



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CRANDELL-REES FELİNE KİDNEY (CRFK) HÜCRE HATTININ
MİKROTAŞIYICI TABANLI SÜSPANSİYON KÜLTÜR SİSTEMİNE
ADAPTASYONU VE FELİNE CALİCİVİRUS (FCV) ÜRETİMİ**

**Tuba Beyza POLAT
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA
2026**



**T.C.
HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

**CRANDELL-REES FELİNE KİDNEY (CRFK) HÜCRE HATTININ
MİKROTAŞIYICI TABANLI SÜSPANSİYON KÜLTÜR SİSTEMİNE
ADAPTASYONU VE FELİNE CALİCİVİRUS (FCV) ÜRETİMİ**

**Tuba Beyza POLAT
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI**

DANIŞMAN: Dr. Öğr. Üyesi Fuat ÖZYÖRÜK

**ŞANLIURFA
2026**

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim ve tez çalışmam süresince akademik bilgi ve deneyimleriyle bana yol gösteren, her aşamada desteğini, sabrını ve değerli katkılarını esirgemeyen danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Fuat ÖZYÖRÜK'e, Sayın Dr. Öğr. Üyesi İrfan ÖZGÜNLÜK'e, Sayın Dr. Öğr.Üyesi Berfin ERTÜRK'e; lisans eğitimimden bu yana bilgi ve tecrübeleriyle bana rehberlik eden, desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Aykut ÖZKUL'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmamın yürütülmesi sürecinde araştırma imkânlarını sağlayarak her türlü desteği sunan Dollvet Biyoteknoloji ailesine; sağladığı katkılarındandolayı Genel Müdür Yardımcısı Sayın Dr. Nilay ÜNAL'a, Birim Şefim Sayın Dr. Muhammed MARKİ'ye, Sayın Tajelser ADAM'a ve Sayın Cansu GÜLECEN'e içten teşekkürlerimi sunarım.

Laboratuvarda bu yoğun çalışma sürecini birlikte paylaştığım, yardımlarını ve desteklerini her zaman hissettiğim çalışma arkadaşlarım Seyyide Nur NARİNCA ve Cemile MOL'a teşekkür ederim.

Son olarak, hayatımın her döneminde olduğu gibi bu zorlu eğitim sürecinde de maddi ve manevi desteklerini, sevgilerini ve dualarını benden hiçbir zaman esirgemeyen, bugünlere gelmemde en büyük pay sahibi olan sevgili aileme; manevi annem Fatma Haral EFE'ye ve bu uzun yolculuk boyunca sabrı, sevgisi ve anlayışıyla her daim yanımda olarak bana güç veren nişanlım İsmail DEMİRKAN'a sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
ÇİZELGELER DİZİNİ	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	iv
KISALTMALAR	vi
SİMGELER.....	vii
1. GİRİŞ	1
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR	5
2.1. Hücre Kültürü Sistemleri ve Biyoproses Gelişimi	5
2.1.1. Temel Hücre Kültürü ve Tek Katmanlı Sistemler	5
2.1.2. Süspansiyon Kültür Sistemleri ve Viral Üretim	6
2.1.3. Mikroteknoloji Taşıyıcıları ve Cytodex Dinamikleri	6
2.1.4. CRFK Hücre Hattının Adaptasyon Potansiyeli	8
2.2. Feline Calicivirus (FCV) Moleküler Biyolojisi ve İmmünizasyon	9
2.2.1. Viral Yapı ve Genomik Organizasyon	9
2.2.2. FCV Replikasyon Döngüsü ve Hücre İçi Kinetiği	11
2.2.3. Epidemiyoloji ve Genetik Varyasyon	13
2.2.4. FCV Enfeksiyonuna Karşı İmmünizasyon ve Aşılama Stratejileri	16
2.3. FCV Üretiminde Mevcut Sistemlerin Sınırlılıkları	17
3. GEREÇ ve YÖNTEM	19
3.1. Virüs ve Hücre.....	19
3.2. Mikrotaşıyıcı Hazırlığı	19
3.3. Hücre Tutunma Deneyleri	19
3.4. Virüs İnokülasyonu	20
3.5. Moleküler Teknikler	20
3.5.1. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu.....	20
3.5.2. cDNA Sentezi.....	20
3.5.3. Konvensiyonel PCR Analizi	21
3.5.4. Agaroze Jel Elektroforezi	21
3.6. İstatistiksel Analiz	21
3.7. Büyüme Eğrisi.....	22
4. BULGULAR	23
4.1. Hücre Tutunma	23
4.2. FCV MOI Optimizasyon Çalışmaları.....	26
4.3. FCV Büyüme Eğrisi	30
4.4. 0,1 MOI FCV Enfeksiyonu Sonrası CRFK Hücrelerinde CPE Gözlemleri.....	30
4.5. Konvensiyonel PCR Bulguları.....	32
4.6. 0,1 MOI'de Tekrarlanabilirlik Analizi.....	33
5. TARTIŞMA.....	35
6. SONUÇLAR	41
7. ÖNERİLER	42
KAYNAKLAR.....	43
ÖZ GEÇMİŞ	52
EKLER.....	53

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

CRANDELL-REES FELİNE KİDNEY (CRFK) HÜCRE HATTININ MİKROTAŞIYICI TABANLI SÜSPANSİYON KÜLTÜR SİSTEMİNE ADAPTASYONU VE FELİNE CALİCİVİRUS (FCV) ÜRETİMİ

Tuba Beyza POLAT

HARRAN ÜNİVERSİTESİ
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ
VETERİNERLİK VİROLOJİ ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı: Dr. Öğr. Üyesi Fuat ÖZYÖRÜK

Yıl: 2026, Sayfa: 54

Bu çalışmada, kedilerin sağlığı için büyük öneme sahip olan kedi kalısivirüsünün (FCV) geleneksel adherent kültürün sınırlayıcılıklarından arındırılarak daha yüksek hacimlerde üretimi amacıyla, Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) hücre hattının mikrotaşıyıcıtabanlı süspansiyon kültür sistemine adaptasyonu gerçekleştirilmiş ve hücre büyümesi incelenmiştir. Çalışma kapsamında iki farklı mikrotaşıyıcı denenmiş ve ön çalışmanın sonucunda hücre proliferasyonu için uygun parametreler belirlenmiştir. Hücre adaptasyon sürecinin ardından, seçilen mikrotaşıyıcı kültüründeki CRFK hücrelerine FCV inokülasyonu yapılmış ve TCID₅₀ yöntemiyle viral titre belirlenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, uygun mikrotaşıyıcı tabanlı sistem ve FCV için uygun MOI belirlenmiştir. Elde edilen bulgular, CRFK hücre hattının süspansiyon kültür sisteminde çoğaltılmasının FCV aşısı üretiminde ve büyük ölçekli araştırmalarda kullanılabilecek geçerli bir model sunduğunu göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELE: Feline Calicivirus FCV), Viral Üretim, CRFK Hücre Adaptasyonu

ABSTRACT

MASTER’S THESIS

ADAPTATION OF THE CRANDELL-REES FELINE KIDNEY (CRFK) CELL LINE TO A MICROCARRIER-BASED SUSPENSION CULTURE SYSTEM AND FELINE CALICIVIRUS (FCV) PRODUCTION

Tuba Beyza POLAT

**HARRAN UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL
DEPARTMENT OF VETERINARY VIROLOGY**

Thesis Advisor: Asst. Prof. Fuat ÖZYÖRÜK

Year: 2026, Page: 54

In this study, the Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) cell line was adapted to a microcarrier-based suspension culture system for the high-volume production of Feline calicivirus (FCV), which is of great importance for feline health. This process was designed to overcome the limitations of traditional monolayer culture methods, and CRFK cells were adapted to the microcarriers. Cell growth was examined. As part of the study, two different microcarriers were tested, and the optimal parameters for cell proliferation were determined. Following the adaptation process, CRFK cells in the selected microcarrier culture were inoculated with FCV, and the titer was determined using the TCID₅₀ method. As a result of the experiments, a suitable microcarrier-based system and an appropriate MOI for FCV were identified. Based on the findings, the adaptation of the CRFK cell line to suspension culture suggests that it could serve as a viable model for FCV vaccine production and large-scale research.

KEYWORDS: Feline Calicivirus (FCV), Viral Production, CRFK Cell Adaptation

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrot taşıyıcılarının karşılaştırılması (Cytiva, 2020).	8
---------------------	--	---

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	Kedi kalisivirüsünün genomik yapısına genel bakış. Şemada, pozitif polariteli, tek iplikçikli genomik RNA (gRNA) üzerinde yer alan açık okuma çerçeveleri (ORF1, ORF2 ve ORF3) ile subgenomik RNA sentezi gösterilmiştir. ORF1, replikasyon kompleksini oluşturan yapısal olmayan proteinleri (p5.6, p32, helikaz, 3C-benzeri proteaz ve RdRp) kodlarken, ORF2 majör kapsid proteinini (VP1), ORF3 ise minör kapsid proteinini (VP2) kodlamaktadır. Yaklaşık 7,5–8,5 kb uzunluğundaki genomik RNA'nın 5' ucu VPg proteini ile kovalent olarak bağlı olup 3' ucunda poli(A) kuyruğu bulunmaktadır. gRNA: genomik RNA; RdRp: RNA'ya bağlı RNA polimeraz (Wei vd., 2024)	10
Şekil 2.2.	Kedi kalisivirüsünün yapısal organizasyonunun şematik gösterimi (ViralZone, 2026).	12
Şekil 2.3.	FCV'nin hücre içine alımı ve salınımının şematik gösterimi (Sun vd.,2004).	12
Şekil 4.1.	CRFK hücrelerinin tutunma sonrası 3. saatteki ışık mikroskobu görüntüleri. A. Monolayer CRFK hücrelerinin görüntüsü. B. Yöntem 1'e göre spinner flaska aktarılan CRFK hücrelerinin 3. saatteki görüntüleri. B1. Cytodex-1; B2. Cytodex-3. C. Yöntem 2'ye göre spinner flaska aktarılan CRFK hücrelerinin 3. saatteki görüntüleri. C1. Cytodex-1; C2. Cytodex-3.	23
Şekil 4.2.	Yöntem 1'e göre spinner flask içerisindeki Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcıları üzerindeki CRFK hücrelerinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki görüntüleri. A–C. Cytodex-1; D–F. Cytodex-3 mikrotasıyıcıları üzerindeki CRFK hücrelerini göstermektedir. Tüm görüntüler ışık mikroskobu altında 5× büyütme ile elde edilmiştir.	24
Şekil 4.3.	Yöntem 2'ye göre spinner flask içerisindeki Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcıları üzerindeki CRFK hücrelerinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki görüntüleri. A–C. Cytodex-1; D–F. Cytodex-3 mikrotasıyıcıları üzerindeki CRFK hücrelerini göstermektedir. Tüm görüntüler ışık mikroskobu altında 5× büyütme ile elde edilmiştir.	25
Şekil 4.4.	Farklı hücre tutunma yöntemi ve mikrotasıyıcı kombinasyonlarında (Y1-C1, Y1-C3, Y2-C1, Y2-C3) CRFK hücre yoğunluğunun zamana bağlı değişimi. Y1: Yöntem 1; Y2: Yöntem 2; C1: Cytodex-1; C3: Cytodex-3'ü göstermektedir. *: istatistiksel olarak anlamlı fark ($p<0,05$).	26
Şekil 4.5.	1 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.	27
Şekil 4.6.	0,1 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.	28
Şekil 4.7.	0,01 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.	28

Şekil 4.8.	0,001 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.	29
Şekil 4.9.	0,0001 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.	29
Şekil 4.10.	Farklı MOI değerlerinde (1, 0,1, 0,01, 0,001 ve 0,0001 MOI) enfekte edilen CRFK hücrelerinde hücre içi FCV viral titrelerinin zamana bağlı değişimi.	30
Şekil 4.11.	0,1 MOI ile FCV enfeksiyonu sonrasında CRFK hücrelerinde farklı zaman noktalarında gözlenen sitopatik etkiler. (A) Enfeksiyon sonrası 12. saat; (B) 24. saat; (C) 36. saat; (D) 48. saat; (E) 60. saat; (F) 72. saat; (G) 84. saat; (H) 96. saat görüntülerini göstermektedir. Tüm görüntüler 5× büyütme ile elde edilmiştir.	31
Şekil 4.12.	0,1 MOI ile FCV enfeksiyonu sonrasında CRFK hücrelerinde farklı zaman noktalarında gözlenen sitopatik etkiler. Enfeksiyon sonrası (I) 108. saat; (J) 120. saat; (K) 132. saat; (L) 144. saat; (M) 156. saat ve (N) 168. saat görüntülerini göstermektedir. Tüm görüntüler 5× büyütme ile elde edilmiştir.	32
Şekil 4.13.	FCV varlığının RT-PCR ile doğrulanmasına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 100 bp DNA belirteci; NK: negatif kontrol; PK: pozitif kontrol; FCV: Feline calicivirus pozitif örneği.	33
Şekil 4.14.	0,1 MOI ile enfekte edilen CRFK hücrelerinde hücre içi ve süpernatanttaki viral titrenin (log TCID ₅₀ /mL) zamana bağlı değişimine ait tekrarlanabilirlik analizi. Veriler ortalama ± SD olarak gösterilmiştir.	34

KISALTMALAR

FBS	Fetal Bovine Serum
CPE	Sitopatik Etki
PBS	Fosfat tamponlu tuz çözeltisi
CRFK	Crandell-Rees Feline Kidney
FHV	Feline Herpesvirus
FPV	Feline Panleukopenia Virus
FCV	Feline Calicivirus
FVRCP	Feline Viral Rhinotracheitis, Calicivirus, Panleukopenia
HEK293T	İnsan Embriyonik Böbrek 293T Hücre Hattı
VERO	Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücre Hattı
PPRV	Peste des Petits Ruminants Virüsü
L	Litre
C-1	Cytodex-1 microcarrier
C-3	Cytodex-3 microcarrier
MOI	Multiplicity of Infection
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
TCID₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50%
TWO-WAY ANOVA	Two-Way Analysis of Variance (İki yönlü varyans analizi)
WSV	Working Seed Virus
bp	Base Pair (Baz çifti)

SİMGELER

C-3	Cytodex-3
Y-1	Yöntem-1
Y-2	Yöntem-2
C-1	Cytodex-1
MOI	Enfeksiyon çokluğu (Multiplicity of Infection)

1. GİRİŞ

Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) hücre hattı ilk olarak 1964 yılında, sağlıklı bir kedinin böbrek dokusundan elde edilmiş ve günümüze kadar dondurularak saklanmıştır. CRFK hücre hattı 200'ün üzerinde pasaj ile *in vitro* ortamda çoğaltılmıştır. Bu hücre hattı hem kedi virüsü araştırmalarında hem de tanısal laboratuvar uygulamalarında yaygın olarak kullanılan bir model haline gelmiştir. Aynı zamanda CRFK hücre hattının kanser araştırmalarında kullanıldığı da bildirilmiştir (Crandell vd., 1973).

CRFK hücre hattı özellikle kedi herpesvirüsü (FHV-1), kedi kalisivirüsü (FCV) ve kedi panlökopeni virüsü (FPV) gibi ajanların çoğaltılmasında yaygın olarak kullanılmakta ve bu etkenlere karşı geliştirilen ticari FVRCP (*Feline viral rhinotracheitis, Calicivirus, Panleukopenia*) aşılarının üretiminde kullanılmaktadır (Songaksorn vd., 2021).

Geleneksel olarak monolayer kültür sisteminde üretilen CRFK hücre hatları, sınırlı yüzey alanı nedeniyle yüksek hacimli aşı üretimi için yetersiz kalabilmektedir. Monolayer geleneksel kültür sisteminde flask (maksimum yüzey alanı: 225 cm²), rolling şişe (maksimum yüzey alanı: 1750 cm²), CellFactory (maksimum yüzey alanları: 6320 cm², 25.280 cm²) gibi küçük ölçekli sistemler bulunmaktadır. HYPERStack hücre kültürü kabı gibi daha yeni gelişmiş ve belirli bir ölçeklendirmeye kadar hacmi arttırılmış sistemler de mevcuttur (Castillo vd., 2013). Tüm bu sistemler geniş kullanım alanlarına sahiptir ancak iki boyutlu yapıda olmaları nedeniyle önemli sınırlamalar taşımaktadır. Hücrelerin *in vivo* ortamında bulunan hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin yeterince taklit edilememesi, hücresel davranışın ve fizyolojik yanıtların doğal koşullardan sapmasına neden olmaktadır (Duval vd., 2017). Ayrıca düşük yüzey/hacim oranı ve kültür ortamındaki heterojenlik gibi faktörler, hücre büyümesini ve üretim verimliliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Derakhti vd., 2019). Bu nedenle, daha yüksek hücre yoğunluğu ve verimli üretim süreçleri için mikrotasıyıcı destekli süspansiyon kültür sistemleri önemli bir alternatif olarak öne çıkmaktadır.

Mikrotasıyıcılar ilk defa 1967 yılında van Wezel tarafından tanıtılmış ve klasik rolling şişe sistemlerinin yerini büyük ölçüde almıştır (van Wezel, 1967). Mikrotasıyıcılar, hücre bağlanması için geniş bir yüzey alanına sahip olduğundan, geleneksel monolayer kültüre

kıyasla daha yüksek verimde hücre eldesine olanak tanımıştır (Hu vd., 2008; Ren vd., 2015). Ayrıca, aşı üretimi için mikrotasıyıcı kültürlerin kullanılmasının işgücü, sarf malzemeleri ve yer tasarrufu açısından birçok fayda sağladığı literatürde bildirilmektedir (Tree vd., 2001).

Yang vd. (2019), XDR-50 ve XSR-200 biyoreaktörlerinde HEK293T (İnsan embriyonik hücre hattı 293T) ve Vero (Afrika yeşil maymunu böbrek hücre hattı) hücreleri için büyük ölçekli hücresel üretim süreçlerini tanımlamış; Sousa vd. (2019) ise, Vero hücrelerinde *Peste des petits ruminants* virüsü (PPRV) üretimi için mikrotasıyıcılar ve perfüzyon sistemlerini entegre ederek ölçeklenebilir bir biyoproses geliştirmiştir. Ayrıca, son zamanlarda Vero hücrelerinin serumsuz ortamda süspansiyon kültürüne başarılı şekilde adapte edilebildiği de bildirilmiştir (Shen vd., 2019; Kiesslich vd., 2021). Örneğin Vero hücrelerinde Cytodex-1 kullanılarak gerçekleştirilen süspanse kültür sistemi çalışmalarında 7 litre (L) hacimli biyoreaktörde $5,6 \times 10^9$ canlı hücreye ulaşılmış ve 4 L virüs süspansiyonu elde edilmiştir. Sun vd. (2004), biyoreaktörde gerçekleştirilen bu işlemle viral antijen üretiminin T150 flask kültürlerine göre yaklaşık üç kat arttığını bildirmiştir. Başka bir çalışmada, 1 L biyoreaktörde Cytodex-1 kullanılarak yapılan viral üretimin adherent kültüre kıyasla 29 kat daha yüksek olduğu raporlanmıştır. Bu 1 litrelik üretimin 15 cm'lik 1284 kültür plağı ile aynı miktara denk geldiği saptanmıştır (Todesco vd., 2024). Bu bulgular, adherent hücre hatlarının mikrotasıyıcı destekli biyoreaktör sistemlerine adapte edilmesinin endüstriyel aşı üretiminde önemli avantajlar sağlayabileceğini göstermektedir.

Bununla birlikte, literatürde CRFK hücre hattının mikrotasıyıcı destekli süspansiyon sistemine adaptasyonuna ve bu sistemde virüs üretimine dair sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Bu nedenle CRFK hücre hattının Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcılarına adaptasyon çalışmalarının yürütülmesi ve FCV üretiminin gerçekleştirilmesi hem hücre biyolojisi hem de veteriner aşı üretim teknolojileri açısından önemli bir literatür boşluğunu doldurmaktadır. Özellikle biyoreaktör tabanlı üretim sistemlerine geçiş, süreçlerin ölçeklenebilirliği ve endüstriyel aşı üretiminin sürdürülebilirliği açısından elzemdir. Dolayısıyla CRFK hücre hattının bu tür alternatif sistemlere adaptasyonu ve bu sistemde FCV üretimi kilit rol oynamaktadır. Bu tez çalışması söz konusu boşluğun giderilmesine katkı sağlayarak gelecekteki endüstriyel uygulamalara bilimsel bir temel oluşturmayı hedeflemektedir.

Biyoreaktörlerde HEK293T ve Vero hücrelerinin mikrotasıyıcı sistemlerde üretiminin tanımlanmış olması, Vero hücrelerinin mikrotasıyıcılarla PPRV üretiminde ölçeklenebilir bir biyoprosesin geliştirilmiş olması ve Vero hücrelerinin serumsuz ortamda süspansiyon kültürüne başarılı şekilde adapte edilebilmesi gibi (Shen vd., 2019; Kiesslich vd., 2021; Yang vd., 2019; Sousa vd., 2019) son yıllarda yapılan çalışmalar, gelecekte viral aşı üretiminde bu sistemlerin daha yaygın kullanılabileceğini göstermektedir. Literatürde, 1 L biyoreaktörde mikrotasıyıcı kullanılarak elde edilen viral verimin geleneksel plak kültürüne kıyasla 29 kat daha yüksek olduğu bildirilmiştir (Todesco vd., 2024). Tüm bu bulgular, adherent hücre hatlarının mikrotasıyıcı destekli biyoreaktör sistemlerine adapte edilmesinin endüstriyel aşı üretiminde maliyet, zaman ve verim açısından ne denli büyük avantajlar sağlayabileceğini açıkça ortaya koymaktadır.

Ancak literatür incelendiğinde, Vero ve HEK293T gibi standart hücre hatlarının dinamik kültür sistemlerindeki adaptasyon süreçleri geniş ölçüde tanımlanmış olsa da FCV üretiminde kritik bir hücre olan CRFK hücrelerinin mikrotasıyıcılarla süspansiyon kültürüne adaptasyonuna dair belirgin bir boşluk bulunmaktadır. Bu çalışma, CRFK hücrelerinin Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcılarla süspansiyon kültüründeki adaptasyon sürecini ve uygun mikrotasıyıcı ile FCV üretimini gerçekleştirerek literatürdeki eksikliği gidermeyi hedeflemektedir. Böylece aşı endüstrisinde teknolojik açıdan binlerce flask yerine tek bir biyoreaktörde dengeli proses kontrolü sağlanarak üretim kontrol edilebilecek ve üretim süresi kısalabilecektir. Bu durum ayrıca iş gücü ihtiyacının minimuma indirilmesine olanak tanıyacaktır. Sonuç olarak bu çalışma, FCV aşılarının endüstriyel ölçekte, yüksek verimli ve standardize bir şekilde üretilmesi için literatüre ticari olarak uygulanabilir ve özgün bir model kazandırmayı amaçlamaktadır.

Çalışmada, CRFK hücre hattının Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcıları kullanılarak süspansiyon kültür sistemine adapte edilip edilemeyeceği araştırılmıştır. Ayrıca, hücre çoğalması ve mikrotasıyıcılara tutunma performansı açısından Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcıları değerlendirilmiştir. Uygun mikrotasıyıcı sisteminde FCV üretiminin uygulanabilirliği ve virüsün çoğalma kinetiğinin nasıl şekillendiği incelenmiştir.

Bu kapsamda, çalışmanın hipotezi; CRFK hücre hattının mikrotasıyıcı tabanlı

süspansiyon kültür sistemine adaptasyonunun başarıyla gerçekleştirilebileceği ve bu sistemin FCV üretimi için uygun bir model sağlayacağı yönündedir.

Çalışmanın amacı, FCV aşısı üretim proseslerinin endüstriyel ölçek büyütme potansiyelini artırmak için yenilikçi bir hücre kültürü adaptasyon modeli geliştirmektir. Bu kapsamda, CRFK hücrelerinin Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcı yüzeylerine tutunma, çoğalma ve canlılığını sürdürme performansları incelenmiştir. Ayrıca seçilen mikrotasıyıcıda üretilen CRFK hücrelerinde FCV üretim kapasitesi değerlendirilmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen verilerin, kedi viral aşılarının geliştirilmesi ve üretim süreçlerinde kullanılabilecek ölçeklenebilir hücre kültürü sistemlerinin oluşturulmasına katkı sağlaması beklenmektedir. Bu doğrultuda çalışmanın hedefleri aşağıda sıralanmıştır:

- CRFK hücrelerinin Cytodex-1 ve Cytodex-3 kullanılarak mikrotasıyıcı tabanlı süspansiyon kültür sisteminde çoğalma kapasitesi, canlılık oranı ve morfolojik özellikleri değerlendirilecektir.
- Optimize edilmiş sistemde FCV enfeksiyonu gerçekleştirilecek ve elde edilen viral titreler TCID₅₀ yöntemi ile kantitatif olarak analiz edilecektir.
- Elde edilen veriler doğrultusunda, mikrotasıyıcı bazlı süspanse kültür sistemlerinin FCV üretimi açısından potansiyel uygulamaları ve avantajları ortaya konulacaktır.
- Kedi virüslerinin daha verimli ve sürdürülebilir şekilde üretilmesine olanak sağlayabilecek alternatif bir üretim platformu oluşturulması hedeflenmektedir.

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Hücre Kültürü Sistemleri ve Biyoproses Gelişimi

2.1.1. Temel Hücre Kültürü ve Tek Katmanlı Sistemler

Hücre kültürlerinde *in vitro* yöntemler, hücresel davranış mekanizmalarının anlaşılması için sıklıkla kullanılır. Bu davranışlar arasında hücre farklılaşması, göçü, büyümesi ve mekaniği yer alır; tüm bunlar biyokimyasal ve biyomekanik mikroçevreden etkilenmektedir (Huh vd., 2011).

Yüzyıldan uzun süredir iki boyutlu hücre kültürleri, biyofiziksel ve biyokimyasal uyaranlara verilen hücresel yanıtları incelemek için *in vitro* modeller olarak kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlar yaygın olarak kabul görmüş ve hücre davranışına ilişkin anlayışımızı önemli ölçüde ilerletmiştir. Ancak bazı durumlar, monolayer sistemlerin *in vivo* yanıtta önemli ölçüde sapma gösteren hücresel biyolojik aktivitelere yol açabileceğini göstermektedir. Bu sınırlamaları aşmak ve *in vivo* koşulları daha iyi taklit etmek üzere yeni 3D (süspanse) hücre kültürü platformları oluşturulmaktadır (Duval vd., 2017).

Virüslerin çoğaltılması ve üretimi için uygun hücre kültürü sistemlerinin kullanılması gerekmektedir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan adherent hücre kültürleri, hücrelerin düz yüzeylere tutunarak çoğalmasına dayanan *in vitro* sistemlerdir ve araştırmalarda temel oluşturmaktadır (Baust vd., 2017). Monolayer geleneksel kültür sisteminde flask (maksimum yüzey alanı: 225 cm²), rolling şişe (maksimum yüzey alanı: 1750 cm²) ve CellFactory (maksimum yüzey alanları: 6320 cm², 25.280 cm²) gibi küçük ölçekli sistemler bulunmaktadır. HYPERStack hücre kültürü kabı gibi daha yeni gelişmiş ve belirli bir ölçeklendirmeye kadar hacmi artırılmış sistemler de mevcuttur (Castillo vd., 2013). Tüm bu sistemler geniş kullanım alanlarına sahiptir ancak iki boyutlu yapıda olmaları nedeniyle önemli sınırlamalar taşımaktadır. Hücrelerin *in vivo* ortamında bulunan hücre-hücre ve hücre-matriks etkileşimlerinin yeterince taklit edilememesi, hücresel davranışın ve fizyolojik yanıtların doğal koşullardan sapmasına neden olmaktadır (Duval vd., 2017). Ayrıca düşük yüzey/hacim oranı ve kültür ortamındaki heterojenlik gibi faktörler, hücre büyümesini ve üretim verimliliğini olumsuz yönde etkileyebilmektedir (Derakhti vd., 2019).

2.1.2. Süspansiyon Kültür Sistemleri ve Viral Üretim

Capstick ve arkadaşları 1962 yılında, süspansiyon kültürü elde etmek için BHK21 hücrelerini veteriner aşı üretiminde kullanmışlardır (Capstick vd., 1962). Van Wezel 1967 yılında, geleneksel kültür sistemlerinin sınırlamalarını aşmak amacıyla mikrotasıyıcıları tanıtmış ve hücrelerin biyoreaktör ortamında çoğaltılmasını sağlamıştır (van Wezel, 1967).

Biyoreaktörlerde süspanse kültür sistemlerinin gelişmesiyle mikrotasıyıcı sistemlerin kullanımı yaygınlaşmıştır. CHO (Çin hamster yumurtalık) hücre hattı 1980'lerden sonra, süspanse hücre hattı halinde çoğaltılmıştır. Biyoreaktörlerde süspanse hücre üretim kapasitesi 20. yüzyılın sonlarına doğru 10.000 L'lik bir ölçeğe ulaşmıştır (Griffiths, 1990). Günümüzde fed-batch kültür (Gutiérrez-Granados vd., 2018), perfüzyon kültürü (Teworte vd., 2021) ve genetik mühendisliğin (Pino vd., 2020) ilerlemesiyle biyoreaktörler; hücrelerin çeşitli viral vektörler, canlı virüsler ve virüs bazlı aşılar üretmek için kullanıldığı bir platform haline gelmiştir. Böylelikle biyoreaktörler geleneksel sistemlerin sınırlamalarını aşarak daha geniş bir uygulama alanı oluşturmuştur (Von den Eichen vd., 2021).

2.1.3. Mikroteknoloji Taşıyıcıları ve Cytodex Dinamikleri

1967 yılında van Wezel, geleneksel kültür sistemlerinin sınırlamalarını aşmak amacıyla mikrotasıyıcıları tanıtmıştır. Mikrotasıyıcılar genellikle 90–350 µm çapında mikro boncuklardır. Hücreler bu mikro boncukların yüzeyine tutunarak çoğalmaktadır. Mikrotasıyıcılar, yüksek yüzey/hacim oranı sayesinde daha düşük hacimlerde daha yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılmasına imkân tanımaktadır (Alfred vd., 2011; Healthcare vd., 2005).

Monolayer kültür sistemi sınırlamalarının aşılması amacıyla geliştirilen mikrotasıyıcı tabanlı hücre kültürü sistemleri, adherent hücrelerin süspansiyon ortamına benzer koşullarda büyütülmesine olanak sağlamaktadır. Bu sayede süspansiyon ve adherent kültür sistemlerinin avantajlarını bir arada barındırarak büyük ölçekli üretime imkân tanımaktadır (Blüml, 2007). Bu sistemler, aşı endüstrileri tarafından Vero veya MDCK (Madin-Darby Köpek Böbrek Hücre Hattı) hücreleri kullanılarak 6000 L'lik biyoreaktörlerde viral aşının rutin üretiminde kullanılmaktadır. Mikrotasıyıcı tabanlı kültür sisteminin bir diğer avantajı homojen olmasıdır.

Bu durum pH, sıcaklık, oksijenin parsiyel basınç parametrelerinin izlenebilir ve kontrol edilebilir olmasına olanak sağlamaktadır (Barrett vd., 2009). Aşıya olan talebin artmasıyla birlikte, hücre kültürü temelli virüs aşılarının üretim sürecinde geleneksel aşı üretiminin eksikliklerinin üstesinden gelmek için bir dizi teknolojik iyileştirmeye ihtiyaç duyulmaktadır.

Tüm bu nedenlerden dolayı mikrotasıyıcı teknolojisi günümüzde influenza (Kistner vd., 1999; Barrett vd., 2009) ve kuduz (Montagnon vd., 1999) aşılarının üretiminde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Mikrotasıyıcı tabanlı hücre kültürü; hücre bağlanması, çoğalması ve ayrılması olmak üzere önemli dinamikler içermektedir. Hücrelerin mikrotasıyıcılara bağlanma aşaması, sürecin verimliliği açısından çok önemlidir (Bock vd., 2009; Forestell vd., 1992). Çünkü düşük hücre bağlanma oranı ve verimsiz virüs ekimi, sonuçta verimin azalmasına neden olur. Buna ek olarak hücrelerin mikrotasıyıcılara yeterince iyi bağlanmamaları, mekanik stres faktörlerinden etkilenerek mikrotasıyıcılardan ayrılmasına yol açmaktadır (Derakhti vd., 2019).

Mikrotasıyıcıların yüzey özellikleri, hücre adezyonu ve proliferasyonu üzerinde doğrudan etkilidir. Cytiva (2020) verilerine göre Cytodex-1 (C-1) ve Cytodex-3 (C-3) mikrotasıyıcıları yüzey yapıları bakımından farklılık göstermektedir. C-1, pozitif yüklü iyonik gruplar içeren bir dekstran matrisine sahip olup hücrelerin elektrostatik etkileşimlerle bağlanmasını sağlarken; C-3, yüzeyinde bulunan denatüre kolajen tabakası sayesinde hücrelerin daha fizyolojik ve güçlü bir şekilde tutunmasına olanak tanımaktadır. Özellikle epitel benzeri hücre hatlarında, biyolojik yüzey yapısı nedeniyle C-3'ün hücre adezyonu ve canlılığı açısından daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (Tablo 2.1) (Cytiva, 2020).

Çizelge 2.1. Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcılarının karşılaştırılması (Cytiva, 2020).

Parametre	Cytodex 1	Cytodex 3
Bağlanma Yüzeyi	İyonik	Biyolojik
Yoğunluk (g/mL)	1,03	1,04
Yaklaşık Alan (cm ² /g)	3000	2000
Şişme Faktörü (mL/g)	20–25	15–18
Sedimentasyon Hızı (cm/saat)	90	120

2.1.4. CRFK Hücre Hattının Adaptasyon Potansiyeli

Evcil kediler (*Felis catus*) dünya çapında yaygın olarak beslenmektedir (Tanaka vd., 2026). Sürekli hücre hatları, günümüz biyomedikal ve veteriner bilimlerinde vazgeçilmez bir araçtır. Evcil bir kedinin böbreklerinden elde edilen Crandell-Rees Kedi Böbrek hücreleri (Crandell vd., 1973; Lawson vd., 2019); kedi kalısivirüsü (Sosnovtsev vd., 2003; Bidawid vd., 2003; Tian vd., 2015), kedi immün yetmezlik virüsü (FIV) (Siebelink vd., 1995; Verschoor vd., 1995; Baldinotti vd., 1994; Mizuno vd., 2001), kedi koronavirüsü (Drechsler vd., 2020; Camero vd., 2022; Baumann vd., 1998; Shimode vd., 2015; Shimode vd., 2022) gibi çeşitli kedi endojen retrovirüsleri de dahil olmak üzere çok sayıda virolojik çalışmada ve aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır (Lappin vd., 2005; Whittemore vd., 2010; Yoshikawa vd., 2010).

Ayrıca normal kedi hücrelerinin otozom sayısı $2n = 38$ iken, CRFK hücrelerinin anöploidi ($2n = 37$) sergilediği, üç işaretleyici kromozom içeren karakteristik bir karyotip gösterdiği (Lasfargues vd., 1976) ve her hücrede kromozom sayısının 36 ile 38 arasında dalgalandığı bilinmektedir. CRFK hücre hattı, dünya çapındaki laboratuvarlarda onlarca yıldır pasajlanmakta ve sayısız bilimsel araştırmaya olanak sağlamaktadır (Tanaka vd., 2026). Bu kapsamda FCV üretimi, CRFK hücrelerinde mikrotasıyıcı bazlı süspansiyon kültür sistemleri kullanılarak değerlendirilmiştir.

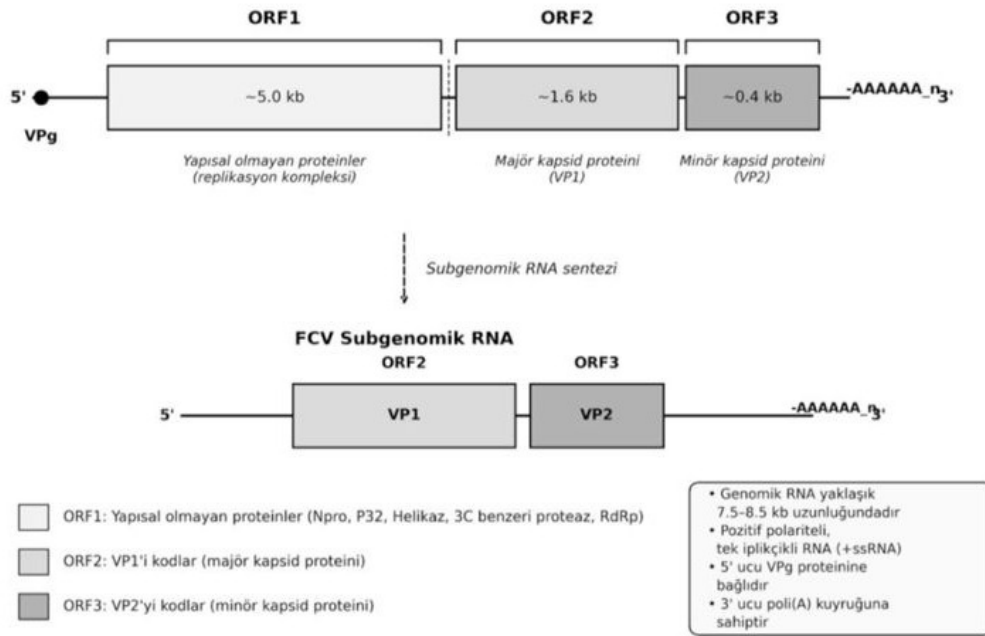
2.2. Feline Calicivirus (FCV) Moleküler Biyolojisi ve İmmünizasyon

2.2.1. Viral Yapı ve Genomik Organizasyon

- Alem (Realm): *Riboviria*
- Krallık (Kingdom): *Orthornavirae*
- Filum (Phylum): *Pisuviricota*
- Sınıf (Class): *Pisoniviricetes*
- Takım (Order): *Picornavirales*
- Aile (Family): *Caliciviridae*
- Cins (Genus): *Vesivirus*
- Tür (Species): *Vesivirus felis* (Yaygın adıyla *Feline calicivirus*) (International Committee of Taxonomy of Viruses, 2026).

FCV, *Caliciviridae* ailesinde *Vesivirus* cinsine ait, zarfsız, tek sarmallı, pozitif polariteli bir RNA virüsüdür (Henzel vd., 2012). FCV'nin genomu yaklaşık 7,5-8,5 kb arasındadır (Sosnovtsev vd., 2002). *Caliciviridae* ailesi, norovirüsler gibi önemli insan patojenlerini içerdiği gibi tavşan hemorajik hastalığı virüsü ve Avrupa kahverengi tavşan sendromu virüsü dahil olmak üzere hayvanlara özgü virüsleri de barındırır. *Caliciviridae* adı, FCV'nin üzerindeki karakteristik yüzey çukurlarını vurgulayarak Latince "kase" anlamına gelen *calyx* kelimesinden türetilmiştir (Hofmann-Lehmann vd., 2022). FCV'de RNA'ya bağımlı RNA polimerazın düzeltme mekanizmasının bulunmaması nedeniyle sık mutasyonlar meydana gelmekte; bu durum yüksek genetik esnekliğe ve konak bağışıklık baskısına hızlı adaptasyona katkıda bulunmaktadır (Vinjé vd., 2019). Viral genom, işlevsel açıdan ORF1, ORF2 ve ORF3 olmak üzere üç açık okuma çerçevesi içermektedir. ORF1, büyük bir poliprotein üretiminden sorumludur. Bu poliprotein daha sonra viral replikasyon süreçlerinde önemli rolleri bulunan ve RNA'ya bağımlı RNA polimerazı (RdRp) da içeren altı adet yapısal olmayan proteinin sentezlenmesinden sorumludur (Sosnovtsev vd., 2002). ORF2 ve ORF3 virüsün yapısal öğelerini kodlar. Bu bölgeler genomik RNA üzerinde yer alırlar ancak enfeksiyonun geç evrelerinde subgenomik bir RNA (sgRNA) molekülü

üzerinden eksprese edilirler. ORF2 kapsid protein geni (LC) ile virion yapısının majör bileşeni olan ana kapsid proteinini (VP1) kodlarken; ORF3, minör kapsid proteini olan VP2'nin sentezini gerçekleştirmektedir (Şekil 2.1) (Cubillos-Zapata vd., 2020). VP2, virüsün kapsülünün açılmasında ve viral RNA'nın konakçı sitoplazmasına salınmasında doğrudan rol oynamaktadır (Conley vd., 2019). Vesivirus cinsine özgü bir protein olan LC, viral proteinaz aracılığıyla proteolitik işlenmeye uğrayarak olgun kapsid proteinine dönüştürülmektedir. Ayrıca LC'nin CRFK hücre kültürlerinde sitopatik etki için gerekli olduğu bildirilmiştir (Abente vd., 2013).



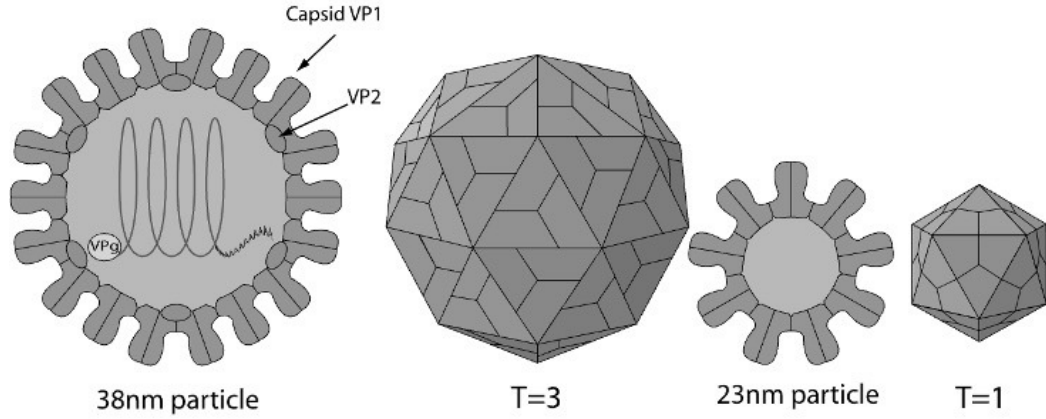
Şekil 2.1. Kedi kalısivirüsünün genomik yapısına genel bakış. Şemada, pozitif polariteli, tek iplikçikli genomik RNA (gRNA) üzerinde yer alan açık okuma çerçeveleri (ORF1, ORF2 ve ORF3) ile subgenomik RNA sentezi gösterilmiştir. ORF1, replikasyon kompleksini oluşturan yapısal olmayan proteinleri (p5.6, p32, helikaz, 3C-benzeri proteaz ve RdRp) kodlarken, ORF2 majör kapsid proteinini (VP1), ORF3 ise minör kapsid proteinini (VP2) kodlamaktadır. Yaklaşık 7,5–8,5 kb uzunluğundaki genomik RNA'nın 5' ucu VPg proteinine ile kovalent olarak bağlı olup 3' ucunda poli(A) kuyruğu bulunmaktadır. gRNA: genomik RNA; RdRp: RNA'ya bağlı RNA polimeraz (Wei vd., 2024)

Ana kapsid proteini olan VP1, virüsün konakçı hedef hücrelerine giriş mekaniz-

masında önemli bir rol oynamaktadır. Literatürde VP1'in antijenik varyasyon gösteren bölgeler barındırdığı ve bu bölgelerin hücre yüzey reseptörü fJAM-A ile etkileşime girdiği bildirilmektedir. Hücreler arası sıkı bağlantılarda görevli olan fJAM-A reseptörünün viral enfeksiyon nedeniyle yapısal bütünlüğünü kaybetmesi ağız ve deri ülserlerinin patogenezi ile ilişkilen dirilmiştir. Güncel araştırmalar da FCV'nin konakçı hücrelerine giriş için klatrin aracılı endositozu yolak olarak kullandığını ortaya konulmuştur. Endozomların asitleşmesi viral genomun kapsid dışına salınması aşamasında gerekli olduğu saptanmıştır görmektedir (Stuart ve Brown, 2006). VP1 ile VP2 arasındaki bu koordineli etkileşim, viral partikülün hem yapısal bütünlüğünün korunması hem de enfeksiyon işlevini başarıyla tamamlaması için önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, nötralize edici ve nötralize edici olmayan antikorlar tarafından tanınan doğrusal epitopların büyük kısmı VP1'in farklı bölgelerinde saptanmıştır (Cubillos-Zapata vd., 2020). FCV izolatları arasında gözlenen bu yoğun antijenik varyasyonlar, sahada geniş spektrumlu aşı çapraz korumasının sağlanmasında zorluklar oluştursa da suşlar arasındaki antijenik varyasyonlar bir miktar çapraz korumaya imkân tanımaktadır (Yang vd., 2023).

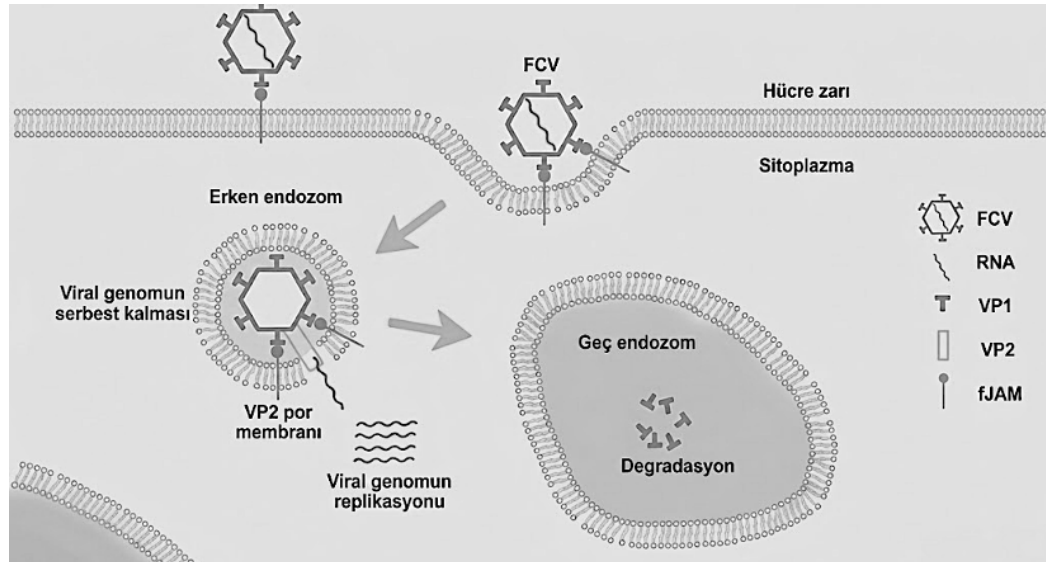
2.2.2. FCV Replikasyon Döngüsü ve Hücre İçi Kinetiği

FCV, VP1 majör kapsid proteini ve VP2 minör kapsid proteininden oluşan zarfsız, ikosahedral simetriye sahip bir kapsid yapısı taşımaktadır. FCV partikülleri çoğunlukla yaklaşık 27–40 nm çapında T=3 ikosahedral simetri gösterirken, daha küçük T=1 partiküller de oluşabilmektedir (Şekil 2.2). Genom, VPg proteini ile bağlantılı pozitif polariteli tek iplikli RNA (+ssRNA) yapısındadır (Prasad vd., 1994; Ossiboff, 2010).



Şekil 2.2. Kedi kalisivirüsünün yapısal organizasyonunun şematik gösterimi (ViralZone, 2026).

FCV, hücreye giriş sürecinde diğer zarfsız RNA virüslerine benzer şekilde reseptör aracılı endositoz yoluyla hücre içine alınmaktadır (Kalia ve Jameel, 2011). FCV enfeksiyonu, ilk olarak konak hücre yüzeyindeki fJAM-A reseptörüne bağlanarak başlar. Daha sonra klattrin bağımlı endositoz yoluyla endozomlara girer, VP2 tarafından endozom zarlarında oluşturulan gözenekler aracılığıyla gRNA'yı sitoplazmaya salar ve sitoplazmada genomik RNA replikasyonu başlar. Bu arada, kapsid proteinleri geç endozomlarda parçalanır (Şekil 2.2) (Sun vd., 2004).



Şekil 2.3. FCV'nin hücre içine alımı ve salınımının şematik gösterimi (Sun vd.,2004).

Virüsün başarılı bir enfeksiyon oluşturabilmesi için genomik RNA'nın (gRNA) uygun zamanda endozomal ortamdan sitoplazmaya aktarılması gerekmektedir. Geç endozomlara ilerleyen virüs partikülleri, düşük pH ve proteolitik enzimlerin etkisiyle parçalanabileceğinden enfeksiyon başarısızlıkla sonuçlanabilmektedir (Hernández vd., 2016). Yapılan çalışmalar, FCV'nin gRNA salınımının erken endozom aşamasında gerçekleştiğini ve pH 6,2 koşullarında viral genomun kapsidden ayrıldığını göstermiştir. Daha düşük pH değerlerinde ise virüs partiküllerinde agregasyon ve yapısal bozulmalar meydana geldiği, bunun da düzenli genom salınım sürecini olumsuz etkilediği bildirilmiştir. FCV'de kapsid proteinlerinden VP2'nin, reseptör etkileşimi sonrası oluşan port benzeri yapılar sayesinde genom salınımında rol aldığı ve viral penetrasyon peptidi olarak görev yaptığı gösterilmiştir (Sosnovtsev vd., 2005; Conley vd., 2019). VP2 proteininin hidrofobik N-terminal bölgesinin endozomal membranda küçük gözenekler oluşturarak gRNA'nın sitoplazmaya aktarılmasını sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca bu bölgedeki aminoasit değişikliklerinin gRNA salınım hızını azalttığı ve enfeksiyon sürecini etkilediği ortaya konmuştur. Bu bulgular, FCV'nin hücreye giriş ve genom aktarım mekanizmasında VP2 proteininin kritik bir rol oynadığını göstermektedir (Sun vd., 2004).

2.2.3. Epidemiyoloji ve Genetik Varyasyon

FCV evcil kediler arasında yaygındır ve kedigiller dışında bilinen bir rezervuar konağı bulunmamaktadır. FCV zoonoz değildir. FCV benzeri yapısal özellik gösteren virüsler ara sıra köpeklerden izole edilmiştir; izole edilen bu virüslerin hem köpeklerde hem de kedilerde FCV epidemiyolojisindeki rolleri belirsizdir. FCV, akut hastalığı olan kedilerin kanlarında, dışkılarında ve idrarlarında bulunmaktadır. Ancak enfeksiyonun yayılımı öncelikle ağız ve burun salgıları yoluyla. Enfeksiyonu takiben kediler en az 30 gün boyunca virüs saçılımına devam edebilmektedir. Bazı kedilerde virüs saçılımı birkaç yıl hatta ömür boyu sürebilmektedir. FCV hem akut enfeksiyon geçiren kedilerde hem de enfeksiyonu takiben iyileşmiş kedilerde persiste enfeksiyon olarak kalabilmektedir. Virüs çevre koşullarına karşı oldukça dirençlidir. Oda sıcaklığında kuru yüzeylerde günlerce hatta haftalarca, daha soğuk ve nemli yüzeylerde ise daha da uzun süre hayatta kalabildiği bildirilmiştir (Nims ve Plavsic, 2013).

FCV enfeksiyonunu maternal antikorlar belirli bir ölçüde engeller. Maternal antikorlar veya aşılama yoluyla oluşan mevcut bağışıklık, klinik semptomları azaltabilir veya ortadan kaldıracaktır. Ancak enfeksiyonun oluşumunu tamamen engellemez ve aşılanmış veya doğal olarak bağışıklık kazanmış kediler, subklinik enfeksiyondan sonra taşıyıcı olabilmektedir. Bu durum hastalığın epidemiyolojisinde asemptomatik taşıyıcıların önemini vurgulamaktadır. Yüksek sirkülasyona sahip barınaklarda, çok kedili evlere oranla FCV'nin daha yüksek genetik varyasyon sergilediği bildirilmiştir (Pereira vd., 2018). Çevresel kontaminasyon ve fomitler aracılığıyla indirekt bulaş; kedi barınaklarında, sığınaklarda ve veteriner kliniklerinde risk faktörüdür. Ayrıca FCV'nin insanlar, aerosoller ve pire dışkı yoluyla yayılma potansiyeli bulunmaktadır (Spiri vd., 2019).

FCV'nin kontrolünde aşılama çok önemlidir. Attenüe ve inaktif aşılar dahil olmak üzere çeşitli aşı türleri bulunmaktadır (Bordicchia vd., 2021). Özellikle yoğun kedi popülasyonunun bulunduğu ortamlarda FCV yayılımını kontrol altına almak için hijyenik önlemlerin alınması ve etkili dezenfeksiyon yöntemlerinin uygulanması önemlidir (Radford vd., 2009).

Kedi kalısivirüsü ilk defa 1957 yılında Yeni Zelanda'da; üst solunum yolu belirtileri, oral ülserler ve ateş gibi klinik belirtiler sergileyen kedilerin bağırsak dokusundan izole edilmiştir (Fastier, 1957). Bugün FCV, evcil kedilerde genetik ve antijenik çeşitliliğiyle bilinen ve dünya çapında yaygınlık gösteren önemli bir viral patojendir.

FCV üzerine gerçekleştirilen genetik çeşitlilik ve viral evrim çalışmaları, suş farklılaşması için %20'lik bir filogenetik uzaklığın sınır değeri olarak kabul edilebileceğini göstermektedir. Özellikle virülan sistemik hastalık salgınlarından elde edilen epidemiyolojik veriler genellikle %99 oranında benzerlik göstermektedir. Bu yüksek benzerlik oranları aynı suşun varyantlarını düşündürmektedir. FCV'nin endemik olduğu kedi kolonilerinde, tek bir suş içinde %18'e varan genetik varyanslar görülebilmektedir. FCV suşları hem zamansal hem de coğrafi düzeylerde belirgin bir genetik ve antijenik karmaşıklık sergilemekte olup, bu popülasyonlarda baskın tek bir saha suşunun bulunmadığı bildirilmektedir (Coyne vd., 2012). Yapılan çalışmalarda yıllık nükleotid (nt) ikame oranının tahmini olarak bireysel konaklarda $1,32 \times 10^2$ ile $2,64 \times 10^2$ arasında, popülasyonlar düzeyinde ise $3,84 \times 10^2$

ile $4,56 \times 10^2$ arasında değiştiği bildirilmiştir. Bu durum FCV'nin hızlı evrim geçirdiğini ve genetik yapısının sürekli değişim halinde olduğunu vurgulamaktadır (Pizarro-Lucero vd., 2025; Spiri, 2022). Bu veriler, FCV'yi tanımlanmış RNA virüsleri arasında en hızlı evrim oranına sahip virüs konumuna getirmektedir. Genetik dizi analizleri, yakın ilişkili izolatlar arasında önemli genetik heterojenlik olduğunu ortaya koymakta ve virüsün konakçı içinde bir kuazitür olarak varlığını sürdürdüğünü desteklemektedir. Ek olarak, hipervaryabl bölgeler üzerinden yapılan nükleotid ve aminoasit dizilerinin analiziyle FCV'nin iki gen grubuna ayrıldığı bildirilmiştir. Ayrıca genotip II izolatlarının yalnızca Japonya kökenli olduğu rapor edilmiştir (Sato vd., 2002).

FCV'deki viral evrim yalnızca farklı izolatlar arasındaki rekabetle ilişkilendirilemez. Virüsün duyarlı bir popülasyonda uzun süre hayatta kalabilmesi; rastgele mutasyonların zamanla birikmesi, reenfeksiyonlar ve rekombinasyon olayları ile ilişkilidir. Bu süreçler, genetik çeşitliliğin artmasına katkı sağlayarak potansiyel yeni suşların ortaya çıkmasına ve enfeksiyonun endemik karakter kazanmasına olanak tanımaktadır (Coyne vd., 2007).

FCV'nin Türkiye'deki epidemiyolojisi ile ilgili bilgiler sınırlıdır. Ancak son yapılan moleküler çalışmalar virüsün ülkede yaygın şekilde dolaşımda olduğunu ve belirgin bir genetik çeşitlilik gösterdiğini ortaya koymaktadır. Elazığ ve Ankara illerinde klinik belirti gösteren 40 kedi ile yapılan bir çalışmada, kedilerin 12'sinde FCV pozitifliği saptanmıştır. Ayrıca çalışmada, FCV'nin en sık tespit edilen viral ajan olduğu; bazı olgularda *Feline alphaherpesvirus 1*, *Feline panleukopenia virus* ve *Feline chaphamaparvovirus* ile koenfeksiyonların görüldüğü belirtilmiştir. Yapılan çalışmadaki filogenetik analizler, tüm FCV izolatlarının genotip I içerisinde kümelendiğini göstermiştir. Türk izolatlarının özellikle İtalya, Almanya, Amerika Birleşik Devletleri, Japonya ve Kore kökenli bazı suşlarla yakın genetik ilişki gösterdiği bildirilmiştir. Bununla birlikte incelenen Türk suşlarında %77–82 arasında değişen nükleotid benzerliği saptanmış olup bu durum, Türkiye'de dolaşan FCV suşlarının önemli düzeyde genetik farklılık taşıdığını ortaya koymaktadır. Çalışmada ayrıca aşıli kedilerde de FCV enfeksiyonunun tespit edildiği vurgulanmıştır. Araştırmacılar bu durumu, virüsün yüksek mutasyon kapasitesi ve sürekli devam eden viral çeşitlenme ile ilişkilendirmiştir. Bu nedenle mevcut saha suşlarının izlenmesi ve genomik surveyans

çalışmalarının sürdürülmesinin kritik olduğu belirtilmiştir (Albaylı vd., 2026).

2.2.4. FCV Enfeksiyonuna Karşı İmmünizasyon ve Aşılama Stratejileri

FCV enfeksiyonu sırasında virüsün yayılması ve klinik semptomların görülmeye başlanması, anti-FCV IgM antikorlarındaki artışla ilgilidir (Knowles vd., 1991). IgM yanıtının ilk artışı, virüs nötralizasyon aktivitesinin başlamasıyla eş zamanlı olarak ilerleyerek IgG antikorlarında hızlı bir artışa neden olmaktadır. Bu artış, IgG (İmmünoglobulin G) antikorlarının nötralizan kapasiteye temel katkıyı sağladığını, IgM antikorlarının ise erken evrede önemli rol oynadığını göstermektedir. Bununla birlikte, aşı kaynaklı antikorlar ile doğal yolla gelişen antikorları ayırt etmek güçtür. Ayrıca çalışmalar IgA (İmmünoglobulin A) antikorlarının varlığını hem tükürükte hem de serumda araştırmış; tükürükte, serumdan daha erken zamanda IgA antikorlarının tespit edildiğini gözlemlemiştir. Bu durum, tükürükteki IgA'nın FCV'ye karşı erken savunmada potansiyel bir rol oynayabileceğini göstermektedir (Spiri, 2022).

FCV enfeksiyonunda aşılama, enfeksiyonun yönetiminde kritik bir öneme sahiptir. FCV aşıları genellikle FHV (Kedi herpesvirüsü) veya FPV (Kedi panlökopeni virüsü) etkenleriyle birlikte karma aşı olarak uygulanmaktadır. Aşılama, şiddetli klinik belirtilere ve inflamasyona karşı koruma sağlamaktadır. Ayrıca aşı, viral yayılımının kontrol altına alınmasında da görev yapmaktadır. FCV için hem modifiye canlı aşı hem de inaktif aşılar ticari olarak mevcuttur. Kullanılan inaktive aşılar, içerdikleri yardımcı maddeler nedeniyle enjeksiyon bölgesinde sarkom oluşumu riski taşıyabilmektedir. Modifiye attenüe FCV aşılarının, mevcut suşların dolaşımına yol açarak bağışıklık sisteminden kaçan yeni varyantların oluşumuna katkı sağlayabileceği göz ardı edilmemelidir. mRNA (mesajcı RNA) aşıları ve subünit aşılar henüz ticari olarak mevcut değildir ancak gelecek için potansiyel taşımaktadır. Uygun aşılama aralıklarına karar vermek için kedilerin yaşı, sağlık durumu, yaşam tarzı ve barınma koşulları gibi etkenler dikkate alınmaktadır (Ford, 2016; Hofmann-Lehmann vd., 2022). Optimum tekrar aşılama aralıkları tartışmalıdır. Risk faktörüne göre üç yılda bir takviye aşısından yıllık takviye aşısına kadar değişen farklı öneriler bulunmaktadır. Yaygın olarak kullanılan aşılama programlarında, 8-9 ve 12 haftalıkken birincil dozların ve ardından yıllık takviye dozlarının uygulanması; iyileşmiş sağlıklı

kedilerin ise aşılınması önerilmektedir. Bu aşılama programının etkinliği tartışmalıdır. Mevcut bulgular, maternal kökenli antikorların yavru kedilerde 12. haftaya kadar kaldığını ve bu nedenle yavruların yeterli bağışıklık geliştiremediğini göstermektedir. Aşılama programı, maternal kökenli antikorların varlığı ve risk faktörleri dikkate alınarak yavru ve yaşlı kediler için değişiklik göstermektedir. FCV suşları arasındaki antijenik çeşitlilik ara sıra aşı başarısızlıklarına neden olabilmektedir. Bundan dolayı güncel aşı geliştirme stratejileri; çapraz reaktivitenin artırılması, viral yayılımın azaltılması ve persiste enfeksiyonların önlenmesi üzerine yoğunlaşmaktadır. Koruyuculuğu değerlendirmeye yönelik güvenilir biyobelirteçlerin bulunmaması ise aşı etkinliğinin belirlenmesinde deneysel enfeksiyon çalışmalarını gerekli kılmaktadır (Radford vd., 2007; Hofmann-Lehmann vd., 2022).

2.3. FCV Üretiminde Mevcut Sistemlerin Sınırlılıkları

FCV üretimi, başta yüzeye bağımlı hücre hatları olmak üzere memeli hücre kültür sistemlerine dayanmaktadır. Bu üretim süreçleri geleneksel olarak monolayer kültür sistemlerinde yürütülmektedir. Bu durum, hücrelerin büyümesi için geniş yüzey alanlarına ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Ancak bu sistemler, özellikle endüstriyel viral üretimde önemli sınırlılıklar içermektedir. Yüksek hacimlerde üretimler için yüksek sayılarda kültür kabı kullanılmalıdır; bu durum hem iş gücü ihtiyacını artırmakta hem de kontaminasyon riskini yükseltmektedir.

Hayvan hücrelerinin intrinsik olarak düşük üretkenliğe sahip olması, viral üretim süreçlerinde büyük hacimlerde kültür süpernatantına ihtiyaç duyulmasına neden olmaktadır. Bu durum üretim maliyetlerini artırmakta ve verimliliği sınırlayan ana faktörlerden biri olmaktadır. Ayrıca monolayer sistemlerde hücre yoğunluğu sınırlıdır ve genel olarak düşük hücre konsantrasyonlarında çalışılmaktadır. Bu da viral replikasyon kapasitesinin ideal düzeylerde değerlendirilmesini engellemektedir (Cytiva, 2020).

Geleneksel hücre kültürü sistemlerinin bir diğer dezavantajı ise proses parametrelerinin homojen yapıda sürdürülememesidir. Kültür süresince pH, çözünmüş oksijen, gaz değişimi ve besin gibi hayati faktörlerin eşit şekilde dağılım sağlamaması, viral üretim çıktılarında dalgalanmalara yol açabilmektedir. Bu durum partiler arası tekrarlanabilirlik açısından sorun yaratmaktadır. Ek olarak, mekanik ve kimyasal streslere karşı hücrele-

rin gösterdiği hassasiyet, özellikle büyük ölçekli üretimlerde hücre canlılığını olumsuz etkileyebilmektedir. Dolayısıyla viral verim düşmektedir (Cytiva, 2020).

Bu sınırlılıkları aşmak amacıyla uygulanan mikrotasıyıcı tabanlı kültür sistemleri, yüzeye bağımlı hücre hatlarının süspansiyon sistemler içerisinde üretilmesine olanak sağlamaktadır. Mikrotasıyıcı sistemlerde hücreler, biyoreaktör içindeki mikrotasıyıcıların yüzeylerine tutunarak büyümektedir. Yüksek yüzey alanı/hacim oranı ile birim hacim başına düşen yüzey alanında çok yüksek bir artış sağlanmaktadır. Elde edilen bu avantaj, aynı biyoreaktör hacminde çok daha yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılmasının önünü açarak viral üretim kapasitesini ciddi oranlarda artırabilmektedir. Cytiva (2020) verilerine göre, mikrotasıyıcı tabanlı sistemlerle yürütülen çalışmalarda hücre yoğunluklarının 2×10^8 hücre/mL seviyelerine kadar ulaşabildiği bildirilmektedir.

Tüm bu olumlu yönlerine rağmen mikrotasıyıcı sistemlerin de limitasyonlar barındırdığı unutulmamalıdır. Özellikle süreç optimizasyonu aşamasında kritik öneme sahip olan hücre tutunma verimi, karıştırma hızına bağlı oluşan hidrodinamik kesme gerilimleri, oksijen transferi ve difüzyonel engeller gibi parametreler yakından takip edilmelidir. Yüksek hücre yoğunluklarında besin tüketiminin artmasıyla metabolitlerin birikmesi, kültür ortamlarının hassas kontrol mekanizmalarıyla izlenmesini zorunlu kılmaktadır (Cytiva, 2020).

Sonuç olarak, FCV üretiminde kullanılan geleneksel monolayer sistemler; düşük hücre yoğunluğu, yüksek maliyet, sınırlı ölçeklenebilirlik ve artan kontaminasyon riski gibi dezavantajlar içermektedir. Bu nedenle, mikrotasıyıcı tabanlı süspanse kültür sistemlerinin geliştirilmesi ve optimize edilmesi, viral üretim verimliliğinin artırılması açısından önemli bir araştırma alanı olarak değerlendirilmektedir. Bu çalışmada, epitel karakterli CRFK hücre hattının Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcı sistemlerine tutunma performansının değerlendirilmesi, uygun tutunma ve inokülasyon koşullarının belirlenmesi ve bu koşullar altında FCV üretiminin incelenmesi amaçlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Virüs ve Hücre

Bu çalışmada konak hücre hattı olarak Dollvet Biyoteknoloji hücre bankasında bulunan Crandell Rees Feline Kidney (CRFK, DOLLL-1) hücreleri kullanıldı. Hücreler, %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum, FBS) (Cegroagen Biotech, Almanya) ile desteklenmiş Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) besiyerinde kültüre edildi ve %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de inkübe edildi.

Çalışmada kullanılan Feline calicivirus (FCV), Dollvet Biyoteknoloji virüs bankasında bulunan master seed virus (MSV)'den türetilmiş working seed virus (WSV) stoklarından elde edildi. Virüs stokları deneylerde kullanılıncaya kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

3.2. Mikrotaşıyıcı Hazırlığı

Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotaşıyıcıları (Cytiva, ABD), üretici firma talimatlarına uygun olarak 0.5 g tartılarak hazırlandı. Mikrotaşıyıcılar oda sıcaklığında en az 3 saat boyunca PBS içerisinde bekletildi. Daha sonra üstteki fazla PBS uzaklaştırılarak taze PBS ile birkaç defa yıkama işlemi yapıldı ve ardından sterilite için mikrotaşıyıcılar 115 °C'de 15 dakika otoklav edildi. Otoklav işleminin ardından fazla PBS uzaklaştırılarak DMEM besiyeri eklendi ve hücreler spinner flask'lara aktarıldı. CRFK hücrelerinin süspansiyon kültür koşullarında çoğaltılması amacıyla 125 mL hacimli spinner flask (Corning, Lot No: 21522001, ABD) kullanıldı. Toplam çalışma hacmi 100 mL olarak belirlendi ve kaplar manyetik karıştırıcıya yerleştirilerek karıştırma hızı 40 rpm olarak ayarlandı. Deney süresince tüm işlemler %5 CO₂ içeren inkübatörde 37 °C'de sürdürüldü.

3.3. Hücre Tutunma Deneyleri

CRFK hücrelerinin mikrotaşıyıcılara tutunması Yöntem-1 (Y-1) ve Yöntem-2 (Y-2) olmak üzere iki farklı yöntemle değerlendirildi. Yöntem-1'de hücreler doğrudan mikrotaşıyıcı içeren ortamda inkübe edildi. Yöntem-2'de ise hücreler santrifüj edildikten sonra spinner flask'lara eklendi ve Verbruggen vd. (2018) tarafından tanımlanan aralıklı karıştırma (*intermittent agitation*) yaklaşımına benzer bir yöntem uygulandı. Hücre tutunması 24., 48. ve 72. saatlerde görüntülendi ve hücre sayımı için süpernatanttaki ve

mikrotaşıyıcı yüzeyindeki hücrelere bakıldı. Hücre yoğunluğu ve canlılık oranı, Trypan Blue dışlama yöntemi kullanılarak belirlendi (Strober, 2015). Hücre süspansiyonu %0,4'lük Trypan Blue çözeltisi ile karıştırıldı ve hücre sayımı hemositometrik sayım yöntemi kullanılarak Bürker lamı üzerinde gerçekleştirildi. Sayımlar, ışık mikroskobu (Zeiss, Almanya) kullanılarak yapıldı. Boyayı almayan hücreler canlı, boyayı alan hücreler ölü olarak değerlendirildi.

Mikrotaşıyıcı yüzeyine tutunmuş hücrelerin belirlenmesi ve hücre yoğunluğunun değerlendirilmesi amacıyla nükleus boyama yöntemi kullanıldı. Bu amaçla hazırlanan nükleus boyama solüsyonu; 1 L son hacimde 1 g kristal viyole, 1 mL Triton X-100 ve 19,2 g sitrik asit kullanılarak hazırlandı. Boyama solüsyonu kültür örneklerine eklendikten sonra örnekler 37 °C'de %5 CO₂ içeren inkübatörde 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında mikrotaşıyıcılar üzerindeki boyanmış hücre çekirdekleri mikroskop altında görüntülenerek hücre tutunması ile dağılımı incelendi ve Bürker lamı kullanılarak sayım gerçekleştirildi. Elde edilen değerler, mikrotaşıyıcı başına düşen hücre sayısı ve toplam hücre yoğunluğunun belirlenmesinde kullanıldı.

3.4. Virüs İnokülasyonu

FCV inokülasyonunda, virüs partiküllerinin konak hücre reseptörleriyle temas olasılığını maksimum seviyeye ulaştırmak amacıyla Verbruggen vd. (2018) tarafından uygulanan yöntem modifiye edilerek bir adsorpsiyon fazı uygulandı. Virüs ekim işlemini takip eden ilk 2 saatlik adsorpsiyon periyodu boyunca; 30 dakika dinlenme / 3 dakika karıştırma periyodu yürütüldü.

3.5. Moleküler Teknikler

3.5.1. Viral Nükleik Asit Ekstraksiyonu

Çalışmada kullanılan örneklerin ekstraksiyon işlemi, RNA/DNA ekstraksiyon kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak üretici firma protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen nükleik asit örnekleri analiz aşamasına kadar -20 °C'de muhafaza edildi.

3.5.2. cDNA Sentezi

FCV cDNA sentezi, cDNA sentez kiti (Invitrogen, ABD) kullanılarak üretici firmanın

önerdiği protokol doğrultusunda gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA örnekleri konvansiyonel PCR analizinde kullanıldı.

3.5.3. Konvansiyonel PCR Analizi

FCV varlığının doğrulanması amacıyla PCR yöntemi uygulandı. Amplifikasyon reaksiyonlarında master mix kiti (Roche, İsviçre) kullanıldı. PCR reaksiyonları, LightCycler 480 PCR cihazında (Roche, İsviçre) gerçekleştirildi. PCR reaksiyon karışımı, toplam 25 µL hacimde olacak şekilde buz üzerinde sırasıyla şu bileşenlerle hazırlandı: 12,5 µL 2X Buffer (Master Mix), 1,0 µL Forward Primer, 1,0 µL Reverse Primer, 5,5 µL nükleaz içermeyen su (dH₂O) ve son olarak 5,0 µL kalıp cDNA. Reaksiyonun termal döngü koşulları şu şekilde yürütüldü: Başlangıç denatürasyonu için 95 °C'de 15 dakika bekletildi. Ardından; 94 °C'de 30 saniye denatürasyon, 55 °C'de 30 saniye primer bağlanması (*annealing*) ve 72 °C'de 1 dakika uzama (*extension*) basamaklarından oluşan döngü toplamda 35 kez tekrarlandı. 35 döngü bittikten sonra, son uzama aşaması olarak 72 °C'de 10 dakika daha bekletildi ve elde edilen PCR ürünleri agaroz jel elektroforezinde yürütüldü. FCV'ye özgü 671 bp büyüklüğündeki amplifikasyon ürünü pozitif sonuç olarak kabul edildi.

3.5.4. Agaroz Jel Elektroforezi

Agaroz jel uygun konsantrasyonda hazırlanarak etidyum bromür ile boyandı. PCR ürünleri yükleme tamponu ile karıştırılarak jel kuyucuklarına yüklendi. Bant büyüklüklerinin belirlenmesi amacıyla 100 bp DNA Ladder (GeneON, Almanya) kullanıldı. Elektroforez işlemi 120 V'da 45 dakika süreyle gerçekleştirildi. Yürütme işleminin tamamlanmasının ardından jel görüntüleri, görüntüleme sistemi (Bio-Rad, ABD) kullanılarak UV ışığı altında elde edildi. Oluşan bant profilleri FCV pozitifliği yönünden değerlendirildi.

3.6. İstatistiksel Analiz

Hücre tutunma verileri iki yönlü varyans analizi (Two-way ANOVA) ile değerlendirildi ve Y1-C1 ile Y2-C3 grupları arasındaki farklar Tukey testi ile analiz edildi. $p < 0,05$ değeri istatistiksel anlamlılık sınırı olarak kabul edildi. Viral titre ölçümleri 0,1 MOI'de üç bağımsız biyolojik tekrar üzerinden yürütüldü. Farklı zaman noktaları (12. ve 120. saat) arasındaki değişimin değerlendirilmesi amacıyla tek yönlü varyans analizi (One-way

ANOVA) uygulandı ve gruplar arasındaki çoklu karşılaştırmalar Tukey çoklu karşılaştırma testi ile gerçekleştirildi. İstatistiksel değerlendirmelerde $p < 0,05$ değeri anlamlılık sınırı olarak kabul edildi.

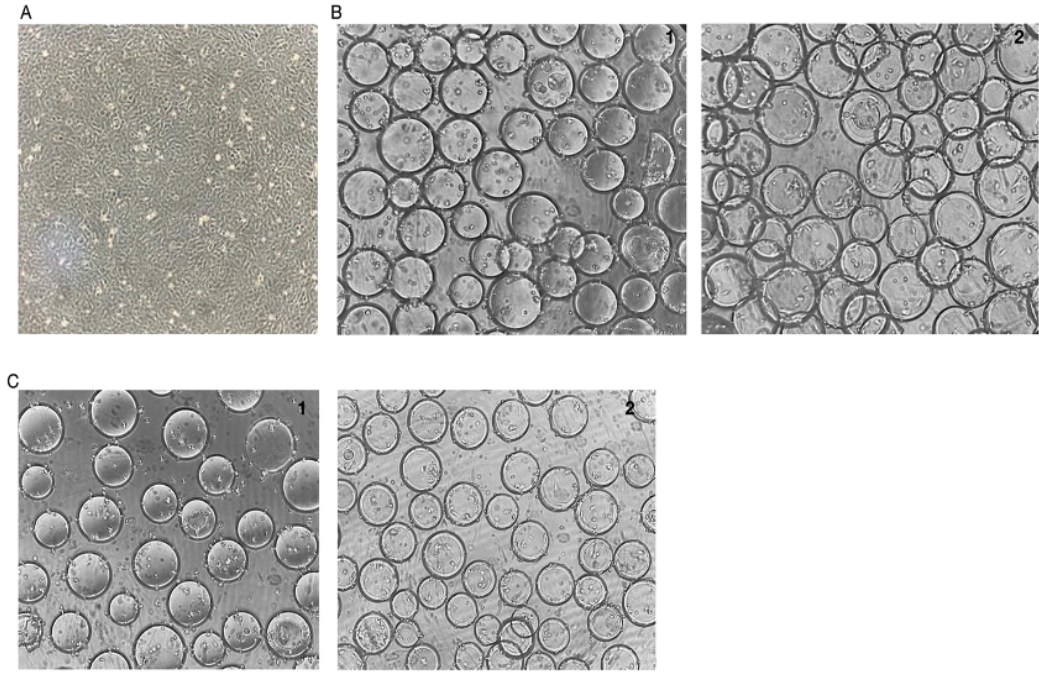
3.7. Büyüme Eğrisi

Spinner flask'larda Cytodex-3 kullanılarak CRFK hücreleri, Tutunma-2 yöntemine göre 1; 0,1; 0,01; 0,001 ve 0,0001 MOI'de enfekte edildi ve 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108, 120, 132, 144, 156 ve 168. saatlerde toplandı. Viral titreler, Spearman-Kärber yöntemi (Kärber, 1931; Spearman, 1908) ile TCID₅₀ testi kullanılarak belirlendi. Ölçülen viral titrelere dayanarak FCV'nin büyüme eğrisi çizildi.

4. BULGULAR

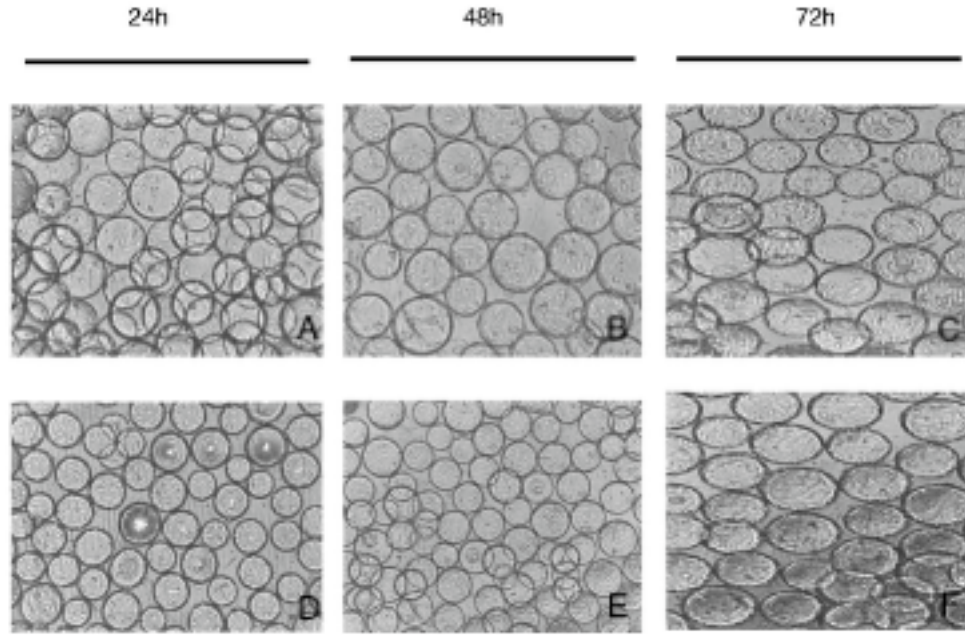
4.1. Hücre Tutunma

CRFK hücrelerinin mikrotasıyıcı yüzeylerine tutunma sürecinin erken dönem morfolojik özellikleri, tutunma sonrası 3. saatte elde edilen mikroskopik görüntülerle incelendi. Hücre tutunması, Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcıları kullanılarak uygulanan iki farklı kültür yöntemi kapsamında takip edildi ve elde edilen görüntüler Şekil 4.1’de gösterildi.

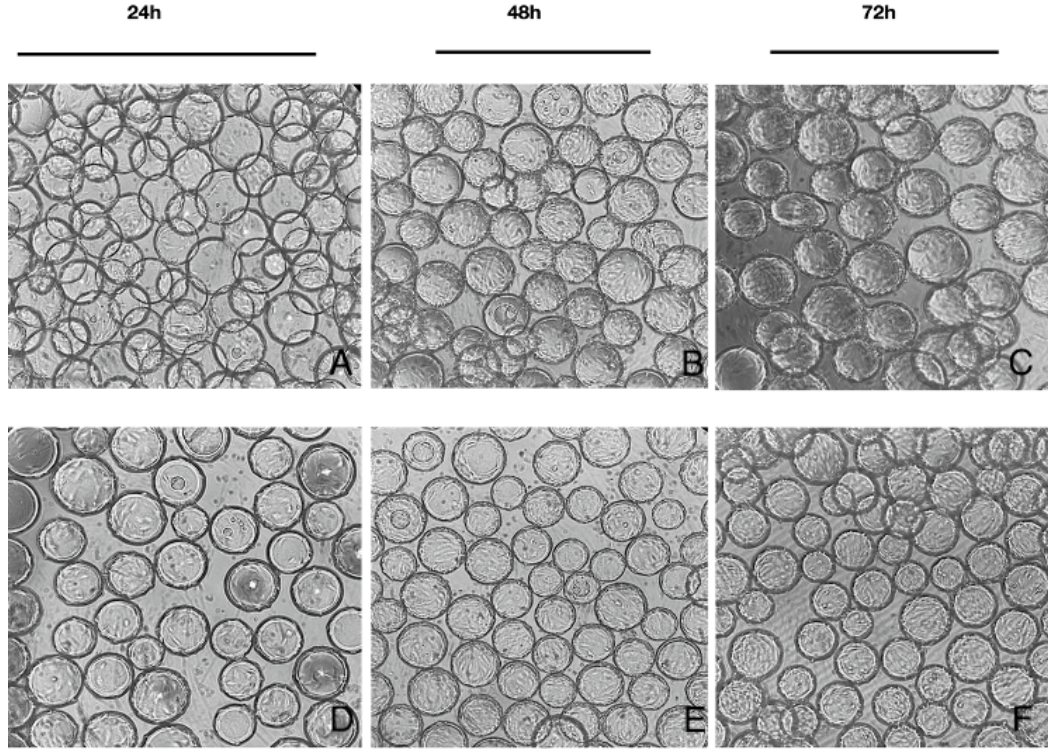


Şekil 4.1. CRFK hücrelerinin tutunma sonrası 3. saatteki ışık mikroskobu görüntüleri. A. Monolayer CRFK hücrelerinin görüntüsü. B. Yöntem 1’e göre spinner flaska aktarılan CRFK hücrelerinin 3. saatteki görüntüleri. B1. Cytodex-1; B2. Cytodex-3. C. Yöntem 2’ye göre spinner flaska aktarılan CRFK hücrelerinin 3. saatteki görüntüleri. C1. Cytodex-1; C2. Cytodex-3.

Tutunma sonrası Yöntem-1 ve Yöntem-2 kullanılarak Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrotasıyıcılarında CRFK hücrelerinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki mikroskopik görüntüleri alındı. Alınan görüntüler Şekil 4.2 ve Şekil 4.3’teki gibidir.

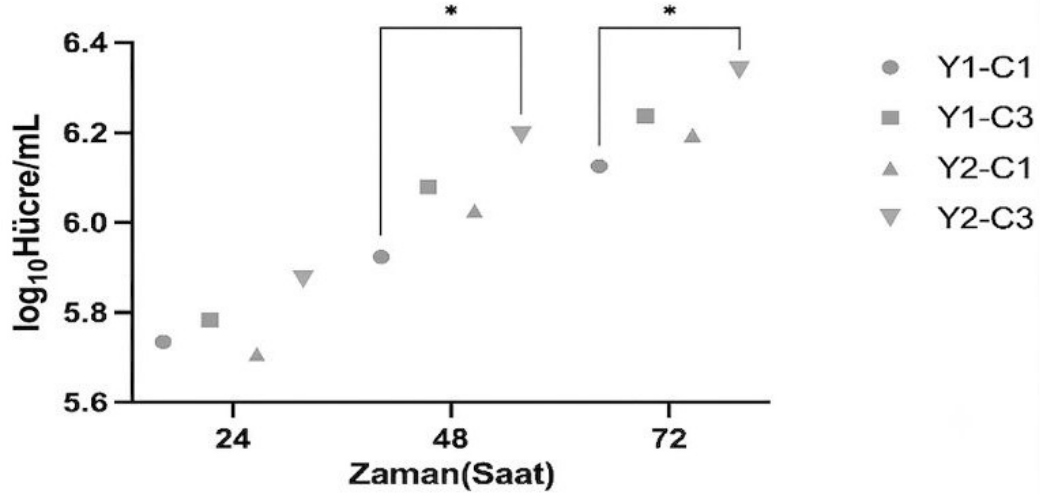


Şekil 4.2. Yöntem 1'e göre spinner flask içerisindeki Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrot taşıyıcıları üzerindeki CRFK hücrelerinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki görüntüleri. A–C. Cytodex-1; D–F. Cytodex-3 mikrot taşıyıcıları üzerindeki CRFK hücrelerini göstermektedir. Tüm görüntüler ışık mikroskobu altında 5× büyütme ile elde edilmiştir.



Şekil 4.3. Yöntem 2'ye göre spinner flask içerisindeki Cytodex-1 ve Cytodex-3 mikrot taşıyıcıları üzerindeki CRFK hücrelerinin 24., 48. ve 72. saatlerdeki görüntüleri. A–C. Cytodex-1; D–F. Cytodex-3 mikrot taşıyıcıları üzerindeki CRFK hücrelerini göstermektedir. Tüm görüntüler ışık mikroskobu altında 5× büyütme ile elde edilmiştir.

CRFK hücrelerinin farklı yöntem ve mikrot taşıyıcılar sonucundaki tutunma verileri istatistiksel olarak analiz edildi. Gruplar arasındaki farklılıklar iki yönlü varyans analizi ve Tukey çoklu karşılaştırma testi kullanılarak belirlendi. Analiz sonuçları Şekil 4.4'te gösterildi.



Şekil 4.4. Farklı hücre tutunma yöntemi ve mikrotasıyıcı kombinasyonlarında (Y1-C1, Y1-C3, Y2-C1, Y2-C3) CRFK hücre yoğunluğunun zamana bağlı değişimi. Y1: Yöntem 1; Y2: Yöntem 2; C1: Cytodex-1; C3: Cytodex-3'ü göstermektedir. *: istatistiksel olarak anlamlı fark ($p < 0,05$).

Şekil 4.4'te gösterildiği üzere Tukey testi analizlerine göre, zaman faktörünün ($p < 0,0001$) ve tutunma yöntemi-mikrotasıyıcı kombinasyonunun ($p = 0,0009$) hücre tutunması üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olduğu tespit edildi. Buna karşın, iki faktör arasındaki etkileşim anlamlı bulunmadı ($p = 0,9510$).

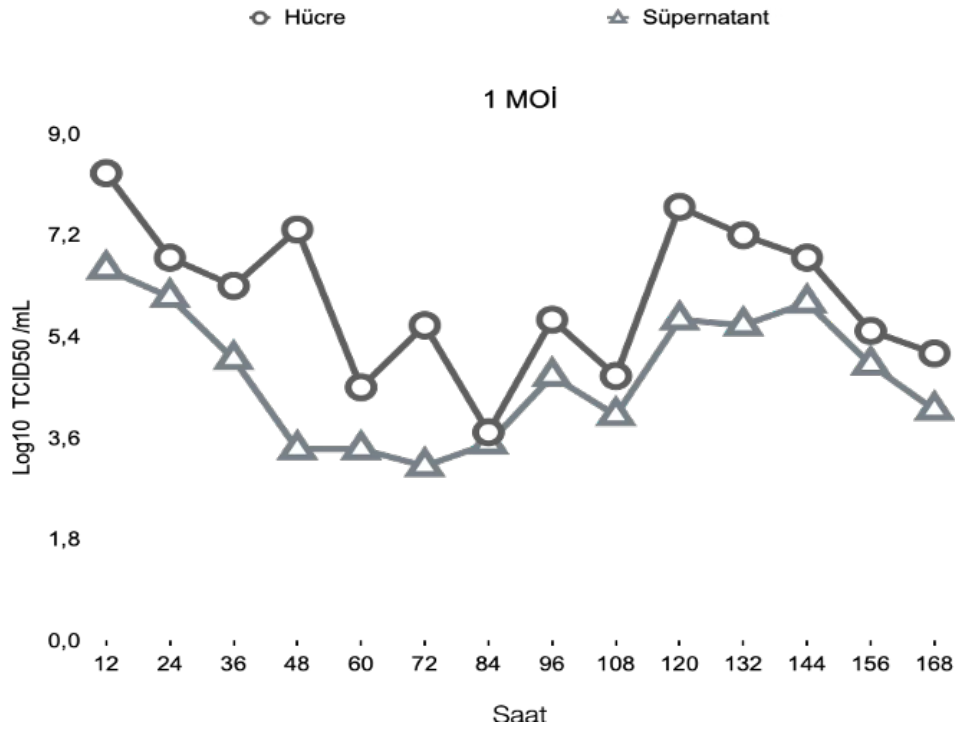
Sonuçlara bakıldığında, 48. saatte Yöntem-2/Cytodex-3 grubunun, Yöntem-1/Cytodex-1 grubuna kıyasla anlamlı derecede daha yüksek hücre tutunması gösterdiği belirlendi ($p = 0,0385$). Yetmiş ikinci saatte benzer eğilim devam etti ancak istatistiksel anlamlılık göstermedi ($p = 0,0572$).

Cytodex-3 ve Yöntem-2 kombinasyonunun, diğer gruplara kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek tutunma performansı sergilediği saptandı. Bu doğrultuda, hücre adaptasyon aşamasını takiben FCV inokülasyon protokolü uygulanarak farklı MOI dozlarında zamana bağlı viral büyüme kinetiği izlendi.

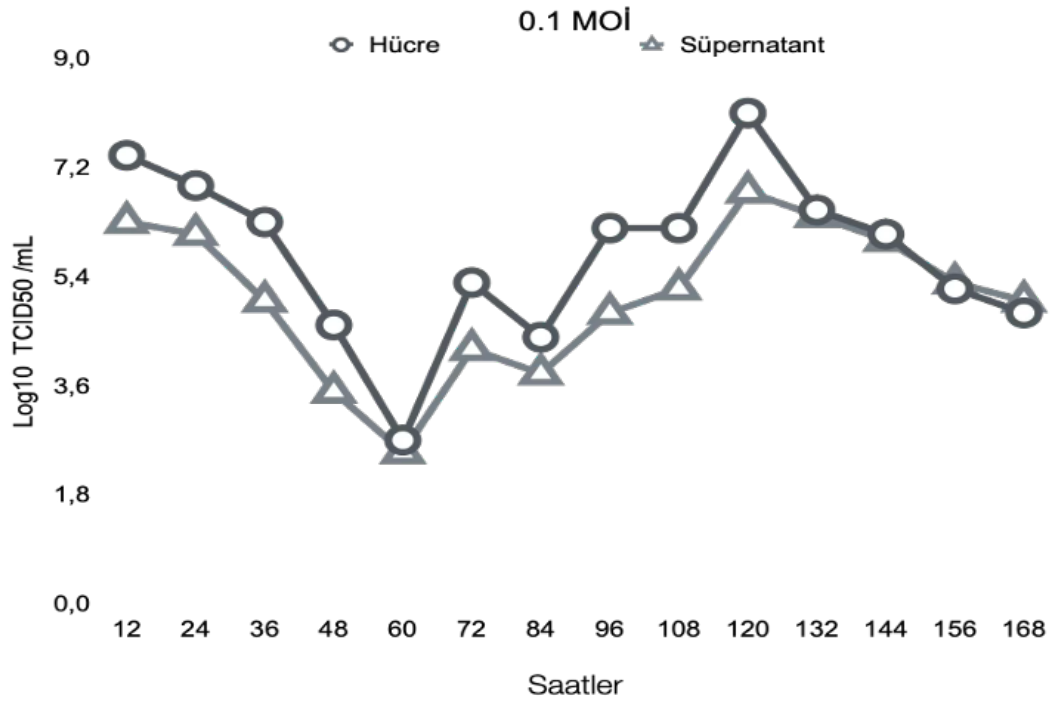
4.2. FCV MOI Optimizasyon Çalışmaları

Farklı MOI değerlerinin (1; 0,1; 0,01; 0,001 ve 0,0001) viral yük üzerindeki etkilerini belirlemek amacıyla süpernatant ve hücre içi TCID₅₀ verileri, 12. saatten başlayarak 12 saat aralıklarla 168. saate kadar takip edildi ve ışık mikroskobu görüntüleri sunuldu.

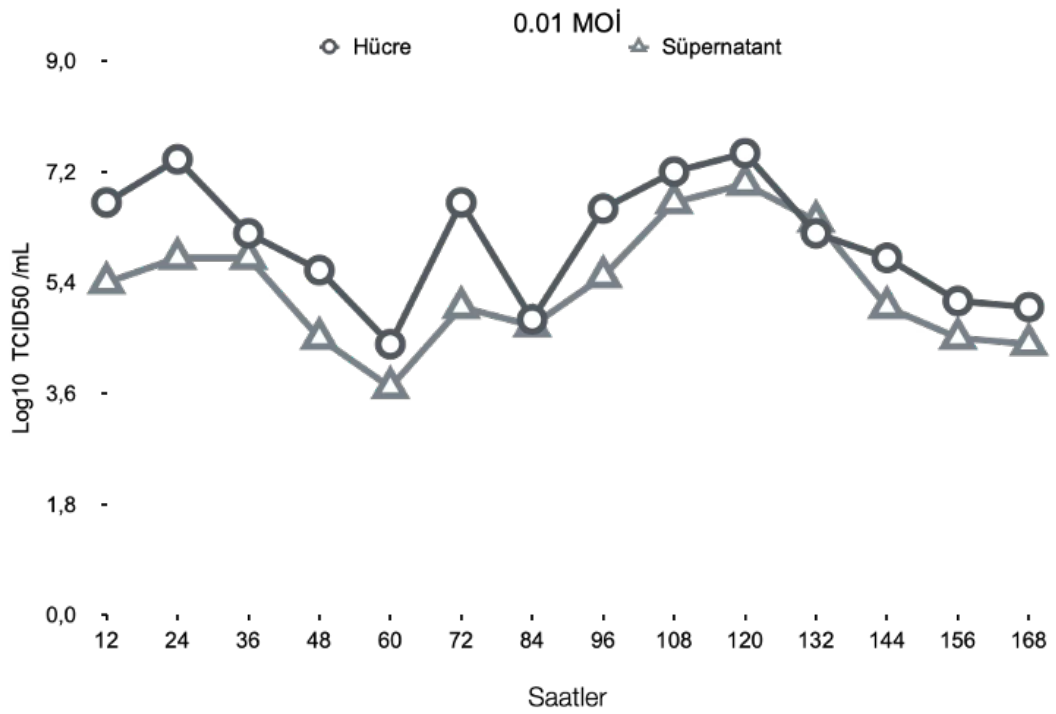
Farklı MOI değerlerinde enfekte edilen kültürlerden belirlenen zaman noktalarında alınan örneklerde viral titre değişimleri incelendi ve sonuçlar Şekil 5.4–5.8’de gösterildi. İlk ölçüm noktası olan 12. saatte yüksek düzeyde viral titre tespit edildi ve bu zaman noktası ilk pik dönemlerinden biri olarak değerlendirildi. Takip eden saatlerde viral titrelerde dalgalanmalar gözlenmekle birlikte, üretimin kültür süresi boyunca devam ettiği belirlendi. İkinci pik değerine ise 120. saatte ulaşıldı. Elde edilen sonuçlar, FCV’nin seçilen kültür koşullarında etkin şekilde çoğaldığını ve viral üretimin enfeksiyon süresince sürdürülebildiğini gösterdi.



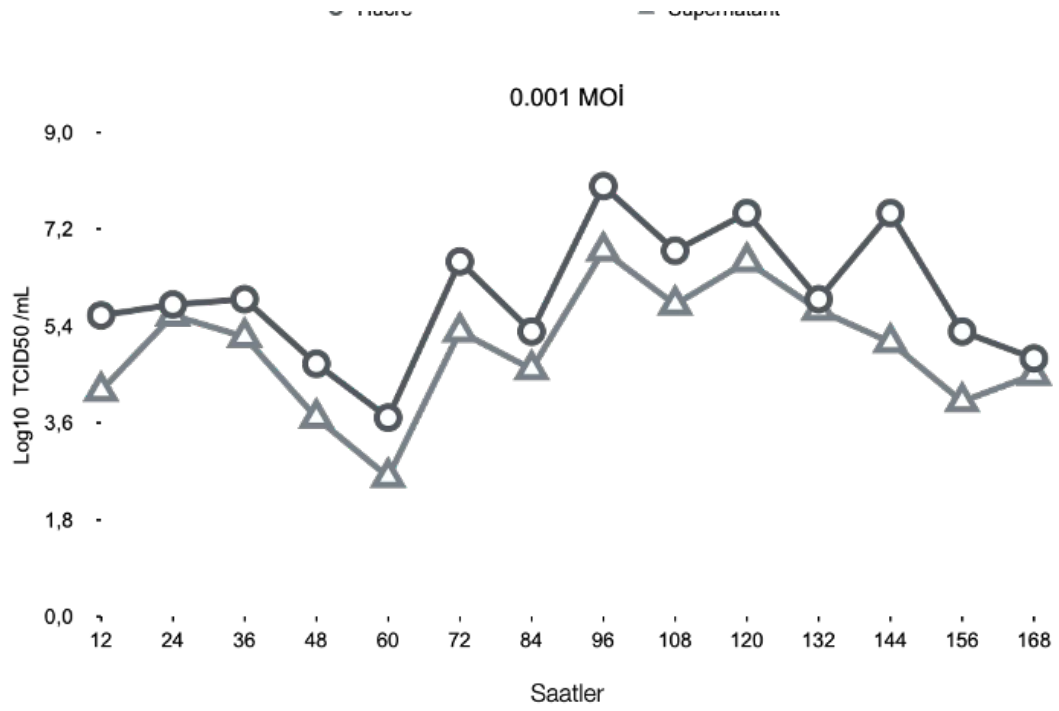
Şekil 4.5. 1 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.



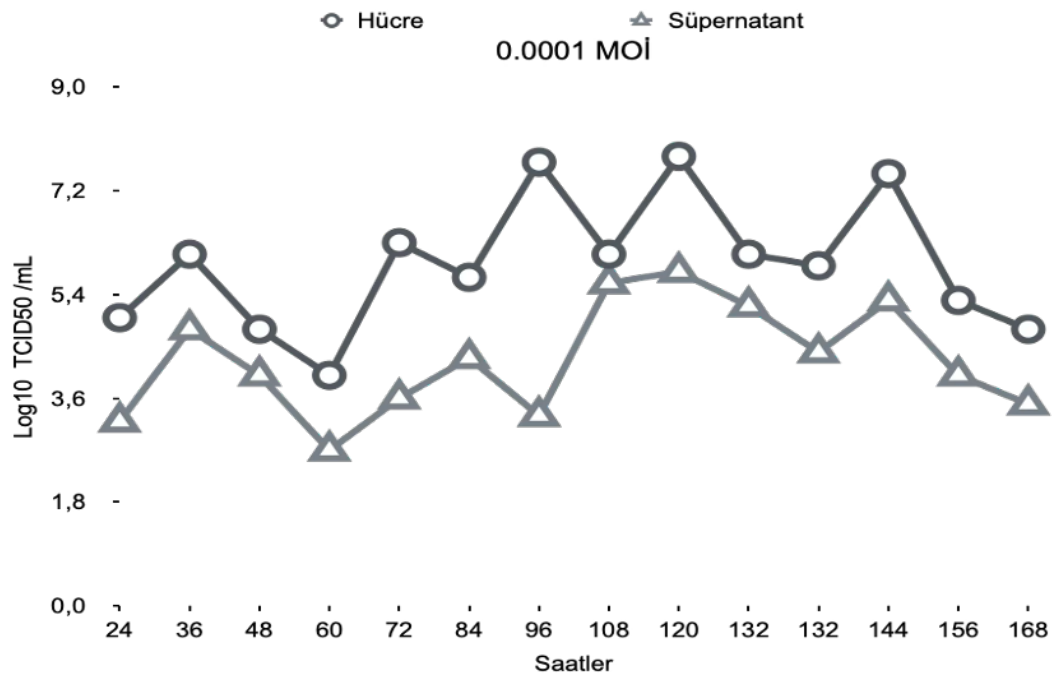
Şekil 4.6. 0,1 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.



Şekil 4.7. 0,01 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.



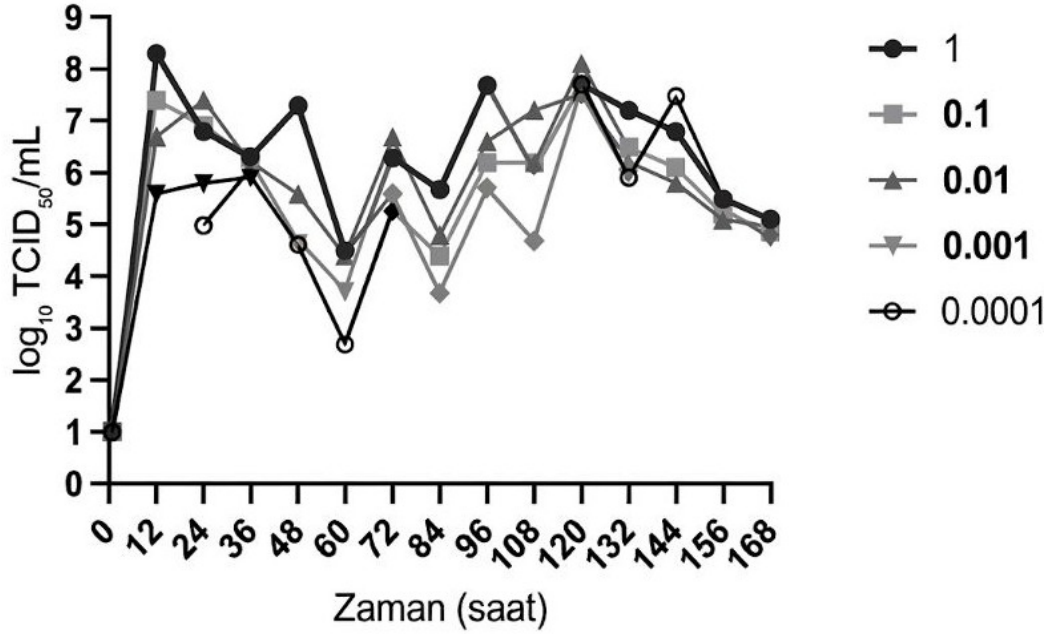
Şekil 4.8. 0,001 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.



Şekil 4.9. 0,0001 MOI uygulamasında zamana bağlı olarak hücre içi ve süpernatanttaki viral titre değişimi.

4.3. FCV Büyüme Eğrisi

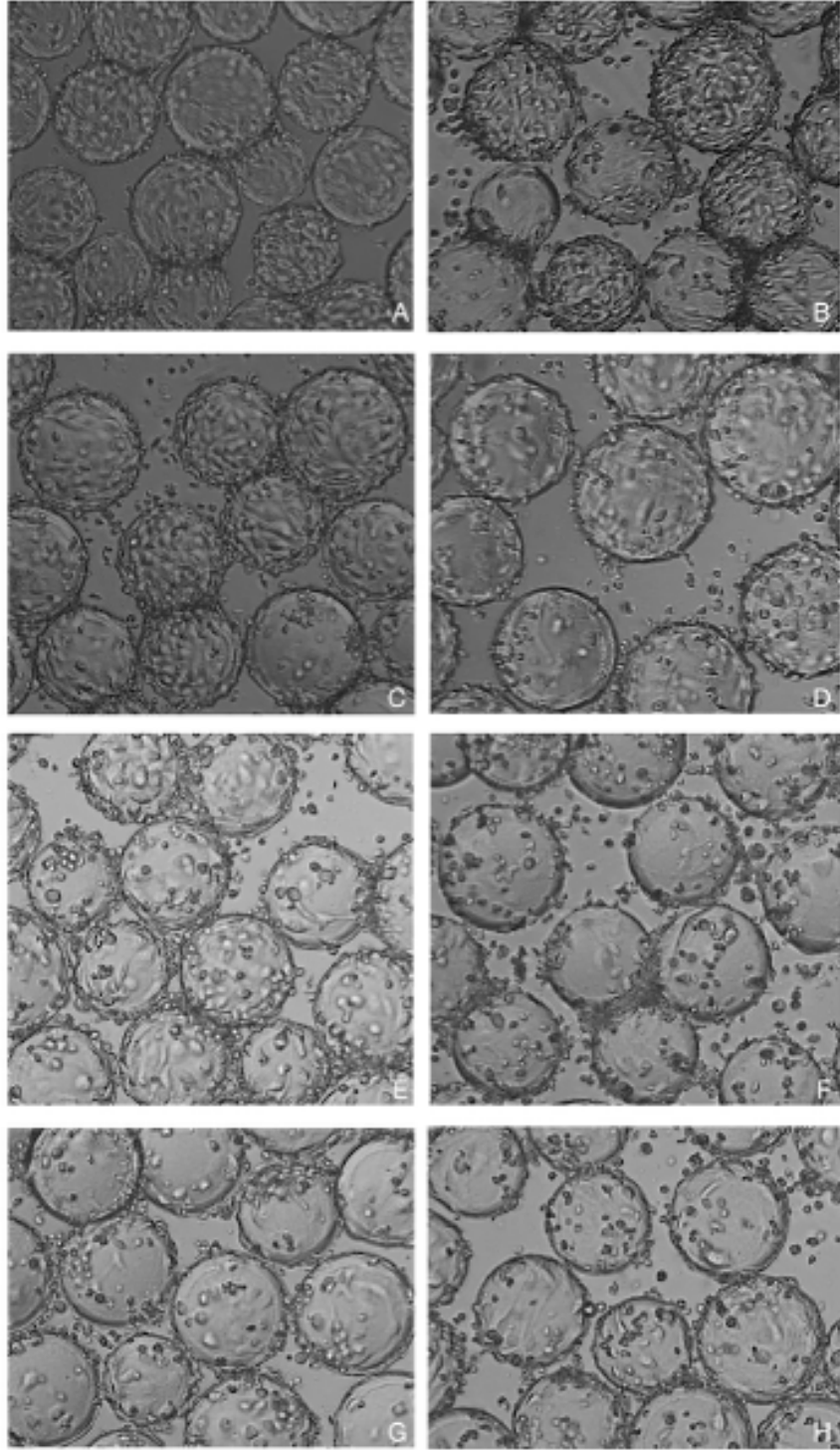
FCV'nin CRFK hücrelerindeki çoğalma kinetiğini değerlendirmek amacıyla farklı MOI değerlerinde elde edilen hücre ilişkili viral titreler karşılaştırıldı ve büyüme eğrileri oluşturuldu. Farklı enfeksiyon dozlarına ait titre değişimleri aynı grafik üzerinde gösterildi ve sonuçlar Şekil 4.10'da verildi.



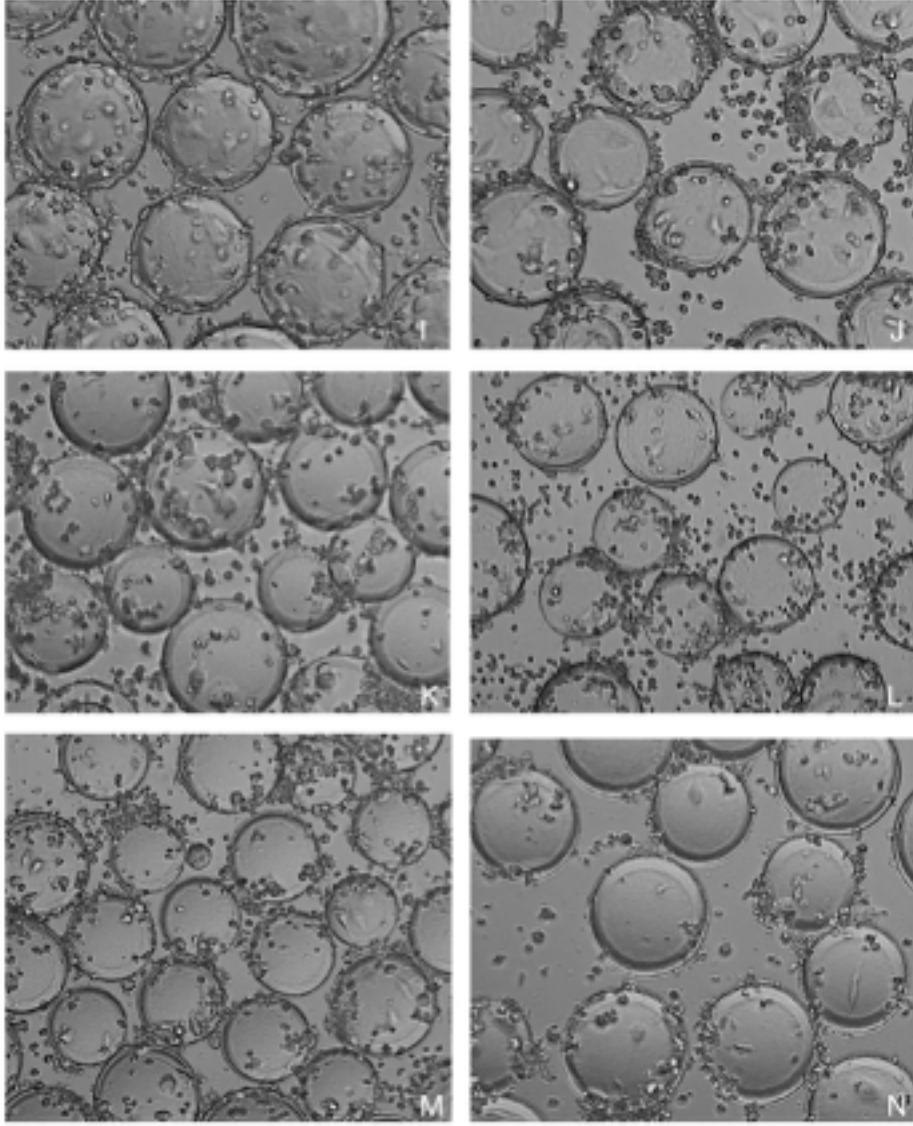
Şekil 4.10. Farklı MOI değerlerinde (1, 0,1, 0,01, 0,001 ve 0,0001 MOI) enfekte edilen CRFK hücrelerinde hücre içi FCV viral titrelerinin zamana bağlı değişimi.

4.4. 0,1 MOI FCV Enfeksiyonu Sonrası CRFK Hücrelerinde CPE Gözlemleri

Çalışmada kullanılacak enfeksiyon koşulunun belirlenmesi amacıyla farklı MOI değerlerinde gerçekleştirilen ön değerlendirmeler sonucunda, 0,1 MOI koşulu viral üretim kinetiğinin izlenmesi ve hücresel değişimlerin değerlendirilmesi açısından uygun bulundu. Bu nedenle 0,1 MOI ile enfekte edilen CRFK hücrelerinde enfeksiyon sürecine bağlı olarak meydana gelen morfolojik değişimler mikroskopik olarak incelendi. FCV enfeksiyonu sonrası oluşan CPE farklı zaman noktalarında değerlendirildi ve elde edilen görüntüler Şekil 4.11'de sunuldu.



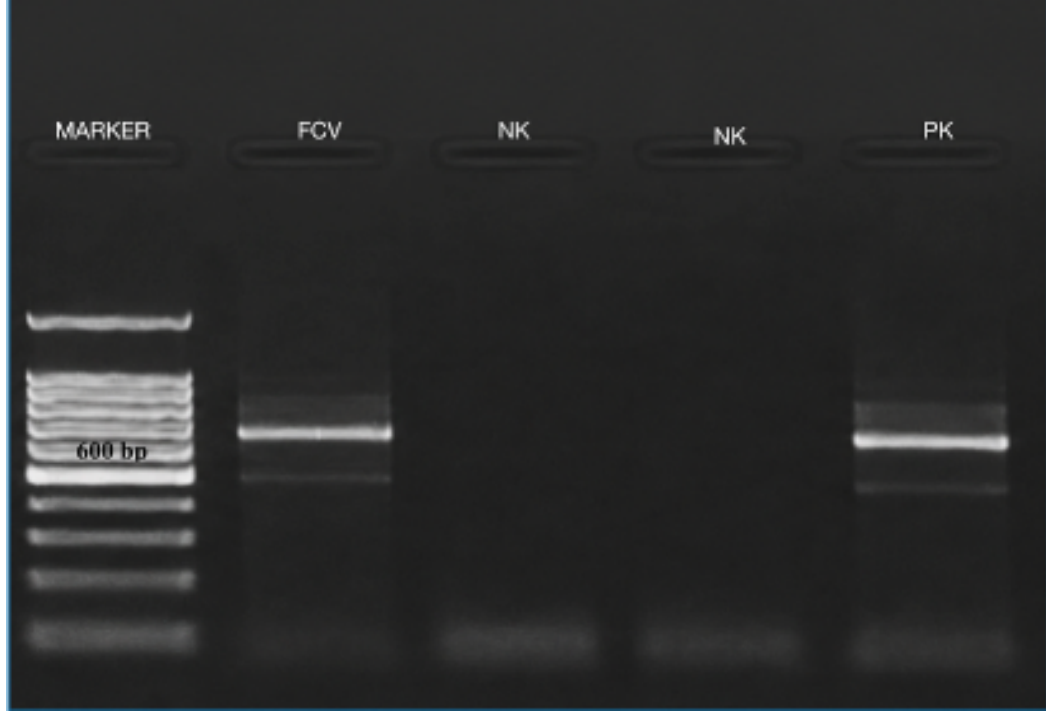
Şekil 4.11. 0,1 MOI ile FCV enfeksiyonu sonrasında CRFK hücrelerinde farklı zaman noktalarında gözlenen sitopatik etkiler. (A) Enfeksiyon sonrası 12. saat; (B) 24. saat; (C) 36. saat; (D) 48. saat; (E) 60. saat; (F) 72. saat; (G) 84. saat; (H) 96. saat görüntülerini göstermektedir. Tüm görüntüler 5× büyütme ile elde edilmiştir.



Şekil 4.12. 0,1 MOI ile FCV enfeksiyonu sonrasında CRFK hücrelerinde farklı zaman noktalarında gözlenen sitopatik etkiler. Enfeksiyon sonrası (I) 108. saat; (J) 120. saat; (K) 132. saat; (L) 144. saat; (M) 156. saat ve (N) 168. saat görüntülerini göstermektedir. Tüm görüntüler 5× büyütme ile elde edilmiştir.

4.5. Konvansiyonel PCR Bulguları

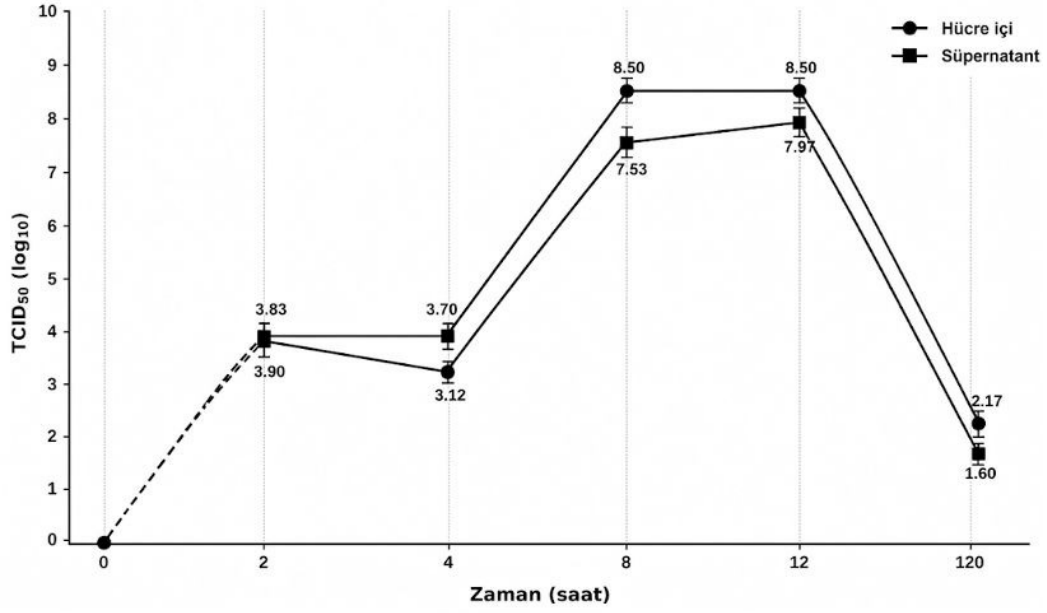
Konvansiyonel PCR analizi sonucunda FCV pozitif örneklerde beklenen 671 bp büyüklüğünde spesifik bantlar gözlemlendi (Şekil 4.13). Agaroze jel elektroforezi ile doğrulanan amplifikasyon ürünleri UV ışık altında görüntülendi.



Şekil 4.13. FCV varlığının RT-PCR ile doğrulanmasına ait agaroz jel elektroforezi görüntüsü. M: 100 bp DNA belirteci; NK: negatif kontrol; PK: pozitif kontrol; FCV: Feline calicivirus pozitif örneği.

4.6. 0,1 MOI’de Tekrarlanabilirlik Analizi

FCV’nin CRFK hücre kültür sistemindeki üretim kinetiğini değerlendirmek amacıyla farklı enfeksiyon sonrası zaman noktalarında viral titre değişimleri incelendi. Ön değerlendirme amacıyla gerçekleştirilen farklı MOI denemelerinde virüs titre artışının özellikle 12. ve 120. saat zaman noktalarında pik yaptığı gözlemlendiğinden, üretim kinetiğinin daha kapsamlı değerlendirilmesi amacıyla bu zaman aralıkları kullanıldı. Ayrıca viral replikasyonun erken dönem değişimlerini daha ayrıntılı ortaya koyabilmek amacıyla 4., 8. ve 12. saatler eklenerek ek örnekleme yapıldı. Hücre içi ve süpernatant fraksiyonlarında belirlenen viral titre değerleri zamana bağlı olarak değerlendirildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.12’de sunuldu.



Şekil 4.14. 0,1 MOI ile enfekte edilen CRFK hücrelerinde hücre içi ve süpernatanttaki viral titrenin (log TCID₅₀ /mL) zamana bağlı değişimine ait tekrarlanabilirlik analizi. Veriler ortalama $\pm$ SD olarak gösterilmiştir.

Hem hücre hem süpernatant verilerinde zaman faktörü istatistiksel olarak anlamlı bulundu ($p < 0,0001$). Elde edilen sonuçlara göre viral titre değerlerinde 8. ve 12. saatler aralığında artış gözlemlendi ve maksimum titre seviyelerine bu dönem içerisinde ulaşıldı. 8. ve 12. saat zaman noktaları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması, viral üretimin bu aralıkta pik düzeyde seyrettiğini gösterdi. 120. saatte elde edilen titre değerleri ise diğer tüm zaman noktalarına göre anlamlı derecede düşük bulundu. Deney, üç bağımsız biyolojik tekrar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark göstermedi ve yüksek düzeyde tekrarlanabilirlik sergiledi.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada, CRFK hücre hattının mikrotasıyıcı tabanlı süspansiyon kültür sistemine adaptasyonu ve bu sistem kullanılarak FCV üretim potansiyeli değerlendirilmiştir. Çalışmanın temel amacı, monolayer özellik gösteren CRFK hücrelerinin mikrotasıyıcı sistemlerde çoğaltılabilirliğini ortaya koymak ve FCV üretimi için uygun enfeksiyon koşulları ile hasat zamanını belirlemektir. Bu nedenle öncelikle farklı mikrotasıyıcı ve tutunma yöntemlerinin hücre tutunması ve büyümesi üzerindeki etkileri değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre Y-2/C-3 kombinasyonunun Y-1/C-1 kombinasyonuna kıyasla daha yüksek hücre tutunması sağladığı belirlenmiştir. Bu nedenle Y-2/C-3 kombinasyonu, FCV üretim çalışmalarında tercih edilmiştir. Ardından seçilen sistemde 5 farklı MOI kullanılarak FCV üretimi değerlendirilmiştir. Uygun görülen MOI ve hasat zamanı ile üç bağımsız biyolojik tekrar yapılmıştır.

Mikrotasıyıcıların yüzey özellikleri, hücre adezyonu ve proliferasyonu üzerinde doğrudan etkilidir. Cytiva (2020) verilerine göre C-1 ve C-3 mikrotasıyıcıları yüzey yapıları bakımından farklılık göstermektedir. C-1, pozitif yüklü iyonik gruplar içeren bir dekstran matrisine sahip olup hücrelerin elektrostatik etkileşimlerle bağlanmasını sağlarken; C-3, yüzeyinde bulunan denatüre kolajen tabakası sayesinde hücrelerin daha fizyolojik ve güçlü bir şekilde tutunmasına olanak tanımaktadır. Özellikle epitel benzeri hücre hatlarında, biyolojik yüzey yapısı nedeniyle C-3'ün hücre adezyonu ve canlılığı açısından daha avantajlı olduğu bildirilmektedir (Cytiva, 2020). CRFK hücrelerinin epitel benzeri özellik göstermesi, bu çalışmada C-3 mikrotasıyıcısı ile daha yüksek hücre tutunması ve proliferasyon elde edilmesini açıklayabilir. Bununla beraber mikrotasıyıcı kültürlerinde hücre bağlanma aşamasında uygulanan karıştırma stratejisinin de hücre dağılımı ve tutunma verimliliği üzerinde etkileri bulunduğu bildirilmektedir. Nienow (2014), hücrenin mikrotasıyıcıya tutunma döneminde kontrollü karıştırmanın hücre kümelenmesini azaltarak daha homojen bir kültür ortamı oluşturduğunu ve tutunma döneminde belli düzeyde karıştırma gerektiğini bildirmiştir. Benzer şekilde, Ikonou vd. (2004), mikrotasıyıcılar üzerinde büyütülen mezenkimal hücrelerin uygun düzeydeki karıştırma koşullarında canlılıklarını 7 güne kadar koruyabildiğini ve hasar görmediğini bildirmiştir. Bu bilgiler ışığında, Yöntem-

2’de uygulanan periyodik karıştırma stratejisinin hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyine daha homojen dağılmasını ve tutunmasını desteklediği; C-3’ün uygun yüzey özellikleri ile birlikte değerlendirildiğinde C-3/Y-2 kombinasyonundan daha yüksek verim alınmasını açıkladığı düşünülmektedir.

Eckhardt vd. (2024) tarafından farklı virüsler ve hücre hatlarıyla yürütülen çalışmalar, yüksek MOI uygulamalarının enfeksiyon sürecini hızlandırdığını ancak sonuçta her zaman daha yüksek viral titre elde edilmediğini göstermiştir. Yüksek MOI değerlerinde başlangıçta enfekte olan hücre sayısının fazla olması, virüsün replikasyon döngüsüne daha erken başlamasını ve pik titreye daha kısa sürede ulaşılmasını sağlamaktadır. Düşük MOI uygulamalarında ise enfeksiyon hücreden hücreye yayıldığı için maksimum titreye ulaşma süresi biraz daha uzamaktadır. Bununla birlikte mevcut araştırmalarda farklı MOI düzeylerinde elde edilen nihai viral titrelerin birbirine yakın olabildiği bildirilmiştir. Dolayısıyla MOI seçimi, maksimum verimden ziyade temel olarak enfeksiyon hızı ve toplam üretim süresi üzerinde belirleyici bir rol oynamaktadır. FCV üretimi incelendiğinde literatürdeki bu teorik altyapıya benzer bulgular ortaya çıkmaktadır. Örneğin; Saade vd. (2026), FCV izolatının hem 0,1 hem de 0,01 MOI’de FCEC hücrelerinde etkili bir şekilde çoğaldığını ve inokülasyonu takiben yaklaşık 12-24. saatler arasında en yüksek titre artışının gözlemlendiğini rapor etmiştir. Benzer şekilde Mao vd. (2022) da tek tabakalı CRFK hücrelerini 0,01 MOI ile enfekte ederek viral kinetiği takip etmiştir. Mevcut bilimsel veriler ışığında, sunulan çalışmada FCV üretimi için en ideal enfeksiyon oranını belirlemek amacıyla 1; 0,1; 0,01; 0,001 ve 0,0001 olmak üzere 5 farklı MOI düzeyi test edilmiştir. Yapılan TCID₅₀ testleri sonucunda, literatürle paralel şekilde farklı MOI’lerin nihai viral titre üzerinde belirgin bir fark yaratmadığı ancak üretim süresi ve enfeksiyon hızı dengesi açısından 0,1 MOI değerinin en uygun seçenek olduğu belirlenmiştir. Seçilen bu MOI değeri (0,1) ile deneylerin tekrarlanabilirliğini güvence altına almak adına 3 bağımsız biyolojik tekrar gerçekleştirilmiştir.

Ön değerlendirme amacıyla gerçekleştirilen farklı MOI denemelerinde, virüs titre artışının özellikle 12. ve 120. saatlerde belirginleşerek çift pik içeren bifazik bir kinetik örüntü sergilediği görülmüştür. Bu nedenle 0,1 MOI üretim kinetiğinin daha kapsamlı analiz

edilmesi amacıyla söz konusu zaman aralıkları temel alınmış; ayrıca viral replikasyonun erken dönem değişimlerini daha ayrıntılı ortaya koyabilmek adına 4., 8. ve 12. saatleri kapsayan kısa zaman aralıklarında ek örneklemeler yapılmıştır.

Yapılan testlerde özellikle enfeksiyon sonrası 8. ve 12. saatlerde elde edilen viral titrelerin yaklaşık 10^8 TCID₅₀/mL seviyesine ulaştığı belirlenmiştir. Zhang vd. (2025) tarafından klasik monolayer kültür koşullarında yapılan çalışmada; CRFK hücreleri 0,1 MOI ile enfekte edilerek 4., 8. ve 12. saatlerde gerçekleştirilen değerlendirmelerde viral replikasyonun zamanla arttığı ve 12. saatte FCV titresinin yaklaşık 10^8 TCID₅₀/mL ile en yüksek seviyeye ulaştığı bildirilmiştir. Elde edilen bulgular, bu değerlerle büyük ölçüde paralellik göstermektedir. Aynı çalışmada enfeksiyonun ilerlemesine paralel olarak sitopatik etkinin belirginleştiği; 4. saatte minimal morfolojik değişiklikler gözlenirken, 8. saatte hücre yuvarlaklaşmasının başladığı ve 12. saatte hücre büzüşmesi ile ayrılmaların belirgin hale geldiği rapor edilmiştir. Çalışmada mikrotasıyıcı tabanlı süspansiyon kültüründe elde edilen virüs çoğalma profilinin ve zamana bağlı değişimlerin, bu monolayer modele benzer olduğu, hatta bazı koşullarda daha yüksek verim sağlayabileceği ortaya konmuştur. Bu durum, adherent kültürlerden süspansiyon tabanlı üretim sistemlerine geçişte virüs üretim performansının sürdürülebileceğini göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Mikrotasıyıcı sistemlerin sağladığı yüksek yüzey/hacim oranı, hücre yoğunluğunu artırarak hücre-virüs karşılaşma olasılığını yükseltmiş olabilir. Bu durum, mikrotasıyıcı sisteminin FCV replikasyonu için uygun bir mikroçevre sunabileceğini göstermektedir.

İlk optimizasyon çalışmalarında farklı MOI değerleri ile yapılan denemelerde 120. saatte de yüksek viral titrelerin elde edildiği gözlenmiş ve bu nedenle hem erken hem de geç zaman noktalarının hasat açısından uygun olabileceği değerlendirilmiştir. Ancak biyolojik tekrar deneylerinde 120. saatte elde edilen titrelerin belirgin şekilde düştüğü tespit edilmiştir. Bu farklılığın temel nedeninin uzun süreli kültürlerde meydana gelen hücre dökülmesi ve kültür stabilitesindeki azalma olduğu düşünülmektedir. Özellikle ilk deneylerde hücrelerin mikrotasıyıcı yüzeyine daha stabil tutunduğu ve hücre canlılığının daha uzun süre korunduğu gözlenmiştir. Buna karşın sonraki tekrar deneylerinde hücrelerin daha erken dönemde yüzeyden ayrıldığı belirlenmiştir. Bu durumun geç faz viral üretim kapasitesini

olumsuz etkilediği düşünülmektedir. Bock vd. (2009) ile Forestell vd. (1992) tarafından da belirtildiği üzere, hücrelerin mikrotasıyıcılara bağlanmasını kapsayan ilk aşama, sürecin genel verimliliği açısından kritik bir öneme sahiptir. Çünkü düşük bir hücre bağlanma oranı, verimsiz bir virüs ekimi (inokülasyon) ile sonuçlanmakta ve nihayetinde viral verimin azalmasına neden olmaktadır. Buna ek olarak, hücrelerin başlangıçta mikrotasıyıcılara yeterince güçlü bağlanamaması durumunda, ilerleyen süreçte dinamik kültürün getirdiği mekanik etkilerden (*shear stress*) daha fazla etkilenecek mikrotasıyıcılardan kolayca ayrıldıkları rapor edilmektedir (Derakhti vd., 2019). Bu bulgular ışığında, enfeksiyon sonrası 8–12 saat aralığının hem daha stabil hücre kültürü koşullarını hem de daha tutarlı viral üretim profilini temsil ettiği anlaşılmaktadır. Buna karşın 120. saat, belirli koşullarda yüksek titre elde edilmesine rağmen kültür stabilitesine bağlı değişkenlik göstermesi nedeniyle daha riskli ve kontrollü bir hasat zamanı olarak değerlendirilebilir.

0,1 MOI için yapılan istatistiksel analizlerde zaman faktörünün viral üretim üzerinde anlamlı etkisi olduğu ($p < 0,0001$), buna karşın biyolojik tekrarlar arasında anlamlı farklılık bulunmadığı ($p > 0,05$) saptanmıştır. Bu sonuçlar, optimize edilen enfeksiyon koşullarının tekrarlanabilir ve güvenilir olduğunu göstermektedir. Bu çalışmada elde edilen bulgular, benzer bir yaklaşımın FCV üretimi için de başarıyla uygulanabileceğini göstermektedir.

Monolayer kültür sistemlerinde yüksek viral titreler elde edilebilmesine rağmen, bu sistemlerin sınırlı yüzey alanı nedeniyle endüstriyel ölçek büyütme açısından çeşitli kısıtlılıkları bulunmaktadır. Mikrotasıyıcı tabanlı süspansiyon kültür sistemleri ise birim hacimde çok daha geniş yüzey alanı sağlayarak yüksek hücre yoğunluklarına ulaşılmasına olanak tanımaktadır. Ayrıca biyoreaktör sistemlerinde pH, sıcaklık, çözünmüş oksijen ve ajitasyon gibi kritik parametrelerin eş zamanlı kontrol edilebilmesi, üretim sürecinin standardizasyonuna katkı sağlamaktadır. Mikrotasıyıcı teknolojisinin influenza ve kuduz gibi viral aşılarda endüstriyel üretiminde başarıyla kullanıldığı bildirilmektedir (Kistner vd., 1999; Montagnon vd., 1999; Barrett vd., 2009). Özellikle Vero ve MDCK hücreleri ile yürütülen büyük ölçekli biyoreaktör uygulamaları, mikrotasıyıcı sistemlerin endüstriyel güvenilirliğini net bir şekilde ortaya koymaktadır. Biyoreaktörlerde süspanse kültür sistemlerinin gelişmesiyle birlikte mikrotasıyıcı sistemlerin kullanımı da giderek yaygınlaşmıştır. 1980'lerden

sonra CHO hücre hattı, süspanse hücre hattı halinde çoğaltılmaya başlanmıştır. 20. yüzyılın sonlarına doğru ise biyoreaktörlerde süspanse hücre üretim kapasitesi 10.000 L'lik devasa bir ölçeğe ulaşmıştır (Griffiths, 1990). Günümüzde; fed-batch kültür (Gutiérrez-Granados vd., 2018), perfüzyon kültürü (Teworte vd., 2021) ve genetik mühendisliğindeki (Pino vd., 2020) ilerlemeler sayesinde biyoreaktörler; hücrelerin, çeşitli viral vektörlerin, canlı virüslerin ve virüs bazlı aşılarda üretilmesi için vazgeçilmez birer platform haline gelmiştir. Böylelikle biyoreaktör sistemleri, geleneksel statik yöntemlerin getirdiği sınırlamaları aşarak çok daha geniş bir endüstriyel uygulama alanı oluşturmuştur (Von den Eichen vd., 2021).

Sonuç olarak bu çalışma, CRFK hücre hattının mikrotasıyıcı bazlı süspansiyon kültür sistemine başarılı şekilde adapte edilebildiğini ve FCV üretimi için yüksek verimli bir platform oluşturabileceğini gösteren bir ön çalışma niteliğindedir. Elde edilen yüksek viral titreler ve erken dönemde gözlenen güçlü replikasyon kinetiği, bu sistemin veteriner biyoteknolojisi ve endüstriyel FCV aşısı üretimi açısından umut verici bir *up-stream* üretim modeli olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte, bu çalışmanın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Mevcut çalışma kapsamında üretim dinamikleri yalnızca spinner flask ölçeğinde değerlendirilmiştir. Deneyler sıcaklık, CO₂ ve besiyeri kullanımı üzerinde sınırlı kontrole sahip spinner flask'larda yapıldığından, kültür sistemi tank biyoreaktör için tam olarak optimize edilmemiş olabilir (Nienow, 2006). İleri ölçekli biyoreaktör parametrelerinin (çözünmüş oksijen düzeyi, sürekli besleme stratejileri vb.) viral üretim üzerindeki etkileri bu aşamada ayrıntılı olarak incelenememiştir. Ayrıca, uzun süreli kültürlerde gözlenen hücre dökülmesinin (*detachment*) mekanizması tam olarak ortaya konulamamıştır. 0,1 MOI grubunda gerçekleştirilen üç biyolojik tekrarın, özellikle 120. saatte gözlenen viral titre düşüşünün nedenlerinin ortaya konulması açısından yetersiz kalmış olabileceği düşünülmektedir. Bu nedenle, gelecekte yapılacak çalışmalarda biyolojik tekrar sayısının artırılması, elde edilen sonuçların güvenilirliğinin ve istatistiksel gücünün artırılmasına katkı sağlayacaktır. Ayrıca, 8,5 log₁₀ TCID₅₀/mL titresine ulaşılan örneklerde, gerçek viral kapasitenin saptanabilmesi amacıyla ilave seri dilüsyonların uygulanması faydalı olacaktır. Bu yaklaşım, maksimum viral üretim kapasitesinin daha doğru şekilde belirlenmesine olanak sağlayacaktır. Gelecek çalışmalarda, spinner flask ölçeğinde elde edilen verilerin kontrollü ve büyük ölçekli biyoreaktör sistemlerine aktarılması, bununla birlikte hücre

yoğunluğu, karıştırma hızı, çözünmüş oksijen ve pH gibi işletim parametrelerinin optimize edilmesi, geliştirilen üretim modelinin endüstriyel uygulanabilirliğini, ölçeklenebilirliğini ve tekrarlanabilirliğini artıracaktır.

Elde edilen sonuçlar, FCV'nin mikrotasıyıcı tabanlı kültür sisteminde spinner flask'lar kullanılarak verimli şekilde üretilebildiğini ve tekrarlanan biyolojik üretimde de benzer sonuçlar elde edildiğini göstermiştir. Bu durum, sistemin FCV aşısı üretimine yönelik süreç geliştirme ve ölçek büyütme çalışmalarında kullanılabilecek potansiyele sahip olduğunu ortaya koymaktadır. Ayrıca sistem, enfeksiyon kinetiği ve üretim parametrelerinin optimize edilmesine yönelik gelecekteki çalışmalar için uygun bir model sunmaktadır. Bu nedenle geliştirilen üretim sisteminin, FCV aşılarının yerli üretimine yönelik biyoproses geliştirme çalışmalarında kullanılabilecek önemli bir altyapı oluşturduğu düşünülmektedir.

6. SONUÇLAR

Bu çalışmada, adherent karakterdeki CRFK hücre hattının mikrotasıyıcı süspansiyon kültür sistemine adaptasyonu başarıyla gerçekleştirilmiş ve bu sistemde FCV üretimi değerlendirilmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, zaman faktörü ile tutunma yöntemi–mikrotasıyıcı kombinasyonunun hücre tutunması üzerinde istatistiksel olarak anlamlı etkiye sahip olduğu belirlenmiştir. Cytodex-3 mikrotasıyıcısı ve Yöntem-2 kombinasyonu, hücre tutunması açısından en başarılı sonucu vermiş ve sonraki deneyler için uygun bulunmuştur.

Farklı MOI değerlerinin virüs çoğalma kinetiği üzerindeki etkisi incelendiğinde, yüksek MOI değerlerinde viral replikasyonun daha erken gerçekleştiği, düşük MOI değerlerinde ise viral çoğalmanın daha yavaş ilerlediği belirlenmiştir. Elde edilen bulgular doğrultusunda, üretim sürecinde daha stabil bir enfeksiyon kinetiği sergilemesi, hasat zamanının daha esnek ve kolay takip edilebilir olması ile daha düşük miktarda virüs kullanılarak benzer düzeyde üretim sağlanabilmesi nedeniyle, FCV üretimi için 0,1 MOI değeri uygun enfeksiyon koşulu olarak tercih edilmiştir.

Viral büyüme kinetiği analizlerinde, enfeksiyonun erken döneminde viral titrelerin hızla arttığı ve 8. ile 12. saatler arasında en yüksek düzeye ulaştığı belirlenmiştir. 8. ve 12. saatlerdeki ölçümler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmaması, bu noktaların üretim açısından uygun hasat zamanları olduğunu göstermiştir. Buna karşılık, 120. saatte elde edilen viral titrelerin düşük seviyelerde olduğu belirlenmiş ve geç dönemin üretim açısından uygun bir hasat zamanı olmadığı sonucuna ulaşılmıştır. 0,1 MOI için yapılan üç bağımsız tekrar arasında anlamlı farklılık saptanmaması, elde edilen sonuçların yüksek düzeyde tekrarlanabilir olduğunu göstermiştir.

Sonuç olarak, CRFK hücrelerinin Cytodex-3 mikrotasıyıcısı üzerinde başarıyla çoğaltılabildiği ve bu sistemin FCV üretimi için uygun, güvenilir ve ölçeklenebilir bir hücre kültürü platformu oluşturduğu ortaya konulmuştur. Çalışmada belirlenen optimum hücre tutunma koşulları, MOI değeri ve hasat zamanının, ileride gerçekleştirilecek biyoreaktör ölçekli üretim çalışmalarına ve veteriner viral aşı üretim süreçlerinin geliştirilmesine katkı sağlayacağı değerlendirilmektedir.

7. ÖNERİLER

Bu çalışmada elde edilen bulgular neticesinde sunulan öneriler şunlardır:

- FCV üretiminde farklı hasat zamanlarının değerlendirilmesine yönelik ilave çalışmalar yapılmalıdır. Özellikle bu çalışmada 120. saatte elde edilen düşük viral titrelerin, enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde hücre canlılığının azalmasına ve mikrotanıyıcılardan hücre dökülmesinin artmasına bağılı olup olmadığı ayrıntılı olarak araştırılmalıdır. Bu amaçla, hücre canlılığı ve hücre tutunmasının geç dönemlerde birlikte değerlendirildiğı çalışmaları gerçekleştirilmesi önerilmektedir.
- Bu çalışmada ulaşılan en yüksek viral titre $8,5 \log_{10}$ TCID₅₀/mL olarak belirlenmiştir. Ancak titrasyon analizlerinde kullanılan son dilüsyon basamağı bu değeri sınırlandırmış olabileceğinden, daha geniş seri dilüsyonlar kullanılarak gerçek maksimum viral titre değerinin belirlenmesi önerilmektedir.
- Çalışmada süreç optimizasyonu *spinner flask* sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Elde edilen sonuçların endüstriyel üretim koşullarına aktarılabilirliğinin değerlendirilmesi amacıyla, aynı üretim parametrelerinin kontrollü biyoreaktör sistemlerinde doğrulanması önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- Abayli, H., Yalçinkaya, E., Tonbak, S., & Aslan, A. N. (2026). Sustained circulation of genotype I and the first whole-genome sequencing of feline calicivirus in Turkish cats. *BMC Veterinary Research*, 22(1), 171. <https://doi.org/10.1186/s12917-026-05352-8>
- Abente, E. J., Santos, N., Green, K. Y., & Sosnovtsev, S. V. (2013). The Vesivirus capsid leader protein is essential for virus production. *Journal of Virology*, 87(16), 8944–8958.
- Abente, E. J., Sosnovtsev, S. V., Sandoval-Jaime, C., Parra, G. I., Bok, K., & Green, K. Y. (2013). The feline calicivirus leader of the capsid protein is associated with cytopathic effect. *Journal of Virology*, 87(6), 3003–3017.
- Alfred, R., Radford, J., Fan, J., Boon, K., Krawetz, R., Rancourt, D., & Kallos, M. S. (2011). Efficient suspension bioreactor expansion of murine embryonic stem cells on microcarriers in serum-free medium. *Biotechnology Progress*, 27(3), 811–823.
- Barrett, P. N., Mundt, W., Kistner, O., & Howard, M. K. (2009). Aşı üretiminde Vero hücre platformu: hücre kültürü tabanlı viral aşılarla doğru ilerleme. *Aşılar Üzerine Uzman İncelemesi*, 8(5), 607–618.
- Baumann, J. G., Günzburg, W. H., & Salmons, B. (1998). CrFK feline kidney cells produce an RD114-like endogenous virus that can package murine leukemia virus-based vectors. *Journal of Virology*, 72(9), 7685–7687. <https://doi.org/10.1128/jvi.72.9.7685-7687.1998>
- Bergmann, M., Speck, S., Rieger, A., Truyen, U., & Hartmann, K. (2019). Antibody response to feline calicivirus vaccination in healthy adult cats. *Viruses*, 11(8), 702.
- Blüml, G. (2007). Microcarrier cell culture technology. İçinde *Animal Cell Biotechnology: Methods and Protocols* (ss. 149–178). Humana Press.
- Bock, A., Sann, H., Schulze-Horsel, J., Genzel, Y., Reichl, U., & Möhler, L. (2009). Growth behavior of number distributed adherent MDCK cells for optimization in microcarrier cultures. *Biotechnology Progress*, 25(6), 1717–1731.
- Bordicchia, M., Fumian, T. M., Brussel, K. V., Russo, A. G., Carrai, M., Le, S. J., & Barrs, V. R. (2021). Feline calicivirus virulent systemic disease: Clinical epidemiology, analysis of viral isolates and in vitro efficacy of novel antivirals in Australian outbreaks. *Viruses*, 13(10), 2040.
- Camero, M., Lanave, G., Catella, C., Lucente, M. S., Sposato, A., Mari, V., & Buonavoglia, A. (2022). ERDRP-0519 inhibits feline coronavirus in vitro. *BMC Veterinary Research*, 18(1), 55.
- Capstick, P. B., Telling, R. C., Chapman, W. G., & Stewart, D. L. (1962). Growth of a cloned strain of hamster kidney cells in suspended cultures and their susceptibility to the virus of foot-and-mouth disease. *Nature*.

- Caron, M. M., Emans, P. J., Coolson, M. M., Voss, L., Surtel, D. A., Cremers, A., & Welting, T. J. (2012). Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(10), 1170–1178.
- Castillo, J., Egloff, M., Collignon, F., Goffinet, J., & Drugmand, J. (2013). Transfer of hepatic progenitor stem cell culture process from multiple tray stacks to the Xpansion multiplate bioreactor. *Cytotherapy*, 15(4), S20.
- Conley, M. J., Bhella, D., & Boardman, P. E. (2019). The minor capsid protein VP2 of feline calicivirus is essential for genome release and infectivity. *Nature Microbiology*, 4(12), 2210–2218.
- Conley, M. J., McElwee, M., Azmi, L., Gabrielsen, M., Byron, O., Goodfellow, I. G., & Bhella, D. (2019). Calicivirus VP2 forms a portal-like assembly following receptor engagement. *Nature*, 565(7739), 377–381.
- Coyne, K. P., Christley, R. M., Pybus, O. G., Dawson, S., Gaskell, R. M., & Radford, A. D. (2012). Large-scale spatial and temporal genetic diversity of feline calicivirus. *Journal of Virology*, 86(20), 11356–11367. <https://doi.org/10.1128/JVI.00701-12>
- Coyne, K. P., Gaskell, R. M., Dawson, S., Porter, C. J., & Radford, A. D. (2007). Evolutionary mechanisms of persistence and diversification of a calicivirus within endemically infected natural host populations. *Journal of Virology*, 81(4), 1961–1971. <https://doi.org/10.1128/JVI.01981-06>
- Crandell, R. A., Fabricant, C. G., & Nelson-Rees, W. A. (1973). Development, characterization, and viral susceptibility of a feline (*Felis catus*) renal cell line (CRFK). *In Vitro*, 9(3), 176–185.
- Cubillos-Zapata, C., Angulo, I., Almanza, H., Borrego, B., Zamora-Ceballos, M., Castón, J. R., & Bárcena, J. (2020). Precise location of linear epitopes on the capsid surface of feline calicivirus recognized by neutralizing and non-neutralizing monoclonal antibodies. *Veterinary Research*, 51(1), 59.
- Cubillos-Zapata, C., Angulo, I., & Caridi, F. (2020). Antigenic variation and structural domains of the feline calicivirus capsid protein VP1. *Veterinary Research*, 51(1), 45–58.
- Cytiva. (2020). *Microcarrier cell culture: Principles and methods*. <https://www.cytiva.com/handbooks>
- Dawson, S., Bennett, D., Carter, S. D., Bennett, M., Meanger, J., Turner, P. C., Carter, M. J., Milton, I., & Gaskell, R. M. (1994). Acute arthritis of cats associated with feline calicivirus infection. *Research in Veterinary Science*, 56(2), 133–143. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(94\)90095-7](https://doi.org/10.1016/0034-5288(94)90095-7)
- den Eichen, N. V., Bromig, L., Sidarava, V., Marienberg, H., & Weuster-Botz, D. (2021). Automated multi-scale cascade of parallel stirred-tank bioreactors for fast protein expression studies. *Journal of Biotechnology*, 332, 103–113.

- Derakhti, S., Safiabadi-Tali, S. H., Amoabediny, G., & Sheikhpour, M. (2019). Attachment and detachment strategies in microcarrier-based cell culture technology: A comprehensive review. *Materials Science and Engineering: C*, *103*, 109782. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109782>
- Drechsler, Y., Vasconcelos, E. J., Griggs, L. M., & Diniz, P. P. (2020). CRFK and primary macrophages transcriptomes in response to feline coronavirus infection differ significantly. *Frontiers in Genetics*, *11*, 584744.
- Duval, K., Grover, H., Han, L. H., Mou, Y., Pegoraro, A. F., Fredberg, J., & Chen, Z. (2017). Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda, Md.)*, *32*(4), 266–277. <https://doi.org/10.1152/physiol.00036.2016>
- Eckhardt, D., Mueller, J., Friedrich, J., Klee, J. P., Sardlishvili, I., Walter, L. E., & Salzig, D. (2024). Production of oncolytic measles virus in Vero cells: impact of culture medium and multiplicity of infection. *Viruses*, *16*(11), 1740.
- Fastier, L. B. (1957). A new feline virus isolated in tissue culture. *American Journal of Veterinary Research*, *18*(67), 382–389.
- Foley, J., Hurley, K., Pesavento, P. A., Poland, A., & Pedersen, N. C. (2006). Virulent systemic feline calicivirus infection: local cytokine modulation and contribution of viral mutants. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, *8*(1), 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2005.08.002>
- Ford, R. B. (2016). WSAVA vaccination guidelines for the dog and the cat. *The Journal of Small Animal Practice*, *57*(1), 3. <https://doi.org/10.1111/jsap.12440>
- Forestell, S. P., Kalogerakis, N., Behie, L. A., & Gerson, D. F. (1992). Development of the optimal inoculation conditions for microcarrier cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, *39*(3), 305–313.
- GE Healthcare Biosciences. (2005). *Microcarrier cell culture: principles and methods*. General Electric Company.
- Griffiths, J. B. (1990). Scale-up of suspension and anchorage-dependent animal cells. İçinde *Animal Cell Culture* (ss. 49–63). Humana Press.
- Gutiérrez-Granados, S., Gòdia, F., & Cervera, L. (2018). Continuous manufacturing of viral particles. *Current Opinion in Chemical Engineering*, *22*, 107–114.
- Henzel, A., e Silva, M. S., Luo, S., Lovato, L. T., & Weiblen, R. (2012). Genetic and phylogenetic analyses of capsid protein gene in feline calicivirus isolates from Rio Grande do Sul in southern Brazil. *Virus Research*, *163*(2), 667–671.
- Hernández, B., Guerra, M., Salas, M. L., & Andrés, G. (2016). African swine fever virus undergoes outer envelope disruption, capsid disassembly and inner envelope fusion before core release from multivesicular endosomes. *PLoS Pathogens*, *12*(4), e1005595.

- Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M. J., Hartmann, K., Egberink, H., Truyen, U., Tasker, S., & Addie, D. D. (2022). Feline calicivirus infection: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 24(7), 591–600.
- Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M. J., Hartmann, K., Egberink, H., Truyen, U., Tasker, S., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Frymus, T., Lloret, A., Marsilio, F., Pennisi, M. G., Addie, D. D., Lutz, H., Thiry, E., Radford, A. D., & Möstl, K. (2022). Calicivirus Infection in Cats. *Viruses*, 14(5), 937. <https://doi.org/10.3390/v14050937>
- Hofmann-Lehmann, R., Hosie, M. J., Hartmann, K., Egberink, H., Truyen, U., Tasker, S., & Möstl, K. (2022). Calicivirus infection in cats. *Viruses*, 14(5), 937.
- Hu, A. Y. C., Weng, T. C., Tseng, Y. F., Chen, Y. S., Wu, C. H., Hsiao, S., & Lee, M. S. (2008). Microcarrier-based MDCK cell culture system for the production of influenza H5N1 vaccine. *Vaccine*, 26(45), 5736–5740.
- Huh, D., Hamilton, G. A., & Ingber, D. E. (2011). From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends in Cell Biology*, 21(12), 745–754.
- Hurley, K. F., & Sykes, J. E. (2003). Update on feline calicivirus: new trends. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*, 33(4), 759–772.
- Ikonomou, L., Bastin, G., Schneider, Y. J., & Agathos, S. N. (2004). Effect of partial medium replacement on cell growth and protein production for the high-five trade mark insect cell line. *Cytotechnology*, 44, 67–76.
- International Committee on Taxonomy of Viruses. (2026, Mart). Vesivirus felis. https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202502810%5C&taxon_name=Vesivirus%5C%20felis
- Kalia, M., & Jameel, S. (2011). Virus entry paradigms. *Amino Acids*, 41(5), 1147–1157.
- Kiesslich, S., Kim, G. N., Shen, C. F., Kang, C. Y., & Kamen, A. A. (2021). Bioreactor production of rVSV-based vectors in Vero cell suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*, 118(7), 2649–2659.
- Kistner, O., Barrett, P. N., Mundt, W., Reiter, M., Schober-Bendixen, S., Eder, G., & Domer, F. (1999). Development of a Vero cell-derived influenza whole virus vaccine. *Developments in Biological Standardization*, 98, 101–110.
- Knowles, J. O., McArdle, F., Dawson, S., Carter, S. D., Gaskell, C. J., & Gaskell, R. M. (1991). Studies on the role of feline calicivirus in chronic stomatitis in cats. *Veterinary Microbiology*, 27(3-4), 205–219. [https://doi.org/10.1016/0378-1135\(91\)90148-9](https://doi.org/10.1016/0378-1135(91)90148-9)
- Lappin, M. R., Jensen, W. A., Jensen, T. D., Basaraba, J. R., Brown, C. A., Radecki, S. V., & Hawley, J. R. (2005). Investigation of the induction of antibodies against Crandell-Rees feline kidney cell lysates and feline renal cell lysates after parenteral administration of vaccines against feline viral rhinotracheitis, calicivirus, and panleukopenia in cats. *American Journal of Veterinary Research*, 66(3), 506–511.

- Lasfargues, E. Y., Lasfargues, J. C., Dion, A. S., Greene, A. E., & Moore, D. H. (1976). Experimental infection of a cat kidney cell line with the mouse mammary tumor virus. *Cancer Research*, 36(1), 67–72.
- Lawson, J. S., Syme, H. M., Wheeler-Jones, C. P. D., & Elliott, J. (2019). Characterisation of Crandell-Rees Feline Kidney (CRFK) cells as mesenchymal in phenotype. *Research in Veterinary Science*, 127, 99–102.
- Mao, J., Ye, S., Li, Q., Bai, Y., Wu, J., Xu, L., & Li, S. (2022). Molecular characterization and phylogenetic analysis of feline calicivirus isolated in Guangdong Province, China from 2018 to 2022. *Viruses*, 14(11), 2421.
- Matsumoto, H., Teshima, T., Iizuka, Y., Sakusabe, A., Takahashi, D., Amimoto, A., & Koyama, H. (2018). Evaluation of the efficacy of the subcutaneous low recombinant feline interferon-omega administration protocol for feline chronic gingivitis-stomatitis in feline calicivirus-positive cats. *Research in Veterinary Science*, 121, 53–58. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2018.10.003>
- Mizuno, T., Goto, Y., Baba, K., Masuda, K., Ohno, K., & Tsujimoto, H. (2001). TNF- α -induced cell death in feline immunodeficiency virus-infected cells is mediated by the caspase cascade. *Virology*, 287(2), 446–455.
- Montagnon, B. J., J. C. Vincent-Falquet & Saluzzo, J. F. (1999). Experience with vero cells at Pasteur Mérieux Connaught. *Developments in Biological Standardization*, 98, 137–140.
- Nienow, A. W. (2006). Reactor engineering in large scale animal cell culture. *Cytotechnology*, 50, 9–33.
- Nienow, A. W., Sieck, J. B., Cordes, T., Budach, W. E., Rhiel, M. H., Suemeghy, Z., Leist, C., Villiger, T. K., Morbidelli, M., & Soos, M. (2014). Development of a scale-down model of hydrodynamic stress to study the performance of an industrial CHO cell line under simulated production scale bioreactor conditions. *Journal of Biotechnology*, 171, 82–84.
- Nims, R., & Plavsic, M. (2013). Inactivation of caliciviruses. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 6(3), 358–392. <https://doi.org/10.3390/ph6030358>
- Ossiboff, R. J., Zhou, Y., Lightfoot, P. J., Prasad, B. V., & Parker, J. S. (2010). Conformational changes in the capsid of a calicivirus upon interaction with its functional receptor. *Journal of Virology*, 84(11), 5550–5564.
- Pedersen, N. C., Elliott, J. B., Glasgow, A., Poland, A., & Keel, K. (2000). An isolated epizootic of hemorrhagic-like fever in cats caused by a novel and highly virulent strain of feline calicivirus. *Veterinary Microbiology*, 73(4), 281–300.
- Pereira, J. J., Baumworcel, N., Fioretti, J. M., Domingues, C. F., Moraes, L. F., Marinho, R. D. S. S., Vieira, M. C. R., Pinto, A. M. V., & de Castro, T. X. (2018). Molecular characterization of feline calicivirus variants from multicat household and public

- animal shelter in Rio de Janeiro, Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 777–784. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.003>
- Pesavento, P. A., MacLachlan, N. J., Dillard-Telm, L., Grant, C. K., & Hurley, K. F. (2004). Pathologic, immunohistochemical, and electron microscopic findings in naturally occurring virulent systemic feline calicivirus infection in cats. *Veterinary Pathology*, 41(3), 257–263. <https://doi.org/10.1354/vp.41-3-257>
- Pino, P., Kint, J., Kiseljak, D., Agnolon, V., Corradin, G., Kajava, A. V., & Wurm, F. M. (2020). Trimeric SARS-CoV-2 spike proteins produced from CHO cells in bioreactors are high-quality antigens. *Processes*, 8(12), 1539.
- Pizarro-Lucero, J., González, M., Yáñez, C., Maceiras, M. J., Neira, V., & Muñoz, L. (2025). Identification and molecular characterization of subgroups GI.1 and GI.2 of feline calicivirus in cats (*Felis silvestris catus*) from Metropolitan Region of Chile. *Microbial Pathogenesis*, 206, 107798. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2025.107798>
- Prasad, B. V., Matson, D. O., & Smith, A. W. (1994). Three-dimensional structure of calicivirus. *Journal of Molecular Biology*, 240(3), 256–264.
- Radford, A., Coyne, K., Dawson, S., Porter, C., & Gaskell, R. (2007). Kedi calicivirus. *Veterinerlik Araştırması*, 38(2), 319–335.
- Radford, A. D., Addie, D., Belák, S., Boucraut-Baralon, C., Egberink, H., Frymus, T., & Horzinek, M. C. (2009). Feline calicivirus infection: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 11(7), 556–564.
- Radford, A. D., Bennett, M., McArdle, F., Dawson, S., Turner, P. C., Glenn, M. A., & Gaskell, R. M. (1997). FCV ile ilişkili hastalık ve aşı başarısızlıklarının epidemiyolojik araştırmasında bir kedi calicivirus (FCV) hiperdeğişken bölgesinin dizi analizinin kullanılması. *Aşı*, 15(12-13), 1451–1458.
- Radford, A. D., Dawson, S., Ryvar, R., Coyne, K., Johnson, D. R., Cox, M. B., & Gaskell, R. M. (2003). High genetic diversity of the immunodominant region of the feline calicivirus capsid gene in endemically infected cat colonies. *Virus Genes*, 27(2), 145–155.
- Ren, Z., Lu, Z., Wang, L., Huo, Z., Cui, J., Zheng, T., & Yang, R. (2015). Rapid production of a H9N2 influenza vaccine from MDCK cells for protecting chicken against influenza virus infection. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(7), 2999–3013.
- Saade, D. I., Liu, C. C., Mills, E. P., Stanfield, B., Thieulent, C. J., Chouljenko, V. N., & Lewin, A. C. (2026). Replication kinetics and cytopathic effect of feline calicivirus in feline corneal epithelial cells. *Veterinary Ophthalmology*, 29(1), e13289.
- Sato, Y., Ohe, K., Murakami, M., Fukuyama, M., Furuhashi, K., Kishikawa, S., & Taneno, A. (2002). Phylogenetic analysis of field isolates of feline calicivirus (FCV) in Japan by sequencing part of its capsid gene. *Veterinary Research Communications*, 26(3), 205–219.

- Shen, C. F., Guilbault, C., Li, X., Elahi, S. M., Ansorge, S., Kamen, A., & Gilbert, R. (2019). Development of suspension adapted Vero cell culture process technology for production of viral vaccines. *Vaccine*, 37(47), 6996–7002.
- Shimode, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., & Miyazawa, T. (2022). Establishment of CRFK cells for vaccine production by inactivating endogenous retrovirus with TALEN technology. *Scientific Reports*, 12(1), 6641.
- Siebelink, K. H., Karlas, J. A., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D., & Bosch, M. L. (1995). A determinant of feline immunodeficiency virus involved in Crandell feline kidney cell tropism. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 46(1-2), 61–69.
- Slaviero, M., Ehlers, L. P., Argenta, F. F., Savi, C., Lopes, B. C., Pavarini, S. S., & Sonne, L. (2021). Causes and lesions of fatal pneumonia in domestic cats. *Journal of Comparative Pathology*, 189, 59–71.
- Smith, S. L., Afonso, M. M., G. L. Pinchbeck, Gaskell, R. M., Dawson, S., & Radford, A. D. (2020). Temporally separated feline calicivirus isolates do not cluster phylogenetically and are similarly neutralised by high-titre vaccine strain FCV-F9 antisera in vitro. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 22(6), 602–607.
- Songaksorn, N., Petsophonsakul, W., Pringproa, K., Lampang, K. N., Sthitmatee, N., Srifawattana, N., Piyaungsri, K., & Thongkorn, K. (2021). Prevalence of autoantibodies that bind to kidney tissues in cats and association risk with antibodies to feline viral rhinotracheitis, calicivirus, and panleukopenia. *Journal of Veterinary Science*, 22(3), e38.
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Mitra, T., & Green, K. Y. (2002). Cleavage map and proteolytic processing of the feline calicivirus nonstructural polyprotein. *Journal of Virology*, 76(14), 7060–7072.
- Sosnovtsev, S. V., Belliot, G., Chang, K. O., Onwudiwe, O., & Green, K. Y. (2005). Kedi kalisivirüsü VP2, bulaşıcı viryonların üretimi için gereklidir. *Viroloji Dergisi*, 79(7), 4012–4024.
- Sosnovtsev, S. V., Garfield, M., & Green, K. Y. (2002). Processing map and essential cleavage sites of the nonstructural polyprotein encoded by ORF1 of the feline calicivirus genome. *Journal of Virology*, 76(14), 7060–7072.
- Sosnovtsev, S. V., Prikhod'ko, E. A., Belliot, G., Cohen, J. I., & Green, K. Y. (2003). Feline calicivirus replication induces apoptosis in cultured cells. *Virus Research*, 94(1), 1–10.
- Sousa, M., Fenge, C., Rupprecht, J., Tappe, A., Greller, G., Alves, P., & Roldão, A. (2019). Process intensification for Peste des Petites Ruminants Virus vaccine production. *Vaccine*, 37(47), 7041–7051.
- Spearman, C. (1908). The method of "right and wrong cases" (constant stimuli) without Gauss's formulae. *British Journal of Psychology*, 2(3), 227–242. <https://doi.org/10.1111/j.2044-8295.1908.tb00175.x>

- Spiri, A. M. (2022). An update on feline calicivirus. *Schweiz Arch Tierheilkd*, 164(3), 225–241.
- Spiri, A. M., Meli, M. L., Riond, B., Herbert, I., Hosie, M. J., & Hofmann-Lehmann, R. (2019). Environmental Contamination and Hygienic Measures After Feline Calicivirus Field Strain Infections of Cats in a Research Facility. *Viruses*, 11(10), 958. <https://doi.org/10.3390/v11100958>
- Strober, W. (2015). Hücre canlılığının tripan mavisi dışlama testi. *Curr. Protoc. Immunol.*, 111, A3.B.1–A3.B.3. <https://doi.org/10.1002/0471142735.ima03bs111>
- Stuart, A. D., & Brown, T. D. K. (2006). Entry of feline calicivirus is dependent on clathrin-mediated endocytosis and acidification in endosomes. *Journal of Virology*, 80(15), 7500–7509.
- Sun, M. B., Jiang, Y. J., Li, W. D., Li, P. Z., Li, G. L., Jiang, S. D., & Liao, G. Y. (2004). A novel process for production of hepatitis A virus in Vero cells grown on microcarriers in bioreactor. *World Journal of Gastroenterology*, 10(17), 2571–2573. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i17.2571>
- Sun, W., Wang, M., Shi, Z., Wang, P., Wang, J., Du, B., Wang, S., Sun, Z., Liu, Z., Wei, L., Yang, D., & He, X. (2024). VP2 mediates the release of the feline calicivirus RNA genome by puncturing the endosome membrane of infected cells. *Journal of Virology*, 98(5), e0035024. <https://doi.org/10.1128/jvi.00350-24>
- Tanaka, G., Goto, R., Komoto, T., Kubota, A., Hayashi, R., Igawa, T., & Awazu, A. (2026). Whole-genome sequencing of CRFK and PG-4 cells to infer the phenotype of the original donor cats. *Companion Animal Health and Genetics*, 13(1), 1.
- Teworte, S., Malcı, K., Walls, L. E., Halim, M., & Rios-Solis, L. (2021). Recent advances in fed-batch microscale bioreactor design. *Biotechnology Advances*, 55, 107888.
- Tian, J., Zhang, X., Wu, H., Liu, C., Liu, J., Hu, X., & Qu, L. (2015). Assessment of the IFN- β response to four feline caliciviruses: Infection in CRFK cells. *Infection, Genetics and Evolution*, 34, 352–360.
- Todesco, H. M., Gafuik, C., John, C. M., Roberts, E. L., Borys, B. S., Pawluk, A., Kallos, M. S., Potts, K. G., & Mahoney, D. J. (2024). High-titer manufacturing of SARS-CoV-2 Spike-pseudotyped VSV in stirred-tank bioreactors. *Molecular Therapy. Methods & Clinical Development*, 32(1), 101189. <https://doi.org/10.1016/j.omtm.2024.101189>
- Tree, J. A., Richardson, C., Fooks, A. R., Clegg, J. C., & Looby, D. (2001). Comparison of large-scale mammalian cell culture systems with egg culture for the production of influenza virus A vaccine strains. *Vaccine*, 19(25-26), 3444–3450.
- van Wezel, A. V. (1967). Growth of cell-strains and primary cells on micro-carriers in homogeneous culture. *Nature*, 216(5110), 64–65.

- Verbruggen, S., Luining, D., van Essen, A., vd. (2018). Bovine myoblast cell production in a microcarriers-based system. *Cytotechnology*, 70, 503–512. <https://doi.org/10.1007/s10616-017-0101-8>
- Vinje, J., Estes, M. K., Esteves, P., Green, K. Y., Katayama, K., Knowles, N. J., L'Homme, Y., Martella, V., Vennema, H., White, P. A., & Ictv Report Consortium. (2019). ICTV Virus Taxonomy Profile: Caliciviridae. *The Journal of General Virology*, 100(11), 1469–1470. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001332>
- ViralZone. (2026). Caliciviridae [Retrieved June 16, 2026]. <https://viralzone.expasy.org/32>
- Wei, Y., Zeng, Q., Gou, H., & Bao, S. (2024). Update on feline calicivirus: viral evolution, pathogenesis, epidemiology, prevention and control. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1388420. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1388420>
- Whittemore, J. C., Hawley, J. R., Jensen, W. A., & Lappin, M. R. (2010). Antibodies against Crandell Rees Feline Kidney (CRFK) cell line antigens, α -enolase, and annexin A2 in vaccinated and CRFK hyperinoculated cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(2), 306–313.
- Yang, J., Guertin, P., Jia, G., Lv, Z., Yang, H., & Ju, D. (2019). Large-scale microcarrier culture of HEK293T cells and Vero cells in single-use bioreactors. *AMB Express*, 9(1), 70.
- Yang, S., Wang, L., & Zhang, X. (2023). Antigenic diversity and cross-protection among feline calicivirus isolates. *Vaccine*, 41(18), 2890–2898.
- Yang, Y., Liu, Z., Chen, M., Feng, K., Qi, R., Zheng, Y., & Liu, J. (2023). Classification of genotypes based on the VP1 gene of feline calicivirus and study of cross-protection between different genotypes. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1226877.
- Yoshikawa, R., Sato, E., Igarashi, T., & Miyazawa, T. (2010). Characterization of RD-114 virus isolated from a commercial canine vaccine manufactured using CRFK cells. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(9), 3366–3369.
- Zhang, R., Zhu, H., Zhao, G., Xue, X., Yu, X., Liu, Y., Yu, J., Jiang, L., Zhang, J., & Zhang, X. (2025). Transcriptome analysis of Crandell Rees Feline Kidney (CRFK) cells infected with Feline calicivirus strain 023 (FCV 023). *Veterinary Microbiology*.

EKLER

Ek 1

Sayı : 2026/01
Konu : Yerel Etik Kurul Kararı

20/04/2026

DOLLVET A.Ş.
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU
(DOLLVET-HADYEK)

Sayın: Tuba Beyza Polat

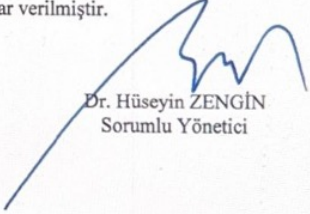
03.04.2026 tarihinde kurulumuza sunulan "CRFK Hücre Hattının Mikrotaşıyıcı Tabanlı Süspansiyon Kültürüne Adaptasyonu ve Bu Sistemlerde Feline Calicivirus (FCV) Üretim Potansiyelinin Araştırılması" isimli projenizde,

Orman ve Su İşleri Bakanlığının 15 Şubat 2014 tarih ve 28914 sayılı "Hayvan Deneyleri Etik Kurullarının Çalışma Usul ve Esaslarına Dair Yönetmeliği Madde 2 (2);

- a) Deneyisel olmayan tarımsal uygulamaları,
- b) Deneyisel olmayan klinik veteriner hekimliği uygulamalarını,
- c) Veteriner sağlık ürünlerine pazarlama yetkisi verilebilmesi için gereken klinik deneyleri,
- ç) Kayıtlı veya onaylı hayvancılık işletmelerinin yapmakla yükümlü olduğu uygulamaları,
- d) Birincil amacı bir hayvanın kimliklendirilmesi olan uygulamaları, kapsamaz."

ifadesi gereğince Tarım ve Orman Bakanlığı ile HADMEK iznine gerek yoktur.

Projenin araştırma etiği açısından; Dollvet A.Ş. Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu (DOLLVET-HADYEK) Yönergesi ilkelerine uyulduğuna, taahhülle bulunduğunuz çerçeve dâhilinde olması şartı ile "**Uygun olduğuna**" oy birliği ile karar verilmiştir.


Dr. Hüseyin ZENGİN
Sorumlu Yönetici

Ek:

- Karar onayı

Ek 2

DOLLVET A.Ş.
HAYVAN DENEYLERİ YEREL ETİK KURULU (DOLLVET-HADYEK)

Karar No : 2026/01
Konu : Yerel Etik Kurul Kararı

03.04.2026 tarihinde kurulumuza sunulan "CRFK Hücre Hattının Mikrotasıyıcı Tabanlı Süspansiyon Kültürüne Adaptasyonu ve Bu Sistemlerde Feline Calicivirus (FCV) Üretim Potansiyelinin Araştırılması" isimli projenizde yapacağınız hayvan denemeleri kurulumuza taahhitle bulunduğunuz çerçeve dâhilinde olması şartı ile uygun bulunmuştur.

Yapılan başvuru formunun incelenmesi sonucu çalışmanın uygun olduğu görüşüne oy birliğince karar verilmiştir.

Dr. Hüseyin ZENGİN
Sorumlu Yönetici

Mehmet Emin TAYAN Veteriner Hekim Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı Sorumlusu	Dr. Nilay ÜNAL Veteriner Hekim Müdür yardımcısı	Cahit BAYBURS Veteriner Hekim Üretim Sorumlusu
Hülya KAPLAN Veteriner Hekim Etik Kurul Başkanı	Yavuz YÜCETEPE Veteriner Hekim Hayvan Refahı Birimi Sorumlusu	Ömer DÖRTKARDEŞ Veteriner Hekim Atenüe Viral Aşılar Birim Sorumlusu
Mehmet Ali ÖZCAN Veteriner Hekim Ar-Ge Birimi	Mehmet ARSLAN Veteriner Hekim İnaktif Viral Aşılar Birimi Sorumlusu	Aziz YALÇIN Veteriner Hekim Süt Üreticileri Birliği Üyesi Sivil Üye (T.C. Vatandaşı)
Ahmet Özgür YAHLİZEDE Veteriner hekim Damızlık Sığır Yetiştiriciliği birlik üyesi Sivil Üye (T.C. Vatandaşı)		