



AZƏRBAYCAN ELM FONDU

**Azərbaycan Elm Fondunun
“Gənc Alim və Tədqiqatçıların 7-ci
qrant müsabiqəsi”nin (AEF-GAT-7-2023-2(44))
qalibi olmuş layihənin yerinə yetirilməsi üzrə aralıq
(rüblük olaraq 2-ci mərhələ)**

ELMİ-TEXNİKİ HESABAT

Layihənin adı: **Bitki və insan kök hüceyrələrindən nano ölçülü ekstraselulyar vezikulların izolyasiyası, xarakteristikası və insan patogenlərinə qarşı antimikrobial təsirinin in vitro öyrənilməsi**

Layihə rəhbərinin soyadı, adı və atasının adı: **Həşimova Leyla Nurəddin qızı**

Layihənin nömrəsi: **AEF-GAT-7-2023-2(44)-10/06/3-M-06**

Müqavilənin imzalanma tarixi: **06 dekabr 2023-cü il**

Qrant layihəsinin yerinə yetirilmə müddəti: **18 ay**

Layihənin icra müddəti (başlama və bitmə tarixi): **01 yanvar 2024-cü il - 01 iyul 2025-ci il**

Layihənin II mərhələ üzrə (rüb) məbləği:

Hesabatda aşağıdakı məsələlər işıqlandırılmalıdır:

| | |
|----------|--|
| 1 | <p>Layihənin həyata keçirilməsi üzrə cari rübdə yerinə yetirilmiş elmi işlər</p> <p>Kök hüceyrə izolyasiyası üçün sterilizasiya və mühitlər hazırlanması.</p> <p>Penisilin-streptomisin antibiotikləri ilə 2% antibiotik ehtiva edən PBS məhlulu hazırlandı; tərkibində 200 U/ml penisilin və 200 µq/ml streptomisin olan, Ca⁺², Mg⁺² ehtiva etməyən PBS (pH 7.4) məhlulu. Bu məhlul həm toxumanın +4°C-də qısa müddət saxlanması üçün, həm də toxumanın yuyulması proseslərində istifadə olundu. 2% antibiotik ehtiva edən PBS məhlulu 4°C-də saxlandı.</p> <p>Mezenximal kök hüceyrələrin çoxaldılması və böyüdülməsi üçün Minimum Essential Medium Alpha (α-MEM) qidalı mühitinə %10 (v/v) fetal bovine (sığır) serum, 2.5 mM L-glutamin, 1.25 µg/ml amfoterisin B antibiotiki, 50 U/ml penisilin və 50 µg/ml streptomisin antibiotik qarışımı əlavə edildi. Bu qidalı mühit hüceyrələrin izolyasiya, kultivasiya, pasajlama kimi bütün mərhələlərində istifadə olundu.</p> <p>α-MEM qidalı mühit içərisinə digər komponentlərin əlavə edilməsi istifadədən əvvəl qısa müddətdə həyata keçirildi. Bütün komponentlər əlavə olunmuş qidalı mühitləri uzun müddət saxlanması əlverişli deyil. Qidalı mühitlər 4°C-də saxlandı.</p> <p>Toxumanın ayrımı və kəsimi üçün istifadə olunan forseps, skalpel, qayçı kimi dəmir alətlər ilk növbədə xlor etiva edin məhlul ilə yuyuldu, kimyavi maddələrin uzaqlaşdırılması üçün təmiz su içərisində bir müddət gözlədikdən sonra ultra saf su ilə yaxalandı. Sonrasında etanol ilə silinərək aliminyum folyoya sarıldı və avtoklavda 121°C-də 30 dəqiqə ərzində steriləndi. Bu alətlər istifadə</p> |
|----------|--|

olunmadan əvvəl steril kabin içərisinə folyoya sarılı şəkildə səthi 70% etanol ilə silinərək alındı və 15 dəqiqə ərzində UV altında saxlandı. İstifadə edildikdə steril şəraitdə folyo içərisindən çıxarıldı.

Toxumadan kök hüceyrə izolasiyası.

Wharton Jelly toxuması göbək ciyəsinə ayrıldı. Ayrılan toxuma antibiotik məhlulu və fosfat tamponu (PBS) olan mühitində saxlandı. Sonra steril hava axını kabininə alınan toxumalar PBS ilə yuyularaq steril forseps və skalpel köməyi ilə kiçik parçalara (~ 1 mm diametrdə) kəsildi. Mezenximal kök hüceyrə izolasiyası miqrasiya üsulu istifadə edilərək həyata keçirildi. Kiçik parçalara kəsilmiş Wharton Jelly toxuması flaskın səthinə steril forseps ilə yerləşdirildi və toxuma parçasının flask səthinə yapışması gözləndi. Bir müddət sonra kiçik toxuma parçası üzərinə α -MEM + 10% fetal serum + 0,1% antibiotik məhlulu olan hüceyrə mühiti əlavə edildi və flask 5% CO₂ inkubatorunda 37°C-də kultivasiya üçün qoyuldu. Təxminən 3-4 gündən sonra toxuma ətrafında hüceyrə miqrasiya mövcudluğu mikroskop ilə müşahidə edildi. Hüceyrə sıxlığına görə hüceyrə qidalı mühiti təzələndi. Təxminən 10 günün sonunda toxumaların ətrafında çox sayıda hüceyrənin köç etdiyi görüldü və toxumalar steril forseps ilə uzaqlaşdırıldı. Qidalı mühit təzələndi və flask içərisindəki hüceyrələr kultivasiyanın davam etməyi üçün yenidən 37°C-də 5% CO₂ inkubatoruna qoyuldu.

Hüceyrələrin pasajlanması.

Mikroskopik müayinə ilə hüceyrələrin kultivasiya qabının səthini örtüyü və hüceyrələrin 90% sıxlığa çatdığı müəyyən edildikdən sonra hüceyrələr üzərindəki qidalı mühit uzaqlaşdırıldı və hüceyrə səthi PBS ilə yuyuldu. Hüceyrə səthini örtmək üçün kifayət qədər tripsin/EDTA (etilendiamin tetraasetik turşu) qarışığını (0,25% tripsin/0,02% EDTA) ehtiva edən enzim məhlulu əlavə edildi və hüceyrələrin səthdən qalxması üçün 3-5 dəqiqə 37°C-də 5% CO₂ inkubatorunda inkubasiya edildi. Tərkibində 10% (v/v) FBS olan PBS məhlulu əlavə edilməklə enzimin aktivliyi inhibə edildi. Hüceyrələr 5 dəqiqə ərzində 1500 rpm-də sentrifuqa ilə çökdürüldü. Tübün üst hissəsində yığılan supernatan ehtiyatlı şəkildə uzaqlaşdırıldı və alt hissəyə çökən hüceyrə pelleti α -MEM + 10% fetal serum + 0,1% antibiotik məhlulu ehtiva edən qidalı mühit ilə toplanıldı və hüceyrələr daha böyük flaska əkildi. Əkildikdən sonra flask yavaşca 37°C-də 5% CO₂ inkubatoruna hüceyrələrin yapışması və sonrasında yayılıb çoxalmaları üçün qoyuldu.

Hüceyrə sayısının müəyyən edilməsi.

Qidalı mühitdəki hüceyrələrin mikroskopik müayinə nəticəsində 90% hüceyrə sıxlığına çatdığı müəyyən edildikdə qidalı mühit uzaqlaşdırıldı və hüceyrə səthi sahəsi PBS ilə yuyuldu. Hüceyrələr yuxarıda qeyd edildiyi kimi tripsin/EDTA enzim məhlulu əlavə edilərək səthdən qaldırıldı. Tübün üst hissəsində yığılan supernatan ehtiyatlı şəkildə uzaqlaşdırıldı və alt hissəyə çökən hüceyrə pelleti α -MEM + 10% fetal serum + 0,1% antibiotik məhlulu ehtiva edən qidalı mühit ilə toplanıldı və hüceyrə suspenziyası əldə olundu. Hüceyrə suspenziyasındakı hüceyrələrin sayını müəyyən etmək üçün 15 μ l suspenziya propilen mikrotübə (eppendorf tübə) götürüldü. 15 μ l tripan mavisi (0,4%; w/v) əlavə edildi. İki dəqiqə gözlədikdən sonra Toma lamına 10 μ l hüceyrə suspenziyası əlavə edildi, mikroskop altında boyanmamış sağlam hüceyrələr və mavi rəngə boyanmış ölü hüceyrələr sayıldı və kulturadakı hüceyrələrin sayı (h/ml) uyğun olaraq hesablandı.

Hüceyrələrin dondurulması.

Hüceyrələr flask səthində hər dəfə qaldırılanda bir hissəsi əkilərkən digər hissəsi donduruldu. Hüceyrə suspenziyasındakı hüceyrələrin bir qismi dondurucu mühitə alınır. Dondurulma üçün hüceyrələr 90% (v/v) FBS və 10% (v/v) dimetil sulfoksiddən (DMSO) ibarət dondurucu mühitə kriovial içərisinə yerləşdirildi. Hüceyrələr dərin dondurucuda -20°C-də 30-60 dəqiqə saxladıqdan sonra -80°C-də dərin dondurucuya köçürüldü. Sağlam hüceyrə ehtiyatları 1-2 gündən sonra maye azot (-195,8°C) olan çənə köçürüldü. Burada mezenximal kök hüceyrələr düzgün saxlama şəraitində və maye azot səviyyələrinin diqqət edilməsi ilə uzun illər ehtiva edilə bilər.

Hüceyrələrin morfolojiq xüsusiyyətlərin müəyyən edilməsi.

Müxtəlif pasajlarda mikroskopik müşahidələr və hüceyrə şəkillərindən əldə edilən ölçmələr nəticəsində Wharton Jelly toxumasından əldə edilən mezenximal kök hüceyrələrin ölçüləri müəyyən edilmişdir. Pasaj sıfırda hüceyrə ölçülərinin kifayət qədər kiçik olduğunu, kulturanın 7-cü və 10-cu günlərində 5-7 μm , sonrakı günlərdə isə 5-13 μm -ə çatdığını aşkar edildi. Hüceyrələrin ilkin pasajda tipik fibroblastik morfolojiqaya sahib olduqları bununla bərabər mühitdə heterogen hüceyrə populyasiyaların olduğu da görüldü.

2 Layihənin həyata keçirilməsi üzrə planda nəzərdə tutulmuş işlərin yerinə yetirilmə dərəcəsi (cari rüb üçün, faizlə qiymətləndirməli)

Kök hüceyrə izolyasiyası-80%

Kök hüceyrə kultivasiyası-100%

3 Hesabat dövründə alınmış **elmi nəticələr**, onların yenilik dərəcəsi

Yoxdur

4 Layihənin yerinə yetirilməsi zamanı istifadə olunan üsul və yanaşmalar

Mezenximal kök hüceyrə izolyasiyası miqrasiya üsulu istifadə edilərək həyata keçirildi.

İlkin eksplant kulturası hüceyrə izolyasiyası və kulturası üçün bildirilmiş ən qədim üsuldür. Başlanğıc material kimi müəyyən edilən toxuma parçası daşıma (transfer) məhlulunda GMP Laboratoriyasına daşınır. Başlanğıc materialın keyfiyyətinə nəzarəti; Laboratoriyaya qəbul üçün gələn toxumanın ölçüsü, çəkisi, seroloji uyğunluğu, qablaşdırmanın bütövlüyü və temperaturun monitorinqi kimi kriteriyalar ayrıca qiymətləndirilir. Uyğun şəraitdə daşınmış və qəbul meyarlarına uyğun olduğu müəyyən edilmiş toxuma qəbul edilir. MSC-ləri toxumalardan izolə edərək fermentativ və/və ya mexaniki parçalanma üsullarından istifadə edilir. Ümumiyyətlə, toxuma qan hüceyrələrindən təmizləndikdən sonra mexaniki olaraq millimetrik ölçülərə qədər parçalanır. Toxuma ölçüsünün azaldılması diffuziya yolu ilə hüceyrələrin qidalanmasını asanlaşdırır. Həddindən artıq parçalanma edilməsi hüceyrələrin mexaniki dekonstruksiya səbəb olur. Enzimatik parçalanma metodunda deqradasiya hüceyrədənənar matrisi parçalayan fermentlərlə həyata keçirilir. Mexaniki olaraq parçalanma üsulu ilə həyata keçirilən eksplant kulturasında daha az heterojenliyə və daha çox proliferasiya və canlılığa malik hüceyrələr əldə edilə bilər. Bunun səbəbi hüceyrədənənar matrisin mühafizəsi ilə izah edilə bilər, çünki miqrasiya edən hüceyrələr fermentə məruz qalmır, beləliklə proteolitik və mexaniki stressdən daha az təsirlənir. Protokol adətən yağ mənşəli MSC-lərin izolyasiyasında istifadə olunur. Enzimatik və mexaniki lizisin birgə istifadəsi hüceyrələri tək mexaniki lizisdən iki dəfə səmərəli şəkildə izolə edə biləcəyi bildirilmişdir. Lazzina və başqaları. insan göbək kordonu MSC-lərində ənənəvi lizis və avtomatik lizis sistemini (GentleMACs) müqayisəsi və avtomatik lizis sistemi protokolunda hüceyrə sayı və canlılığının ənənəvi fermentativ həzmdən daha yüksək olduğunu aşkar edilmişdir. Mərkəzə daşınan transfer məhlulunda aparılan keyfiyyətə nəzarət testləri ilə qəbuluna qərar verilir. Müvafiq fraksiya seçildikdən sonra toxuma üçün uyğun olan bazal mühitlə hazırlanmış mühitlə kolbalara əkilir və 37°C inkubatora yerləşdirilir.

Ümumi hüceyrə sayı, mühitdəki ölü və canlı hüceyrə nisbəti hüceyrələr Trypan Mavi ilə boyandıqdan sonra Toma lamı sayım üsulu istifadəsiylə müəyyən edildi.

Toma lamı sayım üsulu - Toma lamı düz bir səthə yerləşdirilir və hesablama aparılacaq hər iki sahəni əhatə edəcək şəkildə üzəri örtük şüşəsi ilə örtüldü. Hüceyrələrin sayılması üçün eppendorfda hazırlanmış hüceyrə süspenziyasından 10 μl pipet istifadə edərək çəkildi və yavaş-yavaş sayılmaq üçün toma lamının hər iki sahəsinə pipetləndi. Toma lamındakı hüceyrələr işıq mikroskopunda 10X böyütmədə sayıldı. Hüceyrələr sayılarkən, toma lamının hər iki sayım sahəsindəki 16 böyük kvadratın 5 böyük kvadratında olan hüceyrələr sayılır orta rəqəm hesablanır və 1 böyük kvadrata düşən

| | |
|----|--|
| | hüceyrə sayı hesablandıqdan sonra 1 ml-dəki hüceyrələrin sayı hesablandı. 1 ml kvadratdakı hüceyrələrin ümumi sayı; seyreltmə dərəcəsi, toma lamındakı kvadratların ümumi sayı və həcm sabiti 10^4 -ə vurmaqla hesablanmışdır (0,1 mm ³ -dəki say hesablanır). |
| 5 | Layihə üzrə elmi nəşrlər (məqalələr, monoqrafiyalar, içməllər, konfrans materialları, tezislər) (dərç olunmuş, çapa qəbul olunmuş və çapa göndərilmişləri ayrılıqda qeyd etməklə) <i>(surətlərini əlavə etməli!)</i> |
| | Yoxdur |
| 6 | İxtira və patentlər, səmərələşdirici təkliflər |
| | Yoxdur |
| 7 | Layihə üzrə ezamiyyətlər |
| | Yoxdur |
| 8 | Layihə üzrə elmi ekspedisiyalarda iştirak |
| | Yoxdur |
| 9 | Layihə üzrə digər tədbirlərdə iştirak |
| | Leyla Həimova - 26- aprel 2024 tarixində İspaniyanın Barselona şəhərində keçirilən "Global-PPS meeting on Antimicrobial Consumption and Resistance" - də iştirak etmişdir. Leyla Həimova - 27-30 aprel 2024 tarixində İspaniyanın Barselona şəhərində keçirilən 34th ECCMID (ESCMID 10 iyun 2024-cü il tarixində Mərkəzi Gömrük Hospitalda keçirilən , "Xəstəxanadaxili infeksiyaların idarə olunması: Sepsis və antibiotikterapiya" mövzusunda Beynəlxalq Elmi Konfrans. Nərgiz İmamova -7-8 may 2024 tarixində Bakıda keçirilən "International Stem Cells and Regenerative Medicine Congress" konfransında iştirak etmişdir. |
| 10 | Layihə mövzusu üzrə elmi məruzələr (seminarlar, konfranslar, dəyirmi masalar və s. çıxışlar) |
| | 27-30 aprel 2024 tarixində İspaniyanın Barselona şəhərində keçirilən 34th ECCMID (ESCMID Global 2024) kongressində Elmi Proqramların Xüsusi Sessiyaları çərçivəsində ESCMID Təcrübəlilər Assosiasiyası (TAE-Day) tərəfindən 27.04.2024-cü il tarixində təşkil olunan Dəyirmi Masa Sessiyasında klinik mikrobiologiya və yoluxucu xəstəliklər sahələrində dünyaca tanınmış ekspertlərlə gənc doktorantların görüşü təşkil olundu. Prof.dr.Murat Akovanın masasında əyləşən Leyla Həşimova Gürcüstandan, İspanyadan, Misirdən, Yaponiyadan və Türkiyədən kongressə qatılan gənc doktorantlarla layihə mövzusu üzrə elmi məruzələr aparıb və ekspertdən tövsiyələr alıb. İnci Şıxaliyeva 7-8 may 2024 tarixində Bakıda keçirilən "International Stem Cells and Regenerative Medicine Congress" konfransında "in vitro kök hüceyrələr" adlı təqdimatı ilə konfransın ilk günündə çıxış edib. Beynəlxalq konfransa qatılan xaricdən gələn və yerli məruzəçilər ilə panel daxilində müzakirələr aparıb, iştirakçıların suallarını cavablandırır və kök hüceyrələrin laboratoriya şəraitində kultivasiyası və klinikdə istifadəsi ilə bağlı detallı məlumatlar paylaşmış. Leyla Həşimova 10 iyun 2024-cü il tarixində "Xəstəxanadaxili infeksiyaların idarə olunması: Sepsis və antibiotikterapiya" mövzusunda Beynəlxalq Elmi Konfransda məruzəçi qismində iştirak etmişdir. |
| 11 | Layihə üzrə əldə olunmuş cihaz, avadanlıq və qurğular, mal və materiallar |
| | Yoxdur |
| 12 | Yerli həmkarlarla əlaqələr |
| | 7 iyun 2024-cü il tarixində Bakı Sağlamlıq Mərkəzində "Bakteriyalarda antimikrob rezistentlik (AMR)" mövzusunda Leyla Həşimova məruzə edərək mərkəzin klinisitləri ilə fikir mübadiləsi aparmışdır. 10 iyun 2024-cü il tarixində Dövlət Gömrük Komitəsinin Tibbi Xidmət İdarəsinin Elmi-Təcrübi və Tədris Mərkəzinin təşkilatçılığı ilə Mərkəzi Gömrük Hospitalda müxtəlif qurumlardan həkim-infeksiyonist, həkim-mikrobioloq, reanimatoloq, uroloq, ginekoloq və s. ixtisasdan həkimlərin dəvəti ilə "Xəstəxanadaxili infeksiyaların idarə olunması: Sepsis və antibiotikterapiya" mövzusunda Beynəlxalq Elmi Konfrans təşkil olunmuşdur. Leyla Həşimova konfransda həmkarları ilə bakteriyalarda artan |

| | |
|----|--|
| | antibiotik davamlılıq və antibiotik davamlılıqla mübarizə yolları mövzusunda fikir mübadiləsi aparmışdır. |
| 13 | Xarici həmkarlarla əlaqələr 27-30 aprel 2024 tarixində İspaniyanın Barselona şəhərində keçiriləcək 34th ECCMID (ESCMID Global 2024) kongressində bütün dünyada 16 mindən çox həkim-mikrobioloq, infeksiyolog, epidemioloq, elmi-tədqiqatçı və s. iştirak etdiyi kongressin “Qeyri-ənənəvi antibiotik terapiya” sessiyasında həmkarları ilə fikir mübadiləsi aparmış, bakteriyalardakı antibiotik davamlılıqla mübarizədə yeni müalicə metodlarının işlənilməsinin əhəmiyyətini vurğulamışdır. 7-8 may 2024 tarixində Bakıda həyata keçirilən “International Stem Cells and Regenerative Medicine Congress” Beynəlxalq konfransında xaricdən (Türkiyə) gələn mütəxəssislər ilə görüşüldü, gələcəkdəki mümkün əməkdaşlığın qurulması ilə bağlı planlar tərtib edildi, layihə ilə bağlı məlumat verildi və kök hüceyrə araşdırmaları və klinik tətbiqində müasir yanaşmalar müzakirə olundu, əsas problemlər ilə bağlı suallar cavablandırıldı və kök hüceyrələrin laboratoriya şəraitində kultivasiyası və klinikdə istifadəsi ilə bağlı detallı məlumatlar paylaşıldı. |
| 14 | Layihə mövzusu üzrə kadr hazırlığı Leyla Həşimova çalışdığı Azərbaycan Tibb Universitetinin Tədris Cərrahiyyə Klinikasında mikrobiologiya ixtisası üzrə təhsil alan həkim-rezidentlərin tədrisi ilə məşğul olmuşdur. Beləki, insanlarda xəstəlik törədən klinik əhəmiyyətli bakteriyalarda antibiotik davamlılığın müəyyən edilməsində istifadə olunan EUCAST standartlarının dərindən mənimsənilməsi üçün, həm nəzəri, həm də praktik təlimlər vermişdir. Disk-diffuziya və minimal inhibisya konsentrasiyası metodlarının müqayisəli təhlili aparıldı. |
| 15 | Sərgilərdə iştirak Leyla Həşimova- 27-30 aprel 2024 tarixində İspaniyanın Barselona şəhərində keçirilən 34th ECCMID kongressi çərçivəsində təşkil olunmuş ECCMID Art Gallery – One Health sərgisində “One health under the threat of Antimicrobial resistance” adlı əsəri ilə sərgidə yerində iştirak etdi. Əsər kongress iştirakçılarının böyük marağına səbəb olmuş və ESCMID-in youtube kanalında seçilən əsərlər arasında adı çəkilmişdir. |
| 16 | Təcrübəartırmada iştirak və təcrübə mübadiləsi Bakı Dövlət Universitetinin Nano Araşdırmalar Mərkəzinin baş tədqiqatçısı Professor Ülviyyə Həsənova və onun araşdırma qrupu ilə görüş keçirildi. Görüş zamanı nanotexnologiya əsaslı çalışmalar barəsində geniş fikir mübadiləsi aparıldı. Bununla yanaşı, kök hüceyrə kulturasının alınması, pasajlama və hüceyrələrin dondurulması ilə bağlı Bakı Dövlət Universitetinin araşdırma qrupuna xüsusi təlim keçirildi. Görüş əsnasında həmçinin P. Acaulis və P. Ferulacea bitkilərindən əldə edilən ekstraktların ağciyər və döş xərçəngi hüceyrələrinə təsirini müəyyən etmək üçün Bakı Dövlət Universitetinin spektrofotometriya cihazından istifadə edildi. Bu təcrübələr vasitəsilə bitki ekstraktlarının potensial terapevtik təsirləri araşdırıldı və onların xərçəng hüceyrələrinin böyüməsinə və yayılmasına təsiri qiymətləndirildi. Bu cür tədqiqatlar, həm nanotexnologiya, həm də biotexnologiya sahəsində yeni və yenilikçi tətbiqlərin inkişafına töhfə verir. |
| 17 | Layihə mövzusu ilə bağlı elmi-kütləvi nəşrlər, kütləvi informasiya vasitələrində çıxışlar, yeni yaradılmış internet səhifələri və s. Yoxdur |

Layihə rəhbərinin imzası _____ Həşimova Leyla Nurəddin qızı

Tarix _____

QEYD: bütün hallarda uyğun olan bəndlər doldurulmalıdır.

