

**TƏBİƏT ELMLƏRİ**  
**NATURAL SCIENCES**

DOI: <https://doi.org/10.36719/2663-4619/100/227-231>

**Şəhla Əliyeva**

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu  
biologiya üzrə fəlsəfə doktoru  
shahlaaliyeva1969@gmail.com

**Fatma Hüseynova**

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu  
tibb üzrə fəlsəfə doktoru  
huseynova01049@gmail.com

**Zivər Abseynova**

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu  
ziver.abseynova@mail.ru

**Sevinc Eyvazlı**

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu  
sevincesgerova122@gmail.com

**İlhamə Məsimova**

V.Y.Axundov adına Elmi-Tədqiqat Tibbi Profilaktika İnstitutu  
ilhamemasimova73@gmail.com

**ÜÇGÜNLÜK MALARİYANIN TÖRƏDİCİSİ OLAN *PLASMODİUM VIVAX*-İN  
ERİTROSİTAR MƏRHƏLƏ FORMASININ *İN VİTRO* İNKİŞAFINA TƏSİR EDƏN  
MÜXTƏLİF KİMYƏVİ AMİLLƏRİN ARAŞDIRILMASI**

**Xülasə**

Üçgünlük malyariya törədiciyi olan *P.vivax* əsasən cavan eritrositləri invaziya etdiyindən onun fasiləsiz kulturası üçün retikulositlər tətbiq olunmalıdır.

Bu məqalədə *Plasmodium vivax*-ın *in vitro* fasiləsiz kulturasının alınması üçün vacib olan müxtəlif kimyəvi faktorlar tədqiq edilir. Kulturada retikulositlərin istifadəsi, qan zərdabının mənbəyi və konsentrasiyası, kriokonservasiya prosesinin kulturada parazitə sonrakı inkişafına təsiri ilə bağlı ədəbiyyat məlumatları araşdırılır. Bütün bu sadalanan amillərin nəzərə alınmasına baxmayaraq törədicinin uzunmüddətli kulturasını aldə etmək hələ mümkün olmayıb. Bu istiqamətdə tədqiqatlar davam etdirilir.

**Açar sözlər:** malyariya, *P.vivax*, fasiləsiz kultura, parazit mənbəyi, insan qan zərdabı, dana rüşeymi qan zərdabı

**Shahla Aliyeva**

Scientific Research Institute of Medical Prophylaxy named after V.Akhundov  
PhD in biological sciences  
shahlaaliyeva1969@gmail.com

**Fatma Huseynova**

Scientific Research Institute of Medical Prophylaxy named after V.Akhundov  
PhD in medical sciences  
huseynova01049@gmail.com

**Zivar Abseynova**

Scientific Research Institute of Medical Prophylaxy named after V.Akhundov  
ziver.abseynova@mail.ru

**Sevinc Eyvazli**

Scientific Research Institute of Medical Prophylaxy named after V.Akhundov  
sevincesgerova122@gmail.com

**İlhame Masimova**

Scientific Research Institute of Medical Prophylaxy named after V.Akhundov  
ilhamemasimova73@gmail.com

## **Investigation of various chemical factors of the causative agent malaria tertiana *Plasmodium vivax* affecting *in vitro* development of the erythrocyte form**

### **Abstract**

Since causative agent of malaria tertiana *P.vivax* mainly infects young erythrocytes, reticulocytes should be used for its continuous culture.

This article discusses various chemical factors that are important for obtaining *in vitro* a continuous culture of the *Plasmodium vivax*. The article reviews the literature on the use of reticulocytes in culture, the source and concentration of blood serum, and the effect of cryopreservation on the further development of the parasite in culture. Even though all these factors have been taken into account, it has not yet been possible to obtain a long-term culture of the pathogen. Research in this direction is ongoing.

**Keywords:** malaria, *P.vivax*, continuous culture, source of parasites, human serum, fetal bovine serum

### **Giriş**

1976-cı ildə Trager, Jensen tərəfindən *P.falciparum*-un fasiləsiz kulturasının alınması üçün işlənilib hazırlanmış sistem malyariyaya qarşı mübarizə müstəvisində parazitlərin biologiyasının öyrənilməsi baxımından böyük uğurlar vəd edirdi. *P.vivax*-ın bu metodun köməyilə laboratoriya şəraitinə gətirilməsi üçgünlük malyariyanın kimyəvi terapiyası sahəsində gələcək araşdırmalara böyük töhfələr verə bilərdi. Trager-Jensen metodunun köməyilə bəzi primat malyariyası növlərinin kulturası aparılsa da *P.vivax* üçün bu metod yetərli olmamışdır.

*P.vivax*-ın *in vitro* fasiləsiz kulturasının alınmaması parazitin biologiyasının, patofiziologiyasının öyrənilməsinə, bu tropik xəstəliyə qarşı mübarizə üçün vaksin, yeni dərman preparatları, diaqnostika vasitələri hazırlanmasına əngəl törədir (Alonso, Brown, Arevalo-Herrera, 2011). Üçgünlük malyariya törədicisinin uzunmüddətli kulturasının alınması istiqamətində işlər durmadan aparılır və *P.vivax*-ın *in vitro* kultivasiya şəraitinin optimallaşdırılması tədqiqatçıların qarşısında duran əsas vəzifələrdən biridir. Kulturanın alınmaması səbəblərindən biri də xəstələrdən təcrid edilmiş izolyatlarda parazit kütləsinin olduqca az olmasıdır. Buna görə də parazit mənbəyinin törədicinin kultura şəraitinə adaptasiyasında nə kimi rol oynadığını aydınlaşdırmaq üçün bir sıra tədqiqatlar aparılmışdır.

Bermudez və həmkarlarının gəldiyi nəticələrə görə primatlara adaptasiya olunmuş *P.vivax* ştammlarından istənilən vaxt üçgünlük malyariya törədicisinin kulturasını almaq üçün istifadə etmək olar. Meymun hüceyrələrinə adaptasiya olunmuş *P.vivax* ştammları sahib hüceyrənin növündən asılı olaraq invaziya qabiliyyətini itirmir (Bermudez, Moreno-Purez, Arevalo-Pinzon, 2018: 301). Bu araşdırmaçılar tərəfindən aparılan təcrübələrdə *P.vivax*-ın *in vitro* kulturasının alınması üçün iki mənbədən istifadə olunmuşdu. Parazitlər insandan və primatdan təcrid olunmuşlar. Müşahidə edilmişdir ki, mənbədən asılı olmayaraq kulturanın statik şəraitdə saxlanması parazitemiyanın artmasına (Shaw-Saliba, Thomson-Luque, Obaldia, 2016). və leykositlərin azalmasına səbəb olmuşdur. Məlumdur ki, leykositlərin parazit əleyhinə faqositar aktivliyi onların invaziyasına təsir edir.

Başqa araşdırmaçıların müşahidəsinə görə ümumiyyətlə bu plazmodium növünü *in vitro* şəraitdə 48-72 saatlıq inkubasiyadan sonra saxlamaq olduqca çətinidir (Chotivanich, Silamut,

Udomsangpetch, 2001: 677-680). Qeyd edildiyi kimi *P.vivax*-la infektə olunmuş primatların qanı parazitin *in vitro* uzunmüddətli kultivasiyası üçün əsas mənbə sayıla bilər (Mehlotra, Blankenship, Howes, 2017: 442). Aotus meymunları *P.vivax*-la infektə olunmuş eritrosit donoru kimi istifadə olunsa da, primatlardan alınmış izolyatın kulturasında da *ex vivo* 48-72 saatlıq inkubasiyadan sonra yenə eyni nəticələr müşahidə olunmuşdu.

Kriokonservasiya prosesinin və müddətinin üçgünlük malyariya törədicilərinin kulturada inkişafına təsirini araşdıran tədqiqatçıların gəldiyi nəticələrə görə bir neçə günlük (Mehlotra, Blankenship, Howes, 2017:442) və bir neçə illik (Noulin, Borlon, van den Eede, 2012) kriokonservasiyaya məruz qoyulmuş parazitlər kulturada öz həyat fəaliyyətini və invaziya qabiliyyətini saxlaya bilirlər.

İnsandan təcrid olunmuş parazitlərin *in vitro* kulturasını alarkən tədqiqatçılar istər kulturanın davam etmə müddəti, istərsə də parazitemiya ilə bağlı çətinliklərlə üzləşmişlər. Müxtəlif izolyatların kulturasının davam etmə müddəti müxtəlif olmuşdur - 10-30 gündən (Udomsangpetch, Somsri, Panichakul, 2007) 85 günə qədər (Panichakul, Sattabongkot, Chotivanich, 2007). *P.vivax*-ın 3 izolyatı 26 ay kulturada saxlanılmış, bu zaman parazitemiya 0,01% təşkil etmişdir (Roobsoong, Tharinjaroen, Rachaphaew, 2015: 297). Kultura şəraitində parazit tədricən sahib hüceyrəyə daxil olma qabiliyyətini itirir ki, bunun səbəbi indiyə qədər aydın deyil. Tədqiqatlar göstərmişdir ki, *P.vivax*-ın hər izolyatının *in vitro* kulturada adaptasiyası ilə bağlı öz spesifik xarakteristikası var. Buna görə də onların invaziya qabiliyyəti, çoxalma sürəti və parazitemiya faizləri fərqlidir.

Təcrid olunmuş üçgünlük malyariya törədicilərinin *in vitro* kultura şəraitinə adaptasiyası və kulturada sonrakı inkişafına həmçinin xəstədən qanın alınmış işlənməsi metodu və qan nümunələrinin saxlanması (Thomson-Luque, Shaw Saliba, Kocken, 2017). da təsir edir. Qan götürmək üçün uyğunlaşdırılmış laboratoriya qablarında standartlar hələ ki, yoxdur. Laboratoriya qablarında heparin litium, natrium sitrat istifadə olunur, EDTA-nın istifadəsi isə arzuolunmazdır (Russell, Suwanarusk, Malleret, 2012: 1063-1070). EDTA-nın və hətta heparin litiumun da merozoitlərin invaziyasını bloklaması faktı məlumdur (Kobayashi, Takano, Takemae, 2013: 3178). Qanın saxlanma müddəti, daşınma temperaturu və s. bu kimi faktorlar da nəzərə alınmalıdır (Thomson-Luque, Adams, Kocken, 2019: 344).

*P.vivax*-ın *in vitro* inkişafına neqativ təsir edən faktorların öyrənilməsi gündəlikdə duran məsələlərdəndir. *In vivo* şəraitdə qan dövrəni ilə daim yuyulub uzaqlaşdırılan toksiki aralıq maddələrin *in vitro* kulturada plazmodiumların inkişafını bloklamaq ehtimalı mövcuddur.

*P.vivax* kulturası üçün ən əhəmiyyətli ədəbiyyat məlumatları *P.vivax*-ın əsasən cavan eritrosit və retikulositlərə (Malleret, Xu, Mohandas, 2013) üstünlük verməsi haqda müşahidələrdir. Norbert Lanners tərəfindən aparılan tədqiqatda (1992) splenektomiyaya məruz qoyulmuş Boliviya meymunları (*Saimiri sciureus boliviensis*) *P.vivax*-ın Chesson ştammi ilə yoluxdurulmuşdur. Sonra infektə olunmuş meymun qanı nümunəsi retikulositlərlə zənginləşdirilmiş sağlam insan eritrositləri ilə birlikdə *in vitro* şəraitdə kultivasiya olunmuşdur. Parazitemiya kulturada 3%-ə qədər yüksəldikdə qametositlər nəzərə çarpmış, lakin sayılmamışdı. Tədqiqatda retikulosit və cavan eritrositlərlə zənginləşdirilmiş sağlam insan qanından (Duffy-positive), HEPES, RPMİ-1640, NaHCO<sub>3</sub> və 5% insan qan zərdabından (AB) istifadə olunmuşdu (pH 7,2). Kulturanın saxlanılma şəraiti kimi dinamik sistem seçilmişdi. 3 mil-lik kultura qabı 37°C-də inkubatora yerləşdirilmiş, içində qidalı mühit olan rezervuar isə kiçik soyuducuda təqribən 0°C-də saxlanılmış və xüsusi nasosun köməyiylə kulturaya qidalı mühit köçürülmüşdü. Kulturada qidalı mühitin tam yenilənməsi hər 2 saatdan bir baş vermişdi. Kulturada qaz tərkibi 3%CO<sub>2</sub>, 5%O<sub>2</sub>, 92% N<sub>2</sub>-dən ibarət olmuşdu. 3% hematokrit və təxminən 1% parazitemiya passajlar həyata keçirilmişdi. Kulturanın vəziyyətini öyrənmək üçün nazik yaxmalar hazırlayıb Gimza üsulu ilə boyamışlar. İki nüvəli hüceyrələrin varlığı şizooniyanın başladığından xəbər verirdi. Azsaylı üzük formalı trofozoitlər müşahidə edilmişdi ki, bu da eritrositlərin reinvaziyası demək idi. Belə aydın olmuşdu ki, məhz sağlam insan eritrositləri əlavə olunduqdan sonra kulturada plazmodiumların vəziyyətində müəyyən canlanma baş vermişdi. Sanki parazitlər insan eritrositlərini "tanımış" və məhz onlara daxil olmuşdular ki, bu da parazitemiyanı müəyyən qədər yüksəlməsinə səbəb olmuşdu. Kulturaya

qlükoza, hipoksantin, orotat, piruvat, pantotenat, hüceyrə orqanellalarının, membran və ribosomların stabilizasiyası üçün poliamin-spermidin, antioksidant kimi isə qlutation-SH, askorbin turşusu,  $\alpha$ -tokoferol əlavə olunmuşdu. (onlarına kultura üçün optimal miqdarı hələ araşdırılmayıb). Lakin bütün bu əlavələrə baxmayaraq *P.vivax*-in kulturada inkişaf tempi hər hansı inkişaf modelini müəyyənləşdirmək üçün yetərinə olmamışdır.

Bu tədqiqatların nəticəsinə görə dinamik sistem və retikulositlər *P.vivax* kulturası üçün daha qənaətbəxşdir. Lakin *P.vivax*-in inkişafı meymun eritrositlərində yüksək parazitemiya faizi ilə fərqlənməmişdir. Yalnız insan eritrositlərinin kulturaya əlavəsindən sonra cavan şizontlar görünməyə başlamış və parazitlər reinvaziya qabil olmuşlar.

Qan zərdabı qidalı maddələr mənbəyi olaraq kulturada çox əhəmiyyətli yer tutur. Ticari yolla əldə edilən və sağlam donorlardan alınan zərdab etibarlı mənbə sayılıb, 30 dəqiqə müddətində 57°C temperaturda bəzi tərkib hissələrdən azad olur. İstilik inaktivasiyası ilə parazit və ya retikulosit üçün lazımlı olan bəzi qida maddələrinin parçalanma ehtimalı hələ tam aydın deyil. Müxtəlif tədqiqatlarda zərdab konsentrasiyası fərqli variasiyalarda (10-50% arasında) tətbiq olunmuşdu. Zərdabın tərkibi həm parazit, həm də retikulosit populyasiyası üçün qidalı maddələrlə zəngin olduğuna görə *P.vivax* kulturasında onun tətbiqi son dərəcə böyük əhəmiyyət daşıyır (Blanc, De Gassart, Géminard, 2005). Maliyyə səbəbindən, həmçinin tərkibində inhibirəedici immun faktorların ola bilməsi ehtimalına görə insan zərdabının məməli heyvanların (meymun, at, qoyun, keçi, donuz, öküz və s.) zərdabı ilə əvəz edilməsi və hətta *in vitro* parazitlərin eritrositar mərhələsinin zərdabsız kulturasının alınması məqsədilə bir sıra mülahizələr söylənilmiş, tədqiqatlar aparılmışdır. Tədqiqatlar ilk öncə tropik malyariya törədicisinin kulturası ilə aparılmışdır. *P.falciparum*-un müxtəlif heyvan mənşəli zərdablarda inkişafını müşahidə edərkən Jensen qərara gəlmişdir ki, insan zərdabından başqa digər serumlar *P.falciparum*-un *in vitro* inkişafı üçün optimal deyillər (1977). İfediba və Vanderberg insan qan zərdabının dana qan zərdabı və proteoz peptonla (1980), Divo - dana qan zərdabı və neopeptonla (1985) əvəz edilməsini təklif etmişlər. Lakin bu zaman parazitlərin adaptasiyası üçün kultura mühitindəki əvvəlki zərdab tədricən azaldılmalı, yeni birləşmələr tədricən artırılmalıdırlar. Lingnau və həmkarları (1994) bu məqsədlə *P.falciparum* ştammları üçün Nutridoma-SR (4%), Flores və həmkarları (1997) isə bu birləşmənin daha aşağı konsentrasiyasını (1%) və Albumax 1 (0,5%) istifadə etmişlər. Albumax təmizlənmiş zərdab albuminidir. İnsan serumu istifadə olunan kulturada 30-50 gün ərzində parazitemiya 15% olmuşsa, bu təcrübələrdə 10% olmuşdur. Bu tədqiqatçılar aşkar etmişlər ki, Nutridoma-SR yüksək konsentrasiyalarda (2-4%) və Albumax 1 ilə birgə istifadəsi kulturada parazitemiyanın aşağı olmasına səbəb olmuşdur.

Üçgünlük malyariya törədicisinin kulturasında da insan qan zərdabının müxtəlif birləşmələrlə əvəz edilməsi haqda bir sıra ədəbiyyat məlumatları vardır. Donuz, quzu qan zərdabları ilə müqayisədə at zərdabı daha yararlı olsa da, insan zərdabı müəyyən keyfiyyətlərinə görə ondan üstün sayılmışdır (Kumar, Singh, Bali, 2017: 192-206). Dana rüşeymi qan zərdabı insan zərdabına nisbətən plazmodiumların inkişafını stimula etmə baxımından az effektiv olmuşdur. Dovşan serumunun istifadəsi isə (5-10%) kulturada 2-3 həftəlik adaptasiya periodu tələb etmişdi (Yazar, Kilic, Saraymen, 2004). *P.vivax* kulturası üçün geniş istifadə edilən McCoy's 5A qidalı mühitinin tərkibində insan qan zərdabının əvəzləyicisi kimi heyvan serumlarına qatılan bakt-pepton vardır.

### Nəticə

Üçgünlük malyariya törədicisi olan *P.vivax*-in *in vitro* inkişafına neqativ təsir edən faktorların öyrənilməsi gündəlikdə duran məsələlərdəndir. *In vivo* şəraitdə qan dövrəni ilə daim yuyulub uzaqlaşdırılan toksiki aralıq maddələrin *in vitro* kulturada plazmodiumların inkişafını bloklamaq ehtimalı mövcuddur. Bu səbəbdən də parazit in vitro fasiləsiz inkişafını təmin edə biləcək optimal kultura şəraitinin yaradılması üçün müxtəlif kimyəvi faktorların araşdırılması böyük əhəmiyyət kəsb edir. Gələcək tədqiqatlarda üçgünlük malyariya törədicisinin *in vitro* fasiləsiz kulturasının alınması üçün həmçinin bioloji aktiv birləşmələrin rolu öyrənilməli, qan zərdabının mənbəyi və konsentrasiyası dəqiq təyin edilməlidir.

### Ədəbiyyat

1. Alonso, P.L., Brown, G., Arevalo-Herrera, M. (2011). A research agenda to underpin malaria eradication. *PLoS Med.*, 8:e1000406.
2. Bermudez, M., Moreno-Perez, D.A., Arevalo-Pinzon, G. (2018). *Plasmodium vivax* in vitro continuous culture: the spoke in the wheel. *Malaria Journal*, 17:301.
3. Shaw-Saliba, K., Thomson-Luque, R., Obaldia, N. (2016). Insights into an optimization of *Plasmodium vivax* Sal-1 in vitro culture: the aotus primate model. *PLoS Negl Trop Dis.*, 10:e0004870.
4. Chotivanich, K., Silamut, K., Udomsangpetch, R. (2001), Ex-vivo short-term culture and developmental assessment of *Plasmodium vivax*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 95, pp.677-680.
5. Mehlotra, R.K., Blankenship, D., Howes, R.E. (2017), Long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax* isolates from Madagascar maintained in *Saimiri boliviensis* blood. *Malar J.*, 16, 442 p.
6. Noulin, F., Borlon, C., van den Eede, P. (2012). Cryopreserved reticulocytes derived from hematopoietic stem cells can be invaded by cryopreserved *Plasmodium vivax* isolates. *PLoS One*, 7:e40798.
7. Udomsangpetch, R., Somsri, S., Panichakul, T. (2007), Short-term in vitro culture of field isolates of *Plasmodium vivax* using umbilical cord blood. *Parasitol Int.*, 56:65–9.
8. Panichakul, T., Sattabongkot, J., Chotivanich, K. (2007). Production of erythropoietic cells in vitro for continuous culture of *Plasmodium vivax*. *Int J Parasitol.*, 37:1551–7.
9. Roobsoong, W., Tharinjaroen, C.S., Rachaphaew, N. (2015). Improvement of culture conditions for long-term in vitro culture of *Plasmodium vivax*. *Malar J.*, 14:297.
10. Thomson-Luque, R., Shaw Saliba, K., Kocken, C.H.M. (2017). A continuous, long-term *Plasmodium vivax* in vitro blood-stage culture: what are we missing? *Trends Parasitol.*, 33:921–4.
11. Russell, B., Suwanarusk, R., Malleret, B. (2012). Human ex vivo studies on asexual *Plasmodium vivax*: the best way forward. *Int J Parasitol.*, 42:1063–70.
12. Kobayashi, K., Takano, R., Takemae, H. (2013). Analyses of interactions between heparin and the apical surface proteins of *Plasmodium falciparum*. *Sci Rep.*, 3:3178.
13. Thomson-Luque, R., Adams, J.H., Kocken, C.H.M. (2019). From marginal to essential: the golden thread between nutrient sensing, medium composition and *Plasmodium vivax* maturation in vitro culture. *Malar J.*, 18(1):344.
14. Malleret, B., Xu, F., Mohandas, N. (2013), Significant biochemical, biophysical and metabolic diversity in circulating human cord blood reticulocytes. *PLoS ONE*, 8:e76062.
15. Blanc, L., De Gassart, A., Geminard, C. (2005). Exosome release by reticulocytes—an integral part of the red blood cell differentiation system. *Blood Cells Mol Dis.*, 35:21–6.
16. Kumar, A., Singh, K.P., Bali, P. (2017). iNOS polymorphism modulates iNOS/NO expression via impaired antioxidant and ROS content in *P.vivax* and *P. falciparum* infection. *Redox Biol.*, 15, pp.192-206.
17. Yazar, S., Kilic, E., Saraymen, R. (2004). Serum malondialdehyde levels in patients infected with *Plasmodium vivax*. *West Indian Med J.*, 53:147-9.

Göndərilib: 29.12.2023

Qəbul edilib: 28.02.2024