

Besiyeri Başlangıç Glikoz ve Glutamin Derişimlerinin Suspende O Tipi şap Virüsü
Kültürlerine Olan Etkilerinin İncelenmesi

Nilüfer Öztürk

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Ocak 2013

Investigation of the Effects of Initial Medium Concentrations of Glucose and Glutamine
on O Serotype Foot-and-Mouth Disease Virus Cultures.

Nilüfer Öztürk

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Chemistry

January 2013

Besiyeri Başlangıç Glikoz ve Glutamin Derişimlerinin Sũspanse O Tipi şap Virũsũ
Kũltũrlerine Olan Etkilerinin İncelenmesi

Nilũfer Őztũrk

Eskişehir Osmangazi Őniversitesi
Fen Bilimleri Enstitũsũ
Lisansũstũ YŐnetmelięi Uyarınca
Kimya Anabilim Dalı
Biyokimya Bilim Dalında
YŐKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Yrd.Doç.Dr. Temir Ali Demir

Ocak 2013

ONAY

Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Nilüfer Öztürk'ün YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı “Besiyeri Başlangıç Glikoz ve Glutamin Derişimlerinin Süspanse O Tipi Şap Virüsü Kùltürlerine Olan Etkilerinin İncelenmesi” başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğın ilgili maddeleri uyarınca değeriendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Yrd.Doç.Dr. Temir Ali DEMİR

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Yrd.Doç.Dr. Temir Ali DEMİR

Üye : Prof.Dr. Tamer AKAR

Üye : Doç.Dr. Ahmet ÇABUK

Üye : Yrd.Doç.Dr. Fahrettin AKYÜZ

Üye : Yrd.Doç.Dr. Asiye BERBER

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Sunulan tez çalışmasında, besiyeri başlangıç glikoz ve glutamin derişimlerinin şap virüsü kültürleri üzerine olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, BHK 21 hücreleri ve O tipi Şap virüsü kullanılmıştır.

Çalışmanın ilk aşamasında başlangıç glikoz ve glutamin derişimleri sırasıyla 5,00-40,00 mM ve 1,00-12,00 mM aralıklarında ve eşzamanlı olarak değişecek şekilde Design-Expert® 7.0.0 yazılımı kullanılarak deney tasarımı gerçekleştirilmiştir. Tasarım sonucuna göre farklı başlangıç glikoz ve glutamin derişimlerinde gerçekleştirilen virüs kültürü deneylerinde 146S ve Enfektif titre miktar tayinleri yapılmıştır. Besiyerinde başlangıç yüksek glikoz (30,00-40,00 mM) ve düşük glutamin derişimlerinin (1,00 mM) 146S ve enfektif titre değerlerini arttırdığı görülmüştür. Seçilen iki bağımsız değişken için Design-Expert® 7.0.0 programı kullanılarak 146S ve enfektif titre cevap parametreleri olarak seçilmiş ve modellenmiştir. Önerilen modele ait sonuçlar ANOVA testi yapılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Yazılım tarafından bağımlı değişkenler için önerilen kuadratik model düşük P değerine (<0,0001) sahip olup istatistiksel olarak önemli bulunmuştur. Kurulan modelde bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkileri incelenmiş ve optimum koşulların belirlenmesi için model optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyonda 146S ve Enfektif titre virüs kültürü verimliliği için maksimize edilmiştir. Yapılan doğrulama deneyleri sonucunda modelin 146S ve Enfektif titre optimizasyonu için dizayn alanında güvenle kullanılabilir özellikte olduğu görülmüştür.

İkinci aşamada tasarım ile sağlanan farklı başlangıç glikoz ve glutamin derişimlerinde gerçekleştirilen virüs kültürü deneylerinde hücre azalması, glikoz ve glutamin tüketim hızları ve laktat oluşum hızları incelenmiştir. Özgül glikoz tüketim ve görünür laktat oluşum hızları sırasıyla 0,346 $\mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa ve 0,529 $\mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulunmuştur. Tüketilen glikozun ortalama %82,50'sinin laktata dönüştürüldüğü görülmüştür. Görünür glutamin tüketim hızı ise 0,163 $\mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Şap virüsü, modelleme, BHK 21, glikoz, glutamin.

SUMMARY

In this study, the effects on foot and mouth virus cultures of initial medium concentrations of glucose and glutamine were investigated. It used that O type foot and mouth virus and BHK 21 cell in the study.

At first step of study, simultaneously change intervals in initial concentrations of glucose and glutamine are selected as 5,00-40,00 mM and 1,00-12,00 mM respectively. The design of experiment sets was carried out using Design-Expert[®] 7.0.0 and these runs were accomplished in accord with the design. According to results of design. In experiments of virus culture which performed different concentrations of initial glucose and glutamine were determined 146S and infectious titer. It seemed that increased in 146S and infectious titer values at initial high glucose and low glutamine concentrations in medium. For two independent variables, 146S and infectious titer response parameters were selected and modelled by used Design-Expert[®] 7.0.0 software program. ANOVA test of the proposed models were described by the statistical results. Proposed quadratic models for dependent variables with a low p value (<0.0001) were found statistically significant. The effects of independent variables on dependent variables were investigated and model optimization was done for determination of optimum concentrations in the created model. 146S and infectious titer were maximized in the optimization for the process efficiency. In the results of verification experiments, it seemed that the model can be used for 146S and infectious titer optimization design area safely.

At the second step of study, cell decrease, glucose and glutamine consumption and lactate production rate were investigated in the virus culture experiment that carried out different initial glucose and glutamine concentrations by provided with design.

Specific glucose consumption and visible lactate rate were founded as 0,346 $\mu\text{mol}/10^6$ cells.h and 0,529 $\mu\text{mol}/10^6$ cells.h respectively production. %82,50 of consumption glucose converted to lactate. Visible glutamine consumption rate was determined as 0,163 $\mu\text{mol}/10^6$ cells.h

Keywords: FMDV, modeling, BHK 21, glucose, glutamine.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarımda, gerek derslerimde ve gerekse tez çalışmalarımda, bana danışmanlık ederek, beni yönlendiren ve her türlü olanağı sağlayan danışmanım Yrd.Doç.Dr. Temir Ali DEMİR'e;

Tez çalışmamda enstitü imkanlarından faydalanmamı sağlayan Şap Enstitüsü Müdürlüğü'nden Vet.Hek. Dr.Musa ALKAN'a ;

Laboratuvar çalışmalarımın ve tez yazımımın her aşamasında bilgi ve tecrübesi ile bana her zaman destek olan Yük.Kimyager Mustafa ÖZYİĞİT'e;

Tez çalışmamda bilgi ve desteğini esirgemeyen Vet.Hek. Dr.Müge FIRAT SARAÇ'a, laboratuvar malzeme ve cihazlarını kullanmama olanak sağlayan Vet.Hek. Dr.Nedret ÇELİK'e, laboratuvar çalışmalarım sırasında manevi destekleri ve yardımlarıyla beni yalnız bırakmayan başta Uzm.Vet.Hek. Himmet EKİCİ olmak üzere Vet.Hek. Ali ÖZDEMİR'e, Laborant Hüseyin Ayhan SARDOĞAN'a, Laborant Necattin YÜCEL'e ve tüm Virüs Kültürü Laboratuvarı personeline, Vasat Hazırlama Laboratuvarı'nda görevli Biyolog Sadık Onur KARAÇAM'a ve Hücre Kültürü Laboratuvarı personeline;

Tez yazımım sırasında yardımını ve desteğini esirgemeyen Ziraat Mühendisi Dr.İmren KUTLU'ya;

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi Yüksek lisans eğitimim boyunca da destekleriyle hep yanımda olan aileme;
teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	v
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	xi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. TEMEL BİLGİLER	3
2.1. Virüslerin Genel Özellikleri.....	3
2.1.1. Virüslerin yapısı.....	4
2.1.2. Virüslerin sınıflandırılması.....	5
2.1.3. Virüslerin çoğalması.....	7
2.2. Şap Hastalığı.....	10
2.3. Şap Virüsü.....	10
2.4. Virüsün hücreye bağlanması.....	14
2.5. Şap Virüsü Tipleri.....	15
2.6. Şap Aşısı Tarihçesi ve BHK Hücre Hattı.....	16
2.7. Hücre metabolizması.....	17
2.7.1. Glikoz taşınımı.....	18
2.7.2. Glikoz metabolizması.....	18
2.7.3. Glutamin taşınımı.....	22
2.7.4. Glutamin metabolizması.....	23
2.8. Deneysel Sistemlerinin Tasarlanması.....	23
2.8.1. Cevap Yüzey Yöntemi.....	24

İÇİNDEKİLER(devam)

2.8.1.1. Cevap yüzey grafiği.....	26
2.8.2.2. Kontur grafiği.....	26
2.8.2.3. Deney tasarımı.....	26
2.8.3. Cevap yüzey yönteminde modelin belirlenmesi.....	27
3.DENEYSEL ÇALIŞMA.....	29
3.1. Deney Tasarımı.....	29
3.2. Hücre Hattı.....	30
3.3. Virüs Kültürü Besiyeri.....	30
3.4. Aşı Virüsünün Hazırlanması ve Stoklanması.....	32
3.5. Virüs Kültürü	32
3.6. Analitik Teknikler.....	35
3.6.1. 146S partikül miktarının belirlenmesi.....	35
3.6.2. Enfektif titrenin belirlenmesi.....	36
3.6.3. Glikoz analizi.....	38
3.6.4. Laktat analizi.....	39
3.6.5. Glutamin analizi.....	39
3.7. Kinetik Eşitlikler.....	40
4.SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	42
4.1. Cevap Yüzey Metodu Model Sonuçları.....	42
4.1.1. 146S için cevap yüzey metodu model sonuçları.....	43

İÇİNDEKİLER(devam)

4.1.2. Enfektif titre (ET) için cevap yüzey metodu model sonuçları.....	48
4.1.3. 146S ve ET Optimizasyonu.....	52
4.1.4. Doğrulama deneyleri.....	55
4.2. Virüs Kültürü Kinetik Çalışma Sonuçları.....	55
4.2.1. Virüs kültüründe zamana karşı metabolit ve substrat derişimi değişimleri.....	56
4.2.2. Virüs kültüründe substrat azalış ve metabolit artış hızları.....	59
4.2.3. Virüs kültürü biyokinetik parametreleri ve sonuçları.....	62
4.2.4. Doğrulama deneyleri kinetik ve biyokinetik sonuçları.....	73
4.3. Genel Sonuçlar.....	79
5.EK AÇIKLAMALAR.....	82
6. KAYNAKLAR DİZİNİ.....	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.1. Virüs partikülü yapısında bulunan bölümler	4
2.2. Virüslerin sınıflandırılması	6
2.3. Virüsün konak hücreye füzyon yoluyla girişi.....	8
2.4. Virüsün konak hücreye pinositoz yoluyla girişi.....	8
2.5. Virüsün hücreye translokasyon yoluyla girişi.....	8
2.6. Picornavirüs yaşam döngüsü.....	9
2.7. Şap virüsü kapsidi.....	11
2.8. Şap virüsünün genom şeması	13
2.9. Normal tek tabaka BHK 21 hücresi ve şap virüsü ile enfekte olan BHK 21 hücresinde CPE oluşumu.....	15
2.10. Glikoliz ve pentoz fosfat döngüsü	20
2.11. TCA döngüsü	19
3.1. Su banyosunda biyoreaktörler	34
3.2. 146S tayini absorbans grafiği örneği	36
3.3. Altı gözlü tek kullanımlık hücre kültürü tabletlerinde D1 deneyine ait plak oluşumu.....	37
3.4. Altı gözlü tek kullanımlık hücre kültürü tabletlerinde F1 deneyine ait plak oluşumu	38
4.1. 146S'in teorik olarak hesaplanan değerlerine karşı gözlenen (deneysel) değerlerin dağılımı.....	45
4.2. 146S modeli glikoz-glutamin YCG ve KG'leri.....	47
4.3. ET'nin teorik olarak hesaplanan değerlerine karşı gözlenen (deneysel) değerlerin dağılımı.....	49
4.4. ET modeli glikoz-glutamin YCG ve KG'leri.....	51
4.5. Optimizasyon deneyleri için 146S, ET, Tercih oranı KG'leri	54
4.6. Virüs kültürü süresince I. grup deneylere ait glikoz, laktat ve glutamin derişimi değişimi grafikleri.....	57
4.7. Virüs kültürü süresince II. grup deneylere ait glikoz, laktat ve glutamin derişimi değişimi grafikleri	58
4.8. Virüs kültürü zamanına karşı glikoz tüketim hızı	60
4.9. Virüs kültürü zamanına karşı glutamin tüketim hızı	61
4.10. Virüs kültürü zamanına karşı hücre derişimi değişimi.....	63
4.11. Virüs kültürü zamanına karşı özgül glikoz tüketim hızı grafikleri.....	65

ŞEKİLLER DİZİNİ(devam)

4.12. Virüs kültürü zamanına karşı görünür laktat oluşum hızı grafikleri.....	67
4.13. Virüs kültürü zamanına karşı değişen $Y_{Lak/Gli}$ verim faktörü.....	69
4.14. Deneyler bazında $Y_{Lak/Gli}$ verim faktörünün % dağılımı.....	70
4.15. Virüs kültürü zamanına karşı görünür glutamin tüketim hızı grafikleri.....	72
4.16. Doğrulama deneylerine ait glikoz, laktat ve glutamin derişimi değişimi grafikleri.....	74
4.17. Doğrulama deneylerine ait glikoz tüketim hızları.....	75
4.18. Doğrulama deneylerine ait glutamin tüketim hızları.....	76
4.19. Doğrulama deneylerine ait özgül glikoz tüketim hızı, görünür laktat oluşum hızı, $Y_{Lak/Gli}$, görünür glutamin tüketim hızı grafikleri.....	79

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Cizelger</u>	<u>Sayfa</u>
3.1. Desing-Expert [®] 7.0.0 programı tarafından önerilen cevap yüzey metodu,merkezi kompozit tasarımı deney setleri.....	29
3.2. 6M besiyeri içeriği.....	31
3.3. Tohum virüse ait 146S partikül miktarı, E.T ve antijenik titre değerleri	32
4.1. Merkezi kompozit tasarımı tarafından önerilen deney setleri ve bağımlı değişkenlerin sonuçları.....	42
4.2. 146S modeli için ANOVA sonuçları.....	44
4.3. ET modeli için ANOVA sonuçları.....	48
4.4. Optimizasyon kriterleri ve koşulları	52
4.5. Design Expert [®] tarafından önerilen optimizasyon çözüm sonuçları.....	53
4.6. Doğrulama deney sonuçları	55
4.7. Virüs kültürü deneylerine ait biyokinetik veriler.....	62

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Simgeler</u>	<u>Açıklama</u>
Gli	Glikoz derişimi (mol L^{-1})
Lak	Laktat derişimi (mol L^{-1})
Glu	Glutamin derişimi (mol L^{-1})
qGli	Hücre özgül glikoz tüketim hızı ($\text{mol hücre}^{-1} \text{ sa}^{-1}$)
qgörLak	Görünür hücre özgül laktat oluşum hızı ($\text{mol hücre}^{-1} \text{ sa}^{-1}$)
qgörGlu	Hücre özgül glutamin tüketim hızı ($\text{mol hücre}^{-1} \text{ sa}^{-1}$)
mM	Milimolar (mmol L^{-1})
sa	Saat
t	Zaman (saat)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
ACO	Akonitat hidrataz
ADP	Adenozin difosfat
ATP	Adenozin trifosfat
α -KG	Alfa ketoglutarat
BEI	Bazik etilenimin
BHK	Yavru hamster böbrek hücre hattı
CAC	Sitrik asit döngüsü
CoA	KoenzimA
CPE	Sitopatik etki
<i>cre</i>	cis-aracılı replikasyon elemanı
CS	Sitrat sentetaz
CYY	Cevap Yüzey Yöntemi
DNA	Deoksiribo nükleik asit
FMDV	Şap virüsü
FUM	Fumaraz
GAPDH	Gliseraldehit 3 fosfat dehidrogenaz

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ(devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Acıklama</u>
G6P DH	Glikoz 6 fosfat dehidrogenaz
HK	Hekzokinaz
IDH	İsositrat dehidrogenaz
IRES	İnternal ribozomal giriş bölgesi
KGDH	α - ketoglutarat dehidrogenaz
LDH	Laktatdehidrogenaz
MDH	Malat dehidrogenaz
MOP	Monolayer O virüsü pasajı
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid'in indirgenmiş formu
NADPH	Nikotinamid adenin nükleotid fosfat indirgenmiş formu
OIE	Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü
ORF	Açık okuma bölgesi
PDH	Piruvat dehidrogenaz
PFU	Plak oluşturan birim
PFK	Fosfofrutokinaz
PGI	Fosfoglikoz izomeraz
PGM	Fosfogliseratmutaz
PGK	Fosfogliseratkinaz
PK	Piruvat kinaz
PPP	Pentoz fosfat yolu
RGD	Arg-Gly-Asp tripeptit
RNA	Ribonükleik asit
SCS	Süksinat KoA sentetaz
SDH	Süksinat dehidrogenaz
TCA	Trikarboksilik asit döngüsü
TPI	Triozfosfat izomeraz
UTR	Kodlanmayan bölge
VPg	Viral genom proteini
VP0-4	Viral protein 0-4

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Şap hastalığı sığır, domuz, koyun ve keçi gibi çift tırnaklı hayvanlarda görülen, uluslararası hayvan ve hayvansal ürün ticaretinde önemli kısıtlama nedeni olarak kabul edilen oldukça bulaşıcı viral bir hastalıktır (Alexandersen and Mowat, 2005; Kitching et al., 2007; Samuel and Knowles, 2001; Paton et al., 2009). Şap virüsünün yedi farklı serotipi (O, A, C, Asia1, SAT1, SAT2 ve SAT3) vardır ve bir tipe karşı oluşan antikor diğer tiplere karşı koruyuculuk içermez (Domingo et al., 2003). Şap virüsünün geniş bir konakçı aralığına sahip olması, duyarlı hayvanlarda küçük dozlarla bile enfeksiyon oluşturabilmesi, hızlı bir replikasyon sürecine sahip olması ve rüzgarla yayılım dahil çeşitli bulaşma modelleri ile yayılabilmesi gibi özelliklerinden dolayı şap hastalığı önemli ve kontrolü zor olan bir hastalıktır (Donaldson et al., 1982).

Viral etmenli bir hastalık olmasından dolayı hastalıkla mücadelede aşılama önemlidir. Günümüzde şap aşısı üretiminde yaygın olarak BHK-21 hücre hattı kullanılmaktadır. Şap virüsünün biyogüvenlik koşulları altında rulo şişelerde veya süspanse BHK 21 hücrelerinde büyük hacimde üretilmesi aşı üretimi süreçlerini oluşturmaktadır (Cox et al., 2006).

Virüslerin üremeleri tümüyle intrasellüler olup konakçı hücre yapısına ve hücrenin metabolik bileşenlerine mutlak bir bağımlılık göstermektedir. Konak hücrenin sitoplazmasında virüs replikasyonu oluştuktan sonra etkenin virulansına bağlı olarak 4–6 saat inkübasyon süresinin sonunda yeni virionlar şekillenmeye başlamaktadır. Virüsün replikasyonu sonucunda konakçı hücrenin sitoplazmasında sitopatik etki (CPE) olarak bilinen hücrelerin yuvarlaklaşması, hücre membranında dejenerasyon ve en son olarak da hücrenin erimesi (lisis) gibi patolojik değişiklikler görülmektedir (Rueckert, 1996).

Virüs kültürlerinin verimini arttırmak için iyi hücre hattı kullanımının yanında iyi tasarlanmış besiyeri kullanılması gereklidir. Besiyerlerinde hücreler için glikoz ana karbon ve enerji kaynağı, glutamin ise ana azot kaynağı olarak kullanılmaktadır (McKeehan, 1982; Thilly, 1986). Bu besiyeri bileşenlerinin tüketim hızları besin

ortamına ve hücrelerin metabolik düzeylerine bağlıdır. Büyük oranda glikoz metabolizması, daha düşük oranda ise glutamin metabolizması sonucu oluşan laktat ve özellikle glutamin metabolizması sonucu oluşan amonyumun hücreler için zararlı metabolitlerdir. Bu zararlı metbolitlerin kültür ortamında düşük derişimde tutulabilmesi için glikoz ve glutamin derişimlerinin kontrollü kullanılması gerekmektedir. Sıcaklık, pH ve çözünmüş oksijen değişkenlerinin de kültür üzerinde etkisi vardır (Miller et al., 1988; Ozturk and Palson, 1991).

Verimli bir virüs kültürü elde edebilmek için kültür ortamında tüketilen besiyeri ve üretilen metabolizma ürünlerinin bağımlı değişkenlerle ilişkilendirilmesi ve optimize edilmesi gerekmektedir. Bu amaç için matematiksel yöntemler kullanılmaktadır.

Bu tez çalışmasında O tipi şap virüsü kültürlerinde eşzamanlı olarak besiyeri glikoz ve glutamin derişimleri değiştirilmiştir. Bu besiyeri bileşenlerinin 146S ve Enfektif titre üzerine olan etkileri cevap yüzey yöntemi ile modellenerek incelenmiştir. Optimizasyon yapılarak virüs kültürü için optimum glikoz ve glutamin miktarları belirlenerek doğrulama deneyleri yapılmıştır. Ayrıca bu tez kapsamında O tipi şap virüsü kültürlerinde zamanla substrat ve metabolit derişimleri değişimleri incelenmiş ve O tipi şap virüsü kültürlerine ait biyokinetik veriler belirlenmiştir.

BÖLÜM 2

TEMEL BİLGİLER

2.1. Virüslerin Genel Özellikleri

Tek hücreli mikroorganizmalar boyutlarına ve yapılarına göre protozoa, mantar, bakteri, mikoplazma, riketsiya ve klamidyalar olarak sıralanabilir. Bu mikroorganizmalar kendi imkanlarıyla enerji ve makromolekül sentezleyebilirler ve bölünerek çoğalırlar (Murphy et al., 1999).

Virüsler yapıları, biyolojik özellikleri ve çoğalma yöntemleri bakımından diğer enfeksiyöz mikroorganizmalardan farklılık göstermektedirler (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011). Diğer mikroorganizmalardan farklı olarak tek tip nükleik asit (DNA ya da RNA) içermeleri virüslerin sınıflandırılmasında önemli bir ölçüt olarak kullanılmaktadır. Enerji üretebilecek ve makromolekül sentezleyebilecek organelleri olmadığı için virüsler çoğalabilmek için mutlak konakçı bir hücreye ihtiyaç duyarlar. Bu özellikleri virüsleri diğer mikroorganizmalardan ayıran en önemli özellikleridir (Ustaçelebi vd.,2004).

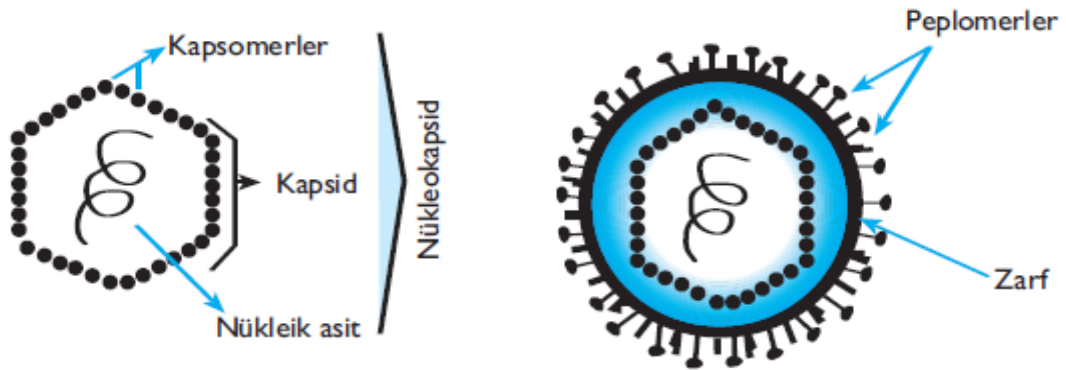
Virüsler diğer mikroorganizmalardan daha küçüktür ve 20-300 nm arasında değişen büyüklükleri ile sadece elektron mikroskobu ile görülebilmektedirler (Ustaçelebi vd.,2004). Virüsler hücre dışında metabolik olarak aktif değildirler (inert), konakçı hücre içinde ise metabolik olarak aktiftirler ve konakçı hücreyi kullanarak kopyalarını oluştururlar (Murphy et al., 1999).

Tüm bu bilgilerden yararlanılarak virüsler zorunlu hücre içi parazit olan, kendine özgü replikasyon mekanizması bulunan, tek tip nükleik asit içeren, enerji üretebilecek veya makromolekül sentez edebilecek organelleri olmayan en küçük enfeksiyon etkenlerindedir şeklinde tanımlanabilmektedirler (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

2.1.1. Virüslerin yapısı

Virüsler nükleik asit ve bunu çevresel inaktive edici ajanlardan koruyan protein kılıf (kapsid) ile çevrilmiştir. Bu yapı nükleokapsid olarak isimlendirilir. Viral kapsidin oldukça dayanıklı olması gerekir. Bu yüzden viral kapsidler simetrik (kübik simetri veya heliksel simetri) bir yapı içerirler. Karmaşık yapıly virüslerin kılıfı ise zengin lipoprotein içerirler (Ustaçelebi vd.,2004).

Nükleokapsidin merkezinde tek tip DNA ya da RNA bulunur. Kapsid altyapı ünitesi olan kapsomerlerden oluşmaktadır. Bu şekilde oluşan enfeksiyöz güce sahip virüs partikülüne virion denir. Bazı virüslerde nükleokapsidi çevreleyen lipoprotein yapısında bir zarf bulunur. Büyük oranda lipitlerden oluşan bu zarf eter ve kloroform gibi çözücülerden etkilenir ve zarfıly virüsler enfeksiyon oluşturma yeteneklerini kaybedebilirler. Zarf üzerinde bulunan glikoproteinler elektron mikroskopunda ışınsl çıkıntılar şeklinde görülür. Bu ışınsl çıkıntılar peplomer olarak isimlendirilirler (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).



Şekil 2.1. Virüs partikülü yapısında bulunan bölümler (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

2.1.2. Virüslerin sınıflandırılması

Virüslerin sınıflandırılmasında virüs yapısı, nükleik asit çeşiti, kapsid yapısı, protein alt birimleri sayısı, konak türü gibi özellikler kullanılır.

İki tür sınıflandırma sistemi vardır:

- 1- Hiyerarşik virüs sınıflandırma sistemi
- 2- Baltimore sınıflandırma

1. Hiyerarşik virüs sınıflandırma sistemi

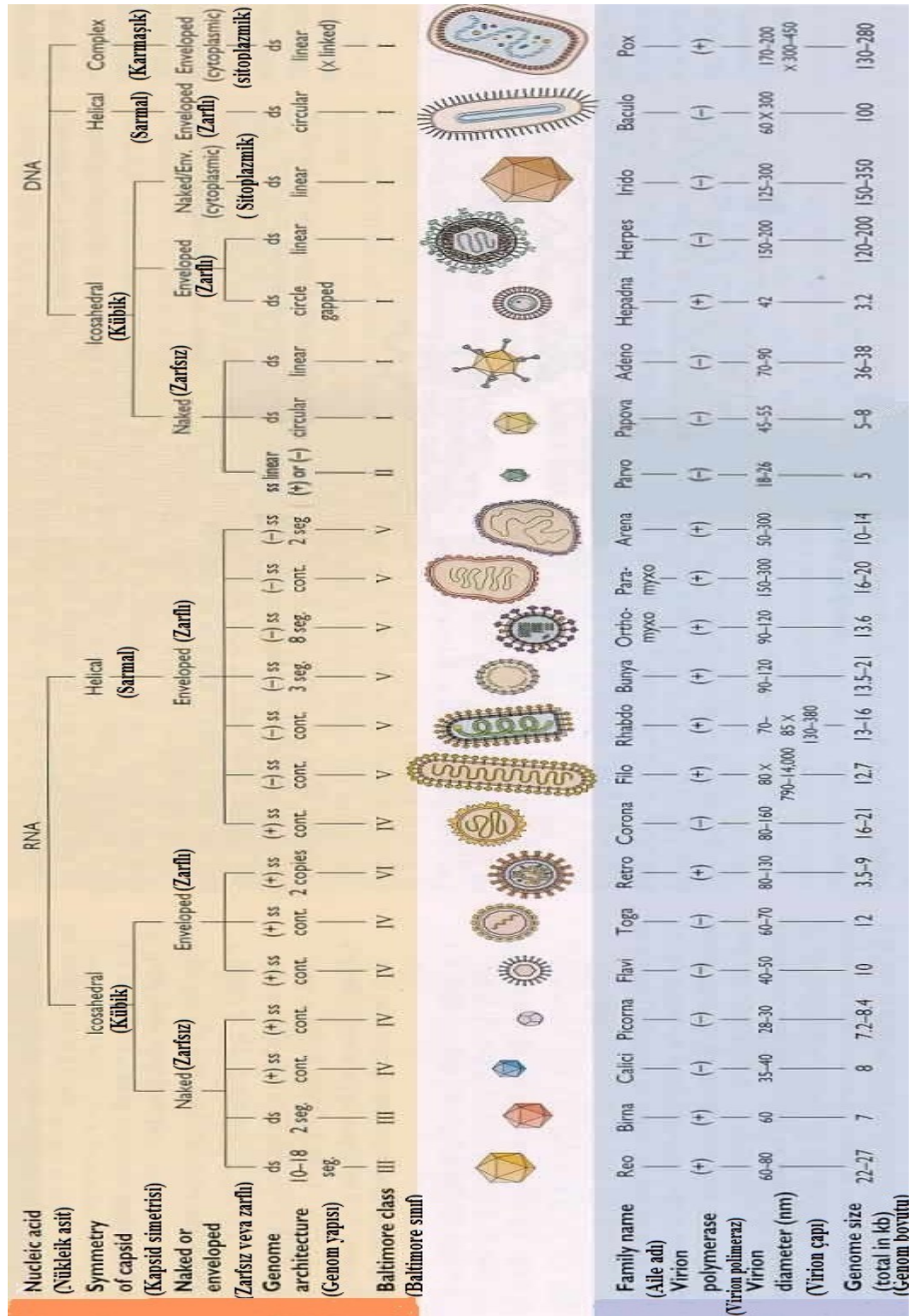
1962 yılında Lwoff, Horne, and Tournier takım - familya - altfamilya - cins - tür - suş/tip şeklinde kapsamlı bir sınıflama yapmışlardır. Bu sistemde virüslerin dört temel özelliği esas alınır:

- Nükleik asit yapısı
- Kapsid simetrisi
- Zarflı veya zarfsız oluşu
- Virion ve kapsid boyutları

2. Baltimore sınıflandırma

David Baltimore'un geliştirdiği sistemde virüsler genom yapılarına ve çoğalma şekillerine göre yedi farklı gruba ayrılır ve her grup Roman rakamıyla gösterilir.

- I. Grup: Çift iplikli DNA virüsleri (Örnek: Adenovirüsler, Herpesvirüsler)
 - II. Grup: Tek iplikli DNA virüsleri (Örnek: Parvovirüsler)
 - III. Grup: Çift iplikli RNA virüsleri (Örnek: Reovirüsler)
 - IV. Grup: Pozitif polariteli tek iplikli RNA virüsleri (Örnek: Picornavirüsler)
 - V. Grup: Negatif polariteli tek iplikli RNA virüsleri (Örnek: Orthomyxovirüsler)
 - VI. Grup: Ters transkripsiyon yapan RNA virüsleri (Örnek: Retrovirüsler)
 - VII. Grup: Ters transkripsiyon yapan DNA virüsleri (Örnek: Hepadnavirüsler)
- (Christian, 2002).



Şekil 2.2. Virüslerin sınıflandırılması (Christian, 2002).

2.1.3. Virüslerin çoğalması

Virüsler zorunlu hücre içi parazitlerdir ve çoğalmabilmek için hücrenin enerji kaynaklarına ve translasyon düzeneklerine gereksinimleri vardır. Virüslerin çoğalması nükleik asit replikasyonuna dayanmaktadır. DNA virüsleri (Poksivirüs hariç) ve bazı RNA virüsleri (retrovirüs ve ortomiksovirüs) replikasyon ve transkripsiyon için hücre çekirdeğindeki proteinlere gereksinim duyarlar ve bu nedenle hücre çekirdeğinde replike olurlar. RNA virüslerinin çoğu ise replikasyon ve transkripsiyon için kendi viral polimerazlarını kullanarak sitozolde replike olurlar (Ustaçelebi vd.,2004; Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

Hücredeki virüs çoğalma süreci;

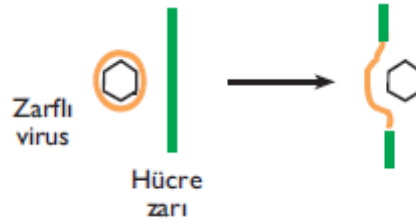
- 1- Tutunma
- 2- Penetrasyon
- 3- Eklips
- 4- Olgun virüs partikülü oluşumu
- 5- Dışarı dökülme

olmak üzere 5 basamakta gerçekleşir (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

1- Tutunma basamağı: Virüsün hücreye girebilmesi için öncelikle hücre yüzeyinde bulunan reseptörlere tutunması gerekir. Reseptörler hücreye ait yüzey proteinleridir ve virüs partikülleri özgün reseptörleri taşıyan hücrelere, virion yüzeyinde yer alan proteinleri (ligant) yolu ile tutunurlar. Bu tutunma basamağı geri dönüşümlü olup çevresel koşullara bağlıdır (ısı, pH, iyon konsantrasyonu) (Ustaçelebi vd.,2004; (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

2- Penetrasyon basamağı: virüsler hücre reseptörlerine tutunduktan sonra çok kısa sürede hücre içine girerler. Enerji gerektiren bu basamakta virüs üç şekilde hücre içine girer (Ustaçelebi vd.,2004).

- Füzyon: Zarflı virüslerin çoğu bu şekilde hücre içine girerler. Zarfın hücre membranı ile kaynaşması sonucu nükleokapsid hücre içine salınır.



Şekil 2.3. Virüsün konak hücreye füzyon yoluyla girişi (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

- Pinositoz: Daha çok zarfsız virüsler bu yolu kullanırlar. Hücre zarına tutunan virüs hücre zarının içeriye doğru çökmesiyle oluşan endozom içerisinde sitoplazmaya alınır.



Şekil 2.4. Virüsün konak hücreye pinositoz yoluyla girişi (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

- Translokasyon: kübik simetrlili ve küçük yapılı virüsler tarafından kullanılan bu yöntemde virion hücre membranını direkt olarak geçerek sitoplazmaya ulaşır.



Şekil 2.5. Virüsün hücreye translokasyon yoluyla girişi (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

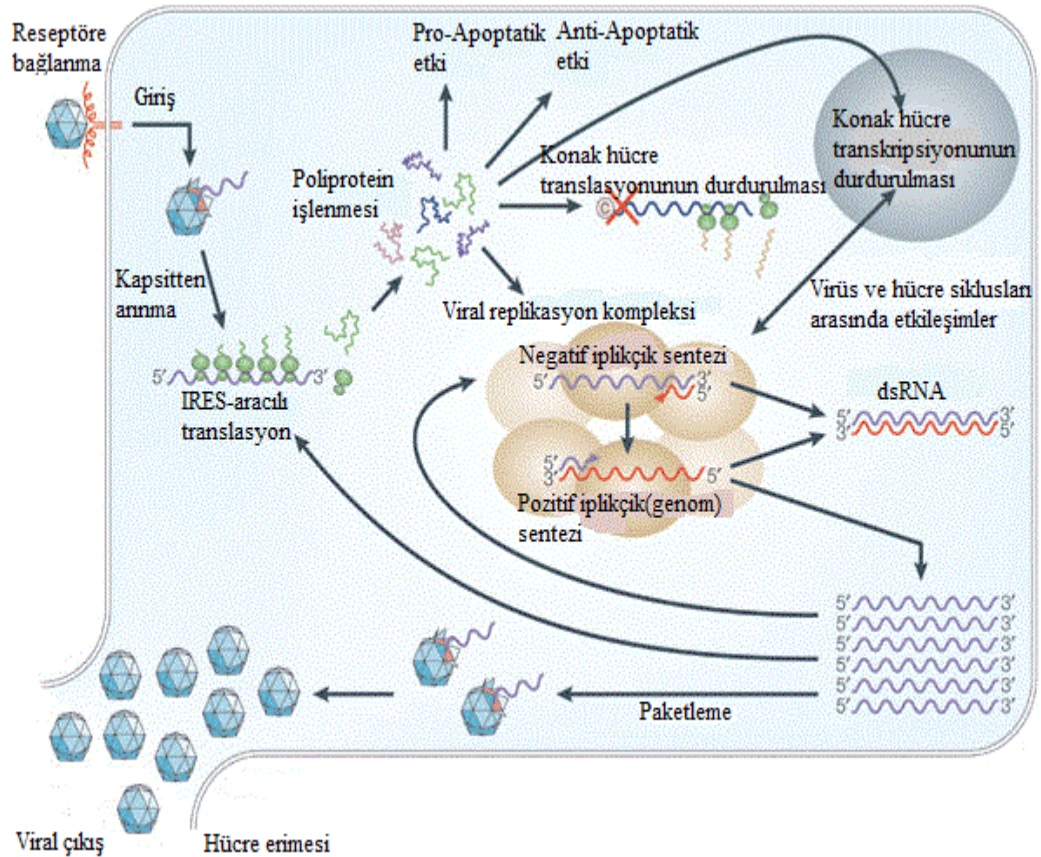
3-Eklips (sentez) basamağı: Bu basamak virüs çoğalmasının en yoğun ve karmaşık aşamasıdır. Serbest kalan nükleik asitten RNA kopyası oluşturulur (transkript) ve bu kopya mRNA'ya dönüştürülerek ilk aşama proteinleri (erken proteinler) sentezlenir. Daha sonra yeni virüs partikülünde yer alacak nükleik asit ve arkasından tekrar mRNA sentezlenerek son proteinler (geç proteinler) sentezlenir (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).

4-Olgun virüs partikülü oluşumu basamağı: Bu basamak zarfsız virüslerde nükleokapsid, zarflı virüslerde buna ek olarak zarf yapısının oluşumunu kapsar. Kapsid oluşumu kapsomer birimleri arasındaki hidrofobik ve elektrostatik etkileşimler yoluyla gerçekleşir (Ustaçelebi vd.,2004).

5-Dışarı dökülme basamağı: yeni virionların konak hücre dışına çıkması iki yolla gerçekleşir.

-Konak hücrenin dejenarasyonu ve virüs partiküllerinin toplu halde saçılımı: Zarfsız virüslerin çoğu sitoplazmada birikerek hücrenin parçalanması sonucu hücre dışına dağılırlar.

-Tomurcuklanma yoluyla saçılım: Zarflı virüsler genellikle hücre membranından tomurcuklanarak dağılırlar (Yeşilbağ ve Çabalar, 2011).



Şekil 2.6. Picornavirüs yaşam döngüsü (Whitton et al., 2005).

2.2. Şap Hastalığı

Şap hastalığı; koyun, keçi, manda, sığır ve domuz gibi çift tırnaklı hayvanlarda görülen viral bir hastalıktır (Alexandersen and Mowat, 2005; Kitching et al., 2007) ve son derece bulaşıcı olup, uluslar arası canlı hayvan ve hayvansal ürünlerin ticaretine kısıtlama getiren (Samuel and Knowles, 2001), Dünya Hayvan Sağlığı Örgütü (OIE)' ne göre ekonomik, ticari ve sosyal açıdan en önemli hayvan hastalığıdır (Paton et al., 2009).

Şap virüsü vücuda giriş bölgesinde, üst solunum yolunun mukoza ve lenfoid dokusunda veya deri bütünlüğünün bozulduğu bölgelerde dermal ve subdermal dokuda replike olur (Kitching, 2002). Enfeksiyon üst solunum yolu ya da virüsün enjeksiyonu ile gerçekleşir. Virüs ilk olarak genellikle faringeal epitelinin birincil vezikülünde çoğalır. Virüsün alınması sonucu 1-2 gün içinde ateş çıkabilir (Barnett et al., 2004). Şap hastalığıyla bağlantılı hayvan ölümleri az olmakla birlikte, hastalık hayvanlarda verimi düşürür, ayaklarda, ağızda ve memede akut ve ağrılı veziküler lezyonlar oluşur (Bachrach, 1968; Pereira, 1981; Sobrino et al., 2001; Burrous, 1996). Hastalığın genellikle 40 °C' nin üzerinde ateş, aşırı tükürük salgısı, topallık, depresyon ve süt üretimindeki azalma gibi klinik belirtileri vardır. Dudak mukozasında, dil yüzeyinde ve diş etlerinde en ağır şekilde gözlemlenir. Genç hayvanlarda kalp hücrelerine zarar vererek ölüme neden olabilmektedir (Kitching, 2002).

Şap hastalığı çoğunlukla doğrudan ya da dolaylı temas yoluyla yayılır. Doğrudan yayılma duyarlı hayvanlara enfekte damlacıkların mekanik transferini, dolaylı yayılma ise virüs bulaşmış personel ya da materyali içerir (Alexandersen et al., 2003).

2.3. Şap Virüsü

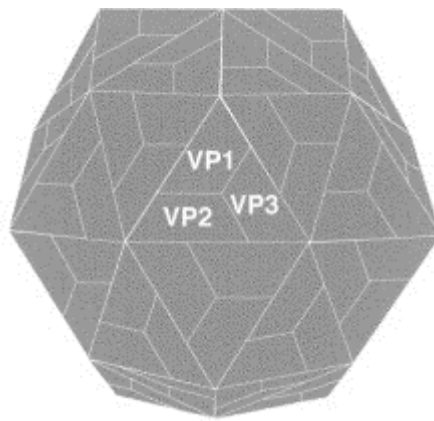
Şap virüsü Picornaviridae ailesinden Aphthovirus cinsine aittir (Belsham, 2005). Diğer Picornaviridae ailesinin virüslerinin aksine düşük pH (pH<6.5) değerine karşı

hassastır (Acharya et al., 1989; Curry et al., 1995) ve 56°C' nin üzerindeki sıcaklıklara karşı son derece dayanıksızdır (Brown et al., 1961).

Şap virüsü kübik simetrlili yapıda, zarfsız, pozitif polariteye sahip ve yaklaşık 8.3 kb. uzunluğunda tek sarmallı RNA'ya sahiptir (Acharya et al., 1989). Virüs partikülünün çapı yaklaşık 30 nm'dir ve her biri 60 kopyadan oluşan VP1(1D), VP2(1B), VP3(1C), VP4(1A) olarak adlandırılan dört kapsit proteinden oluşmaktadır. VP1, VP2, VP3 kapsidin dış yüzeyinde yer alırken, VP4 iç kısımda RNA ile temas halindedir (Mateu, 1995, Acharya et al., 1989).

Virion yaklaşık % 70 protein, % 30 RNA ve çok az miktarda lipit içerir (Bachrach et al., 1964), yaklaşık $8,5 \times 10^6$ moleküler kütle ve 146S sedimentasyon sabitine sahiptir. Sukroz çözeltilerindeki sedimentasyon oranı olan 146S, aşı üreticileri tarafından kültür ürünüde varolan bozulmamış virion kütlelerini hesaplamak için sıklıkla kullanılır çünkü virus partiküllerinin parçalanması immunitite kaybı ile sonuçlanır (Thomson, 1994).

Protomer olarak bilinen yapısal proteinlerin tek bir kümesi VP1, VP2, VP3 ve VP4 ün her birisinin bir kopyasını içerir. Beş protomer bir araya gelerek pentameri, oniki pentamer de kapsiti oluşturur (Forss, 1984; Palmenberg, 1990).



Şekil 2.7. Şap virüsü kapsidi (Domingo et al., 2002).

VP1'in virüsün duyarlı hücreye yapışmasında ve virüsün yaşamsal döngüsünde önemli rolü vardır (Alcala et al.,2001; Bachrach et al.,1975).

VP1, virüsün önemli immünojenik sitesini içerir (G-H kıvrımı) ve onun kodlama dizisi serotiplerin ayrılmasında kullanılır (Vosloo et al., 2002). G-H kıvrımı doğal virionların kristal X ışını kırılım desenlerine göre son derece düzensiz görünür (Logan et al., 1993). Salgınlar sırasında elde edilen izole VP1 kodlama dizilerinin karşılaştırılması sonucunda bireyler arasındaki akrabalık belirlenebilir (Samuel and Knowles, 2001).

VP1'de ki iki immünojenik bölge 141-160. amino asit (G-H kıvrımı) ve 200-213. amino asit dizilerinde yer alır. 145-147 amino asit kalıntıları üzerinde virüs ve hücre yüzey reseptör arasındaki etkileşim içinde RGD motifi yer alır (Arg¹⁴⁵-Gly¹⁴⁶-Asp¹⁴⁷ (RGD) motifi) (Mason et al., 2003). VP1 deki G-H kıvrımının üzerinde bulunan RGD' nin virüs için hücre reseptörlerini tanıma ve antikor bağlayıcı olarak iki işlevi vardır (Baranowski et al., 2001; Nemerow et al., 2001; Verdaguer, et al., 1995). VP1 bağışıklık yanıtını uyaran iki epitop taşır; B hücre epitopu (141–160 aa ve 200–213 aa kalıntıları) (Bittle et al., 1982; Van Lierop et al., 1992) ve T hücre epitopu (21–40 aa kalıntıları) (Collen et al., 1991).

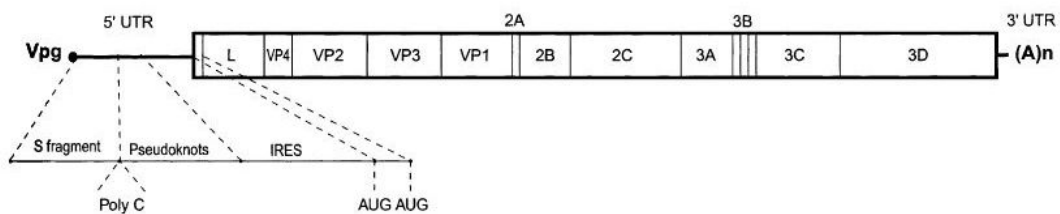
Şap virüsü genomu uzun tek bir açık okuma çerçevesi içerir (ORF) Tek bir polipeptid kodlamasında iki yanında çevrilmemiş bölge bulunur (5'UTR ve 3'UTR) (Sobrino et al., 2001). 5' çevrilmemiş bölgesinde (5'UTR) kısa fragmanlı bir çok yapısal oluşmaktadır (Belsham and Brangwyn, 1990; Clarke et al., 1987). Bütün Picornaviridaeelerin aksine şap virüsü genomunda 5'UTR de mRNA bulunmaz. Bunun yerine viral RNA' nın 5'UTR viral protein (VPg) ile kovalent bağlıdır (King et al., 1980). 5'UTR de ; uzun u şeklinde S parçası, değişken uzunluktaki poli(C) bölgesi (100-400), birbiri ardına katlanan çoklu (2-4) pseudo düğümleri, ilmek yapısında olan cis-aracılı replikasyon elemanı (*cre*), translasyonun internal başlangıcına katılan internal ribozomal giriş bölgesi (IRES) yer alır (Belsham and Brangwyn, 1990; Kuhn et al.,1990; Martinez-Salas et al., 1993).

Şap virüsü hücreye bağlandıktan sonra VPg proteini, genomik RNA'nın 5'UTR'sine bağlanarak şapka yapısını kaybeder ve serbest bir 5'UTR'sine sahip olur.

Hücresel bir enzim yardımıyla VPg bölünür ve IRES yönetiminde bir poliprotein üretilir (Mason et al., 1994; Racaniello, 2007).

Poliprotein viral proteazlar tarafından bölünerek çeşitli yapısal ve yapısal olmayan proteinler oluşur. Bu proteinler L ve P1 proteinleri olup genom replikasyonuna destek vererek yeni virüs partiküllerinin üretimine katkı sağlarlar (Mason et al., 1994; Racaniello, 2007). P1 polipeptid sekansı L proteinin hemen aşağısında başlar. P1 dört kapsid proteini (VP1-VP4) içerir (Baxt et al., 2002).

P2 ve P3 RNA geninin replikasyonunu ve viral çoğalmayı sağlayan yapısal olmayan proteinleri (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D) kodlar (Hansen et al., 1997). Protein 2A'nın viral replikasyonda rolünün olduğu düşünülmektedir. Protein 2B ve 2C endoplazmik retikulumdan golgi aparatına doğru olan geçişi kapatarak salgısal yolu inhibe ederler. Protein 3A hücresel membran ile çok yakından ilişkilidir (Mason et al., 2003). Protein 3B VPg 'nin üç kopyasını kodlar, Protein 3C poliproteinlerin bölünmesini katalizleyen proteazdır, protein 3D ise viral RNA'ya bağlı RNA polimerazdır (Hansen et al., 1997). 3'UTR yaklaşık 90 nükleotid uzunluğunda bir bölge ve poli (A) bölgesinden oluşur. Viral RNA replikasyonunda IRES faaliyetlerine katılmaktadır (Lopez de Quinto et al., 2002; Saiz et al., 2001).



Şekil 2.8. Şap virüsünün genom şeması (Sobrinho et al., 2001).

Viral genomun replikasyonu enfekte olmuş hücrenin sitoplazmasında oluşur. Protein sentezi 84 nükleotidden oluşan 2 AUG kodunu ile başlar (Forss et al., 1984).

Replikasyonda RNA, mRNA işlevini görür (Mason et al., 2003). Genomun replikasyonu, cre'nin yardımı ile 3D proteini tarafından gerçekleştirilir (Goodfellow et al., 2003; Bedard and Semler, 2004).

Alfa/ beta interferon (IFN α/β) viral enfeksiyona karşı konak hücrenin ilk savunma mekanizmasıdır. Şap virüsü IFN α karşı oldukça duyarlıdır (Chinsangaram et al., 2003). Yeni çalışmalar IFN α 'nın çözünebilir bir protein içeren antijenle birlikte uygulandıklarında antiviral aktiviteye yardımcı bir madde olarak işlev yapabileceğini göstermiştir (Le Bon et al., 2001).

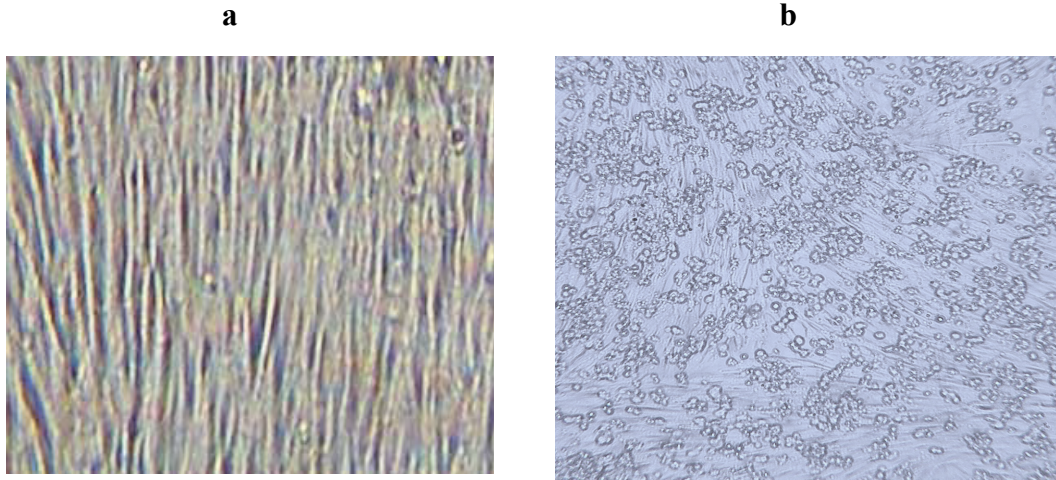
2.4. Virüsün hücreye bağlanması

Virüsün bağlanması VP1 de bulunan RGD döngüsünün hücre yüzeyindeki integrin reseptörleriyle etkileşimi yoluyla gerçekleşir (Jackson et al., 2003; Logan et al., 1993). İntegrin hücreye yapışma molekülü olarak işlev gören integral membran reseptörleri ailesindedir. Her integrin α ve β altbirimleri tarafından oluşturulur (Hynes, 2002). Şap virüsü hücreye $\alpha_v\beta_3$ integrin reseptörlerini kullanarak bağlanır (Fox et al., 1989).

Konak hücrenin sitoplazmasında virüs replikasyonu oluştuktan sonra diğer Picornaviruslar gibi etkenin virulansına bağlı olarak 4–6 saat inkübasyon süresinin sonunda yeni virionlar şekillenmeye başlar (Rueckert, 1996).

Virüsün replikasyonu sonucunda konakçı hücrenin sitoplazmasında sitopatik etki (CPE) olarak bilinen virüs kaynaklı patolojik değişiklikler oluşur. CPE olan hücrelerde hücrelerin yuvarlaklaşması, hücre membranında dejenerasyon ve en son olarak da hücrenin erimesi (lisis) gibi bir dizi değişimler gözlemlenir (Rueckert, 1996).

Şekil 2.4.'de normal hücre iğ şeklinde görünürken CPE olan hücreler toplanmış olarak gözükmektedir.



Şekil 2.9. (a) Normal tek tabaka BHK-21 hücresi. (b) Şap virüsü ile enfekte olan BHK 21 hücresinde CPE oluşumu (fotoğraf orjinaldir).

2.5. Şap Virüsü Tipleri

Virüsün birbirlerin arasında çapraz koruma bulunmayan yedi farklı serotipi vardır, O, A, C, Asia-1, SAT 1, SAT 2, SAT 3 (Domingo et al., 2003). Serotiplerin alt tipleri de vardır ve bir serotip içinde bazı alttipler arasında çapraz koruma gözlemlenmemiştir (Alexandersen et al., 2003).

Serotiplerin dünya genelinde dağılımı eşit değildir. O ve A tipleri Güney Amerika, Asya ve Afrika ' da, Asia-1 tipi Asya ve Orta Doğuda, SAT serotipleri ise genellikle Afrika ile sınırlıdır (Paton et al., 2009). Dünya çapında en yaygın olan O tipidir (Mahy, 2004). A serotipinde diğer serotiplere göre daha fazla yeni alttip oluşumu görülmüştür ve bu nedenden dolayı aşılama ile kontrolde zorluklarla karşılaşmaktadır (Kitching, 2005).

2.6. Şap Aşısı Tarihçesi ve BHK Hücre Hattı

Şap virüsü 1897 yılında Löffler ve Frosch tarafından etiyolojik bir ajan olarak tanımlanan ilk hayvan virüsüdür. Bulaşıcı virüse maruz kalan hayvanlara bağışıklık kazandırmak için 19.yy başlarında aşı geliştirme çalışmalarına başlanmıştır (Lombard et al., 2007).

İlk inaktif şap aşısı 1937 yılında Waldmann ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Sığır dil epiteli ve veziküler sıvısından izole edilen virüsü alüminyum hidroksit içeren formaldehit ile inaktif hale getirmişlerdir (Doel, 2003).

Büyük ölçekli ilk inaktif aşı ise 1947 yılında Frenkel tarafından sağlıklı hayvanlardan kesilen dil epiteli kültürü kullanılarak gerçekleştirilmiştir (Lombard et al., 2007). Frenkel' in bu yöntemi uzun yıllar kullanılmıştır. Ancak yeterli dil epitelinin karşılanmaması ve sterilizasyon sıkıntıları nedeniyle daha uygun yeni hücre hatları araştırılmaya başlanmıştır (Doel, 2003).

MacPherson ve Stoker (1962) tarafından bulunan BHK 21 C13 hücreleri Mowat ve Chapman (1962) tarafından tek tabaka (monolayer) kültürde üretilmiş ve şap aşısı üretimine uygun olduğu belirtilmiştir. Capstick ve arkadaşları (1962) tek tabakalı BHK hücrelerini süspanseye adapte etmişlerdir. Daha sonra Telling and Elsworth (1965) büyük ölçekli biyoreaktörlerde süspanse hücreler üretmişlerdir (Doel, 2003).

BHK 21, IBRS-2 veya BK hücre hatları in vitro koşullarda şap virüsü tarafından enfekte edilebilmektedir (Sobrino et al., 2001). Şap virüsü HmLu ve NIL-2 hücre hatlarında süspanse olarak üretebilmekte ve IFFA 3 hücre hattı da aşı üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır (Barteling and Vreeswijk, 1991).

Günümüzde tüm şap aşılarında canlı virüs biyogüvenlik koşulları altında rulo şişelerde veya süspanse BHK-21 (Baby Hamster Kidney) hücrelerinde geniş hacimde üretilir. Toplanan virüs konsantre edildikten sonra inaktif hale getirilerek adjuvant ile karıştırılır. Adjuvant olarak genellikle alüminyum hidroksit/saponin veya yağ kullanılır (Cox et al., 2006). Daha önceleri inaktivasyon işlemine kullanılan formaldehit yerine

günümüzde bazik etilen imin (binary ethyleneimine, BEI) kullanılmaktadır (Sobrin et al., 2001).

2.7. Hücre metabolizması

Hücre veya organizmada bir seri enzim katalizli tepkimenin aracılığıyla meydana gelen tüm kimyasal dönüşümlere metabolizma denilir. Metabolizmanın karbonhidrat, protein ve yağ gibi organik besin moleküllerini küçük, basit son ürüne dönüştüren yıkım fazına katabolizma, küçük, basit öncül bileşiklerden lipit, protein, polisakkarit ve nükleik asit gibi büyük kompleks moleküllerin sentezlendiği yapım fazına anabolizma denir. Hücrede enerji, adenosin trifosfat (ATP) ve indirgenmiş elektron taşıyıcıları olan NADH (nikotinamid adenin dinükleotid' in indirgenmiş formu) ve NADPH (nikotinamid adenin dinükleotid fosfat) ile sağlanmaktadır (Neermann and Wagner, 1996).

Hücre metabolizması sıcaklık, pH, çözülmüş oksijen, besin ve metabolit konsantrasyonları gibi çevresel faktörlere bağlıdır (Miller et al., 1988; Ozturk and Palsson, 1991).

Memeli hücreleri enerji kaynağı olarak glikoz ve glutamin kullanır (Miller et al., 1989; Miller et al., 1988; Ozturk and Palsson, 1991). Glikoz konsantrasyonu reaktör verimini ve hücre büyümesini etkileyebilir (Kurokawa et al., 1994; Miller et al., 1988; Zhou and Hu, 1994).

Glikoz ve glutamin genellikle hücre büyümesini sınırlayıcı besin olarak kabul edilmektedir (Dalili et al., 1990). Farklı kimyasal ortamlarda hücreler farklı glikoz ve glutamin miktarları kullanabilir (Zielke et al. 1984; Maranga and Goochee, 2006).

Hücre metabolizması sonucu oluşan atık ürünlerin inhibitör veya hücre için toksik olduğu bildirilmiştir. Laktat ve amonyum bunlardan en önemlileridir (Cruz et al., 2000; Pate et al., 2000). Laktat, glikoz ve glutamin metabolizmasından gelen bir ara ürün, amonyum ise hem aminoasit metabolizmasının bir atık ürünü hem de glutaminin bozunma ürünüdür (Zielke et al., 1984; Ozturk et al. 1989). Başlangıç glikoz ve glutamin derişimlerine bağlı olarak bu metabolitlerin kültür sonu derişimleri

değişmektedir. Kültür ortamında glutaminin kendiliğinden bozunması ve memeli hücrelerinde yüksek glikoz ve glutamin tüketim hızları laktat ve amonyum birikmesine neden olmaktadır (Cruz et al., 2000; Mirabet et al., 1997; Newland et al., 1994; Godia and Cairo, 2006). Glikoz metabolizması sonucunda üretilen laktat hücrelerin büyüme ve metabolik aktiviteleri için önemli bir faktördür. Yüksek laktat miktarlarının (>2 g/L) memeli hücrelerinin büyümesini yavaşlattığı bilinmektedir (Ozturk et al., 1992). Seri üretimlerde aşırı miktarda glutaminin kullanılmasının yüksek amonyak oluşumuna sebep olduğu görülmüştür (Buter and Spier, 1984; Jeong and Wang, 1995).

2.7.1. Glikoz taşınımı

Glikoz hücreler için önemli bir enerji ve karbon kaynağıdır (McKeehan, 1982; Thilly, 1986). Glikoz integral taşıyıcı proteinler yoluyla hücre içine taşınır. Bu geçiş yapısal ve fonksiyonel olarak farklı iki grubun üyeleri tarafından gerçekleştirilir.

1) Na⁺ bağımlı glikoz taşıyıcıları

Na⁺ bağımlı glikoz taşıyıcıları büyük bir taşıyıcı protein ailesinin üyesidir ve SGLT olarak isimlendirilir (Wright, 2001). SGLT ile glikozun taşınması ikincil aktif taşımayla gerçekleşir. Na⁺-K⁺ ATPase pompaları ile oluşturulan Na⁺ elektrokimyasal gradienti ile glikoz derişiminin zıt yönünde olacak şekilde taşınır (Hediger et.al.,1987).

2) Kolaylaştırılmış glikoz taşıyıcıları

GLUT ailesindedir. Glikoz yanında diğer şekerleri de taşıma yeteneğine sahip, bir dokuya ya da türe özgü değişik izoformları olan taşıyıcı proteinlerdir (Mueckler, 1994; Thorens and Mueckler, 2010; Joost and Thorens, 2001). GLUT 1-12 ve HMIT (H⁺-myo-inositol) olmak üzere toplam 13 üyesi vardır (Joost and Thorens, 2001).

2.7.2. Glikoz metabolizması

Glikoz, glikoliz, pentoz fosfat yolu (PPP) ve glutaminin de katkıda bulunduğu

sitrik asit döngüsü (CAC) (veya trikarboksilik asit (TCA)) ile metabolize edilmektedir.

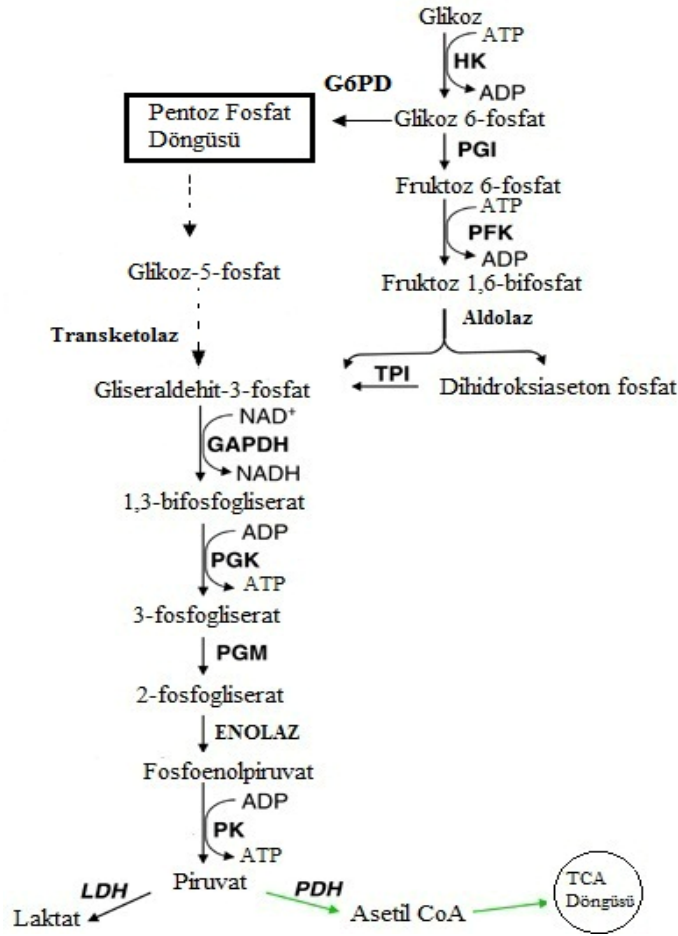
Glikoliz glikozun bir dizi enzim katalizörlü reaksiyonlarla kısmen iki molekül pirüvata dönüştürülmesi işlemidir.

Glikozun pirüvata dönümü aşağıdaki reaksiyonda gösterilmiştir.



İlk aşamada Glikozun C-6 daki hidroksil grubu heksokinaz tarafından katalizlenerek fosforlanır ve glikoz 6-fosfat oluşur (Pollard-Knight and Cornish-Bowden, 1982). Oluşan glikoz 6-fosfat glikoz 6-fosfat izomeraz ile fruktoz 6-fosfata çevrilir. Bu izomerizasyon sonraki C-1' in tekrar fosforlandığı ve fruktoz 1,6-bifosfat olduğu adım için temel oluşturur. Her iki fosforillenme için fosforil grubu vericisi ATP' dir. Sonraki basamakta dihidroksiaseton fosfat ve gliseraldehit 3-fosfat oluşur. Bu basamak lizis basamağıdır. Bu zamana kadar ATP üretilmemiş tüketilmiştir. Bu ikinci aşama için yatırım olarak kabul edilir. Dihidroksiaseton fosfat ikinci bir gliseraldehit 3-fosfata izomerleşir. Böylece glikozun tüm karbon zinciri 2 molekül gliseraldehit 3-fosfata dönüştürülür. Gliseraldehit 3-fosfatın her bir molekülü oksitlenir ve inorganik fosfatla fosforlanarak 1,3-bifosfogliserat oluşur (Sirover, 1999). 1,3-bifosfogliserat, fosfogliserat kinaz, fosfogliserat mutaz, enolaz ve pirüvat kinaz tarafından gerçekleştirilen bir dizi basamak sonucunda iki molekül pirüvata dönüşür ve bu sırada enerji açığa çıkar (Jurica et al.,1998).Sonuçta her glikoz başına 2 molekül ATP (adenozin trifosfat) ve 2 molekül NADH (nikotin adenin dinükleotid) oluşmaktadır (Warburg et al., 1927).

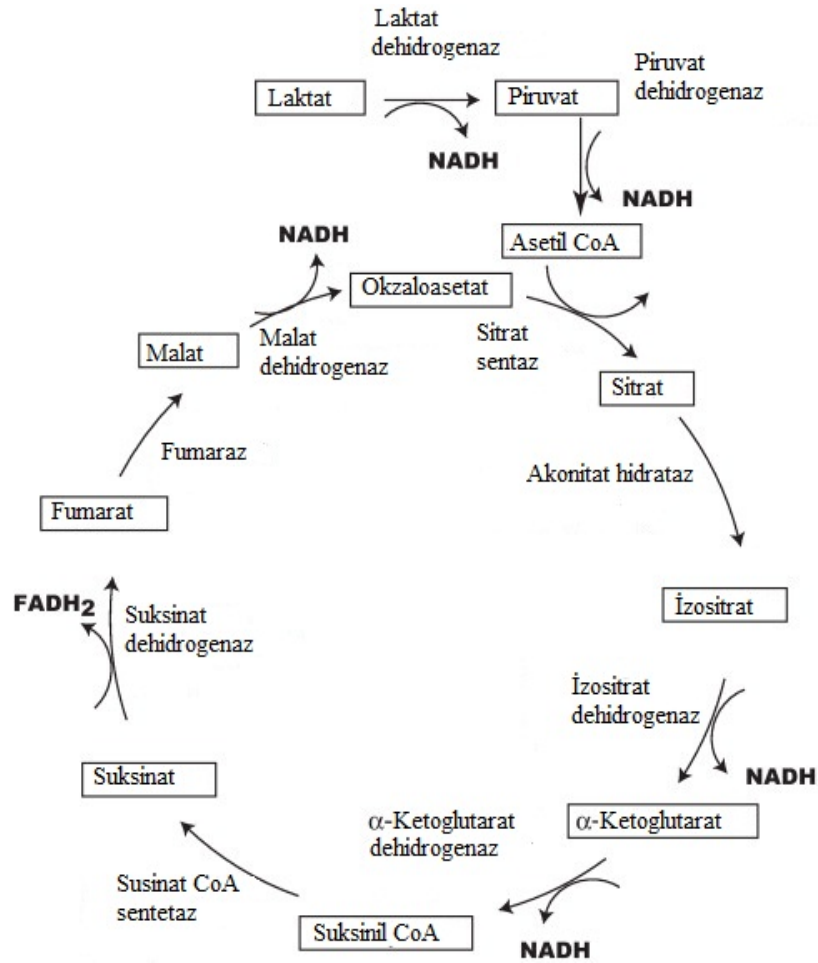
Pentoz fosfat yolunun nükleik asit sentezi için gerekli riboz 5-fosfat moleküllerinin oluşumunu sağlamak (Wood, 1985) ve bir çok hücrel reaksiyonlarda önemli bir elektron kaynağı olan NADPH oluşumunu sağlamak (Becker et al., 2003) gibi iki benzersiz işlevi vardır.



Şekil 2.10. Glikoliz ve pentoz fosfat döngüsü (Pelicano et al., 2006).

Piruvat daha sonra mitokondri içinde gerçekleşen TCA döngüsüne girer. TCA döngüsünün hücre anabolizması öncülleri olan farklı kimyasal bileşikleri sağlamak ve metabolik enerjinin çoğunluğunu oluşturmak gibi temel iki fonksiyonu vardır. TCA döngüsü glüköz karbon iskeletini CO₂ son ürününe kadar dönüştürmektedir. TCA döngüsünde sekiz enzim kullanılır: Üç NAD-bağımlı dehidrogenazlar, isositrat dehidrogenaz (IDH), α- ketoglutarat dehidrogenaz (KDH), malat dehidrogenaz (MDH) ve FAD bağımlı süksinat dehidrogenaz (SDH) (Logan et al., 2006; Schröder, 2007; Arechederra and Minter, 2008).

TCA döngüsünün ilk reaksiyonunda asetil koenzim A (AsetilCoA) okzaloasetat (oxaloacetate) ile reaksiyona girerek sitrat molekülü oluşturmaktadır. Sitrat akonitat hidrataz enzimi etkisiyle tersinir olarak izositrata dönüşür. Daha sonra izositratın oksidatif dekarboksillenmesi ile α -ketoglutarat oluşur. Sitratın önemli bir kısmının yağ oluşumuna katkıda bulunmak için TCA döngüsünden çıkıp sitozola girmesinden kaynaklanan enerji açığını α -ketoglutarat kapatır. Glutaminin buradaki katkısı büyüktür. Glutamin mitokondri içerisinde önce glutamata dönüştürülür daha sonra α -ketoglutarat oluşarak TCA döngüsüne katılır ve döngüyü aktif halde tutar. Buradan glutaminin ana enerji ve karbon kaynağı olmasının sebebi anlaşılır. Sonraki basamakta α -ketoglutarat süksinil-CoA ve CO_2 ' ye parçalanır. Süksinil-CoA' dan oluşan süksinat oksitlenerek fumaratı oluşturur. Fumaratın L-malata tersinir hidrasyonu fumaraz tarafından katalizlenir. TCA' nın son tepkimesinde malat oksidasyonu ile okzaloasetat oluşur.



Şekil 2.11. TCA döngüsü (Tsujimura et al., 2012)

2.7.3. Glutamin taşınımı

Hücreler için azot kaynağı olması yanında enerji ve karbon kaynağı olarak da kullanılan glutamin (McKeehan, 1982; Thilly, 1986) plazma içinde en çok bulunan amino asittir (Darmaun et al, 1986). Kültür içindeki hücrelerin en iyi şekilde büyümeleri için önemi 1950'lerden beri bilinmektedir (Eagle, 1955).

Glutaminin memeli hücrelerinde farklı fonksiyonları vardır. Glutamin; glutamat, histidin, arginin, prolin gibi amino asitler, proteinler, nükleik asitler gibi diğer çok sayıda önemli biyolojik moleküller için öncül olarak önemlidir (Boza et al., 2000). Glutamin aynı zamanda hücre kültürü ortamında üretilen amonyum iyonlarının da büyük kaynağıdır. Glutamin kararsız bir aminoasittir ve normal hücre kültürü şartlarında (37°C) 0,2-0,6 mM/gün hızla birinci dereceden enzimatik olmayan bir kinetikle kendiliğinden bozularak pirrolidin-karboksilik asit ve amonyum iyonlarını oluşturmaktadır (Trisch and Moore, 1962; Ozturk et al., 1989; Godia and Cairo, 2006). Memeli hücre zarı üzerinde glutamin taşıyıcıları vardır. Glutaminin hücre içine alınmasında genel olarak çoğu aminoasitlerin taşınmasında olduğu gibi Na^+ elektrokimyasal gradienti kullanılmaktadır. Bu şekilde glutamin taşıyıcıları Na^+ bağımlı ve Na^+ bağımsız olmak üzere iki kategoriye ayrılır.

1) Na^+ bağımlı taşıyıcılar

Na^+/K^+ -ATPase tarafından oluşturulan Na^+ elektrokimyasal gradientine zıt yönde glutamin taşınımı gerçekleşir. Na^+ bağımlı taşıyıcılar: ASC veya B^0 N (SN1), B^{0+} , A, γ +L' dir.

2) Na^+ bağımsız taşıyıcılar

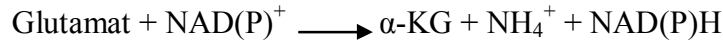
Bu taşıyıcılar aminoasitlerin Na^+ gradientinden bağımsız olarak geçişlerini sağlar. L, b^{0+} ve n bu taşıyıcılardandır (Bode, 2001).

2.7.4. Glutamin metabolizması

Hücre içinde glutamin düzeylerinin kontrolü karmaşık bir süreçtir. Glutaminden glutaminaz enzimi faaliyeti ile glutamat ve amonyak oluşur (Tate and Meister, 1971).



Glutamatın amino grubu proline dönüştürülerek, glutamat amino-transferazlar ile transaminasyona uğratarak alanin, aspartat ve serin/glisin veya glutamat dehidrogenaz ile amonyak haline getirilmektedir. Glutaminin karbon iskeleti α -ketoglutarat olarak TCA döngüsüne katılmaktadır (Xie and Zhou, 2006).



2.8. Deney Sistemlerinin Tasarlanması

Biyolojik süreçlerde sistemlerin performansını artırmak ve düşük maliyetle işlemlerin verimini arttırmak önemlidir. Bu amaçla en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi için optimizasyon yapılmaktadır. Optimizasyonun yapılmasında analitik, sayısal ve dinamik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Analitik yöntem, sürekli fonksiyonların uç noktalarını içeren matematiksel teoriye dayanmaktadır ve süreç değişkeni ile bağımlı fonksiyonun türevi sifıra eşitlenerek sistem için elde edilen eşitlikler çözülmektedir. Sayısal yöntem, lineer olmayan programlama tekniklerini temel alarak farklı algoritmalar içermektedir. Dinamik yöntem ise genellikle çok basamaklı süreçlerde kullanılmakta ve karmaşık problemler daha basit algoritmalara indirgenerek çözülmektedir (Ekinci, 2007).

Bu yöntemlerde süreç için tanımlanan mevcut değişkenler sabit tutulurken tek bir değişken değiştirilmekte ve sonuçlarda sadece bu değişkene bağlı olmaktadır. Bu durumda deney sayısı artmakta ve optimizasyon zorlaşmaktadır. Deney sayısının

artması da zaman, malzeme ve maliyet giderlerini artmasına ve değişkenlerin birbirleri arasında etkileşimlerinin belirlenememesine neden olmaktadır (Ekinci, 2007).

2.8.1. Cevap Yüzey Yöntemi

Cevap Yüzey Yöntemi (CYY), süreçlere etki eden çok sayıda değişkenin olması durumunda; problemlerin analiz edilmesinde ve modellenmesinde sıklıkla kullanılan istatistiksel tekniklerin ve matematiksel ifadelerin toplamıdır. CYY yeni ürünlerin formülasyon geliştirilmesinin yanı sıra var olan ürün tasarımının iyileştirilmesinde ve süreç optimizasyonunda kullanılır. Bağımsız değişkenler üzerine etki analizine ek olarak deneylerdeki kimyasal ve biyokimyasal süreçleri açıklayan matematiksel bir model üretir (Anjum et al., 1997; Myers and Montgomery, 1995).

Bu yöntemdeki amaç, öncelikle uygun bir yaklaşım fonksiyonu elde ederek sistemin cevabını öngörebilmek, bağımsız parametrelerin optimum değerlerini belirlemek (Güven, 2004) ve kontrol edilebilen giriş parametreleri ile elde edilen cevap yüzeyleri arasındaki ilişkiyi sayısal olarak tanımlamaktır (Aslan vd., 2008).

Sürecin cevabını tanımlayan gerçek modele en yakın olan regresyon modeli oluşturularak istenilen cevabın optimum şartları tahmin edilebilmektedir. Regresyon katsayıları yardımıyla bir parametrenin ana etkisinin ya da etkileşim etkisinin cevap değişkeninin değerlerinde ne derece önemli bir etkiye sahip olduğuna karar verilir. Bütün değişkenlerin ölçülebildiği varsayılırsa Eşitlik 2.1.'deki gibi ifade edilir:

$$y = f(x_1, x_2, x_3, \dots, x_k) \quad (2.1.)$$

Burada y sistemin cevabı, x_i ise faktörler olarak adlandırılan etki değişkenleridir. Bağımsız değişkenlerin, önemsiz hatalarla birlikte tecrübelerle dayanılarak sürekli ve kontrol edilebilir olduğu kabul edilmiştir (Aslan vd., 2008).

Deneyler sonucunda elde edilen bağımsız değişkenler ile bağımlı değişken (cevap) arasında bir model geliştirilerek bağımlı değişken için bir yaklaşım fonksiyonu belirlenir. CYY ile elde edilen yaklaşım fonksiyonu sonucunda oluşan polinomun derecesi cevapla bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiye bağlıdır. Eğer aralarında doğrusal bir ilişki varsa model Eşitlik 2.2’de gösterildiği gibi 1.derece bir polinomdur.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (2.2.)$$

Bu eşitlikte “y”, bağımlı değişken “ β_i ”, regresyon katsayısı “i”, “ X_i ” bağımsız değişken ve “ ε ” deneysel hata olarak tanımlanmaktadır.

Eğer istenen cevap, sistemde değiştirilen bağımsız değişkenlere göre bir kavislenme içeriyorsa bu durumda cevap fonksiyonunu iyi bir uyum için daha yüksek dereceden ifade etmek gerekmektedir.

Çoğu cevap yüzey yöntemlerinde bağımsız değişkenlerle yanıtlar arasındaki ilişki Eşitlik 2.3’ de verilen ikinci dereceden polinomla açıklanabilir.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (2.3.)$$

Eşitlik 2.4. ve 2.5.’de bağımsız değişkenlerin sayısına bağlı olarak gerekli modelin oluşturulabilmesi için kaç tane deneyin yapılacağı belirtilmiştir.

$$N = 2^k + 2k + n_0 \quad k \leq 5 \quad (2.4.)$$

$$N = 2^{k-1} + 2k + n_0 \quad k > 5 \quad (2.5.)$$

Bu eşitliklerde

N : Yapılacak deney sayısı,

k : Bağımsız değişken sayısı

n_0 : Merkez noktada yapılması istenen deney sayısıdır (Güven, 2004).

2.8.1.1. Cevap yüzey grafiği

İkiden fazla faktörün düzeylerinin cevap değişkeni üzerine etkisinin üç boyutlu olarak gösteriminde kullanılan grafiklerdir. Faktörler ve cevap değişkenleri için oluşturulan model doğrusal olduğunda grafik doğrusal, ikinci dereceden terimler içeren bir model ise eğrisel bir şekil almaktadır (Kul, 2004).

2.8.2.2. Kontur grafiği

Cevap yüzey yöntemlerinin sonuçlarını en iyi şekilde ortaya koyan grafiklerden bir tanesidir. X ve Y eksenlerinde faktörler gösterilirken, eksenlerin içinde kalan bölgeler cevap yüzeyinin aldığı değerleri göstermektedir. Oluşturulan regresyon modeli doğrusal ise eksenler arasındaki bölge doğrusal çizgilerle, ikinci dereceden bir ilişki söz konusu ise daireler şeklinde ifade edilmektedir (Kul, 2004).

2.8.2.3. Deney tasarımı

Bileşke tasarımların özel bir grubu olan merkezi bileşke tasarımı (Central Composite Design, CCD) deneysel planlama yapılırken sıklıkla kullanılmaktadır. Bileşke tasarımlarda, ikinci derece yüzeylerin katsayılarını belirleyebilmek için birinci dereceden faktöriyel tasarımların nokta sayısı artırılmaktadır.

Bu işlemlerin gerçekleştirilebilmesi için kullanılan çeşitli bilgisayar programlarından bir tanesi de Design-Expert® programıdır. Bu programda cevap yüzey yöntemi kullanılarak cevaplar ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkilere göre farklı faktör seviyelerinin kombinasyonları üretilmekte, model yaklaşımı gerçekleştirilmekte

ve optimizasyon yapılmaktadır. Optimizasyon grafiksel ya da sayısal olarak elde edilebilmektedir.

Bağımsız değişkenlerin herhangi bir değeri tahmini düğüm noktası analizi kullanılarak hesaplanabilir. Tasarımı etkileyen tüm parametreler için minimum ve maksimum seviyeler belirlendikten sonra istenen yaklaşım fonksiyonu maksimize ve minimize edilebilir, hedef gösterilerek veya istenen değerler arasında hesaplanabilir. Yaklaşım fonksiyonun şeklini ve büyüklüğünü ayarlayabilmek için ağırlık oranı değiştirilebilir. Program sonuçları bir araya getirerek fonksiyonun optimizasyonu sağlanır. Sayısal optimizasyon yapılırken tercih oranını maksimum yapacak noktalar tespit edilmektedir. Cevap yüzeylerinin fonksiyondaki farklı kombinasyonlarına bağlı olarak birden fazla maksimum elde edilebilir. Design-Expert® programı tasarımdaki birçok noktayı inceleyerek en iyi yerel maksimumu bulmaktadır.

Tasarımdaki değişkenlerin birbirlerine üstünlükleri farklıdır ve biri veya daha fazlası minimize, optimize veya maksimize edilerek istenilen en verimli optimum koşullar oluşturulabilmektedir. Ağırlık oranı olarak ifade edilen, değişkenin önemini, ne derecede modele katılacağını belirten 1 ile 5 arasında değişen değer kullanıcı tarafından atanmaktadır (Desing-Expert® User's Guide, 2001).

2.8.3. Cevap yüzey yönteminde modelin belirlenmesi

Desing-Expert® programı tarafından cevap ile bağımsız değişkenler arasındaki ilişkiyi gösteren polinom modeli otomatik olarak önerilmektedir. Eşitlik 2.9. ve 2.10'da model sonuç değeri tanımlanmıştır. Eşitliklerdeki Adj R-Squared modele değer katkısı olmayan terimlerin sayısı arttıkça azalmaktadır. Pred R-Squared ve Adj R-Squared değerleri arasındaki fark 0.2'den fazla olduğu zaman deneysel verilerde veya uygulanan modelde bir sorun olduğu anlaşılır.

$$\text{Sonuç Değeri 1} = (M)(L)(\text{Pred R-Squared}) \quad (2.9.)$$

$$\text{Sonuç Değeri 2} = (M)(L)(\text{Adj R-Squared}) \quad (2.10.)$$

Bu eşitliklerde;

M : Ardışık modeldeki fark karelerinin toplamı,

L : Uyum göstermeyen sonuç değerleri,

Pred-R2 : Modelde tanımlanan kısıtlayıcı verilerin varyasyonunun ölçüsü

Adj-R2 : Modelde belirlenmiş tüm değerlerin ortalamadaki varyasyonunun ölçüsüdür
(Desing-Expert[®] User's Guide, 2001).

BÖLÜM 3

DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1. Deney Tasarımı

Deneylerin tasarımında Design-Expert[®] 7.0.0 (Deneme sürümü) programı, cevap yüzey metodu (RSM, Response surface method) ve merkezi kompozit tasarım (CCD, Central Composite Design, rotatable ($k < 6$) yazılımları kullanılmıştır. Glikoz ve glutamin bağımsız değişkenleri için cevap olarak 146S ve enfektif titre (E.T.) seçilmiştir.

Design-Expert[®] 7.0.0 programı ile 5 tanesi merkez deneyi olmak üzere toplam 13 adet deney tasarlanmıştır. Bu deneylerin her biri 3'er defa tekrarlanmış olup toplamda 39 adet deney yapılmıştır. Çizelge 3.1.'de Design-Expert[®] 7.0.0 programı tarafından önerilen cevap yüzey metodu, merkezi kompozit tasarımı deney setleri verilmiştir.

Çizelge 3.1 Design-Expert[®] 7.0.0 programı tarafından önerilen cevap yüzey metodu, merkezi kompozit tasarımı deney setleri.

Deney No	Bağımsız Değişkenler	
	Glikoz (mM)	Glutamin (mM)
A	22,5	6,5
B	22,5	6,5
C	22,5	12
D	22,5	6,5
E	40	1
F	5	6,5
G	22,5	6,5
H	5	1
K	40	6,5
L	5	12
M	40	12
N	22,5	1
P	22,5	6,5

Deneyler tamamlandıktan sonra bağımlı değişken sonuçları programa girilmiş ve program bu iki bağımlı değişken için ayrı modeller önermiştir. Önerilen modelin istatistiksel olarak uygunluğu ANOVA testi ile tespit edilmiştir. Modelin uygunluğu R^2 'ler (regresyon katsayıları) ile ifade edilmiş ve istatistiksel önemi F testi ile incelenmiştir. Elde edilen modelde bağımlı ve bağımsız değişkenler için optimizasyon yapılarak deneyleri yapılmıştır.

3.2. Hücre Hattı

Bu çalışmada Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre Bankası'ndan temin edilen BHK21 An30 hücresi kullanılmıştır.

Orjini İtalya Brescia Enstitüsü olan bu hücreler yeni doğan hamster böbrek epitel hücrelerinden elde edilmiş olup hem monolayer hem de süspanse üreme özelliklerine sahiptir.

Hücreler Şap Enstitüsü Müdürlüğü Hücre Bankası Laboratuvarı'nda süspanseye adapte edilerek Üretim Bölümünde büyük hacim (700L ve 3000L) biyoreaktörlerde çoğaltıldıktan sonra deneylerde kullanılmıştır. Deneylerde BHK An30 $K_2M_5S_4$ hücresinin süspanse 4. ve 5. pasajları kullanılmıştır.

Süspanse hücrelere bakteriyel ve fungal kontaminasyonlar yönünden sterilite testleri yapılmıştır. Bunun için 10 mL tüp içinde bulunan FTM (Fluid Thioglycollate Medium) ve TSB (Tryptone Soy Broth) sıvı besiyerlerine 1 mL ekimleri yapılarak hem oda sıcaklığında hem de 37°C' de 14 gün süre ile takip edilmiştir.

3.3. Virüs Kültürü Besiyeri

Virüs kültürü deneylerine kullanılan 6M besiyeri Şap Enstitüsü Müdürlüğü Vasat Hazırlama Laboratuvarı'nda Şap Enstitüsü Protokolünde (2010) bildirilen içerikte hazırlanmıştır.

Şap Enstitüsü'nde hücre kültürlerinde rutin olarak kullanılan 6M besiyeri Pirbright Hayvan Sağlığı Enstitüsü (İngiltere) araştırmacılarından Telling ve Radlett tarafından bildirilmiştir (1969). Bu besiyeri standart EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium) besiyerine laktalbumin ilavesi yapılarak vitamin, glikoz ve glutamin derişimleri arttırılmış aminoasit içeriği düşürülerek elde edilmiştir. Virüs kültürü deneylerinde kullanılan besiyeri 6M hücre kültürü besiyerindeki %10 (hacim/hacim) serumunun çıkarılması ve bikarbonat miktarının %50 oranında arttırılmasıyla elde edilmiştir. Virüs kültürleri deneylerinde köpük kırıcı kullanılmamıştır. Çizelge 3.2.'de 6M besiyerinin içeriği verilmiştir.

Çizelge 3.2. 6M besiyeri içeriği (Radlett et al.,1971).

Besiyeri bileşeni	Miktarı (mg/L)	Besiyeri bileşeni	Miktar (mg/L)
NaCl	5120	L-Sistein	4,8
KCl	321	L-Histidin	3,84
MgSO ₄ .7H ₂ O	160	L-Izolösin	10,48
NaH ₂ PO ₄ .7H ₂ O	112	L-Lösin	10,48
CaCl ₂	160	L-Lizin HCl	14,62
Fe(NO ₃) ₃ .9H ₂ O	0,08	L-Fenilalanin	6,6
NaHCO ₃	2200	L-Treonin	9,52
Glikoz	6200	L-Triptofan	1,6
TPB toz	2000	L-Tirozin	7,24
Fenol kırmızısı	8	L-Valin	9,36
Riboflavin	0,32	L-Metiyonin	3,0
Kolin klorür	3,2	L-Glutamin	466
Folik asit	3,2	İnositol	0,7
Nikotinamid	3,2	Pluronic F69	1000
Piridoksal HCl	3,2	Laktalbumin hidrolizat	5000
Tiamin HCl	3,2	Sığır serumu	100 ^a
DL-Pantotenik asit kalsiyum tuzu	3,2	Köpük kırıcı emülsiyonu	0,4 ^a
L-Arjinin	8,4		

a= mL/L

3.4. Aşı Virüsünün Hazırlanması ve Stoklanması

Bu tez çalışmasında Şap Enstitüsü Müdürlüğü Virüs Kültürü Laboratuvarı'nda üretilen O tipi şap virüsü kullanılmıştır. Bu virüs 850 cm²'lik döner şişelerde (CELLMASTERTM, Greiner Bio-One, Almanya) tek tabaka hücre kültürlerinde üretilmiş, santrifüj edilerek membran filtrelerden (Sartobran P, Sartorius, Almanya) süzülerek 500 mL hacimli saklama kaplarına paylaştırılıp -80°C'de stoklanmıştır. Tez çalışmalarında kullanılacak virüs stokları, bu dondurulmuş büyük hacimdeki virüslerden birisinin çözdürülüp, steril olarak 1mL'lik kriyotüplere paylaştırılması ve tekrar -80°C'de dondurulmasıyla hazırlanmıştır. Her virüs kültürü hazırlanmasında çözdürülerek kullanılmıştır. Çizelge 3.3' de tohum virüse ait 146S partikül miktarı, enfektif ve antijenik titre değerleri verilmiştir.

Çizelge 3.3. Tohum virüse ait 146S partikül miktarı, enfektif ve antijenik titre değerleri

Şap virüsü tipi	146S partikül miktarı (µg/mL)	Enfektif titre (log ₁₀ PFU/mL)	Antijenik titre (CFT)	Süspanse kültürde inkübasyon süresi (saat)
O (MOP9 Tohum)	1,01	8,0	3x4	17 saat

3.5. Virüs Kültürü

Virüs kültürü çalışmaları 500 mL çalışma hacimli, manyetik karıştırıcılı cam biyoreaktörde gerçekleştirilmiştir. Biyoreaktörün iki adet giriş-çıkış portundan bir tanesi numune alımları için kullanılmış, üzerine hava filtresi (Midisart O 0,20 im, Sartorius, Almanya) yerleştirilmiş olan bir diğer port ile biyoreaktöre gaz giriş çıkışı sağlanmıştır. Karıştırma hızı 200 devir/dakika olarak ayarlanmıştır.

Hücre Kültürü Laboratuvarı'ndan alınan hücreler, hücre kültürü besiyerinde bulunan serum ve metabolik atıklardan arındırılmak için soğutmalı santrifüjde 850 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj (Sigma 8K10, Almanya) edilmiştir. Daha sonra süpernatant uzaklaştırılarak çöken kısım bileşenleri değiştirilerek hazırlanan 6M virüs kültürü besiyerine (pH≈7,60) aktarılmıştır. Hücre süspansiyonu homojenize edilerek son hacimde $1,60 \times 10^6$ hücre/mL olacak şekilde çalışma hacmi hazırlanan besiyeri ile 400 mL'ye tamamlanmıştır.

Hazırlanan bu hücre süspansiyonu, virüs kültürü biyoreaktörüne alındıktan sonra üzerine Bölüm 3.4.'de hazırlanması anlatılan tohum virüsten 0,06 MOI (Multiplicity of infection, virüs/hücre) oranında eklenmiştir. MOI Eşitlik 3.1. yardımıyla hesaplanmıştır.

$$MOI = \frac{\text{Virüs inokülasyon hacmi (mL)} * 10^{ET} (\text{virüs / mL})}{\text{Çalışma hacmi (mL)} * \text{Hücre derişimi (hücre / mL)}} \quad (3.1.)$$

Virüs ekimi yapıldıktan sonra biyoreaktör sıcaklığı 37°C olarak ayarlanan su banyosuna yerleştirilerek üretime başlanmıştır. Hücrelerin laktik asit ve CO₂ üretimine bağlı olarak ortamın pH'sında gözlenen düşüş ortama eklenen %7,5'lik (ağırlık/hacim) NaHCO₃ ile başlangıç pH değerinde sabit tutulmuştur. Virüs üremesine bağlı olarak canlı hücre sayısının azalması ile de pH da düşüş gözlenmiştir.



Şekil 3.1. Su banyosunda biyoreaktörler

Virüs kültürünün 0.saatinden başlamak üzere üçer saatlik aralıklarla Bölüm 3.6.3, 3.6.4. ve 3.6.5.'te belirtilen analizleri yapmak üzere biyoreaktörden 2mL numune alınmış 0,45 μ mluk filtreden (Minisart, Sartorius, Almanya) geçirilerek 1 mL'lik tüplerde -80°C 'de dondurularak saklanmıştır. Yine üçer saat aralıklarla alınan 0,9 mL'lik numunelerin üzerine 0,1 mL tripan mavisi (% 0,4'luk, Sigma, ABD) çözeltisi eklenmiş ve tekrar homojenize edilerek hemasitometreye (Burker, Almanya) konan suspansiyondaki canlı hücre derişimleri ışık mikroskobunda (Olympus CH40, Japonya) sayım yapılarak belirlenmiştir. Sunulan bu tezde virüs enfekte veya enfekte olmayan boya almamış bütün hücreler sayılmış ve bu hücre derişimi olarak ifade edilmiştir. Kültür süreleri deneylerde farklılık göstermiş, hücrelerin % 90-95'inde CPE oluşumu görüldüğünden deney sonlandırılarak üretilen virüste Bölüm 3.6.1. ve 3.6.2.' de anlatılan değerlerinin tespiti için 50 mL numune alınarak -80°C 'de dondurularak saklanmıştır.

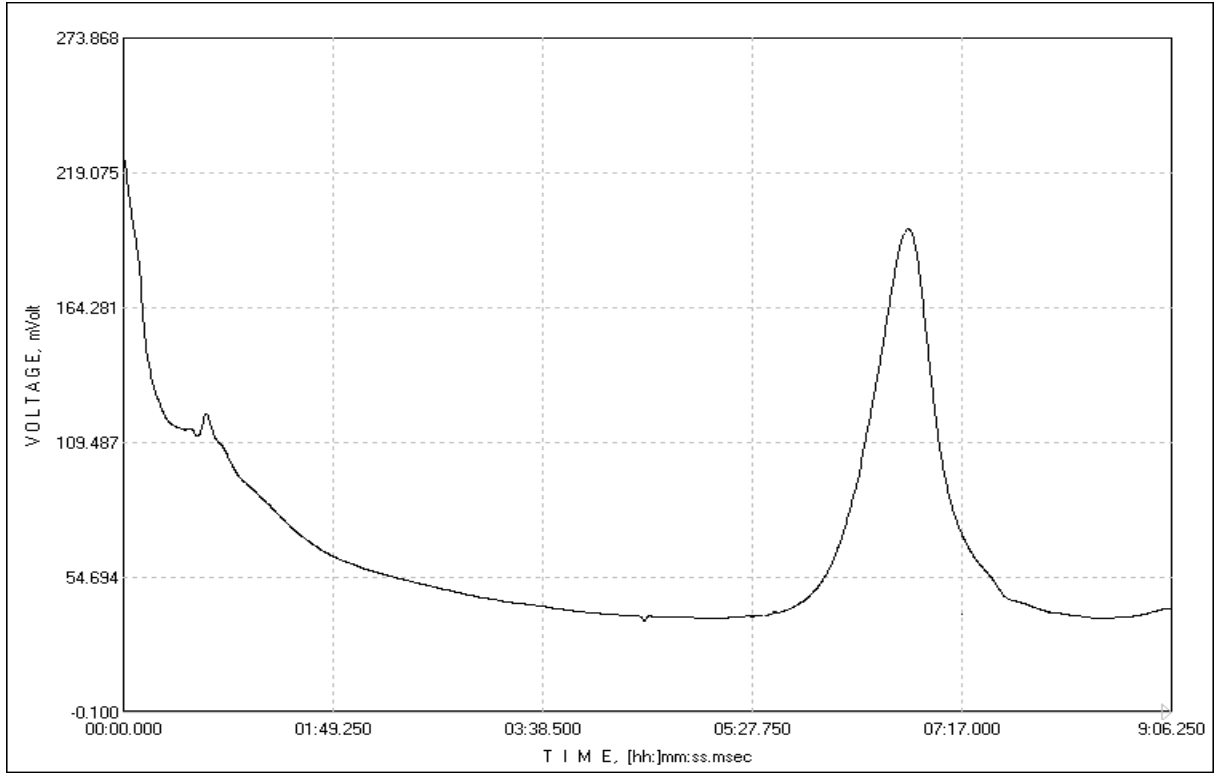
3.6. Analitik Teknikler

Virüs kültürleri sonucunda üretilen her virüse 146S partikül miktarı ve enfektif titre tayinleri yapılmıştır. Virüs kültürü süresince 3'er saat arayla alınan örneklerde glikoz, laktat ve glutamin miktarlarına bakılmıştır.

3.6.1. 146S partikül miktarının belirlenmesi

Şap virüsünde yapısal ve fonksiyonel olarak farklı oluşumlardan biri olan ve bağışıklıktan sorumlu 146S partikül miktarının belirlenmesinde Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü'nde (2010) belirtilen sukroz yoğunluk gradient santrifugasyon yöntemi ve sürekli akış UV spektrofotometre metodu kullanılmıştır.

Bu yöntem merkezkaç kuvveti yardımı ile proteinlerin molekül ağırlıklarına göre ayrılması esasına dayanmaktadır. 146S proteinlerinin belli bir gradient bölgesinde toplanması amacıyla bir tüp içine % 45'lik (ağırlık/hacim) ve % 15'lik (ağırlık/hacim) sakkaroz çözeltileri kullanılarak hazırlanan gradient üzerine 0,5 mL virüs süspansiyonu eklenerek ultrasantrifüjde 2 saat +4°C'de 41000 devir/dakika santrifüjleme işlemi uygulanmaktadır. Bu işlem sonunda tüpün altı delinerek belirli bir hızda % 60'lık (ağırlık/hacim) sakkaroz çözeltisi ile gradientler optik okuyucuya gönderilerek spektrofotometre 254 nm dalga boyunda absorbans ölçümleri yapılmaktadır. Oluşan pik alanından 146S partikülü derişimi hesaplanmaktadır.



Şekil 3.2. 146S tayini absorbands grafiği.

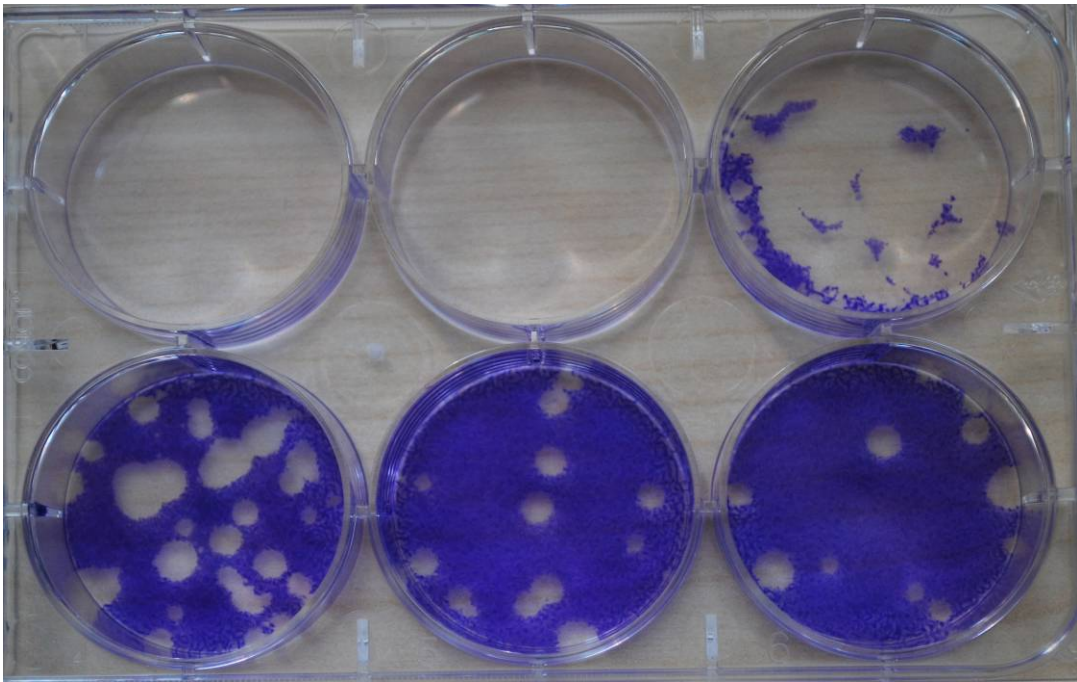
3.6.2. Enfektif titrenin belirlenmesi

Virüs kültürlerinden elde edilen virüslerin enfektif titresinin belirlenmesinde Şap Enstitüsü Müdürlüğü Protokolü'nde (2010) yer alan plak test yöntemi kullanılmıştır. Tek kullanımlık 6 gözlü hücre kültürü tabletlerinde 48 saat öncesinden tek tabaka halinde doymuş hücreler üretilir. Titresi belirlenecek olan virüs süspansiyonunun farklı seyreltme numuneleri (10^{-1} - 10^{-6}) hazırlanır ve bu numuneler her 1 göze 0,1mL olacak şekilde tabletlere eklenir. 37°C 'de 1 saat %5'lik CO₂'li etüde inkübasyona bırakıldıktan sonra her göze 3 mL örtme besiyeri (%50 gum + %50 2X GMEM karışımı) konularak tabletler 48 saat CO₂'li etüde 37°C'de inkübasyona bırakılır. Bu sürenin ardından virüs partikülünün çoğaldığı bölgeyi görebilmek için tabletlerin içi boşaltılarak her göze 2 mL %20 formol ve %2,5 kristal viyole içeren boyama çözeltisi eklenir. 20 dakikalık bekleminin ardından tabletler dikkatlice suyla yıkanarak kurumaya bırakılır.

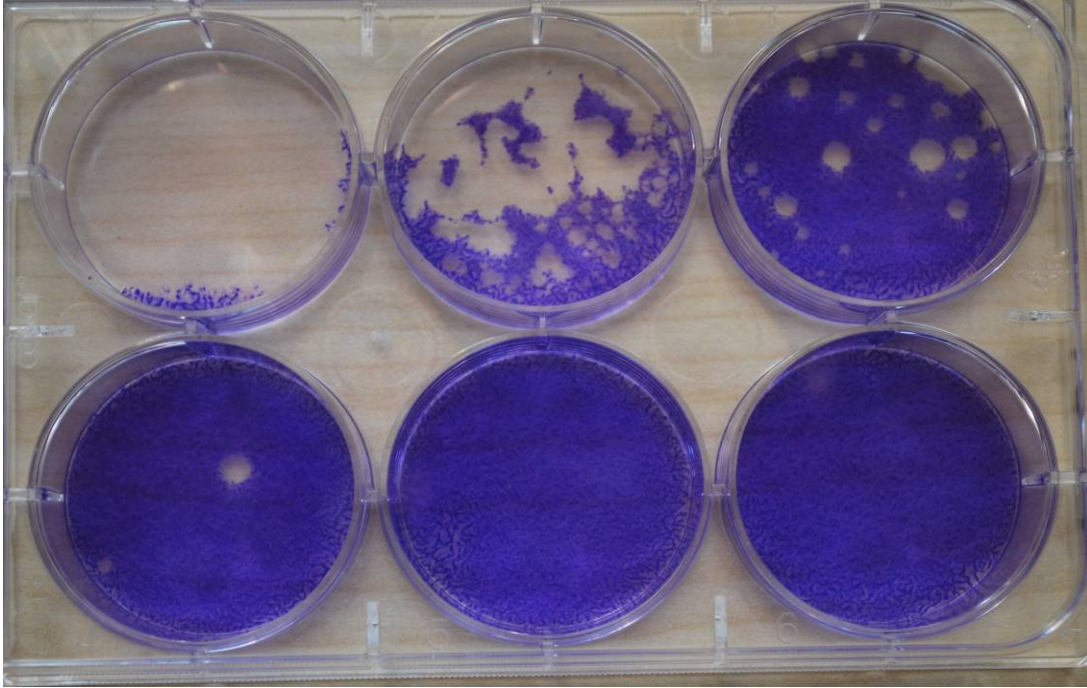
Tabletlerde her bir virüs partikülünün üreyerek çoğaldığı bölgelerde boyanmamış boşluklar halinde 'plak' oluşumu görülür. Seyreltme faktörleri de değerlendirilerek oluşan plak sayısından enfektif virüs derişimi hesaplanabilmektedir. Tabletler kuruduktan sonra plakların ortalama sayısı alınarak Eşitlik 3.2.'ye göre enfektif titresini PFU/ml olarak bulunur.

$$\text{Enfektif titre}(\log_{10} \text{PFU} / \text{mL}) = \log_{10} \left[\frac{\text{Ortalama plak sayısı (PFU)}}{\text{Seyreltme katsayısı} * \text{inokülasyon hacmi(mL)}} \right] \quad (3.2.)$$

Aşağıdaki şekillerde yüksek enfektif titreyle sahip D1 ile düşük enfektif titreyle sahip F1 deneylerine ait plak oluşumları görülmektedir.



Şekil 3.3. Altı gözlü tek kullanımlık hücre kültürü tabletlerinde D1 deneyine ait plak oluşumu.



Şekil 3.4. Altı gözlü tek kullanımlık hücre kültürü tabletlerinde F1 deneyine ait plak oluşumu.

3.6.3. Glikoz analizi

Çalışmada besiyerindeki glikoz miktarı YSI 2700 Select biyokimya analizörü (YSI Incorporated, ABD) ile tayin edilmiştir.

Bu yöntemde bir veya daha fazla oksidaz enzimi membran üzerine immobilize edilmiştir. Substrat-enzim reaksiyonu sonucunda ortamdaki substrat miktarını elektrokimyasal olarak ölçer. Substrat verildiğinde enzimle reaksiyona girerek H_2O_2 oluşturur. H_2O_2 selüloz asetat membrandan geçerek platin elektrotta oksitlenir. Oluşan akım substrattaki glikoz düzeyiyle orantılıdır.

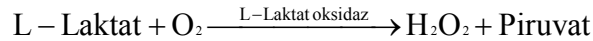
Substrat cihazın numune haznesine otomatik olarak bırakılmakta ve burada otomatik seyreltme ve karıştırma işlemlerine tabi tutulmaktadır. Çalışmada besiyerindeki glikoz (substrat) tayinleri için elektrot ucuna glikoz oksidaz enzimi içeren membran (YSI 2365 Dextrose Membrane) takılmıştır. Membran üzerinde aşağıdaki reaksiyon gerçekleşmektedir:



Yapılan analizlerde numune seyreltmelerinde YSI 2357 tamponu kullanılmıştır. Kalibrasyonlarda ve doğrusallık kontrollerinde sırasıyla 2,50 g/L glikoz (YSI 2776) ve 9 g/L glikoz (YSI 1531) standartları kullanılmıştır.

3.6.4. Laktat analizi

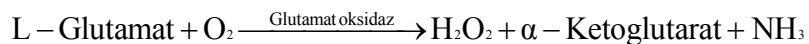
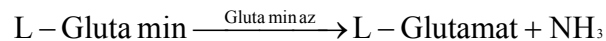
Çalışmada besiyerindeki laktat miktarı YSI 2700 Select biyokimya analizörü ile tayin edilmiştir. Elektrot ucuna L-Laktat oksidaz enzimi içeren membran (YSI 2329 L-Lactate Membrane) takılmıştır. Membran üzerinde aşağıdaki reaksiyon gerçekleşmektedir:



Yapılan analizlerde numune seyreltmelerinde YSI 2357 tamponu kullanılmıştır. Kalibrasyonlarda ve doğrusallık kontrollerinde sırasıyla 0,50 g/L L-Laktat (YSI 2776) ve 2,67 g/L L-Laktat (YSI 1530) standartları kullanılmıştır.

3.6.5. Glutamin analizi

Çalışmada besiyerindeki glutamin miktarı YSI 2700 Select biyokimya analizörü ile tayin edilmiştir. Elektrot ucuna glutaminaz ve glutamat oksidaz enzimlerini içeren membran (YSI 2735 L-Glutamine Membrane) takılmıştır. Membran üzerinde aşağıdaki reaksiyonlar gerçekleşmektedir:



Yapılan analizlerde ve numune seyreltmelerinde YSI 2357 tamponu kullanılmıştır. Kalibrasyonlarda ve doğrusallık kontrollerinde sırasıyla 5,00 mM L-Glutamin (YSI 2736) ve 8,00 mM L-Glutamin (YSI 2737) standartları kullanılmıştır.

Glutamin analizlerinde kullanılan membran glutamat oksidaz enzimi içerdiğinden besiyerinde glutamat miktarının da belirlenmesi amacıyla iki ölçüm kanallı YSI 2700 Select biyokimya analizöründe L-Glutamin ve L-Glutamat tayinleri eşzamanlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Çalışmada besiyerindeki glutamat tayinleri için cihazda yer alan diğer elektrodun ucuna glutamat oksidaz enzimlerini içeren membran (YSI 2754 L-Glutamate Oxidase Membrane) takılmıştır.

Yapılan analizlerde numune seyreltmelerinde YSI 2357 tamponu kullanılmıştır. Kalibrasyonlarda ve doğrusalılık kontrollerinde sırasıyla 5,00 mM L-Glutamat (YSI 2755) ve 10,00 mM L-Glutamat (YSI 2756) standartları kullanılmıştır.

3.7. Kinetik Eşitlikler

Özgül substrat tüketim ve metabolit oluşum hızları Eşitlik 3.3., 3.4. ve 3.5. ile hesaplanmış ve ortalama hız olarak verilmiştir.

$$q_{\text{Gli}} = \left[-\frac{\Delta[\text{Gli}]}{\Delta[t]} \right] \frac{1}{X} \quad (3.3.)$$

$$q_{\text{görGlu}} = \left[-\frac{\Delta[\text{Glu}]}{\Delta[t]} \right] \frac{1}{X} \quad (3.4.)$$

$$q_{\text{görLak}} = \left[\frac{\Delta[\text{Lak}]}{\Delta[t]} \right] \frac{1}{X} \quad (3.5.)$$

Eşitliklerde kullanılan, [Gli], glikoz derişimini (mol/L); [Glu], glutamin derişimini (mol/L); [Lak], laktat derişimini (mol/L); X, ortalama hücre derişimini (hücre/mL); t, proses zamanını (sa) ifade etmektedir.

BÖLÜM 4

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Cevap Yüzey Metodu Model Sonuçları

Şap virüsü üretiminde besiyeri başlangıç glikoz ve glutamin derişimlerinin etkilerini belirlemek, modeller oluşturmak ve proses optimizasyonu yapmak amacıyla deneyler yapılmıştır. Desing-Expert[®] 7.0.0 cevap yüzey metodu merkezi kompozit tasarımı ile planlanarak yapılan deneylere ait sonuçlar programa cevap olarak girilmiş ve bağımlı değişkenler modellenmiştir. Önerilen modelin uygunluğunun test edilmesi ve bağımsız değişkenler ile bunlara ait ikinci dereceden ve interaksiyon etkilerin belirlenebilmesi için ANOVA testi uygulanmıştır. Merkezi kompozit tasarım tarafından önerilen deney setleri ve bağımlı değişkenlerin sonuçları Çizelge 4.1.'de verilmiştir. C1, G2 ve N2 deneyleri R² değerini düşürdüğü için bu deneylere ait veriler çizelge 4.1.'de verilmiş fakat model çalışmalarında kullanılmamıştır.

Çizelge 4.1. Merkezi kompozit tasarımı tarafından önerilen deney setleri ve bağımlı değişkenlerin sonuçları.

Deney No	Bağımsız Değişkenler (Faktörler)		Bağımlı Değişkenler (Cevaplar)	
	Glikoz (mM)	Glutamin (mM)	146S(µg/mL)	E.T.(log ₁₀ PFU/mL)
A1	22,50	6,50	0,96	8,00
A2	22,50	6,50	0,92	8,00
A3	22,50	6,50	1,28	8,30
B1	22,50	6,50	1,04	8,10
B2	22,50	6,50	1,02	8,28
B3	22,50	6,50	1,15	8,25
C1	22,50	12,00	1,00	8,00
C2	22,50	12,00	1,07	8,38
C3	22,50	12,00	1,32	8,18
D1	22,50	6,50	1,13	8,33

Çizelge 4.1. devam

Deney No	Bağımsız Değişkenler (Faktörler)		Bağımlı Değişkenler (Cevaplar)	
	Glikoz (mM)	Glutamin (mM)	146S($\mu\text{g}/\text{mL}$)	E.T.(\log_{10} PFU/mL)
D2	22,50	6,50	0,92	8,25
D3	22,50	6,50	1,00	8,30
E1	40,00	1,00	1,22	8,23
E2	40,00	1,00	1,31	8,33
E3	40,00	1,00	1,14	8,28
F1	5,00	6,50	0,51	6,38
F2	5,00	6,50	0,67	6,65
F3	5,00	6,50	0,54	6,47
G1	22,50	6,50	1,26	6,69
G2	22,50	6,50	1,55	6,70
G3	22,50	6,50	1,26	7,14
H1	5,00	1,00	1,12	7,14
H2	5,00	1,00	0,85	6,80
H3	5,00	1,00	0,84	6,70
K1	40,00	6,50	0,98	7,00
K2	40,00	6,50	1,23	7,00
K3	40,00	6,50	1,22	7,00
L1	5,00	12,00	0,86	6,69
L2	5,00	12,00	0,54	7,10
L3	5,00	12,00	0,65	6,18
M1	40,00	12,00	1,12	7,42
M2	40,00	12,00	1,05	7,50
M3	40,00	12,00	1,09	7,50
N1	22,50	1,00	0,91	7,32
N2	22,50	1,00	0,62	7,16
N3	22,50	1,00	1,07	7,28
P1	22,50	6,50	0,99	7,43
P2	22,50	6,50	1,01	7,56
P3	22,50	6,50	1,10	7,54

4.1.1. 146S için cevap yüzey metodu model sonuçları

O tipi şap virüsü kültürlerinden elde edilen virüslerin 146S değeri cevap değişkeni olarak seçilmiştir. Merkezi kompozit deney tasarımının önerdiği deney setlerinin yapılması sonucunda cevap değişkeni 146S değerleri Design-Expert® 7.0.0 paket programına aktarılmıştır. Model çalışmasında toplam 36 veri kullanılmış ve

Design-Expert® 7.0.0 paket programı tarafından “kuadratik” model önerilmiştir. 146S için kullanılan veriler Çizelge 4.1.’de, 146S’e ait modelin ANOVA testi sonuçları ise Çizelge 4.2.’de verilmiştir.

Çizelge 4.2. 146S modeli için ANOVA sonuçları.

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	1.14	5	0.23	13.53	< 0.0001
A-Glikoz	0.90	1	0.90	53.08	< 0.0001
B-Glutamin	0.012	1	0.012	0.74	0.3968
AB	1.229E ⁻⁰⁰⁴	1	1.229E ⁻⁰⁰⁴	7.265E ⁻⁰⁰³	0.9326
A ²	0.24	1	0.24	14.04	0.0008
B ²	0.019	1	0.019	1.12	0,2994

R²=0,6928 ; Adj-R²=0,6416 ; Pred-R²=0,5497

Design-Expert® 7.0.0 paket programı, istatistiksel analiz sonucunda 146S’in “kuadratik” model ile tanımlanmasını önermiştir. Önerilen model (Eşitlik 4.1.) için gerçekleştirilen ANOVA sonucunda model için elde edilen düşük p değeri (<0,0001) modelin %99,999 güven aralığında önemli olduğunu belirtmektedir. Kuadratik model içerisinde yer alan bağımsız değişkenlerden glikoza ait temel etkiler sahip olduğu düşük p değeri (p<0,05) ile istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. İnteraksiyon etkiler ve ikinci dereceden etkiler incelendiğinde ise A² terimi istatistiksel açıdan önemli model terimi olarak bulunmuştur (p<0,05). Modele ait regresyon katsayısı (R²) 0,6928 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç toplam değişkenlerin ve model sonuçlarının 69,28’nin önerilen model ile açıklanabileceğini ifade etmektedir. Adj-R² (0,6416) değerinin R² değerine yakın olması model içerisine ilave terim eklenmesine ihtiyaç olmadığını göstermektedir. Pred-R² (0,5497) değeri Adj-R² (0,6416) değerleri ile kabul edilebilir seviyede uyumlu bulunmuştur. Design-Expert® paket programı tarafından önerilen kuadratik modele ait kodlu ve gerçek terimli model eşitlikleri sırasıyla Eşitlik 4.1. ve Eşitlik 4.2.’de verilmiştir.

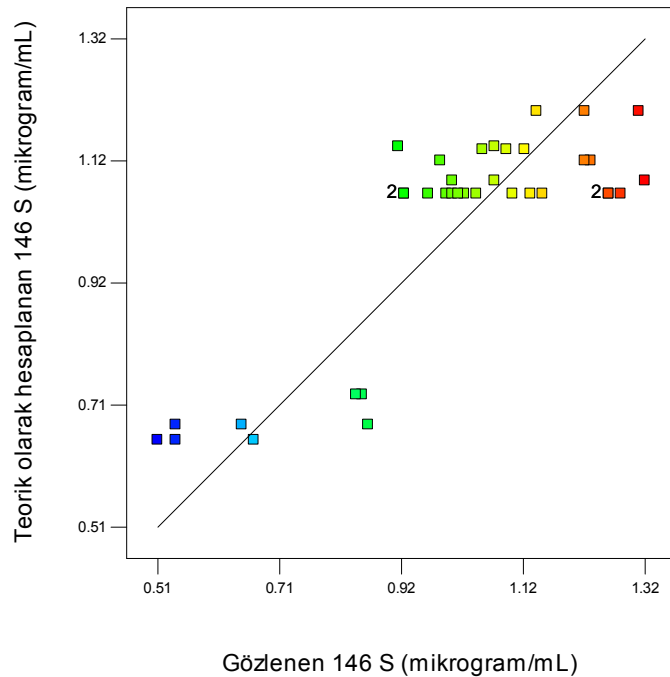
$$146S = +1.06 + 0.23 * A - 0.028 * B - 3.378E^{-003} * A * B - 0.18 * A^2 + 0.050 * B^2 \quad (4.1.)$$

$$146S = +0.57130 + 0.039414 * \text{Glikoz} - 0.025974 * \text{Glutamin} - 3.50954E^{-005} * \text{Glikoz} * \text{Glutamin} - 5.76574E^{-004} * \text{Glikoz}^2 + 1.66204E^{-003} * \text{Glutamin}^2 \quad (4.2.)$$

Eşitlik 4.1.'de önerilen model eşitliği kullanılarak hesaplanan teorik değerlere karşı gözlenen (deneysel) sonuçların dağılımı Şekil 4.1.'de verilmiştir. 146S'e ait teorik ve gözlenen değerler Şekil 4.1.'den görüleceği üzere lineer doğrunun etrafında bölgesel dağılımlar göstermektedir. Sonuçların model açısından kabul edilebilir seviyede olmasına karşın çalışılan sistemin virüs kültürü gibi canlı içeren bir sistemin olması ve etki eden faktörlerin fazla olması sebebiyle görülen bu dağılım deneysel veriler ile modelden elde edilen veriler arasında bir uyumun olduğunu göstermektedir.

Design-Expert® Software
146S

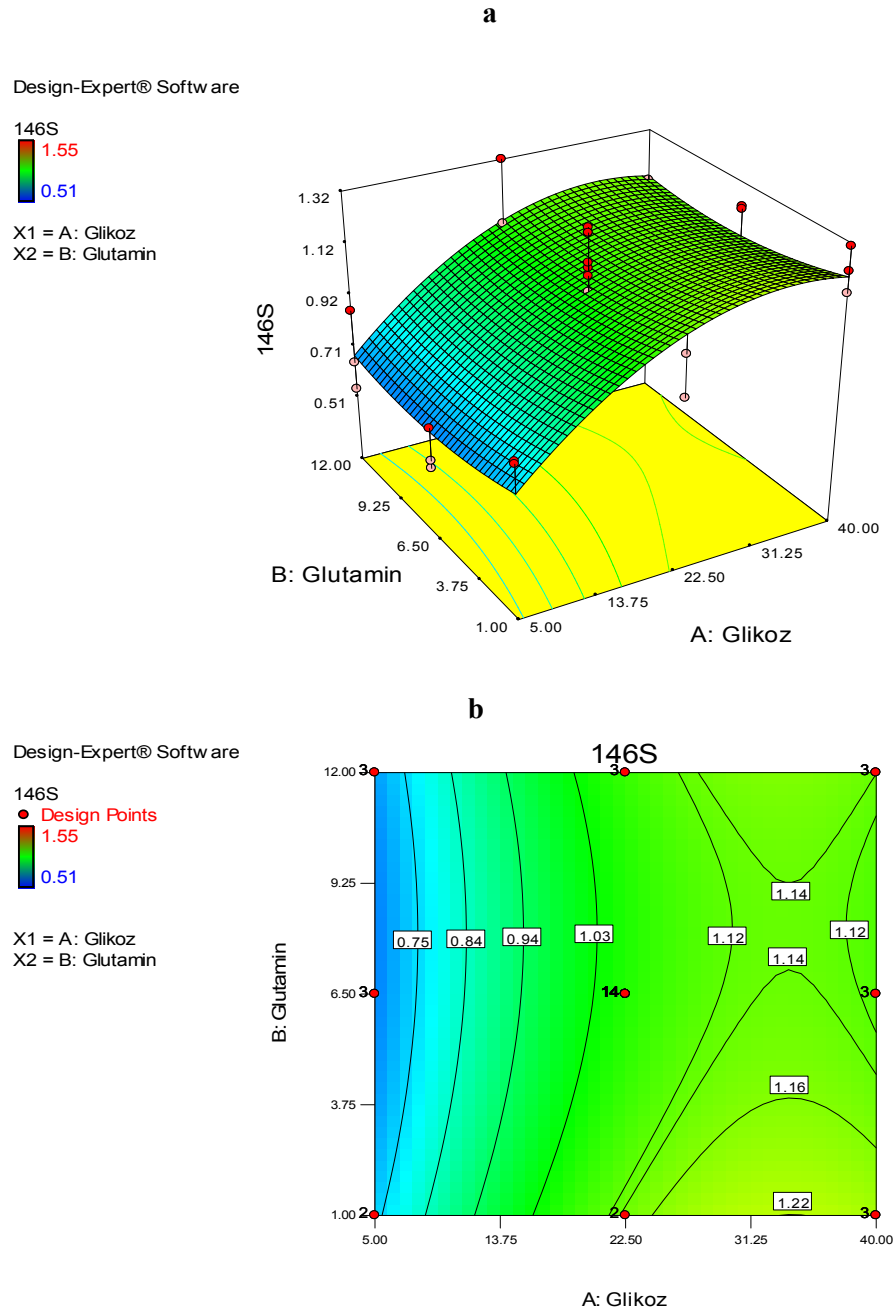
Color points by value of
146S:



Şekil 4.1. 146S'in teorik olarak hesaplanan değerlerine karşı gözlenen (deneysel) değerlerin dağılımı.

Şekil 4.2. (a) ve (b)'de glikoz ve glutamin derişimlerinin 146S üzerine etkilerini inceleyen yüzey cevap grafiği ve kontur grafiği verilmiştir. Grafiklerde 146S cevap değişkeninin glutamin derişiminden bağımsız olduğu glikoz derişiminin ise etkili olduğu gözlenmiştir. Artan glikoz derişimleri 146S değerini arttırmaktadır. Glutaminin 1-12 mM, glikozun yaklaşık 20 mM olduğu durumlarda 1,00 µg/mL'nin üzerinde 146S değeri elde edilmektedir. En yüksek 146S değeri yaklaşık 1.22 µg/mL değerine ile 35 mM glikoz ve 1,00 mM glutamin olan bölgedir. 35,00 mM glikoz derişiminde glutamin derişimi 8,00 mM'a kadar arttığında 146S değerinde yavaş bir azalma, bu glutamin değerinden sonra ise çok az bir artış görülmektedir. En düşük 146S değeri ise 5,00 mM glikoz ve 1-12mM aralığındaki glutamin derişimlerindedir. Bütün glutamin derişimlerinde 12,00 mM'dan düşük glikoz derişiminde 146S değerine 0,9 µg/mL'nin altına düşmektedir. Sonuç olarak; oluşturulan 146S modelinde yüksek 146S için glikoz derişiminin belli değerine üzerinde olması gereklidir. Bunun için olabilecek en düşük glikoz derişimi yaklaşık 20 mM'dır (>1 µg/mL). Bu derişimin üzerindeki glikoz derişimleri 146S değerini arttırmaktadır. En yüksek 146S değerleri ise düşük glutamin (1 mM) ve 30-40 mM aralığındaki glikoz derişimlerinde elde edilmektedir. Model sonucunda elde edilen bu veriler aynı zamanda besiyeri formülasyonları için de kullanılabilir. Yüksek 146S değerleri elde edebilmek için besiyeri formülasyonlarında yüksek glutamin derişimlerine gerek duyulmadığı grafiklerden anlaşılmaktadır. Özyiğit (2012) tarafından yapılan çalışmada en yüksek 146S değerini 2 mM glutamin ve 44 mM glikoz derişimlerinde elde edilmiştir ve yüksek glikoz derişimlerinde glutamin derişimlerinin arttırılmasının 146S değerini düşürdüğu belirtilmiştir. Glutamin aynı zamanda kültür ortamında üretilen amonyum iyonlarının kaynağıdır (Ozturk et al.,1989). Kültür ortamında oluşan amonyum derişimleri başlangıç glutamin derişimlerine bağlıdır. Yüksek glutamin derişimleri oluşan amonyum derişimlerini de arttırmaktadır. Yüksek amonyum derişimleri ise hücreler için toksik etki yapmaktadır. McQueen and Bailey (1991), Ozturk et al. (1992), Ryll et al. (1994), Mirabet et al. (1997), Cruz et al. (2000), Ferreira et al. (2007) memeli hücrelerinde amonyum toksitesi sonucunda elektrokimyasal gradientlerin bozulduğunu ve sitoplazmanın asitlendiğini, enzim reaksiyonlarının inhibisyona uğradığını, hücre içi pH'nın değiştiğini ve hücre onarım(maintenance) enerjisinin arttığını, apoptoza neden

olduğunu ve hücre içi aktif şekerlerin hücreler için toksik seviyelere çıktığını bildirmişlerdir.



Şekil 4.2. 146S modeli glikoz-glutamin (a)Yüzey Cevap Grafiği, (b) Kontur Grafiği

4.1.2. Enfektif titre (ET) için cevap yüzey metodu model sonuçları

O tipi şap virüsü kültürlerinden elde edilen virüslerin ET değeri cevap değişkeni olarak seçilmiştir. Merkezi kompozit deney tasarımının önerdiği deney setlerinin yapılması sonucunda cevap değişkeni enfektif titre (ET) değerleri Design-Expert® 7.0.0 paket programına aktarılmıştır. Model çalışmasında toplam 36 veri kullanılmış ve Design Expert® 7.0.0 paket programı tarafından “kuadratik” model önerilmiştir. ET için kullanılan veriler Çizelge 4.1.’de, ET’ye ait modelin ANOVA testi sonuçları ise Çizelge 4.3.’te verilmiştir.

Çizelge 4.3. ET modeli için ANOVA sonuçları.

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Kareler Ortalaması	F değeri	p değeri
Model	9.66	5	1.93	8.82	< 0.0001
A-Glikoz	3.96	1	3.96	18.06	0.0002
C-Glutamin	0.018	1	0.018	0.081	0.7775
AB	0.41	1	0.41	1.89	0.1790
A ²	5.72	1	5.72	26.13	< 0.0001
B ²	0.49	1	0.49	2.25	0.1439

R²=0,5951 ; Adj-R²=0,5276 ; Pred-R²=0,4367

Design-Expert® 7.0.0 paket programı, istatistiksel analiz sonucunda ET’nin “kuadratik” model ile tanımlanmasını önermiştir. Önerilen model (Eşitlik 4.3.) için gerçekleştirilen ANOVA sonucunda model için elde edilen düşük p değeri (<0,0001) modelin %99,999 güven aralığında önemli olduğunu belirtmektedir. Kuadratik model içerisinde yer alan bağımsız değişkenlerden glikoza ait temel etkiler sahip olduğu düşük p değeri (p<0,05) ile istatistiksel açıdan önemli bulunmuştur. İnteraksiyon etkiler ve ikinci dereceden etkiler incelendiğinde ise A² terimi istatistiksel açıdan önemli model terimi olarak bulunmuştur (p<0,05). Modele ait regresyon katsayısı (R²) 0,5951 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuç toplam değişkenlerin ve model sonuçlarının 59,51’nin önerilen model ile açıklanabileceğini ifade etmektedir. Adj-R² (0,5276) değerinin R² değerine yakın olması model içerisine ilave terim eklenmesine ihtiyaç olmadığını göstermektedir. Pred-R² (0,4367) ile Adj-R² (0,5276) değerleri birbiriyle uyumlu bulunmuştur. Design Expert® paket programı tarafından önerilen kuadratik modele ait

kodlu ve gerçek terimli model eşitlikleri sırasıyla Eşitlik 4.3. ve Eşitlik 4.4.'de verilmiştir.

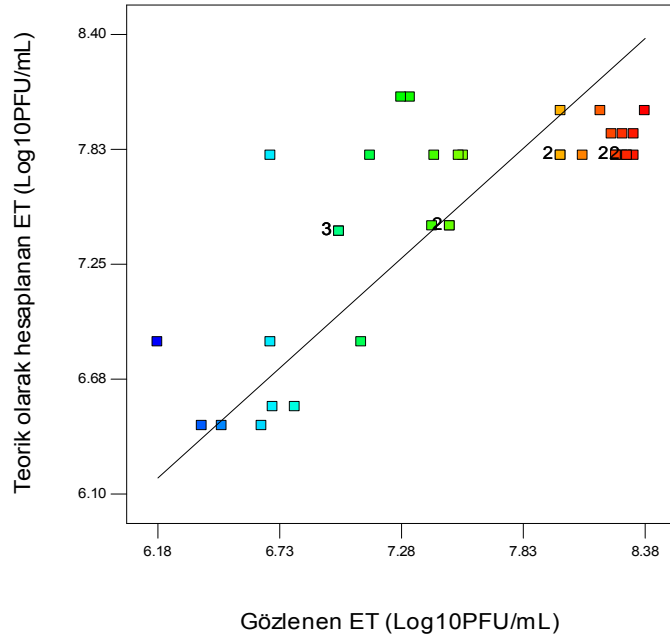
$$ET = +7.79 + 0.49 * A - 0.034 * B - 0.20 * A * B - 0.87 * A^2 + 0.26 * B^2 \quad (4.3.)$$

$$ET = +5.83606 + 0.16844 * \text{Glikoz} - 0.070787 * \text{Glutamin} - 2.03897E^{-003} * \text{Glikoz} * \text{Glutamin} - 2.83089E^{-003} * \text{Glikoz}^2 + 8.50049E^{-003} * \text{Glutamin}^2 \quad (4.4.)$$

Eşitlik 4.3'te önerilen model eşitliği kullanılarak hesaplanan teorik değerlere karşı gözlenen (deneysel) sonuçların dağılımı Şekil 4.3.'te verilmiştir. ET'ye ait teorik ve gözlenen değerler Şekil 4.10.'dan görüleceği üzere lineer doğrunun etrafında geniş bir dağılım göstermektedir. Bu dağılım, deneysel veriler ile modelden elde edilen veriler arasında bir uyumun olduğunu göstermektedir.

Design-Expert® Software
ET

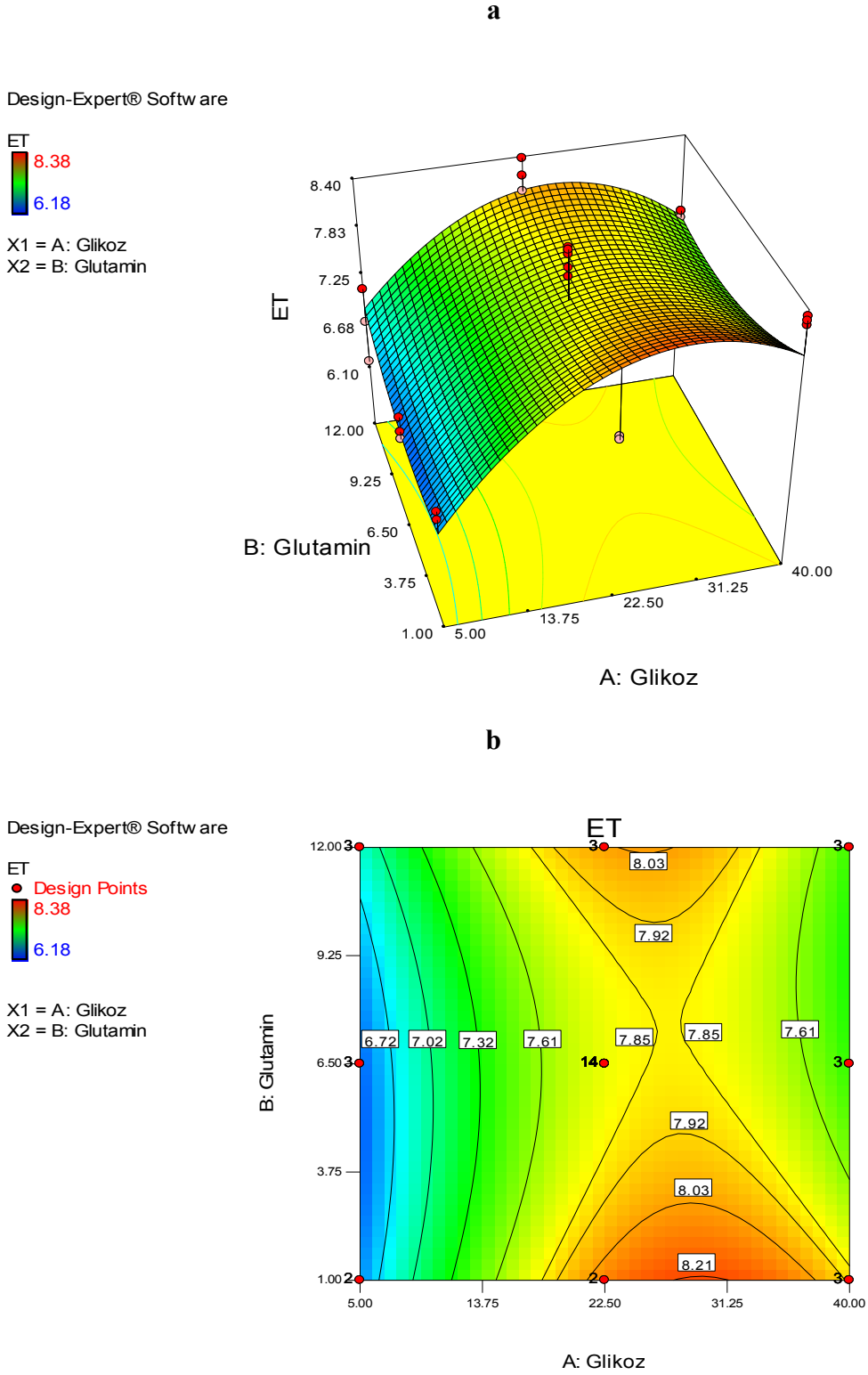
Color points by value of
ET:



Şekil 4.3. ET'nin teorik olarak hesaplanan değerlerine karşı gözlenen (deneysel) değerlerin dağılımı.

Cevap değişkeni ET için glikoz ve glutamin derişimlerini inceleyen yüzey cevap grafiği ve kontur grafiği Şekil 4.4.'de verilmiştir. Düşük glikoz derişimlerinde (5,00-6,30 mM) glutamin derişimi 10,65 mM'in üzerinde olduğu durumda ET değeri 6,70 Log₁₀ PFU/mL'nin üzerine çıkmaktadır. 9,00 mM glikoz derişiminin üzerinde bütün glutamin derişimleri için (1,00-12,00 mM) ET değeri 7,00 Log₁₀ PFU/mL'nin üzerinde olduğu görülmektedir. Artan glikoz derişimleri ile birlikte artan glutamin derişimleri ET değeri üzerine derişimlere bağlı etki göstermektedir. Grafiklerden ET değerinin en yüksek olduğu iki durumun olduğu görülmektedir. Birinci durum ET değerinin 7,80-8,20 Log₁₀ PFU/mL arasında olduğu 18,00-30,00 mM glikoz, 1,00-7,00 mM glutamin derişimleri bölgesidir. Bu bölgede en yüksek ET değeri 8,22 Log₁₀ PFU/mL (yaklaşık 30,00 mM glikoz ve 1,00 mM glutamin derişimlerinde) olarak elde edilmiştir. İkinci durum ise ET değerinin 7,80-8,05 Log₁₀ PFU/mL olduğu 18,00-33,00 mM glikoz, 7,00-12,00 mM glutamin derişiminin bölgesidir. Bu bölgede en yüksek ET değeri 8,05 Log₁₀ PFU/mL (yaklaşık 25,00 mM glikoz ve 12,00 mM glutamin derişimlerinde) olarak elde edilmiştir. 18,00-40,00 mM glikoz derişimleri, 7,00 mM'dan 1,00 mM'a azalan glutamin derişimleri ET değerini arttırmaktadır. Aynı şekilde 18,00-33,00 mM glikoz derişimleri, 7,00 mM'dan 12,00 mM'a artan glutamin derişimleri ET değerini arttırmaktadır. Grafiklerden yüksek ET değerleri elde edebilmek için glutamin derişimlerinin yüksek olması gerekmediği anlaşılmaktadır. Bölüm 4.1.1'de yüksek glutamin değerlerinin tercih edilmeme sebepleri anlatılmıştır. Özyiğit (2012) yüksek glikoz derişimlerinin ET değerinin arttırıcı etkisi olduğunu belirtmiştir.

Sonuç olarak model sonuçlarına göre yüksek 146S ve ET değerleri elde edebilmek için besiyeri formülasyonlarında yüksek glikoz, düşük glutamin derişimlerinin tercih edilmesi gerektiği görülmüştür.



Şekil 4.4. ET modeli glikoz-glutamin (a) Yüzey Cevap Grafiği, (b) Kontur Grafiği

4.1.3. 146S ve ET Optimizasyonu

Virüs kültürü besiyerinin iki temel karbon ve azot kaynağı bileşeni olan glikoz ve glutamin bağımsız değişkenlerinin optimizasyonunda Design-Expert® 7.0.0 programı kullanılmıştır. Optimizasyonda amaç deneysel veriler sonucunda elde edilen model eşitlikleri yardımıyla bağımsız değişkenlerin istenilen cevap şartları doğrultusunda optimum değerlerine ulaşmaktır.

Modelleme sonuçları incelendiğinde bağımsız değişkenler ile bağımlı değişkenler arasında yakın ilişkiler tespit edilmiştir. Optimizasyonda 146S ve ET değerleri proses verimliliği için maksimize edilmiştir. Glikozun bağımlı değişkenler üzerinde olumlu etkisinin olmasından dolayı optimizasyonda bu değer aralıkta bırakılmıştır. Glutaminin ise 146S ve ET değerleri üzerine etkisinin olmamasından dolayı optimizasyonda bu değer minimize edilmiştir. Optimizasyonda kullanılan kriterler ve koşulları Çizelge 4.4.'de, program tarafından önerilen çözüm önerileri ise Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

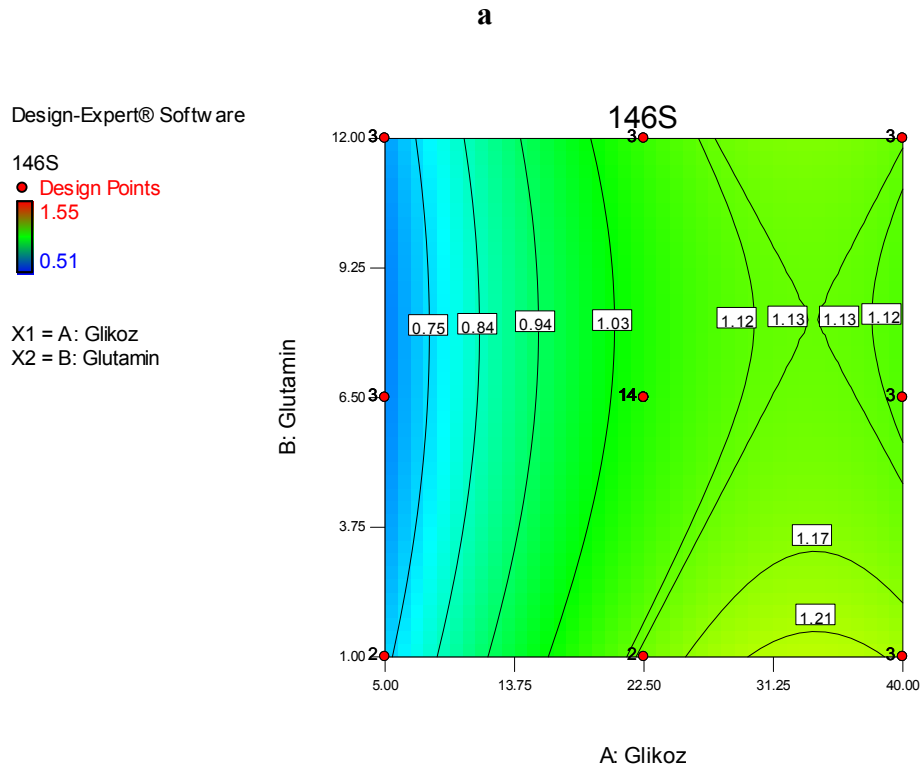
Çizelge 4.4. Optimizasyon kriterleri ve koşulları.

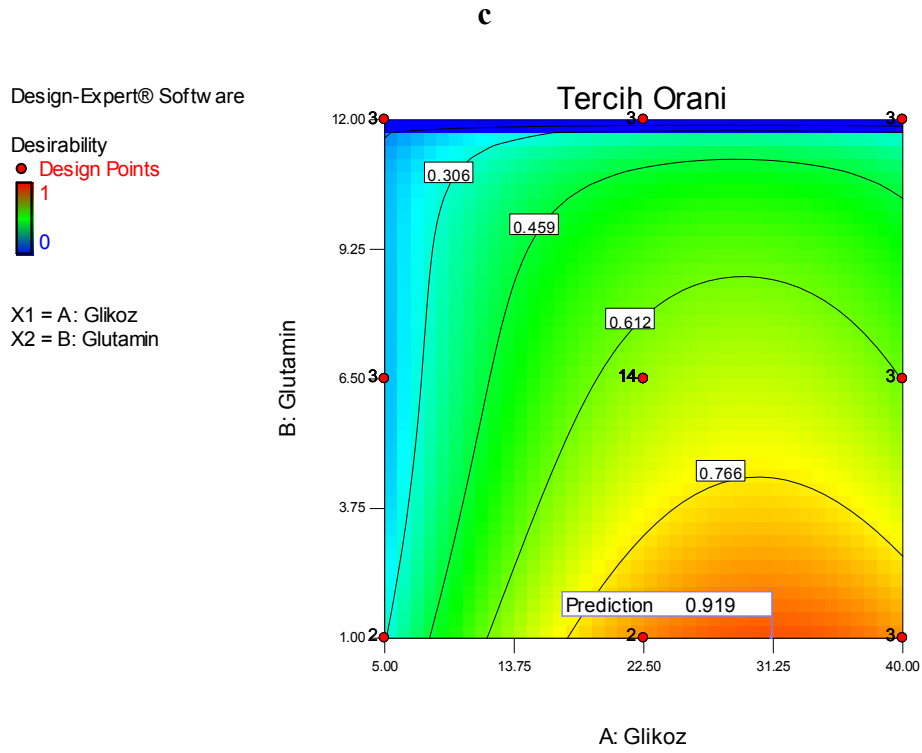
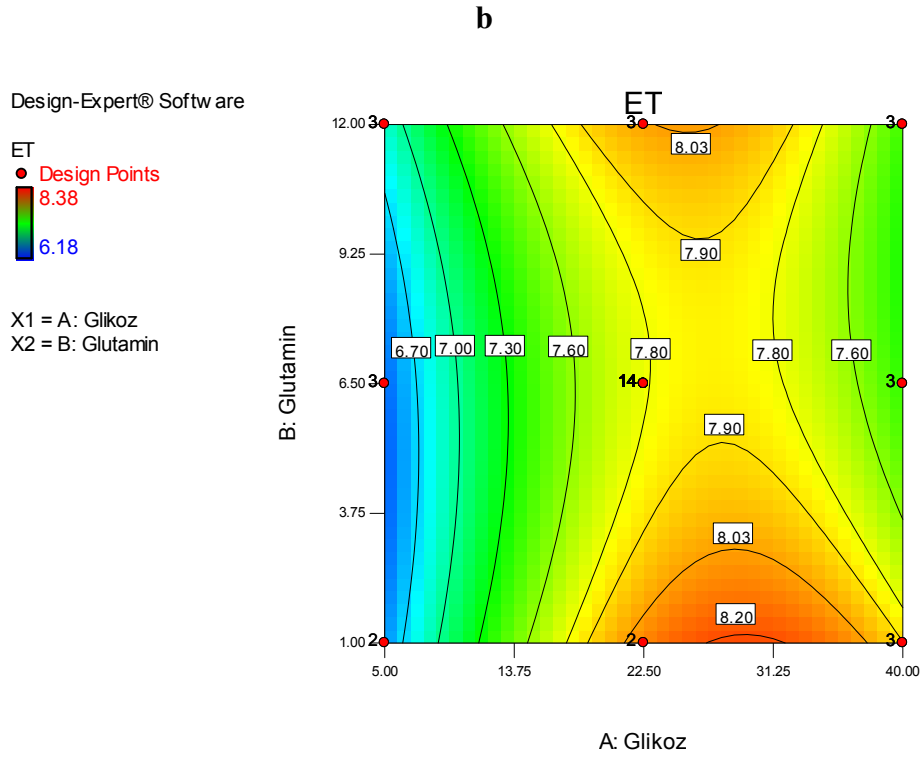
Kriter	Hedef	Alt sınır	Üst sınır	Alt Ağırlık	Üst Ağırlık	Önem
Glikoz	Aralıkta	5	40	1	1	3
Glutamin	Minimize	1	12	1	1	3
146S	Maksimize	0,51	1,32	1	1	5
ET	Maksimize	6,18	8,38	1	1	5

Çizelge 4.5.'den görüldüğü gibi tercih oranları aynı olan üç deney önerilmiştir. Modelin tercih ettiği optimizasyon deneyinde glikoz ve glutamin konsantrasyonları sırasıyla 31,15 ve 1,00 mM olarak önerilmiştir. Bu başlangıç koşullarında virüs kültürü sonunda elde edilebileceği tahmin edilen 146S ve ET değerleri ise Çizelge 4.5.'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Design Expert® tarafından önerilen optimizasyon çözüm sonuçları.

Sıra No	Glikoz(mM)	Glutamin(mM)	146S($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ET($\text{Log}_{10}\text{PFU}/\text{mL}$)	Tercih Oranı
1	31,15	1,00	1,21	8,21	0,919
2	30,98	1,00	1,21	8,21	0,919
3	31,43	1,00	1,22	8,21	0,919





Şekil 4.5. Optimizasyon deneyleri için (a) 146S, (b) ET, (c) Tercih oranı Kontur grafikleri.

4.1.4. Doğrulama deneyleri

Elde edilen sonuçların güvenilirliğinin tespiti amacıyla çözümleme sonucunda ulaşılan optimum değerlerin doğrulama (validasyon) deneyleri yapılmaktadır. Doğrulama deneylerinin yapılmasında amaç optimizasyon çözüm önerileri ile doğrulama deneyinden elde edilen gerçek değerlerin karşılaştırılmasıdır.

Model tarafından, yapılacak doğrulama deneyleri için 146S partikül miktarı 1,21 µg/mL, ET değeri 8,21 Log₁₀ PFU/mL olarak tahmin edilmiştir. Yapılan 6 adet doğrulama deneyleri sonucunda ortalama 146S değeri 1,19±0,09 µg/mL, ortalama ET değeri ise 8,31±0,19 Log₁₀ PFU/mL olarak bulunmuştur. Tahmin edilen ve ölçülen değerler arasındaki hata yüzdeleri 146S için % 1,65, ET için % 1,22'dir. Model 146S ve ET optimizasyonu için dizayn alanında güvenle kullanılabilir özelliktedir.

Çizelge 4.6. Doğrulama deney sonuçları

Deney	Glikoz (mM)	Glutamin (mM)	146S (µg/mL)	ET (Log ₁₀ PFU/mL)	Tercih Oranı
Model Optimizasyon 1	31,15	1,00	1,21	8,21	0,919
Doğrulama Deneyleri (n=6)	29,87±1,15	1,04±0,08	1,19±0,09	8,31±0,19	

n= Yapılan deney sayısı

4.2. Virüs Kültürü Kinetik Çalışma Sonuçları

Çalışmanın bu bölümünde virüs kültürü süresince üçer saat arayla numuneler alınmış ve her numune alınımında hücre derişimi belirlenmiştir. Alınan her numune daha sonra glikoz, laktat ve glutamin tayinlerinde kullanılmak üzere dondurulmuştur. Gerçekleştirilen analiz sonucunda virüs kültürüne ait biyokinetik parametreler hesaplanmıştır.

4.2.1. Virüs kültüründe zamana karşı metabolit ve substrat derişimi değişimleri

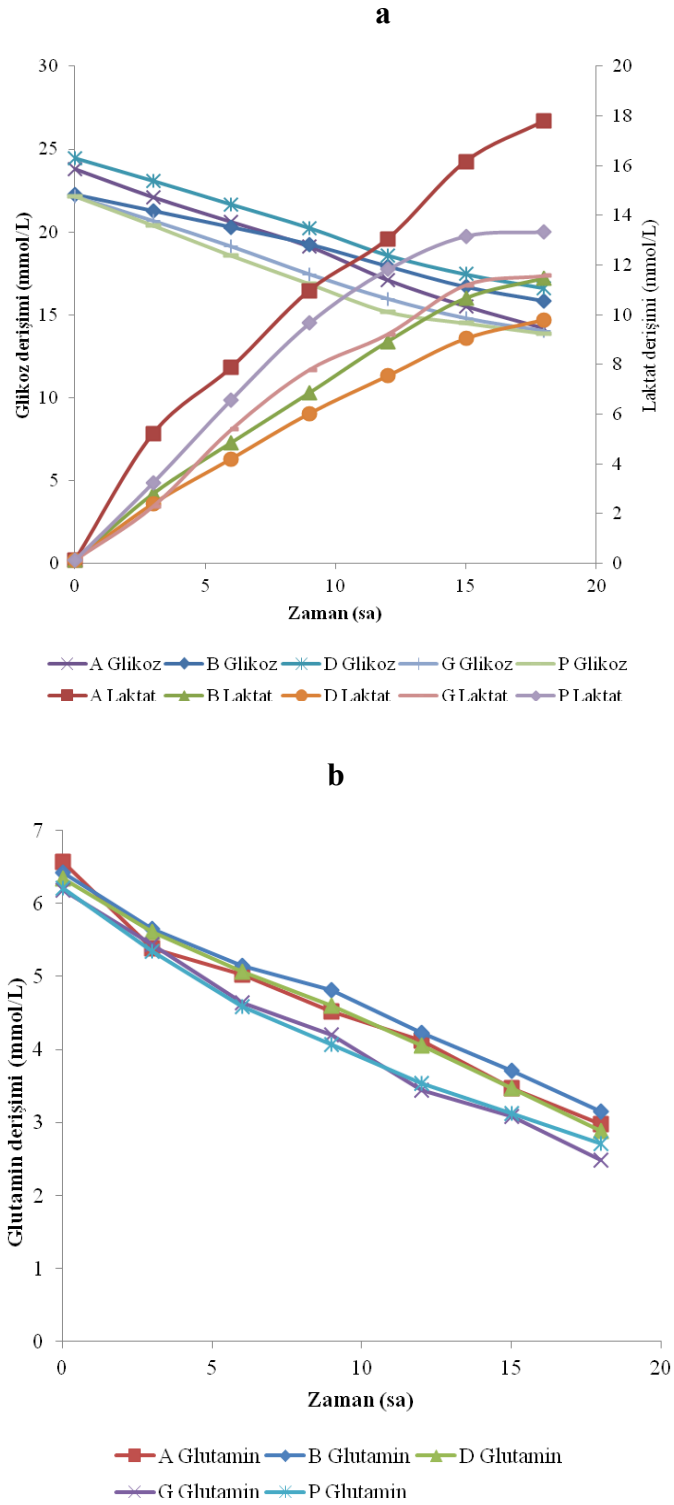
Virüs kültürü süresince zamana bağlı olarak glikoz ve glutamin derişimlerinde azalma, laktat derişimlerinde ise artma görölmektedir. Zamana bağlı olarak çizilen grafiklerde bu artma ve azalma gösterilmiştir.

Üç tekrarlı yapılan deneylerin ortalamaları alınarak grafikleri çizilmiştir. Merkez noktası deneyleri I. grup, diğer deneyler II. grup olarak alınmıştır.

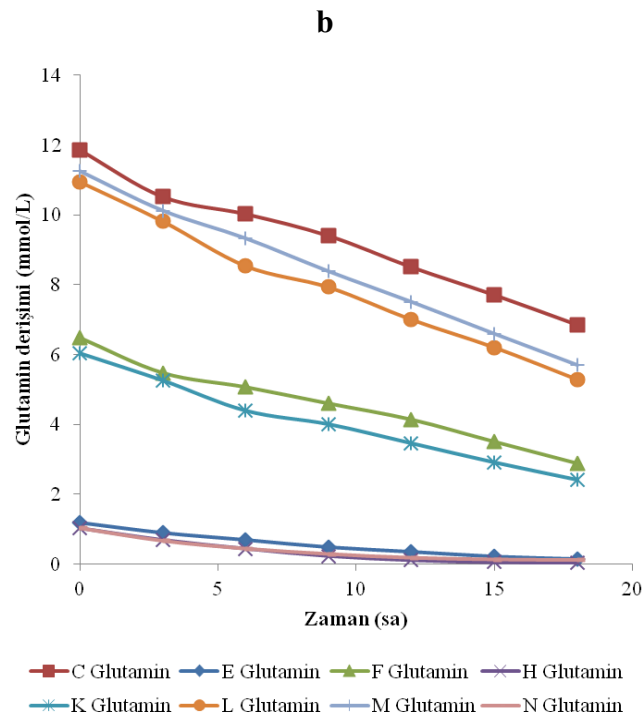
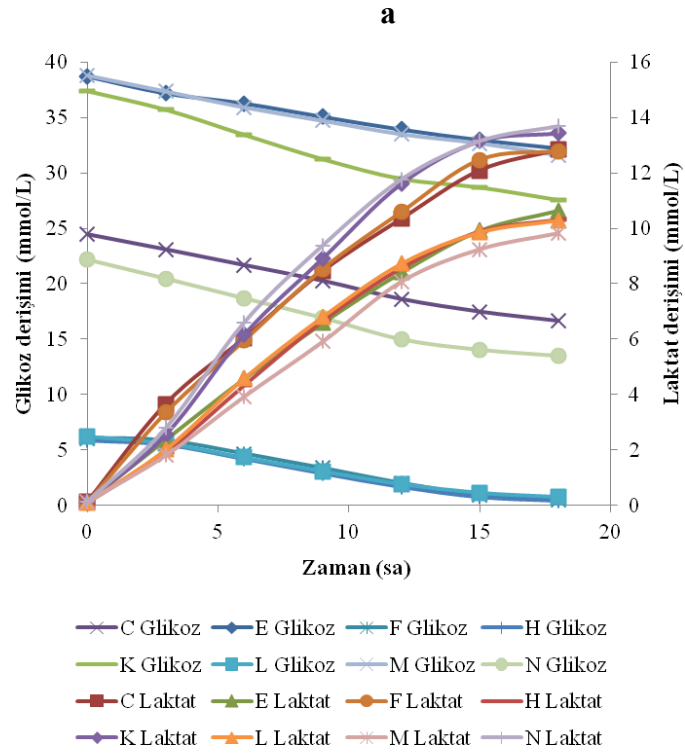
Şekil 4.6. (a) ve 4.7. (a)'da virüs kültürleri boyunca glikoz derişimi azalması ve laktat oluşumu, Şekil 4.6. (b) ve 4.7. (b)'de ise glutamin derişimi azalması gösterilmektedir. Besiyerinde düşük glikoz miktarı kullanıldığında (5,00 mM) kültür sonuna kadar glikozun yaklaşık % 91'i kullanılmıştır. 22,50 mM glikoz içeren deneylerde glikozun yaklaşık % 35'i ve 40 mM glikoz derişimlerinde ise glikozun yaklaşık % 20'si kullanılmıştır. 1,00 mM glutamin içeren deneylerde glutaminin yaklaşık olarak %91'i, 6,50 mM glutamin içeren deneylerde ise glutaminin %55'i kullanılmıştır. En yüksek glutamin miktarı olan 12,00 mM'da ise glutaminin yaklaşık % 48'i kullanılmıştır.

Oluşan laktat derişimine ait grafikler şekil 4.6.(a) ve 4.7. (a)'da gösterilmiştir. Virüs kültürü sonunda bütün deneylerde 10,49-13,56 mmol/L aralığında laktat oluşmuştur. Sadece kültür sonu laktat derişimi 17,66 mmol/L olan A deneyi bu aralık dışına çıkmıştır. Kültür süresi de diğer deneylere oranla daha uzun süren A deneyinde laktat derişimlerini etkileyen başka parametrelerin olabileceği düşünölmüştür. Cruze et al. (1999) oluşan laktatın yüksek oranda kültür ortamındaki glikoz derişimine bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Sonuç olarak oluşan laktat derişiminin tüketilen glikoz derişimi ile ilişkili olmasının yanında tüketilen glutamin derişiminden de etkilendiği görölmüştür. Merkez noktası deneylerinde oluşan laktat derişimi 11,83 mmol/L olarak bulunmuştur. Bu aralık içinde oluşan en yüksek laktat miktarı 13,56 mmol/L ile N deneyinde görölmüştür. Oluşan en düşük laktat miktarı ise 9,74 mmol/L değeri ile M deneyinde görölmüştür.



Şekil 4.6. Virüs kültürü süresince I. grup deneylere ait (a) glukoz ve laktat, (b) glutamin derişimi değişimi grafikleri



Şekil 4.7. Virüs kültürü süresince II. grup deneylere ait (a) glüköz ve laktat, (b) glutamin derişimi değişimi grafikleri.

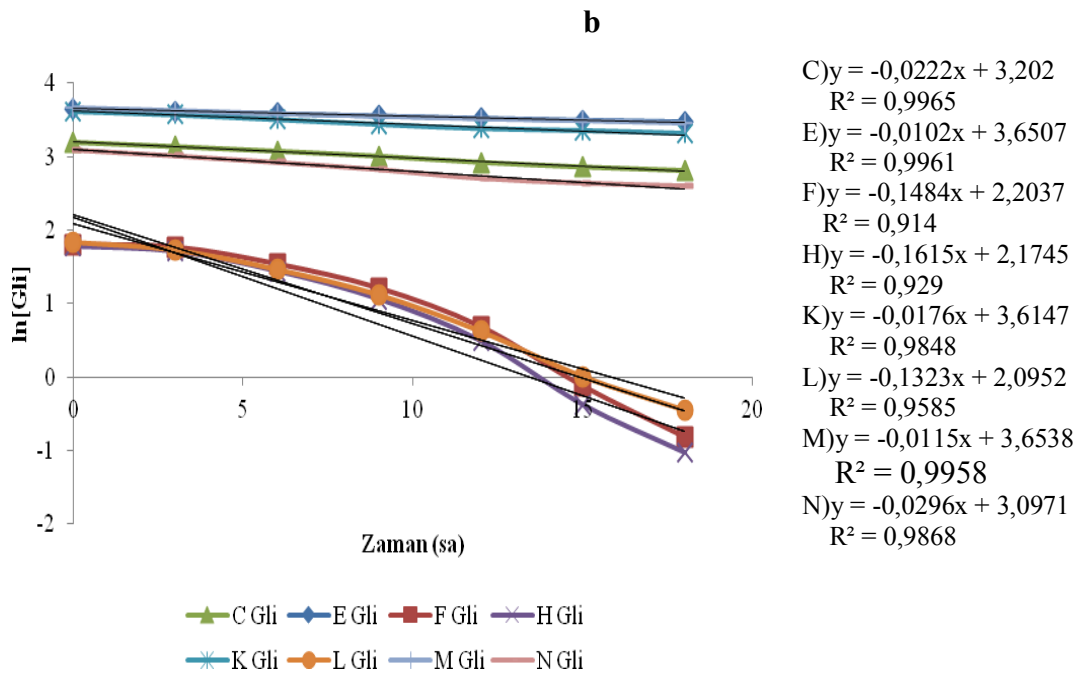
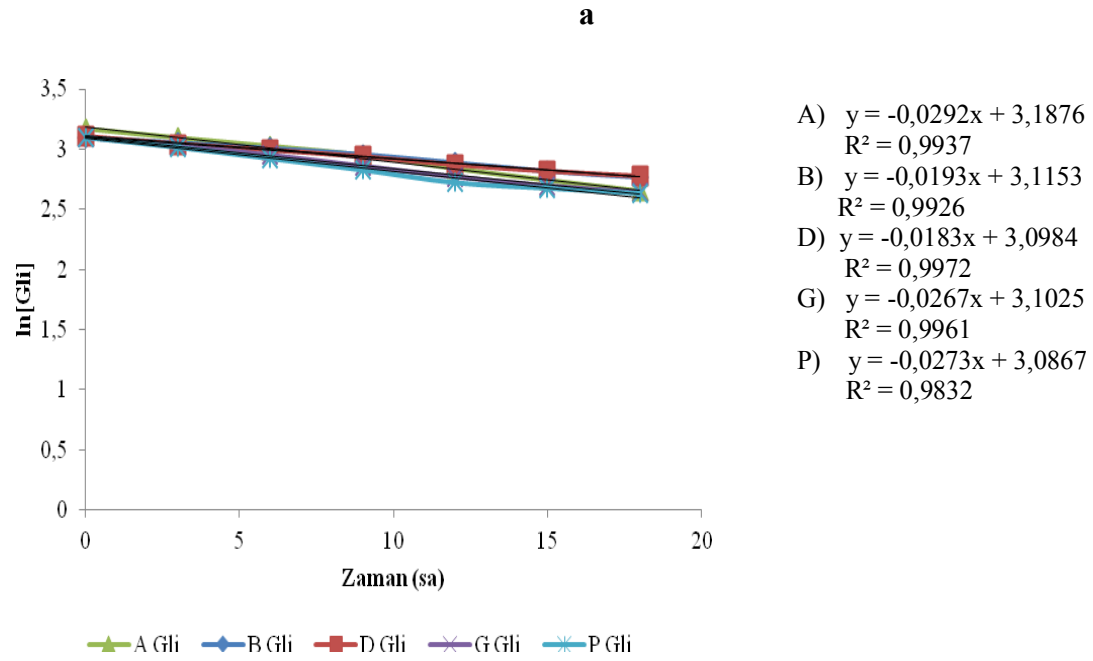
4.2.2. Virüs kültüründe substrat azalış ve metabolit artış hızları

Virüs kültürü süresince substrat ve metabolit miktarlarındaki artış ya da azalma hızı zamanla değişmektedir. Yapılan deneyler sonucunda virüs kültürü zamanına karşı çizilen glikoz ve glutamin tüketim hızı ve laktat oluşum hızı grafiklerinde bu açıkça görülmektedir. Zamanla glikoz ve glutamin derişimi azalış hızı birinci dereceden kinetikle ifade edilebilmektedir.

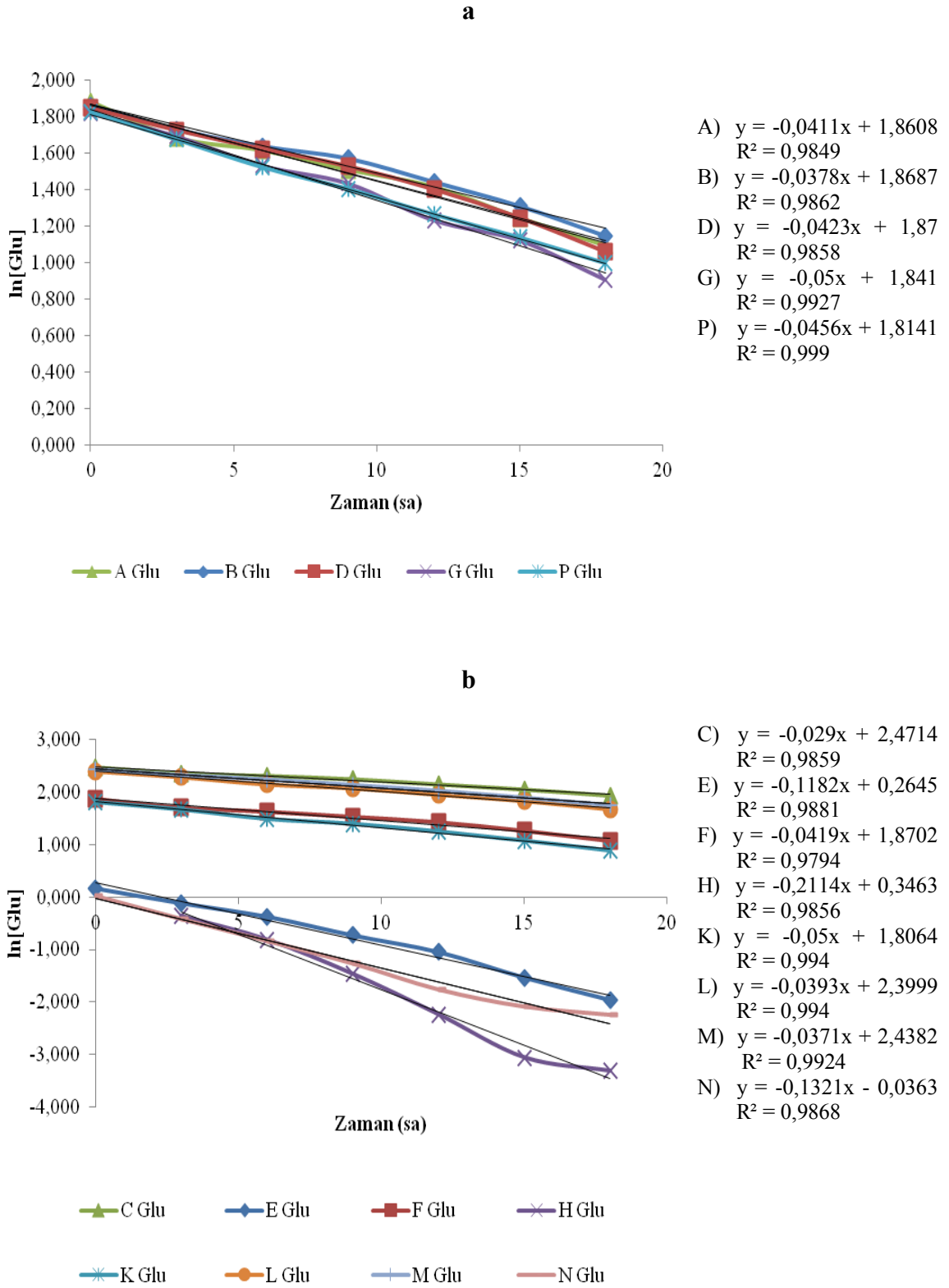
Şekil 4.8.'de ki grafiklerde virüs kültürü süresince glikoz tüketim hızı görülmektedir. Merkez noktası deneylerine ait ortalama glikoz tüketim hızı $0,024 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Besiyerinde $22,50 \text{ mM}$ glikoz, $1,00 \text{ mM}$ glutamin içeren N deneyinde hız $0,029 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Glikoz miktarı merkez noktası ve N değeri ile aynı olan fakat glutamin miktarı $12,00 \text{ mM}$ olan C deneyinde ise hız $0,022 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Aynı glikoz derişimlerini ($40,00 \text{ mM}$) içeren E ($1,00 \text{ mM}$ glutamin) ve M ($12,00 \text{ mM}$ glutamin) deneylerinde ise hızlar sırasıyla $0,010 \text{ sa}^{-1}$ ve $0,011 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. En yüksek hız değeri $5,00 \text{ mM}$ glikoz 1 mM glutamin içeren H deneyinde görülmüştür ($0,161 \text{ sa}^{-1}$). Besiyerinde $5,00 \text{ mM}$ glikoz bulunan F ($6,50 \text{ mM}$ glutamin) ve L ($12,00 \text{ mM}$ glutamin) deneylerinde hızlar sırasıyla $0,148 \text{ sa}^{-1}$ ve $0,132 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlardan sınır glikoz derişimlerinde glutamin derişimindeki artışın glikoz tüketim hızını düşürdüğü görülmüştür.

Şekil 4.9.'da virüs kültürü süresince glutamin tüketim hızı grafikleri verilmiştir. Merkez noktası deneylerine ait ortalama glutamin tüketim hızı $0,043 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Merkez noktalarıyla aynı derişime sahip F ($5,00 \text{ mM}$ glikoz) ve K ($40,00 \text{ mM}$ glikoz) deneylerinde glutamin tüketim hızları sırasıyla $0,041 \text{ sa}^{-1}$ ve $0,05 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. $6,50 \text{ mM}$ glutamin derişiminde glikoz derişimindeki artış glutamin tüketim hızını arttırmıştır. $12,00 \text{ mM}$ glutamin derişimlerine sahip, C ($22,50 \text{ mM}$ glikoz), M ($40,00 \text{ mM}$ glikoz) ve L ($5,00 \text{ mM}$ glikoz) deneylerinde glutamin tüketim hızları sırasıyla $0,029 \text{ sa}^{-1}$, $0,037 \text{ sa}^{-1}$ ve $0,039 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. En yüksek hız değeri ise $5,00 \text{ mM}$ glikoz ve $1,00 \text{ mM}$ glutamin içeren H deneyinde görülmüştür ($0,211 \text{ sa}^{-1}$). Aynı glutamin derişimine sahip N ($22,50 \text{ mM}$ glikoz) deneyinde $0,132 \text{ sa}^{-1}$ ve E ($40,00 \text{ mM}$ glikoz) deneyinde $0,118 \text{ sa}^{-1}$ hız değerleri elde edilmiştir. Düşük

glutamin miktarlarında glikoz derişimindeki artışın glutamin tüketim hızını düşürdüğü görülmüştür.



Şekil 4.8. Virüs kültürü zamanına karşı glikoz tüketim hızı. (a) I. grup deneylere ait glikoz tüketim hızları (b) II. grup deneylere ait glikoz tüketim hızları



Şekil 4.9. Virüs kültürü zamanına karşı glutamin tüketim hızı. (a) I. grup deneylere ait glutamin tüketim hızları (b) II. grup deneylere ait glutamin tüketim hızları

4.2.3. Virüs kültürü biyokinetik parametreleri ve sonuçları

Virüs kültürleri süresince biyokinetik parametreler kültür zamanıyla sürekli olarak değişmektedirler. Yapılan deneylerde de bu görülmüştür. Hücre derişim azalış hızı gibi birinci dereceden kinetik ifadelerle açıklanabilen durumların yanında çoğunlukla lineer olmayan durumlar söz konusudur. Virüs kültürü zamanına karşı çizilen özgül substrat tüketim ve görünür metabolit oluşum grafiklerinde bu durum açık bir şekilde tespit edilmiştir. Verilen grafiklerde bu durumlar görülmektedir.

Çizelge 4.7.'de virüs kültürleri sonucunda hesaplanan biyokinetik parametreler verilmiştir.

Çizelge 4.7. Virüs kültürü deneylerine ait biyokinetik veriler

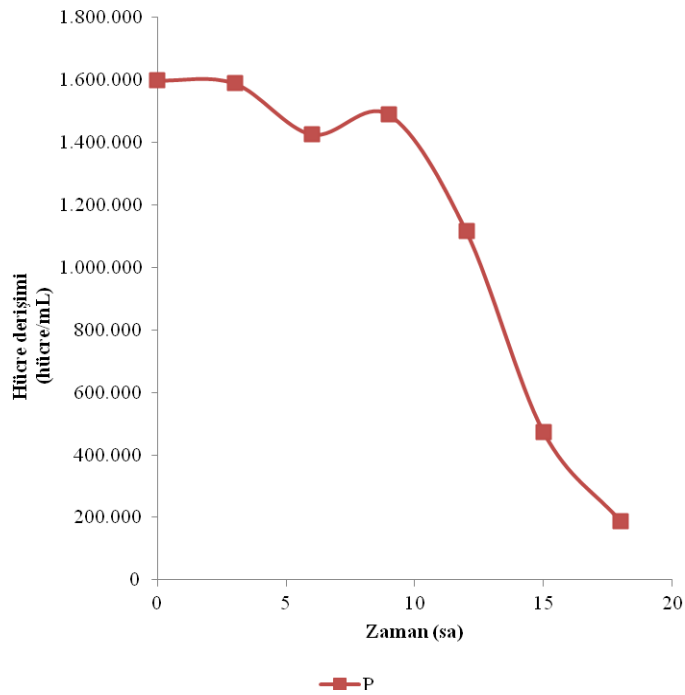
Deney adı	Glikoz derişimi (mM)	Glutamind erişimi (mM)	Hücre azalış hızı (sa ⁻¹)	*	*	*	**
				qGli	q _{gör} Lak	q _{gör} Glu	Y _{Lak/Gli}
A	22,50	6,50	0,121	0,414±0,08	0,701±0,17	0,156±0,07	1,663±0,46
B	22,50	6,50	0,142	0,333±0,11	0,541±0,06	0,176±0,08	1,828±0,62
D	22,50	6,50	0,149	0,298±0,07	0,445±0,04	0,183±0,09	1,576±0,31
G	22,50	6,50	0,212	0,359±0,09	0,445±0,14	0,180±0,11	1,411±0,54
P	22,50	6,50	0,236	0,420±0,11	0,565±0,20	0,200±0,10	1,513±0,67
Merkez noktası ortalama			0,172	0,364±0,05	0,539±0,10	0,179±0,01	1,598±0,15
C	22,50	12,00	0,186	0,394±0,08	0,595±0,13	0,274±0,15	1,606±0,60
E	40,00	1,00	0,190	0,388±0,16	0,577±0,04	0,056±0,01	1,805±0,47
F	5,00	6,50	0,116	0,299±0,08	0,587±0,22	0,187±0,08	1,636±0,58
H	5,00	1,00	0,153	0,249±0,05	0,404±0,12	0,033±0,02	1,593±0,22
K	40,00	6,50	0,254	0,392±0,07	0,604±0,10	0,152±0,05	1,865±0,45
L	5,00	12,00	0,124	0,232±0,06	0,411±0,11	0,242±0,11	1,881±0,62
M	40,00	12,00	0,170	0,385±0,16	0,452±0,08	0,306±0,16	1,368±0,46
N	22,50	1,00	0,235	0,416±0,06	0,598±0,10	0,036±0,02	1,499±0,40
Ortalama			0,177	0,346±0,07	0,529±0,08	0,163±0,10	1,650±0,17

* $\mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa

** mol/mol

Bu çalışmada hücre derişimi azalış hızı 0,177 sa⁻¹ olarak hesaplanmıştır. Hücre derişimi azalış hızı en yüksek K deneyinde (0,254 sa⁻¹) en düşük ise F deneyinde (0,116 sa⁻¹) görülmüştür. Hücre derişiminde ilk dokuz saatlik süre içinde artmalar ve azalmalar görülmektedir. Hücrenin ve virüsün ortama adapte olma süreci olarak kabul edilen bu süreler hücre derişimi azalış hızı hesaplanırken kullanılmamıştır. Rueckert (1996) hücre kültürlerinde şap virüsü enfeksiyonundan 4-6 saat sonra yeni virionlar

oluşmaya başladığını ve enfekte hücrelerde morfolojik değişikliklerin görüldüğünü bildirmiştir. Virüsün hücreyi enfekte etmeye başladığı süreden itibaren hücre derişiminde lineer bir azalma görülmektedir. Şekil 4.10'da merkez noktası deneylerinden olan P deneyine ait hücre derişimi azalış grafiğı görülmektedir.



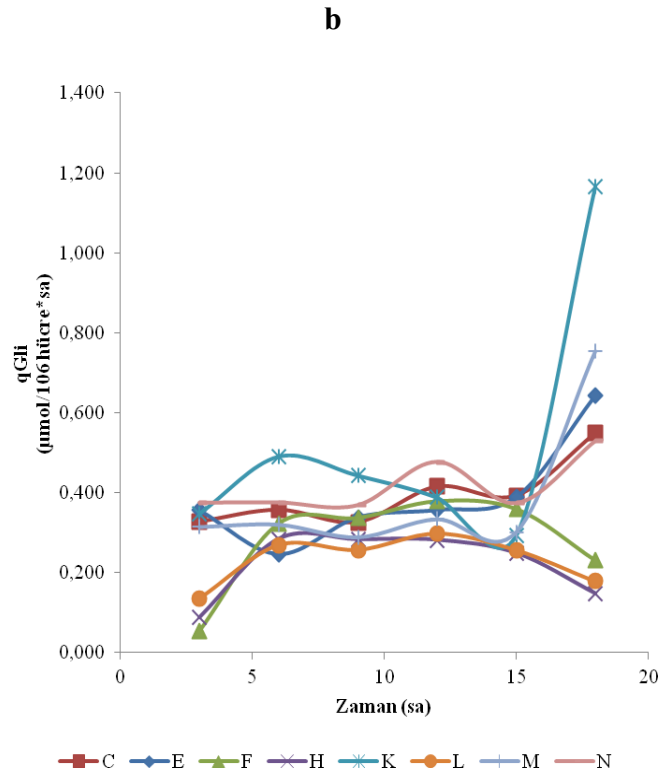
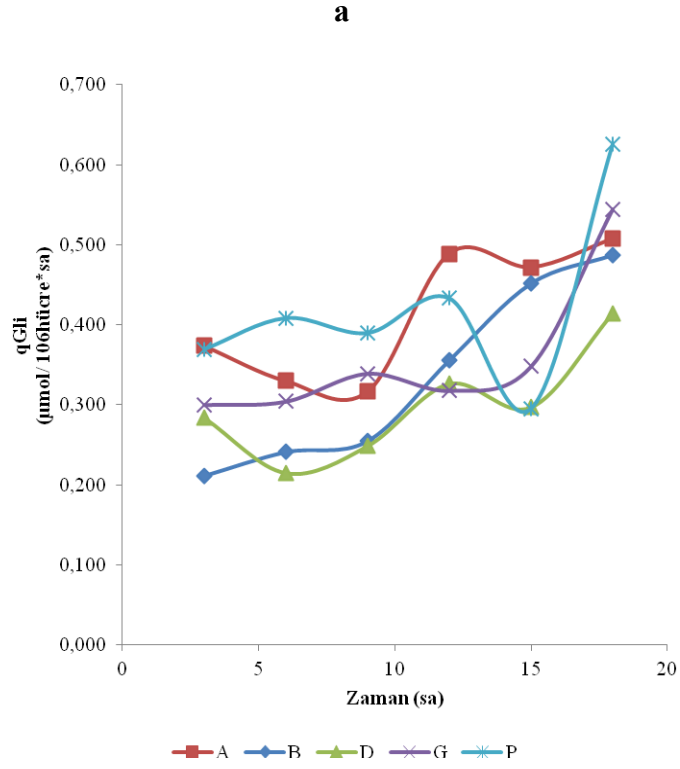
Şekil 4.10. Virüs kültürü zamanına karşı hücre derişimi değışimi.

Yaptığımız virüs kültürü deneylerinde özgül glikoz tüketim hızı (qGli) 0,346 $\mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulunmuştur. Merkez noktasına ait deneylerde ise özgül glikoz tüketim hızı 0,364 $\mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak elde edilmiştir. Merkez noktasıyla aynı glikoz derişimine sahip (22,50 mM) olan N deneyinde en yüksek özgül glikoz tüketim hızı saptanmıştır (0,416 $\mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa). En düşük qGli değıerleri F, H ve L deneylerinde görülmüştür. 5,00 mM glikoz içeren bu deneylerde uç noktalarda glutamin (1,00 mM ve 12,00 mM) derişimlerinin özgül glikoz tüketim hızını düşürdüğü görülmüştür. Sınır glikoz derişimlerinde (5,00 mM ve 40,00 mM) glutamin derişiminin en yüksek seviyede tutulması diğer glutamin derişimlerine göre glikoz tüketim hızını düşürmüştür.

Bulunan özgül glikoz tüketim hızı, aynı hücre hattında Ergin (2010) tarafından bildirilen değere ile ($0,342 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa) hemen hemen aynı, Özyiğit (2012) tarafından bildirilen $0,181 \pm 0,047 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa değerinin ise yaklaşık iki katı bulunmuştur. Neermann and Wagner (1996) özgül glikoz tüketim hızını $0,78 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa, Cruze et al (1999) ise düşük glikoz derişimlerinde bu değeri $0,102 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bildirmişlerdir. Cruze et al., (1999), aynı hücre hattına ait glutamin derişiminin $1,00 \text{ mM}$ 'da sabit tutulduğu çalışmalarında düşük glikoz derişimlerinde özgül glikoz tüketim hızında hızlı bir artış olduğunu, glikoz derişimindeki yükselmeye rağmen glikoz tüketim hızının sabit bir değer eğiliminde olduğunu belirtmişlerdir.

Yapılan bu çalışmada ise özgül glikoz tüketim hızlarının glutamin derişimine bağlı olarak değiştiği, düşük ve yüksek glikoz derişimlerinde glutamin derişimiyle hızın arttığı, yüksek glutamin derişiminde ise hızın birden düştüğü görülmüştür.

Ozturk et al. (1992) başlangıç amonyum ve laktat içeren besiyerlerinde yaptıkları hücre kültürü çalışmalarında hücre üremesini baskılayan koşulların olduğu durumlarda substart tüketim ve metabolit oluşum hızlarında artışların olduğunu, metabolik aktivitenin yüksek olduğunu bildirmişlerdir. Benzer durum yaptığımız virüs kültürü çalışmasında da görülmüştür.

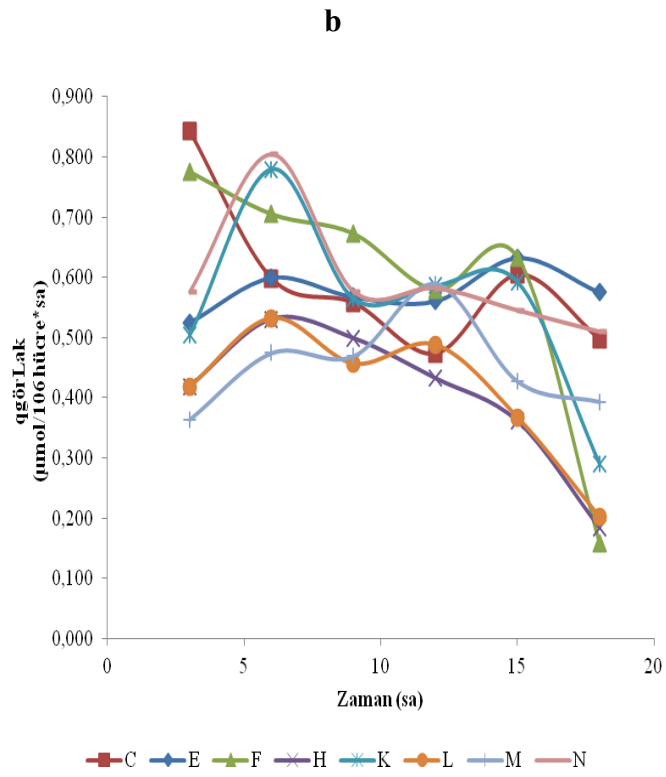
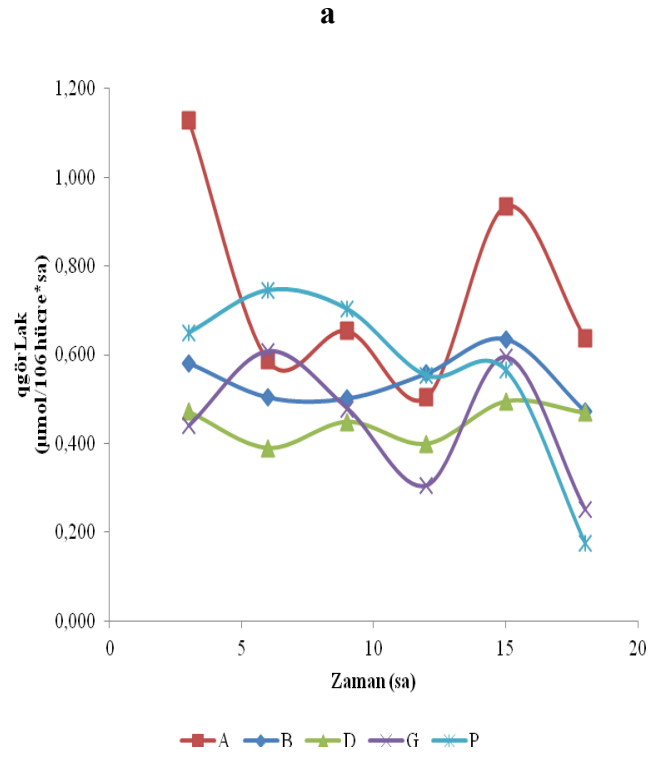


Şekil 4.11. Virüs kültürü zamanına karşı (a) I. Grup (b) II. grup deneylere ait özgül glikoz tüketim hızı grafikleri

Şekil 4.11’de özgül glikoz tüketim hızı grafikleri gösterilmektedir. Yüksek glikoz derişimi kullanılan deneylerde virüs kültürü sonuna doğru özgül glikoz tüketim hızında belirgin bir artma, düşük glikoz derişimlerinde ise kültür sonuna doğru özgül glikoz tüketim hızında belirgin bir azalma görülmektedir. Ayrıca düşük glikoz derişimlerinde virüs kültürünün ilk saatlerinde q_{Gli} değerinin hızlı bir şekilde arttığı görülmektedir.

Yapılan bu çalışmada görünür laktat oluşum hızı ($q_{g\ddot{o}rLak}$) $0,529 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulunmuştur. Merkez noktalarına ait görünür laktat oluşum hızı $0,539 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulunmuştur. En yüksek görünür laktat oluşum hızı $40,00 \text{ mM}$ glikoz $6,50 \text{ mM}$ glutamin içeren K deneyinde görülmüştür ($0,604 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa). En düşük görünür laktat oluşum hızı ise $5,00 \text{ mM}$ glikoz içeren H ($1,00 \text{ mM}$ glutamin) ve L ($12,00 \text{ mM}$ glutamin) deneylerinde görülmüştür ($0,404$ ve $0,411 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa).

Bulunan $q_{g\ddot{o}rLak}$ değeri Ergin (2010) tarafından bildirilen $0,508 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa değerine yakın, Özyiğit (2012) tarafından bildirilen $0,262\pm 0,083 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa değerinin ise yaklaşık iki katıdır. Neermann and Wagner (1996) bu değeri $1,14 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bildirmiştir.



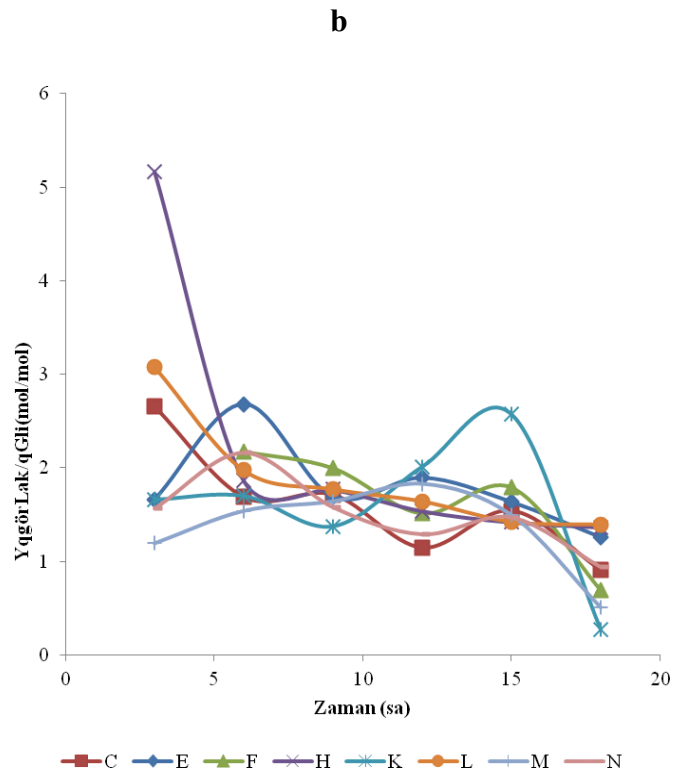
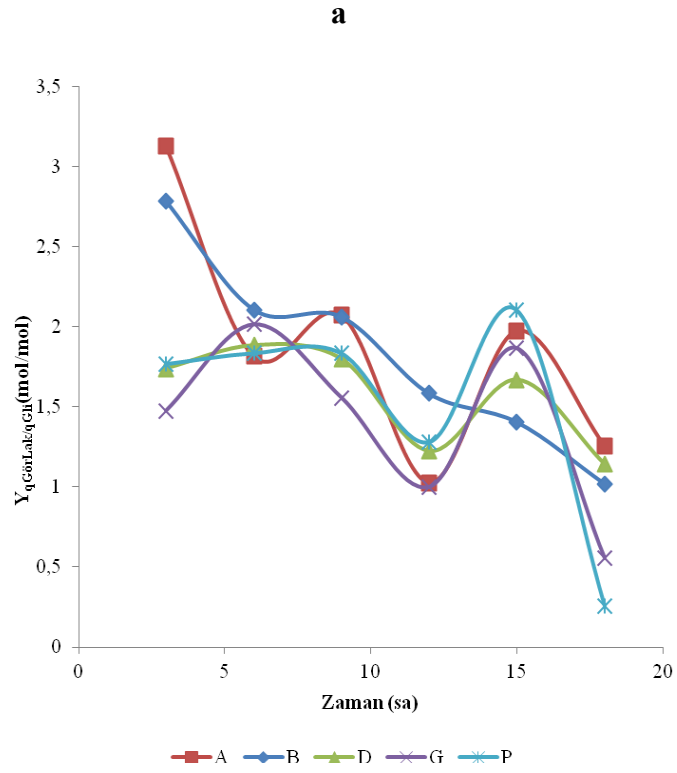
Şekil 4.12. Virüs kültürü zamanına karşı (a) I. Grup (b) II. grup deneylere ait görünür laktat oluşum hızı grafikleri

Şekil 4.12.'de kültür boyunca sabit olmayan görünür laktat oluşum grafikleri gösterilmektedir.

Bu çalışmada $Y_{Lak/Gli}$ verim faktörü 1,650 mol/mol olarak bulunmuştur. Merkez noktasında $Y_{Lak/Gli}$ 1,598 mol/mol olarak bulunmuştur. En yüksek değer 1,881 mol/mol ile L deneyinde, en düşük değer ise 1,368 mol/mol ile M deneyinde elde edilmiştir. Bu iki değer arasındaki fark %27,27'dir. L deneyi ile aynı glikoz derişimine sahip (5,00 mm) F (6,50 mM glutamin) ve H (1,00 mM glutamin) deneylerinde $Y_{Lak/Gli}$ değerleri sırasıyla 1,636 mol/mol ve 1,593 mol/mol olarak bulunmuştur. Glikoz derişimleri aynı olan bu deneylerde tüketilen glikozdan oluşan laktat miktarının glutamin derişiminin artmasıyla arttığı görülmüştür. Aynı sonuç 22,50 mM glikoz içeren deneylerde de görülmüştür.

Linz et al. (1997) $Y_{Lak/Gli}$ değerini 1,60 mol/mol, Cruze et al. (1999) yüksek glikoz derişimlerinde 1,50 mol/mol olarak bildirmişlerdir. Çalışma sonucunda 1,65 mol/mol olarak bulunan verim faktörü bu değerler ile uyumludur.

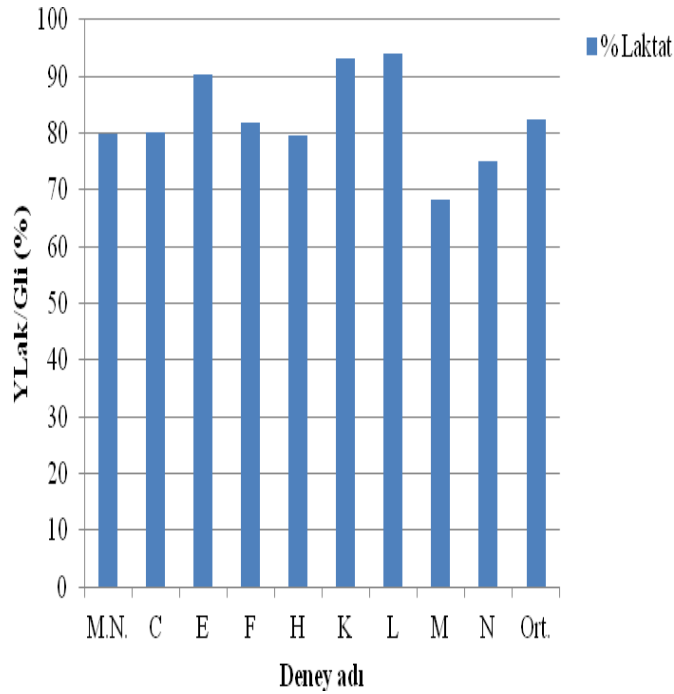
Rietzer et al., (1979) ve Zielke et al., (1980) oluşan laktatın çoğunun glikozdan geldiğini aynı zamanda glutamin metabolizması sonucunda da bir miktar laktatın oluştuğunu bildirmişlerdir.



Şekil 4.13. Virüs kültürü zamanına karşı değişen (a) I. grup (b) II. grup deneylere ait $Y_{Lak/Gli}$ verim faktörü.

Şekil 4.14.'de deneyler bazında dağılımı gösterilen tüketilen glikoz başına oluşan laktat miktarının yüksek değerlere sahip olduğu görülmektedir. Ortalama %82,50 olarak bulunan bu değer tüketilen glikozun %82,50'sinin laktata dönüştürüldüğünü göstermektedir. Bu durum glikozun verimsiz bir şekilde kullanıldığının göstermektedir. Literatürde glikozun %4-5'nin TCA döngüsüne katıldığı ve %80'nin laktata dönüştürüldüğü, glutaminin ise %35'nin CO₂'de oksitlendiği ve %13'nün laktata dönüştürüldüğü bildirilmiştir (Rietzer et al., 1979).

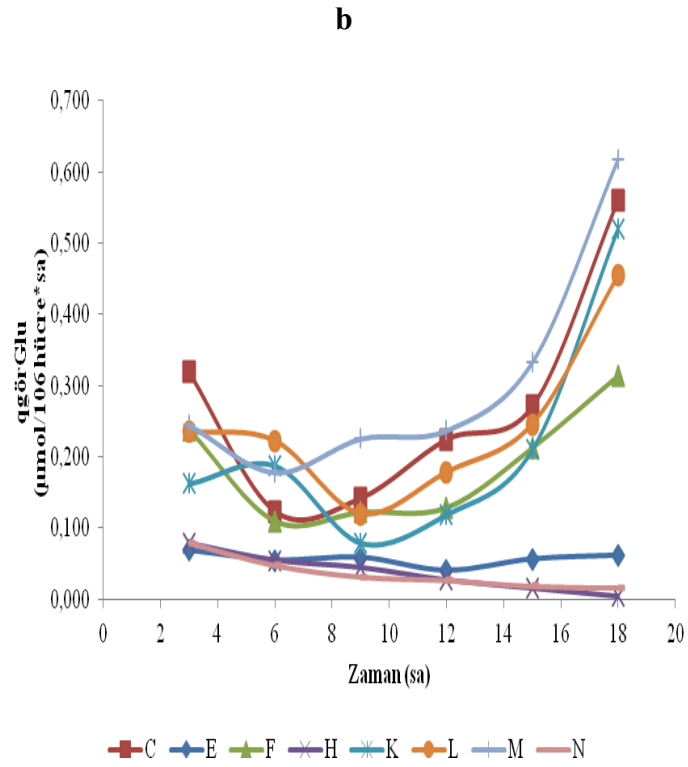
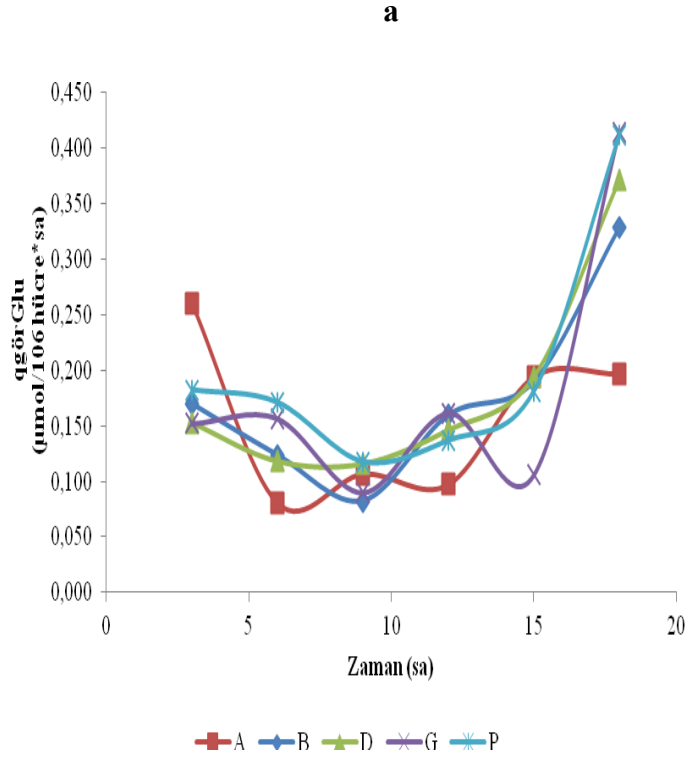
En yüksek değer %94,05 ile L deneyinde (5,00 mM glikoz, 12,00 mM glutamin) görülmüştür. E (5,00 mM glikoz, 6,50 mM glutamin) ve K (40,00 mM glikoz, 6,50 mM glutamin) deneylerinde de tüketilen glikozun % 90'ından fazlası laktata dönüştürülmüştür. Sınır glikoz derişimi (40,00 mM) deneyi hariç artan glikoz derişimlerinde glutamin derişiminin arttırılmasıyla tüketilen glikozdan oluşan laktat artmıştır. Deneylerde glikoz en verimli şekilde 40,00 mM glikoz ve 12,00 mM glutamin içeren M deneyinde kullanılmıştır (%68,40).



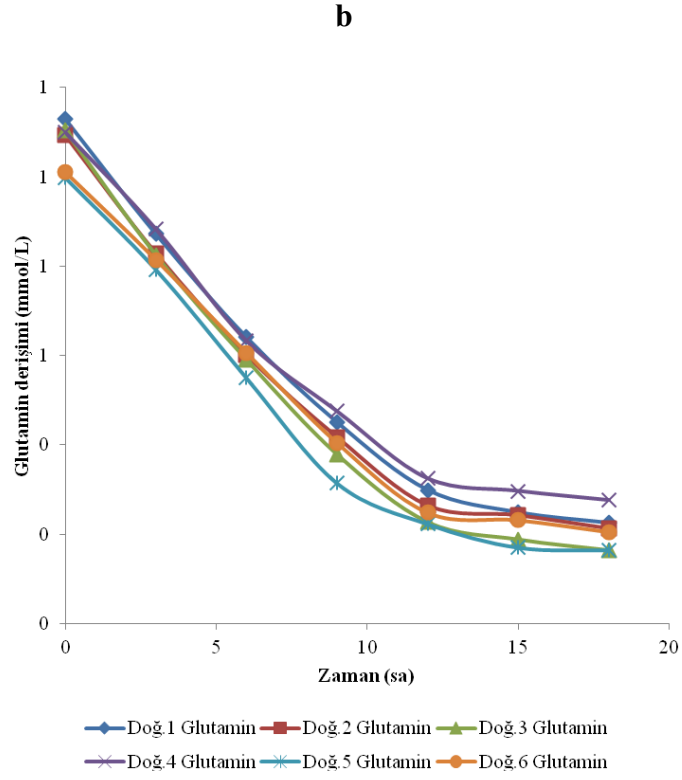
Şekil 4.14. Deneyler bazında $Y_{Lak/Gli}$ verim faktörünün % dağılımı

Görünür glutamin tüketim hızı ($q_{\text{görGlu}}$) $0,163 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulunmuştur. Bu değer aynı hücre hattında Özyiğit (2012) tarafından bildirilen hücre görünür glutamin tüketim hızının ($0,0555 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa) 2,94 katıdır. Trisch ve Moore (1962), Ozturk et al. (1989), Godia ve Cairo (2006) glutaminin karbon ve enerji kaynağı olarak kullanılmasının yanında doğrudan protein sentezinde de kullanıldığını, aminoasit, nükleotid ve lipitlerin oluşumuna katıldığını bildirmişlerdir. Merkez noktası deneylerinde $0,179 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulunan glutamin tüketim hızı en yüksek $12,00 \text{ mM}$ glutamin $40,00 \text{ mM}$ glikoz derişimi içeren M deneyinde görülmüştür ($0,306 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa). Aynı glutamin derişimine sahip L ($5,00 \text{ mM}$ glikoz) ve C ($22,50 \text{ mM}$ glikoz) deneylerinin glutamin tüketim hız değerleri ise sırasıyla $0,242$ ve $0,274 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulunmuştur. Yüksek glutamin derişimlerinde glikoz derişimindeki artış glutamin tüketim hızını da arttırmıştır. En düşük glutamin tüketim hız değerleri ise $1,00 \text{ mM}$ glutamin içeren H deneyinde $0,033 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa N deneyinde ise $0,036 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak hesaplanmıştır. Yine aynı glutamin derişimine sahip glikoz derişimi en yüksek ($40,00 \text{ mM}$) olan E deneyinde hız değeri $0,056 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa bulunmuştur. Düşük ve yüksek glutamin derişimlerinde glutamin tüketim hızı glikoz derişimine bağlı olarak artmıştır. $6,50 \text{ mM}$ glutamin içeren deneylerde ise glikoz derişimindeki artış glutamin tüketim hızını düşürmüştür.

Cruze et al. (1999) çok düşük glikoz derişimlerinde ($0,28 \text{ mM}$) glutamin tüketim hızını $0,390 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulurken glikoz derişiminin yükselmesiyle glutamin tüketim hızında azalma olduğunu belirtmişlerdir.



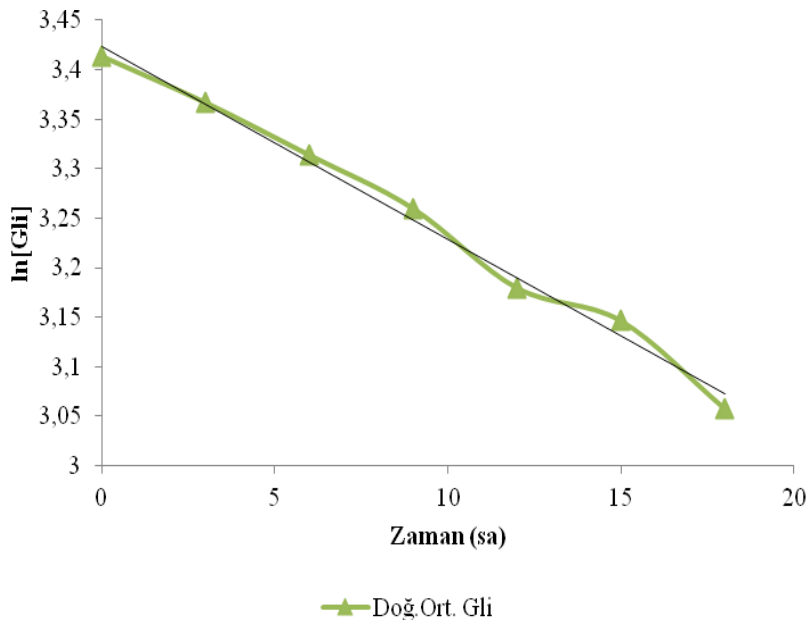
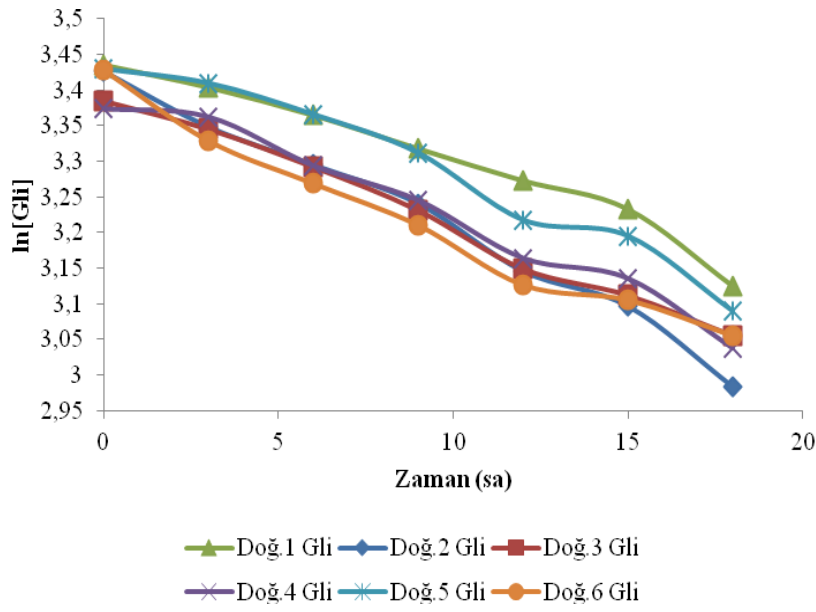
Şekil 4.15. Virüs kültürü zamanına karşı (a) I. Grup (b) II. grup deneylere ait görünür glutamin tüketim hızı grafikleri



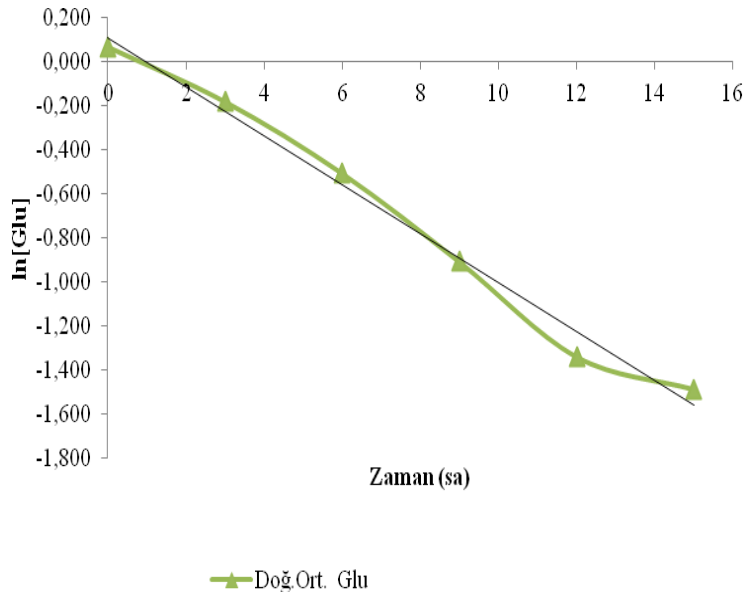
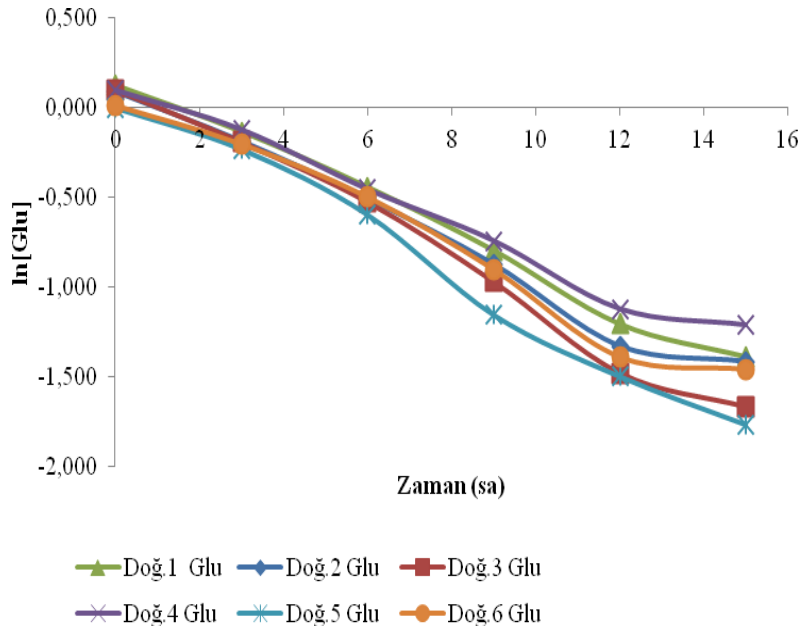
Şekil 4.16. Doğrulama deneylerine ait (a) glikoz ve laktat, (b) glutamin derişimi değişimi grafikleri

Doğrulama deneyleri sonucunda virüs kültürü zamanına karşı çizilen glikoz ve glutamin tüketim hızı grafikleri çizilerek ortalama glikoz ve glutamin tüketim hızları hesaplanmıştır.

Glikoz tüketim hızı $0,019 \text{ sa}^{-1}$, glutamin tüketim hızı $0,111 \text{ sa}^{-1}$ olarak bulunmuştur. Bu değerler bulunan diğer sonuçlarla uyumlu çıkmıştır. Deneylere ait grafikler Şekil 4.17 ve 4.18’de verilmiştir.



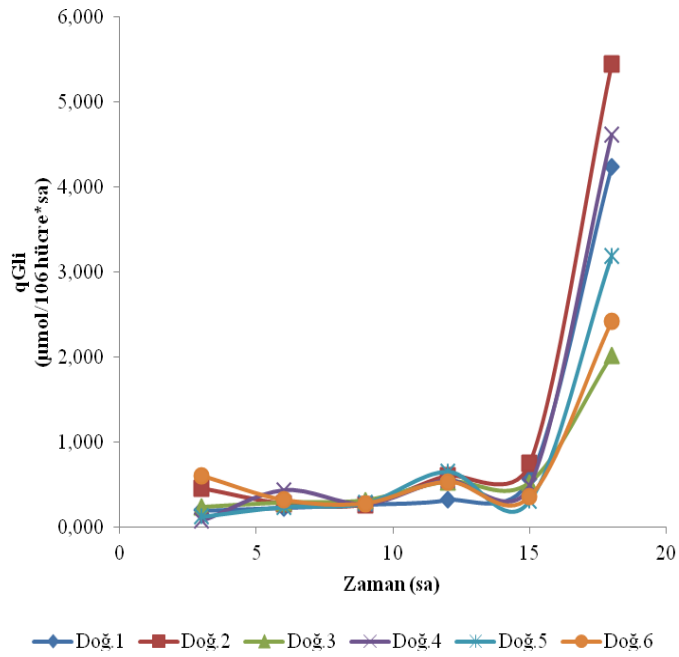
Şekil 4.17. Doğrulama deneylerine ait glikoz tüketim hızları

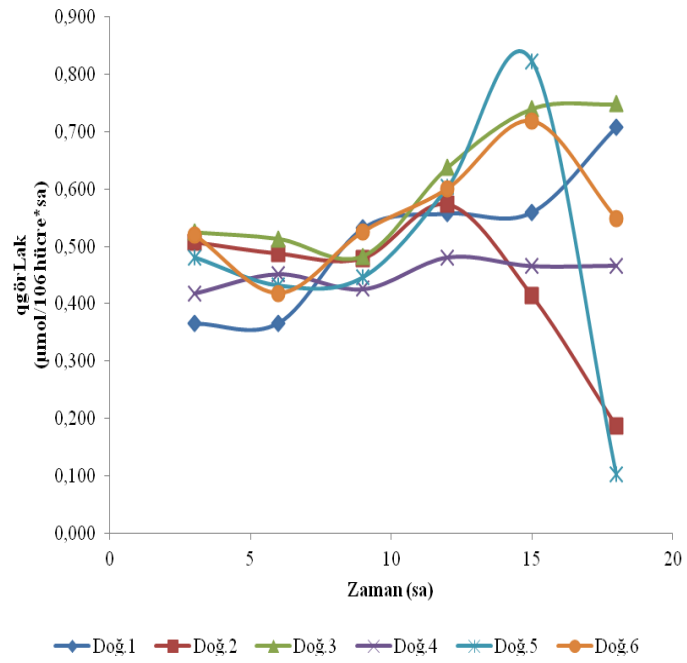
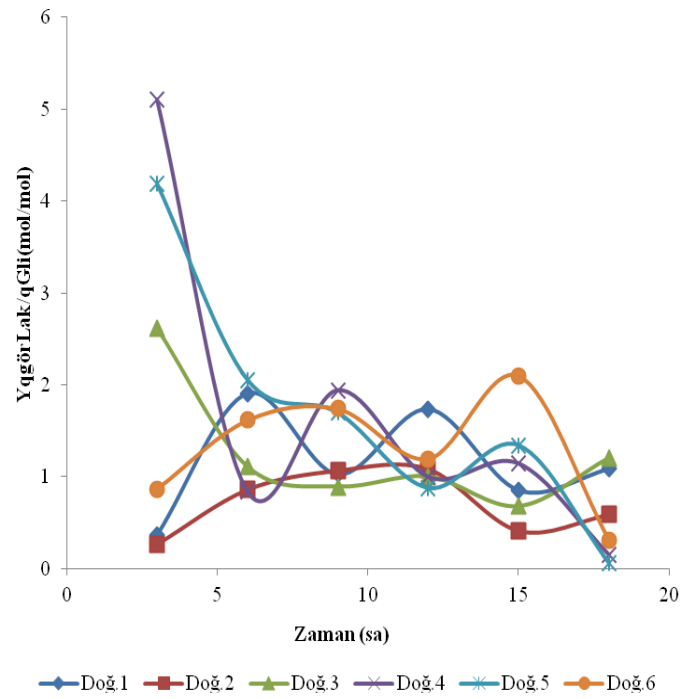


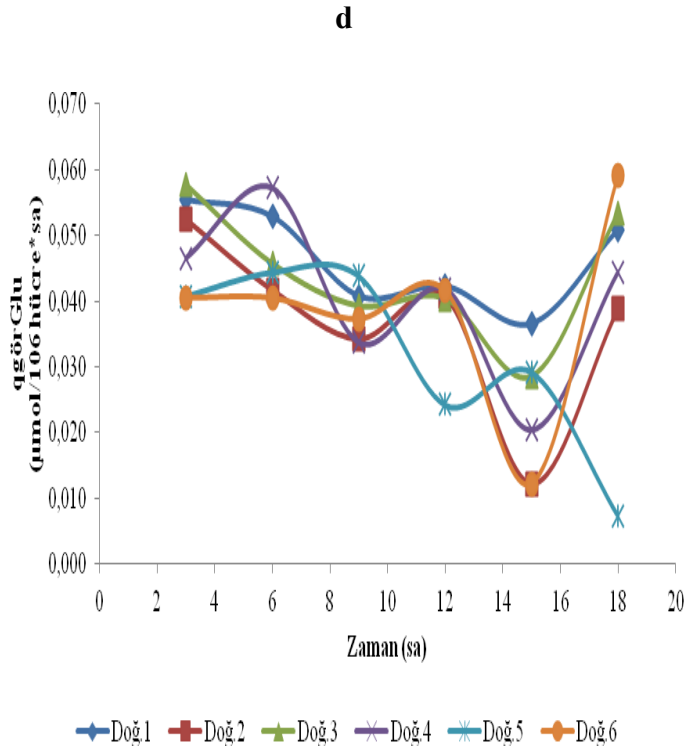
Şekil 4.18. Doğrulama deneylerine ait glutamin tüketim hızları

Doğrulama deneylerinin hücre derişimi azalış hızı $0,320 \text{ sa}^{-1}$ bulunmuştur. Bu diğer deneyler sonucunda hesaplanan değerlerden yüksek bulunmuştur. Özgül glikoz tüketim hızı $0,377 \mu\text{mol}/10^6 \text{ hücre}\cdot\text{sa}$, görünür laktat oluşum hızı $0,508 \mu\text{mol}/10^6 \text{ hücre}\cdot\text{sa}$, görünür glutamin tüketim hızı ise $0,039 \mu\text{mol}/10^6 \text{ hücre}\cdot\text{sa}$ olarak bulunmuştur. Bu değerlerin yapılan diğer deney sonuçlarıyla uyumlu olduğu görülmüştür. $Y_{\text{Lak/Gli}}$ değeri $1,452 \text{ mol/mol}$ olarak elde edilmiştir. Tüketilen glükozun % 72,6'sı laktata dönüştürülmüştür. Şekil 4.19. (a)'da özgül glikoz tüketim hızı, (b)'de görünür laktat oluşum hızı, (c)'de $Y_{\text{Lak/Gli}}$, (d)'de görünür glutamin tüketim hızı grafikleri gösterilmektedir.

a



b**c**



Şekil 4.19. Doğrulama deneylerine ait (a) özgül glikoz tüketim hızı, (b) görünür laktat oluşum hızı, (c) $Y_{Lak/Gli}$, (d) görünür glutamin tüketim hızı grafikleri

4.3. Genel Sonuçlar

Şap virüsü kültüründe besiyeri başlangıç glikoz ve glutamin derişimlerinin etkilerinin birlikte incelendiği bir çalışma tespit edilememiştir. Virüs kültürlerinde glikoz ve glutamin derişimlerinin eşzamanlı olarak değiştirilerek 146S ve Enfektif titre (ET) süreç değişkenlerinin tahmin edilmesine yönelik modelleme ve optimizasyon çalışmaları bulunmamaktadır. Bu çalışmada Design-Expert[®] 7.0.0 cevap yüzey metodu merkezi kompozit tasarımı kullanılmıştır. Besiyeri başlangıç glikoz ve glutamin derişimleri eşzamanlı olarak değiştirilerek 146S ve Enfektif titre (ET) modelleri oluşturulmuş, bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkileri incelenmiştir. Model optimizasyonu yapılarak optimum proses koşulları tespit edilmiş ve doğrulama deneyleri yapılmıştır. Çalışma sonunda elde edilen önemli bulgular aşağıda özetlenmiştir.

Design-Expert® 7.0.0 programı 146S partikül miktarı, enfektif titre (ET) değeri için kuadratik model önermiştir. Önerilen modellere ait sonuçlar ANOVA testi yapılarak istatistiksel açıdan değerlendirilmiştir. Önerilen modeller düşük p değerine (<0,0001) sahip olup istatistiksel olarak önemli bulunmuşlardır.

146S partikül miktarı için oluşturulan modelin regresyon katsayısı (R^2) 0,6928 olarak bulunmuştur. Bu değer değişkenler ile deneysel sonuçların %69,28'nin önerilen model ile açıklanabileceğini ifade etmektedir. 146S üzerine bağımsız değişkenlerden glikoz ve glutamin derişimlerinin etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Enfektif titre (ET) için oluşturulan modelin regresyon katsayısı (R^2) 0,5951 olarak bulunmuştur. Bu değer değişkenler ile deneysel sonuçların %59,51'nin önerilen model ile açıklanabileceğini ifade etmektedir. ET üzerine bağımsız değişkenlerden glikoz ve glutamin derişimlerinin etkileri istatistiksel olarak önemli bulunmuştur.

Model sonuçlarına göre yüksek 146S ve ET değerleri elde edebilmek için besiyeri formülasyonlarında yüksek glikoz ve düşük glutamin derişimlerinin tercih edilmesi gerektiği görülmüştür.

Kurulan modellerle bağımsız değişkenlerin bağımlı değişkenler üzerine etkileri incelenmiş ve optimum proses koşullarının tespit edilebilmesi için model optimizasyonu yapılmıştır. Optimizasyonda 146S ve ET değerleri maksimize edilmiştir. Optimizasyonda 31,15 mM glikoz ve 1,00 mM glutamin derişimleri önerilmiştir.

Elde edilen sonuçların güvenilirliğinin tespiti amacıyla çözümlenme sonucunda ulaşılan optimum değerlerin doğrulama (validasyon) deneyleri yapılmıştır. Doğrulama deneyleri sonucunda tahmin edilen ve ölçülen değerler arasındaki hata yüzdeleri 146S için % 1,65, ET için % 1,22 olarak bulunmuştur.

Modelin O tipi şap virüsü kültürlerinde 146S ve ET optimizasyonu için dizayn alanında güvenle kullanılabilir özellikte olduğu sonucu elde edilmiştir.

Virüs kültürü besiyeri başlangıç glikoz ve glutamin derişimlerinin substrat tüketim hızı üzerinde etkili olduğu görülmüştür. Sınır glikoz derişimlerinde glutamin derişimindeki artışın glikoz tüketim hızını düşürdüğü, düşük glutamin miktarlarında ise glikoz miktarındaki artışın glutamin tüketim hızını düşürdüğü görülmüştür.

Virüs kültürü besiyeri başlangıç glikoz ve glutamin derişimlerinin O tipi şap virüsü kültürü biyokinetikleri üzerinde etkili olduğu görülmüştür. O tipi şap virüsü kültüründe hücre derişimi azalış hızı $0,223 \text{ sa}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

O tipi şap virüsü kültüründe özgül glikoz tüketim hızı $0,346 \pm 0,07 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak hesaplanmıştır.

O tipi şap virüsü kültüründe görünür özgül laktat oluşum hızı $0,529 \pm 0,08 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak bulunmuştur.

O tipi şap virüsü kültüründe özgül glutamin tüketim hızı $0,163 \pm 0,10 \mu\text{mol}/10^6$ hücre.sa olarak tespit edilmiştir.

O tipi şap virüsü kültüründe $Y_{\text{Lak/Gli}}$ $1,650 \pm 0,17 \text{ mol/mol}$ olarak hesaplanmıştır. Glikoz başına oluşan laktat miktarının yüksek değerlere sahip olduğu ve tüketilen glikozun ortalama %82,50'sinin laktata dönüştürüldüğü tespit edilmiştir.

Önerilen modelin sonuçlarına göre verimli O tipi şap virüsü kültürleri için besiyerinde başlangıç glikoz derişiminin yüksek, glutamin derişiminin ise düşük tutulması gerektiği sonucuna varılmıştır.

Bu çalışmada, virüs kültüründe bulunan özgül glikoz tüketim hızı, görünür laktat oluşum hızı ve görünür glutamin tüketim hızı değerlerinin Özyiğit (2012) tarafından hücre kültürü çalışmalarında bulunan değerlerin iki katı olduğu görülmüştür.

Bu yüksek lisans tezi sonucunda pH ve Çözünmüş oksijen kontrolü yapılan biyoreaktörlerde daha sonra yapılacak olan optimizasyon çalışmaları için veriler üretilmiştir.

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
A1	0	1.600.000	23,766 ± 0,384	0,127 ± 0,005	6,500 ± 0,075
	3	1.410.000	22,453 ± 0,202	4,979 ± 0,152	5,233 ± 0,062
	6	1.750.000	20,862 ± 0,315	7,509 ± 0,233	4,887 ± 0,017
	9	1.340.000	19,339 ± 0,309	10,677 ± 0,340	4,377 ± 0,025
	12	1.130.000	17,352 ± 0,215	12,866 ± 0,322	3,827 ± 0,005
	15	1.140.000	15,642 ± 0,173	16,054 ± 0,256	3,207 ± 0,069
	18	910.000	14,043 ± 0,078	17,514 ± 0,183	2,803 ± 0,009
	21	700.000	13,003 ± 0,138	18,833 ± 0,256	2,030 ± 0,008
	25	270.000	12,027 ± 0,146	20,489 ± 0,359	0,975 ± 0,009
A2	0	1.600.000	23,910 ± 0,194	0,126 ± 0,005	6,597 ± 0,019
	3	1.270.000	22,356 ± 0,120	5,372 ± 0,043	5,460 ± 0,037
	6	1.580.000	20,704 ± 0,078	8,072 ± 0,033	5,093 ± 0,005
	9	1.770.000	19,317 ± 0,088	11,089 ± 0,161	4,587 ± 0,042
	12	1.400.000	17,152 ± 0,078	12,986 ± 0,106	4,103 ± 0,025
	15	1.060.000	15,561 ± 0,105	15,905 ± 0,106	3,540 ± 0,014
	18	800.000	14,321 ± 0,000	17,626 ± 0,000	3,060 ± 0,008
	21	180.000	13,562 ± 0,069	19,086 ± 0,092	2,587 ± 0,012
	24	130.000	12,896 ± 0,052	19,572 ± 0,106	2,223 ± 0,005
A3	0	1.600.000	23,757 ± 0,163	0,116 ± 0,005	6,600 ± 0,042
	3	1.580.000	21,523 ± 0,422	5,310 ± 0,179	5,473 ± 0,005
	6	1.500.000	20,288 ± 0,231	8,058 ± 0,220	5,090 ± 0,085
	9	1.550.000	18,706 ± 0,163	11,159 ± 0,181	4,590 ± 0,028
	12	1.150.000	16,782 ± 0,138	13,285 ± 0,140	4,423 ± 0,017
	15	870.000	15,320 ± 0,045	16,541 ± 0,053	3,673 ± 0,017
	18	500.000	14,173 ± 0,026	18,225 ± 0,053	3,083 ± 0,025
	21	270.000	13,673 ± 0,094	19,535 ± 0,159	2,647 ± 0,005
	24	120.000	13,174 ± 0,069	19,797 ± 0,053	2,447 ± 0,005
B1	0	1.600.000	22,370 ± 0,078	0,120 ± 0,005	6,460 ± 0,045
	3	1.530.000	21,222 ± 0,364	3,035 ± 0,032	5,553 ± 0,039
	6	1.210.000	20,279 ± 0,214	5,411 ± 0,009	5,120 ± 0,036
	9	1.590.000	19,206 ± 0,163	7,421 ± 0,367	4,760 ± 0,024
	12	1.200.000	17,670 ± 0,026	9,569 ± 0,348	4,197 ± 0,005
	15	750.000	16,412 ± 0,105	11,444 ± 0,341	3,673 ± 0,029
	18	450.000	15,394 ± 0,069	12,237 ± 0,092	3,147 ± 0,005
21	120.000	15,080 ± 0,069	12,948 ± 0,053	2,623 ± 0,005	

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
B2	0	1.600.000	22,370 ± 0,163	0,120 ± 0,005	6,403 ± 0,077
	3	1.520.000	21,333 ± 0,094	2,971 ± 0,005	5,643 ± 0,033
	6	1.350.000	20,349 ± 0,376	5,039 ± 0,201	5,207 ± 0,017
	9	1.410.000	19,017 ± 0,393	7,178 ± 0,190	4,803 ± 0,026
	12	1.000.000	17,836 ± 0,146	9,532 ± 0,087	4,340 ± 0,014
	15	810.000	16,541 ± 0,208	11,339 ± 0,000	3,690 ± 0,000
	18	380.000	15,616 ± 0,026	12,050 ± 0,191	3,133 ± 0,005
	21	110.000	15,283 ± 0,026	12,649 ± 0,053	2,593 ± 0,005
B3	0	1.600.000	21,953 ± 0,334	0,126 ± 0,005	6,410 ± 0,045
	3	1.320.000	21,218 ± 0,209	2,377 ± 0,082	5,737 ± 0,021
	6	1.230.000	20,205 ± 0,120	4,105 ± 0,166	5,110 ± 0,022
	9	1.210.000	19,520 ± 0,026	5,961 ± 0,246	4,877 ± 0,012
	12	1.000.000	18,280 ± 0,069	7,649 ± 0,283	4,160 ± 0,022
	15	730.000	17,115 ± 0,094	9,206 ± 0,294	3,767 ± 0,037
	18	310.000	16,523 ± 0,026	10,104 ± 0,078	3,170 ± 0,016
	21	110.000	16,227 ± 0,069	10,381 ± 0,041	2,513 ± 0,021
C1	0	1.600.000	24,627 ± 0,204	0,123 ± 0,000	11,733 ± 0,125
	3	1.000.000	23,128 ± 0,114	3,566 ± 0,011	10,333 ± 0,125
	6	1.680.000	21,925 ± 0,078	5,741 ± 0,241	9,755 ± 0,065
	9	1.380.000	20,408 ± 0,069	8,083 ± 0,280	9,067 ± 0,045
	12	1.290.000	18,984 ± 0,045	9,775 ± 0,279	8,060 ± 0,059
	15	780.000	17,762 ± 0,078	11,384 ± 0,270	7,067 ± 0,021
	18	360.000	16,819 ± 0,045	12,125 ± 0,092	6,040 ± 0,059
	21	120.000	16,282 ± 0,069	12,948 ± 0,140	5,097 ± 0,005
C2	0	1.600.000	24,201 ± 0,091	0,120 ± 0,005	11,767 ± 0,047
	3	1.300.000	22,758 ± 0,354	3,342 ± 0,021	10,533 ± 0,047
	6	1.340.000	21,389 ± 0,328	5,569 ± 0,104	10,133 ± 0,047
	9	1.270.000	20,075 ± 0,159	7,896 ± 0,376	9,580 ± 0,085
	12	1.210.000	18,373 ± 0,045	9,674 ± 0,343	8,817 ± 0,009
	15	700.000	17,337 ± 0,069	11,373 ± 0,285	8,047 ± 0,025
	18	230.000	16,560 ± 0,052	12,088 ± 0,053	7,277 ± 0,062
	21	140.000	16,153 ± 0,078	12,275 ± 0,053	6,437 ± 0,054
C3	0	1.600.000	24,520 ± 0,383	0,123 ± 0,000	12,033 ± 0,047
	3	1.300.000	23,369 ± 0,163	4,072 ± 0,053	10,667 ± 0,094
	6	1.340.000	21,685 ± 0,204	6,807 ± 0,101	10,167 ± 0,047
	9	1.700.000	20,260 ± 0,078	9,393 ± 0,394	9,550 ± 0,045
	12	1.100.000	18,447 ± 0,069	11,571 ± 0,389	8,637 ± 0,025

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
	15	740.000	17,281 ± 0,094	13,510 ± 0,231	8,017 ± 0,024
	18	220.000	16,504 ± 0,026	14,296 ± 0,191	7,253 ± 0,046
	21	120.000	15,949 ± 0,052	14,445 ± 0,053	5,623 ± 0,021
D1	0	1.600.000	22,314 ± 0,091	0,123 ± 0,000	6,253 ± 0,076
	3	1.600.000	21,074 ± 0,146	2,287 ± 0,014	5,537 ± 0,054
	6	1.500.000	19,872 ± 0,163	3,997 ± 0,191	4,980 ± 0,045
	9	1.120.000	18,947 ± 0,105	5,681 ± 0,258	4,557 ± 0,045
	12	1.310.000	17,799 ± 0,069	7,234 ± 0,289	4,047 ± 0,040
	15	720.000	16,911 ± 0,114	8,742 ± 0,307	3,507 ± 0,009
	18	400.000	16,208 ± 0,120	9,483 ± 0,255	2,893 ± 0,005
	21	160.000	15,154 ± 0,078	9,749 ± 0,093	2,360 ± 0,022
D2	0	1.600.000	22,240 ± 0,189	0,120 ± 0,005	6,387 ± 0,063
	3	1.800.000	21,019 ± 0,114	2,960 ± 0,019	5,613 ± 0,012
	6	1.600.000	19,816 ± 0,120	5,235 ± 0,259	4,990 ± 0,029
	9	1.390.000	18,577 ± 0,189	7,552 ± 0,164	4,543 ± 0,005
	12	1.470.000	17,170 ± 0,069	9,303 ± 0,363	3,990 ± 0,016
	15	720.000	16,208 ± 0,078	10,965 ± 0,274	3,370 ± 0,022
	18	280.000	15,542 ± 0,045	11,639 ± 0,106	2,813 ± 0,019
	21	100.000	14,913 ± 0,308	11,751 ± 0,140	2,390 ± 0,029
D3	0	1.600.000	22,189 ± 0,284	0,126 ± 0,005	6,393 ± 0,045
	3	1.400.000	20,593 ± 0,471	1,962 ± 0,066	5,687 ± 0,033
	6	1.300.000	19,983 ± 0,240	3,391 ± 0,120	5,233 ± 0,012
	9	1.170.000	19,113 ± 0,159	4,876 ± 0,050	4,717 ± 0,029
	12	1.100.000	17,966 ± 0,052	6,107 ± 0,146	4,140 ± 0,008
	15	750.000	17,115 ± 0,114	7,455 ± 0,167	3,540 ± 0,033
	18	320.000	16,504 ± 0,094	8,285 ± 0,066	2,930 ± 0,024
	21	170.000	16,245 ± 0,026	8,544 ± 0,049	2,197 ± 0,005
E1	0	1.600.000	38,356 ± 0,283	0,153 ± 0,005	1,197 ± 0,005
	3	1.400.000	36,450 ± 0,069	2,215 ± 0,014	0,919 ± 0,039
	6	1.160.000	35,136 ± 0,078	4,105 ± 0,023	0,709 ± 0,004
	9	1.270.000	34,100 ± 0,258	5,980 ± 0,014	0,497 ± 0,000
	12	950.000	33,564 ± 0,172	7,619 ± 0,162	0,347 ± 0,004
	15	630.000	32,620 ± 0,138	9,232 ± 0,181	0,203 ± 0,005
	18	220.000	31,380 ± 0,183	10,149 ± 0,048	0,120 ± 0,006
	21	100.000	30,622 ± 0,812	10,377 ± 0,151	0,094 ± 0,003

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
E2	0	1.600.000	39,318 ± 0,131	0,142 ± 0,005	1,177 ± 0,005
	3	1.200.000	38,485 ± 0,114	2,253 ± 0,019	0,908 ± 0,008
	6	1.210.000	37,782 ± 0,228	4,487 ± 0,050	0,719 ± 0,002
	9	1.110.000	36,487 ± 0,224	6,339 ± 0,220	0,486 ± 0,005
	12	1.080.000	35,062 ± 0,189	8,401 ± 0,087	0,366 ± 0,016
	15	720.000	33,971 ± 0,078	9,861 ± 0,213	0,222 ± 0,000
	18	200.000	33,619 ± 0,266	10,752 ± 0,125	0,140 ± 0,000
	21	120.000	33,397 ± 0,094	11,032 ± 0,026	0,107 ± 0,000
E3	0	1.600.000	38,467 ± 0,091	0,142 ± 0,005	1,180 ± 0,014
	3	1.140.000	36,635 ± 0,480	2,665 ± 0,026	0,852 ± 0,007
	6	1.250.000	35,913 ± 0,136	5,134 ± 0,023	0,646 ± 0,000
	9	1.100.000	34,655 ± 0,172	7,447 ± 0,061	0,466 ± 0,002
	12	980.000	33,175 ± 0,094	9,202 ± 0,283	0,339 ± 0,004
	15	450.000	32,398 ± 0,026	10,654 ± 0,236	0,221 ± 0,001
	18	200.000	31,713 ± 0,214	11,006 ± 0,021	0,164 ± 0,006
	21	100.000	31,158 ± 0,258	11,062 ± 0,074	0,111 ± 0,003
F1	0	1.600.000	6,143 ± 0,052	0,101 ± 0,000	6,423 ± 0,068
	3	1.200.000	5,810 ± 0,026	3,492 ± 0,018	5,553 ± 0,048
	6	1.200.000	4,663 ± 0,061	6,193 ± 0,212	5,120 ± 0,014
	9	1.350.000	3,236 ± 0,068	8,832 ± 0,348	4,707 ± 0,025
	12	1.050.000	1,822 ± 0,037	11,137 ± 0,286	4,243 ± 0,012
	15	920.000	0,614 ± 0,009	12,724 ± 0,231	3,550 ± 0,014
	18	540.000	0,287 ± 0,003	12,948 ± 0,106	3,017 ± 0,026
	21	130.000	0,205 ± 0,000	13,023 ± 0,092	2,463 ± 0,009
F2	0	1.600.000	6,050 ± 0,045	0,090 ± 0,000	6,463 ± 0,056
	3	1.300.000	5,939 ± 0,045	3,151 ± 0,032	5,217 ± 0,005
	6	1.220.000	4,751 ± 0,070	5,565 ± 0,229	4,943 ± 0,012
	9	1.180.000	3,560 ± 0,037	8,023 ± 0,355	4,370 ± 0,029
	12	930.000	2,309 ± 0,043	10,104 ± 0,310	3,927 ± 0,005
	15	970.000	1,295 ± 0,027	12,050 ± 0,191	3,367 ± 0,005
	18	410.000	0,672 ± 0,005	12,424 ± 0,191	2,667 ± 0,031
	21	210.000	0,487 ± 0,009	12,911 ± 0,000	2,260 ± 0,016
F3	0	1.600.000	6,032 ± 0,026	0,101 ± 0,000	6,550 ± 0,029
	3	1.100.000	5,810 ± 0,026	3,398 ± 0,029	5,657 ± 0,025
	6	1.380.000	4,553 ± 0,081	6,096 ± 0,215	5,143 ± 0,087
	9	1.380.000	3,275 ± 0,040	8,764 ± 0,403	4,727 ± 0,017
	12	1.290.000	1,871 ± 0,021	10,523 ± 0,424	4,253 ± 0,009

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
	15	800.000	0,881 ± 0,009	12,649 ± 0,322	3,607 ± 0,021
	18	370.000	0,457 ± 0,003	12,986 ± 0,106	2,980 ± 0,022
	21	130.000	0,296 ± 0,003	13,098 ± 0,053	2,307 ± 0,005
G1	0	1.600.000	21,995 ± 0,246	0,121 ± 0,005	6,087 ± 0,081
	3	1.700.000	20,482 ± 0,120	2,777 ± 0,014	5,457 ± 0,005
	6	1.870.000	18,577 ± 0,146	6,343 ± 0,207	4,257 ± 0,040
	9	1.710.000	16,819 ± 0,198	9,431 ± 0,037	4,197 ± 0,017
	12	1.500.000	14,913 ± 0,094	11,163 ± 0,408	3,263 ± 0,017
	15	690.000	14,228 ± 0,052	12,948 ± 0,347	3,203 ± 0,005
	18	250.000	13,229 ± 0,094	13,173 ± 0,140	2,563 ± 0,009
	21	80.000	12,822 ± 0,120	13,323 ± 0,191	2,247 ± 0,005
G2	0	1.600.000	22,351 ± 0,138	0,123 ± 0,000	6,360 ± 0,037
	3	1.700.000	20,686 ± 0,094	2,063 ± 0,086	5,503 ± 0,038
	6	1.600.000	19,354 ± 0,069	5,351 ± 0,037	4,960 ± 0,065
	9	1.540.000	17,152 ± 0,078	7,238 ± 0,146	4,363 ± 0,012
	12	1.420.000	15,561 ± 0,105	8,615 ± 0,360	3,753 ± 0,005
	15	650.000	14,321 ± 0,000	10,845 ± 0,247	3,260 ± 0,036
	18	200.000	13,562 ± 0,069	11,182 ± 0,138	2,670 ± 0,029
	21	90.000	12,896 ± 0,052	11,601 ± 0,106	1,913 ± 0,005
G3	0	1.600.000	22,166 ± 0,138	0,120 ± 0,005	6,117 ± 0,038
	3	1.650.000	20,908 ± 0,172	2,017 ± 0,093	5,357 ± 0,005
	6	1.650.000	19,483 ± 0,000	4,450 ± 0,005	4,683 ± 0,025
	9	1.620.000	18,391 ± 0,146	6,699 ± 0,076	4,033 ± 0,025
	12	1.600.000	17,429 ± 0,136	7,878 ± 0,055	3,290 ± 0,022
	15	860.000	15,820 ± 0,045	9,797 ± 0,046	2,770 ± 0,000
	18	300.000	15,246 ± 0,114	10,366 ± 0,125	2,203 ± 0,026
	21	100.000	15,006 ± 0,094	10,782 ± 0,087	1,783 ± 0,005
H1	0	1.600.000	5,902 ± 0,026	0,097 ± 0,005	1,057 ± 0,005
	3	1.260.000	5,662 ± 0,157	1,909 ± 0,016	0,715 ± 0,002
	6	1.700.000	4,302 ± 0,080	4,378 ± 0,214	0,445 ± 0,006
	9	1.280.000	2,962 ± 0,005	6,770 ± 0,042	0,261 ± 0,006
	12	1.350.000	1,761 ± 0,023	8,413 ± 0,298	0,121 ± 0,005
	15	930.000	0,847 ± 0,007	10,018 ± 0,101	0,064 ± 0,002
	18	590.000	0,498 ± 0,003	10,100 ± 0,055	0,060 ± 0,003
	21	150.000	0,442 ± 0,003	10,104 ± 0,072	0,050 ± 0,000

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
H2	0	1.600.000	5,884 ± 0,045	0,097 ± 0,005	1,020 ± 0,014
	3	1.270.000	5,464 ± 0,041	1,706 ± 0,009	0,699 ± 0,000
	6	1.750.000	4,352 ± 0,028	3,754 ± 0,185	0,475 ± 0,002
	9	1.430.000	3,236 ± 0,036	5,838 ± 0,239	0,258 ± 0,011
	12	1.600.000	1,996 ± 0,033	7,713 ± 0,225	0,157 ± 0,004
	15	900.000	0,971 ± 0,016	9,157 ± 0,239	0,074 ± 0,002
	18	620.000	0,498 ± 0,003	9,891 ± 0,057	0,047 ± 0,003
	21	140.000	0,392 ± 0,003	10,048 ± 0,042	0,040 ± 0,004
H3	0	1.600.000	5,921 ± 0,052	0,101 ± 0,000	1,020 ± 0,008
	3	1.350.000	5,429 ± 0,016	2,141 ± 0,005	0,667 ± 0,001
	6	1.800.000	4,008 ± 0,032	4,899 ± 0,233	0,412 ± 0,000
	9	1.410.000	2,487 ± 0,020	7,421 ± 0,326	0,183 ± 0,007
	12	1.730.000	1,223 ± 0,016	9,621 ± 0,321	0,064 ± 0,004
	15	970.000	0,385 ± 0,005	10,542 ± 0,254	0,022 ± 0,002
	18	650.000	0,181 ± 0,005	11,014 ± 0,084	0,018 ± 0,002
	21	150.000	0,167 ± 0,005	10,942 ± 0,061	0,015 ± 0,003
K1	0	1.600.000	36,154 ± 0,708	0,135 ± 0,000	6,063 ± 0,048
	3	1.600.000	33,601 ± 0,266	2,361 ± 0,005	5,213 ± 0,005
	6	1.300.000	30,696 ± 0,432	5,540 ± 0,249	4,300 ± 0,014
	9	1.740.000	29,178 ± 0,146	8,476 ± 0,060	3,900 ± 0,014
	12	1.220.000	26,903 ± 0,172	10,931 ± 0,098	3,393 ± 0,005
	15	410.000	26,348 ± 0,026	12,518 ± 0,126	2,870 ± 0,000
	18	200.000	25,089 ± 0,120	12,799 ± 0,092	2,333 ± 0,021
	21	90.000	24,465 ± 0,099	13,210 ± 0,053	1,987 ± 0,021
K2	0	1.600.000	38,175 ± 0,327	0,135 ± 0,000	6,037 ± 0,025
	3	1.660.000	36,857 ± 0,045	2,792 ± 0,011	5,253 ± 0,012
	6	1.500.000	35,025 ± 0,120	6,811 ± 0,014	4,367 ± 0,012
	9	1.840.000	32,046 ± 0,172	9,378 ± 0,076	3,993 ± 0,012
	12	1.350.000	31,214 ± 0,052	12,574 ± 0,092	3,483 ± 0,005
	15	490.000	29,900 ± 0,131	13,753 ± 0,097	2,943 ± 0,026
	18	200.000	28,938 ± 0,172	14,296 ± 0,140	2,533 ± 0,005
	21	100.000	27,448 ± 0,139	14,857 ± 0,106	2,263 ± 0,009
K3	0	1.600.000	37,727 ± 0,052	0,135 ± 0,000	6,003 ± 0,005
	3	1.530.000	36,598 ± 0,069	2,504 ± 0,018	5,297 ± 0,005
	6	1.690.000	34,581 ± 0,198	6,167 ± 0,029	4,490 ± 0,016
	9	1.720.000	32,527 ± 0,136	8,907 ± 0,032	4,097 ± 0,017
	12	1.300.000	30,363 ± 0,078	11,339 ± 0,092	3,473 ± 0,005

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
	15	450.000	29,900 ± 0,094	13,173 ± 0,140	2,890 ± 0,016
	18	190.000	28,753 ± 0,208	13,210 ± 0,053	2,333 ± 0,017
	21	100.000	27,347 ± 0,258	13,397 ± 0,191	1,803 ± 0,005
L1	0	1.600.000	6,254 ± 0,026	0,098 ± 0,005	10,900 ± 0,141
	3	1.400.000	5,547 ± 0,005	2,279 ± 0,009	9,448 ± 0,110
	6	1.960.000	4,058 ± 0,016	5,351 ± 0,014	7,953 ± 0,033
	9	1.590.000	2,626 ± 0,040	7,956 ± 0,283	7,642 ± 0,098
	12	1.210.000	1,334 ± 0,015	10,183 ± 0,227	6,843 ± 0,041
	15	1.040.000	0,518 ± 0,009	11,077 ± 0,053	5,947 ± 0,056
	18	400.000	0,290 ± 0,003	11,676 ± 0,092	5,190 ± 0,024
	21	150.000	0,278 ± 0,005	11,713 ± 0,140	4,383 ± 0,031
L2	0	1.600.000	6,198 ± 0,052	0,101 ± 0,000	10,967 ± 0,094
	3	1.470.000	5,643 ± 0,026	1,968 ± 0,019	9,900 ± 0,049
	6	1.800.000	4,415 ± 0,023	4,191 ± 0,035	8,903 ± 0,040
	9	1.430.000	3,260 ± 0,028	6,063 ± 0,294	7,817 ± 0,005
	12	1.320.000	2,157 ± 0,009	7,892 ± 0,084	6,963 ± 0,066
	15	950.000	1,301 ± 0,010	9,236 ± 0,085	6,113 ± 0,090
	18	500.000	0,803 ± 0,007	9,543 ± 0,121	5,170 ± 0,029
	21	120.000	0,627 ± 0,005	9,887 ± 0,095	4,543 ± 0,029
L3	0	1.600.000	6,309 ± 0,026	0,101 ± 0,000	10,967 ± 0,094
	3	1.500.000	5,699 ± 0,026	1,804 ± 0,005	10,100 ± 0,000
	6	1.530.000	4,516 ± 0,029	4,229 ± 0,028	8,750 ± 0,041
	9	1.410.000	3,355 ± 0,065	6,411 ± 0,176	8,327 ± 0,005
	12	900.000	2,259 ± 0,012	8,106 ± 0,024	7,200 ± 0,008
	15	870.000	1,530 ± 0,011	9,281 ± 0,093	6,557 ± 0,009
	18	460.000	1,129 ± 0,019	9,659 ± 0,023	5,500 ± 0,033
	21	130.000	0,990 ± 0,009	10,089 ± 0,011	4,380 ± 0,016
M1	0	1.600.000	37,727 ± 0,308	0,155 ± 0,004	11,167 ± 0,094
	3	1.630.000	35,784 ± 0,273	2,021 ± 0,018	9,943 ± 0,012
	6	1.630.000	33,804 ± 0,045	4,206 ± 0,032	9,167 ± 0,012
	9	1.300.000	32,509 ± 0,204	6,624 ± 0,049	8,323 ± 0,095
	12	1.240.000	31,528 ± 0,091	8,843 ± 0,083	7,183 ± 0,046
	15	600.000	31,029 ± 0,181	9,779 ± 0,037	6,257 ± 0,005
	18	220.000	30,381 ± 0,258	10,052 ± 0,028	5,670 ± 0,024
	20	130.000	29,363 ± 0,120	10,288 ± 0,037	5,063 ± 0,012

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
M2	0	1.600.000	39,688 ± 0,988	0,122 ± 0,004	11,033 ± 0,047
	3	1.350.000	38,411 ± 0,198	1,648 ± 0,009	9,937 ± 0,045
	6	1.530.000	37,204 ± 1,153	3,783 ± 0,073	9,177 ± 0,060
	9	1.350.000	35,836 ± 1,223	5,533 ± 0,117	8,313 ± 0,005
	12	1.150.000	34,304 ± 0,120	7,727 ± 0,095	7,643 ± 0,083
	15	670.000	33,291 ± 0,993	8,858 ± 0,084	6,677 ± 0,029
	18	310.000	31,917 ± 1,117	9,543 ± 0,136	5,627 ± 0,009
	20	140.000	30,955 ± 0,146	9,872 ± 0,029	4,880 ± 0,043
M3	0	1.600.000	39,096 ± 0,146	0,127 ± 0,005	11,533 ± 0,205
	3	1.420.000	37,949 ± 0,026	1,763 ± 0,009	10,467 ± 0,047
	6	1.400.000	36,783 ± 0,159	3,798 ± 0,014	9,617 ± 0,005
	9	1.220.000	35,784 ± 0,183	5,576 ± 0,047	8,493 ± 0,009
	12	1.100.000	34,618 ± 0,069	7,660 ± 0,032	7,677 ± 0,017
	15	720.000	33,656 ± 0,214	9,101 ± 0,065	6,830 ± 0,057
	18	330.000	32,398 ± 0,026	9,876 ± 0,023	5,783 ± 0,005
	20	140.000	31,473 ± 0,120	10,190 ± 0,023	4,570 ± 0,000
N1	0	1.600.000	21,907 ± 0,291	0,112 ± 0,000	1,027 ± 0,005
	3	1.480.000	20,024 ± 0,310	2,518 ± 0,030	0,687 ± 0,005
	6	1.610.000	18,095 ± 0,078	6,351 ± 0,047	0,451 ± 0,003
	9	1.380.000	16,375 ± 0,091	8,974 ± 0,098	0,287 ± 0,009
	12	1.250.000	14,358 ± 0,069	11,339 ± 0,000	0,182 ± 0,006
	15	440.000	13,377 ± 0,000	12,499 ± 0,106	0,145 ± 0,008
	18	180.000	12,933 ± 0,091	12,799 ± 0,092	0,131 ± 0,000
	20	100.000	12,415 ± 0,026	13,023 ± 0,000	0,129 ± 0,004
N2	0	1.600.000	22,166 ± 0,138	0,131 ± 0,005	1,050 ± 0,008
	3	1.520.000	20,723 ± 0,026	2,874 ± 0,024	0,681 ± 0,004
	6	1.750.000	18,854 ± 0,105	6,624 ± 0,040	0,433 ± 0,000
	9	1.580.000	17,226 ± 0,105	9,588 ± 0,033	0,276 ± 0,003
	12	1.200.000	14,895 ± 0,094	11,676 ± 0,092	0,152 ± 0,002
	15	510.000	13,895 ± 0,026	13,173 ± 0,053	0,118 ± 0,002
	18	210.000	13,155 ± 0,240	14,034 ± 0,092	0,106 ± 0,003
	20	100.000	12,619 ± 0,026	14,146 ± 0,400	0,096 ± 0,005
N3	0	1.600.000	22,518 ± 0,214	0,123 ± 0,000	1,007 ± 0,012
	3	1.450.000	20,649 ± 0,136	2,960 ± 0,005	0,620 ± 0,002
	6	1.700.000	19,095 ± 0,091	6,833 ± 0,028	0,421 ± 0,004
	9	1.630.000	17,115 ± 0,131	9,584 ± 0,037	0,284 ± 0,003
	12	1.150.000	15,616 ± 0,026	12,275 ± 0,053	0,183 ± 0,000

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
	15	530.000	14,746 ± 0,026	13,772 ± 0,053	0,111 ± 0,000
	18	200.000	14,284 ± 0,204	14,221 ± 0,053	0,085 ± 0,006
	20	100.000	13,914 ± 0,172	14,595 ± 0,159	0,085 ± 0,008
P1	0	1.600.000	22,129 ± 0,131	0,123 ± 0,000	6,203 ± 0,012
	3	1.420.000	20,297 ± 0,266	3,087 ± 0,028	5,313 ± 0,033
	6	1.200.000	18,391 ± 0,146	6,403 ± 0,069	4,340 ± 0,024
	9	1.650.000	16,412 ± 0,131	9,438 ± 0,080	4,240 ± 0,022
	12	900.000	14,858 ± 0,026	11,676 ± 0,092	3,717 ± 0,009
	15	500.000	13,951 ± 0,026	12,873 ± 0,106	3,183 ± 0,009
	18	190.000	13,248 ± 0,026	13,098 ± 0,140	2,803 ± 0,012
	20	100.000	13,137 ± 0,026	13,173 ± 0,053	2,510 ± 0,000
P2	0	1.600.000	22,073 ± 0,026	0,138 ± 0,005	6,113 ± 0,045
	3	1.650.000	20,427 ± 0,045	3,263 ± 0,021	5,257 ± 0,009
	6	1.570.000	18,632 ± 0,026	6,841 ± 0,005	4,667 ± 0,017
	9	1.420.000	16,985 ± 0,045	10,003 ± 0,302	3,963 ± 0,009
	12	1.240.000	15,061 ± 0,094	12,312 ± 0,053	3,447 ± 0,005
	15	460.000	14,450 ± 0,052	13,697 ± 0,092	3,160 ± 0,033
	18	170.000	13,988 ± 0,120	13,734 ± 0,053	2,817 ± 0,021
	20	90.000	13,951 ± 0,052	13,809 ± 0,092	2,657 ± 0,009
P3	0	1.600.000	22,314 ± 0,316	0,123 ± 0,000	6,323 ± 0,090
	3	1.700.000	20,501 ± 0,052	3,364 ± 0,014	5,457 ± 0,033
	6	1.510.000	18,725 ± 0,069	6,515 ± 0,014	4,767 ± 0,033
	9	1.400.000	17,244 ± 0,094	9,550 ± 0,050	4,013 ± 0,033
	12	1.210.000	15,635 ± 0,114	11,489 ± 0,053	3,450 ± 0,022
	15	460.000	15,098 ± 0,078	12,948 ± 0,347	3,007 ± 0,021
	18	200.000	14,395 ± 0,069	13,210 ± 0,053	2,507 ± 0,017
	20	100.000	14,339 ± 0,026	13,323 ± 0,053	2,007 ± 0,012
Doğ. Den.1	0	1.600.000	31,066 ± 0,258	0,138 ± 0,005	1,130 ± 0,016
	3	1.700.000	30,104 ± 0,250	1,837 ± 0,005	0,872 ± 0,002
	6	1.710.000	28,938 ± 0,026	3,443 ± 0,035	0,641 ± 0,009
	9	1.630.000	27,606 ± 0,026	5,924 ± 0,005	0,450 ± 0,000
	12	910.000	26,385 ± 0,172	7,922 ± 0,059	0,299 ± 0,000
	15	300.000	25,348 ± 0,026	8,686 ± 0,105	0,249 ± 0,007
	18	110.000	22,740 ± 0,114	9,015 ± 0,009	0,225 ± 0,011

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
Doğ.					
Den.2	0	1.600.000	30,765 ± 0,492	0,126 ± 0,005	1,093 ± 0,019
	3	1.770.000	28,457 ± 0,214	2,683 ± 0,009	0,829 ± 0,008
	6	1.800.000	26,977 ± 0,136	5,344 ± 0,042	0,601 ± 0,006
	9	1.780.000	25,552 ± 0,052	7,919 ± 0,023	0,417 ± 0,000
	12	770.000	23,239 ± 0,146	10,078 ± 0,088	0,264 ± 0,005
	15	220.000	22,129 ± 0,138	10,823 ± 0,028	0,242 ± 0,003
	18	70.000	19,761 ± 0,078	10,965 ± 0,095	0,212 ± 0,002
Doğ.					
Den.3	0	1.600.000	29,530 ± 0,078	0,127 ± 0,005	1,103 ± 0,012
	3	1.700.000	28,383 ± 0,069	2,661 ± 0,000	0,825 ± 0,014
	6	1.700.000	26,921 ± 0,045	5,292 ± 0,032	0,590 ± 0,016
	9	1.700.000	25,330 ± 0,094	7,900 ± 0,059	0,378 ± 0,004
	12	800.000	23,332 ± 0,026	10,291 ± 0,061	0,227 ± 0,006
	15	290.000	22,481 ± 0,045	11,302 ± 0,053	0,188 ± 0,006
	18	120.000	21,241 ± 0,146	11,639 ± 0,053	0,164 ± 0,001
Doğ.					
Den.4	0	1.600.000	29,178 ± 0,318	0,131 ± 0,005	1,100 ± 0,050
	3	1.500.000	28,845 ± 0,334	2,077 ± 0,009	0,883 ± 0,000
	6	1.420.000	26,940 ± 0,233	4,057 ± 0,029	0,633 ± 0,011
	9	1.690.000	25,663 ± 0,069	6,044 ± 0,028	0,475 ± 0,007
	12	700.000	23,665 ± 0,069	7,769 ± 0,032	0,325 ± 0,001
	15	210.000	22,999 ± 0,026	8,405 ± 0,070	0,297 ± 0,002
	18	100.000	20,852 ± 0,146	8,622 ± 0,057	0,276 ± 0,005
Doğ.					
Den.5	0	1.600.000	30,862 ± 0,120	0,131 ± 0,005	0,998 ± 0,016
	3	1.760.000	30,252 ± 0,045	2,556 ± 0,005	0,792 ± 0,002
	6	1.880.000	28,956 ± 0,026	4,914 ± 0,005	0,550 ± 0,003
	9	1.700.000	27,439 ± 0,172	7,312 ± 0,052	0,314 ± 0,003
	12	810.000	24,978 ± 0,252	9,584 ± 0,046	0,223 ± 0,014
	15	390.000	24,423 ± 0,078	11,066 ± 0,083	0,170 ± 0,001
	18	120.000	21,981 ± 0,091	11,145 ± 0,050	0,164 ± 0,003
Doğ.					
Den.6	0	1.600.000	30,844 ± 0,250	0,138 ± 0,005	1,010 ± 0,008
	3	1.620.000	27,920 ± 0,120	2,650 ± 0,009	0,814 ± 0,011
	6	1.800.000	26,292 ± 0,114	4,798 ± 0,014	0,606 ± 0,007
	9	1.800.000	24,793 ± 0,026	7,638 ± 0,158	0,404 ± 0,005

EK AÇIKLAMALAR

VİRÜS KÜLTÜRÜ DENEYLERİ ANALİZ SONUÇLARI DEVAM

Deney Adı	t (sa)	Hücre derişimi (hücre/ml)	Glikoz derişimi (mM)	Laktat derişimi (mM)	Glutamin derişimi (mM)
	12	700.000	22,795 ± 0,026	9,891 ± 0,060	0,248 ± 0,004
	15	210.000	22,314 ± 0,136	10,871 ± 0,074	0,231 ± 0,000
	18	90.000	21,222 ± 0,026	11,118 ± 0,023	0,205 ± 0,002

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Acharya, R., Fry, E., Stuart, D., Fox, G., Rowlands, D., Brown, F., 1989, The threedimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature*, 337, 709–716.
- Alcala, P., Feliu, J. X., Aris, A. and Villaverde, A., 2001, Efficient accommodation of recombinant foot-and-mouth disease virus RGD peptides to cell surface integrins. *Biochem Biophys. Res Commun*, 285, 201–206.
- Alexandersen, S., Zhang, Z., Donaldson, A. I. and Garland, A. J., 2003, The pathogenesis and diagnosis of foot-and-mouth disease, *J. Comp Pathol*, 129, 1–36.
- Alexandersen, S., Mowat, N., 2005, Foot-and-mouth disease: host range and Pathogenesis, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 288, 9–42.
- Anjum, M.F., Tasadduq, I., and Al-Sultan, K., 1997, Response surface methodology: A neural network approach, *European Journal of Operational Research*, 101, 65–73.
- Arechederra, R., Minter, S.D., 2008. *Electrochim. Acta* 53, 669–6793.
- Aslan, N., Çiftçi, F. and Yan, D., 2008, Optimization of process parameters for producing graphite concentrate using response surface methodology, *Separation and Purification Technology*, 59, 9-16.
- Bachrach, H.L., Trautman, R., Breese, S.S., 1964, Chemical and physical properties of virtually pure foot-and-mouth disease virus, *American Journal of Veterinary Research*, 25, 333-342.
- Bachrach, H.L., 1968, Foot-and-mouth disease virus, *Annu Rev Microbiol*, 22, 201–44.
- Bachrach, H. L., Moore, D. M, McKercher, P. D. and Polatnick, J., 1975, Immune and antibody responses to an isolated capsid protein of foot-and mouth disease virus, *The Journal of Immunology*, 115, 1635–1641.
- Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Domingo, E., 2001, Evolution of cell recognition by viruses. *Science*, 292, 1102–5.
- Barnett, P.V.; Keel, P.; Reid, S.; Armstrong, R.M.; Statham, R.J.; Voyce, C.; Aggarwal, N. and Cox, S.J., 2004, Evidence that high potency of foot and mouth disease vaccine inhibits local virus replication and prevents the carrier state in sheep, *Vaccine*, 22, 1221-1232.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Barteling, S.J., and Vreeswijk, J., 1991. Developments in foot-and-mouth disease vaccines, *Vaccine*, 9, 75-88.
- Baxt, B., Neff, S., Rieder, E. and Mason, P.W., 2002, Foot-and-mouth disease virus receptor interactions: role in pathogenesis and tissue culture adaptation, In B. L. Semler and E. Wimmer (ed.), *Molecular biology of picornaviruses*. ASM Press, Washington, D.C., p. 115–123.
- Becker, K., Rahlfs, S., Nickel, C., Schirmer, R.H., 2003, Glutathione–functions and metabolism in the malarial parasite *Plasmodium falciparum*, *Biological Chemistry*, 384, 551-566.
- Bedard, K., Semler, B. L., 2004, Regulation of picornavirus gene expression, *Microbes and Infection*, 6, 702-713.
- Belsham, G.J., Brangwyn, J.K., 1990, A region of the 5' noncoding region of foot-and-mouth disease virus RNA directs efficient internal initiation of protein synthesis within cells: involvement with the role of L protease in translational control, *J Virol*, 64, 5389–5395.
- Belsham, G.J., 2005, Translation and replication of FMDV RNA, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 288, 43–70.
- Bittle, J.L., Houghten, R.A., Alexander, H., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., Lerner, R.A., Rowlands, D.J., Brown, F., 1982, Protection against foot-and-mouth disease by immunization with a chemically synthesized peptide predicted from the viral nucleotide sequence., *Nature* 298, 30–33.
- Bode, B.P., 2001, Recent Molecular advances in mammalian glutamine transport, *J Nutr*, 131, 2475–2485.
- Boza, J.J., Moennoz, D., Bournot, C.E., Blum, S., Zbinden, I., et al., 2000, Role of glutamine on the de novo purine nucleotide synthesis in Caco-2 cells, *Eur J Nutr* 39, 38–46.
- Brown F, Cartwright B., 1961, Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components, *Nature*, 192, 1163–1164.
- Burrows, R., 1996, The spectally assay of foot and mouth disease virus in pigs. *J. Hyg. Comb.*, 64, 75.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Butler, M., Spier, R.E., 1984, The effects of glutamine utilisation and ammonia production on the growth of BHK cells in microcarrier culture, *Journal of Biotechnology*, 1, 187–196.
- Chinsangaram, J., M. P. Moraes, M. Koster, and M. J. Grubman, 2003, Novel viral disease control strategy: adenovirus expressing alpha interferon rapidly protects swine from foot-and-mouth disease, *J. Virol*, 77, 1621–1625
- Christian, B., 2002, *Virology*, <http://www.nlv.ch/Virologytutorials/Classification.htm>.
- Clarke, B.E., Brown, A.L., Currey, K.M., Newton, S.E., Rowlands, D.J., Carroll, A.R., 1987, Potential secondary and tertiary structure in the genomic RNA of foot and mouth disease virus, *Nucleic Acids Res* 15, 7067–7079.
- Collen, T., Dimarchi, R., Doel, T.R., 1991, A T cell epitope in VP1 of foot-and-mouth disease virus is immunodominant for vaccinated cattle, *The Journal of Immunology*, 146, 749–755.
- Cox, S.J., Voyce, C., Parida, S., Reid, S.M., Hamblin, P.A., Hutchings, G., et al., 2006, Effect of emergency FMD vaccine antigen payload on protection, subclinical infection and persistence following direct contact challenge of cattle, *Vaccine*, 24, 3184–90.
- Cruz, H.J., Ferreira, A.S., Freitas, C.M., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.T., 1999, Metabolic responses to different glucose and glutamine levels in baby hamster kidney cell culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 579-585.
- Cruz, H.J., Freitas, C.M., Alves, P.M., Moreira, J.L., Carrondo, M.J.T., 2000, Effects of ammonia and lactate on growth, metabolism, and productivity of BHK cell, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 43–52.
- Curry, S., Abrams, C.C., Fry, E., Crowther, J.C., Belsham, G.J., Stuart, D.I., King, A.M., 1995, Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *Journal of Virology*, 69, 430-438.
- Dalili, M., Sayles, G.D., Ollis, D.F., 1990, Glutamine-limited batch hybridoma growth and antibody production: experiment and model, *Biotechnology and Bioengineering*, 36, 74–82.
- Darmaun, D., Matthews, D.E., Bier, D.M., 1986, Glutamine and glutamate kinetic in humans, *American Journal Physiology*, 251, 117–126.
- Doel, T.R., 2003, FMD vaccines. *Virus Research*, 91, 81-99.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Domingo, E., Baranowski, E., Escarmis, C., Sobrino, F., 2002, Foot-and-mouth disease virus, *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 25, 297-308.
- Domingo, E., Escarmis, C., Baranowski, E., Ruiz-Jarabo, C.M., Carrillo, E., Núñez, J.I., Sobrino, F., 2003, Evolution of foot-and-mouth disease virus. *Virus Res.* 91, 47-63.
- Donaldson, A. I., Gloster, J., Harvey, L. D., Deans, D. H., 1982, Use of prediction models to forecast and analyse airborne spread during the foot-and-mouth disease outbreaks in Brittany, Jersey and the Isle of Wight in 1981. *Vet. Rec.*, 110, 53-57.
- Eagle H., 1955, Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture, *Science*, 122, 501-504.
- Ekinci, M.S., 2007, Tavuk Gübresinden Biyogaz Üretimi İçin En Uygun Koşulların Belirlenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, 105 s.
- Ergin, G., 2010, Sap Virüsü Üretimine Dolgulu Reaktörlerde Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 93-94 s.
- Fox, G., Parry, N.R., Barnett, P.V., McGinn, B., Rowlands, D.J., Brown, F., 1989, The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J. Gen. Virol.*, 70, 625-637.
- Forss, S., Strebel, K., Beck, E. and Schaller, H., 1984, Nucleotide sequence and genome organization of foot-and-mouth disease virus, *Nucleic Acids Res.* 12, 6587-6601.
- Ferreira, T.B., Carrondo, M.J.T., Alves, P.M., 2007, Effect of ammonia production on intracellular pH: Consequent effect on adenovirus vector production, *Journal of Biotechnology*, 129, 433-438.
- Godia, F., Cairo, J.J., 2006, Cell Metabolism. In: *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies*, Ozturk, S.S., and Hu, W.-S., (eds.), CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, 81-112.
- Goodfellow, I. G., Kerrigan, D., Evans, D. J., 2003, Structure and function analysis of the poliovirus cis-acting replication element (CRE), *Rna-a Publication of the Rna Society*, 9, 124-137.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Güven, G., 2004, Peyniraltı Atıksuyunun Arıtılması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Hansen, J., Long, A.M., Schultz, S., 1997, Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus, *Structure* 15, 1109–1122.
- Hediger, M.A., Coady, M.J., Ikeda, T.S., Wright, E.M., 1987, Expression cloning and cDNA sequencing of the Na⁺/glucose co-transporter, *Nature* 330, 379–381.
- Hynes, R.O., 2002, Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines, *Cell*, 110, 673–687.
- Jackson, T., King, A. M., Stuart, D. I. and Fry, E., 2003, Structure and receptor binding, *Virus Res*, 91, 33–46.
- Jeong, Y-H., Wang, S.S., 1995, Role of glutamine in hybridoma cell culture: effects on cell growth, antibody production, and cell metabolism, *Enzyme Microbial Technology*, 17, 45–55.
- Joost, H.G. and Thorens, B., 2001, The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review), *Molecular Membrane Biology* 18, 247–256.
- Jurica, M.S. et al., 1998, The allosteric regulation of pyruvate kinase by fructose-1,6-bisphosphate, *Structure* 6, 195–210.
- King, A.M., Sangar, D.V., Harris, T.J., Brown. F., 1980, Heterogeneity of the genomelinked protein of foot-and-mouth disease virus, *Journal of Virology*, 34, 627–634.
- Kitching, R.P., 2002, Clinical variation in foot and mouth disease: cattle. *Rev Sci Tech*, 21, 499–504.
- Kitching, R. P., 2005, Global epidemiology and prospects for control of foot-and-mouth disease, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 288, 133-148.
- Kitching, P., Hammond, J., Jeggo, M., Charleston, B., Paton, D., Rodriguez, L., Heckert, R., 2007, Global FMD control – is it an option?, *Vaccine* 25, 5660-5664.
- Kuhn, R., Luz, N., Beck, E., 1990, Functional analysis of the internal translation initiation site of foot-and-mouth disease virus, *Journal of Virology*, 64, 4625–4631.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Kul, S., 2004, Cevap Yüzey Yöntemleri, Yüksek Lisans Tezi, Mersin Üniversitesi, Mersin, 89 s.
- Kurokawa, H., Park, Y.S., Iijima, S., Kobayashi, T., 1994, Growth characteristics in fed-batch culture of hybridoma cells with control of glucose and glutamine concentrations. *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 95–103.
- Le Bon, A., Schiavoni, G., D'Agostino, G., Gresser, I., Belardelli, F., Tough, D.F., 2001, Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo, *Immunity*, 14, 461–470.
- Linz, M., Zeng, A.P., Wagner, R., Deckwer, W.D., 1997, Stoichiometry, kinetics, and regulation of glucose and amino acid metabolism of a recombinant BHK cell line in batch and continuous cultures. *Biotechnol Prog*, 13, 453-463.
- Logan, D., Abu-Ghazaleh, R., Blakemore, W., Curry, S., Jackson, T., King, A., Lea S., Lewis, R., Newman, J., Parry, N., Rowlands, D., Stuart, D., Fry, E., 1993, Structure of a major immunogenic site on foot-and-mouth disease virus, *Nature*, 362, 566–8.
- Logan, B.E., Hamelers, B., Rozendal, R., Schroder, U., Keller, J., Freguia, S., Aelterman, P., Verstraete, W., Rabaey, K., 2006, Microbial fuel cells: Methodology and technology, *Environmental Science and Technology*, 40, 5181–5192.
- Lombard, M., Pastoret, P.P., Moulin, A.M., 2007, A brief history of vaccines and vaccination. *Revue Scientifique et Technique*, 26, 29–48.
- Lopez de Quinto, S., Saiz, M., de la Morena, D., Sobrino, F., Martinez-Salas, E., 2002, IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 39-NCR and poly(A) sequences, *Nucleic Acids Res*, 30, 4398–4405.
- Mahy, B.W.J., 2004, Overview of foot-and mouth disease and its impact as a re-emergent viral infection. In: Sobrino F, Domingo E (eds) *Foot and mouth disease. Current perspectives*. Horizon Bioscience, Norfolk, pp 437–446.
- Maranga, L., Goochee, C.F., 2006, Metabolism of PER.C6™ cells cultivated under fed-batch conditions at low glucose and glutamine levels, *Biotechnology Bioengineering*, 94, 139–150.
- Martinez-Salas, E., Saiz, J.C., Davila, M., Belsham, G.J., Domingo, E., 1993, A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo, *Journal of Virology*, 67, 3748–3755.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Mason, P. W., Rieder, E., Baxt, B., 1994, RGD sequence of foot-and-mouth disease virus is essential for infecting cells via the natural receptor but can be bypassed by an antibody-dependent enhancement pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 91, 1932-6.
- Mason, P.W., Grubman, M.J., Baxt, B., 2003, Molecular basis of pathogenesis of FMDV, *Virus Res*, 91, 9–32.
- Mateu, M.G., 1995, Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view, *Virus Res*, 38, 1–24.
- McKeehan, W.L., 1982, Glycolysis, glutaminolysis and cell proliferation. *Cell Biol Int Rep*, 6, 635–649.
- McQueen, A., Bailey, J.E. , 1991, Growth inhibition of hybridoma cells by ammonium ion: correlation with effects on intracellular pH, *Bioprocess Engineering*, 6, 49-61.
- Miller, W.M., Blanch, H.W., Wilke, C.R., 1988, Kinetic analysis of hybridoma growth and metabolism in batch and continuous culture: Effect of nutrient concentrations, dilution rate, and pH. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 947–965.
- Miller, W.M., Wilke, C.R., Blanch, H.W., 1989, Transient responses of hybridoma cells to nutrient additions in continuous culture: I. Glucose pulse and step changes. *Biotechnology and Bioengineering*, 33, 477–486.
- Mirabet, M., Navarro, A., Lopez, A., Canela, E.I., Mallol, J., Lluís, C., Franco, R., 1997, Ammonium toxicity in different cell lines. *Biotechnology and Bioengineering*, 56, 530–537.
- Mueckler M., 1994, Facilitative glucose transporters, *Eur J Biochem* 219, 713–725.
- Murphy, F.A., Gibbs, E.P.J., Horzinek, M.C., Studdert, M.J., 1999, *Veterinary Virology*, Academic Press Inc, 629 p.
- Myers, R.H., and Montgomery, D.C., 1995, *Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments*, New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Neermann, J., Wagner, R., 1996, Comparative analysis of glucose and glutamin metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J Cell Physiol*, 166, 152-169.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Nemerow, G.R., Stewart, P.L., 2001, Antibody neutralization epitopes and integrin binding sites on nonenveloped viruses, *Virology*, 288, 189–91.
- Newland, M., Kamal, M.N., Greenfield, P.F., Nielsen, L.K. , 1994, Ammonia inhibition of hybridomas propagated in batch, fed-batch, and continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 43, 434–438.
- Ozturk, S.S., Meyerhoff, M.E., and Palsson, B.O., 1989, Measurement of ammonia and glutamine in cell culture media by gas sensing electrodes, *Biotechnology Techniques*, 3, 217-222.
- Ozturk, S.S., Palsson, B.O., 1991, Growth, metabolic, and antibody production kinetics of hybridoma cell culture: 1. Analysis of data from controlled batch reactors, *Biotechnol. Prog.*, 7, 471–480.
- Ozturk, S.S., Riley, M.R., Palsson, B.O., 1992, Effects of ammonia and lactate on hybridoma growth, metabolism, and antibody production, *Biotechnology. and Bioengineering*, 39, 418–431.
- Özyiğit, M., 2012, Şap Virüsü Üretiminde BHK-21 An30 Hücrelerinin Kesikli Üretim Prosesinde Biyokinetik Parametrelerinin İncelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 163 s.
- Palmenberg, A. C., 1990, Proteolytic processing of picornaviral polyprotein, *Annu. Rev. Microbiol.*, 44, 603–623.
- Pate, S.D., Papoutsakis, E.T., Winter, J.N., Miller, W.M., 2000, The lactate issue revisited: novel feeding protocols to examine inhibition of cell proliferation and glucose metabolism in hematopoietic cell cultures, *Biotechnol Prog.*, 16, 885–892.
- Paton, D.J., Sumption, K.J., and Charleston, B., 2009, Options for control of foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.*, 364, 2657–2667.
- Pelicano, H., Martin, D.S., Xu, R-H. and Huang, P, 2006, Glycolysis inhibition for anticancer treatment, *Oncogene*, 25, 4633–4646.
- Pereira, H.G., 1981, Foot-and-mouth disease virus. In: Gibbs RPG, editor. *Virus diseases of food animals*, vol. 2. New York: Academic Press, p. 333–63.
- Pollard-Knight, D., Cornish-Bowden, A., 1982, Mechanism of liver glucokinase, *Mol Cell Biochemistry*, 44, 71–80.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Racaniello, V. R., 2007, Picornaviridae: The viruses and their replication. In: Fields Virology, 5th Edition, Vol. I, Knipe, D. M., Howley, P.H. (eds), Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Business. pp. 795-838.
- Radlett, P.J., Telling, R. C. Stone, C.J., and Whiteside, J.P., 1971, Improvements in the growth of BHK-21 cells in submerged culture, Applied Microbiology, 22, 534-537.
- Reitzer, L.J., Wice, B.M., and Kennell, D., 1979, Evidence that glutamine not sugar is the major energy source for cultured HeLa cells, J.Biol. Chem. 254, 2669-2676.
- Rueckert, R.R., 1996, Picornaviridae: the viruses and their replication, Fields virology, 3rd edn., Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M. (eds), Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, Pa, 609–654.
- Ryll, T., Valley, U., Wagner, R., 1994, Biochemistry of growth inhibition by ammonium ions in mammalian cells. Biotechnol. Bioeng. 44, 184–193.
- Saiz, M., Gomez, S., Martinez-Salas, E., Sobrino, F., 2001, Deletion or substitution of the aphthovirus 39 NCR abrogates infectivity and virus replication. J Gen Virol 82, 93–101.
- Samuel, A.R., Knowles, N. J., 2001, Foot-and-mouth disease virus: cause if the recent crises for the UK livestock industry, Trends in Genetics 17, 421–424.
- Samuel, A. R., and Knowles, N. J., 2001, Foot-and-mouth disease type O viruses exhibit genetically and geographically distinct evolutionary lineages (topotypes), J. Gen. Virol. 82, 609–621.
- Schröder, U., 2007, Phys. Chem. Chem. Phys, 9, 2619–2629.
- Sirover, M.A., 1999, New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Biochim Biophys Acta 1432, 159–184.
- Sobrino, F., Saiz, M., Jimenez-Clavero, M.A., Nunez J.I., Rosas, M.F., Baranowski, E., Ley, V., 2001, Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat, Vet. Res. 32, 1–30.
- Şap Enstitüsü Müdürlüğü, 2010, Yağ Adjuvanlı Şap Aşısı Protokolü, Ankara.
- Tate, S.S., Meister, A., 1971, Regulation of rat liver glutamine synthetase: activation by alpha-ketoglutarate and inhibition by glycine, alanine, and carbamyl phosphate, Proc Natl Acad Sci USA, 68, 781–785.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Thilly, W.G., 1986, Mammalian cell technology. Butterwoth, Boston.
- Thomson, G.R., 1994, Foot-and-mouth disease. In: Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa, Vol. II, Ed: J. A. W. Coetzer, G. R. Thomson, R. C. Tustin. Cape Town, Oxford, New York: Oxford University Press, 825-852p.
- Thorens, B., Mueckler, H., 2010, Glucose transporters in the 21st century. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, 141–145.
- Trisch, G.L., Moore, G.E., 1962, Spontaneous decomposition of glutamine in cell culture media. *Exp. Cell. Res.* 28, 360-364.
- Tsujimura, S., Fukuda, J., Shirai, O., Kano, K., Sakai, H., Tokita, Y., Hatazawa, T., 2012, Micro-coulometric study of bioelectrochemical reaction coupled with TCA cycle, *Biosensors and Bioelectronics*, 34, 244-248.
- Ustaçelebi, Ş., Abacıoğlu, H. ve Badur, S., 2004, Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji, Güneş Tıp Kitabevi, 389 s.
- Van Lierop, M.J.C., Van Maanen, K., Meloen, R.H., Rutten, V.P.M.G., De Jong, M.A.C., Hensen, E.J., 1992, Proliferative lymphocyte response to foot-and-mouth disease virus and three FMDV peptides after vaccination or immunization with these peptides in cattle, *Immunology* 75, 406–413.
- Verdaguer, N., Mateu, M.G., Andreu, D., Giralt, E., Domingo, E., Fita, I., 1995, Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction, *EMBO J*, 14, 1690–1696.
- Vosloo, W., Bastos, A.D., Sangare, E.O., Hargreaves, S.K., and Thomson, G. R., 2002, Review of the status and control of foot and mouth disease in sub-Saharan Africa. *Rev. Sci. Tech.*, 21, 437–449.
- Warburg, O., Wind, F., Negelein, E., 1927, The metabolism of tumors in the body. *J Gen Physiol* 8, 519–530.
- Whitton, J.L., Cornell, C.T. and Feur, R., 2005, Host and virus determinants of picornavirus pathogenesis and tropism, *Nature Reviews Microbiology*, 3, 765-776.
- Wright, E.M., 2001, Renal Na⁺-glucose cotransporters. *American Journal of Physiology* 280, F10–F18.
- Wood, T., 1985, The Pentose Phosphate Pathway, Academic Press.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

- Xie, L., and Zhou, W., 2006, Fed-batch cultivation of mammalian cells for the production of recombinant proteins. In: Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies, Ozturk S.S., and Hu W.-S., (eds.), CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, pp. 349-386.
- Yeşilbağ, K. ve Çabalar, M., 2011, Viroloji, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Yayın no: 2339, 197s.
- Zhou, W., Hu, W.-S., 1994, On-line characterization of a hybridoma cell culture Process, Biotechnology and Bioengineering, 44, 170–177.
- Zielke, H.R., Sumbilla, C.M., Sevdalian, D.A., Hawkins, R.L., Ozand, P.T., 1980, Lactate: a major product of glutamine metabolism by human diploid fibroblasts, J Cell Physiol 104, 433-438.
- Zielke, H.R., Zielke, C.L., Ozand, P.T., 1984, Glutamine: a major energy source for cultured mammalian cells, Fed Proc, 43, 121–125.