

<https://doi.org/10.36719/2789-6919/42/113-117>

Şəhla Əliyeva

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu
biologiya üzrə fəlsəfə doktoru

<https://orcid.org/0009-0006-6971-4679>

shahlaaliyeva1969@gmail.com

Fatma Hüseynova

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu
tibb üzrə fəlsəfə doktoru

<https://orcid.org/0009-0009-6805-2302>

huseynova01049@gmail.com

Zivər Abseyanova

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu
<https://orcid.org/0009-0009-1366-0896>

ziver.abseyanova@mail.ru

Sevinc Eyvazlı

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu
<https://orcid.org/0009-0005-5045-3176>

sevincesgerova122@gmail.com

İlhamə Məsimova

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu
<https://orcid.org/0009-0004-5507-3650>

ilhamemasimova73@gmail.com

Leyşmaniya parazitlərinin müxtəlif qidalı mühitlərdə *in vitro* inkişafının müqayisəli öyrənilməsi

Xülasə

Leyşmanioz Yaxın Şərq və Aralıq dənizi ölkələrində yayılmış ciddi parazitər xəstəlikdir. Xəstəliyə qarşı vaksin hazırlanması, törədiciyin dərman preparatlarına qarşı həssaslığının öyrənilməsi üçün parazitlərin *in vitro* kulturasının alınması xüsusi önəm daşıyır.

Leishmania-nın həm ikifazlı, həm də maye mediumlarda kultivasiyası üçün geniş üsullar spektri mövcuddur. Bifaza mediumları parazitlərin ilkin təcrid edilməsi və promastiqotların yüksək yoluxuculuğuna nail olmaq üçün, maye mühitlər isə geniş miqyaslı təcrübələr üçün daha məqsədəuyğundur. Müxtəlif tədqiqatlarda leyşmaniya parazitləri fərqli qidalı mühitlərdə kultivasiya edilmişdir. Tədqiqatlar nəticəsində ilkin olaraq tripanosomlar üçün hazırlanmış, bifazalı və maye mühitin üstünlüklərini özündə birləşdirən ikifazlı SNB-9 (saline-neopeptone-blood) mühitində *Leishmania* promastiqotlarının kultivasiyasının optimallaşdırılması təklif olunmuşdur. Digər tədqiqatlarda *L.donovani* promastiqotlarının kultivasiyası üçün hemoqlobinli, yeni, qansız bifazalı qidalı mühit; sadə agar, qidalı bulyon, 10% dana rüşeymi zərdabından ibarət medium; yüksək həyatilik qabiliyyətinə malik promastiqot kulturasını təmin edə biləcək, sadə inqredientlərdən ibarət yeni qidalı mühitlər hazırlanmışdır. Bütün bu tədqiqatlar gələcəkdə leyşmaniya parazitlərinin kultivasiyasında istifadə edilən klassik qidalı mühitə alternativ, daha asan yolla başa gələn yeni mediumların hazırlanması baxımından çox əhəmiyyətlidir.

Açar sözlər: *leyşmanioz, Leishmania parazitləri, NNN, SNB-9, RPMİ-1640 mediumu*

Shahla Aliyeva

The V.Y.Akhundov Scientific Research Medical Preventive Institute
PhD in biological sciences

<https://orcid.org/0009-0006-6971-4679>

shahlaaliyeva1969@gmail.com

Fatma Huseynova

The V.Y.Akhundov Scientific Research Medical Preventive Institute

PhD in medical sciences

<https://orcid.org/0009-0009-6805-2302>

huseynova01049@gmail.com

Zivar Abseynova

The V.Y.Akhundov Scientific Research Medical Preventive Institute

<https://orcid.org/0009-0009-1366-0896>

ziver.abseynova@mail.ru

Sevinc Eyvazli

The V.Y.Akhundov Scientific Research Medical Preventive Institute

<https://orcid.org/0009-0005-5045-3176>

sevincesgerova122@gmail.com

Ilhame Masimova

The V.Y.Akhundov Scientific Research Medical Preventive Institute

<https://orcid.org/0009-0004-5507-3650>

ilhamemasimova73@gmail.com

A Comparative Study of in Vitro Development of *Leishmania* Parasites in Different Nutrient Environments

Abstract

Leishmaniasis is a serious parasitic disease prevalent in the Middle East and Mediterranean countries. In vitro culture of parasites is of particular importance for preparing a vaccine against the disease and studying the sensitivity of the causative agent to drugs.

A wide spectrum of methods is available for the cultivation of *Leishmania* in both biphasic and liquid media. Biphasic media are suitable for primary isolation of parasites and for achieving high infectivity of promastigotes, while liquid media are more suitable for large-scale experiments. In different studies, *Leishmania* parasites were cultured in different nutrient media. As a result of the research, optimization of the cultivation of *Leishmania* promastigotes in biphasic SNB-9 (saline-neopeptone-blood) medium, which combines the advantages of biphasic and liquid medium, originally prepared for trypanosomes, was proposed. In other studies, a novel blood-free biphasic nutrient medium with hemoglobin was prepared for the cultivation of *L. donovani* promastigotes. Also simple agar, nutrient broth, medium consisting of 10% fetal bovine serum; new nutrient medium consisting of simple ingredients that can provide promastigote culture with high viability has been proposed. All these studies are very important from the point of view of preparing new mediums that are easier to use and alternative to the classical nutrient medium used in the cultivation of *Leishmania* parasites in the future.

Keywords: leishmaniasis, *Leishmania* parasites, NNN, SNB-9, RPMI-1640 medium

Giriş

Leyşmanioz transmissiv xəstəlik olub, törədicisi obliqat makrofaqdaxili ibtidailərdir. Bir çox tropik, subtropik ölkələr və Aralıq dənizi hövzəsi üçün endemikdir. Dünya üzrə 12 milyon insan *Leishmania* ilə yoluxmuşdur və 88 ölkədə 350 milyon insan yoluxma riski altındadır (Desjeux, 1996). Xəstəlik törədicilərinin 20-dən artıq növü mövcuddur və o, 30-dan artıq mığmığa növü ilə ötürülür. *Leishmania* növləri karbohidratları parçalaya bilən və enerji mənbəyi kimi ətraf mühətdən qlükoza, amin turşuları və ya lipidlərdən istifadə edə bilən protozoalardır (Kwang, 2023).

Qeyd etmək zəruridir ki, hələlik leyşmanioza qarşı peyvənd hazırlanmamışdır (Kedzierski, 2010) və xəstəliyin müalicəsi əhəmiyyətli təkmilləşdirmə tələb edir (Goto, 2010). Leyşmaniozun heyvan

modelləri (Lima, 1997) xəstəliyin mexanizmlərinin başa düşülməsində, onun müalicəsi və profilaktikası yollarının tapılmasında əsas rol oynayır. Etibarlı nəticələr əldə etmək üçün ən mühüm ilkin şərtlərdən biri *Leishmania* parazitlərinin uzunmüddətli kulturasının mövcudluğudur.

İqor Qrekov və həmkarlarının məqaləsində bifazalı SNB-9 qidalı mühitində kultivasiya yolu ilə yüksək yoluxuculuğa malik leyşmaniya promastiqotlarının alınması işıqlandırılmışdı (Grekov, 2011).

Ümumiyyətlə, parazitlərin kultivasiyası üçün istifadə olunan qidalı mühitlər ikifazlı və monofazlı (maye) olmaqla 2 qrupa bölünə bilər. Maye mühitlərlə müqayisədə ikifazlı mediumun hazırlanması texniki cəhətdən daha çətindir. Bununla belə, *Leishmania* parazitlərinin ilkin təcrid edilməsi üçün ikifazlı mühitin istifadəsi çox tövsiyə olunur və bifazalı mühitlərin parazitlərin yoluxuculuğu üçün daha əlverişli olduğuna dair sübutlar var (Dey et al., 2002).

Tədqiqat

Bu tədqiqatda ikifazlı və maye mühitin üstünlüklərini özündə birləşdirən ikifazlı SNB-9 (fizioloji məhlul-neopepton-qan) mühitində *Leishmania* parazitlərinin kultivasiyası təsvir edilir. Bu mühit əvvəlcə quş sümük iliyindən tripanosomları təcrid etmək üçün istifadə edilmiş, sonradan isə *Leishmania* fiziologiyasını öyrənmək üçün tətbiq edilmişdir. Bərk və maye faza nisbəti 4:1 idi. İkifazlı qan əsaslı SNB-9 mühiti böyük həcmdə maye fazaya malikdir. SNB-9 qidalı mühiti qanlı aqar bazasından ibarətdir. Qanlı aqar bazası 2% Bacto™ aqar (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, ABŞ), 2% Bacto™ Neopeptone (Becton, Dickinson and Company) və 0,6% NaCl məhlulu ilə hazırlanmış, 20 dəqiqə ərzində 1 atm. təzyiqdə 120°C avtoklavlanmışdır. Sonra məhlul 60°C-də su hamamında soyudulmuş və ona defibrinləşdirilmiş dovşan qanı əlavə edilmişdir.

Klassik ikifazlı NNN (Nicole-Novey-McNeil) və USMARU (Difco Blood Agar) mühitinə nisbətən SNB-9-da daha böyük həcmdə maye fazanın olması kultura manipulyasiyasını asanlaşdırır. Aydın ki, bu, ümumi parazit məhsuldarlığına da təsir edə bilər. Tədqiqatçılar SNB-9-da *Leishmania*-nın böyümə dinamikasını təhlil edib onu tam Schneider mühitində böyümə dinamikası ilə müqayisə etmişlər. Kulturanın stasionar mərhələsinin yoluxucu potensialını qiymətləndirmək üçün təcrübə siçanları parazit daşıyan makrofaqlarla yoluxdurulmuşdur (van Zandbergen et al., 2006). Tədqiqat işində *L.major* və *L.tropica*-nın SNB-9, 10% Schneider və 20% Schneider qidalı mühitlərində inkişafı izlənilmişdi. SNB-9 və 10% Schneider mediumlarının müqayisəsində *L.major* konsentrasiyalarındakı fərqlər əhəmiyyətli deyildi, lakin SNB-9 və 20% Schneider arasında parazit konsentrasiyalarındakı fərqlər kultivasiyanın 4, 5, 6 və 7-ci günləri gözəçarpan idi. Beləliklə, ilkin olaraq *Trypanosoma* kultivasiyası üçün hazırlanmış bifazalı SNB-9 qidalı mühiti leyşmaniya parazit kulturası üçün də yararlı olmuşdur. SNB-9 genişmiqyaslı təcrübələr üçün kifayət qədər yüksək parazit kütləsi əldə etməyə imkan verir və maye fazanın çoxluğu manipulyasiyanı asanlaşdırır. SNB-9-da yetişdirilən parazitlər in vitro yüksək dərəcədə yoluxucudur.

Başqa bir tədqiqatda *L.donovani* promastiqotlarının kultivasiyası üçün hemoqlobinli, yeni, qansız bifazalı qidalı mühit təklif olunmuşdur (Agarwal, 1996). Klassik qidalı mühitlərin tərkibindəki qan və ya zərdabın iribuynuzlu heyvanların hemoqlobin tozu ilə əvəz edilməsinə cəhd edilmişdi. Tədqiqatçılar qeyd edir ki, 4 saat müddətində ərsəyə gələn qidalı mühit sadə, etibarlı, ucuz və avtoklav edilə bilər. Mediumun hazırlanmasında istifadə olunan inqredientlər aşağı qiymətə asanlıqla əldə edilir və hazırlanan məhlul tərkibini dəyişmədən bir ay ərzində 4°C temperaturda saxlanıla bilər. Limoncu və həmkarlarının apardığı tədqiqatın (Limoncu, 2004) məqsədi *Leishmania* parazitləri üçün, çoxsaylı və yüksək həyatilik qabiliyyətinə malik promastiqot kulturasını təmin edə biləcək, mikrobiologiya və ya parazitologiya laboratoriyalarında mövcud olan inqredientlərdən ibarət yeni qidalı mühitlər yaratmaq idi. Bu qidalı mühitlərin digər xüsusiyyətləri qan, FBS (dana dölünün zərdabı), qırmızı qan hüceyrəsi lizatına ehtiyac olmaması, aşağı qiymət və asanlıqla hazırlanması idi. Dəri leyşmaniozuna (CL) şübhəli xəstələrdən alınmış aspirasiya nümunələri bu mühitlərə aşılınmışdır. Üç qidalı mühit hazırlanmışdır. Birinci - Trypticase-Mal əti ekstraktı-Hemoqlobin (TBH) mühiti. Bu medium triptikaza, zülal mənbəyi kimi mal əti ekstraktı və maya ekstraktı, karbohidrat mənbəyi kimi qlükoza, FeNH₄ və öküz qanı hemoqlobindən ibarətdir. İkinci - *Leishmania* parazitlərinin kulturası üçün effektiv olduğu müəyyən edilmiş pepton-maya ekstraktı (PY), onun tərkibinə iribuynuzlu heyvan hemoqlobini (PYH) də əlavə edilmişdi. Üçüncü - tərkibində öküz hemoqlobini (BKH) olan Beyin-Ürək (Brain Heart medium) qidalı mühiti. Promastiqotların sayı

RPMI-1640 və BKH mediumunda müvafiq olaraq 8 və 13-cü günlərdə ən yüksək olmuşdur. TBH və PYH mediumunda yüksək hədd 16 və 19-cu günlərdə, TBH mediumunda isə 20-ci gündən sonra yüksək rəqəm alınmışdır. BKH, TBH və RPMI-1640 qidalı mühitlərində promastiqotların sayının təxminən eyni olduğu aşkar edilmişdir, PYH mühitində isə bu rəqəm daha aşağı olmuşdur. Dəri leşmaniozuna şübhəli nümunələrdən (lezion nümunələri) ən çox inkişaf tərkibində 10% FCS olan RPMI-1640 mühitində, daha sonra TBH və BKH, ən az isə PYH mediumunda aşkar edilmişdi. Tədqiqatın nəticələri göstərdi ki, bu üç qidalı mühit FCS və qırmızı qan hüceyrəsi lizatına ehtiyac olmadan promastiqotların inkişafı üçün effektivdir və həmçinin xəstələrdən parazitlərin təcrid edilməsi üçün də istifadə oluna bilər.

Ozbilgin və həmkarlarının tədqiqatında (Ozbilgin, 1995) biri visseral leşmanioz, digəri isə dəri leşmaniozu diaqnozu qoyulmuş iki xəstədən alınan sümük iliği aspirasiyası və biopsiya nümunələri Novy, McNeal, Nicolle (NNN) mühitinə və tərkibində dana rüşeymi zərdabı (FCS) olan qidalı bulyona (NB) aşılınmışdır (penisilin və streptomisin əlavə olunmuşdur). Hər iki mediumda parazitlər 10 gün ərzində 27°C-də inkubasiya edilmiş, *L.infantum* və *L.major* promastiqotları gündəlik müşahidə edilmişdir. Promastiqotlar birinci gündən sonra qidalı bulyonda, inkubasiyanın ikinci və ya üçüncü günündən sonra isə NNN mediumunda müşahidə edilmişdir ki, bu da leşmaniozun hər iki formasının erkən diaqnostikasında qidalı bulyonun effektivliyini göstərir.

Gokmen və həmkarlarının tədqiqat işində (Gokmen, 2015) dəri leşmaniozunun diaqnostikası üçün alternativ ikifazlı qidalı mühit təklif edilmişdir. Dəri leşmaniozu (CL) düyünlü və xorali dəri lezionları ilə xarakterizə olunan xəstəlikdir. CL insanlara yoluxmuş ağcaqanadların qan sorması ilə ötürülür və dünyanın təxminən 98 ölkəsində endemikdir. Mikroskopik müayinə ilə amastiqotların aşkarlanması və NNN (Novy-McNeal-Nicolle) mühitində promastiqotların inkişafı laboratoriya diaqnostikasının qızıl standartıdır. Bu tədqiqatın məqsədi laboratoriyalarda rutin olaraq istifadə edilən ikifazlı NNN mediumunu promastiqotların kulturası üçün mikrobiologiya laboratoriyalarında asanlıqla hazırlana bilən ikifazlı digər qidalı mühit ilə müqayisə etmək idi. Tədqiqatda dəri leşmaniozuna şübhəli xəstənin aspirasiya mayesindən istifadə edilmişdi. Leziondan götürülmüş aspirat nümunəsi mikroskopiya, iki fərqli qidalı mühidə kultivasiya və real vaxt polimeraza zəncirvari reaksiya (Rt-PCR) üsulları ilə qiymətləndirilmişdi.

Aspirasiya mayesindən hazırlanmış və Gimza boyası ilə boyanmış yaxmaların mikroskopik müayinəsi zamanı *Leishmania* amastiqotları aşkar edilmişdi. Parazitin ITS1 bölgəsini hədəf alan xüsusi praymerlər və zondlardan istifadə etməklə həyata keçirilən Rt-PCR üsulu *L.tropica* ilə uyğunlaşmanı aşkar etmişdi. Aspiratdakı parazitlərin kultivasiyası üçün NNN (NNN + RPMI-1640 + 10% fetal dana zərdabı) və digər qidalı mühit (sadə agar + qidalı bulyon + 10% fetal dana zərdabı) istifadə edilmişdir. Kultura 27°C temperaturda 10 gün inkubasiya edilmiş, üçüncü, yeddinci və onuncu günlərdə çoxalmış promastiqotların sayı hesablanmışdır. Üçüncü gün hər iki mediumda *Leishmania* promastiqotlarının artımı aşkar edilmişdir. Üçüncü, yeddinci və onuncu günlərdə NNN qidalı mühitində yetişdirilən promastiqotların sayı müvafiq olaraq 105/ml, 106/ml və 108/ml olmuşdur. Digər mühidə bu kəmiyyətlər üçüncü, yeddinci və onuncu günlərdə müvafiq olaraq 106/ml, 107/ml və 108/ml olmuşdur. Üçüncü və yeddinci günlərdə promastiqotların sayı digər mühidə NNN mediumuna nisbətən daha çox olsa da, onuncu gündə kultivasiya edilmiş promastiqotların sayı bərabər olmuşdur. Nəticə etibarlı ilə klassik kultura mühitinə alternativ kimi təqdim edilən, DL diaqnozunda effektiv hesab edilə bilən ikinci medium mikrobiologiya və parazitologiya laboratoriyalarında asanlıqla əldə edilib uzun müddət saxlanıla bilər. Bu ikifazlı kultura mühiti NNN mediumunu əldə etmək mümkün olmadıqda laboratoriyalarda əlavə diaqnostik mühit kimi istifadə edilə bilər.

Daha bir tədqiqatda (Ozbilgin, 2010) dəri leşmaniozunun diaqnostikası və törədicinin izoləsi üçün müxtəlif qidalı mühitlər müqayisəli öyrənilmişdir. Məlumdur ki, Giemsa ilə boyanmış yaxmaların mikroskopik müayinəsi və kultura mühitinə əkilmə diaqnostikanın qızıl standartıdır. Bu tədqiqatda xəstəliyin diaqnostikasında yeni mediumların effektivliyini qiymətləndirmək üçün üç fərqli qidalı mühit (pepton-maya ekstraktı, beyin-ürək və qidalı bulyon) kontrol qidalı mühitlərlə (Novy-McNeal-Nicolle və RPMI-1640) müqayisədə istifadə edilmişdir. Kulturalardan əldə edilən yaxmalar Gimza üsulu ilə boyanmış və işıq mikroskopunda müayinə olunmuşdur. Siçanların dəri

leyşmaniozu lezionlarından əldə edilən nümunələr bütün kultura mühitlərinə əkilmişdir. Pepton-maya ekstraktı və qidalı bulyonda artım aşkar edilmişdir. Yaxmalarda parazitlər müşahidə olunmuşdur. İnsan dəri leyşmaniozuna şübhəli 12 təcrübə nümunəsinin 5-də məhz bu 2 mediumda parazitlər aşkar edilmişdir. Tədqiqat nəticəsində aydın olur ki, pepton-maya ekstraktı və qidalı bulyon həm parazitlərin izoləsi, həm də DL diaqnostikası üçün yararlıdır.

Nəticə

Tədqiqatlar nəticəsində məlum olmuşdur ki, SNB-9 *in vitro* parazit yoluxuculuğu üçün Schneider mühitindən əhəmiyyətli dərəcədə üstündür, yəni bu mühitdə eksperimental infeksiya üçün uyğun olan yüksək yoluxucu promastigotlar əmələ gəlir. Həmçinin TBH, PYH, BKH, NB qidalı mühitləri də klassik NNN mediuma alternativ kimi çıxış edə bilər.

Ədəbiyyat

1. Agarwal, M., Jain, A. (1996, dec.). New blood free biphasic medium with haemoglobin for cultivation of Leishmania donovani promastigotes. *Indian J Exp Biol.*;34(12):1233-6.
2. Desjeux, Ph. (1996, okt.). Leishmaniasis: Public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*. Vol. 14, Is. 5, p. 417-423. [https://doi.org/10.1016/0738-081X\(96\)00057-0](https://doi.org/10.1016/0738-081X(96)00057-0).
3. Dey, T., Afrin, F., Ali, N. (2002, aug.). Infectivity and virulence of Leishmania donovani promastigotes: a role for media, source, and strain of parasite. *J Eukaryot Microbiol*; 49(4):270-4. doi: 10.1111/j.1550-7408.2002.tb00369.x.
4. Goto, H., Lindoso, J. (2010, apr.). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.*;8(4):419-33. doi: 10.1586/eri.10.19.
5. Gokmen, A.A., Oncel, K., Ozdemir, O.A. (2015, apr.). An alternative biphasic nutrient medium for the diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Mikrobiyol Bul.*;49(2):266-71. doi: 10.5578/mb.8913.
6. Grekov, İ., Svobodova, M., Nohynkova, E. (2011, dec.). Preparation of highly infective Leishmania promastigotes by cultivation on SNB-9 biphasic medium. *Journal of Microbiological Methods*. Vol. 87, Is. 3, p.273-277. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.08.012>.
7. Kedzierski, L. (2010, may). Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? *J Glob Infect Dis.*; 2(2):177–185. doi: 10.4103/0974-777X.62881.
8. Kwang, P.C. (2023). Leishmania and Leishmaniasis Research: The Past 50 Years and the Future. *Pathogens*, 12(6), 776; <https://doi.org/10.3390/pathogens12060776>.
9. Lima, H.C., Bleyenbergh, J.A., Titus, R.G. (1997, feb.). A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals. *Parasitology Today*. Vol. 13, Iss.2, p.80-82.
10. Limoncu, M.E., Ozbilgin, A., Ozbel, Y. (2004). Evaluation of three new culture media for the cultivation and isolation of Leishmania parasites. *J Basic Microbiol.*;44(3):197-202. doi: 10.1002/jobm.200310367.
11. Ozbilgin, A., Ozbel, Y., Alkan, M. (1995, 25 aug.). Cultivation of Leishmania sp. in nutrient broth. *J Egypt Soc Parasitol.*;25(2):437-41.
12. Ozbilgin, A., Zeyrek, F., Limoncu, M. (2010, jul.). Comparison of cultura media in the isolation and diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *African Journal of Microbiology Research*. 4(11):1038-1043.
13. Van Zandbergen, G., Bollinger, A., Wenzel, A. (2006, sep.12). Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proc Natl Acad Sci. U S A*;103(37):13837-42. doi: 10.1073/pnas.0600843103.

Daxil oldu: 29.10.2024

Qəbul edildi: 01.02.2025