

Распространение мутаций гена VKORC1 и резистентность серых крыс к родентицидам-антикоагулянтам в ряде городов России

Миронова Т. А.¹, кандидат биологических наук,
Рыльников В. А.², доктор биологических наук,
Богачева А. В.³, Лавренченко Л. А.¹, доктор биологических наук

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
«Институт проблем экологии и эволюции им. А. Н. Северцова Российской академии наук»,
119071 г. Москва, Ленинский проспект 33

² Негосударственное частное научно-образовательное учреждение
«Институт Пест-Менеджмента», 117342 г. Москва, ул. Введенского 12, корп. 1

³ ООО «Городской центр дезинфекции», 156005 г. Кострома, ул. Нижняя Дебря, 58

Родентициды-антикоагулянты занимают лидирующие позиции среди препаратов для контроля численности грызунов. Активное применение антикоагулянтов привело к возникновению резистентных популяций серых крыс. Их постоянный мониторинг проводится в ряде стран Европы, Америки и Азии. Было обнаружено, что резистентность определяется единичными нуклеотидными заменами в гене VKORC1. Нами были отловлены и обследованы выборки серых крыс из нескольких городов России. Из ранее описанных мутаций, приводящих к возникновению резистентности у серых крыс, нами была обнаружена только одна *Tyr139Ser*. Резистентные крысы были отловлены на территории города Москвы, причем все особи были гетерозиготами по данной замене. Частота мутации *Tyr139Ser* составила 29% в Академическом районе Москвы. Также были изучены выборки серых крыс из Костромы и Читы, все обследованные особи оказались «чувствительными» к родентицидам-антикоагулянтам и не имели резистентных мутаций в ключевых позициях 120, 128 и 139 гена VKORC1.

Ключевые слова: серая крыса, VKORC1, резистентность, родентициды-антикоагулянты.

Введение. Серая крыса (*Rattus norvegicus*) – вид-космополит, широко распространившийся по миру благодаря хозяйственной деятельности человека. Социальное и экономическое значение этого вида огромно, он является одним из самых важных объектов контроля численности грызунов. Серые крысы являются переносчиками целого ряда природно-очаговых инфекций, их жизнедеятельность наносит огромный экономический ущерб как в сельском хозяйстве, так и в промышленной сфере. Известны случаи, когда деятельность крыс приводила к авариям.

История борьбы человека с серой крысой насчитывает не одно столетие, но одним из переломных моментов этого противостояния стало широкое применение родентицидов-антикоагулянтов в пятидесятых годах XX века. Антикоагулянты оказались весьма эффективны для борьбы с серыми крысами, т. к. обладали кумулятивным характером действия и не вызывали реакции избегания приманки. Еще одним преимуществом

родентицидов-антикоагулянтов стала низкая токсичность препаратов по сравнению с ядами острого действия, которые применяли ранее для борьбы с грызунами. Также существует универсальный антидот к антикоагулянтам – витамин К, употребление которого устраняет последствия отравления и не наносит серьезного вреда здоровью. Стоит отметить, что антикоагулянты первого поколения (варфарин, дикумарол и т. д.) применяются не только для контроля численности грызунов, но также являются крайне важными медицинскими препаратами для профилактики тромбозомболических осложнений и при постоперационном восстановлении.

Начиная с 50-х годов XX века антикоагулянты стали широко применяться для контроля численности популяций серых крыс по всему миру. Однако спустя десять лет стали появляться первые сообщения об обнаружении резистентных популяций крыс. Это привело к переоценке эффективности применения антикоагулянтов первого

Частота кодонов, отвечающих за резистентность к родентицидам-антикоагулянтам в ряде регионов России.

Локалитет	кол-во образцов	Частота кодонов			
		120 (СТГ)	128 (СТГ)	139 (ТАТ)	139 (ТА/СТ)*
г. Москва, Академический район	24	1	1	0,71	0,29
г. Москва, пос. Московский, «Саларьево парк»	13	1	1	0,92	0,08
г. Кострома	34	1	1	1	0
г. Чита	16	1	1	1	0

* Гетерозигота по второй позиции кодона, несинонимичная замена, приводящая к изменению кодируемой аминокислоты (ТАТ – Тирозин, ТСТ – Серин).

поколения и послужило толчком для разработки более эффективных, но и более токсичных антикоагулянтов второго поколения (дифенакум, бромадиолон и др.). Дальнейшее применение этих препаратов показало, что некоторые популяции серых крыс оказались устойчивыми и к антикоагулянтам второго поколения. Многолетнее изучение этой проблемы в Западной Европе, Северной Америке и ряде стран Восточной Азии привело к разработке эффективных способов преодоления резистентности популяций серых крыс, а также позволило составить карты распространения резистентных популяций, за которыми ведется постоянный мониторинг [2, 4, 5].

Долгое время генетическая составляющая резистентности была неизвестна, только в 2004 году был открыт ген, мутации в котором вызывали резистентность к антикоагулянтам [3, 6]. Этот ген кодирует 1 субъединицу фермента витамин-К-эпоксид-редуктазы (VKORC1), который представляет собой небольшой (163 аминокислоты) трансмембранный белок [7, 8]. У серых крыс ген VKORC1 локализован на первой хромосоме. Основные мутации, отвечающие за резистентность к антикоагулянтам, локализованы в третьем экзоне гена VKORC1 в позициях 120, 128 и 139 [5, 6].

Материалы и методы. Было исследовано 113 образцов от диких серых крыс обоих полов, отловленных в период с 2014 по 2019 гг. на территории трех регионов: г. Москва, г. Кострома и г. Чита (Табл. 1). Для молекулярно-генетических исследований использовались небольшие (1–2 см) фрагменты хвоста, которые фиксировались в 96%-м спирте.

ДНК выделяли с использованием специальных китов для животных тканей (Синтол). Мы амплифицировали третий экзон гена VKORC1 с помощью специально подобранных праймеров: VKORC13F 5' – GACGTTGGGCCTCTATCC -3' и VKORC13R 5' – TTGTTCAAATCCTTCTCTT -3'.

Амплификацию проводили по следующему протоколу: предварительная денатурация при температуре 95°C в течение 3 мин.; следующие 40 циклов: денатурация при 95°C – 30 сек., отжиг праймеров на 52°C – 30 сек., синтез при температуре 72°C – 30 сек.; финальная элонгация – 5 мин при 72°C. Был амплифицирован фрагмент размером 370 пар нуклеотидов. Полученный фрагмент секвенировался на автоматическом анализаторе ABI PRISM 310 с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems).

Результаты и обсуждение. В настоящее время описан ряд мутаций гена VKORC1, которые отвечают за возникновение устойчивости к антикоагулянтам. Для позиции 120 известен один вариант резистентной мутации: Leu120 Gln (Лейцин120 Глутамин). В позиции 128 описано два варианта мутаций: Leu128 Gln (Лейцин128 Глутамин) и Leu128 Ser (Лейцин128 Серин). Самыми распространенными, наиболее изменчивыми, а также отвечающими за высокую степень резистентности, являются мутации в позиции 139. Описано 3 варианта аминокислотных замен, вызывающих резистентность у серых крыс: Tyr139 Cys (Тирозин139 Цистеин), Tyr139 Ser (Тирозин139 Серин) и Tyr139 Phe (Тирозин139 Фенилаланин) [5, 6].

Мы исследовали фрагменты гена VKORC1 от 113 крыс, отловленных в трех крупных городах России (Табл. 1). Условия обитания в крупных городах нередко препятствуют расселению грызунов, что приводит к фрагментации популяций, поэтому мы анализировали отдельные выборки из г. Москвы независимо друг от друга. В позициях 120 и 128 у всех исследованных образцов выявлена аминокислота Лейцин, которая является «диким» вариантом и не приводит к возникновению резистентности к антикоагулянтам. В позиции 139 на территории городов Кострома и Чита выявлен Тирозин, который также является «ди-

ким» типом. Только на территории Москвы были обнаружены серые крысы, несущие резистентную мутацию в позиции 139. Все обнаруженные особи были гетерозиготами по мутантному аллелю Tyr139Ser (Тирозин139Серин). Причем частота этой мутации сильно варьировала в разных районах города. Так, в Академическом районе частота мутантного аллеля достигла почти 30%, тогда как рядом с поселком Московский была обнаружена всего 1 гетерозиготная особь и частота мутации составила всего 8%.

Заключение. Впервые были собраны и проанализированы репрезентативные выборки серых крыс из нескольких регионов России. Изучена изменчивость третьего экзона гена VKORC1. Исследованы три ключевые позиции 120, 128 и 139, отвечающие за возникновение резистентности к родентицидам-антикоагулянтам у серых крыс, обнаружена мутация в позиции 139. Все резистентные особи были гетерозиготами Tyr139Ser (Тирозин139Серин). Из трех исследованных городов, резистентные серые крысы были обнаружены только в Москве, причем частота резистентной мутации в разных выборках колебалась от 29% в Академическом районе до 8% в поселке Московский. Отсутствие гомозигот по мутантному аллелю в диких популяциях серых крыс может быть связано с их пониженной жизнеспособностью. По предварительным данным, мутация Tyr139Cys (Тирозин139Цистеин) приводит к ряду нарушений сердечно-сосудистой системы крыс, в частности вызывает кальциноз аорты и почечных артерий [1].

Список использованной литературы References

1. Kohn M. H., Price R. E., Pelz H. J. 2008. A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant Vkorc1 mutant rats. *Artery Research* 2: 138–147.
2. Lasseur R., Longin-Sauvageon C., Berny P., Benoit E. 2007. Biochemistry of resistance to warfarin in a French strain of the Norway rat (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Pest Management*. 53(4): 273–280.
3. Li T., Chang C-Y., Jin D-Y., Lin P-J., Khvorova A., Stafford D. W. 2004. Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature* 427(6974): 541–544.
4. Meerburg B. G., van Gent-Pelzer M. P., Schoelitsz B. and van der Lee T. A. 2014. Distribution of anticoagulant rodenticide resistance in *Rattus norvegicus* in the Netherlands according to Vkorc1 mutations. *Pest Management Science*, 70: 1761–1766.

5. Pelz H. J., Rost S., Hünerberg M., Fregin A., Heiberg A.-C., Baert K., MacNicoll A. D., Prescott C. V., Walker A.-S., Oldenburg J., Müller C. R. 2005. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents. *Genetics* 170: 1839–1847.

6. Rost S., Fregin A., Ivaskevicius V., Conzelmann E., Hörtnagel K., Pelz H.-J., Lappégard K., Seifried E., Scharrer I., Tuddenham E. G. D., Müller C. R., Strom T. M., Oldenburg J. 2004. Mutations in the VKORC1 gene cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature* 427:537–541.

7. Tie J.-K., Nicchitta C., von Heijne G. and Stafford D. W. 2005. Membrane Topology Mapping of Vitamin K Epoxide Reductase by in Vitro Translation/Cotranslocation. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 16410–16416.

8. Tie J.-K., Stafford D. W. 2016. Structural and functional insights into enzymes of the vitamin K cycle. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 14(2): 236–247.

Distribution of VKORC1 mutations and anticoagulant rodenticide resistance in norway rats in Russia

Tatiana A. Mironova¹ PhD. Bio,
Valentin A. Rylnikov² Dr. Sc. Bio.,
Angelina V. Bogacheva³,
Leonid A. Lavrenchenko¹ Dr. Sc. Bio.

¹A. N. Severtsov Institute of Ecology and Evolution (Moscow, Russia)

²Institute of pest management (Moscow, Russia)

³LLC City Centre disinfection (Kostroma, Russia)

Resistance of Norway rat to anticoagulant rodenticides now occurs in many countries in Europe, America and Asia. Resistance is often associated with single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the VKORC1 gene. This study gives a first overview of the distribution and frequency of VKORC1 SNPs in Norway rat, based on tissue samples from several cities in Russia. No SNPs associated with resistance were found in Kostroma and Chita. We found one of the several previously described mutations Tyr139Ser for VKORC1. This mutation is known to be associated with resistance to anticoagulant rodenticides, and it was found in 29% of the samples from Moscow. All these rats were heterozygous for the Tyr139Ser variant.

Key words: Norway rats, VKORC1, resistance, anticoagulant rodenticides.