonu ile villilerin gelişmesine engeleyerek dejeneratif değişikliklerin başlamasına neden olur. Düz ve yassı epitel hücreler, kübik ve jelsi olan enterositler ile yer değiştirirler ve bu tip enfeksiyonlarda mukoza epitelinde, kriptleri gelişmemiş hücreler oldukça fazla miktarda bulunmaktadır. Şiddetli olaylarda villuslar aşınabilir. Patolojik seyir jejunum üzerinden başlayabilir ve ileum boyunca ilerler. Suşlar arasında patojenik varyasyonlar vardır. Bazı suşlar sadece üst jejunum boyunca sınırlı kalırken, diğer suşlar ince bağırsak boyunca ilerleyerek harabiyete neden olurlar (Hall ve ark 1993). Enfeksiyon sırasında görülen ishalin en büyük nedeni, tahrip olan bağırsak hücrelerinin yerini alan olgunlaşmamış hücrelerdeki yetersiz sodyum ve glikoz absorbsiyonu olduğu bilinmektedir. Bu değişikliğe bağlı olarak hayvanlarda ishal, dehidrasyon ve çeşitli metabolik bozukluklar gelişir (Kapikian ve Chonock 1990). İnce bağırsak villilerinin etkilenmesi sonucu bağırsak lümeninde laktaz gibi disakkarit enzimleri azalır ve glikoza bağlı Na taşınması durur (Hall ve ark 1993). İnce bağırsakta enfeksiyona bağlı tahribat şekillenen bölgelerde gelişen laktaz enziminin seviyesindeki azalma, yeni doğan hayvanlarda ve bebeklerde laktoz intolerans şekillenmesini engelleyerek, ishalin şiddetinin artmasına neden olur.

Rotavirusların dıştaki proteini parçalayan bir enzim olarak intestinal kanal epitel hücrelerinde bulunan laktaz miktarının olarak azalması, rotavirusların çoğalma yeteneğinin artmasına neden olur (McNulty 1978). İnce bağırsakta gelişen patolojik değişimler bağırsağın fonksiyonlarını etkiler. Dejenere olan bağırsak epitel hücrelerinin laktazı daha az bulunduran ve olgun olmayan enterositlerle yer değiştirmesi, özellikle jejunumda laktoz sindiren mukoza kapasitesindeki azalmaya neden olarak, diğer laktaz bulunduran enterositlerin kaybına neden olur. Bu şekilde

ince bağırsağın yüzey alanı daralır ve laktozun sindiriminde rol oynayan glikoz ve galaktozun absorbe edilme yeteneği azalır. Gaitadan suyun emilimine engel olan hipertonisite nedeniyle laktoz, kalın bağırsakda birikerek su kaybının artmasına ve bunun sonucu olarak da dehidrasyona katkıda bulunur (Hall ve ark 1993).

1. 2. 4. İmmunoloji

Hayvanlarda doğal bir enfeksiyonu takiben aktif immunite gelişir. İmmunite genellikle serotip spesifiktir. Ayrıca düşük düzeyde heterotipik immunite de gelişmektedir. Humoral, mukozal ve hücresel immunite doğal ve deneysel enfeksiyonu takiben belirlenmiştir. Mukozal immunite, sekresyonda antikorların oluşumu ile ilgili olarak rotavirus enfeksiyonlarına karşı korunmada primer öneme sahiptir. Nötralizan antikorlar, intestinal sistemde rotavirus enfeksiyonlarından korunmada önemlidir. Sekretorik IgA, IgG ve IgM'den daha etkilidir. Çünkü IgA intestinal kanalda proteolitik yıkımlanmaya daha dirençlidir ve birçok hayvan türünde süt sekresyonunda predominant olan immunoglobulindir. Mukozal immunite en iyi şekilde oral immunizasyon ile sağlanır. Kan sirkülasyondaki antikorlar çoğunlukla koruyucu değildir (Paul ve Lyoo 1993).

Rotaviral enfeksiyonlara duyarlı hayvanları korumak amacıyla, anne sütündeki antikorların, laktojenik immunitenin stimule edilmesiyle, artırılması başarılı bir yaklaşım olarak kabul edilmektedir. Rotavirusla aşılanmış gebe ineklerde gelişen laktojenik immunitede, kan ve kolostrumda en yüksek antikor düzeyi aşılandıktan sonra 28-56 gün arasında görülür. Buzağılar, doğumdan sonra 6 gün, sadece kolostral ve laktojenik olarak korunurlar. Aktif immunite, özellikle mukozal immunite, homolog bir serotiple rotavirus enfeksiyonunun tekrarlaması durumunda yaşlı hayvanları korumaktadır (Paul ve Lyoo 1993).

Rotavirus enfeksiyonları hayvanlarda viremi dönemi oluşturmadan lokal olarak seyreder. Enfeksiyonun önlenmesi, ince bağırsaklarda lokal bağışıklığın oluşmasına bağlıdır. Rotavirusun neden olduğu diyare için risk süresi 14 gün kadardır ve 7-8 günde pik düzeye ulaşır. Bu süre içinde ince bağırsaklarda antirotavirus antikorlarının salgılanması veya bulunması çok önemlidir. Kritik dönem süresince antirotavirus antikorları günlük olarak alındığında, gastro-intestinal sistemde antiviral korunma sağlanır. Ayrıca hayvanlara yüksek titrede antiviral

antikor içeren zenginleştirilmiş kolostrum verilerek IgG rezervi oluşturulabilir. Böylece gerekli miktarın günlük olarak bağırsak lümenine transferi ile koruyucu antikor varlığı devam ettirilir. Bu şekilde laktojenik antikorlara bağımlı kalınması engellenmiş olur (Besser ve ark 1988).

Rotavirusa karşı aşılanmış annelerden elde edilen kolostrumla beslenen buzağılarda pasif bir immunite gelişir (Kuroki ve ark 1997). Kolostrum yolu ile enfeksiyona karşı bir korunma sağlanabilmesi için kolostral antikorların belirli bir titre düzeyine ulaşması gerekmektedir (McNulty 1978, Blood ve ark 1983). Ayrıca kan dolaşımında yer alan antikorlar da korunmada etkili bir role sahip değildir. Bu antikorlar ancak çok yüksek titreye ulaştığı zaman bağırsak lümenine geçebilmektedir (Besser ve ark 1988). Perk ve ark (2000), diyarenin buzağıların yaşamlarının ilk günlerinde ortaya çıkışını önlemede, buzağı aşılarının kullanımının pratik olmadığını, bu dönemde aktif immunitenin yeterince gelişemediğini tespit ederek, korunmada en önemli kriterin canlı aşılama ve kolostrumla sağlanabilecek pasif immunite olduğunu ifade etmişlerdir. Enfeksiyöz ajanların neden olduğu hastalıkları engellemek için ineklerin kolostrum ve sütündeki antikorların artınlması ve sürekliliğinin sağlanması gerekir. Bu nedenle buzağının kolostrum ve hiperimmun sütü yeterli miktarda alması teşvik edilmelidir. Laktojenik immunitenin etkin olmasını sağlamak için, gebe ineklere yüksek konsantrasyonda antijen verilmeli, ineklerin kolostrum ve sütünde yeterli miktarda antikor seviyesi oluşturulmalı ve bu antikorların enterik ajanlara karşı yüksek duyarlılık görülen neonatal dönem boyunca günlük alınması sağlanmalıdır, ineklerin E. coli, Rota ve Coronavirus antijenlerini içeren aşılarla aşılanması, kolostrum ve sütte bu patojenlere karşı oluşan özel antikorların miktarını artırmaktadır. Buzağıların, bu antikorlar tarafından korunduğunun ortaya konması, kolostrum ve kan serumunun antikor seviyesinin belirlenmesi ile mümkündür (Güngör ve Baştan 2004).

1. 2. 5. Tedavi

Rotavirus antikor tedavisinde ilk etapta oluşan ishal ve kusma sonucu şekillenen sıvı elektrolit dengesi ve metabolizma bozukluklarının önüne geçmek amacıyla oral ve parenteral sıvı tedavisi yapılmalıdır. Enfeksiyonun sekonder bir bakteriyel ajan olarak oluşabileceği de dikkate alınmalıdır. Çünkü ölüm olaylarının

en büyük nedeni budur. Bu nedenle sıvı tedavisi parenteral olarak antibiyotik tedavisi ile de desteklenmelidir (Blood ve ark 1983).

Canlı attenüe edilmiş ticari buzağı rotavirus aşısı kullanılmaktadır. Bu aşı doğumdan hemen sonra buzağılara oral olarak verilir. Aşı deneysel olarak virulent saha virusu ile etkilenen kolostrum almış buzağıları korumuştur. İnsan ve hayvanlarda enfeksiyon oluşturan rotavirus suşları arasında kros nötralizasyon oldukça zayıftır. Her bir tür için farklı aşıların hazırlanması gereklidir (McNulty 1978, Paul ve Lyoo 1993).

Ayrıca aşılamaya alternatif bir yaklaşım olarak, inaktif aşılarla aşılanmış anneler incelenmiştir. Aşılama sonrasında rotavirusa karşı serumda oluşan nötralizan antikor titrelerinde artış belirlenmiştir. Buzağılarda korunma intestinal boşluklarında kolostral antikor seviyelerinin artması ile mümkündür (McNulty 1978).

1. 2. 6. Kimyasal Durum

Rotavirus enfektivitesi florokarbon ekstraksiyonu, eter ve deoxycholate muamelesi gibi yöntemlerden etkilenmez. Bundan başka viral partiküller tekrarlayan dondurma çözülme, sonikasyon veya 37°C'da 1 saat, oda ısısında (25°C) 24 saat muameleye nispeten dayanıklıdır. Kloroform muamelesi belirgin olmamakla beraber enfektiviteyi düşürür ve hemaglutinasyon aktivitesini yok eder (Donelli ve Superti1994). Viral enfektivite etanol, fenol, formalin (%3), klorin, iodoform (%4) ve lizol(%5) gibi dezenfektanlar tarafından inaktive edilebilir. Sodyum dodesil sülfat (%0.1) enfektiviteyi inaktive eder, fakat noniyonik deterjanlar enfektiviteyi arttırırlar (Donelli ve Superti 1994).

1. 2. 7. Virusun üretildiği in vivo ve in vitro sistemler

Rotaviruslar yaygın olarak MA-104 (Monkey Kidney), MDBK (Madin Darby Bovine Kidney) ve Vero (African Green Monkey Kidney) hücre kültürlerinde üretilmektedir. Genelikle hücre kültürlerinin çoğaltılması hücre tutunması için vasata serum ilave edilir, fakat günümüzde serum elde edilen hayvanlardaki enfeksiyon riski, serumun yapısındaki hayvansal proteinler biyolojik maddelerin kontaminasyon riskini arttırmakta, aynı zamanda da ürünün saflığını etkilemektedir. Etkenin üretilmesinde en duyarlı hücre kültürleri primer hücre kültürleridir. Ayrıca MA-104,

MDBK, Vero, MK-2 (Monkey Kidney), LLC-MK-2 (RhesusMonkey Kidney), BSC-1 (African Green Monkey Kidney), PK-15 (Pig Kidney), CaCO-2 (İnsan Kolon Adenokorsinom Hücresi), HepG2 (Human Hepadoma Hücresi) ve Sekonder Sığır Böbrek Hücreleri diğer duyarlı hücre kültürleri arasında yer almaktadır (Ojeh 1984, Makabe ve ark 1985, Goto ve ark 1986).

Ojeh (1984), ishalli buzağılardan topladığı gaita örneklerinden hazırladığı süspansiyonu MA-104 hücrelerine inokule ederek virusu üretmeyi başarmıştır. Araştırmacı (1984) fekal inokulumu hazırlamadan önce tripsin ile muamele etmiş ve idame vasatın içine de ilave olarak tripsin eklemiştir. Bovine rotavirus saha suşlarının sürekli olarak hazırlanması için MA-104 hücrelerinin kullanılmasını önermiştir.

1. 2. 8. Virolojik Teşhis

Rotaviruslar tarafından oluşturulan enfeksiyonların teşhisi amacıyla kullanılan metotlar arasında Immuno Elektron Mikroskobi (IEM) (Cheung ve ark 1982, Benfield ve ark 1984, Athanassious ve ark 1994, Burgu ve ark 1995, Greig ve ark 2006), Floresan Antikor Tekniği (FAT) (Benfield ve ark 1984, Dea ve ark 1984), Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (Hammand ve ark 1982, Rubenstein ve Miller 1982, Reynold ve ark 1984, Moosai ve ark 1985, Edwards ve ark 1987, Garcia-Sanchez ve ark 1993, Ekik 2002, Roman ve Martinez 2005), Agar Gel Presipitasyon (AGP) (Shah ve Jhala 1990), Hemaglutinasyon Inhibisyon (HAI)(Burgu ve Akça 1983, Murakami ve ark 1987, Piednoir ve ark 2003), Poliakrilamid Jel Elektroforez (PAGE) (Edwards ve ark 1987, Singh ve Pandey1988, Garcia-Sanchez ve ark 1993, Kebaabetswe ve ark 2005), Lateks Aglutinasyon(LA) (Jensen 1985, Moosai ve ark 1985, Sukura ve Neuvonen 1990, Jyothirlatha ve ark 1992, Pazdiora ve ark 2002), Reverse Pasif Hemaglutinasyon(RPHA) (Sanekata ve ark 1982, Edwards ve ark 1987, Alkan ve ark 1992, Fujii ve ark 2000), Immuno Peroksidaz (IP) (Weber ve ark 1992), Polimeraz Chain Reaksiyonu (PCR) (Hussein ve ark 1995), Komplement Fikzasyon (CF) (Nagano ve ark 1984) testleri önemli yer tutmaktadır. Serum Nötralizasyon (SN) testi de serolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (Schlafer ve Scott 1979, Burgu ve Akça 1983, Yazıcı ve Akça 1993, Ekik 2002).

1. 2. 9. Hücre Kültürü Üretimi ve Serumsuz Vasatlar

Viral aşıların üretiminde hücre kültürleri 1940-50'li yıllarda kullanılmaya başlamıştır. Hücre kültürlerinin üremesi, çoğaltılması ve farklılaştırılmaları için suni çevre koşullarına gereksinim vardır. Hücre kültürü vasatları;

1- Fiziko-kimyasal şartların (pH ve osmolarite) devamını sağlar,

2- Hücrelerin ve hücre ürünlerinin sentezi için gerekli yapı maddelerini sağlar.

Her hücre tipinin besin ihtiyacı farklıdır. Hücre kültürü yapan kişinin çalıştığı hücreyi tanıması başarılı bir kültür için gereklidir ve her hücrenin varlığını sürdürebilmesi için gerekli olan maddeler birbirinden farklıdır (Falkner ve ark 2006).

Hücre kültürlerinde kullanılan ticari vasatlar, komponentleri formüle göre ilave edilmiş, kullanıma hazır toz veya sıvı halde ya da formülasyonundaki komponentler üretici firma tarafından ayrı ayrı hazırlanmış halde kullanılır. Hücre kültürü vasatlarında komponentler suda eriyebilir olmalı, toksik madde içermemeli, stabil olmalıdır (Freshney 2005).

Serum, vasat bileşimine sudan sonra giren en önemli maddedir. Doku ve hücre kültürlerinde en çok hayvan orjinli (at, dana, koyun, domuz, keçi) serumlar kullanılır. Serumlar kültürü yapılacak hücre tipine göre seçilmeli, hangi tip hücre ile çalışılacaksa o hücreye homolog serum alınmalıdır. Hücre kültürlerinde en fazla kullanılanlar yeni doğan buzağı serumu [New Born Calf Sera (NBCS)] ve foetal dana serumu [Foetal Bovine Sera(FBS)]'dur ve hepsinin içeriği farklıdır (Freshney 2005).

Serumlar in vitro ortamı hücreler için, in vivo ortama yakın hale getirdiği için hücre kültürlerinde sıklıkla kullanılır. Fakat serumların orijininden kaynaklanan istenmeyen bazı kontaminantları, içeriğinin tam olarak tespit edilememesi, çok kolay elde edilemeyişleri, maliyetinin yüksek oluşu ve raf ömrünün kısa olması gibi nedenler kullanımını sınırlar. Serumun bu kadar dezavantajının olması araştırıcıları serumsuz kültürlerle çalışmaya yönlendirmiştir (Freshney 2005).

Serumsuz vasatlar çalışılacak hücre tipine bağlı olarak değişiklik gösterir. Serumsuz vasatlar, bileşiminde serum bulunmayan, serumda bulunan maddelerin hücrenin ihtiyacına bağlı olarak, dışarıdan ve gereken miktarlarda ilave edilmesi ile

hazırlanan ortamlarıdır. Serum içinde bulunan proteinler yerine rekombinat proteinler kullanılır ve bu proteinler sentetik olarak mikrobiyal kaynaklardan ve bitkilerden sağlanır (Delioglu ve Ozdural 1990).

Serumsuz vasatların birçok tipi vardır. Bunlara hiçbir hayvansal madde içermeyen veya hiç protein içermeyen vasatlar örnek gösterilebilir. Serumsuz vasatlar geniş spektrumda yarar sağladıkları ve içerikleri kontrol edilebildiği için birçok araştırıcı tarafından yaygın olarak kullanılırlar (Freshney 2005).

Serumsuz vasatlar bazal ortam ve bazı katkı maddeleri içerir aynı zamanda hücreye özel formüle edilebilirler. Serumsuz vasat ortamlarında;

1. Transforme hücreler, transforme olmayanlara göre daha kolay ürerler,
2. Hibridoma ve miyelomalar genelde serumsuz vasatlarda daha kolay ürerler,
3. Yüzeye bağımlı hücreler, bu ortamlara farklı yanıt verirler,
4. Üreme genellikle daha yavaştır, bazen fenotipik değişimler de görülebilir.

Ayrıca serumsuz vasatların;

1. İçeriği tam olarak bilinir,
2. Hücrenin ihtiyacına bağlı olarak gereken maddeler ortama ilave edilir,
3. Raf ömrü nispeten uzundur,
4. Kontaminasyon riski azdır,
5. Çeşitlerinin çok olması özel istekleri olan hücrelerle çalışmayı kolaylaştırır.

1. 2. 10. Hücre Kültürü Biyoreaktörleri

1970'li yıllardan itibaren büyük ölçek hücre kültürü çalışmaları insan ve hayvan sağlığını ilgilendiren ürünlerin üretiminde önem kazanmaya başlamıştır (Wang ve ark 2002). Daha sonra bu çalışmalar en verimli şekilde hücre üretimini sağlayabilecek uygun çevresel faktörlerin tanımlanması ve geliştirilmesi üzerinde yoğunlaşmaya başlamıştır. Bu amaçla araştırmalar büyük ölçekte kimyasal olarak tanımlanmış vasat ve en uygun fizikokimyasal faktörlerin (pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen vs.) belirlenmesine yönelik olarak gelişmiştir (Wang ve ark 2002). Bu çalışmaların sonucunda çevresel koşulları kontrol edecek bazı araç ve gereçler de

kullanılarak, biyoteknoloji uygulamalarında bugünlerde sıklıkla kullanılan biyoreaktörler geliştirilmiştir (Wang ve ark 2002).

Biyoreaktörler yeterli hücre üremesi ve ürün biyosentezini sağlayabilmek için aşağıda belirtilen bazı özelliklere sahip olmalıdır (Wang ve ark 2002):

1. Vasatın asit-baz dengesi (pH) kontrol edilebilmelidir,
2. Sıcaklık kontrolü yapılabilmelidir,
3. Oksijen ihtiyacını karşılamak ve birikmiş CO_2'i uzaklaştırmak için uygun gaz alışverişi sağlamalıdır,
4. Uygun formülasyonda hazırlanmış vasatın kültür ortamına ilavesine izin vermelidir,
5. Yüzey bağımlı hücreler için yeterli yüzey alanı sağlamalıdır,
6. Kontaminasyonlardan (mikroorganizma, virus diğer hücre) kaçınacak şekilde aseptik koşulları sağlamalıdır.

Biyoreaktör sistemlerde temel amaç, reaktör içi çevresel faktörlerin hücre üremesini etkileyecek şekilde değişimini önlemek için homojen bir fizikokimyasal çevre oluşumunu sağlamaktır. Biyoreaktörler bu nedenle çeşitli proplar, sensörler ve kontrol sistemleri ile donatılmıştır. Biyoreaktörlerin birçoğu ya canlı organların taklit edilmesi ya da mikrobiyal fermentasyonda sıklıkla kullanılan fermentörlerin hayvansal hücre kültürü için modifiye edilmesi ile geliştirilmiştir (Wang ve ark 2002).

Bütün hücre kültürü sistemleri katı faz (hücre), sıvı faz (vasat) ve son olarak gaz fazı (Biyoreaktörlerde gazların kullanımı) kimyasal reaksiyonlarla ortaya çıkan CO_2'in (Asidik bir gaz olması nedeni ile pH'ı düşürür) süpürülmesi, şayet oksijensiz bir ortamda veya yüksek oksijen seviyesi istenmeyen üretimlerde O_2'nin azot (N_2)ile süpürülmesi. Aerobik koşullarda üreyen hücreler için ise tüketilen oksijenin gaz fazdan sıvı faza aktarımı ile oksijenlendirme yapılmasıdır. Böylece optimum atmosferin oluşturulmasıdır. Bu gazlar özellikle Oksijen genellikle saf olarak kullanılmaz aksi halde oksidatif etkileri nedeni ile üretimi yapılacak kültüre zarar verir ve besiyeri içindeki bazı maddeleri oksitleyerek özelliklerinin bozulmasına neden olacağından steril filtreden geçirilerek taşıyıcı görevi yapan hava ile birlikte kullanılır. Hava sistemi sürekli beslenirken O_2 gazı ile ihtiyaca göre zenginleştirme yapılır. Fazların en az ikisinden oluşan çok fazlı sistemlerdir. Hücre kültürü

biyoreaktörleri çeşitli kriterlere göre farklı şekillerde sınıflandırılabilirse de bunlardan en çok kullanılanı, sistemin homojenite durumuna göre yapılan sınıflandırmadır. Buna göre biyoreaktörleri genel olarak, hücrelerin vasat içerisinde süspanse bir şekilde dağıldığı homojen biyoreaktörler ve hücrelerin reaktörün her tarafına homojen şekilde dağılmamış olarak tutulduğu heterojen biyoreaktörler olarak sınıflandırmak mümkündür. Çizelge 1.1.'de sistem homojenizasyonuna göre biyoreaktör türleri listelenmiştir.

Çizelge 1.1. Sistem homojenizasyonuna göre biyoreaktörlerin sınıflandırılması.

Homojen Biyoreaktörler	**Heterojen Biyoreaktörler**
Karıştırmalı Tank Biyoreaktörler	Dolgulu Yataklı Biyoreaktörler
Hava Kaldırmalı Biyoreaktörler	Akışkan Yataklı Biyoreaktörler
Dalgalı Biyoreaktörler	Hollow-fiber Biyoreaktörler Yüzey bağımlı hücreler için diğer biyoreaktörlerDöner şişeler, CellCube®, Cell Factory vs

1. 2. 11. Mikrotaşıyıcı sistemler

Yüzeye bağımlı hücrelerin hafif karıştırmayla süspanse halde tutulan küçük kürecikler üzerinde üretilmesi fikri ilk olarak 1967'de iyon değişim kromatoğrafi çalışmalarında kullanılan N,N-dietil-aminoetilamin (DEAE)-Sephadex A50TM (GE Healthcare) jel küreciklerinin Van Wezel(1967) tarafından kullanılmaya başlamasıyla ortaya atılmıştır. Araştırıcı (1967) birkaç yıl sonra bu yolla üretmiş olduğu hücre kültürlerinden inaktif çocuk felci aşısı üretimini gerçekleştirerek büyük bir aşama kaydetmiştir.

Günümüzde çok çeşitli materyallerden yapılmış oldukça fazla sayıda mikrotaşıyıcı mevcuttur. Ayrıca özellikle virus üretimi olmak üzere, rekombinant proteinler, monoklonal antikorlar ve gen terapi vektörlerinin üretiminde 6.000 L hacime kadar ulaşabilen reaktörlerde (CytodexTM mikrotaşıyıcılarında Vero hücreleri kullanılarak grip aşısı üretimi) kullanıma girmiştir (Birch ve Racher 2006).

Mikrotaşıyıcı ile ilgili araştırmalarda ikinci önemli dönüm noktası, kullanılan büyük gözenekli küreciklerin içerisinde, mekanik etkilerden uzak kalan hücrelerin yüksek verimle üretilmesine başlanmasıdır.

Mikrotaşıyıcıların hemen hemen hepsi gözenekli yapıda olmalarına rağmen bu gözeneklerin çaplarına göre mikrotaşıyıcıları mikrogözenekli (microporous) ve makrogözenekli (macroporous) olarak ikiye ayırmak mümkündür (Fassnacht ve Porter 1999, McTaggart ve Al Rubeai 2000).

Mikrogözenekli mikrotaşıyıcılar

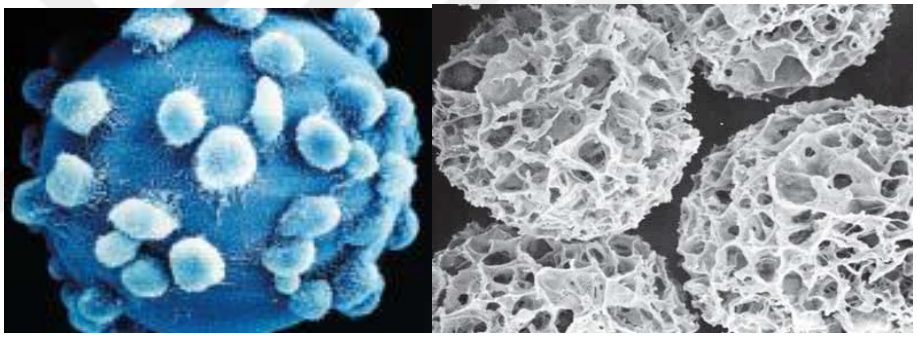
Bazı araştırmacılar tarafından gözeneksiz olarak da tabir edilebilen bu taşıyıcıların gözenek çapı çok küçüktür (Şekil 1.2.a). Hücrelerin bu gözeneklerden içeriye girmesi mümkün olmadığından, taşıyıcının dış yüzeyinde monolayer tarzda tutunarak üreyebilirler. Bu tür taşıyıcılarda hücre üremesi için gerekli yüzey alanı taşıyıcının dış yüzey alanı ile sınırlıdır. Bu durum kültür süresince taşıyıcıların birbirlerine çarpmalarından kaynaklanan mekanik zararlara yol açabilmektedir (Fassnacht ve Porter 1999, McTaggart ve Al Rubeai 2000).

Çoğu mikrogözenekli taşıyıcının çapı 90–300 mikrometre(μm) arasında değişmekte olup gözenek çapı 10-20 μm ve özgül ağırlıkları ise 1,02–1,04 g/cm^3'tür. Özgül ağırlıkları genel olarak vasatın yoğunluğundan biraz yüksektir. Böylelikle bu taşıyıcıların düşük karışım hızlarında dahi vasatın içerisinde homojen bir şekilde dağılımları sağlanmış olur.

Makrogözenekli mikrotaşıyıcılar

Makrogözenekli taşıyıcılar genellikle 0,4–5 mm çapında olup özgül ağırlıkları 1,03-4,40 g/cm^3 ve gözenek büyüklükleri ise 10–400 μm aralığında değişken bir yapı gösterirler. Hücreler bu gözeneklerden kolaylıkla taşıyıcının iç kısımlarına girerek oralarda tutunup üç boyutlu (3D) şekilde çoğalabilirler (Rupp 1985). Ayrıca büyük çaplı taşıyıcılar, karıştırmanın durması halinde yerçekimine bağlı olarak dibe çökerler. Bu durum rekombinant proteinler gibi hücresel ürünlerin hücre kaybı olmaksızın vasat ile birlikte kültür ortamından alınmasına yardımcı olur (Reuveny 1990).

Bu tür taşıyıcılar hücrelerin doğal ortamlarına çok benzer. Makrogözenekli mikrotaşıyıcılar (Şekil 1.2.b) hücrelerin üç boyutlu ortamlarda üretilebilmesi ve yüksek hücre sayısına ulaşabilmek amacıyla geliştirilmiştir (Rupp 1985). Hücrelerin üç boyutlu ortamda üretilmeleri, bazı büyüme faktörlerini kendi kedilerine üretmelerini sağlayarak, serum gereksiniminin azalmasına ve hatta serumsuz vasat kullanımına izin vermektedir. Bu yolla üretilen hücrelerin metabolizma faaliyetlerinin daha düzenli olduğu, mikrogözenekli taşıyıcılarda üretilen hücrelere göre daha dayanıklı oldukları, daha uzun süre kültüre edilebildikleri ve düşük mekanik hasarlardan dolayı daha az kayıp yaşandığı bildirilmektedir (Rupp 1985). Bu tür taşıyıcılar için en büyük problem, özellikle büyük ölçekli çalışmalarda, homojen çevre sağlama zorluğu, besin maddeleri ve oksijenin taşıyıcı içindeki kütle transferi kısıtlamalarıdır (Rupp, 1985). Ayrıca, hücre sayımı ve hücre pasajı için tripsin ile muamele edilen taşıyıcılardan mevcut hücrelerin önemli bir kısmının geri kazanımı da mümkün değildir (Aslankaraoğlu 1999).



a b

Şekil 1.2. a. Mikrogözenekli mikrotaşıyıcılar, b. Makrogözenekli mikrotaşıyıcılar.

Dokunmamış poliester fabrik [Non Woven Poliester Fabrik (NWPF)] mikrotaşıyıcılar

Doku mühendisliği çalışmalarında gerek in vivo gerekse de in vitro olarak hücrelerin kendi mikro çevrelerine benzer bir ortamda üç boyutlu olarak üremesine yardımcı olan dokunmamış poliesterfabrikler (3 boyutlu bir mikroçevre sağlayan, yüksek yüzey alanına, mükemmel kimyasal ve mekanik özelliklere sahip diskler), hücre kültürü çalışmalarında (saf ve yoğun monoklonal antikor üretiminde), başarıyla kullanılmaktadır (Aslankaraoğlu ve ark 2001).

Bu mikrotaşıyıcılar fiber temelli olup oldukça gözenekli (%95'ten büyük) bir yapıya sahiptirler. Kültür ortamında bozulmaya uğramayan bu dokunmamış

fiberlerden oluşan fabriklerin fiber çapı genellikle 10-20 μm olup, değişik sentetik polimerlerden elde edilebilirler. Günümüzde, bu tür polimerlerden, özellikle polietilen teraftalat (PET) bazlı fiberler yaygın olarak kullanılmaktadır (Aslankaraoğlu 1999).

Dokunmamış poliester fabrikler hücrelerin fiber yüzeyine tutunmalarını sağlamak için, yüzey yükünün değiştirilmesi amacıyla, ya fiziksel olarak plazma polimerizasyonuna ya da kimyasal modifikasyon işlemlerine maruz bırakılırlar. Ticari olarak satılan NWPF'ler plazma polimerizasyonuna maruz bırakıldıklarından kimyasal modifikasyona gerek yoktur (Aslankaraoğlu 1999).

Çizelge 1.2. Günümüzde ticari olarak üretilen bazı mikrotaşıyıcı türü ve bunlara ait bazı bilgiler (Ergin 2010).

	Firma	Yapısı	Yoğunluk,g/cm3	Çap, μm
DEAE Dekstran				
Cytodex 1	A Amersham Pharmacia	DEAE-dekstran	1,03	160–230
Cytodex 2	Amersham Pharmacia	DEAE- dekstran	1,04	115–200
Microdex	Dextran Products	DEAE- dekstran	1,03	150
Plastik				
Acrobeads	Galil	Kaplanmış poliakrolein	1,04	150
Biosilon	Nalge Nunc	İşlenmiş polistiren	1,05	160–300
Biocarriers	Biorad	Poliakrilamit/DMAP	1,04	120–180
Bioplas	Whatman, Cellon	Polistiren	1,04	150–210
Cytospheres	Lux	İşlenmiş polistiren	1,04	160–230
Rapidcell P	ICN	Polistiren	1,02; 1,03	90–210
Fibracel	New Brunswick sci..	PET	1,04	Fiber
Jelatin				
Ventregel	Ventrex (Bayer)	Jelatin	1,03	150–250
Cytodex 3	Amersham Pharmacia	Jelatin –dekstran kaplı	1,04	130–210
Cultisphere-G	Sigma	Jelatin	N/A	120–180
Cultisphere-GL	Sigma	Jelatin	N/A	150–330
Cultisphere-S	Sigma	Jelatin	N/A	120–180
Glass				
Bioglas	Whatman, Cellon	Cam- plastik kaplı	1,03	150–210
BioSPEX GlasSPEX	JRH Biosciences	Cam- polistiren kaplı	1,02;1,03; 1.04	90–210
Rapidcell G	ICN	Cam	1,02; 1,03	90–210
Ventreglas	Ventrex (Bayer)	Cam	1,03	90–210

Glass	Sigma	Cam	1,03; 1,04	95–210
Selüloz				
DE-52/53	Whatman	DEAE-Selüloz	1,03	Fiber
Kollajen/kollajen kaplı				
BioSPEX	JRH Biosciences	Kollajen polistiren kaplı	1,02; 1,03; 1,04	90–210
Cytodex 3	Amersham Pharmacia	Kollajen	1,04; 1,04	130–210
Rapidcell C	ICN	Kollajen kaplı	1,02; 1,02; 1,03	90–210
Biospheres	Whatman, Cellon	Kollajen kaplı	1,02; 1,02	150–210

Dokunmamış poliester fabrikler değişik boyutlarda kesilerek doku kültürü polistiren [(TCPS)](Tissue Culture Polystren) kaplar ve döner şişelerin tabaka şeklinde kaplanmasıyla kullanılabileceği gibi, özellikle dolgulu biyoreaktörlerde de etkin bir şekilde kullanılabilmektedir (Kadouri ve ark 1989). Günümüzde dolgulu reaktör çalışmalarında kullanılan NWPF'ler ticari (FibraCel® ve BioNOC®)olarak piyasada bulunur (Aslankaraoğlu 1999).

Hücrelerin NWPF disklere tutunma süresinin 2-4 saat gibi kısa bir süre olması bu taşıyıcıların önemli özelliklerindendir.

Dokunmamış poliester fabrikler ile yürütülen çalışmalarda ‘‘yüzey alanı/hacim’’oranları'nın oldukça yüksek olduğu ve bu nedenle hücre sayısı ve üretkenliğin diğer mikrotaşıyıcılara göre yaklaşık 10 kat artabildiği bildirilmiştir. Özellikle virus ve protein yapısındaki çeşitli hücresel ürünlerin üretimi çalışmalarında kullanımı oldukça yaygındır (Kadouri ve ark 1989). NWPF kullanılarak DA 4.4 ve 123 A gibi hibridoma hücreleri; fibroblast fare embriyo hücresi (3T3), insan embriyo akciğer fibroblast hücresi (MRC-5), hamster böbrek hücresi (BHK), Afrika yeşil başlı maymun böbrek hücresi (VERO), Çin hamster ovaryum hücresi (CHO) ve insan embriyo böbrek hücresi (HEK 293) gibi yüzeye bağımlı hücreler ile solucan hücresi (SF-9) ve tırtıl hücresi (Hi-5) gibi insekt hücrelerinin üretildiği bildirilmektedir.

Çizelge 1. 3. Fibra-cel® disk taşıyıcılara ait bazı bilgiler.

Yapı malzemesi	**PET (Polipropilen örgülerle desteklenmiş)**
Disk kalınlığı	0,431 mm
PP destek kalınlığı	0,508 mm
Disk çapı	6 mm
Yoğunluk	1,037-1,040 g/cm3
Toplam yüzey alanı	1200 cm2/g disk
Disk ağırlığı	0,00572 g
1 gramda bulunan disk sayısı	175 adet
Otoklavnabilirlik	Evet
Fiber çapı	14-20 μm
Porozite (εmatrix)	0,90
İnokulum yoğunluğu	0,2-1x 106 hücre/mL
Maksimum hücre sayısı	6x108 hücre/g disk
Kullanılabilen hücre tipi	Süspanse ve yüzey bağımlı hücreler

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2. 1. GEREÇ

2. 1. 1. Hücre Kültürü ve Bovine Rotavirus Üretimi İçin Gerekli Vasatlar ve Solüsyonların Hazırlanması

Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM)

Ticari olarak toz şeklinde temin edildi (Gıbco, Cat: 52100-021, Lot: 1249764, Londra, İngiltere). Üretici firmanın bildirdiği yönteme göre hazırlandı.

BHK 21 cell serum free medium(BSFM)

Serumsuz vasat olarak formüle edilmiş, ticari olarak toz şeklinde temin edildi (Skywıng, Cat: SAF 200-25 L, Lot: 120504 Çin). Üretici firmanın bildirdiği yönteme göre hazırlandı.

Iscove basal medium

Steril, serumsuz ve sıvı olarak formüle edilmiş hazır vasat ticari olarak temin edildi (Biochrom AG, Cat: F0465, Lot:0635X Almanya)

Serum and protein free medium (PFEK-1)

Steril, serumsuz ve sıvı olarak formüle edilmiş hazır vasat ticari olarak temin edildi (Biochrom AG, Cat: F8045, Lot:0414B Almanya).

2. 1. 2. Toz Vasatın Sulandırılarak Hazırlanışı

Ticari olarak satın alınan toz vasatlar 10 litre ultrapure su ile sulandırıldı. 3-4 saat boyunca oda ısısında magnetik karıştırıcı ile karıştırılarak eritildi. Vasatın pH'sı sodium hidrojen karbonat ($NaHCO_3$) ile 7,2-7,4 olacak şekilde ayarlandı. 0,45µm + 0,2µm membran filtrelerden geçirilerek steril edilen vasatlar bakteriyel ve fungal kontaminasyonlar yönünden kontrolleri yapıldı. Steril olanlar kullanılıncaya kadar +2°C/+8°C'de muhafaza edildi.

Hazır, steril sıvı vasatlar ise direk olarak kullanıldı.

2. 1. 3. Foetal Bovine Serum

Bu amaçla gama ışınları ile muamele edilmiş, steril foetal bovine serum kullanıldı (Biochrom AG, cat no: S0115, lot no: 0011X Almanya). DMEM hücre ve virus üretme vasatlarına %2-10 oranlarında FBS ilave edildi.

2. 1. 4. Phosphate Buffer Solüsyonu (PBS) g/l Hazırlanması

Aşağıda belirtilen toz halindeki kimyasallar ayrı ayrı eritildi, 0,22 µm por çaplı milipor filtrelerden süzülerek taksim edildi ve buzdolabında 4˚C'da muhafaza edildi. PBS formülasyonu çizelge 2. 1. de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Phosphate Buffer Solüsyonu (PBS) formülasyonu.

NaCl	**8,000 g/l**
KCl	0,200 g/l
Na_2HPO_4	1,150 g/l
KH_2PO_4	0,200 g/l
$CaCl_2$	0,100 g/l
$MgCl_2$ $6H_2O$	0,100 g/l
Phenol red	0,020 g/l
Deiyonize su	1000 ml

2. 1. 5. Dulbecco's Phosphate Buffer Solüsyonu (w/o Ca, Mg) D-PBS g/l Hazırlanması

Aşağıdaki maddeler ayrı ayrı eritildi, otoklavda 121˚C'de 15 dakika steril edildi ve buzdolabında 4˚C'da muhafaza edildi. Şekil 2. 2. de D-PBS'in formülasyonu verilmiştir.

Çizelge 2. 2. Dulbecco's Phosphate Buffer Solüsyonu (D-PBS).

NaCl	8,000 g/l
KCl	0,200 g/l
Na_2HPO_4	1,150 g/l
KH_2PO_4	0,200 g/l
Deiyonize su	1000 ml

2. 1. 6. Trypsin Solüsyonu g/l Hazırlanması

Aşağıdaki maddeler ayrı ayrı eritilip, pH. 7,2 ± 0,2 ayarlandı. 0,22µm por çaplı milipor filtreden süzülerek taksim edildi ve kullanılıncaya kadar -20˚C'da muhafaza edildi. Şekil 2.3. de trypsin solüsyonu formülasyonu verilmiştir.

Çizege 2. 3. Trypsin Solüsyonu formülasyonu.

Trypsin (1/250)	**2,500 g/l**
KCl	0,020 g/l
Phenol red	1,150 g/l
Deiyonize su	1000 ml

2. 1. 7. EDTA (Versen) % 2 Stok Solüsyon g/l

Aşağıdaki maddeler iyice eritilirek 100 ml hacimde taksim edildikten sonra 121˚C'de 15 dakika otoklavize edilerek steril edildi ve buzdolabında 4˚C'da muhafaza edildi. Çizelge 2. 4. de EDTA (Versen) formülasyonu verilmiştir.

Çizelge 2. 4. EDTA (Versen) formülasyonu.

EDTA	22,140 g/l
Phenol red	1,000 g/l
Deiyonize su	1000 ml

2. 1. 8. Antibiyotik Stok Solüsyonu

Aşağıdaki maddeler iyice eritildi. 1 ml' lik porsiyonlar halinde -20ºC'da muhafaza edildi. Şekil 2.5. de antibiyotik stok solüsyonu formülasyonu verilmiştir.

Çizelge 2. 5. Antibiyotik Stok Solüsyonu Formülasyonu.

Sodyum penisilin	$1x10^6$ IU/şişe
Streptomisin sülfat	1x1g/şişe
Deiyonize su	10 ml

2. 1. 9. Kontrol Amaçlı Kullanılan Besiyerleri ve Hazırlanması

Fluid thioglycollate medium (FTM) g/l

Hazır olarak formüle edilmiş toz haldeki ticari besiyeri bakteriyolojik kontroller amacıyla kullanılmak üzere hazırlanma talimatına göre tartılarak hazırlandı. Otoklavda121°C'da15 dk steril edildi ve steril 1M NaOH ile final pH 7,1±0,2'ye ayarlandı. Taksim edilerek buzdolabında +4 ºC'da muhafaza edildi.

Soyabean casein digest medium (TSB) g/l

Hazır olarak formüle edilmiş toz haldeki ticari besiyeri bakteriyolojik kontroller amacıyla kullanılmak üzere hazırlanma talimatına göre tartılarak hazırlandı. Otoklavda 121°C'da 15 dk steril edildi ve steril 1M NaOH ile final pH 7,1±0,2'ye ayarlandı. Taksim edilerek buzdolabında +4 ºC'da muhafaza edildi.

Pleuro pneumonia like organizm(PPLO)broth ve agar

Hazır olarak formüle edilmiş toz haldeki ticari besiyeri bakteriyolojik kontroller amacıyla kullanılmak üzere hazırlanma talimatına göre tartılarak hazırlandı. Otoklavda 121°C'da15 dk steril edildi. Steril şartlarda karışım yapılarak buzdolabında +4 ºC'da muhafaza edildi.

2. 1. 10. Mikrotaşıyıcı Sistemler

Bu amaçla New Brunswıck CelliGen 310 FibraCel Disks [M1292-9984, Amerika (Fibra-cel®)] kullanıldı.

Bu araştırmada diskler ticari olarak New Brunswıck CelliGen 310 FibraCel Disks [M1292-9984, Amerika(Fibra-cel®)] satın alınmış olup piyasaya sunum öncesinde işlem gördüğünden ayrıca bir modifikasyon işlemi yapılmamıştır. Bu taşıyıcılara ait önemli bazı özellikler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

2. 1. 11. Glukoz-Laktat Kiti

Membranlı ve membransız, serumlu ve serumsuz ortamlarda üretilen hücre kültürlerinin metabolik aktivitelerini saptamak amacıyla glukoz-laktat kiti (Glukoz cat no: 1001190, Lactat cat no:1001330 Spınreact İspanya) kullanıldı.

2. 2. YÖNTEM

2. 2. 1. Hücre Kültürü Üretimi

Bovine rotavirusun üretiminde MA-104 hücre kültürü, hücre ve virusun, ekstra ajanlar yönünden kontrol testlerinde MDBK (CCL-22) ve Vero (CCL-81) hücre kültürleri kullanıldı. Likit nitrojen tankında stoklanmış olan hücre kültürü ampulleri tanktan çıkarılıp, 37˚C'da eritilerek, 800 devirde 5 dk santrifüj edildi. Süpernatant atılarak, hücre peleti üretme vasatı (% 90 DMEM + %10 FBS) ile resüspanse edildi. Takiben içinde üretme vasatı bulunan flasklara alınıp 37˚C'de inkubasyona bırakıldı. Tüm yüzeyi kaplayarak üremesini tamamlamış olan hücreler daha sonra tez araştırmada kullanıldı.

2. 2. 2. Hücre Muhafazası

Bu amaçla monolayer olarak tüm yüzeyi kaplamış olan hücre kültürlerinin vasatları döküldü. Takiben hücre yüzeyine 37˚C da ısıtılmış trypsin+EDTA karışımı ilave edildi ve hücreler yüzeyden kaldırıldı. Hücre süspansiyonu santrifüj edilerek hücre peleti muhafaza vasatı (% 90 DMEM+%10 DMSO) ile resüspanse edildi. Hücre dondurma kutusu içinde 1˚C/dk olacak şekilde soğutularak, -70˚C'da 1 gece bekletildi. Daha sonra likit nitrojen tankına aktarılarak kullanılıncaya kadar burada muhafaza edildi.

2. 2. 3. Sterilite Kontrolleri

Stok (ana) ve çalışma hücre kültürlerinin bakteri, mantar, mikoplazma ve ekstra ajanlar yönünden testleri aşağıda açıklandığı şekilde yapıldı.

Aerobik bakteriyel kontaminasyonlar yönünden kontroller

Sterilite kontrolü amacıyla vasatlar hücre süspansiyonları ve virus kültürlerinden sıvı thioglikolat besiyerine ve tryptic soy buyyona 1 ml miktarında ekim yapıldı. Aerob ortamda 30-35^{o}C'da 14 gün süreyle inkübe edildi ve süre sonunda yapılan kontrollerde besiyerlerinde herhangi bir üreme gözlenmedi. Tüm hücre ve virus kültürlerinin steril olduğu belirlendi.

Anaerobik bakteriyel kontaminasyonlar yönünden kontroller

Sterilite kontrolü amacıyla vasatlar, hücre süspansiyonları ve virus kültürlerinden sıvı thioglikolat besiyerine 0,2 ml miktarında inokule edildi. 30-35 ^{o}C'da 14 gün süreyle inkübe edildi ve süre sonunda yapılan kontrollerde besi yerlerinde herhangi bir üreme görülmedi. Tüm hücre ve virus kültürlerinin steril olduğu belirlendi.

Mikoplasma etkenleri yönünden kontroller

Bu amaçla Pleuropneumonia-like Organisms (PPLO agar cat no: 241210 BD Amerika) ve PPLO buyyon (cat no:255420 BD Amerika) kullanıldı. PPLO katı besi yerlerine 0,1'er ml ve sıvı PPLO buyyonlara 1'er ml hücre ve virus kültürü numunesi ekildi, %5-10 CO_2'li etüvde ve nemli ortamda 33-37^{o}C'da 14 gün inkübe edilerek, inkubasyon süresi sonunda herhangi bir üremeye rastlanmadı. Tüm hücre ve virus kültürlerinin steril olduğu belirlendi.

Fungal kontaminantlar yönünden kontroller

Bu amaçla Sabouraud dekstroz agar (SDA cat no:210950 BD Amerika) ve Sabouraud dekstroz broth (SDB cat no: 238230 (BD Amerika) kullanıldı. Sıvı Sabouraud dekstroz broth buyyona 0,2'er ml, katı besiyerlerine 0,1'er ml olmak üzere hücre kültürü numunelerinden 2 seri ekim yapıldı. Ekimlerin bir serisi 37 ^{o}C'da, diğer serisi ise 20-25^{o} C'da 14 gün süreyle inkübe edildi. İnkubasyonun 7 ve 14. günlerinde sıvı besiyerlerinden katı besi yerlerine ekimler yapıldı. İnkubasyon süresi sonunda mantar yönünden herhangi bir üremeye rastlanmadı. Tüm hücre kültürlerinin steril olduğu belirlendi.

2. 2. 4. Mikrotaşıyıcıların Karakterizasyonu ve Kültür İçin Hazırlanması

Gerek monolayer durgun ortam çalışmaları gerekse biyoreaktör çalışmalarında kullanılan diskler ticari olarak olarak New Brunswıck CelliGen 310 FibraCel Disks [M1292-9984, Amerika(Fibra-cel®)] satın alındı. Piyasaya sunum öncesinde işlem gördüğünden ayrıca bir modifikasyon işlemi yapılmadı, kullanım talimatına göre otoklav edilerek steril edildi. Bu taşıyıcılara ait önemli bazı özellikler aşağıdaki Çizelge 2.6.'da verilmiştir.

Çizelge 2.6. Fibra-cel® disk taşıyıcılara ait bazı bilgiler.

Yapı malzemesi	PET (Polipropilen örgülerle desteklenmiş)
Disk kalınlığı	0,431 mm
PP destek kalınlığı	0,508 mm
Disk çapı	6 mm
Yoğunluk	1,037-1,040 g/cm3
Toplam yüzey alanı	1200 cm^2/g disk
Disk ağırlığı	0,00572 g
1 gramda bulunan disk sayısı	175 adet
Otoklavlanabilirlik	Evet
Fiber çapı	14-20 μm
Porozite (εmatrix)	0,90
İnokulum yoğunluğu	0,2-1x 106 hücre/ml
Maksimum hücre sayısı	$6x10^8$ hücre/g disk
Kullanılabilen hücre tipi	Süspanse ve yüzey bağımlı hücreler

2. 2. 5. Hücre Üremesinin Belirlenmesi

Gerek durgun ortam (flask, rolling, ya da mikrotaşıyıcı içerisinde üretilmiş monolayer hücre) gerekse biyoreaktörde yapılan hücre kültürü çalışmalarında, hücre sayımı gibi yöntemler ile hücre sayısı direk olarak belirlendi. Ayrıca bu yönteme ek olarak, hem tripsin etkisinden kaynaklanabilecek kayıplar, hem de hücrelerin gözenekli yapıdan tam olarak geri kazanılamayacağı düşünüldüğünden, indirek metotlar da kullanılarak hücre sayısı belirlenmeye çalışıldı. İndirekt yöntemler, özellikle hücrelerin özgül üreme fazında gerçekleştirilen değerlendirmelerde, oldukça gerçekçi sonuçlar vermektedir (Ojeh 1984).

Bu amaçla durgun ortam çalışmalarında 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) analizi ve glikoz tüketimi/laktat üretim hızları kullanılarak yaklaşık hücre sayısı belirlendi. Ayrıca, taşıyıcılar üzerinde hücrelerin tutunma, yayılma ve üremesi kristal viyole boyaması ile incelendi.

Hücre sayımı

Hücre süspansiyonunlarından 0,5 ml alındı ve 4,5 ml % 0.2'lik PBS içindeki trypan blue stok solusyonu ile karıştırılarak 10 dakika oda ısısında bırakıldı. Tekrar süspanse edilip, mikropipet yardımı ile 20μl burker lamına damlatılarak hücreler sayıldı. Ölü hücreler mavi boya alarak canlılardan ayırt edildi. Canlı hücre sayımı aşağıdaki formüle göre hesaplandı.

$$N = \frac{\text{Toplam hücre sayısı X dilüsyon faktörü X CF}}{\text{Sayılan kare sayısı}}$$

CF= burker faktörü 10000 veya 5000 olarak kullanılan modele göre değişir

N= hücre sayısı/ml

Canlı hücre oranı aşağıdaki formüle göre hesap edilir.

$$\%\ \text{canlı hücre} = \frac{\text{Toplam boyanmamış hücre sayısı X 100}}{\text{Toplam hücre sayısı}}$$

2. 2. 6. Hücre ve Virus Kültürü Çalışmaları

Virus üretim çalışmaları için MA-104 hücre kültürleri kullanıldı. MA-104 hücre kültürleri mikrotaşıyıcı sistem içeren ve içermeyen ortamlarda, FBS'u içeren DMEM vasatı ve serumsuz vasat kullanılarak çoğaltıldı.

2. 2. 7. Durgun Ortam Çalışmaları

Durgun ortam çalışmaları mikrotaşıyıcı içeren ve içermeyen 24 gözlü ve 96 gözlü pleytlerle, 75cm^2'lik ve 175cm^2'lik hücre kültürü flasklarında (Greiner, Almanya) gerçekleştirildi.

Mikrotaşıyıcılar 24 gözlü hücre kültürü pleytlerine yerleştirilmeden önce, hücrelerin doku kültürü polistiren (TCPS) yüzeylere tutunmalarını önlemek amacıyla pleytlerin yüzeyi parafilm ile kaplandı. Bu amaçla öncelikle taşıyıcılar için hazırlanmış olan kalıp ile uygun çaplarda parafilm diskler kesilerek %70'lik etil alkol içerisine alındı. Daha sonra gözlere yerleştirilen parafilm diskler üzerine 1mL %70 lik etil alkol eklenerek UV ışını ile 3 saat sterilizasyonları sağlandı. Süre sonunda etil alkol ortamdan uzaklaştırılarak parafilm kaplı gözler PBS ile 2 kez yıkandı. Daha önceden karakterizasyonu ve D-PBS içerisinde 121^{o}C da 20 dk sterilizasyonu yapılmış olan Fibracel diskler laminar akışlı kabin içerisinde steril bir şekilde bu kaplara yerleştirildi. Üzerine vasat konularak mikrotaşıyıcıların doygun hale getirilmeleri sağlandı. Ertesi gün aktif üreme fazındaki monolayer hücre kültüründen elde edilmiş olan kondisyonel vasat (DMEM)'a %1 oranında FBS'u ilave edildikten

sonra 0,20 μm gözenek çaplı enjektör tipi filtreden (Minisart cat no:16534 Sartorius, Almanya) süzüldü ve hazırlanan 24 gözlü kaplara 1 ml olarak taksim edildi. Daha sonra kaplar %5 CO_2'li etüve kaldırılarak büyüme ve üreme faktörlerinin taşıyıcı yüzeyinde etkileşimi sağlandı. 24 saat sonunda kondisyonel vasat ortamdan uzaklaştırılarak kaplar hücre ekimi için hazır hale getirildi. Daha sonra bu hücre seyreltmelerinden ($1,5x10^5$ hücre/mL) mikrotaşıyıcı disk içeren 10 adet 24 gözlü pleytin kuyucuklarına 1'er ml hücre aktarıldı. Beş adet 24 gözlü pleyt, MTT analizleri için, diğer 5 pleyt ise yine 24 saat aralıklarla yapılacak virus kültürü çalışmaları için hazırlandı. Ayrıca taşıyıcı içermeyen ve aynı şekilde hücre üretilen 10 adet 24 gözlü pleyti ise kontrol amacıyla kullanıldı.

Hücre kültürü çalışmalarında vasat pH'sı 6,80-7,20 virus kültürü çalışmalarında ise 7,20-7,60 aralığında tutulmaya çalışıldı. Vasat analizleri amacıyla sıfırıncı saat numunesi olarak yukarıda sözü edilen hücre süspansiyonundan numune alınarak 5 ml'lik kriyotüpler içerisinde -20^oC'daki derin dondurucuda saklandı.

Ekim yapılan tüm kaplar sıcaklığı 37^oC'da tutulan CO_2'li etüve (Heraus, Almanya) kondu. Hücre üremesinin kontrolü amacıyla 24 saat aralıklarla MTT boyama yapıldı. Bu amaçla taşıyıcı içeren kaplardan 24., 48., 72. ve 96. saatlerde, taşıyıcı içermeyenlerden ise 24., 48. ve 72. saatte MTT analizi yapıldı.

Taşıyıcı diskler üzerinde tutunmuş hücrelerin mikroskobik olarak gösterimi amacıyla MTT boyama için ayrılmış olan kapların ilk sırasındaki gözlerde 24., 48., 72. ve 96. saatlerde Giemsa ve kristal viyole ile boyamaları yapıldı. Besin maddelerinin hücreler tarafından tüketildiği düşünüldüğünden 24 saat aralıklarla %50 oranında vasat değişimleri gerçekleştirildi. Vasat değişimlerinde kullanılan vasatlardan glikoz ve laktat analizleri için numuneler alınarak çalışma sonunda analiz edilmek üzere yukarıda belirtildiği şekilde saklandı.

2. 2. 8. MTT Analizi

MTT 3-(4,5-Dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) analizi hücre canlılığı ve sayısını belirlemede kullanılan ve tekrarlanabilir sonuçların alındığı kolorimetrik bir yöntemdir. Analiz tetrazolyum halkasının canlı hücrelerde bulunan mitokondriyal suksinat dehidrojenaz enzimi vasıtasıyla kırılması sonucu çözünmeyen mor renkli formazon kristallerine dönüşmesini esas alır. Oluşan

formazon kristalleri asidik izopropanol ile çözdürülerek 570 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçülerek değerlendirildi.

Stok çözelti hazırlamak için 1 g MTT 500 ml fenol redsiz PBS içerisinde çözdürüldü. 0,22 µm filtreden süzülerek steril edildi. Karanlık ortamda -20^{o}C'da muhafaza edildi.

Çalışmada MTT analizi amacıyla test edilecek olan hücre kültürlerinden $2x10^4$-$5x10^4$hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu hazırlandı. Analizde kullanılacak olan 96 gözlü pleytin A1–A5 gözlerine taşıyıcı gerekli işlemler yapıldıktan sonra konuldu. Pleytin A6–A12 gözleri ise taşıyıcısız bırakıldı. 12 kanallı pipet yardımı ile hücre süspansiyonu 100µl/göz olacak şekilde taksim edildi ve %5 CO_2'li etüvde 24 saat inkübasyona bırakıldı. Bütün gözlere önceden -20 ^{o}C'dan çıkarılıp eritilen MTT solüsyonu 13 µl/göz olacak şekilde taksim edildi. Pleyt ışık almayacak şekilde aluminyum folyo ile sarılarak %5 CO_2'li etüvde 4 saat bekletildi. Hücre kültürü mikroskobu (Olympus, Japonya)'nda formazon kristallerinin oluşup oluşmadığı kontrol edildikten sonra, pleyti ters çevirerek bütün gözler boşaltıldı. Formazon kristallerini çözmek için bütün gözlere 100 µl/göz olacak şekilde izopropil alkol kondu. Fazla bekletilmeden pleytler spektrofotometrede 570 nm dalga boyunda okutularak absorbansı değerleri aşağıdaki belirtildiği şekilde değerlendirildi.

Kalitatif değerlendirme

Hazırlanan MTT süspansiyonu pleyt gözlerine ilave edilmeden önce, hücre kültürü mikroskobunda, 96 gözlü pleytlerdeki hücreler vakualizasyon, yüzeyden ayrılma, membran bütünlüğünün bozulması ve lizis gibi morfolojik bozukluklar yönünden değerlendirildi.

Kantitatif değerlendirme

Hücre kontrol sütunundaki 8 gözün ortalaması alındı ve bu değer %100 kabul edildi. Test numunesi sütunlarının ortalamaları hücre kontrol gözleriyle oranlanarak 100 ile çarpıldı ve % canlılık oranı bulundu. Çizelge 2.7.'ye göre değerlendirildi.

% canlılık: $T_{absorbans\ ort.}$ / $HK_{absorbans\ ort}$ x100

Çizelge 2. 7. MTT kantitatif değerlendirme kriterleri

Non-toksik	%90 hücre canlılığı
Az toksik	% 60-90 hücre canlılığı
Orta derecede toksik	% 30-59 hücre canlılığı
Toksik	< %30 hücre canlılığı

2. 2. 9. Hücrelerin Kristal Viole ile Boyanması

Bu amaçla boyanacak hücre kültürü ortamındaki vasat uzaklaştırılarak hücre yüzeyleri ilave edilen 2 ml PBS ile yıkandı. Hücrelerin üzeri 1 ml %0,5'lik kristal viyole çözeltisi ile kaplandı. Boyama için oda ısısında 10 dk beklendi. Süre sonunda hücrelerin yüzeyinde bulunan boyanın uzaklaştırılması için yavaş akan deiyonize su ile hücre yüzeyleri yıkandı. Havada kurutuldu ve canlı kalabilen hücreler mikroskopta incelendi. Hücrelerin çekirdekleri koyu mor, sitoplazmaları ise açık mor olarak gözlendi.

2. 2. 10. Hücrelerin Giemsa ile Boyanması

Bu amaçla boyanacak hücre kültürü ortamındaki vasat uzaklaştırıldı. Hücreler PBS ile yıkandı. Daha sonra hücrelerin üzerine PBS-metanol karışımı (1:1,5ml) konularak hücreler yıkandı. Sonra PBS-metanol karışımı boşaltılarak sadece metanol konuldu ve 10 dakika oda ısısında bekletildi. Süre sonunda metanol dökülüp tekrar konuldu ve hemen sonra hücrelerin yüzeyini tamamen örtecek miktarda Giemsa boya solüsyonu ilave edildi ve 2 dk beklendi. Süre sonunda boya dökülerek, yavaş akan su ile pembe bulut fon gidene kadar yıkandı ve hücreler nemli iken hücre kültürü mikroskobunda (20X) incelendi.

2. 2. 11. Glikoz ve Laktat Analizleri

Çalışmada vasat içerisinde bulunan glikoz miktarları ticari glikoz kitiyle laktat miktarları ise ticari laktat test kitiyle kolorimetrik olarak belirlendi.

Bu kitlerin çalışma prensibi, besiyerlerinde bulunan glikoz ve laktatın enzimatik oksidasyonu sonucu oluşan hidrojen peroksitin, peroksidaz enzimi varlığında quinone'a dönüştürülmesi esasına dayanır. Reaksiyon sonunda oluşan

rengin yoğunluğu vasat ortamında bulunan glikoz ve laktat konsantrasyonu ile orantılı olup spektrofotometrede 505 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü.

Hücre kültürü çalışmaları esnasında belirli aralıklarla alınan vasat numuneleri 0,45 µm gözenek çaplı enjektör tipi filtrelerden süzülerek 5 ml'lik kriyotüpler içerisinde -20^{o}C'da derin dondurucuda saklandı.

Bu numuneler analizler öncesinde hızla çözdürülerek teste alındı. Bu amaçla numuneler 10 mm quartz kare küvetlerde enzim ile reaksiyona bırakılarak Multiscan spektrofotometre (Thermo Amerika) ile 505 nm'de ölçümleri yapıldı.

2. 2. 12. Rotavirusun Üretilmesi ve Titresinin Saptanması

Monolayer tabakalanmış MA-104 hücrelerin üretildiği flaskların içeriği boşaltılıp, hücre yüzeyleri PBS ile 3 kez yıkandı. Sonra % 0,4 tripsin içeren %10 FBS'lu DMEM ile (0,1 ml/175 cm^2 flask) bovine rotavirus (BRV) ekimi yapıldı ve 37°C'da 1 saat inkubasyonun ardından, hücre üretme flasklarına standart miktarda (virus üretme vasatı) ilave edilerek 37°C'da inkubasyona bırakıldı. Her gün hücre kültürü mikroskobunda yapılan kontroller ile viral sitopatik etki (CPE) izlendi. CPE oluşumu izlenerek sonuçlandırıldıktan sonra, virus kültürü -85°C'da stoklandı. Daha sonra su banyosunda çözdürüldü, santrifüj edildi ve süpernatant rotavirus yönünden yapılan kontrollerde (ELISA ve PCR) rotavirus varlığının saptanması sonrasında çalışmalarda kullanıldı.

2. 2. 13. Üreyen Virusun $DKID_{50}$'sinin Saptanması

Mikrotitrasyon metodu ile önce Bovine rotavirus'un $DKID_{50}$'si saptandı. $DKID_{50}$ değerinin saptanması amacıyla mikrotitrasyon testi uygulandı. 96 gözlü pleytlerde monolayer MA-104 hücre kültürü hazırlandı. Virusun PBS ile 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}, 10^{-6} ve 10^{-7}şeklinde 10 katlı dilusyonları yapıldı. Monolayer oluşmuş 96 gözlü pleytlerdeki hücre üretme vasatları döküldü ve hücreler virus üretme vasatı ile 3 kez yıkandı. Her dilusyondan 96 gözlü pleytin bir sırada bulunan dört gözüne 100'er µl virus sulandırılmasından kondu. Hücre kontrolü amacıyla pleytin son dört gözüne 100'er µl vasat eklendi. Pleyt 37°C'de ve %5 CO_2'li ortamda her gün kontrolleri yapılarak 10 gün süreyle inkübe edildi. Virusun üremesine bağlı CPE oluşumları gözlendi. Üreyen virusun $DKID_{50}$ değerleri Spermen-Kaerber metoduna

göre hesaplandı. $DKID_{50}$ titresi saptanan Bovine rotavirus suşu MA-104 hücre kültürlerine ekimleri için titresi $DKID_{50}$ 10^4/ml olacak şekilde PBS ile sulandırılır, sonra 100 ve 1000 $DKID_{50}$ değeri Sperman-Kaerber metoduna göre sulandırılarak hazırlandı. Daha önceden hazırlanmış taşıyıcılı ve taşıyıcısız, serum içeren ve içermeyen 24 gözlü pleytlerde virus üretimi yapıldı. Mikrotitrasyon tekniğiyle DKID50 titreleri saptandı.

2. 2. 14. Biyoreaktör Çalışmaları

Biyoreaktörde hücre ve virus üretimi amacıyla çalışmalar 500 ml hacimli Corning spinner flask (Corning, Amerika)(Şekil 2. 1.) ve 10 L mikroproses kontrollü biyoreaktörde(Sartorious, Almanya)(Şekil 2. 2.) yapıldı. Bu reaktörde sıcaklık, pH ve çözünmüş oksijenin on-line olarak takip edilebilmesi amacıyla cam gövde üzerinde pH ve oksijen propların yerleşimine izin veren portlar kondu. Hücre ve virus kültürleri esnasında reaktöre takılı bulunan bu proplardan alınan bilgiler bilgisayar ortamında grafiksel olarak kaydedilerek kültürün takibi sağlandı. Kültür ortamının homojenizasyonu, manyetik olarak dönen karıştırıcı ile sağlandı. Reaktörün havalandırması reaktör tabanında yerleşik bulunan silikon tüplerlerden sağlanan gaz akışıyla gerçekleştirildi. Bu tüplerin reaktör dışında bulunan derin ve yüzey havası sağlayan uçlarına steril akış sağlanabilmesi amacıyla 0,20 μm gözenek çaplı hava filtreleri (Sartorius, Almanya) yerleştirildi.

Çalışmaların başlangıcında önce reaktör deiyonize su ile iyice yıkandı. Ardından pH ve oksijen propları yerleştirildi. Daha sonra 5 g/l konsantrasyonda Fibra-cel® diskler yerleştirildi. Kurulumu gerçekleştirilen biyoreaktör içerisine çalışma hacmi kadar PBS doldurularak otoklavda 121^{o}C'da 20 dakika steril edildi.

Sterilizasyonu sonrasında biyoreaktörde bulunan PBS boşaltılarak yerine roller şişelerde hücre üretilmesi esnasında elde edilen 5000 ml kondisyonel besi ortamı ilave edildi ve mikrotaşıyıcılar 24 saat 37^{o}C'de ve 50 rpm'de karıştırılarak inkübasyona bırakıldı. Bu süre içerisinde hem disklerin kondisyonel ortamla etkileşimi sağlandı, hem de pH ve oksijen proplarının kalibrasyonu yapıldı. Süre sonunda $5x10^5$ hücre/ml olacak şekilde hücre süspansiyonu DMEM vasatı içerisinde reaktöre ilave edildi. Ayrıca hava akışı ve karıştırmanın etkisiyle oluşabilecek köpürmenin önlenmesi için vasat ortamına 10 ppm oranında köpük giderici (Sigma

A-5758, Amerika) ilave edildi. İlk vasat değişimi 48. saatte yapıldı, daha sonra 24 saat aralıklarla %50 oranında vasat değişimleri gerçekleştirildi.



Şekil 2. 1. 500 ml Corning spinner flask**.**



Şekil 2. 2. 10 L mikroproses kontrollü biyoreaktör**.**

3. BULGULAR

3. 1. Durgun Ortam Hücre ve Virus Kültürü Çalışmaları

Tez projesinin bu bölümünde durgun ortamda taşıyıcı varlığında yapılan çalışmaların mikroskobik incelenmesi, MTT analiz sonuçları, glikoz-laktat sonuçları ve virus üretim sonuçları, taşıyıcısız kaplardan elde edilen sonuçlarla karşılaştırıldı. Aşağıda bu çalışmalar ile ilgili sonuçlar ayrı başlıklar halinde değerlendirildi.

Hücre kültürü çalışmalarında, farklı başlangıç hücre konsantrasyonları ile ilgili yapılan ön denemelere göre, başlangıç hücre sayısı $1,5x10^5$ hücre/ml olacak şekilde belirlendi.

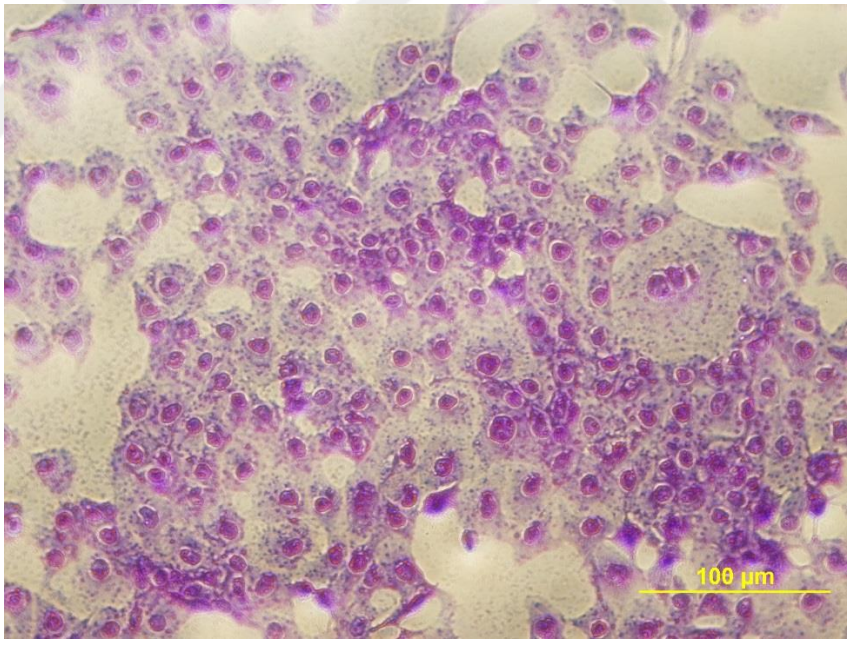
3. 1. 1. Mikroskobik İnceleme

Taşıyıcı bulunmayan pleytlerin mikroskobik incelemeleri sonucunda $1,5x10^5$ hücre/ml başlangıç hücre sayısı ile başlanan kültürlerde 24. saatte, hücrelerin normal fibroblastik yapıda ve aralarında yer yer boşluklar bulunduğu gözlendi. 48 saatlik inkübasyon süresi sonunda ise üreme için yeterli alan kalmadığından hücrelerin ovalleşmeye başladıkları Şekil 3.1. de görüldü. Vasat değişimi yapılarak kültüre devam edildiğinde ise 96. saatte yapılan incelemelerde hücrelerin parçalar halinde yapıştıkları yüzeyden ayrıldıkları gözlemlendi.

Taşıyıcı ile kaplanmış kültür kabı gözlerinde ise 48. saat sonunda yapılan boyama sonucunda incelenen disklerde hücrelerin fiberler üzerinde tutunarak fibroblastik olarak üredikleri, ancak taşıyıcısız kaplardakinin aksine gerek fiberler üzerinde gerekse de fiberler arasında halen geniş boşlukların bulunduğu görüldü. Bu boşlukların vasat değişimi sonrasında 72. saatlerde yapılan incelemelerde hücreler tarafından doldurulduğu Şekil 3.2. ve Şekil 3.3. de görüldü. Taşıyıcı diskler üzerinde üreyen hücrelerin kristal viyole ile boyanmış optik mikroskop görüntüleri Şekil 3.4.ile Şekil 3.5. te gösterildi.

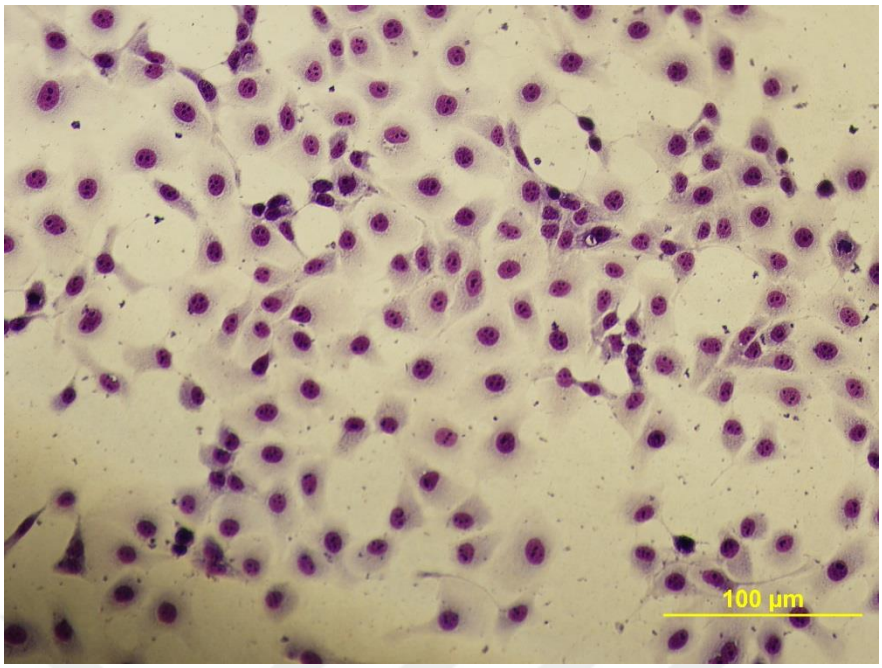


Şekil 3.1. MA-104 hücre kültürünün 48. saatte hücre kültürü mikroskobu görüntüleri (4X).

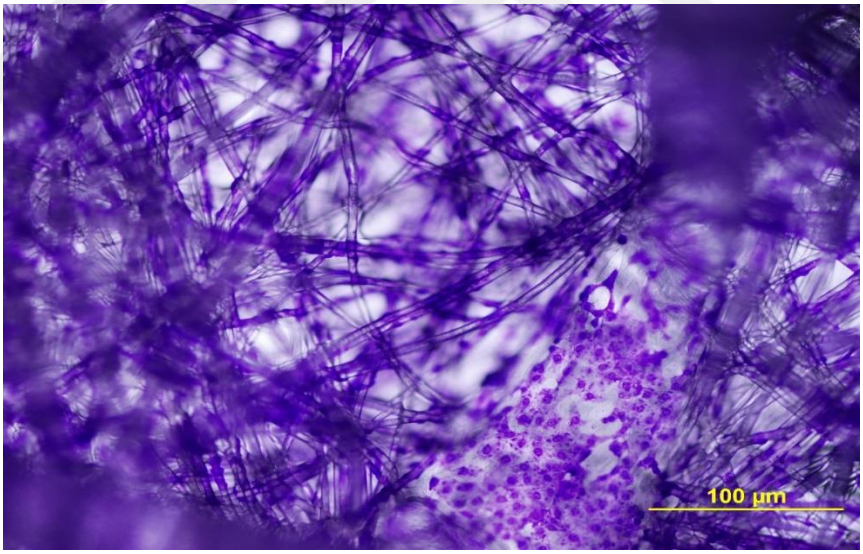


Şekil 3. 2. Kristal viyole ile boyama sonucunda taşıyıcısız kaplarda üretilen hücrelerin hücre kültürü mikroskop görüntüleri (72. saat, 20X).

.



Şekil 3. 3. Giemsa ile boyama sonucunda taşıyıcısız kaplarda üretilen hücrelerin doku kültürü mikroskop görüntüleri (72.saat, 20X).



Şekil 3. 4. Fibracel mikrotaşıyıcıda üreyen MA-104 hücre kültürü (72.saat,10X).



Şekil 3. 5. Fibracel mikrotaşıyıcıda üreyen MA-104 hücre kültürü (72. saaat 40X).

3. 2. Hücre sayımı

Hücrelerin değişik vasatlarda üremelerini test etmek amacıyla mikrotaşıyıcı içeren ve içermeyen %5 ve %10 FBS içeren vasat ile serumsuz vasat içerisindeki hücrelerin üremeleri ve canlılıklarını devam etmeleri yönünden 6 gün boyunca izlendi. Serumlu ve serumsuz vasatların üretim etkileri arasında büyük bir fark görülmedi. %10 serum içeren vasatın kullanıldığı kültürlerde 3. gün hücre miktarı 3 katına çıkarken, 4. gün yarısı oranına azalıp, 6. günde daha aşağı değerlere indiği belirlendi. Oysaki serumsuz vasatlarda kültür daha stabil bir artış gösterip 6. günde de canlılığını koruduğu gözlendi. Mikrotaşıyıcı içeren kültür ile içermeyen kültür karşılaştırıldığında da mikrotaşıyıcı içerenlerde hücrelerin daha yoğun olduğu görüldü. Burada hücre sayımı hemasitometrik yöntemle yapılıp, hücre boyaması ve MTT ile karşılaştırıldığında da paralel sonuçlar elde edildi.

3. 3. MTT analizi

Taşıyıcı disk bulunmayan 24 gözlü TCPS kaplarda 24., 48., ve 72. saatlerde, mikrotaşıyıcı disk içeren kaplarda ise 24., 48., 72., ve 96. saatlerde yukarıda bildirilen metotla yapılan MTT analizi sonuçları karşılaştırıldığında mikrotaşıyıcı içermeyen vasatlarla mikrotaşıyıcı içeren vasatlar karşılaştırıldığında ortalama %94,83 benzerlik görülmüştür.

Çizelge 3. 1. Mikrotaşıyıcı içeren ve içermeyen değişik vasatlarda hücre üremesi.

Örnek Adı	Hücre Sayısı (10^5hücre/ml)				
	1.GÜN	**2.GÜN**	**3.GÜN**	**4. GÜN**	**5.GÜN**
Iscove Basal Medıum (1)	5,2	10,0	15,7	15,5	16,3
PFEK-1 (2)	6,1	11,2	14,3	16,9	15,9
BSFM (3)	6,1	11,0	18,0	15,2	18,8
%2,5 FBS'li DMEM (4)	2.3	6,8	11,5	14,8	14,0
%10 FBS'li DMEM (5)	3,5	7,1	20,1	10,7	13,5
Iscove Basal Medıum M (6)	5,0	12,0	23,8	19,9	19,7
PFEK-1 M(7)	4,4	12,0	15,2	18,1	35,8
BSFM (8)	6,0	4,5	21,9	16,7	20,3
%2,5 FBS'li DMEM-M (9)	2,3	10,0	20,9	23,9	18,8
%10 FBS'li DMEM-M (10)	3,5	10,0	12,5	14,1	14,5

Çizelge 3. 2. Mikrotaşıyıcı içeren ve mikrotaşıyıcı içermeyen pleytteki hücrelerin sitotoksite yönünden karşılaştırılması.

Mikrotaşıyıcı içeren pleytteki hücre						**Mikrotaşıyıcı içermeyen pleytteki hücre**					
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**
A	0,6916	0,6387	0,6373	0,6392	0,6599	0,6408	0,6562	0,6857	0,6596	0,6801	0,6960
B	0,6586	0,6567	0.6463	0,7164	0,6620	0,6955	0,7677	0,7119	0,7379	0,7170	0,7509
C	0,7975	0,7417	0,6472	0,7022	0,6457	0,7284	0,7382	0,7354	0,761	0,7816	0,7504
D	0,7071	0,7402	0,6456	0,6953	0,6424	0,7150	0,7373	0,7997	0,7649	0,7439	0,7499
E	0,7694	0,7065	0,6472	0,7247	0,7161	0,7282	0,7913	0,7049	0,754	0,7524	0,7511
F	0,7359	0,7441	0,6611	0,7288	0,6654	0,7069	0,7368	0,7271	0,7692	0,7706	0,7723
G	0,6132	0,7405	0,6382	0,7033	0,6378	0,6992	0,6888	0,6732	0,718	0,6889	0,7023
H	0,7571	0,6823	0,6672	0,7170	0,7777	0,7252	0,7510	0,7751	0,7867	0,7893	0,7610
ORT	**0,7163**	**0,7015**	**0,6494**	**0,7033**	**0,6781**	**0,7049**	**0,7334**	**0,7266**	**0,7439**	**0,7393**	**0,7365**

3. 4. Glikoz Tüketimi ve Laktat Üretimi

Durgun ortam hücre kültürü çalışmalarında 12 saat aralıklarla alınan numunelerde temel enerji kaynağı olan glikoz ve metabolizma ürünü olarak laktik asit konsantrasyonları enzimatik test kitleriyle ölçüldü. Taşıyıcısız kaplarda sadece 48. saatte, taşıyıcılı kaplarda ise 48. ve 72. saatlerde %100 vasat değişimi yapıldı.

Taşıyıcısız ve taşıyıcılı kaplarda yapılan kültürler için glikoz ve laktat miktarlarının zamana karşı değişimleri Çizelge 3.4 'te gösterildi. Çizelge incelendiğinde, beklenildiği gibi glikoz miktarının maksimum hücre sayısının ulaşıldığı 48. saate kadar azaldığı görüldü.

Çizelge 3. 3. Mikrotaşıyıcı içeren ve mikrotaşıyıcı içermeyen pleytteki hücrelerin üreme yönünden karşılaştırılması.

	Mikrotaşıyıcı içeren pleytteki hücre					Mikrotaşıyıcı içermeyen pleytteki hücre						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**
A	1,5759	1,5951	1,5983	1,2065	1,3797	1,6624	0,2333	0,2287	0,2407	0,1342	0,1851	0,1442
B	1,6833	1,4366	1,2635	1,2810	1,6967	1,2205	0,4422	0,3705	0,3584	0,2002	0,1871	0,2037
C	1,8205	1,7059	1,7526	1,3261	1,3414	1,5373	0,4397	0,2743	0,3184	0,2059	0,2395	0,2401
D	1,4839	2,2318	2,1424	1,6477	1,3422	1,5497	0,6512	1,0479	1,0686	0,0906	0,1926	0,2531
E	0,7087	1,0215	1,3514	0,1885	0,1759	0,8126	1,0159	0,6781	0,2956	0,1737	0,1927	0,1913
F	0,6321	1,1751	1,1781	0,1668	0,2407	0,8090	1,0414	0,8043	1,1382	0,2036	0,2287	0,2056
G	0,3479	1,0452	0,6582	0,1937	0,1857	0,3900	1,1161	0,8336	0,6566	0,2748	0,2227	0,2100
H	1,4157	0,8730	0,9114	0,2149	0,1409	0,6724	1,1604	1,1121	0,6283	0,4856	0,2092	0,2356

Çizelge 3. 4. Glikoz laktat miktarlarının zamana göre değişimi.

Örnek Adı	Glikoz/laktat					
	1.GÜN	**2.GÜN**	**3.GÜN**	**4. GÜN**	**5.GÜN**	**6.GÜN**
Isco ve Basal Medıum	90,5/4.5	166,2/29,3	245,1/19,6	267,0/37,4	227,7/26,9	188,1/52,0
PFEK-1	96,6/5.1	192,6/30,5	231,5/23,8	274,3/29,1	219,2/23,3	185,7/36,0
BSFM	96,4/7.0	176,3/32,0	262,0/27,8	248,5/25,8	243,6/21,3	208,8/29,7
%2,5 FBS'li DMEM	27,9/4.6	106,9/20,4	172,6/20,8	226,6/25,8	194,9/13,3	150,4/15,0
%10 FBS'li DMEM	31,9/8.5	110,6/22,7	273,0/19,8	206,9/24,1	174,4/12,7	184,1/15,7
Iscove Basal Medıum M	76,5/2,2	203,2/33,3	321,0/15,0	283,6/14,6	265,3/12,5	331,3/16,2
PFEK-1 M	63,6/2,1	214,5/35,1	234,3/11,1	278,8/13,0	357,1/16,3	232,1/11,7
BSFM	94,7/3,4	86,1/14,7	311,3/15,3	272,7/13,1	309,6/13,2	333,4/14,9
%2,5 FBS'li DMEM-M	27,5/1,0	158,3/26,4	302.1/13,2	328,2/16,1	245,1/11,7	338,4/17,2
%10 FBS'li DMEM-M	31,8/2,4	158,3/26,5	224,2/11,4	211,2/11,2	215,0/10	257,1/13,6

3.5. Virus kültürü çalışmaları

MA-104 hücrelerinden taşıyıcısız ve taşıyıcılı 24 gözlü kültür kaplarında üretilen bovine rotavirusları yukarıda belirtilen testler ile titreleri hesaplanarak değerlendirildi.

Çizelge 3. 5. Rotavirusun deneme vasatlarında üremesine bağlı açığa çıkan glikoz/laktat miktarları .

Rota virus +vasat adı	Glukoz(mg/dl)	Laktat(mg/dl)
R + PFEK-1 M	10,0	180,5
R + PFEK-1	111,7	178,3
R + ISCOVE M	1,3	186,8
R + ISCOVE	11,3	174,0
R +BSFM M	9,9	181,1
R +BSFM	31,6	177,4
R + %2.5 FBS'li DMEM M	1,4	179,1
R + %2.5 FBS'li DMEM	55,8	183,1

Çizelge 3. 6. Rota virusun deneme vasatlarına bağlı titre değerleri.

Rota vırus +vasat adı	Titre $TCID_{50}$/ml
R + PFEK-1 M	8,2
R + PFEK-1	7,9
R + ISCOVE M	8,3
R + ISCOVE	8,0
R +BSFM M	7,6
R +BSFM	7,2
R + %2.5 FBS'liDMEM M	8,3
R + %2.5 FBS'li DMEM	8,1

4. TARTIŞMA

Yenidoğanlarda ishalin nedenleri çok çeşitli olup enfeksiyöz ajanlar, hijyenik faktörler, çevre ve beslenme şartları hastalığın çıkışında rol oynar. Yenidoğanların ishal olgularının başlıca viral etkenleri rota ve coronaviruslardır. Ayrıca parvoviruslar, astroviruslar, caliciviruslar, bovine viral diarrhea virusu ve Breda virusu viral kökenli ishal olaylarında yer alan diğer etkenlerdir (Alkan 1998).

Bovine rotavirus (BRV) ise, ilk kez Mebus ve ark (1973)'nın ishalli buzağılardan alınan gaitalar ile kolostrum almamış buzağılarda deneysel olarak enfeksiyonu oluşturmaları ile buzağıların ishal etkeni olarak tanımlanmıştır. Corona ve rotavirus enfeksiyonları çoğunlukla genç hayvanlarda görülmektedir. Yenidoğanlar genellikle yaşamlarının ilk haftasında enfeksiyona duyarlı olup, Bovine corona virus enfeksiyonu sıklıkla 3-21 günlük buzağılarda saptanmaktadır. BRV enfeksiyonu ile gelişen sindirim sistemi enfeksiyonlarında etkenlerin alınması enfekte gaita ile bulaşık yem ve sular ile oral yoldan olmaktadır. Erişkin hayvanlar genellikle BRV ile subklinik enfekte olduklarından, hastalığın sürü içinde yayılmasında önemli rol oynarlar. Crouch ve ark (1985) klinik olarak normal, sağlıklı sığırların gaitalarında BRV varlığını saptamışlar ve bu sığırların gaita ve kan serumlarında antikor bulunduğunu da bildirmişlerdir. Virusun saçılışı gebeliğin geç dönemlerinde özellikle doğum yaptıkları gün muhtemelen hormonal değişiklikler ve hormonların immun sistemdeki etkilerine bağlı olarak artmaktadır Bu nedenle sürü içindeki subklinik enfekte erişkin hayvanlar yenidoğan buzağıların etkeni edinmelerinde önemli rol oynarlar. Bundan başka sağlıklı görünümlü buzağıların nazal swap örnekleri ya da gaitalarından BRV, gaita örneklerinden BRV izolasyonları bildirilmiş olup, bu buzağıların virusu düşük titrede saçtıkları ve sürüde klinik enfeksiyonların oluşmasında önemli rol aldıkları bildirilmiştir (Alkan 1998).

BRV enfeksiyonunun buzağılardaki şiddeti yaş ve buzağının immunolojik durumu, enfekte eden doz ve virus suşuna göre değişir. Genç ve kolostrum almamış hayvanlarda diyare daha erken yaşlarda ve çok şiddetli gelişir BRV ve BCV enfeksiyonlarında klinik bulgular birbirinden belirgin farklılıklar göstermeyip, sulu, bazen mukuslu ve nadiren kanlı ishal ile karakterizedir. Hastalığın başlangıcında yüksek olan ateş, daha sonra normale döner. Hayvanda kilo kaybı, tüylerde düzensizlik ve keçeleşme dikkati çeker. Dehidrasyon ve sıvı elektrolit dengesinde

bozulmaya bağlı olarak hipovolemik şok ve ölüm şekillenebilir. E. Coli, Salmonella, Clostridia, Criptosporidium, v.s. gibi etkenler ile komplikasyon mortalitenin artmasına neden olur. Rotavirus enfeksiyonlarının teşhisi genellikle gaitada virusun ya da virus antijenlerinin varlığının saptanması esasına dayanmaktadır (Alkan 1998).

Serumsuz vasatlar, bileşiminde serum bulunmayan vasatlardır. Serumun içinde bulunan maddeler hücrenin ihtiyacına bağlı olarak gereken miktarlarda vasatlara eklenerek hazırlanır. Serum içinde bulunan proteinler yerine rekombinat proteinler kullanılır ve bu proteinler sentetik olarak mikrobiyal kaynaklardan ve bitkilerden sağlanır. Serumsuz vasatların birçok tipi vardır. Bunlar; hayvansal kökenli yapı taşları içermeyen ve protein içermeyen olarak ikiye ayrılırlar (Delioglu ve Ozdural 1990).

Serumsuz vasatlar geniş spektrumda yarar sağladıkları ve içerikleri kontrol edilebildiği için birçok araştırıcı tarafından yaygın olarak kullanılırlar (Delioglu ve Ozdural 1990). Bazal ortamı ve bazı katkı maddelerini içerir. Bazal ortam; aminoasitler, vitaminler, nükleik asitler, lipitler, inorganik tuzlar, enerji kaynağı insulin, insulin-benzeri büyüme faktörleri (IGFs), epidermal büyüme faktörü (EGF), platelate- derived büyüme faktörü (PDGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF) ve östradiol deksametazon vb bazı maddelerden oluşur (Delioglu 1992).

Serumsuz vasatlar; transforme hücrelerin, transforme olmayanlara göre bu ortamda daha kolay üremesi nedeniyle avantaja sahiptirler. Hibridoma ve miyelomalarda genelde serum free medium (SFM) de kolay ürerler, büyüme faktörlerine gereksinimleri daha azdır. Yüzeye bağımlı hücreler, bu ortamlara farklı yanıt verirler. SFM da kontaminasyon riski azdır. Çeşitlerinin çok olması özel istekleri olan hücrelerle çalışmayı kolaylaştırır. Araştırıcı çalıştığı hücreye uygun vasat hazırlayabilir. Seruma oranla daha ucuza elde edilebilir (Yılmaz 2015).

Bu tez çalışmasında hücre kültürünün ve bovine rotavirusun mikro taşıyıcı içeren ve içermeyen serumlu ve serumsuz vasatlarda, monolayer olarak durgun ortamlarda ve biyoreaktörde üretimi konularında çalışıldı. Aynı zamanda endüstriyel ölçekte hücre ve aşı üretimi amacıyla birim hacim başına düşen yüzey alanlarının üç boyutlu diskler kullanılarak arttırılması ve virusun halen kullanılmakta olan çok

sayıda döner şişeler yerine biyoreaktörde tek bir seferde ve daha güvenli şekilde üretilmesi amaçlanmıştır.

Tedavi ve aşılama amacıyla biyolojik ürünlerin güvenliğini arttırmak için serumsuz ve insan/hayvan proteinlerinden ari vasatların geliştirilmesi son derece önemlidir. Serum kullanımının en önemli dezavantajı hayvansal orijinli ektra ajanların, kontaminantların varlığıdır (Merten 2002). Aşılar genellikle sağlıklı olan bireylere uygulandığı için zararsızlığı en önemli kriteridir. Üretimde kullanılan besiyerlerinden hayvansal orijinli proteinleri uzaklaştırmak, dış kaynaklı risklerin de azalmasına sebep olur. Bu nedenle birçok besiyeri üreticisi firma serumsuz vasat geliştirmiştir ve çok fazla sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir (Moreira 1995)(Gstraunthaler G, Lindl T and Valk J 2013). Özellikle insan aşılarında aşıların güvenliği açısından Vero, MRC-5 ve BHK gibi aşı üretiminde kullanılan birçok hücre kültüründe üretim çalışmaları serumsuz vasatlar kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Vaccine 2014). Yine başka bir çalışmada aynı zamanda serumsuz vasatların Vero hücrelerinde yumuşak agarda tümorojenik fenotipi uyarmadığı görülmüştür. Sonuç olarak düşük proteinli serumsuz vasatların (LPKM) yanlızca kimyasal komponentleri ve rekombinant proteinleri içerdiği saptanmıştır. (Merck & Co. Inc. 1999).

Son yıllarda daha stabil büyük hacimli üretim amacıyla mikrotaşıyıcı sistemler kullanılarak aşı çalışmaları yapılmaya başlanmış ve uyumlu sonuçlar alınmıştır.

Bras (2004), çalışmasında mikrotaşıyıcı içeren hücre kültürü sistemleri ve diğer rutin sistemleri kullanılarak farklı viral antijenlerin üretiminde karşılaştırmalı bir çalışma gerçekleştirmiştir. Bu amaçla Vero, BHK ve MA 104 hücreleri konvensiyonel roux şişeleriyle paralel olarak 3.7 L çalışma kapasiteli biyoreaktörde 2mg/ml konsantrasyondaki mikrotaşıyıcılarda kültüre edilmişlerdir. BHK hücreleri 4 gün sonra, Vero ve MA 104 hücreleri ise 7 gün sonra 0.1 Multiplicity Of Infection (MOI, herbir hücreye göre ortalama plak sayısı) titresindeki kuduz, kızamık, poliovirus ve rotavirusla inokule edilmiş. Araştırmada (2004) mikrotaşıyıcı ve diğer konvansiyonel sistemdeki hücre ve virus miktarı saptanmış olup, mikrotaşıyıcı sistemde roux şişeler kullanılarak hazırlanan monolayer hücre kültürlerine göre 20 kat daha fazla hücre saptandığı ifade edilmiştir. Diğer taraftan bu hücrelerde elde

edilen virus miktarı da 1.3 ile 6.7 virus/ml daha fazla bulunmuştur. Bununla beraber, mikrotaşıyıcı içeren hücre kültürü sistemleri ile yaptıkları daha kapsamlı çalışmalarda, seri boyutunda virus miktarlarının istatistiki olarak benzer olduğunu göstermiştir. Viral antijen üretim miktarı sadece hücre konsantrasyonuna bağlı olmayıp aynı zamanda hücre üretme yüzeyinin özelliği gibi diğer kültürel faktörlere de bağlıdır. Bu nedenle virus üretiminin hacim arttırmasına dayalı stratejilerin geliştirilmesi temel oluşturmaktadır. Küçük hacim virus üretimi için optimal olan koşullar, büyük hacimde virus üretimi için uygun olmayabileceğinden yeni standartlar ve değerlendirmeler gerektirmektedir.

Zhang ve ark (2011)'nın yaptıkları çalışmada, Rotavirusun büyük hacimde üretim prosesine adapte edilmesi amacıyla fermentör kullanılarak mikrotaşıyıcılarda üretilmiş olan Vero hücrelerinde virus üretimi amaçlanmıştır. Vero hücreleri Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından önerilen insanlarda uygulanan aşı üretiminde kullanılan en güvenli hücre kültürüdür. Son 10 yılda Vero hücreleri kültürleri canlı polio, inaktif polio ve kuduz aşıları gibi insan aşılarının üretiminde dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca çeşitli viruslara karşı büyük hacimlerde aşı üretimi için hücre kültürü hazırlanmasında mikrotaşıyıcılar kullanılmaktadır. Bu çalışmada da rotavirus aşısı mikrotaşıyıcılardaki Vero hücrelerinde üretilmiştir.

Bu çalışmada hücrelerin değişik vasatlarda üremelerini test etmek amacıyla mikrotaşıyıcı içeren ve içermeyen %5 ve %10 FBS içeren vasat ile serumsuz vasat içerisindeki hücrelerin üremeleri ve canlılıklarını devam etmeleri yönünden 6 gün boyunca izlendi, serumlu ve serumsuz vasatların üretim etkileri arasında büyük bir fark olmadığı görüldü. %10 serum içeren vasatın kullanıldığı kültürlerde 3. gün hücre miktarı 3 katına çıkarken, 4. gün yarısı oranına azalıp, 6. günde daha aşağı değerlere indiği belirlendi. Oysaki serumsuz vasatlarda üretilen kültürün daha stabil bir artış gösterip 6. günde de canlılığını koruduğu gözlendi. Aynı vasatlarla çalışma mikrotaşıyıcı içeren ve içermeyen kültür ortamında da gerçekleştirildi ve aynı vasatların mikrotaşıyıcı içermeleri durumunda hücre sayılarında önemli bir artış olduğu görüldü.

Mikrotaşıyıcı içeren kültür ile içermeyen kültür karşılaştırıldığında vasatlara göre değişiklik göstermesine rağmen mikrotaşıyıcı içerenlerde hücrelerin daha yoğun olduğu, mikrotaşıyısız sistemlere göre 2,5 katına kadar arttığı görüldü.

İlk olarak durgun ortamda mikrotaşıyıcılı ve taşıyıcısız kaplarda yapılan çalışmalar 4 alt başlıkta değerlendirildi. Bu kapsamda hücre kültürlerinin mikroskobik incelenmesi, MTT analiz sonuçları, glikoz-laktat sonuçları ve virus üretim sonuçları ele alındı. İkinci bölümde ise dolgulu biyoreaktörde yapılan çalışmalarda elde edilen hücre üremesine yönelik kinetik sonuçlar ve virus titreleri; başlangıç hücre sayısı, taşıyıcı konsantrasyonu ve hücre kültür süreleri gibi önemli kriterler göz önünde bulundurularak 3 alt başlık halinde sunuldu.

Bu araştırmada NWPF'ler değişik boyutlarda kesilerek TCPS kaplar ve döner şişelerin tabaka şeklinde kaplanmasıyla kullanılabileceği görüldü. Günümüzde dolgulu reaktör çalışmalarında kullanılan NWPF'ler FibraCel® ve BioNOC® isimleriyle ticari olarak piyasada bulunmaktadır (Ergin 2010).

Hücrelerin NWPF disklere tutunma süresinin 2-4 saat gibi kısa bir süre olması bu taşıyıcıların önemli özelliklerindendir. NWPF'ler ile yürütülen çalışmalarda ‘‘yüzey alanı/hacim oranı’’nın oldukça yüksek olduğu ve bu nedenle hücre sayısı ve üretkenliğin diğer mikrotaşıyıcılara göre yaklaşık 10 kat artabileceği bildirilmiştir (Kaduori 1989). Özellikle virus üretimi çalışmaları ve protein yapısındaki çeşitli hücresel ürünlerin üretimi çalışmalarında kullanımı yaygındır. NWPF kullanılarak DA 4.4 ve 123 A gibi hibridoma hücreleri; 3T3, MRC-5, BHK, VERO, CHO ve HEK 293 gibi yüzeye bağımlı hücreler ile SF-9 ve Hi-5 gibi insekt hücrelerinin üretildiği bildirilmektedir (Wang 2002).

Bu yapılan çalışmada hücreler pleytlere konulduktan 1,5 saat, reaktöre konulduktan 4 saat sonra vasatın berrak bir hal aldığı gözlemlenmiştir. Vasattan kontrol amacıyla alınan numunelerin mikroskobik incelenmesinde vasatlarda hücre olmadığı görülmüştür. Bu durum, ekilen hücrelerin hemen tamamının kondisyonel vasat ortamında 1 gece, bekletilmiş taşıyıcı matris içerisinde ise 1,5-2 saatte kolay bir şekilde tutunduklarını göstermektedir.

Sunulan tez çalışmasında karşılaştırma amacıyla, Dollvet A.Ş. protokolünde (2004) bildirilen şekilde hazırlanan monolayer kültürlerde virus üretimleri gerçekleştirildi. Aynı hücre ve tohum virus kullanılarak yapılan çalışmalar sonunda üretilen virusların mikrotaşıyıcılı miktarlarında monolayer kültürlere göre 2,5 kat ve süspanse kültürlere göre ise 3 kat artış sağlandığı görüldü.

Durgun ortamda MA-104 hücrelerinin taşıyıcısız ve NWPF taşıyıcılı kültür kaplarındaki özgül üreme hızları değerlendirildiğinde taşıyıcı varlığında hücrelerin daha yavaş üredikleri tespit edilmiştir. Bu durum Aslankaraoğlu'nun (1999) hibridoma hücreleri ile yaptığı durgun ortam verileriyle uyumlu olmakla birlikte kültür başlangıcında hücrelerin taşıyıcı yüzeyine adaptasyon için daha çok süreye ihtiyaç duydukları akla gelmiştir. Ayrıca kültürün ilerleyen günlerinde çok fazla sayıda hücre oluşması nedeniyle gerek kontak inhibisyon gerekse toksik metabolit artışının olabileceği de düşünülmektedir.

5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, öncelikle laboratuvar ölçeğinde gerçekleştirilen rotavirus aşı üretiminde kullanılan tohum virusun, halen kullanılmakta olan çok sayıda döner sistemle üretilen hücre kültürlerinin yerine mikrotaşıyıcı içeren biyoreaktörde tek bir seferde hücrelerin üretilmesi sağlanmıştır. Ayrıca ilerleyen süreçte büyük ölçek çalışmalarıyla birlikte aşı virusunun da süspanse kültürlere alternatif olarak benzer şekilde minimum hacimde ve yüksek kalitede üretilebileceği düşünülmektedir.

Serumsuz vasat ile ilgili olarak ise çeşitlerinin çok olması özel istekleri olan hücrelerle çalışmayı kolaylaştırmıştır. Çalışılan hücreye uygun vasat hazırlanmış ve seruma oranla daha ucuza elde edilmiştir. Ayrıca serumdan kaynaklanan olası bir kontaminasyonun önüne geçilmiştir. Hücrenin yapısına uygun serumsuz vasat kullanılması her açıdan önerilmektedir.

Durgun ortamda MA-104 hücrelerinin taşıyıcısız kültürlerde taşıyıcı kullanımına göre daha hızlı üredikleri tespit edilmiştir. Ancak taşıyıcı varlığında hücreler daha uzun süreli kültür edilebilmekte ve dolayısıyla daha yüksek hücre sayılarına ulaşılmaktadır. Durgun ortamda taşıyıcı kullanılan kültürlerde kristal viyole boyama sonucunda hücrelerin gerek fiberler üzerinde gerekse de fiberler arasındaki geniş boşlukları doldurarak üredikleri izlenmiştir.

Durgun ortamda üretilen virusların miktarında taşıyıcı kullanımının taşıyıcısız kaplara göre yaklaşık 2 kat artış sağladığı görülmüştür. Taşıyıcı bulunan kaplarda ve bioreaktörde yapılan çalışmalarda hücrelerin taşıyıcı matrise 1,5-2 saat içinde tutundukları gözlenmiştir.

Çalışma sonunda elde edilen tüm sonuçların ışığında, durgun ortamda serumsuz vasat ve taşıyıcı kullanarak MA-104 hücresi ve Rotavirusu üretimi yapılmıştır. Böylece Rotavirusu üretimi, daha az işçilik ve malzeme maliyeti olan, kolay çalıştırılabilir, kontaminasyon riski düşük ve daha az enerji tüketen avantajlı bir sistemle, yüksek verimde gerçekleştirilmiştir. Yapılan bu tez çalışması iki amaçlı olarak fayda sağlamış olup bundan sonraki aşı çalışmalarında da önerilmektedir.

Bu araştırmada; serumsuz vasat kullanıldığında, serumlu vasat kullanımında olduğu gibi, in vitro şartlarda, aynı miktarda hücre elde edilebildiği ortaya konulmuştur.

Tercih edilecek metotla daha homojen, stabil ve güvenli aşı üretimi için;

- Kullanılacak hücre kültürüne uygun serumsuz vasatların araştırılması ve kullanımının sağlanması,
- Araştırmalar yapılarak, mikrotaşıyıcı sistemler ile diğer üretim sistemleri mukayesesi ve üretimdeki total maliyetin belirlenmesi,
- Döner sistemle sınırlı miktarda üretilen hücre kültürlerinin üretim kapasitelerinin arttırılması amacıyla mikrotaşıyıcı sistemlerin kullanılması,
- Planlanacak olan yeni araştırmalarda ise, bu çalışmada aşı üretiminde kullanılan laboratuvar ölçekli biyoreaktör yerine, büyük hacimlerde aşı üretimi için en az 100 L hacmine sahip mikroproses sistemli biyoreaktörlerin kullanılması önerilmektedir.

6. KAYNAKLAR

Alkan F, Pulat H, Yazıcı Z, Burgu İ, 1992. Ters (reverse) Pasif Hemaglutinasyon Testi ile ishalli Buzagı Gaitalarında Rotavirusların Tespiti. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 39, 238-46.

Alkan F, 1998. Buzagı İshallerinde Rotavirus ve Coronavirusların Rolü. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi s. 45,29-37.

Athanassious R, Marsolais G, Assaf R, Dea S, Descoteaux PL, Dulude S, Montpetit C, 1994. Delection of Bovine Coronavirus and Type A Rotavirus. İn Neonatal Calf Diarrheaand Winter Dysentery of Cattlen Quebec Evaluation of Three Diagnostic Methods. Can Vet J, 35, 163-9.

Aslankaraoğlu E, 1999. NWPF diskler içeren reaktörlerde üç boyutlu hücre üremesinin incelenmesi. Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Aslankaraoğlu E, Gürhan SI, Gümüşderelioğlu M, 2001. Rabies virus production in non-woven polyester fabric (NWPF) packed-bed reactors, Biotechnol Appl Biochem, 33, 167–79.

Benfield DA, Stotz IJ, Nelson EA, Groon KS, 1984. Comparision of a Commercial Enzyme Linked immunosorbent Assay with Electron Microcopy Fluorescent Antibody and Virus isolation for the Detection of Bovine and Porcine Rotavirus, Am J Vet Res, 10, 45.

Besser TE, Gay CC, Mcguire TC, Evermann JF, 1988. Passive immunity to Bovine Rotavirus infection Associated with Transfer of Serum Antibody İnto the intestinal Kumen. J Virol, 62, 2238-42.

Blood D, Radostis O and Handerson J, 1983. Veterinary Medicine, Sixty Edition, Baillere, Tindal, London, U K.

Birch J, Racher A, 2006. Antibody production. Advanced Drug Delivery Reviews, 58, 671-85.

Bridger J, Hall G, Parsons K, 1992. A Study of the Basis of Virulence Variation of Bovine Rota viruses. Vet Microbiol, 33, 169- 74.

Bras J. Effect of cell culture system on the productıon of human vıral antıgens, Patol. Med. Lab. vol.40 no.3 Rio de Janeiro June 2004.

Burgu İ, ve Akça Y, 1983. Sıgırlarda Rotavirus Antikorlarının Dağılımı Üzerinde Serolojik Araştırmalar. Ankara Üniversiesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 30 (1), 35-44.

Burgu İ, Akça Y, Alkan F, Özkul A, Karaoglu T, 1995. Yenidogan ishalli Buzagılarda Rotavirusların Electron Microskopi (EM), EnzymeLinked immunosorbent Assay (ELISA) ve Polyacrylamide Gel Electrophorosis (PAGE) Teknikleri ile Çabuk Teshisi ve Antijenik Karakterizasyonu. Ankara Üniversiesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 42, 491-8.

Cheung EY, Hnatko SI, Gunning H, Wilson J, 1982. Comparison of Rota enzyme and Direct Electron Mikroscopy for Detection of Rotavirus in Human Stool. American Society for Microbiology, 16 (3), 562-3.

Çabalar M, Voyvoda H, Sekin S**,** 2000. Virological and serological examinations for rotaviruses in diarrhoeic calves. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 11, 18-21.

Çabalar M, 2004. Van yöresindeki bazı süt sığırcılığı işletmelerinde Rotavirus enfeksiyonunun serolojik araştırılması. Yüzüncü Yıl Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 15, 33-5.

Crouch CF, Bielefeldt Ohmann H, Watts TC, Babiuk LA, 1985. Chronic shedding of bovine enteric coronavirus antigen-antibody complexes by clinically normal cows. J Gen Virol, 6, 1489–500.

Dea S, Begin ME, Archambault D, Elazhary Y, Roy RS, 1984. Distinct Rota viruses isolated from Asymptomatic Calves. Cornell Veterinary, 75, 307-18.

Delioglu GSI, Ozdural N, 1990. Serial cultivation of suspended BHK21/13 cells in serum reduced and serum-free medium supplemented with various membrane protected agents, Cytotechnology, 3, 89-93.

Delioglu GSI. Preparation of BHK suspension cell cultures in the media with low serum dilution, 6th Int. Pharmaceutical and Industrial Biotechnology Symp., (IPTS-92) Sep. 1992, Ankara, Turkey.

Donelli G and Superti F, 1994. The Rotavirus Genus. Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 17 (34), 305-20.

Edwards S, Chasey D, Napthine P, Banks J, Hewitt-Taylor C, Cranage, MPA, 1987. Comparision of Three Rapid Diagnostic Methods forthe. Detection of Rotavirus infection in Calves. Vet Microbiol, 13, 19-25.

Ekik M, 2002. Konya Bölgesinde Yeni dogan ishalli Buzagılardan Rotavirus Antijenlerinin ELISA ile Belirlenmesi ve Annelerinden Rotavirus Antikorlarının Tespiti. Doktora Tezi Selçuk Üniversitesi Saglık Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Ergin G, 2010. Şap Virusu Üretiminin Dolgulu Biyoreaktörlerde Araştırılması. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Estes M, Conner M, Gilger M, Graha D, 1989. Molecular Biology and immunology of Rotavirus infections. Immunological Investigations, 18, 571-81.

Falkner E, Appl H., Eder C, Loserta UM, Schöfflb H, Pfallerb W, 2006. Serum free cell culture: The free access online database. Toxicology in Vitro, 20, 395-400.

Fassnacht D and Porter R, 1999. Experimental and theoretical considerations on the oxygen supply of animal fixed-bed culture. Journal of Biotechnology, 72, 169–84.

Freshney R, 2005. Culture of Anımal Cells. Fifth Edition. Wiley Lıss A john Wiley and sons, Inc. publication, p. 119-23.

Fujii R, Kuzuya M, Homano M, Ogura H, Yamada M, Mori T, 2000. Neutralization Assay for Human Group C Rotaviruses Using a Reverse Passive Hemagglutination Test for Endpoint Determination. Clin J Microbiol, 38 (1), 50-4.

Garcia-Sancez, J, Corral C, Halaihel NG, Simon MC, Alonso JL, Muzquiz JL, Ortega C, Girones O, 1993. Survey of Rotavirus infection in a Dairy Herd Comparison Between Polyacrylamide Gel Electrophoresis and Two Commercial Test, Vet microbiol, 34, 321-32.

Gstraunthaler G, Lindl T and Valk J 2013.A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media. Cytotechnology 65,791–793 DOI 10.1007/s10616-013-9633-8

Goto Y, Kurogi H, Inaba Y, Matumoto M, 1986. Sequential isolation of Rotavirus from individual Calves, Vet microbiol, 11, 177-84.

Greig S, Berriman J, O'Brien J, Taylor J, Bellamy A, Yeager M and Mitra A, 2006. Structural Determinants of Rotavirus Subgroup Specificity Mapped by Cryo-electron Microcopy. J Mol Biol, 356 -1, 209-21.

Güngör Ö, Baştan A, 2004. Gebe ineklerde uygulanan aşıların kolostrum ve buzağıda IgG konsantrasyonu üzerine etkileri. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 51, 7-11.

Hall G, Bridger J, Parsons K, Cook R, 1993. Variation in Rotavirus Virulence A Comparison of Pathogenesis in Calves Between Two Rota viruses of Different Virulence. Vet Pathol, 30, 223-33.

Hammand G, Ahluwalia G, Barker F, 1982. Comparison of Direct and İndirect Enzyme immunoassays with Direct Ultracentrifugation Before Electron Microscopy for Delection of Rotaviruses. J Clin Microbiol, 16, 53-9.

House J, 1978. Economic impact of Rota virus and Other Neonatal Disease Agents of Animals. J Am Vet Med Assoc, 173, 573-6.

Hussein H, Cornaglia E, Saber M, El-Azhary Y, 1995. Prevalence of Sero types G6 and G10 Group A Rota viruses in Dairy Calves in Quebec. Can J Vet Res, 59, 235-7.

Jensen A, 1985. Evalution of theTwo Commercial Kits for Rapi Detection of Human Rotavirus in Feces Rotalex, A Latex Agglutination Test and Rotavirus ELISA Kit. APMIS, 93, 159-60.

Jyothırlatha B, Kotigadde S, Venkatesh A, Shivananda P, 1992. Rotavirus and Bacteriyal Enteropathogens Causing Acute Diarrhea. Indian J. Pediatr, 59 (2), 203-7.

Kapikian Z and Chanock M**,** 1990. Rotavirus In Virology, Ed by Fields BN, Second Edition, New York, Knipe DM and Raven Press, p.1353-404.

Kadouri A and Zipori D, 1989. Production of anti-leukemic factor from Stroma cells in a stationary bed reactor on a new cell support, Advances In Animal Cell Biology And Technology For Bioprocesses, Spier RE, Griffiths JB, Stephenne J and Rooy PJ (eds.), Tiptree, Essex Courier International Ltd. p.327-30.

Kebaabetswe L, Sebunya T, Matshoka M, Ndungu T, 2005. Detection and Molecular Characterisation of Group A Rotavirus From Children in Northern Botswona. East Afr Med J, 82(4), 203-8.

Lee J, Babiuk LA, Yoo DA, 1998. Neutralizing Monoclonal Antibody to Bovine Rotavirus VP8 Neutralizens Rotavirus infection Without inhibiting Virus Attachment to MA-104 Cells. Can J Vet Res, 62, 63-7.

Lu W, Duhamel GE, Hoshino Y, Benfield DA, Nelson EA, Hess RA, 1995. Characterization of the Bovine Group A Rotavirus Strain Neonatal Calf Diarrhea Virus-cody (NCDV-cody). J Clin Microbio, 33 (4), 990-4.

Makabe T, Komaniwa H, Kishi Y, Yataya K, Imagava H, Sato K, Inaba Y**,** 1985. Isolation of Bovine Rotavirus in Cell Culture, Archives of Virology, 83, 123-7.

Merten OW 2002. Development of serum-free media for cell growth and production of viruses/viral vaccines: Safety issues of animal products used in serum-free media. INIST-CNRS, Cote INIST: 13557, 35400010413764

Merck & Co., Inc., 1999. Serum-free, low-protein media for rotavirus vaccine production

WO 1999021969 A1

McNulty MS, 1978. Rotaviruses. J Gen Virol, 40, 1-18.

Mebus CA, Kono M, Underdahl NR, Rhodes MB, Twiehaus MJ, 1971. Cell Culture Propagation of Neonatal Calf diarrhea Virus. Can Vet J, 12, 69-72.

Moosai RB, Alcock R, Bell TM, Laidler FR, Peiris JSM, Wyn-Jones Apand, Madeley CR, 1985. Detection of Rotavirus by a Latex Agglutination Test, Rotalex: Comparison with Electron Microscopy, immunofluorescece, Polyacrylamide Gel Electrophorosis, and Enzme Linked immunosorbent Assay. J Clin Pathol, 38, 674-700.

Moreıra, S V. 2005. Análise documental como método e como técnica. In Jorge Duarte Antonio Barros. (Org.). Métodos e Técnicas de Pesquisa em Comunicação. 1 ed. São Paulo Atlas, v. p 267-279.

Murakami T, Hirano N, Chitose K, Tsuchiva K, Ono K, Sato F, Suzuki Y, Murakami YA, 1987. Survey on Bovine Type 1-Associated Neonatal Calf Diarrhea in a Beef Herd Jpn. The Japanese Journal of Veterinary Science, 49 (1), 23-30.

Nagano H, Goto H, Shimizu K, 1984. Virological and Serological Studies of Rotavirus infection in Cattle. Ress Bull Obihiro Universty, 14, 1-8.

Ojeh CK, 1984. Isolation and Propagation of Bovine Rotavirus in Cell Culture. Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux, 37 (4), 400-405.

Paul PS and Lyoo YS, 1993. Immunogens of Rotaviruses. Vet Microbiol, 37, 299-317.

Pazdiora P, Svecova M, Jelinkova H, Taborsko J, 2002. Diagnosis of Rotavirus infections-comparison of Various Methods. Epidemiol Mikrobiol Imunol, 51(3), 95-7.

Perk K, Moussa AA, Tromp AM, Reda IM, Refai M, Friedman A, Farid AF, Gallily O, Salah SM, 2000. Neonatal Diarrheal Disease of Dairy Cattle in Egyptand Israel. Israel Veterinary Medical Association, 55, 1.

Piednoir E, Bessaci K, Bureau-Chalot F, Sabauraud P, Brodard V, Andreoletti L, Bajolek O, 2003. Economic impact of Healthcore assciated Rotavirus infection in a Paediatric Hospital. J Hosp Infect, 55 (3), 190-5.

Reynold DJ, Chasey D, Scott AC, Bridger JC**,** 1984. Evaluation of ELISA and Electron Microscopy for Detection of Coronavirus and Rotavirus in Bovine Faeces. Vet Rec, 21, 397-401.

Reuveny S, 1990. Microcarrier culture systems. Bioprocess Technol, 10, 271–341.

Rubenstein AS and Miller MF, 1982. Comparison of an Enzyme_mmunoassay With Electron Microscopic Procedures for Detecting Rotavirus. J Clin Microbiol, 15, 938-44.

Rupp RG, 1985. Use of cellular microencapsulation in large-scale production of monoclonal antibodies, in Large-scale mammalian cell culture. Fader, J, Tolbert, W. (eds), New York, Academic Press. p. 19–38

Roman E and Martinez I, 2005. Detection of Rotavirus in Stool Samples of Gastroenteritis Patients. P R Health Sci J, 24 (3), 179-84.

Sanekata T, Yoshida Y, Okada H and Oda K, 1982. Detection of Rotavirus Antibody by inhibition of Reverse Passive Hemagglutination. J Clin Microbiol, 15 (1), 148-155.

Schlafer HD and Scott MF, 1979. Prevalence of Neutralizing Antibady to the Calf Rotavirus in New York cattle. The Cornell Veterinarian, 69 (3), 262-71.

Shah NM and Jhala VM, 1990. Latex Agglutination Test (Rotalex) for Rapid Diagnosis of Rotavirus in Neonatal Calf Diarrhea. Indian Journal of Animal Scienses, 60 (11), 1311-2.

Singh A and Pandey R, 1988. Analysis of Electrophoretypes of Rotavirus From Diarrhoeic Faeces of Neonatal Buffalo Calves in india. Acta Virol, 32 (2), 156-9.

Sukura A and Neuvonen E**,** 1990. Latex Test for Rapid Rotavirus Diagnosis in Calves. Acta Vet Scand, 31(1,4), 42.

Van wezel 1967. Growth of Cell-strains and Primary Cells on Micro-carriers in Homogeneous Culture Nature 216, 64 – 65. doi:10.1038/216064a0

Vaccine, 2014. Vaccine-preventable Diseases and Vaccinations Among Health-care Workers, 32 (38), 4813-80.

Wang MD, Yang M, Huzel N, Butler M, 2002. Erythropoietin production from CHO cells grown by continuous culture in a fluidized-bed bioreactor, Biotechnology Bioengineering, 77, 194–203.

Weber B, Harms F, Selb B and Doerr HW**,** 1992. Improvement of Rotavirus isolation in the Cell Cultureby immune Peroxidase Staining. J Virol Methods, 38, 187-94.

White DO, Fenner FJ, 1986. MedicalVirology. 3rd edu. San Diego Academic Press.

Yazıcı Z ve Akça Y, 1993. Buzagılarda Rotavirus Enfeksiyonlarının Sero epidemiyolojisi ve ELISA Testi ile Rotavirus Antijenlerinin İdentifikasyonu. Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi 40 (2), 231-40.

Yılmaz Ş, Arsoy T, Gültekin Y, Bayri B, Karadaş H, Parlak H. Cultivation and Comparison of BHK-21 Cells in Serum Free Medium by Using Two Adaptation Methods Foot and Mouth Disease Institute, 32. Dünya Veteriner Kongresi Eylül, 2015, Ankara, Turkey.

Zhang B, Yi S, Ma Y, Zhang G, Zhang Y, Xie T, Li H and Sun M. 2011. Immunogenicity of a scalable inactivated rotavirus vaccine in mice, 7(2), 248-57.

.

8. ÖZGEÇMİŞ

14.03.1980 tarihinde Şanlıurfa ' da doğdu. İlköğrenimini Şehitlik ilköğretim okulu'nda, orta ve lise öğrenimini Şanlıurfa Kız Lisesi'nde tamamladı.1998 yılında girmiş olduğu Harran Üniversitesi Kimya Bölümünü 2002 yılında birincilikle bitirdi. Aynı yıl Harran Üniversitesi Kimya Bölümü Anorganik Anabilim Dalı'nda yüksek lisansa başladı ve 2004 yılında mezun oldu. Bir yıl Şanlıurfa Güçlü İlköğretim Okulun'da Fen Bilgisi Öğretmenliği yaptı. 2005 yılında Dollvet Veteriner Aşı, İlaç ve Biyolojik Madde Üretimi A.Ş.'nde Viral Aşılar Bölümü'nde Yüksek Kimyager olarak işe başladı. Halen Dollvet A.Ş'.nde çalışmakta olup Viral Aşılar Laboratuvar Sorumlusudur. Evli ve 3 çocuk annesidir.