ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԳԻՏՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐԻ ԱԶԳԱՅԻՆ ԱԿԱԴԵՄԻԱ
НАЦИОНАЛЬНАЯ АКАДЕМИЯ НАУК АРМЕНИИ
NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF ARMENIA
ДОКЛАДЫ ԶԵԿՈՒՅՑՆԵՐ REPORTS
Հատոր Том Volume 112 2012 № 2

ԿԵՆԴԱՆԱԲԱՆՈՒԹՅՈՒՆ

ՈՒԴԴ 576.895.42:599.323. 4

Ս.Ա. Աղայան[1, 2], Գ.Հ. Բոյախչյան[1]

Թռչունների արյան սպորավոր մակաբույծների բազմազանությունը և տարածվածությունը Կովկասում

(Ներկայացված է ՀՀ ԳԱԱ թղթակից անդամ Լ. Ռ. Մանվելյանի կողմից 14/II 2012)

Առանցքային բառեր. *թռչունների արյան մակաբույծներ, Plasmodium spp., Haemoproteus spp., Leucocytozoon spp., տարածվածություն, ՊՇՌ-հետազոտություններ, հապլոտիպեր:*

Ներածություն: Կովկասը կենսաբազմազանությամբ աշխարհի առավել հարուստ տարածաշրջաններից մեկն է [1,2]: Թռչունների, ինչպես նաև նրանց մակաբույծների հետազոտություններին վերջին տարիներին առանձնահատուկ ուշադրություն է դարձվում: Թռչուններն ախտահարվում են վիրուսային, բակտերիալ, մակաբուծային և սնկային պաթոգեններով և կարող են նրանց պահեստարաններ հանդիսանալ [3,4]: Ինֆեկցիոն և մակաբուծային հիվանդությունները, հատկապես նրանք, որոնք հայտնաբերվում են վայրի բնության մեջ, հաճախացել են վերջին մի քանի տասնամյակներում [2]: Այս հիվանդությունները կարևոր գործոն են բնական էկոհամակարգերի գործունեության մեջ [5,6]: Ինչպես հայտնի է, արյան սպորավոր մակաբույծները կարող են կենսաբազմազանության ոչնչացման պատճառ հանդիսանալ, ինչը հատկապես վտանգավոր է էնդեմիկ ֆաունայի համար [1,2]:

Մեր ուսումնասիրության առարկա հանդիսացող թռչունների արյան սպորավորներին պատկանող *Plasmodium, Haemoproteus* և *Leucocytozoon* ցեղերի մակաբույծները փոխանցվում են բազմազան և բավականին լայն տարածում ունեցող երկթևանի միջատների միջոցով՝ մոծակների, գիշերային մլակների, մժիկների [7]: Այս միջատները կոսմոպոլիտ են և հայտնաբերվել են բոլոր մայրցամաքներում՝ բացառությամբ Անտարկտիդայի:

Գրավոր աղբյուրներում բավարար տեղեկություն չկա թռչունների արյան մակաբույծների ուսումնասիրությունների վերաբերյալ: Մեր հետազոտությունների նպատակն է բացահայտել թռչունների արյան մակաբույծների բազմազանությունը և տարածվածությունը կենսաբազմազանությամբ հարուստ Կովկասյան տարածաշրջանում:

Նյութեր և մեթոդներ: 2010 թ. մայիսից օգոստոս ընկած ժամանակահատվածում հավաքվել է թռչունների 34 տեսակի շուրջ 396 արյան նմուշ՝ Հայաստանի Հանրապետության (ՀՀ) և Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության (ԼՂՀ) (206 նմուշ), ինչպես նաև ՌԴ Կրասնոդարի երկրամասի (190 նմուշ) մի շարք անտառային վայրերից (նկ. 1):

1. Նազարովա Շել
2. Սերեբրյանի Կլյուչ
3. Պերեվալկա
4. Սոլենոե
5. Գյուլագարակ Դենդրոպարկ
6. Ֆիոլենտովո
7. Հանքավան
8. Ծովագյուղ
9. Զուար
10. Արխավանդ
11. Ստեփանակերտ
12. Միջնավան

Նկար 1. Նմուշի հավաքման վայրերը Հայաստանում (Armenia), ԼՂՀ-ում և ՌԴ-ում (Russia):

Թռչունների որսն իրականացվել է համապատասխան ցանցերի միջոցով: Որոշվել է յուրաքանչյուր թռչնի տեսակը, ապա երակից վերցվել է արյան նմուշը: Արյունը պահվել է սենյակային ջերմաստիճանում էթանոլի 96%-ոց լուծույթում: Բոլոր թռչուններն օղակավորվել են՝ բացառելու համար միևնույն առանձնյակի կրկնակի որսը, և բաց են թողնվել:

Արյան նմուշից անջատվել է ամբողջական ԴՆԹ-ն (և՛ թռչնի, և՛ մակաբույծի առկայության դեպքում): Թռչնի մոտ *Haemoproteus spp., Plasmodium spp.* և *Leucocytozoon spp.* առկայությունը պարզելու համար կիրառվել է ՊՇՌ (պոլիմերազային շղթայական ռեակցիաներ) մեթոդը: Մակաբույծի նույնականացման համար կիրառվել են պրայմեր-ներ, որոնք ծածկում են նրա միտոքոնդրիալ ցիտոքրոմ Բ գենը, որն ամենալայն կիրա-ռություն ունեցող մարկերն է վերոհիշյալ մակաբույծների հայտնաբերման համար [8,9]:

ՊՇՌ-ն իրականացվել՝ է օգտագործելով հետևյալ պրայմերները՝ HAEMNF - CATATATTAAGAGAATTATGGAG, HAEMNR2 – AGAGGTGTAGCATATCTATCTAC [9]: Ռեակցիայի պայմաններն են՝ 30 վրկ – 95° C, 30 վրկ – 52° C, և 45 վրկ 72° C 40 ցիկլով: Ցիկլիկ ռեակցիաներից առաջ նմուշներն ինկուբացվել են 95° C՝ 15 րոպե տևողությամբ և ռեակցիայից հետո 60°՝ C 10 րոպե տևողությամբ: 12,5 µl ռեակցիայի լուծույթը պարունակել է 2 µl անջատված ԴՆԹ-ից, 0,24 uM յուրաքանչյուր պրայմերից, 1x of GoTaq® Flexi Buffers, 0,287 mM՝ dNTP, 2 mM՝ $MgCl_2$, 5,978 µl՝ H_2O և 1,2 u՝ Taq ԴՆԹ պոլիմերազա (Promega Corporation) վերջնական կոնցենտրացիաներով:

ԴՆԹ-ի առկայությունը պարզելու համար վերջնանյութը ենթարկվել է էլեկտրոֆորեզի 2,0% ագարոզային գելի վրա, արդյունքը դիտվել է ՈՒՄ ճառագայթների տակ: Դրական արդյունք ցույց տված նմուշները մաքրվել են՝ օգտագործելով ExoSAP-IT PCR Clean-up Kit (USB Corporation), և ուղարկվել են Macrogen (Macrogen corporation-Netherlands) նուկլեոտիդային հաջորդականության որոշման համար: Հաջորդականու-թյունները մշակվել են BioEdit ծրագրով [10], և հապլոտիպերը որոշվել են DNAsp 5 ծրագրով [11]: Պարզելու համար հապլոտիպերի պատկանելությունն այս կամ այն

մակաբույծի տեսակին, դրանք համեմատվել են գեների միջազգային բանկում և MalAvi բազայում [9] առկա հաջորդականությունների հետ:

Արդյունքներ: Ուսումնասիրված 396 նմուշներից, որոնք ներկայացնում են թռչունների 34 տեսակ, վարակվածների թիվը կազմել է 249 նմուշ՝ 29 թռչնատեսակ:

Աղյուսակ 1

ՊՇՌ հետազոտության արդյունքները Հայաստանում և ՌԴ Կրասնոդարի մարզում

Թռչնի տեսակը	Նմուշների քանակը	Հայաստան		ՌԴ Կրասնոդարի մարզ	
		Թռչ. առանձ. քանակը	Վարակված. էքստենսիվություն	Թռչ. առանձ. քանակը	Վարակված. էքստենսիվություն
Erithacus rubecula	40	3	33,0% (1)	37	59,5% (22)
Parus caeruleus	23	8	25,0% (2)	15	80,0% (12)
Parus major	65	34	79,4% (27)	31	74,2% (23)
Phylloscopus lorenzii	38	37	29,7% (11)	1	100,0% (1)
Phylloscopus nitidus	24	19	47,3% (9)	5	60,0% (3)
Sylvia atricapilla	24	10	50,0% (5)	14	64,3% (9)
Turdus merula	38	19	78,9% (15)	19	84,2% (16)
Մնացած տեսակները	144	76	64,5% (49)	68	69,1% (47)
Ընդհանուր	**396**	**206**	**57,7% (119)**	**190**	**70,0% (133)**

Նմուշներ (ընդհանուր)	Վարակվածներ (ընդհանուր)
396	**62,8% (249)**

Համեմատվել են Հայաստանի և ՌԴ Կրասնոդարի երկրամասի թռչունների վարակվածության աստիճանները որոշ տեսակների համար, ինչպես նաև ընդհանուր վարակվածության աստիճանները (աղ. 1):

Ուսումնասիրվել են նուկլեոտիդային 147 հաջորդականություններ, որոնք ներկայացնում են 40 առանձին հապլոտիպեր. դրանցից 26-ը ներկայացնում են *Haemoproteus spp.,* 11-ը՝ *Plasmodium spp.* և միայն 3-ը՝ *Leucocitozoon spp.* (աղ. 2): Հայտնաբերվել են նաև որոշ նոր հապլոտիպեր, որոնք մինչ օրս գրանցված չեն եղել գեների միջազգային բանկում:

Աղյուսակ 2

Թռչունների մակաբույծների նուկլեոտիդային հաջորդականությունները և հապլոտիպերի քանակը

Նուկլեոտիդային հաջորդականություն – 147 (40 հապլոտիպ)								
Haemoproteus spp. - 26			Plasmodium spp. - 11			Leucocytozoon spp. - 3		
Նոր	Գեն բանկ		Նոր	Գեն բանկ		Նոր	Գեն բանկ	
8 հապլ.	Կոսմ.	Եվր.	5 հապլ.	Կոսմ.	Եվր.	1 հապլ.	Կոսմ.	Եվր.
	2 հապլ.	16 հապլ.		5 հապլ.	1 հապլ.		0 հապլ.	2 հապլ.

Քննարկում և եզրակացություն: Վերջին տասնամյակների ընթացքում, երբ մակաբույծների ուսումնասիրության ոլորտ ներմուծվեցին պոլիմերազային շղթայական ռեակցիաների վրա հիմնված մեթոդները [12,13], թռչնի մալարիան, որը հետաքրքրություն էր ներկայացնում հատկապես էկոլոգիական և էվոլյուցիոն առումներով, մեծ թափով սկսեց ուսումնասիրվել [9]: Չնայած նրան, որ ժամանակակից մեթոդները հեշտացրել են մակաբույծների ուսումնասիրությունները, դրանք ևս զուրկ չեն թերություններից և կարիք ունեն հետագա զարգացման և կատարելագործման:

Հայտնի է, որ ՊՇՌ մեթոդով աշխատելիս չի կարելի լիարժեք համոզված լինել, որ բացասական արդյունք ցույց տված նմուշներում մակաբույծներ չկան [14], այնուամենայնիվ մեր վերլուծությունները հիմնվում են ստացված և առկա արդյունքների վրա:

Թռչունների վարակվածության էքստենսիվությունը կազմում է 62,8%, ինչը այլ աշխարհագրական տարածքների համեմատ բավականին բարձր ցուցանիշ է [15,16]: Ուսումնասիրված թռչունների համարյա բոլոր տեսակների մոտ վարակվածության մակարդակը Կրասնոդարի երկրամասում ավելի բարձր է, քան Հայաստանում, ինչը հավանաբար պայմանավորված է բնակլիմայական պայմաններով:

147 նուկլեոտիդային հաջորդականությունների հետազոտության արդյունքում հայտնաբերվել են թռչունների մալարիա հարուցող մակաբույծների 3 ցեղեր, որոնցից առավել հաճախ հանդիպում է *Haemoproteus spp.*՝ 105 նուկլեոտիդային հաջորդականություն (71,4%), նրան հաջորդում են *Plasmodium spp.*՝ 31 նուկլեոտիդային հաջորդականություն (21,1%) և *Leucocytozoon spp.*՝ 11 նուկլեոտիդային հաջորդակա-նություն (7,5%): Մեր հետազոտությունների արդյունքում բացահայտվել են նաև 14 նոր հապլոտիպեր, որոնք մինչ այժմ ոչ մի տեղ գրանցված չեն եղել, ինչը վկայում է տարածաշրջանում թռչունների արյան սպորավորների էնդեմիկության բավականին բարձր մակարդակի մասին: Հայտնաբերվել են նաև 7 կոսմոպոլիտ հապլոտիպեր, որոնք գրանցված են եղել նաև այլ աշխարհամասերում: Հաշվի առնելով այն, որ մակաբույծ-ներն ունեն չափազանց ցածր սպեցիֆիկություն թռչունների տեսակների նկատմամբ [14], կարելի է խոսել առկա վտանգի մասին, այսինքն՝ մակաբույծները համաճարակի պոտենցիալ աղբյուր են, ինչը հատկապես վտանգավոր է էնդեմիկ ֆաունայի համար:

Հետազոտությունը կատարվել է Գալուստ Գյուլբենկյան հիմնադրամի ֆինանսական աջակցությամբ:

[1]ՀՀ ԳԱԱ Կենդանաբանության և հիդրոէկոլոգիայի գիտական կենտրոն, կենդանաբանության ինստիտուտ
[2]Երևանի պետական համալսարան

Ս.Ա. Աղայան, Գ.Հ. Բոյախչյան

Թռչունների արյան սպորավոր մակաբույծների բազմազանությունը և տարածվածությունը Կովկասում

Մակաբույծների բազմազանությունը և տարածվածությունը որոշելու նպատակով գենետիկական ուսումնասիրության են ենթարկվել Հայաստանի, Լեռնային Ղարաբաղի Հանրապետության և ՌԴ Կրասնոդարի երկրամասի 12 տարբեր վայրերից հավաքված թռչունների արյան նմուշներ: ՈՒսումնասիրվել են նաև նուկլեոտիդային 147 հաջորդականություններ, որոնք ներկայացնում են տարբեր հապլոտիպեր: Ստացված արդյունքները ցույց են տալիս Կովկասի տարածաշրջանում թռչունների՝ մակաբույծներով վարակվածության և մակաբույծների էնդեմիկության բավականին բարձր մակարդակ:

С.А. Агаян, Г.А. Бояхчян

Разнообразие и распространение споровых кровепаразитов птиц Кавказа

С целью определения разнообразия паразитов и их распространения генетически изучены образцы крови птиц из 12 различных местностей Армении, Нагорно-Карабахской Республики и Краснодарского края Российской Федерации. Исследованы также 147 нуклеотидных последовательностей, представляющих различные гаплотипы. Полученные данные свидетельствуют о широкой распространенности и высокой степени эндемизма определенных кровепаразитов птиц Кавказа.

S.A. Aghayan, G.A. Boyakhchyan

Diversity and Prevalence of Avian Haemosporidian Parasites in Caucasus

Blood samples of birds from 12 different districts of Armenia, Republic of Nagorny Karabakh and Krasnodar Region of Russia were examined genetically to determine the diversity and prevalence of parasites. 147 nucleotide sequences representing various haplotypes were also investigated. The abtained data show wide prevalence and high degree of endemism of avian hemosporidian parasites in Caucasus.

Գրականություն

1. *Warner R. E.* - The Condor. 1968. V. 70. №. 2. P. 101-120.
2. *Jones K. E., Patel N. G. et al.* - Nature. 2008. V. 451. №. 7181. P. 990-993.

3. *Davis J. W., Anderson R.C. et al.* Parasitic Diseases of Wild Mammals. Iowa State University Press. Ames. IA. 1971.
4. *Hubálek Z.* - Journal of Wildlife Diseases. 2004. V. 40. №. 4. P. 639-659.
5. *Daszak P., Cunningham A. A. et al.* - Science. 2000. V. 287. №. 5452. P. 443-449.
6. *Harvell C. D., Mitchell C. E. et al.* - Science. 2002. V. 296. P. 2158-2162.
7. *Njabo K., Cornel A. et al.* - Malaria jornal. 2009. V. 8. P. 193-204.
8. *Valkiūnas G., Bensch S. et al.* - Journal of Parasitology. 2006. V. 92. №. 2. P. 418-422.
9. *Bensch S., Hellgren O. et al.* - Molecular Ecology Resources. 2009. V. 9. P. 1353-1358.
10. *Hall T.A.* - Nucleic Acids Symposium Series. 1999. V. 41. P. 95-98.
11. *Librado P. and Rozas J.* - Bioinformatics. 2009. V. 25. P. 1451-1452.
12. *Feldman R. A., Freed L. A. et al.* - Molecular Ecology. 1995. V. 4. №. 6. P. 663-674.
13. *Bensch S., Stjernman M. et al.* - The Royal Society. 2000. V. 267. P. 1583-1589.
14. *Szymanski M. M., Lovette I. J.* - Journal of Parasitology. 2005. V. 91. №. 4. P. 768-774.
15. *Ishtiaq F., Gering E. et al.* - Journal of Wildlife Diseases. 2007. V. 43. №. 3. P. 382-398.
16. *Martinsen E. S., Blumberg B. J. et al.* - Journal of Wildlife Diseases. 2008. V. 44. №. 2. P. 260-268.