

**UNIVERZITET U BEOGRADU**

**POLJOPRIVREDNI FAKULTET**

**Tanja R. Šćepović, dipl. inž.**

**Osetljivost domaćeg miša (*Mus musculus* L.)  
na bromadiolon i mogućnost njegovog  
suzbijanja**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2015.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE**

**FACULTY OF AGRICULTURE**

**Tanja R. Šćepović, MSc**

**Susceptibility of house mice (*Mus musculus* L.)  
to bromadiolone and control options**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2015**

Univerzitet u Beogradu

Poljoprivredni fakultet

Mentor:

dr Petar Vukša, redovni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

Drugi mentor:

dr Marina Vukša, viši naučni saradnik

Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

Članovi komisije:

dr Bojan Stojnić, vanredni profesor

Univerzitet u Beogradu, Poljoprivredni fakultet

dr Dragan Kataranovski, redovni profesor

Institut za biološka istraživanja "Siniša Stanković", Beograd

dr Goran Jokić, naučni saradnik

Institut za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd

## **Zahvalnica**

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr Petru Vukši, na ukazanom poverenju i razumevanju. Veliko hvala na nesebičnoj podršci i pomoći u svim fazama izrade ove disertacije.

Ogromnu zahvalnost dugujem dr Marini Vukši na ukazanom poverenju, slobodi u istraživačkom radu, ogromnoj podršci, brojnim stručnim savetima koje mi je pružala tokom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Prof. dr Bojanu Stojniću hvala na diskusijama i pomoći i na tome što je pravo zadovoljstvo sarađivati s njim.

Prof. dr Draganu Kataranovskom se zahvaljujem na korisnim savetima i sadržajnim sugestijama pri konačnom formulisanju ove disertacije.

Veliku zahvalnost dugujem dr Goranu Jokiću na saradnji, stručnoj pomoći i savetima pri izvođenju oglada i tumačenju rezultata.

Veliko hvala kolegici Suzani Đedović na stručnoj pomoći i prijatnoj radnoj atmosferi ali i neizmernoj prijateljskoj podršci i razumevanju.

Ogromnu zahvalnost dugujem dr Alexandri Esther bez čije pomoći nije bilo moguće do kraja sprovesti veći deo ključnih eksperimenata.

Posebnu zahvalnost dugujem svim kolegama iz Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine na podršci, razumevanju i pomoći tokom izrade doktorske disertacije.

Svojoj porodici i prijateljima, koji su bili moja glavna pokretačka snaga, dugujem zahvalnost za razumevanje i podršku u proteklom periodu.

Posebno se zahvaljujem svom vereniku Velimiru čija ljubav i strpljenje su mi bili glavna podrška tokom izrade ove disertacije, što je olakšalo moj put ka ostvarenju ovog cilja.

# **Osetljivost domaćeg miša (*Mus musculus* L.) na bromadiolon i mogućnost njegovog suzbijanja**

## **Apstrakt**

Ispitivanjem osetljivosti jedinki domaćeg miša izlovljenih iz divljih populacija sa sedam lokaliteta, primenom metode testa hranjenja u trajanju od 21 dan, utvrđena je rezistentnost na bromadiolon (0,005 %) na dva lokaliteta. Takođe, na jednom od ostalih lokaliteta utvrđen je znatno smanjen nivo osetljivosti na ovaj antikoagulant. Primenom istog eksperimentalnog dizajna na potomke rezistentnih jedinki utvrđena je rezistentnost kod 38,46 % jedinki. Manji procenat smrtnosti i duži period preživljavanja kod osetljivih jedinki utvrđen je kod ženki. Takođe, manja promena telesne mase utvrđena je kod osetljivih i rezistentnih ženki. Kod ženki je utvrđena veća letalna i neletalna doza u odnosu na mužjake u svim sprovedenim testovima hranjenja.

Molekularnim metodama utvrđeno je prisustvo Leu128Ser i Tyr139Cys varijanti u trećem egzonu *vkorc1* gena. Takođe, kod pojedinih jedinki utvrđeno je istovremeno javljanje obe varijante, odnosno kombinacija varijanti Leu128Ser/Tyr139Cys u pomenutom egzonu. VKOR varijanta Tyr139Cys i kombinacija varijanti Leu128Ser/Tyr139Cys potvrđene su i kod osetljivih i kod rezistentnih jedinki. Varijanta Leu128Ser utvrđena je samo kod osetljivih jedinki. U egzonu 2 nisu utvrđene promene u sekvenci *vkorc1* gena, dok je u egzonu 1 utvrđena do sada neutvrđena promena u sekvenci ovog gena, Ala21Thr. Ova varijanta utvrđena je samo kod dve rezistentne jedinke. Kod jedne jedinke bila je u kombinaciji sa Tyr139Cys varijantom.

VKOR varijanta u kombinaciji sa polom ispoljila je značajan uticaj na nivo osetljivosti jedinki na bromadiolon. Nosioce Tyr139Cys varijante samostalno ili u kombinaciji sa drugim varijantama imali su smanjen nivo osetljivosti na bromadiolon u odnosu na nosioce Leu128Ser varijante. Isto se odnosi i na nosioce nove, Ala21Thr, varijante. Smanjen nivo osetljivosti odražavao se preko dužeg vremena preživljavanja, veće konzumacije bromadiolon mamca i manjih promena u telesnoj masi.

Mamci sa sadržajem difenakuma (0,005 %) ispoljili su 100 % efikasnost na jedinke domaćeg miša koje su bile rezistentne na bromadiolon u testovima hranjenja u trajanju

od 21 dan. Takođe, mamci sa sadržajem brodifakuma (0,005 %) ispoljili su efikasnost od 90 % i 100 % u testovima sa kratkoročnim izlaganjima od 1 i 2 dana.

**Ključne reči:** *Mus musculus*, antikoagulant, bromadiolon, rezistentnost, *vkorc1*, mutacije, polimorfizam, Leu128Ser, Tyr139Cys

Naučna oblast: Biotehničke nauke

Uža naučna oblast: Fitofarmacija

UDK: 632.958:599.323.4(043.3)

## **Susceptibility of house mice (*Mus musculus* L.) to bromadiolone and control options**

### **Abstract**

The susceptibility of house mice trapped at 7 locations was examined in 21-day feeding tests which revealed bromadiolone (0.005 %) resistance in two locations. In one of the other locations, we detected a significantly lower susceptibility to that anticoagulant. Applying the same experimental design on the offspring of resistant animals, we detected resistance in 38.46 % of the animals. Considering the susceptible animals, females had lower mortality percentages and longer survival intervals. Also, females sustained less variation in body weight both among the susceptible and resistant animals. Females also had higher lethal and non-lethal doses than males in all feeding tests.

In molecular testing, the Leu128Ser and Tyr139Cys variants were detected in exon 3 of the *vkorc1* gene. In some of the animals, both variants were found to occur simultaneously as the Leu128Ser/Tyr139Cys combination in exon 3. The VKOR variant Tyr139Cys and the combination of variants Leu128Ser/Tyr139Cys were confirmed both in susceptible and resistant animals. The variant Leu128Ser was only found in susceptible animals. No change in the *vkorc1* gene sequence was detected in exon 2, while a so far unreported change in that gene sequence, the Ala21Thr, was detected in exon 1. The variant was found in two resistant animals only. In one of these animals, it occurred in combination with the Tyr139Cys variant.

VKOR variant in combination with gender was found to affect significantly the susceptibility of animals to bromadiolone. Animals carrying the Tyr139Cys variant alone or its combination with the other showed a lower level of susceptibility to bromadiolone than those carrying the Leu128Ser variant. The same applies to the carriers of the new Ala21Thr variant. Lower susceptibility was detected through longer duration of survival, greater intake of bromadiolone baits and less variation in body weight.

Baits containing difenacoum (0.005 %) demonstrated 100 % efficacy against the house mice previously found to be bromadiolone-resistant in the 21-day feeding tests. Baits

containing brodifacoum (0.005 %) showed 90 % and 100 % efficacy in tests with brief exposure periods of 1 and 2 days.

**Keywords:** *Mus musculus*, anticoagulant, bromadiolone, resistance, *vkorc1*, mutation, polymorphism, Leu128Ser, Tyr139Cys

Scientific field: Biotechnical sciences

Specific scientific field: Phytopharmacy



# SADRŽAJ

|         |                                                                                          |    |
|---------|------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | Uvod.....                                                                                | 1  |
| 2       | Pregled literature.....                                                                  | 4  |
| 2.1     | Osnovne morfološke i biološke karakteristike domaćeg miša ( <i>Mus musculus</i> L.)..... | 4  |
| 2.2     | Štete od domaćeg miša.....                                                               | 5  |
| 2.3     | Hemijsko suzbijanje domaćeg miša.....                                                    | 7  |
| 2.3.1   | Razvoj i primena antikoagulantnih rodenticida.....                                       | 7  |
| 2.3.2   | Pregled antikoagulantnih rodenticida.....                                                | 9  |
| 2.3.2.1 | Bromadiolon.....                                                                         | 9  |
| 2.3.2.2 | Difenakum.....                                                                           | 10 |
| 2.3.2.3 | Brodifakum.....                                                                          | 10 |
| 2.3.3   | Mehanizam delovanja antikoagulantnih rodenticida.....                                    | 11 |
| 2.4     | Mehanizam ispoljavanja rezistentnosti.....                                               | 14 |
| 2.4.1   | Farmakodinamička osnova rezistentnosti.....                                              | 14 |
| 2.4.2   | Farmakokinetička osnova rezistentnosti.....                                              | 16 |
| 2.4.3   | Ostali faktori koji mogu uticati na mehanizam ispoljavanja rezistentnosti.....           | 18 |
| 2.5     | Pojava i razvoj rezistenosti domaćeg miša na antikoagulante.....                         | 19 |
| 2.5.1   | Pojava i razvoj rezistentnosti na antikoagulante prve i druge generacije.....            | 19 |
| 2.5.2   | Genetska osnova rezistentnosti domaćeg miša na antikoagulante.....                       | 21 |
| 2.5.2.1 | VKOR varijanta Leu128Ser.....                                                            | 23 |
| 2.5.2.2 | VKOR varijanta Tyr139Cys.....                                                            | 24 |
| 2.5.2.3 | Spretus grupa (Arg12Trp/Ala26Ser/Ala48Thr/Arg61Leu)..                                    | 25 |
| 2.6     | Mogućnost suzbijanja rezistentnih jedinki domaćeg miša.....                              | 26 |
| 2.6.1   | Pleiotropni efekat <i>vkorc1</i> gena.....                                               | 26 |
| 2.6.2   | Uvođenje novih antikoagulanata u praktičnu primenu.....                                  | 27 |
| 2.6.3   | Potencijalni faktori uticaja na efikasnost antikoagulanata.....                          | 29 |
| 3       | Materijal i metode.....                                                                  | 31 |
| 3.1     | Lokaliteti i izlovljavanje jedinki.....                                                  | 31 |
| 3.2     | Čuvanje i aklimatizacija jedinki.....                                                    | 34 |
| 3.3     | Korišćeni mamci.....                                                                     | 35 |
| 3.4     | Utvrđivanje osetljivosti domaćeg miša na bromadiolon.....                                | 35 |
| 3.5     | Utvrđivanje prisustva mutacija u <i>vkorc1</i> genu.....                                 | 37 |
| 3.6     | Utvrđivanje osetljivosti domaćeg miša na difenakum.....                                  | 38 |
| 3.7     | Ispitivanje osetljivosti domaćeg miša na brodifakum.....                                 | 39 |
| 3.8     | Obrada podataka.....                                                                     | 39 |
| 4       | Rezultati.....                                                                           | 41 |

|         |                                                                     |     |
|---------|---------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.1     | Osetljivost domaćeg miša na bromadiolon.....                        | 41  |
| 4.1.1   | Konzumacija placebo mamca.....                                      | 41  |
| 4.1.2   | Vreme preživljavanja.....                                           | 45  |
| 4.1.3   | Konzumacija bromadiolon mamca.....                                  | 48  |
| 4.1.3.1 | Konzumacija mamca prema lokalitetima i poreklu<br>domaćeg miša..... | 48  |
| 4.1.3.2 | Konzumacija mamca prema osetljivosti domaćeg miša.....              | 50  |
| 4.1.3.3 | Konzumacija mamca domaćeg miša prema polu.....                      | 53  |
| 4.1.3.4 | Odstupanja u konzumaciji mamca tokom testa.....                     | 55  |
| 4.1.4   | Promena telesne mase.....                                           | 57  |
| 4.2     | Polimorfizam <i>vkorc1</i> gena.....                                | 60  |
| 4.2.1   | Utvrđene varijante <i>vkorc1</i> gena.....                          | 60  |
| 4.2.2   | Uticaj VKOR varijante na vreme preživljavanja.....                  | 61  |
| 4.2.3   | Uticaj VKOR varijante na konzumaciju mamca.....                     | 63  |
| 4.2.4   | Uticaj VKOR varijante na promenu telesne mase.....                  | 66  |
| 4.3     | Osetljivost domaćeg miša na difenakum.....                          | 69  |
| 4.3.1   | Vreme preživljavanja.....                                           | 69  |
| 4.3.2   | Konzumacija mamca.....                                              | 73  |
| 4.3.3   | Promena telesne mase.....                                           | 76  |
| 4.4     | Osetljivost domaćeg miša na brodifakum.....                         | 78  |
| 5       | Diskusija.....                                                      | 80  |
| 5.1     | Test hranjanja bromadiolonom.....                                   | 80  |
| 5.2     | Uticaj VKOR varijante na nivo rezistentnosti.....                   | 83  |
| 5.3     | Efikasnost difenakuma i brodifakuma.....                            | 88  |
| 6       | Zaključak.....                                                      | 91  |
| 7       | Literatura.....                                                     | 94  |
|         | Biografija.....                                                     | 110 |
|         | Prilozi.....                                                        | 111 |

## 1 UVOD

Upotreba rodenticida predstavlja najviše primenjivan način suzbijanja štetnih glodara. Antikoagulanti (antikoagulansi) su napravili značajan pomak u suzbijanju glodara u odnosu na prethodno primenjivane akutne rodenticide s obzirom na sporiji mehanizam delovanja i postojanje antidota, pri čemu se povećala efikasnost i bezbednost u primeni rodenticida (Bentley, 1972; Hadler i Buckle, 1992; RRAG, 2012).

Od otkrića 1940. godine pa do danas, antikoagulanti su najčešće korišćeni rodenticidi za suzbijanje populacija štetnih glodara (Bentley, 1972; Buckle i sar., 1994; Prescott, 2011; RRAG, 2012). Mehanizam delovanja antikoagulanata prve i druge generacije zasniva se na narušavanju normalnog funkcionisanja vitamin K ciklusa, što rezultira poremećajem u koagulaciji krvi i pojavom hemoragija u glodarima (Misenheimer i sar., 1994; Wllin i sar., 2001; Ishizuka i sar., 2008).

Domaći miš (*Mus musculus* L.) u skladištima nanosi štete ishranom i oštećenjem uskladištenih proizvoda, kao i zagađenjem izmetom, urinom i dlakama (Meyer, 1994; Timm, 1994; White i Harris, 2002). Takođe, kao vektor humanih i animalnih patogena predstavlja opasnost po zdravlje ljudi i domaćih životinja. S obzirom na štete koje domaći miš nanosi, suzbijanje se nameće kao neophodna mera očuvanja uskladištenih proizvoda (Klimpel i sar., 2007; Fuehrer i sar., 2012).

Pojava rezistentnosti na antikoagulantne rodenticide je najčešći uzrok smanjene efikasnosti suzbijanja. Smatralo se da učestala primena istog antikoagulanta dovodi do razvoja rezistentnosti kod nekih vrsta glodara na šta je ukazivao značajniji gubitak efikasnosti u praktičnim uslovima kada je antikoagulant primenjen pravilno (Rowe i Redfern, 1964, 1965; Greaves, 1994). Uvođenjem novih metoda utvrđeno je da rezistentnost predstavlja posledicu genetičke varijabilnosti unutar populacije u kojoj su pojedine jedinke manje osetljive na antikoagulantne rodenticide (Li i sar., 2004; Rost i sar., 2004). Antikoagulanti deluju selektivno prouzrokujući uginuće osetljivih jedinki, pri čemu utiču na širenje rezistentnih alela u populacijama glodara (Heiberg i sar., 2003, 2006; Buckle i Endepols, 2008).

Otkriće mutacija u *vkorc1* genu, za koje se smatra da dovode do smanjene osetljivosti na antikoagulate, dalo je nove mogućnosti za razvoj metodologije utvrđivanja rezistentnosti, pre svega molekularno-bioloških metoda. Ove metode omogućavaju

jednostavnije praćenje razvoja i distribucije rezistentnih populacija i sprečavaju upotrebu neefikasnih rodenticida (Li i sar., 2004; Rost i sar., 2004; Pelz i sar., 2005, 2007).

Nedavna istraživanja dovela su u sumnju da rezistentnost glodara na antikoagulate predstavlja vrlo kompleksan mehanizam i da se ne može objasniti samo mutacijama u *vkorc1* genu (Endepols i sar., 2012; Buckle i Prescott, 2012; Buckle, 2012). Genetska osnova antikoagulantne rezistentnosti kod domaćeg miša nije u potpunosti razjašnjena. Rezultati ranijih istraživanja su utvrdili postojanje jednog gena koji kontroliše rezistentnost slično kao i u sivom pacovu (*Rattus norvegicus*) (Wallace i MacSwiney, 1976). Međutim, skorija istraživanja ukazuju na komplikovaniju osnovu rezistentnosti koja nije u potpunosti razjašnjena, a takođe se smatra da je uključeno više mehanizama rezistentnosti (Endepols i sar., 2011; RRAG, 2012; Endepols i sar., 2013).

Do danas je rezistentnost na antikoagulate u populacijama domaćeg miša registrovana u raznim delovima Evrope (Belgija, Danska, Finska, Francuska, Nemačka, Velika Britanija, Norveška, Švedska, Švajcarska i Portugal) i Amerike (Kanada, SAD i Argentina) (Pelz i sar., 2005; Rost i sar., 2009; Guidobono i sar., 2010; Pelz i sar., 2012). Utvrđivanje prisustva rezistentnosti u populacijama glodara na antikoagulantne rodenticide na području Srbije do sada je rađeno jedino u divljim populacijama sivog pacova (Kataranovski, 1988; Kataranovski i sar., 1988). Testovima hranjenja antikoagulantima prve generacije tada nije utvrđeno prisustvo rezistentnosti. Utvrđivanje prisustva rezistentnosti na antikoagulate u populacijama domaćeg miša (*Mus musculus*) do našeg istraživanja u Srbiji nije rađeno.

U ovoj doktorskoj disertaciji je istraživanje bilo usmereno na utvrđivanje prisustva rezistentnosti u divljim populacijama domaćeg miša prvenstveno na bromadiolon, koji je jedan od antikoagulanata sa najintenzivnijom upotrebom na području Srbije. Takođe, cilj istraživanja bio je da se sprovede uporedna analiza rezultata testa hranjenja i sekvencioniranja *vkorc1* gena kako bi se utvrdio stepen uticaja varijanti ovog gena na ispoljavanje rezistentnosti kod domaćeg miša, odnosno mogući uticaj drugih faktora u kombinaciji sa varijantama pomenutog gena. Konačni cilj istraživanja bio je da se predloži način suzbijanja jedinki koje su već razvile rezistentnost, odnosno suzbijanja populacija domaćeg miša u kojima bromadiolon više nije efikasan. Predlaganjem

alternativnih metoda suzbijanja ovakvih jedinki sprečice se dalje širenje rezistentnih alela u populacijama domaćeg miša.

## 2 PREGLED LITERATURE

### 2.1 OSNOVNE MORFOLOŠKE I BIOLOŠKE KARAKTERISTIKE DOMAĆEG MIŠA (*MUS MUSCULUS* L.)

Domaći miš (*Mus musculus* L.) pripada redu glodara (*Rodentia*), porodici mišolikih glodara (*Muridae*) i potporodici pravih miševa i pacova (*Murinae*) (Đukić i sar., 2005). Rasprostranjen je širom sveta i nastanjuje mesta u blizini ljudskih populacija (Battersby i sar., 2008).

*Mus musculus* koji egzistira u našoj zemlji i Švajcarskoj kao i lokalizovanim delovima u Danskoj i Nemačkoj ima velike sličnosti sa evropskom prevalentnom vrstom *Mus domesticus* i manje zastupljenom vrstom *Mus spretus* koja opstaje u takođe lokalizovanim delovima Španije i Francuske. Glavna razlika je što vrsta *Mus musculus* nema izrazito zakrivljenu gornju vilicu kao ostale vrste. Hibridizaciju vrsta *Mus musculus* i *Mus spretus* prethodno nije utvrđena, već je ova pojava utvrđena jedino između vrsta *Mus domesticus* i *Mus spretus* uz takođe zabeležen manji nivo reprodukcije njihovih potomaka (Lund, 1994). Međutim, nedavno istraživanje Pelz-a i sar. (2012) potvrdilo je da do hibridizacije dolazi i između ove dve vrste.

Domaći miš ima sposobnost reprodukcije tokom cele godine. Skotnost ženki traje 21 dan pa u toku godine mogu, teoretski, dati i do 13 legala. Broj novorođenih mladih u leglu kreće se od 3 do 12, sa prosekom od 5 do 6. Mladi se rađaju goli, zatvorenih očnih kapaka i slušnih kanala. Nakon 10 dana telo je u potpunosti prekriveno krznom, nakon 14 dana se otvaraju očni kapci, a sa 21 dan postaju skoro u potpunosti samostalni. Polnu zrelost jedinke domaćeg miša dostižu već sa 5 do 7 nedelja starosti. Prosečan životni vek jedinki u prirodi je oko godinu dana, dok u laboratorijskim uslovima mogu živeti i do 3,2 godine, sa prosečnim životnim vekom od 2 godine (Hrgović i sar., 1991; Timm, 1994; Vukša, 2008).

Domaćeg miša odlikuje izrazita sposobnost adaptacije. Jedinke domaćeg miša koje opstaju u poljskim uslovima i izložene su uticaju spoljašne sredine imaju sezonski način reprodukcije, dok se u zatvorenom prostoru jedinke razmnožavaju tokom cele godine. Domaći miš se izuzetno adaptira na uslove suše duži vremenski period jer koristi takozvanu metaboličku vodu, za razliku od sivog pacova koji ne može opstati duže od par dana bez vode. Nedostatak vode dobrim delom uslovljava niži nivo reprodukcije ali

se normalna reprodukcija uspostavlja odmah nakon što voda postane dostupna *ad libitum* (Lund, 1994; Timm, 1994).

Jedinke domaćeg miša pretežno su aktivne noću. Taktilne dlake ili vibrise (*vibrissae*) raspoređene po leđnoj, bočnim stranama tela i njušci, omogućavaju snalaženje u prostoru (Đukić i sar., 2005). Skloništa prave na mračnim i manje pristupačnim mestima koja su sa spoljašnom sredinom povezana malim otvorom. Iako postoje podaci o radijusu kretanja domaćeg miša i do 2 km ipak se uglavnom ne udaljavaju od svojih skloništa koja najčešće grade u blizini izvora hrane (Murphy i sar., 2005). Dobro razvijeno čulo sluha, odnosno sposobnost percepcije i proizvodnje ultrazvučnih talasa jedan je od bitnih načina komunikacije i zaštite od mogućih opasnosti i predatora (Đukić i sar., 2005).

Domaći miš je omnivorna vrsta ali u ishrani preferira semena i zrnastu hranu. Kod ove vrste glodara nije izražena neofobija pa ne oklevaju da se hrane na novim izvorima hrane u svom okruženju. Ukoliko nema dostupnog zrnevlja preferira hranu bogatu mastima i proteinima (Timm, 1994). U prirodi se hrani semenjem i plodovima svih biljnih kultura, ali i štetnim insektima. Često konzumira tek posejana zrna žitarica i tako čini ogromne štete već pri samoj setvi. U stambenim objektima u ishrani koristi svu dostupnu hranu kao i delove građevinskog materijala pričinjavajući velike štete pogotovo u uslovima prenamnoženja (Đukić i sar., 2005; Battersby i sar., 2008).

## **2.2 ŠTETE OD DOMAĆEG MIŠA**

Najveće štete domaći miš nanosi u zatvorenom prostoru, mada može dovesti do ekonomski značajnih gubitaka prinosa u usevima (Brown i Singleton, 2000). Štete nanosi ishranom i zagađenjem proizvoda koji služe za pripremu i skladištenje kako stočne tako i ljudske hrane (Hrgović i sar., 1991; Lund, 1994; Battersby i sar., 2008). Domaći miš ne konzumira velike količine hrane, u proseku jedinki je potrebno da u toku dana pojede najmanje 10 % od svoje telesne mase (Meyer, 1994). Prema podacima jedna jedinka, sa prosečnim dnevnim unosom od oko 3 g, bi na godišnjem nivou pojela ili oštetila oko 1 kg hrane (Tim, 1994; Brooks i Fiedler, 1999). Međutim, urinom, fecesom i dlakama zagađi mnogo veće količine hrane. Jedna jedinka može da produkuje i do 50 fekalnih peleta u toku dana (White i Harris, 2002).



Slika 1. Oštećenja na uskladištenom semenskom kukuruzu (a) i soji (b)

Precizna procena štete koju domaći miš nanosi u skladištima uglavnom nije izvodljiva. Podaci u literaturi o ekonomskim gubicima koje domaći miš nanosi u skladištima predstavljaju se kao ukupne štete koje nastaju usled prisustva glodara u skladištima, odnosno kao ekonomski gubici koje nanese miševi i pacovi zajedno. Novijih podataka o gubicima koje glodari mogu naneti u zatvorenom prostoru i polju nema. Raniji podaci ukazuju na to da se godišnje izgubi i do 33 miliona tona cerealija kao posledica šteta od glodara (Meyer, 1994; Timm, 1994). U periodu od 1994. do 1995. godine u Australiji domaći miš naneo je štete u vrednosti od 60 miliona dolara (Brown i Singleton, 2000). Gubitak u proizvodnji pirinča od 6 %, koji u proseku na godišnjem nivou nanese glodari, bio bi dovoljan da se prehrani 215 miliona ljudi, a pri tome se gubici mogu kretati i do 17 % (Battersby i sar., 2008).

Pored hrane i drugih uskladištenih proizvoda domaći miš oštećuje i objekte. Štete koje domaći miš nanosi ponekad zahtevaju troškove sanacije koji prevazilaze štetu na uskladištenim proizvodima. Oštećenja na objektima smanjuju efikasnost i bezbednost čuvanja proizvoda (Meyer, 1994).



Kao domaćin i vektor većeg broja endo- i ektoparazita domaći miš ima izuzetan epizootiološko-epidemiološki značaj. Kao vektor virusa uzročnik je limfocitarnog horiomeningitisa, lasa groznice kao i američkog encefalitisa konja. Takođe domaći miš je vektor leptospira, salmonela, toksoplazmi i uzročnika kuge i tularemije. Ektoparaziti čiji je domaćin domaći miš, takođe mogu biti vektori raznih oboljenja (krpeljski encefalitis) (Hrgović i sar., 1991; Gratz, 1994; Battersby i sar., 2008; Kataranovski i sar., 2010; Vujanić i sar., 2011).

Zoonoze se direktno ili indirektno prenose na ljude, kućne ljubimce ili stoku, pri čemu predstavljaju potencijalni rizik po zdravlje (Namue i Wongsawad, 1997; Klimpel i sar., 2007; Fuehrer i sar., 2012). Do direktnih infekcija kod ljudi dolazi usled konzumiranja kontaminirane hrane. Osim ovog direktnog načina infekcije se šire i indirektnim putem preko prelaznih domaćina, najčešće insekata. Predatorstvo i raspadanje leševa dodatno utiču na širenje zoonoznih agenasa (Rafique i sar., 2009; Fuehrer i sar., 2012).

Životni ciklus, perzistentnost i prenos među jedinkama divljih populacija kao i prenos na čoveka za većinu patogena nije dovoljno proučen ili je nepoznat. Mnoge zoonoze glodara infektivne za ljude mogu inficirati stoku i kućne ljubimce, pri čemu je rizik po zdravlje ljudi veći (Klimpel i sar., 2007; Fuehrer i sar., 2012). Opasnost i štete koje glodari svojim prisustvom i povećanom brojnošću izazivaju, kao neophodnost nameću potrebu preduzimanja odgovarajućih mera suzbijanja, odnosno smanjenja brojnosti njihovih populacija (Hrgović i sar., 1991).

## **2.3 HEMIJSKO SUZBIJANJE DOMAĆEG MIŠA**

### **2.3.1 Razvoj i primena antikoagulantnih rodenticida**

Rodenticidi koji imaju najširu primenu u svetu i kod nas u suzbijanja domaćeg miša kao i ostalih štetnih glodara su antikoagulantni rodenticidi (Bentley, 1972; Hadler i Buckle, 1992; Đukić i sar., 2005; Prescott, 2011). Ova grupa rodenticida je otkrivena pedesetih godina 20. veka, a njihova prednost u efikasnosti i bezbednosti brzo je rezultirala njihovom dominantnom ulogom u suzbijanju glodara (Bentley, 1972). Izolacijom dikumarina u Americi (Link, 1944) nastala je serija sintetisanih jedinjenja od kojih je prvi registrovan kao rodenticid bio varfarin, predstavnik antikoagulanata prve generacije koji je registrovan u Velikoj Britaniji 1949. godine (Hadler i Buckle, 1992). Zahvaljujući činjenici da za razliku od svojih prethodnika akutnih rodenticida imaju

sporije delovanje i da su bezbedniji za upotrebu (postojanje antidota, vitamina K), antikogulanti prve generacije (varfarin, kumafuril, kumatetralil, kumahlor, hlofacinon, difacinon i pindon) imaju široku primenu u suzbijanju glodara širom sveta (Bentley, 1972; Đukić i sar., 2005; Berny, 2011).

Antikoagulanti prve generacije, prvenstveno varfarin, imali su široku primenu u suzbijanju štetnih glodara u periodu od 1950. do 1965. godine (Hadler i Buckle, 1992). Prvi rezultat o rezistentnosti glodara na varfarin utvrđen je kod sivog pacova u Škotskoj (Boyle, 1960). Nakon ovog istraživanja rezistentnost je potvrđena i u drugim zemljama Evrope, Azije i Amerike (Lund, 1984; Hadler i Buckle, 1992; Pelz, 2001; Pelz i sar., 2005; Wang i sar., 2008; Guidobono i sar., 2010; Tanaka i sar., 2012). S obzirom da ostali antikoagulanti prve generacije nisu bili efikasni u suzbijanju štetnih glodara kao varfarin, pri čemu je takođe došlo i do pojave ukrštene rezistentnosti među pripadnicima ove grupe, usledio je razvoj antikoagulanata druge generacije (Boyle, 1960; Bentley, 1972).

Ponašanje domaćeg miša tokom ishrane dodatno može umanjiti efikasnost antikoagulanata prve generacije uzimajući u obzir da domaći miš često menja izvor hrane, pri čemu ne unosi letalne doze. Prednost antikoagulanata druge generacije je u činjenici da su male količine mamca dovoljne da postignu letalni efekat i kod rezistentnih jedinki glodara (RRAG, 2012).

Prvi sintetisani antikoagulanti druge generacije (bromadiolon, difenakum i brodifakum) su ispoljili bolju efikasnost u suzbijanju osetljivih, ali i rezistentnih populacija štetnih glodara (Hadler i sar., 1975; Redfer i Gill, 1980; Rowe i sar., 1981). Takođe, efikasniji način primene s obzirom da nije bilo neophodno višekratno izlaganje i dugotrajno konzumiranje, kao što je to bio slučaj sa antikoagulantima prve generacije, rezultirao je da antikoagulanti druge generacije zamene svoje prethodnike (Hadler i Buckle, 1992; Buckle, 1994; Buckle i sar., 1994; Prescott, 2011). U pojedinim zemljama se zastupljenost rezistentnih jedinki kreće i do 75 %, a suzbijanje ovakvih jedinki zahteva upotrebu potentnijih jedinjenja kao što su antikoagulanti druge generacije, odnosno bromadiolon, difenakum i brodifakum (Pelz, 2001). Međutim pojava rezistentnosti i na antikoagulanate druge generacije, posebno na bromadiolon i difenakum, dovela je u

pitanje upotrebu ovih antikoagulanata (Rowe i sar., 1981; Prescott, 1996; Rost i sar., 2004; Pelz i sar., 2005; Lasseur i sar., 2007; Pelz i sar., 2012).

Od 1975. godine pet antikoagulanata druge generacije je u svetu dostupno za suzbijanje štetnih glodara u svetu i to su bromadiolon, difenakum, brodifakum, flokumafen i difetialon (Berny, 2011; Prescott, 2011; RRAG, 2012). Od antikoagulanata druge generacije u našoj zemlji su registrovani bromadiolon, brodifakum, flokumafen i difetialon, pri čemu bromadiolon ima najširu upotrebu u suzbijanju glodara u skladištima (Janjić i Elezović, 2010; Anonimus, 2013).

## **2.3.2 Pregled antikoagulantnih rodenticida**

### **2.3.2.1 Bromadiolon**

Bromadiolon je sintetisan 1968. godine, ali je tek nakon 1976. godine postao komercijalno dostupan. Bromadiolon je razvijen od strane francuske kompanije Liphia i pušten u prodaju 1977. godine. Uveden je u upotrebu ne samo zbog efikasnijeg suzbijanja rezistentnih jedinki već i poboljšanja postupka suzbijanja osetljivih jedinki glodara. Izuzetno visoku efikasnost ovaj antikoagulant je ispoljio na varfarin osetljive jedinke glodara nakon samo jednog dana hranjenja kao i blago veću efikasnost u suzbijanju pacova u odnosu na domaćeg miša (Marsh, 1977). Dobra efikasnost bromadiolona zabeležena je i na varfarin rezistentne jedinke glodara (Redfern i Gill, 1980).

Bromadiolon je kratko vreme imao široku primenu sa dobrom efikasnošću na varfarin rezistentne jedinke. Smanjena efikasnost bromadiolona utvrđena je prvo na terenu a onda i u laboratorijskim testovima hranjenja bez alternativnog izbora hrane (Rowe i sar., 1981). Skorija istraživanja ukazuju na iste rezultate (Prescott, 1996; Guidobono i sar., 2010; Endepols i sar., 2012).

Pre tri decenije bromadiolon je registrovan u našoj zemlji i ima najširu upotrebu u suzbijanju štetnih glodara (Janjić i Elezović, 2010; Anonimus, 2013). Kontinuirana i dugotrajna primena bromadiolona rezultirala je njegovom smanjenom efikasnošću u objektima, a koja je primećena na terenu tokom poslednjih godina.

### **2.3.2.2 Difenakum**

Difenakum predstavlja prvi komercijalno dostupan antikoagulant druge generacije u svetu. Preparate na bazi difenakuma proizvodila je firma Sorex Ltd. iz Velike Britanije, a za suzbijanje štetnih glodara uglavnom su korišćeni mamci sa 0,005 % aktivne supstance (Hadler i sar., 1975).

Istraživanja su pokazala da je ovaj rodenticid bio efikasan u suzbijanju osetljivih populacija sivog pacova i domaćeg miša, odnosno populacija glodara koje nisu razvile rezistentnost na varfarin (Hadler i Shadbolt, 1975). Efikasnost difenakuma na varfarin rezistentne jedinke sivog pacova i domaćeg miša rezultirala je njegovom širokom primenom u svetu (Hadler i sar., 1975). Međutim, difenakum je ubrzo izgubio lidersku ulogu u suzbijanju glodara nakon pojave rezistentnosti na ovaj antikoagulant u Engleskoj i drugim zemljama sveta (Rowe i sar., 1981; Lund, 1984).

Nakon što se prvo pojavio na tržištu Velike Britanije brzo je našao veliku primenu širom Evrope ali i Amerike. U Evropi je jedan od najviše korišćenih antikoagulanata druge generacije (Buckle i sar., 2012a). U našoj zemlji do 1991. godine ovaj antikoagulant je samo testiran ali nije našao praktičnu primenu u deratizaciji s obzirom da nije bio registrovan (Hrgović i sar., 1991). Do danas ovaj antikoagulant nije registrovan za suzbijanje glodara u zatvorenom prostoru u našoj zemlji (Janjić i Elezović, 2010; Anonimus, 2013).

### **2.3.2.3 Brodifakum**

Ovaj antikoagulant je otkriven 1975. godine i proizveden od strane firme ICI u Velikoj Britaniji. Redfern i sar. (1976) i Rowe i sar. (1978) utvrdili su visoku efikasnost na varfarin rezistentne jedinke. Brodifakum mamci (0,005 %) postizali su 100 % smrtnost u suzbijanju populacija varfarin osetljivih i varfarin rezistentnih jedinki već nakon jednog ili dva dana hranjenja. Nakon visoke uspešnosti u suzbijanju varfarin rezistentnih glodara, ali i veće efikasnosti u odnosu na bromadiolon i difenakum, brodifakum se uvodi u primenu širom sveta (Greaves i Cullen-Ayres, 1988). Skorija terenska ispitivanja su utvrdila visoku efikasnost brodifakuma u rezistentnim populacijama sivog pacova (Buckle i sar., 2012b).

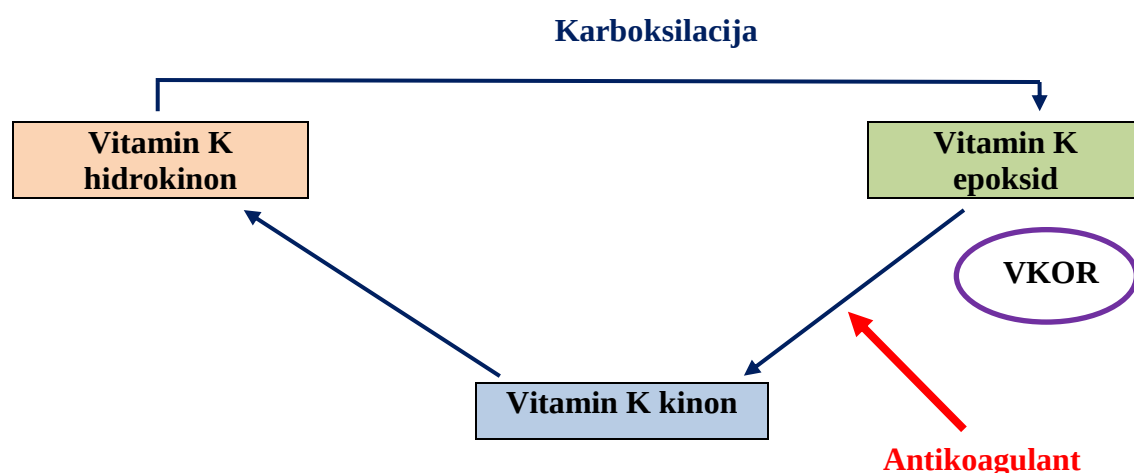
U našoj zemlji brodifakum postao je dostupan pre više od tri decenije, pri čemu u periodu od 2004. do 2010. godine ovaj antikoagulant nije bio registrovan, odnosno nije

primenjivan u našoj zemlji (Janjić i Elezović, 2010; Anonimus, 2013). Međutim, njegova primena je do danas ostala na mnogo manjem nivou nego što je to primena bromadiolona.

### 2.3.3 Mehanizam delovanja antikoagulantnih rodenticida

Svi sintetisani antikoagulantni rodenticidi predstavljaju derivate hidroksikumarina (varfarin, kumafuril, kumatetralil, kumahlor, bromadiolon, difenakum, brodifakum i flokumafen), indandiona (pindon, difacinon i hlorofacinon) i benzotiopirana (difetialon). Iako se međusobno razlikuju po hemijskoj strukturi, njihov fiziološki efekat je gotovo istovetan. Ova jedinjenja pripadaju grupi antivitamin K jedinjenja (AVK), jer svojom aktivnošću remete normalno funkcionisanje vitamin K ciklusa (MacNicoll, 1986; Lasseuer i sar., 2007; Berny, 2011; Buckle i Prescott, 2012; RRAG, 2012).

Antikoagulantni pripadaju grupi sporodelujućih rodenticida (Đukić i sar., 2005). Ova jedinjenja ne dovode do brze pojave simptoma. Vremenski period između ingestije letalne doze i pojave prvih simptoma je dovoljno dug da se spreči širenje neofobije među jedinkama glodara i poveća efikasnost antikoagulantna. Jedna od najvećih prednosti upotrebe antikoagulanata jeste postojanje antidota. Sporiji mehanizam delovanja omogućava adekvatnu primenu antidota, vitamina K, u situacijama akcidentalnih trovanja (Hadler i Buckle, 1992; Fisher, 2005).



Slika 2. Ciklus vitamina K i mesto delovanja antikoagulantnih rodenticida

Antikoagulantni se veoma lako apsorbiraju u tankom crevu i brzo dospevaju u jetru vezani za albumine plazme. Glavno mesto delovanja antikoagulanata su mikrozomi jetre, a meta je enzimski kompleks vitamin K epoksid reduktaze (VKOR). VKOR predstavlja enzimski sistem koji se nalazi u membrani endoplazmatičnog retikuluma (ER). Lipidi koji ga okružuju su od suštinskog značaja za njegovu enzimsku aktivnost. VKOR se nalazi u hidrofobnom lipidnom okruženju i njegov polipeptidni lanac čine hidrofobne aminokiseline. Ovaj enzim pripada grupi enzima prisutnih kod kičmenjaka, drozofila, biljaka, bakterija i arhea (Wallin i sar., 2003). Osnovni mehanizam delovanja antikoagulantnih rodenticida je antagonizam u odnosu na vitamin K koji se ispoljava preko inhibicije VKOR-a (Buckle, 1994; Misenheimer i sar., 1994).

Aktivna forma vitamina K, hidrokinon ( $KH_2$ ), deluje kao koenzim enzima gama-glutamil karboksilaze (GGXC) koji učestvuje u sintezi protrombina (faktor II), prokonvertina (faktor VII), antihemofilnog globulina B (faktor IX) i Stuart-Prover-ovog činioca (faktor X) koji su faktori koagulacije krvi. Svi činioci koagulacije krvi koji su zavisni od vitamina K sadrže u svom konačnom obliku karboksilovanu glutaminsku kiselinu, te se aktivnost ovog vitamina vezuje za postranslacionu fazu biosinteze ovih proteina. U postranslacionom ciklusu karboksilacije se ostaci glutaminske kiseline (GLU) prevode u gama-karboksiglutamat (GLA proteini). Ovu reakciju katalizuje GGXC. Posledica smanjenog nivoa GLA proteina je smanjeno vezivanje za fosfolipidne membrane na povređenim mestima, pri čemu se ne formira ugrušak. Za formiranje ugruška potrebni su joni kalcijuma koje mogu vezivati samo funkcionalni faktori koagulacije krvi (Fasco i Principe, 1982; Wallin i sar., 2001; Oldenburg i sar., 2007; Ishizuka i sar., 2008).

U karboksilacionom ciklusu  $KH_2$  se oksiduje do vitamin K 2,3- epoksida (KO). Ovo je neaktivna forma vitamina K koja ne reaguje kao koenzim sve dok se ne vrati u oblik kinona posredstvom VKOR-a (slika 2). Manji deo KO se izluči iz organizma, dok se većina prevodi u vitamin K, kinon formu, uz pomoć VKOR-a. Antikoagulantni imaju jak afinitet vezivanja upravo za ovaj enzim, pa se na taj način remeti prevođenje oksidovanog u redukovanu oblik vitamina K zbog čega se inhibira sinteza faktora koagulacije krvi (Wallin i sar., 2001). Prevođenje KO u formu kinona je neophodna faza i njena inhibicija dovodi do sprečavanja vitamin K ciklusa, dok faza prevođenja kinona u hidrokinon se može odvijati i bez VKOR-a putem drugih fizioloških reakcija u

organizmu. Inhibicija vitamin K ciklusa rezultira poremećajima u koagulaciji krvi u roku od 48/72 sata (Rowe i Redfern, 1968; Fasco i Principe, 1982; Berny, 2011).

U prirodi su poznata dva oblika vitamina K, vitamin K<sub>1</sub> (filohinon) koji je vezan u hloroplastima i vitamin K<sub>2</sub> (menahinon) koji nastaje mikrobiološkom sintezom u digestivnom traktu (Damon i sar., 2005). Treća forma vitamina K (K<sub>3</sub>), menahinon, predstavlja sintetičku formu vitamina K. Ovaj oblik vitamina K je glodarima najčešće dostupan preko stočne hrane. Forme K<sub>1</sub> i K<sub>3</sub> deluju kao antidoti za pacove, dok je za miševe antidot samo vitamin K<sub>1</sub> (MacNicoll i Gill, 1993). Glavni izvor vitamina K su reciklirajući procesi u jetri. Manjim delom organizam se snadbeva preko mikrobiološke sinteze u digestivnom traktu i konzumiranjem biljnih proizvoda bogatih hlorofilom. (Janjić, 2009; Kidd, 2010).

Svi uzroci koji sprečavaju sintezu i apsorpciju vitamina K u tankom crevu, ili koji sprečavaju njihovu regulatornu ulogu u sintezi pomenutih faktora koagulacije krvi, mogu izazvati unutrašnje krvarenje. S obzirom da se antikoagulanti brže vezuju za enzim, odnosno imaju veći afinitet nego vitamin K, samim tim dolazi do sprečavanja sinteze faktora koagulacije krvi. Nedostak vitamina K klinički se ispoljava pojavom hemoragije, dok subklinički ima za rezultat probleme sa razvojem kostiju i kalcifikacijom arterija (Hrgović i sar., 1991; Kaneki i sar., 2006).

S obzirom da je mehanizam dejstva isti za sve antikoagulanate, ne postoji razlika u vremenu smrti pri delovanju različitih antikoagulanata nakon što je enzim blokiran. Ono što pravi razliku između delovanja različitih antikoagulanata jeste vreme koje je potrebno da se blokira enzim. Takođe, antikoagulanti se ne mogu razlikovati ni prema mestima na kojima nastaju hemoragije (Hadler i Buckle, 1992).

Antikoagulantni rodenticidi deluju selektivno prouzrokujući uginuće samo osetljivih jedinki glodara, a samim tim favorizuju preživljavanje i umnožavanje rezistentnih jedinki. Nije dokazano da antikoagulantni rodenticidi prouzrokuju promene nasledne osnove koje bi bile odgovorne za rezistentnost, već se njihovom intenzivnom upotrebom vrši jak selekcionni pritisak na određenu populaciju glodara unutar koje se prouzrokuje uginuće osetljivih, a favorizuje opstanak i reprodukcija rezistentnih jedinki (Heiberg i sar., 2003, 2006; Buckle i Endepols, 2008).

## 2.4 MEHANIZAM ISPOLJAVANJA REZISTENTNOSTI

### 2.4.1 Farmakodinamička osnova rezistentnosti

Pojava rezistentnosti na antikoagulate predstavlja problem kako u suzbijanju štetnih glodara tako i u humanoj medicini. S obzirom da varfarin ima široku primenu u lečenju tromboze, pojava rezistentnosti na ovaj antikoagulant dovodi do problema u lečenju ljudi (D'Andrea i sar., 2005; Bodin i sar., 2005; Kovač i sar., 2009; Božina, 2010). Takođe, pojava rezistentnosti glodara na antikoagulate dovodi do značajnih problema u suzbijanju štetnih glodara na terenu (Rowe i sar., 1981; Endepols i sar., 2011; Endepols i sar., 2013).

Prvi rezultati da se pojava rezistentnosti na atikoagulate nalazi pod kontrolom gena koji ima analognu poziciju kod domaćeg miša i sivog pacova, utvrđeni su sedamdesetih godina 20. veka u Engleskoj (Wallace i MacSwiney, 1976). Ovim istraživanjem je utvrđeno da se, tada nazvan „gen rezistentnosti“ kod domaćeg miša (*War*), nalazi na hromozomu 7 i da je njegova pozicija analogna genu rezistentnosti kod sivog pacova (*Rw*) sa pozicijom na hromozomu 1. Smatralo se da ovaj gen određuje sintezu proteina, odnosno enzima, koji je uključen u mehanizam rezistentnosti na antikoagulate. Iako je aktivnost ovog enzima zabeležena još 1974. godine, naponi da se ovaj enzim izoluje bili su bezuspešni (Fasco i sar., 1983; Cain i sar., 1997; Wallin i sar., 2001).

Saznanja o genetskoj osnovi mehanizma rezistentnosti na antikoagulantne rodenticide napravila su veliki pomak u ovoj istraživačkoj oblasti (Li i sar., 2004; Rost i sar., 2004). Istraživanjima je obuhvaćeno utvrđivanje genetske osnove enzimskog kompleksa za koji se smatralo da je odgovoran za mehanizam rezistentnosti (Pelz i sar., 2005, 2007; Pelz, 2007; Buckle i Prescott, 2012). Prve smernice za identifikaciju gena koji određuje sintezu VKOR-a dali su Kohn i Pelz (2000). Ubrzo su Li i sar. (2004) u svom istraživanju na ljudima uspeali da identifikuju prvi protein VKOR-a, nazvan vitamin K reduktazni kompleks podjedinica 1 (VKORC1). Ovaj protein predstavlja glavnu, a moguće i jedinu komponentu VKOR-a i glavnu metu antikoagulantnih rodenticida. Utvrđeno je da ovaj enzim predstavlja transmembranski protein koji se nalazi u membrani ER. Gen koji diktira sintezu ovog proteina nazavan je *vkorc1* gen. Kod ljudi je gen za rezistentnost na varfarin utvrđen na hromozomu 16.



Rost i sar. (2004) obavili su istraživanje na sivom pacovu i uspeali da identifikuju *vkorc1* gen pomoću PCR metode. Zapažili su da je grupa gena na hromozomu 16 kod čoveka ortogonalna u odnosu na gene u okolini lokusa *Rw* i *War* gena za koje se smatralo da su odgovorni za pojavu rezistentnosti na antikoagulate. Utvrdili su da celokupni transkript *vkorc1* gena, koji kodira enzim vitamin K epoksid reduktazu duga 163 aminokiseline, sadrži 5126 baznih parova i podeljen je u tri egzona. Kod ljudi, sivog pacova i domaćeg miša *vkorc1* visoko je očuvan tokom evolucije i deli više od 85 % identičnosti u sekvenci (Garcia i Reitsma, 2008; Müller i sar., 2014).

*Vkorc1* gen je polimorfan i ima više od jednog, odnosno dva alela. Aleli predstavljaju različite oblike (varijante) gena i nalaze se na istom genskom mestu (lokusu) na homologim hromozomima i svojim interakcijama mogu uticati na fenotip (Li i sar., 2004; Rost i sar., 2004).

Promene u sekvenci *vkorc1* gena koje dovode do fenotipskih promena kod glodara i ljudi, odnosno do ispoljavanja rezistentnosti na antikoagulate predstavljaju tip „tačkastih“ mutacija (point mutation) u genu. Promene u sekvenci gena se odvijaju na nivou nukleotida gde se jedna baza zameni drugom. Kao posledica ovog procesa dobija se alel sa izmenjenom sekvencom (Marinković i sar., 1989; Snustad i sar., 1997). Promene u sekvenci *vkorc1* gena se nasleđuju dominantno-recesivno, odnosno do ispoljavanja rezistentnosti na antikoagulate dolazi kod svih kombinacija u kojima je prisutan izmenjeni alel kao što je prikazano u tabeli 1.

Za razliku od mutacija, DNK polimorfizam predstavlja više varijanti alela jednog hromozomskog lokusa koji se mogu razlikovati po nukleotidnoj sekvenci. Osim toga, smatra se da je polimorfizam varijacija sekvence DNK koja je česta u populaciji sa učestalošću većom od 1 %, dok manja učestalost karakteriše mutacije. Ukoliko ovakav proces rezultira promenom na nivou proteina čiju sintezu diktira novi izmenjeni gen, onda su to pojedinačni polimorfizmi nukleotida (SNP-Single nucleotide polymorphism) (Schorka i sar., 2000).

*Vkorc1* gen je polimorfan s funkcionalnim varijantama koje imaju farmakogenetičku značajnost. Polimorfizam ovog gena određuje dve kategorije fenotipa, odnosno osetljiva i rezistentna jedinka. Fenotip osetljivih jedinki karakteriše prisustvo oba alela „divljeg“ tipa, dok ostale kombinacije alela rezultiraju pojavom rezistentnosti. Smatra se da

različite varijante gena (SNP) i različita stanja u kojima se javljaju (heterozigot i homozigot) imaju veliku ulogu u modulaciji enzimske aktivnosti, što je predmet brojnih farmakogenetičkih istraživanja (Greaves i Cullen-Ayres, 1988; Pelz i sar., 2005; Lasseur i sar., 2008; Jacob i sar., 2012; Matagrín i sar., 2013).

Tabela 1. Tipovi odnosa među alelima *vkorc1* gena

| Odnos alela | Genotip     | Fenotip       |
|-------------|-------------|---------------|
| AA          | homozigot   | Rezistentnost |
| Aa          | heterozigot | Rezistentnost |
| aa          | homozigot   | Osetljivost   |

A- dominantan, izmenjen alel; a- recesivan alel, „divlji“ tip

Izmenjena sekvenca *vkorc1* gena diktira sintezu proteina sa izmenjenom strukturom, što ima za posledicu nemogućnost vezivanja antikoagulant za ciljno mesto enzima (Rost i sar., 2005). Međutim, smatra se da samo izmene na određenim kodonima, koji predstavljaju vezivna mesta antikoagulanata, „vruće tačke“ (hot spots), dovode do ove pojave (Pelz i sar., 2005).

Nisu sve izmene na nivou nukleotida u *vkorc1* genu povezane sa smanjenom osetljivošću na antikoagulate. Takođe, određene VKOR varijante, koje predstavljaju zamene aminokiselina na određenim kodonima, nemaju nikakav uticaj na rezistentnost jedinki što su neki istraživači potvrđivali uginućem svih nosilaca date VKOR varijante u testovima hranjenja (Snustad i sar., 1997; Schorka i sar., 2000; Tanaka i sar., 2012). Ovakve promene u sekvenci gena predstavljaju „tihe“ mutacije (silent mutation) koje se javljaju kao posledica zamene na nivou nukleotida pri čemu aminokiselina ostaje nepromenjena, kao i sekvenca *vkorc1* gena, pa ne dolazi do promena na nivou sintetisanog proteina. Rost i sar. (2009) utvrdili su „tihe“ mutacije u *vkorc1* genu na miševima i pacovima i za njih je utvrđeno da nemaju uticaja na pojavu rezistentnosti kod ljudi i glodara.

#### 2.4.2 Farmakokinetička osnova rezistentnosti

Uporedo sa istraživanjem genetske osnove rezistentnosti glodara na atikoagulate teklo je i istraživanje o dodatnim mehanizmima koji bi mogli uticati na ispoljavanje ove

pojave kod glodara (Sutcliffe i sar., 1990; Misenheimer i sar., 1994; Ishizuka i sar., 2007).

Sumnju o postojanju dodatnih faktora koji bi mogli uticati na ispoljavanje rezistentnosti kod glodara izazvalo je neslaganje rezultata drugih metoda za utvrđivanje rezistentnosti, kao što je to test koagulacije krvi (BCR - Blood Clotting Response Test), i molekularnih analiza (PCR - Polymerase Chain Reaction). Većina istraživača smatra da prisustvo promena u sekvenci *vkorc1* gena kod jedinki koje su prema BCR metodi osetljive i obrnuto zapravo predstavljaju lažno negativne, odnosno lažno pozitivne rezultate BCR metode koji se tolerišu kod 1 % populacije (Pelz i sar., 2005). Međutim, u pojedinim istraživanjima broj takvih jedinki prevazilazi dozvoljenu granicu od 1 % (Endepols i sar., 2011, 2012, 2013). Takođe, rezultati istraživanja na sivom pacovu u Danskoj (Heiberg i sar., 2009) i domaćem mišu u Argentini (Espinosa, 2013) koji ukazuju na prisustvo rezistentnih populacija bez promena u *vkorc1* genu, dodatno su pojačali sumnju o mogućem postojanju drugih mehanizama koji samostalno ili u sinergiji sa polimorfizmom *vkorc1* gena utiču na rezistentnost glodara na antikoagulate.

Određena jedinjenja koja mogu biti efikasni antikoagulanti kod jedne vrste mogu biti neefikasni kod druge vrste jedinki zbog mogućih razlika u metabolizmu. Ranija istraživanja ukazuju da je aktivnost citohrom P450 mnogo veća kod rezistentnih nego osetljivih jedinki, što rezultira i bržim metabolizmom antikoagulantnih jedinjenja (Sutcliffe i sar., 1990; Misenheimer i sar., 1994). Uporednim biohemijskim i molekularnim istraživanjima na crnom pacovu (*Rattus rattus*) u Tokiju utvrđeno je da kod ovog glodara rezistentnost nema genetske osnove već predstavlja posledicu bržeg metabolizma varfarina (Ishizuka i sar., 2007). Inhibicija enzima citohrom P450 utiče na veću efikasnost antikoagulanata pa s toga način metabolizma utiče i na njihovu efikasnost, odnosno pojavu rezistentnosti glodara na ove rodenticide (Buckle i Prescott, 2012).

Istraživači koji se bave uticajem polimorfizma *vkorc1* gena na terapiju antikoagulantima kod ljudi smatraju da postoji mogući zajednički uticaj polimorfizma ovog gena sa polimorfizmom gena *CYP2C9* koji diktira sintezu enzima za metabolizam varfarina citohrom P450 (Božina, 2010). Rezultati do kojih su došli ovi istraživači ukazuju da su pojedine kombinacije polimorfizma *vkorc1* i *CYP2C9* gena povezane sa prekomernom

koagulacijom krvi. Literaturnih podataka o mogućem uticaju polimorfizma gena citohrom P450 kod domaćeg miša na pojavu rezistentnosti na antikoagulate nema.

#### **2.4.3 Ostali faktori koji mogu uticati na mehanizam ispoljavanja rezistentnosti**

Prema nekim istraživačima vitamin K i varfarin imaju sličnu strukturu pa samim tim pretenduju da se vežu za isto mesto enzima. Istraživači ukazuju na postojanje proteina kalumenina koji ima jači afinitet vezivanja za VKOR, pa se na taj način ovaj enzimski kompleks čuva od vezivanja za antikoagulate, što bi rezultiralo određenim stepenom inhibicije VKOR-a. Koncentracija kalumenina u ER određuje stepen inhibicije VKOR-a, odnosno aktivnost karboksilacionog ciklusa i rezistentnost na antikoagulate (Wallin i sar., 2001).

Rezultati ranijih istraživanja usmeravali su istraživače da, zbog veće stope preživljavanja ženki u odnosu na mužjake, smatraju da je mehanizam rezistentnosti pod kontrolom hormona (Rowe i Redfern, 1964, 1967; Wallace i MacSwiney, 1976; MacSwiney i Wallace, 1978). Heiberg i sar. (2003) su tokom svog istraživanja o uticaju primene bromadiolona na nivo rezistentnosti u populaciji sivog pacova utvrdili da su ženke manje osetljive na promene nivoa vitamina K u hrani, što se odražavalo na njihovu veću otpornost u odnosu na mužjake. Takođe, utvrđeno je da starosno doba ima uticaj na pojavu hemoragija kod jedinki, odnosno kod starijih ženki je utvrđeno da su bile osetljivije na promene sadržaja vitamina K u hrani, što su ovi istraživači objasnili činjenicom da je stariji organizam podložniji raznim bolestima koje mogu smanjiti sposobnost iskorišćavanja vitamina K u organizmu.

Nakon potvrđenog uticaja promena u sekvenci *vkorc1* gena na osetljivost glodara na antikoagulate, uticaj pola i starosti jedinki nije detaljnije ispitivan (Pelz i sar., 2005, 2007; Rost i sar., 2009; Pelz i sar., 2012). Garg i Singla (2014) primenom testova hranjenja bromadiolonom na jedinke crnog pacova utvrdili su veću osetljivost mužjaka. Međutim, ova istraživanja nisu upotpunjena molekularnim analizama, odnosno utvrđivanjem eventualnog prisustva VKOR varijanti kao i interakcije sa polom.

## **2.5 POJAVA I RAZVOJ REZISTENTNOSTI DOMAĆEG MIŠA NA ANTIKOAGULANTE**

### **2.5.1 Pojava i razvoj rezistentnosti na antikoagulate prve i druge generacije**

Rezistentnost na antikoagulate rezultira smanjenjem efikasnosti antikoagulanata kada je on primenjen pravilno u praktičnim uslovima kao posledica prisustva rezistentnih jedinki glodara sa naslednom smanjenom osetljivošću na antikoagulate (Greaves, 1994).

Domaći miš u odnosu na pacova poseduje određeni stepen smanjene osetljivosti na antikoagulantne rodenticide, odnosno ovi rodenticidi imaju manju efikasnost na osetljive jedinke domaćeg miša nego na sivog pacova (RRAG, 2012). Ovu tvrdnju upotpunjuju i testovi hranjenja za utvrđivanje rezistentnosti u kojima se sivi pacov izlaže antikoagulantima šest dana, dok kod miševa ovi testovi traju 21 dan (EPPO, 2004b). Vrednosti letalnog perioda hranjenja (LFP-Lethal Feeding Period) višestruko su veće kod jedinki domaćeg miša nego kod pacova (RRAG, 2012). Rezistentnost kod jedinki domaćeg miša se progresivno razvija u nekim zemljama, kao na primer u Velikoj Britaniji, pa je teže naći osetljive nego rezistentne jedinke u populacijama domaćeg miša (Buckle i Prescott, 2012; RRAG, 2012).

Antikoagulanti prve generacije, pre svega najviše korišćeni varfarin, imali su široku primenu u suzbijanju sve do pojave smanjene osetljivosti populacija domaćeg miša širom sveta. Takođe, pojava ukrštene rezistentnosti jedinki domaćeg miša na varfarin i druge pripadnike prve generacije antikoagulanata dodatno je smanjila upotrebu ove grupe rodenticida (Boyle, 1960).

Prvi rezultati o smanjenoj osetljivosti domaćeg miša u laboratorijskim istraživanjima na antikoagulate prve generacije utvrđeni su u Velikoj Britaniji šezdesetih godina 20. veka. Testovima bez izbora hrane potvrđena je smanjena osetljivost domaćeg miša na varfarin (Rowe i Redfern, 1964). Daljim istraživanjem potvrđeno je nasleđivanje ove pojave (Rowe i Redfern, 1965). S obzirom na brzo širenje rezistentnih jedinki domaćeg miša, kao posledica nasleđivanja smanjene osetljivosti na antikoagulate, usledila su istraživanja s ciljem pronalaska jedinjenja koja će biti efikasna u suzbijanju varfarin rezistentnih jedinki.

U početku se smatralo da je prvi sintetisani antikoagulant druge generacije, difenakum, bio efikasan (Hadler i Shadbolt, 1975). Međutim, iste godine kada se difenakum pojavio

na tržištu rađena su istraživanja u kojima je utvrđeno da ovaj antikoagulant nema potpunu efikasnost na varfarin rezistentne jedinke domaćeg miša, odnosno da se razvila ukrštena rezistentnost između antikoagulanata prve i druge generacije. Međutim, difenakum je i dalje imao primenu u suzbijanju osetljivih i rezistentnih jedinki s obzirom da je imao najveću efikasnost u odnosu na ostale, tada dostupne, antikoagulanate (Hadler i sar., 1975; Rowe i Bradfield, 1976). Novija istraživanja takođe potvrđuju rezistentnost jedinki domaćeg miša na ovaj antikoagulant na terenu (Endepols i sar., 2011).

Bromadiolon je bio efikasan na varfarin osetljive jedinke domaćeg miša nakon samo jednog dana hranjenja. Istraživanje Redfern-a i Gill-a (1980) potvrdilo je opravdanost upotrebe ovog antikoagulanta u suzbijanju varfarin rezistentnih jedinki domaćeg miša zajedno sa difenakumom. Nakon laboratorijskih testova hranjenja bez izbora hrane bromadiolon je ispoljio osobenosti vrlo efikasnog antikoagulanta u suzbijanju rezistentnih populacija domaćeg miša. Međutim, istraživanja koja su kasnije usledila utvrdila su ukrštenu rezistentnost varfarin rezistentnih jedinki domaćeg miša na bromadiolon i difenakum (Rowe i sar., 1981; Lund, 1984; Prescott, 1996). Skorija istraživanja takođe potvrđuju rezistentnost domaćeg miša na bromadiolon i difenakum (Guidobono i sar., 2010; Pelz i sar., 2012; Endepols i sar., 2011, 2013).

Istraživači su utvrdili dobru efikasnost brodifakuma i predlagali njegovu upotrebu i u situacijama razvoja ukrštene rezistentnosti varfarin rezistentnih jedinki na bromadiolon i difenakum. Ovaj antikoagulant ispoljio je 100 % efikasnost na varfarin rezistentne jedinke domaćeg miša nakon samo jednog ili dva dana hranjenja. Utvrđeno je da se optimalne koncentracije brodifakuma u mamcima za efikasno suzbijanje varfarin rezistentnih jedinki domaćeg miša nalaze u intervalu od 0,002 % do 0,005 % (Redfern i sar., 1976). Takođe, u dugoročnim testovima ovaj antikoagulant bio je efikasan na varfarin rezistentne jedinke domaćeg miša u testovima bez izbora i sa izborom hrane. Dobra efikasnost u testovima sa prisustvom drugih izvora hrane potvrdila je da je brodifakum efikasan i pri malim unosima mamca (Rowe i Bradfield, 1976). Međutim Lund (1981) je zabeležio da je manji broj jedinki preživeo kratkoročne testove hranjenja brodifakum mamcima (0,005 %), ali i svakako mnogo veću efikasnost ovog antikoagulanta od bromadiolona na varfarin-osetljive i varfarin-rezistentne jedinke domaćeg miša.

Ispitivanje osetljivosti na antikoagulate u populacijama glodara na području Srbije rađeno je krajem osamdesetih godina 20. veka u populacijama sivog pacova (Kataranovki i sar., 1988). Istraživanje je urađeno primenom šestodnevnog testa hranjenja mamcima antikoagulanata prve generacije (varfarin i kumatetralil) pri čemu nije utvrđena rezistentnost kod jedinki izlovljenih na području Beograda, Požarevca, Pirot i Korčule. Istraživanja na istu temu u populacijama domaćeg miša do sada nisu rađena.

### **2.5.2 Genetska osnova rezistentnosti domaćeg miša na antikoagulate**

Ranija istraživanja na domaćem mišu potvrdila su postojanje gena, tada nazvanog *War* gen, na hromozomu 7. Ovim istraživanjima je utvrđena analognost u poziciji gena kod domaćeg miša i pacova i dato objašnjenje genske ekspresije rezistentnosti (Wallace i MacSwinney, 1976; Prescott, 1996).

Nakon identifikacije *vkorc1* gena promene u ovom genu smatraju se jednim od glavnih razloga promene osetljivosti domaćeg miša na antikoagulate (Li i sar., 2004; Rost i sar., 2004). U Nemačkoj je na većini ispitivanih lokaliteta zastupljenost jedinki domaćeg miša sa promenama u sekvenci *vkorc1* gena iznosila i do 90 % (Pelz i sar., 2012).

Nakon što je opisan *vkorc1* gen, poznavanje sekvence ovog gena dalo je mogućnost utvrđivanja varijanti ovog gena koje bi mogle imati ulogu u pojavi rezistentnosti na antikoagulate kod glodara bez donošenja jedinki u laboratoriju za potrebe *in-vivo* istraživanja (Li i sar., 2004; Rost i sar., 2004; Pelz i sar., 2005, 2007). Do sada je utvrđeno 9 promena u sekvenci *vkorc1* gena kod domaćeg miša. Tri tipa aminokiselinskih zamena (VKOR varijanti) povezuju se sa promenom osetljivosti domaćeg miša na antikoagulate: Leu128Ser (zamena leucina serinom na 128. kodonu), Tyr139Cys (zamena tirozina cisteinom na 139. kodonu) i Spretus grupa (grupa vezanih mutacija - Arg12Trp/Ala26Ser/Ala48Thr/Arg61Leu) (Pelz i sar., 2012). Za sve tri varijante poznato je da nose značajan stepen smanjene osetljivosti na kompletnu prvu generaciju antikoagulanata i neke antikoagulate druge generacije (Pelz i sar., 2012; RRAG, 2012).

Postojanje promene na nivou nukleotida ne mora obavezno rezultirati pojavom rezistentnosti na antikoagulate kod domaćeg miša. U terenskim ispitivanjima u

Nemačkoj potvrđeno je prisustvo aminokiselinske zamene Arg58Gly (zamena arginina sa glicinom) kod jedinki domaćeg miša pri čemu je utvrđeno da ova alelna varijanta *vkorc1* gena ne može biti marker za rezistentnost (Endepols i sar., 2011). Takođe, utvrđene su nove VKOR varijante ovog gena, Glu37Gly (zamena glutamina sa glicinom), Trp59Leu (zamena triptofana sa leucinom), Trp59Ser (zamena triptofana sa serinom) i Leu124Gln (zamena leucina sa glutaminom), za koje do sada nije poznato da li imaju uticaja na pojavu rezistentnosti kod domaćeg miša (Pelz i sar., 2012). Takođe, u Nemačkoj je potvrđeno prisustvo „tihih“ mutacija u *vkorc1* genu domaćeg miša Glu37Glu (zamena nukleotida u kodonu za glutaminsku kiselinu), pri čemu nije došlo do promene redosleda aminokiselina u VKORC1 proteinu. Za ovu mutaciju je, takođe, potvrđeno da nema uticaja na promenu osetljivosti na antikoagulate kod domaćeg miša (Rost i sar., 2009).

Pored navedenih promena u sekvenci *vkorc1* gena, koje se dešavaju u nekom od tri egzona ovog gena, moguće su i promene u intronima, nekodirajućim delovima gena. Ovakva promena utvrđena je u populaciji domaćeg miša u Nemačkoj. Kod ovih jedinki utvrđene su promene u intronu 1 na poziciji 398. Za ovu promenu je utvrđeno da nema uticaja na osetljivost jedinki domaćeg miša na antikoagulate (Endepols i sar., 2013).

Potrebno je naglasiti da sam mehanizam ispoljavanja rezistentnosti kod domaćeg miša nije u potpunosti razjašnjen, ali da nesumnjivo postoji analognost sa rezultatima istraživanja na sivom pacovu (Misenheimer i sar., 1994). Takođe, o genetskoj osnovi rezistentnosti domaćeg miša zna se mnogo manje nego kod pacova. Smatra se da isti gen kontroliše sintezu istog proteina kao i kod jedinki sivog pacova. Takođe, promene u ovom genu rezultiraju promenama u osetljivosti na antikoagulate (RRAG, 2012). Međutim, potvrđeno prisustvo populacija rezistentnih jedinki domaćeg miša bez utvrđenih promena u *vkorc1* genu ukazuje na mogući složeniji mehanizam razvoja i nasleđivanja rezistentnosti kod ovog glodara (Espinosa i sar., 2013). Osim mogućeg uticaja drugih faktora u kombinaciji sa polimorfizmom *vkorc1* gena, postoji mogućnost uticaja i drugih gena na razvoj rezistentnosti kod domaćeg miša na šta su ukazali Song i sar. (2008) nakon neutvrđene jasne veze između varijacija u protrombinskom vremenu i sadržaju i gustini kostiju sa različitim genotipovima kao rezultat promena u *vkorc1* genu kod domaćeg miša.



### 2.5.2.1 VKOR varijanta Leu128Ser

Prve rezistentne jedinice domaćeg miša sa Leu128Ser varijantom utvrđene su u okolini Jorka 1976. godine u Velikoj Britaniji (Wallace i MacSwiney, 1976), ali je tek primenom novih molekularnih metoda na sačuvanim uzorcima potvrđeno da su te rezistentne jedinice domaćeg miša zapravo bile nosioci Leu128Ser VKOR varijante (Pelz i sar., 2005). U istraživanju Wallace i MacSwiney (1976) jedinice su bile rezistentne na antikoagulate prve generacije, što je tada potvrđeno primenom metode testa hranjenja.

Jedinice domaćeg miša sa ovim tipom aminokiselinske zamene u *vkorc1* genu najviše su zastupljene u Velikoj Britaniji u oblasti Jork (Wallace i MacSwiney, 1976; Pelz i sar., 2005), ali je i novijim istraživanjima ova VKOR varijanta potvrđena i kod jedinki domaćeg miša u Nemačkoj, Portugalu i Švajcarskoj (Rost i sar., 2009; Pelz i sar., 2012). Utvrđeno je da se ova varijanta javila zajedno sa Spretus grupom kod jedinki iz Nemačke, kao i u kombinaciji sa varijantom Tyr139Cys kod jedinki domaćeg miša iz Nemačke i Portugala (Pelz i sar., 2012) .

Smatra se da je kodon 128 zapravo „vruća tačka“ na kojoj je detektovano više tipova aminokiselinskih zamena koje se povezuju sa pojavom rezistentnosti na atikoagulate kod više vrsta organizama. Prema Rost-u i sar. (2004) zamena leucina sa argininom na ovom kodonu povezana je sa rezistentnošću ljudi na antikoagulantnu terapiju. Takođe, zamena leucina sa glicinom kod sivog pacova dovodi do problema u suzbijanju ovih jedinki primenom antikoagulanata (Pelz i sar., 2005).

Kod nosilaca Leu128Ser VKOR varijante utvrđena je niska bazalna aktivnost VKOR-a u poređenju sa jedinkama sa divljim tipom u odsustvu antikoagulanata. Aktivnost VKOR enzima se u prisustvu antikoagulanta dodatno smanjila ispod nivoa detekcije u poređenju sa aktivnošću enzima kod jedinki nosilaca divljeg tipa (Pelz i sar., 2005). Smatra se da smanjena aktivnost VKOR-a koja ima za posledicu manjak vitamina K kod rezistentnih jedinki, može voditi ka aktivaciji drugih za sada nepoznatih mehanizama kojima će jedinice nadoknađivati nedostatak vitamina K za nesmetano funkcionisanje vitamin K ciklusa (Pelz i sar., 2012). Prema rezultatima ranijih istraživanja, jedinice koje su bile nosioci ove VKOR varijante rezistentne su na antikoagulate prve generacije, kao i na bromadiolon i difenakum (Wallace i

McSwiney, 1976; Rowe i sar., 1981). Jedna jedinka u istraživanju Rowe i Bradfield (1976) preživela je 21 dan testa hranjenja sa brodifakum mamcima.

#### **2.5.2.2 VKOR varijanta Tyr139Cys**

Rezistentnost kod jedinki domaćeg miša sa Tyr139Cys VKOR varijantom prvi put je utvrđena u Velikoj Britaniji (Prescott, 1996). Kasnijim istraživanjima i analizom sačuvanih uzoraka primenom molekularnih metoda utvrđeno je da su jedinke domaćeg miša koje su preživele testove hranjenja zapravo bile nosioci ove VKOR varijante (Pelz i sar., 2005). Jedinke domaćeg miša sa ovom varijantom najviše su rasprostranjenije u Nemačkoj i Velikoj Britaniji (Prescott, 1996; Pelz i sar., 2005), a novija istraživanja su potvrdila prisustvo ove varijante u *vkorc1* genu i kod jedinki domaćeg miša u Švajcarskoj i Portugalu (Rost i sar., 2009; Pelz i sar., 2012). Osim što je ova VKOR varijanta utvrđena zajedno sa Leu128Ser varijantom, takođe je potvrđeno i njeno istovremeno javljanje u kombinaciji sa Spretus grupom kod jedinki domaćeg miša u Nemačkoj i Švajcarskoj (Pelz i sar., 2011, 2012).

Kodon 139 istraživači takođe smatraju „vrućom tačkom“ jer su samo kod sivog pacova registrovane tri vrste zamena tirozina na istom kodonu (Tyr139Cys, Tyr139Ser, Tyr139Phe) koje se povezuju sa pojavom rezistentnosti (Pelz i sar., 2005; RRAG, 2012; Buckle i sar., 2012a; Buckle, 2013). Aminokiselina tirozin na 139. kodonu predstavlja visoko očuvano mesto u *vkorc1* genu obzirom da se javlja kod kičmenjaka i komaraca, pa se smatra da sve izmene na ovom kodonu utiču na promenu aktivnosti enzima (Rost i sar., 2009). U nekim *in-vitro* istraživanjima utvrđeno je da je Tyr139 zapravo vezivno mesto antikoagulanata. Smatra se da zamena tirozina drugom aminokiselinom rezultira nemogućnošću antikoagulanta da se veže za VKORC1. U istraživanju Lasseuer-a i sar. (2007) sa varfarin-rezistentnim pacovima potvrđeno je da su jedinke sa Tyr139Phe zamenom rezistentne na varfarin bez obzira što je razlika između tirozina i fenilalanina u samo jednoj hidroksilnoj grupi. Do istih rezultata došli su Grandemange i sar. (2009).

Kod nosilaca Tyr139Cys varijante utvrđeno je da imaju bazalnu aktivnost VKOR enzima manju od divljeg tipa (Pelz i sar., 2005). U prisustvu antikoagulanata aktivnost enzima se dodatno smanjuje, ali je i dalje veća od aktivnosti VKOR-a u poređenju Leu128Ser varijantom. Druge zamene tirozina na ovom kodonu, takođe, imaju visoku bazalnu aktivnost VKOR-a (Lasseur i sar., 2007; Matagrín i sar., 2013). Zamena

tirozina sa fenilalaninom pokazala je aktivnost enzima veću od bazalne aktivnosti divljeg tipa za 16 % (Pelz i sar., 2005).

Tyr139Cys varijanta je dosta istraživana kod sivog pacova i prevalentna je u populacijama sivog pacova u evropskim državama kao što su Nemačka, Danska, Francuska, Velika Britanija, Belgija i Norveška, a njeno prisustvo je potvrđeno u Mađarskoj, što je do sada predstavljao jedini rezultat o rezistentnosti glodara uopšte na ovim prostorima (Rost i sar., 2009; Buckle i sar., 2012b). Utvrđeno je da su jedinke domaćeg miša, nosioci ove VKOR varijante, rezistentni na prvu generaciju antikoagulanata i bromadiolon (Prescott, 1996; Pelz i sar., 2005). Rezultati skorijih istraživanja ukazuju na uginuće manjeg broja nosilaca ove varijante tokom tretmana bromadiolonom ali u populacijama sivog pacova (Endepols i sar., 2012). Efikasnost ostalih antikoagulanata druge generacije na ovu varijantu do sada nije utvrđivana na domaćem mišu.

#### **2.5.2.3 Spretus grupa (Arg12Trp/Ala26Ser/Ala48Thr/Arg61Leu)**

Prvi slučaj hibridizacije vrsta alžirskog miša (*Mus spretus*) sa domaćim mišem (*Mus musculus*) utvrdili su Geen-Till i sar. (2000). Kasnija istraživanja pokazala su da se ovim putem prenose rezistentni aleli sa *Mus spretus* na *Mus domesticus* i *Mus musculus* (Song i sar., 2011; Pelz i sar., 2012). Ukrštanjem dolazi do prenosa grupe vezanih mutacija, odnosno Spretus grupe sa alžirskog na domaćeg miša.

Prisustvo Spretus grupe potvrđeno je u Nemačkoj, Švajcarskoj i Portugalu (Rost i sar., 2009; Pelz i sar., 2012). Kod domaćeg miša ova varijanta može se javiti u kombinaciji sa Leu128Ser i Tyr139Cys varijantama (Pelz i sar., 2011; Pelz i sar., 2012). Varijanta Ala26 u potpunosti je očuvana kod kičemenjaka (Rost i sar., 2009). Takođe, varijanta Arg61Trp nije snažno vezana za ovu grupu vezanih mutacija, pa se Spretus grupa može sresti i bez ove varijante (Pelz i sar., 2012).

U *in-vitro* istraživanjima pojedinačno je potvrđen uticaj svake VKOR varijante koja se nalazi u Spretus grupi (Rost i sar., 2009). Za Arg12Trp i Arg61Leu utvrđen je jak uticaj na VKOR aktivnost čija je bazalna aktivnost bila na nivou 33 % i 49 % u odnosu na osetljivu varijantu. Za varijante Ala26Ser i Ala48Thr utvrđena je visoka bazalna aktivnost VKOR-a od 67 % i 118 %. U kombinaciji sa Spretus grupom sreće se i

Arg58Gly varijanta koja takođe ima jak uticaj samo na bazalnu VKOR aktivnost, dok se u prisustvu antikoagulant ne održava aktivnost VKOR-a (Pelz i sar., 2012).

Za Spretus VKOR varijantu utvrđeno je da dovodi do rezistentnosti na prvu generaciju antikoagulanata i poseduje određeni stepen rezistentnosti na difenakum (Song i sar., 2011).

## **2.6 MOGUĆNOST SUZBIJANJA REZISTENTNIH JEDINKI DOMAĆEG MIŠA**

### **2.6.1 Plejotropni efekat *vkorc1* gena**

Osim razlike u sekvenci *vkorc1* gena, između osetljivih i rezistentnih jedinki utvrđene su razlike u raznim fiziološkim procesima. Osetljive jedinke nalaze se u biološkoj prednosti u odnosu na rezistentne jedinke (Greaves i Cullen-Ayres, 1988; Smith i sar., 1991; Heiberg i sar., 2003; Pelz i sar., 2005; Heiberg i sar., 2006; Kaneki i sar., 2006; Lasseuer i sar., 2007; Kohn i sar., 2008; Jacob i sar., 2012; Matagrín i sar., 2013).

Pored toga što utiče na ispoljavanje rezistentnosti, za polimorfizam *vkorc1* gena je ustanovljena i povezanost sa izmenjenom aktivnošću enzima čiju sintezu diktira ovaj gen, odnosno da se aktivnost enzima sa izmenjenom sekvencom razlikuje u odnosu na „divlji“ tip. Kao posledica plejotropnog efekta *vkorc1* gena rezistentne jedinke imaju prirodno smanjenu aktivnost VKOR-a (Pelz i sar., 2005). Lasseuer i sar. (2007) su utvrdili različite parametre za aktivnost enzima između osetljivih i rezistentnih jedinki za različite antikoagulantne rodenticide. Takođe, razlike u vrednostima parametara za enzimsku aktivnost rezistentnih jedinki za različite antikoagulanate direktno su ukazivale i na različite nivoe rezistentnosti na različite antikoagulanate kod jedinki sa istim tipom *vkorc1* varijante.

Polimorfizam *vkorc1* gena može uticati i na druge vitamin K zavisne reakcije u organizmu kao što su mineralizacija i arteriosklerotična kalcifikacija. Smanjena aktivnost VKOR-a može dovesti do smanjenja kostne gustine i sadržaja zbog smanjene sinteze osteokalcina, jednog od vitamin K zavisnih proteina koji ulazi u sastav kostiju (Song i sar., 2008).

Posledice nedostatka vitamina K se kod rezistentnih glodara mogu odraziti i preko smanjenog nivoa reprodukcije i zaostajanja u porastu, što ukazuje na evolutivnu prednost osetljivih jedinki (Smith i sar., 1991; Kaneki i sar., 2006; Jacob i sar., 2012;

Buckle i Prescottt, 2012). Rezultati do kojih su došli Jacob i sar. (2012) su potvrdili da smanjen nivo reprodukcije kod Tyr139Cys jedinki sivog pacova, za 20 % u odnosu na osetljive, nije posledica anomalija u građi genitalija zbog promena u *vkorc1* genu, već povećanih zahteva u vitaminu K kod jedinki rezistentnih na bromadiolon.

Razlike u potrebama za vitaminom K posebno su izražene između različitih genotipova, odnosno heterozigotnih i homozigotnih jedinki. Zbog drastično smanjene aktivnosti VKOR enzima homozigotne jedinke imaju zahteve u vitaminu K veće nego heterozigotne jedinke (Bishop i sar., 1977; Greaves i Cullen-Ayres, 1988; Jacob i sar., 2012). Ovakvi zahtevi imaju za posledicu izraženiju kalcifikaciju aorte (Kohn i sar., 2008), kao i manji reproduktivni potencijal homozigotnih jedinki (Heiberg i sar., 2006).

U prilog tvrdnji da i rezistentne jedinke mogu uginuti zbog pojave hemoragija zbog nedostatka vitamina K je i istraživanje koje su sprovedi Heiberg i sar. (2003) na rezistentnim jedinkama sivog pacova. U ovom istraživanju su kod jedinki koje su tokom 2 godine držane po principu poluotvorenih sistema i na koje nije primenjivan bromadiolon, ipak tokom trajanja testa zabeležena uginuća jedinki sa simptomima krvarenja usled nedostatka vitamina K. Takođe, primećeno je da se ovakva pojava češće dešava kod mlađih mužjaka nego kod ženki. Nivo rezistentnosti u datoj populaciji ostao je nepromenjen što su istraživači pokušali objasniti dostupnim alternativnim izvorima vitamina K u prirodi koji deluje kao antidot.

Isti istraživači smatrali su da bi se ograničavanjem izvora vitamina K moglo uticati na brojnost jedinki rezistentnih na bromadiolon zbog negativnog plejotropnog efekta *vkorc1* gena što za posledicu ima povećane potrebe u vitaminu K. Ipak, ishod ovakvih postupaka zavisio bi od većeg broja faktora kao što su uslovi sredine, tip rezistentnosti koji bi definisao visinu potreba u vitaminu K kod jedinki, kao i učestalost genotipa.

Zbog negativnih posledica plejotrofnog efekta *vkorc1* gena, rezistentne jedinke glodara su u prednosti u odnosu na osetljive samo u uslovima primene antikoagulantnih rodenticida na koje su te jedinke već razvile rezistentnost (Jacob i sar., 2012; RRAG, 2012).

## **2.6.2 Uvođenje novih antikoagulanata u praktičnu primenu**

S obzirom na štete koje jedinke domaćeg miša mogu naneti, njihovo suzbijanje se nameće kao neophodna mera koja se mora sprovesti. Razvojem rezistentnosti na

određeni rodenticid smanjuje se efikasnost suzbijanja. Dodatna opasnost zbog prisustva rezistentnih jedinki u prirodi javlja se zbog činjenice da ovakve jedinke predstavljaju veliku opasnost posmatrano i sa ekotoksikološkog stanovišta. Sadržaj rodenticida u rezistentnim jedinkama može biti i do 5 puta veći u odnosu na osetljive jedinke (MacVicker i sar., 2005). Takođe, količine primene neefikasnih antikoagulanata mogu biti i 10 puta veće nego što bi to bio slučaj sa antikoagulantima na koje nije razvijena rezistentnost. Dodatni problem je činjenica da rezistentne jedinke, koje u sebi nose ostatke antikoagulanata, višestruko duže preživljavaju nego što bi preživele tretman sa za njih efikasnim antikoagulantom i samim tim predstavljaju opasnost za druge ne ciljane organizme (Daniells i sar., 2011). Nema razlike između osetljivih i rezistentnih jedinki u načinu i stepenu akumulacije antikoagulanata, ali se rizik od sekundarnog trovanja povećava zbog izuzetno značajnih razlika u dužini preživljavanja između ove dve grupe jedinki (Berny i sar., 2011; Vein i sar., 2013).

Prvi korak nakon utvrđene rezistentnosti na neki antikoagulant jeste njegovo isključivanje iz primene i zamena sa drugim efikasnijim rodenticidima. U Nemačkoj se brodifakum, flokumafen i difetialon predlažu kao rešenje za suzbijanje populacija u kojima su prisutne neke od tri poznate VKOR varijante za koje se vezuje smanjena osetljivost domaćeg miša. Primena ovih antikoagulanata se preporučuje samo u oblastima gde je registrovana rezistentnost na bromadiolon i difenakum, kako bi se izbegao potencijalni rizik po ne ciljane vrste zbog velike toksičnosti ovih antikoagulanata (Esther i sar., 2014). Skorija istraživanja vezana za donošenja novih rešenja za suzbijanje Tyr139Cys jedinki, koje se povezuju sa visokim nivoom rezistentnosti na bromadiolon, sprovedena su samo na pacovima gde je utvrđeno da se ove jedinke mogu uspešno suzbiti uvođenjem difenakuma u primenu (Buckle i sar., 2012a). Takođe, brodifakum je ispoljio veću efikasnost od difenakuma u suzbijanju istih jedinki (Buckle i sar., 2012b). Komitet za rezistentnost na rodenticide (RRAC-Rodenticide Resistance Action Committee) dao je predlog da se brodifakum koristi za suzbijanje jedinki sivog pacova u populacijama koju čine nosioci Tyr139Cys varijante (RRAC, 2010).

Istraživanje Grandemange-a i sar. (2009) ukazalo je na činjenicu da primena antikoagulanata prve generacije u populacijama sa niskim stepenom rezistentnosti, odnosno koju karakteriše prisutnost heterozigotnih i eventualno manja zastupljenost

homozigotnih jedinki, može dovesti do značajnog povećanja učestalosti rezistentnih alela, odnosno prisustva homozigotnih jedinki.

Isključivanje antikoagulanata, na koji je rezistentnost već razvijena, iz primene ima veliki značaj za gubitak rezistentnih alela u populaciji. Zbog svih nedostataka koje rezistentne jedinke trpe u odnosu na osetljive kao posledica nedostataka vitamina K, osetljive jedinke mogu biti favorizovane u prirodi ukoliko ne bi bilo primene antikoagulanata na koje su jedinke već razvile rezistentnost. Broj homozigota bi se smanjivao u korist heterozigota, dok bi se broj heterozigota smanjivao usled gubljenja alela u osetljivim populacijama. Smatra se da bi period od 2 do 4 godine bio dovoljan da se izgube rezistentni aleli ukoliko bi se isključila primena antikoagulantnih rodenticida. Ovo naročito važi za početak pojave rezistentnosti s obzirom da su početni stadijumi uvek odražavaju preko pojave heterozigota (Greaves, 1994).

Međutim, potpuno isključivanje antikoagulanata na ovako dug period uglavnom nije ekonomski prihvatljivo. Takođe, neprimenjivanje antikoagulanata u smislu očekivanog „oporavka“ populacije odnosno gubitka rezistentnih alela u nekim istraživanjima nije dalo očekivane rezultate jer je i nakon 2 godine neprimenjivanja bromadiolona nivo rezistentnosti u populaciji sivog pacova bio isti (Heiberg i sar., 2003). U prilog tome su i rezultati istraživača Heiberg-a i sar. (2006) koji ukazuju da heterozigotne ženke imaju veći reproduktivni potencijal od homozigotnih u situacijama kada antikoagulant nije bio primenjivan.

Do gubitka rezistentnih alela može doći ali u primenu treba uvesti neki drugi efikasniji antikoagulant s obzirom da heterozigotne jedinke nemaju negativne biološke posledice kao što je slučaj sa homozigotima u situacijama odsustva antikoagulanata (Endepols i sar., 2013).

### **2.6.3 Potencijalni faktori uticaja na efikasnost antikoagulanata**

Glavni uzrok kojim se objašnjava neefikasnost nekog antikoagulanata na terenu jeste postojanje rezistentnih jedinki glodara (Rowe i sar., 1981; Endepols i sar., 2011; Buckle i sar., 2012a, 2012b; Endepols i sar., 2013). Međutim, razlog smanjene efikasnosti nekog antikoagulanata na terenu nije uvek prisustvo rezistentnih jedinki. Više činilaca može objasniti neefikasnost nekog antikoagulanata na terenu iako je njegova efikasnost u laboratorijskim testovima zadovoljavajuća. Greške prilikom izvođenja deratizacije su

jedan od čestih uzroka neuspeha tokom suzbijanja štetnih glodara. Kratak period izlaganja mamaca, mali broj kutija u kojima se vrši izlaganje mamca, pogrešno procenjena oblast u kojoj će se sprovesti suzbijanje, nedovoljno atraktivan mamac, kontaminacija mamca od strane insekata ili mikroorganizama koji mogu smanjiti atraktivnost, vrlo nepovoljno utiču na efikasnost suzbijanja (Timm, 1991, 1994).

Imigracija novih jedinki kao i prisustvo alternativnih izvora hrane i samo ponašanje jedinki tokom ishrane dodatno utiču na nespeh u izvođenju deratizacije (Humphries i sar., 1992; Quy i sar., 1992; Humphries i sar., 2000; Clapperton, 2006; Buckle i sar., 2012a, 2012b; Espinosa, 2013).

Uzimajući u obzir da se vitamin K ( $K_1$  i  $K_2$ ) može naći u povrću tj. zelenim delovima biljaka, mlečnim proizvodima, mesu, jajima i da je domaći miš omnivorna vrsta, vrlo je moguće da jedinke u isto vreme unose i antikoagulant i antidot. Takođe, iako je antikoagulant primenjen jedinke mogu izbegavati njegovu ingestiju ukoliko su prisutni alternativni i atraktivniji izvori hrane što je u skladišnim objektima čest slučaj (Damon i sar., 2005).

Neefikasnost antikoagulantnih rodenticida koja predstavlja posledicu izmenjenog ponašanja jedinki do sada je kod glodara registrovana jedino kod domaćeg miša. U nekim populacijama domaćeg miša je ustanovljen problem sa konzumiranjem mamaca na bazi žitarica jer, usled smanjenog nivoa ili nedostatka enzima alfa amilaze u digestivnom traktu, nisu mogli da svare hranu na bazi žitarica. Ovaj fiziološki problem je nasledan i s obzirom na brzinu razmnožavanja kućnog miša vrlo brzo se širi unutar populacije. U ovom slučaju glodari su osetljivi na antikoagulate ali preživljavaju zahvaljujući izmenama u njihovom ponašanju za razliku od rezistentnih glodara koji konzumiraju mamce sa antikoagulantima ali ne uginjavaju (Humphries i sar., 1992, 2000).



### **3 MATERIJAL I METODE**

#### **3.1 LOKALITETI I IZLOVLJAVANJE JEDINKI**

Divlje jedinke koje su korišćene u eksperimentima<sup>1</sup> izlovljavane su u skladištima na lokalitetima Surčin, Zemun Polje, Stara Pazova, Uljma, Bački Jarak, Barajevo i Smederevska Palanka. Takođe, u oglede su uključivane jedinke domaćeg miša koje su po poreklu bile potomci divljih jedinki dobijeni u laboratorijskim uslovima.

Jedinke domaćeg miša su izlovljavane u skladištima u kojima je suzbijanje glodara proteklih godina vršeno rodenticidima. Najintenzivnija primena rodenticida bila je na lokalitetima Surčin, Zemun Polje i Smederevska Palanka, s obzirom da se na ovim lokalitetima skladišti i priprema semenski materijal i stočna hrana tokom cele godine u većem ili manjem obimu. Na lokalitetima Stara Pazova, Uljma i Bački Jarak, takođe su za suzbijanje glodara primenjivani rodenticidi, ali u manjoj meri s obzirom da skladišni materijal nije bio prisutan konstantno u toku godine. Izlovljavanje jedinki na lokalitetu Barajevo vršeno je na privatnom gazdinstvu na kome nikada ranije nije primenjivan bilo koji rodenticid.

Primena rodenticida uglavnom je vršena bez prethodne kontrole brojnosti glodara i bez kontrole konzumacije primenjenih mamaca. Najčešće primenjenjivani rodenticidi bili su antikoagulant, prvenstveno bromadiolon. U svim objektima u kojima je korišćen bromadiolon primećena je njegova značajno smanjena efikasnost tokom suzbijanja domaćeg miša.

Jedinke domaćeg miša izlovljene su u objektima za pripremu i skladištenje stočne hrane, semenskog materijala kao i u objektima za proizvodnju i skladištenje prehrambenih proizvoda (tabela 2). Izlovljavanje je sprovedeno u periodima mart-april i septembar-oktobar. Za izlovljavanje su korišćene klopke živolovke Longworth. U klopke je postavljan mamac pripremljen od pržene slanine, luka i hleba prema Vukićević-Radić i sar. (2005). Klopke živolovke postavljane su u svim objektima gde su primećeni tragovi prisustva domaćeg miša kao što su feces, miris urina, tragovi stopala ali i oštećenja na uskladištenim proizvodima ili na samom objektu. Klopke

---

<sup>1</sup> Svi eksperimenti sprovedeni su u skladu sa etičkim principima koje je usvojila Etička komisija pri Institutu za biološka istraživanja "Siniša Stanković" (broj protokola: 9-04/2013).

životlovke su postavljane uz ivice zidova, na razmaku od približno 5 m. Na svakom lokalitetu izlovljavanje je sprovedeno u periodu od 4 uzastopna dana. Klopke su proveravane dva puta u toku dana.

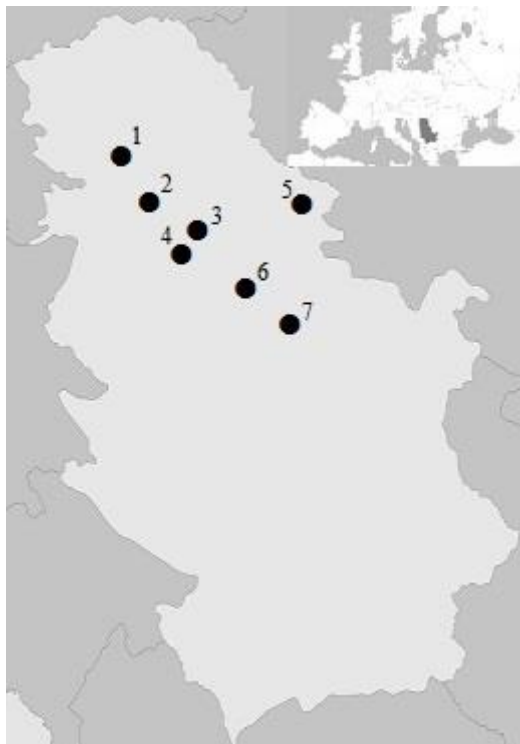
Tabela 2. Osnovni podaci o lokalitetima na kojima je vršeno izlovljavanje

| Lokalitet              | Koordinate      | Izlovljavanje                   | Skladišteni materijal                     |
|------------------------|-----------------|---------------------------------|-------------------------------------------|
| Surčin                 | 44°50'N 20°17'E | Mart-april<br>Septembar-oktobar | Stočna hrana                              |
| Zemun<br>Polje         | 44°52'N 20°20'E | Mart-april<br>Septembar-oktobar | Semenski material<br>(kukuruz)            |
| Stara<br>Pazova        | 44°59'N 20°08'E | Mart-april<br>Septembar-oktobar | Prehrambeni<br>proizvodi                  |
| Uljma                  | 45°03'N 21°09'E | Septembar-oktobar               | Semenski material<br>(pšenica)            |
| Bački<br>Jarak         | 45°15'N 19°51'E | Septembar-oktobar               | Uljane kulture<br>(suncokret)             |
| Barajevo               | 44°36'N 20°26'E | Septembar-oktobar               | Ratarske i<br>povrtarske kulture          |
| Smederevska<br>Palanka | 44°21'N 20°57'E | April                           | Semenski material<br>(povrtarske kulture) |

Svi objekti u kojima je vršeno izlovljavanje jedinki domaćeg miša bili su okruženi oranicama i pašnjacima koji obiluju alternativnim izvorima hrane pružajući pogodne uslove za održavanje i širenje populacije ovog glodara.

Sa svakog lokaliteta u laboratoriju je odnešeno po 20 adultnih jedinki (10 mužjaka i 10 ženki). Uhvaćene jedinke za koje se sumnjalo da su gravidne, bolesne ili nisu bile polno

zrele nisu odnošene u laboratoriju. Takođe, u laboratoriju nisu odnošene jedinke koje su pokazivale znakove stresa (drhtanje, slaba pokretljivost).



Slika 3. Lokaliteti na kojima je vršeno izlovljavanje jedinki domaćeg miša (1-Bački Jarak; 2-Stara Pazova; 3-Zemun Polje; 4-Surčin; 5-Uljma; 6-Barajevo; 7-Smederevska Palanka)



Slika 4. Klopka živolovka Longworth

### 3.2 ČUVANJE I AKLIMATIZACIJA JEDINKI

Pre početka eksperimenta svih 140 divljih jedinki domaćeg miša prilagođavane su laboratorijskim uslovima tokom perioda aklimatizacije u trajanju od 21 dan. Jedinke su čuvane pojedinačno u standardnim plastičnim kavezima dimenzija 320·200·135 mm pod kontrolisanim laboratorijskim uslovima: sobna temperatura  $20\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , relativna vlažnost od 40 % do 70 % i dvanaestočasovni režim svetlosti (12 h svetlo/tama). Tokom perioda aklimatizacije jedinke su hranjene laboratorijskom hranom za miševe (proizvođač Veterinarski zavod Subotica). Voda je bila dostupna *ad libitum*. Takođe, u periodu nakon tretiranja antikoagulantima su sve preživjele jedinke vraćene na isti režim čuvanja kao i tokom perioda aklimatizacije.

Pod istim laboratorijskim uslovima čuvane su i jedinke  $F_1$  generacije. Ove jedinke dobijene su ukrštanjem divljih jedinki domaćeg miša koje su preživjele test hranjenja bromadiolonom. Sparivanje preživjelih divljih jedinki vršeno je isključivo između jedinki poreklom sa istog lokaliteta. Iz ukupno sedam okota dobijeno je 26 jedinki  $F_1$  generacije od kojih su devet jedinki (tri ženke i šest mužjaka) predstavljale potomke preživjelih jedinki sa lokaliteta Surčin i 17 jedinki (devet ženki i osam mužjaka) koje su bile potomci jedinki iz Zemun Polja. Sve jedinke  $F_1$  generacije, starosti tri meseca, uključivane su u ogledе sa bromadiolonom po istoj eksperimentalnoj šemi kao i njihovi roditelji.



Slika 5. Održavanje domaćeg miša tokom perioda aklimatizacije

Takođe, jedinke preživjele test hranjenja bromadiolonom ukrštane su u svrhu dobijanja potomstva sa smanjenom osetljivošću na bromadiolon s ciljem utvrđivanja osetljivosti

na difenakum i brodifakum. Za potrebe ovih ogleda nakon većeg broja ukrštanja tri rezistentna mužjaka i šest rezistentnih ženki tokom perioda od godinu dana dobijeno je 65 jedinki  $F_1$  generacije. Sa tri meseca starosti ove jedinke su uključivane u testove hranjenja bromadiolonom nakon kojih su dobijene 24 jedinke sa smanjenom osetljivošću na bromadiolon koje su dalje uključivane u ogleda sa difenakumom i brodifakumom u cilju ispitivanja ukrštene rezistentnosti na ove antikoagulate.



Slika 6. Jedinke  $F_1$  generacije starosti od 7 i 14 dana

### 3.3 KORIŠĆENI MAMCI

Svi mamci pripremani su u skladu sa metodom EPPO standarda (2004a). Placebo mamci dobijenu su mešanjem usitnjenog pšeničnog zrna, kukuruznog ulja i pšeničnog brašna u odnosu 90:5:5.

Mamci na bazi bromadiolona, difenakuma i brodifakuma dobijeni su po istom principu kao i placebo mamci uz dodavanje odgovarajuće količine aktivne supstance rodenticida do sadržaja u mamcima od 0,005 %. Za pripremanje mamaca korišćeni su tečni koncentraciji aktivnih supstanci proizvođača Duochem.

Svi mamci pripremljeni su u Laboratoriji za primenjenu zoologiju, a sadržaj aktivne supstance proveren je u Laboratoriji za primenjenu hemiju Instituta za pesticide i zaštitu životne sredine.

### 3.4 UTVRĐIVANJE OSETLJIVOSTI DOMAĆEG MIŠA NA BROMADIOLON

Utvrdjivanje osetljivosti domaćeg miša na bromadiolon izvedeno je prema metodama EPPO standarda (2004b) i Guidobono-a i sar. (2010). Jedinke domaćeg miša nakon



perioda aklimatizacije prvo su izlagane placebo mamcima u trajanju od četiri dana. Placebo mamcima izlagane su sve divlje jedinke. Jedinke F<sub>1</sub> generacije nisu izlagane placebo mamcima neposredno pred izlaganje antikoagulantima jer su tokom odgajanja bile podvrgnute procesu privikavanja na način izlaganja mamca. U test hranjenja je uključivano po 20 divljih adultnih jedinki (10 mužjaka i 10 ženki) sa svakog lokaliteta.

Nakon četvorodnevnog hranjenja placebo mamcima, divljim jedinkama je ponuđen mamac sa 0,005 % bromadiolona u testu hranjenja bez izbora hrane u trajanju od 21 dan. Tokom testa praćen je dnevni unos mamca. Svakodnevno je jedinkama ponuđen svež mamac u čistim čašicama. Voda je bila dostupna *ad libitum*. Pored konzumacije mamca svakodnevno su praćeni simptomi trovanja antikoagulantima. Kod svih uginulih jedinki vršena je autopsija kako bi se utvrdilo da li su prisutni simptomi trovanja antikoagulantima prema Kataranovski i sar. (1980).

Tokom trajanja testa sve jedinke su držane pojedinačno u kavezima. Kontrolisani parametri (temperatura, vlažnost i svetlost) održavani su u laboratoriji kao i tokom perioda aklimatizacije.



Slika 7. Kavezi u kojima su jedinke domaćeg miša izlagane mamcima antikoagulanata

Po završetku testa hranjenja preživjele jedinke su vraćene na normalan režim ishrane uz

stalno praćenje pojave simptoma trovanja antikoagulantima tokom perioda opservacije u trajanju od 21 dan. Jedinke domaćeg miša koje prežive test hranjenja antikoagulantima bez izbora hrane u trajanju od 21 dan i dodatni opservacijski period u istom trajanju, smatraju se rezistentnim jedinkama. Ista šema eksperimenta primenjena je i na jedinke F<sub>1</sub> generacije preživelih divljih jedinki.

Prema metodi EPPO standarda (2004a) da bi antikoagulant bio efikasan na sve jedinke u jednoj populaciji, u testovima sa divljim jedinkama se uključuju jedinke različite telesne mase. Početna telesna masa divljih jedinki bila je u intervalu od 10,4 g do 22,9 g, dok je interval telesne mase jedinki F<sub>1</sub> generacije bio od 11,0 g do 18,3 g. Svim jedinkama, osim početne telesne mase, zabeležena je i telesna masa na kraju testa. Promena telesne mase utvrđivana je prema metodi Guidobono-a i sar. (2010).

### 3.5 UTVRĐIVANJE PRISUSTVA MUTACIJA U *VKORC1* GENU

Za ekstrakciju DNK korišćeni su delovi ušne školjke. Uzorci za DNK analizu uzimani su sa uginulih jedinki koje su prethodno čuvane na -70 °C. Uzeti uzorci ušne školjke do same analize čuvani su u 80 % rastvoru alkohola. Ukupno su analizirana 33 uzorka (9 divljih i 24 jedinke F<sub>1</sub> generacije). U tabeli 3 dat je prikaz uzoraka koji su analizirani.

Tabela 3. Opis uzoraka za ekstrakciju DNK i sekvencioniranje *vkorc1* gena

| Rezistentne               |        |   |             |   | Osetljive |   |             |   |
|---------------------------|--------|---|-------------|---|-----------|---|-------------|---|
| Divlje jedinke            |        |   |             |   |           |   |             |   |
| Lokalitet                 | Surčin |   | Zemun Polje |   | Surčin    |   | Zemun Polje |   |
| Pol                       | ♂      | ♀ | ♂           | ♀ | ♂         | ♀ | ♂           | ♀ |
| Broj uzoraka              | 1      | 2 | 2           | 4 | -         | - | -           | - |
| F <sub>1</sub> generacija |        |   |             |   |           |   |             |   |
| Lokalitet                 | Surčin |   | Zemun Polje |   | Surčin    |   | Zemun Polje |   |
| Pol                       | ♂      | ♀ | ♂           | ♀ | ♂         | ♀ | ♂           | ♀ |
| Broj uzoraka              | 3      | 1 | -           | 4 | 3         | 1 | 8           | 4 |

Ekstrakcija DNK urađena je u Julius Kühn Institute, Vertebrate Research (Munster, Nemačka) po protokolu za Puregene Core Kit A (Qiagen). Sekvencioniranje tri egzona *vkorc1* gena urađeno je u Nemačkoj kompaniji GATC po metodi Pelz-a i sar. (2012)

prema kojoj su promene u sekvenci *vkorc1* gena utvrđivane na osnovu poređenja sa sekvencom NM\_178 600 koja je uzeta kao divlji tip iz banke gena. Očitavanja sekvenci vršena su pomoću automatskog aparata Beckman Coulter CEQ8000.

Sve jedinke domaćeg miša čiji su uzorci uzeti za analizu su prethodno bile uključene u testove hranjenja bromadiolonom, odnosno fenotipski status tj. osetljivost na bromadiolon kod svih analiziranih jedinki bio je poznat pre molekularnih analiza.

Sekvencioniranje sva tri egzona *vkorc1* gena urađeno je s ciljem utvrđivanja prisustva nekih od već poznatih VKOR varijanti u egzonu 3 ovog gena, koje se smatraju razlogom pojave rezistentnosti kod domaćeg miša, kao i eventualno prisustvo do sada neutvrđenih promena u sekvenci *vkorc1* gena kod domaćeg miša.

### **3.6 UTVRĐIVANJE OSETLJIVOSTI DOMAĆEG MIŠA NA DIFENAKUM**

Utvrdjivanje osetljivosti domaćeg miša na difenakum rađeno je prema metodama EPPO standarda (2004b) i Rowe-a i sar. (1981) prema kojima su jedinke domaćeg miša izlagane difenakum mamcima u testu hranjenja u trajanju od 21 dan bez izbora hrane. U oglede su uključivane isključivo jedinke koje su prethodno preživele testove hranjenja bromadiolonom u trajanju od 21 dan s ciljem utvrđivanja prisustva ukrštene rezistentnosti. Vremenski period između tretmana bromadiolonom i difenakumom bio je sedam meseci, čime su zadovoljene preporuke EPPO standarda (2004b) o minimalnom vremenskom periodu od 21 dan koji je potreban da bi se uspostavila normalna koagulacija krvi između dva tretmana antikoagulantima.

U test hranjenja uključeno je 20 adultnih jedinki (9 mužjaka i 11 ženki) od kojih je za 16 jedinki bila poznata sekvenca *vkorc1* gena. Svakodnevno je jedinkama ponuđen svež difenakum mamac (0,005 %) u čistim čašicama. Tokom testa praćen je dnevni unos mamca. Način izlaganja mamca bio je isti kao i tokom testa hranjenja bromadiolon mamcima. Voda je bila dostupna *ad libitum*. Na početku i na kraju testa zabeležena je telesna masa svih jedinki. Promena telesne mase utvrđivana je prema metodi Guidobono-a i sar. (2010).

Sve jedinke su držane pojedinačno u kavezima tokom trajanja testa hranjenja. Kontrolisani laboratorijski parametri (temperatura, vlažnost i svetlost) održavani su kao i tokom perioda aklimatizacije. Nakon 21 dan testa hranjenja, preživele jedinke se



vraćaju na normalan režim ishrane uz stalno praćenje pojave simptoma trovanja antikoagulantima tokom perioda opservacije u trajanju od 21 dan.

### **3.7 ISPITIVANJE OSETLJIVOSTI DOMAĆEG MIŠA NA BRODIFAKUM**

Ispitivanje osetljivosti jedinki domaćeg miša na brodifakum urađeno je prema metodama EPPO standarda (2004b) i Redfern-a i sar. (1976). Jedinke su izlagane mamcima sa 0,005 % aktivne supstance u trajanju od jedan i dva dana. U ogledu su uključivane isključivo jedinke koje su prethodno preživele test hranjenja bromadiolonom u trajanju od 21 dan s ciljem utvrđivanja osetljivosti ovakvih jedinki na mamce sa sadržajem brodifakuma od 0,005 %. Vremenski period između tretmana bromadiolonom i brodifakumom bio je sedam meseci.

U periodima od 24 i 48 sati jedinke su bile izlagane mamcima sa brodifakumom u testu bez izbora hrane. U oba ogleda uključeno je po 10 adultnih jedinki (5 mužjaka i 5 ženki). Jedinkama je u plastičnim čašicama bio ponuđen mamac sa brodifakumom bez izbora hrane. Voda je bila dostupna *ad libitum*.

Kao i tokom ogleda sa bromadiolonom i difenakumom, sve jedinke su držane pojedinačno u kavezima tokom trajanja testa hranjenja. Kontrolisani laboratorijski parametri (temperatura, vlažnost i svetlost) održavani su kao i tokom perioda aklimatizacije.

Nakon isteka 24 sata, odnosno 48 sati jedinke su vraćane na normalan režim ishrane uz kontrolisane laboratorijske uslove i stalno praćenje pojave simptoma trovanja tokom perioda opservacije od 21 dan.

### **3.8 OBRADA PODATAKA**

Vreme preživljavanja između različitih grupa jedinki domaćeg miša poređena su korišćenjem Log-rank testa (Survival analysis). Nivo značajnosti bio je  $p < 0,05$ .

Vrednosti ukupne i prosečne konzumacije izračunate su za ceo period hranjenja za svaku jedinku pojedinačno prema sledećim formulama:

Ukupna konzumacija = suma konzumacije mamca tokom celog perioda hranjenja (g)/početna masa (g)

Prosečna konzumacija = prosečna konzumacija mamca tokom celog perioda hranjenja (g)/početna masa (g)

Za utvrđivanje uticaja različitih faktora na ukupnu konzumaciju mamca sa antikoagulantima, kao i za prosečnu konzumaciju mamca za sve jedinke iz testa hranjenja korišćen je Studentov t-test i faktorijalna analiza varijanse (ANOVA). Daljom post hoc analizom poređenja su vršena korišćenjem Tukey HSD testa. Nivo značajnosti za sva poređenja bio je  $p < 0,05$ .

Promena telesne mase (tm) u procentima izračunata je za svaku jedinku pojedinačno prema formuli koju su dali Guidobono i sar. (2010):  $[(\text{početna telesna masa} - \text{krajnja telesna masa}) / \text{početna telesna masa}] \times 100$ . Za podatke o telesnoj masi koji nisu imali normalnu raspodelu i nakon logaritamske transformacije, za statističku obradu su korišćeni neparametrijski testovi (Manh-Whitney U test i Kruskal Wallis test).

Dobijeni podaci su obrađeni prema uputstvima Sokal i Rohlf-a (1995) i pomoću softverskog paketa Statistika for Windows 6.0 (Stat Soft Italia, 1997).

Iste slovne oznake na box plot graficima koji su korišćeni za grafički prikaz rezultata (centralna linija box plot grafika predstavlja medijanu, dok donja i gornja linija predstavljaju vrednosti  $Q_1$ - prvih 25 % podataka od ostalih većih u nizu i  $Q_3$ - prvih 75 % podataka u nizu; srednja vrednost-  $\bar{x}$ ; minimum-  $\perp$ ; maksimum-  $\top$ ) označavaju sličnosti u Tukey testu. U pojedinim graficima nedostaju slovne oznake iz razloga što su grupe, u kojima nije bio dovoljan broj jedinki, bile isključene iz statističke analize.

## 4 REZULTATI

### 4.1 OSETLJIVOST DOMAĆEG MIŠA NA BROMADIOLON

#### 4.1.1 Konzumacija placebo mamca

Tokom četvorodnevno testu hranjenja mužjaci su ukupno pojeli 890 g, dok su ženke pojele 807,9 g placebo mamca. Prosečne vrednosti konzumacije za mužjake i ženke iznosile su  $12,76 \pm 2,52$  g i  $11,68 \pm 2,11$  g. Konzumacija placebo mamca kod mužjaka na svim lokalitetima, izuzev jedinki izlovljenih na lokalitetu Bački Jarak, bila je veća u odnosu na ženke (tabela 8).

Između mužjaka i ženki utvrđene su statistički značajne razlike u ukupnoj konzumaciji placebo mamaca ( $t=2,75$ ;  $df=138$ ;  $p<0,0066$ ). U tabelama je prikazana konzumacija placebo mamca tokom četiri dana i bromadiolon mamca prvog dana testa za svaku jedinku pojedinačno.

Tabela 4. Konzumacija placebo mamca (g) tokom četvorodnevno testu hranjenja za divlje mužjake i ženke domaćeg miša sa lokaliteta Surčin

| Mužjaci         |                     |               |          | Ženke           |                     |               |          |
|-----------------|---------------------|---------------|----------|-----------------|---------------------|---------------|----------|
| Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan | Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan |
| 1               | 14,0                | 2,8           | 3,8      | 3               | 12,0                | 2,4           | 3,2      |
| 2               | 13,5                | 2,7           | 3,6      | 7               | 11,4                | 2,3           | 2,8      |
| 4               | 13,1                | 2,6           | 3,5      | 9               | 11,9                | 2,4           | 3,1      |
| 8               | 14,2                | 2,8           | 4,7      | 12              | 12,9                | 2,6           | 3,5      |
| 10              | 13,2                | 2,6           | 3,6      | 19              | 12,2                | 2,4           | 3,0      |
| 13              | 12,5                | 2,5           | 3,5      | 51              | 8,3                 | 1,7           | 2,3      |
| 17              | 14,0                | 2,8           | 3,4      | 53              | 13,6                | 2,7           | 3,8      |
| 18              | 12,4                | 2,5           | 3,2      | 54              | 11,9                | 2,4           | 3,0      |
| 50              | 14,2                | 2,8           | 3,8      | 55              | 9,7                 | 1,9           | 2,5      |
| 59              | 14,6                | 2,9           | 4,9      | 92              | 12,3                | 2,5           | 2,9      |
| Ms              | 13,6                | 2,7           | 3,8      | Ms              | 11,6                | 2,3           | 3,0      |
| Sd              | 0,7                 | 0,1           | 0,5      | Sd              | 1,5                 | 0,3           | 0,4      |

Tabela 5. Konzumacija placebo mamca (g) tokom četvorodnevnog testa hranjenja za divlje mužjake i ženke domaćeg miša sa lokaliteta Zemun Polje

| Mužjaci         |                     |               |          | Ženke           |                     |               |          |
|-----------------|---------------------|---------------|----------|-----------------|---------------------|---------------|----------|
| Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan | Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan |
| 25              | 13,4                | 2,7           | 3,5      | 26-1            | 8,8                 | 1,8           | 2,1      |
| 26-2            | 12,6                | 2,5           | 3,2      | 28              | 10,5                | 2,1           | 2,7      |
| 26-3            | 11,8                | 2,4           | 2,9      | 39              | 12,3                | 2,5           | 3,0      |
| 26-4            | 8,5                 | 1,7           | 2,1      | 40              | 14,4                | 2,9           | 3,7      |
| 32              | 13,6                | 2,7           | 3,5      | 44              | 11,2                | 2,2           | 2,9      |
| 36              | 14,1                | 2,8           | 3,8      | 58              | 13,2                | 2,6           | 3,3      |
| 38              | 12,0                | 2,4           | 3,0      | 86              | 12,7                | 2,5           | 3,2      |
| 57              | 14,0                | 2,8           | 3,5      | 87              | 8,8                 | 1,8           | 2,5      |
| 90-4            | 11,6                | 2,3           | 2,8      | 88              | 14,6                | 2,9           | 3,9      |
| 91              | 15,6                | 3,1           | 3,9      | 89              | 11,0                | 2,2           | 2,7      |
| Ms              | 12,7                | 2,5           | 3,2      | Ms              | 11,7                | 2,3           | 3,0      |
| Sd              | 1,9                 | 0,4           | 0,5      | Sd              | 2,1                 | 0,4           | 0,5      |

Tabela 6. Konzumacija placebo mamca (g) tokom četvorodnevnog testa hranjenja za divlje mužjake i ženke domaćeg miša sa lokaliteta Stara Pazova

| Mužjaci         |                     |               |          | Ženke           |                     |               |          |
|-----------------|---------------------|---------------|----------|-----------------|---------------------|---------------|----------|
| Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan | Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan |
| 20              | 12,6                | 2,5           | 3,0      | 14              | 12,7                | 2,5           | 3,2      |
| 21-2            | 14,2                | 2,8           | 4,0      | 15              | 12,0                | 2,4           | 2,8      |
| 21-4            | 16,3                | 3,3           | 5,2      | 21              | 14,0                | 2,8           | 3,7      |
| 21-6            | 16,4                | 3,3           | 4,2      | 21-1            | 12,7                | 2,5           | 3,5      |
| 21-7            | 16,2                | 3,2           | 4,3      | 21-3            | 15,6                | 3,1           | 4,2      |
| 23-1            | 15,8                | 3,2           | 4,5      | 21-5            | 16,6                | 3,3           | 4,8      |
| 23-2            | 16,5                | 3,3           | 4,8      | 22              | 12,9                | 2,6           | 3,3      |
| 23-5            | 16,0                | 3,2           | 4,2      | 23              | 12,0                | 2,4           | 3,0      |
| 23-7            | 15,6                | 3,1           | 4,0      | 23-3            | 13,6                | 2,7           | 3,7      |
| 23-8            | 13,8                | 2,8           | 3,6      | 23-4            | 16,7                | 3,3           | 4,9      |
| Ms              | 15,3                | 3,1           | 4,2      | Ms              | 13,9                | 2,8           | 3,7      |
| Sd              | 1,3                 | 0,3           | 0,6      | Sd              | 1,8                 | 0,3           | 0,7      |

Tabela 7. Konzumacija placebo mamca (g) tokom četvorodnevnog testa hranjenja za divlje mužjake i ženke domaćeg miša sa lokaliteta Uljma

| Mužjaci         |                     |               |          | Ženke           |                     |               |          |
|-----------------|---------------------|---------------|----------|-----------------|---------------------|---------------|----------|
| Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan | Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan |
| 67              | 12,9                | 2,6           | 3,4      | 68              | 13,4                | 2,7           | 3,5      |
| 73              | 12,5                | 2,5           | 3,2      | 69              | 14,0                | 2,8           | 4,0      |
| 78-1            | 16,7                | 3,3           | 4,5      | 70              | 12,5                | 2,5           | 3,4      |
| 78-2            | 13,3                | 2,7           | 3,9      | 74              | 12,5                | 2,5           | 3,4      |
| 78-3            | 15,8                | 3,2           | 4,4      | 75              | 11,9                | 2,4           | 3,1      |
| 79              | 15,6                | 3,1           | 4,2      | 76              | 8,3                 | 1,7           | 1,9      |
| 81              | 14,1                | 2,8           | 3,7      | 77              | 16,7                | 3,3           | 4,7      |
| 83              | 16,0                | 3,2           | 4,4      | 78              | 13,4                | 2,7           | 3,6      |
| 84              | 16,5                | 3,3           | 4,1      | 78-4            | 11,8                | 2,4           | 3,2      |
| 85              | 15,9                | 3,2           | 4,3      | 78-5            | 13,0                | 2,6           | 3,7      |
| Ms              | 14,9                | 3,0           | 4,0      | Ms              | 12,7                | 2,6           | 3,4      |
| Sd              | 1,6                 | 0,3           | 0,4      | Sd              | 2,1                 | 0,4           | 0,7      |

Tabela 8. Konzumacija placebo mamca (g) tokom četvorodnevnog testa hranjenja za divlje mužjake i ženke domaćeg miša sa lokaliteta Bački Jarak

| Mužjaci         |                     |               |          | Ženke           |                     |               |          |
|-----------------|---------------------|---------------|----------|-----------------|---------------------|---------------|----------|
| Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan | Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan |
| 98              | 8,5                 | 1,7           | 2,9      | 108             | 8,1                 | 1,6           | 1,9      |
| 99              | 10,5                | 2,1           | 3,0      | 109             | 7,9                 | 1,6           | 2,4      |
| 100             | 12,2                | 2,4           | 3,3      | 110             | 11,2                | 2,2           | 2,3      |
| 101             | 7,5                 | 1,5           | 1,6      | 111             | 11,7                | 2,3           | 3,1      |
| 102             | 8,0                 | 1,6           | 2,2      | 112             | 9,1                 | 1,8           | 2,9      |
| 103             | 11,8                | 2,4           | 3,1      | 113             | 8,2                 | 1,6           | 2,3      |
| 104             | 11,8                | 2,4           | 3,0      | 114             | 12,0                | 2,4           | 3,2      |
| 105             | 6,7                 | 1,3           | 2,0      | 115             | 9,1                 | 1,8           | 2,9      |
| 106             | 7,2                 | 1,4           | 2,3      | 116             | 11,4                | 2,3           | 3,0      |
| 107             | 8,2                 | 1,6           | 2,3      | 117             | 12,3                | 2,5           | 3,4      |
| Ms              | 9,2                 | 1,8           | 2,6      | Ms              | 10,1                | 2,0           | 2,7      |
| Sd              | 2,1                 | 0,4           | 0,6      | Sd              | 1,8                 | 0,4           | 0,5      |

Tabela 9. Konzumacija placebo mamca (g) tokom četvorodnevnog testa hranjenja za divlje mužjake i ženke domaćeg miša sa lokaliteta Barajevo

| Mužjaci         |                     |               |          | Ženke           |                     |               |          |
|-----------------|---------------------|---------------|----------|-----------------|---------------------|---------------|----------|
| Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan | Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan |
| 201             | 12,3                | 2,5           | 3,0      | 211             | 11,2                | 2,2           | 2,8      |
| 202             | 12,5                | 2,5           | 3,3      | 212             | 12,0                | 2,4           | 3,0      |
| 203             | 13,4                | 2,7           | 4,1      | 213             | 9,9                 | 2,0           | 3,1      |
| 204             | 13,6                | 2,7           | 3,8      | 214             | 11,0                | 2,2           | 3,3      |
| 205             | 10,9                | 2,2           | 3,0      | 215             | 9,2                 | 1,8           | 2,9      |
| 206             | 14,2                | 2,8           | 4,1      | 216             | 11,1                | 2,2           | 3,0      |
| 207             | 13,6                | 2,7           | 4,1      | 217             | 13,1                | 2,6           | 3,7      |
| 208             | 13,0                | 2,6           | 3,9      | 218             | 12,8                | 2,6           | 3,4      |
| 209             | 12,4                | 2,5           | 3,8      | 219             | 8,7                 | 1,7           | 2,9      |
| 210             | 13,3                | 2,7           | 3,3      | 220             | 13,3                | 2,7           | 3,7      |
| Ms              | 12,9                | 2,6           | 3,6      | Ms              | 11,2                | 2,2           | 3,2      |
| Sd              | 0,9                 | 0,2           | 0,4      | Sd              | 1,6                 | 0,3           | 0,3      |

Tabela 10. Konzumacija placebo mamca (g) tokom četvorodnevnog testa hranjenja za divlje mužjake i ženke domaćeg miša sa lokaliteta Smederevska Palanka

| Mužjaci         |                     |               |          | Ženke           |                     |               |          |
|-----------------|---------------------|---------------|----------|-----------------|---------------------|---------------|----------|
| Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan | Jedinka (šifra) | Ukupno ( $\Sigma$ ) | $\Sigma$ 20 % | Prvi dan |
| 303             | 8,1                 | 1,6           | 2,9      | 301             | 8,9                 | 1,8           | 2,7      |
| 304             | 9,4                 | 1,9           | 3,3      | 302             | 8,3                 | 1,7           | 2,8      |
| 305             | 8,7                 | 1,7           | 2,9      | 306             | 12,2                | 2,4           | 3,3      |
| 309             | 12,4                | 2,5           | 3,2      | 307             | 9,8                 | 2,0           | 3,0      |
| 310             | 12,5                | 2,5           | 3,3      | 308             | 10,1                | 2,0           | 3,0      |
| 311             | 9,7                 | 1,9           | 2,8      | 312             | 10,9                | 2,2           | 4,0      |
| 314             | 10,6                | 2,1           | 3,3      | 313             | 12,6                | 2,5           | 3,3      |
| 315             | 10,6                | 2,1           | 2,9      | 316             | 12,5                | 2,5           | 3,4      |
| 318             | 11,9                | 2,4           | 3,0      | 317             | 9,3                 | 1,9           | 2,9      |
| 320             | 12,2                | 2,4           | 2,9      | 319             | 9,7                 | 1,9           | 3,3      |
| Ms              | 10,6                | 2,1           | 3,0      | Ms              | 10,4                | 2,1           | 3,2      |
| Sd              | 1,6                 | 0,3           | 0,2      | Sd              | 1,5                 | 0,3           | 0,4      |

#### 4.1.2 Vreme preživljavanja

Test hranjenja preživelo je 10 divljih jedinki domaćeg miša sa lokaliteta Surčin i Zemun Polje (tabela 11). Veći broj preživelih zabeležen je u grupi jedinki koje su izlovljene na lokalitetu Zemun Polje. Preživelih jedinki, koje su izlovljavane na sa ostalim lokalitetima, nije bilo ali se dužina perioda preživljavanja razlikovala u zavisnosti od lokaliteta. Najduži period preživljavanja osetljivih jedinki zabeležen je kod onih sa lokaliteta Smederevska Palanka ( $\leq 18$  dana). Kod jedinki sa lokaliteta Uljma i Bački Jarak takođe je utvrđen dug period preživljavanja od  $\leq 15$  dana. Period preživljavanja osetljivih jedinki sa ostalih lokaliteta bio je  $\leq 10$  dana.

Test hranjenja preživelo je 10 jedinki  $F_1$  generacije. Osetljive jedinke iz Surčina uginule su do šestog dana testa, dok je kod osetljivih jedinki sa lokaliteta Zemun Polje utvrđen period preživljavanja od  $\leq 18$  dana.

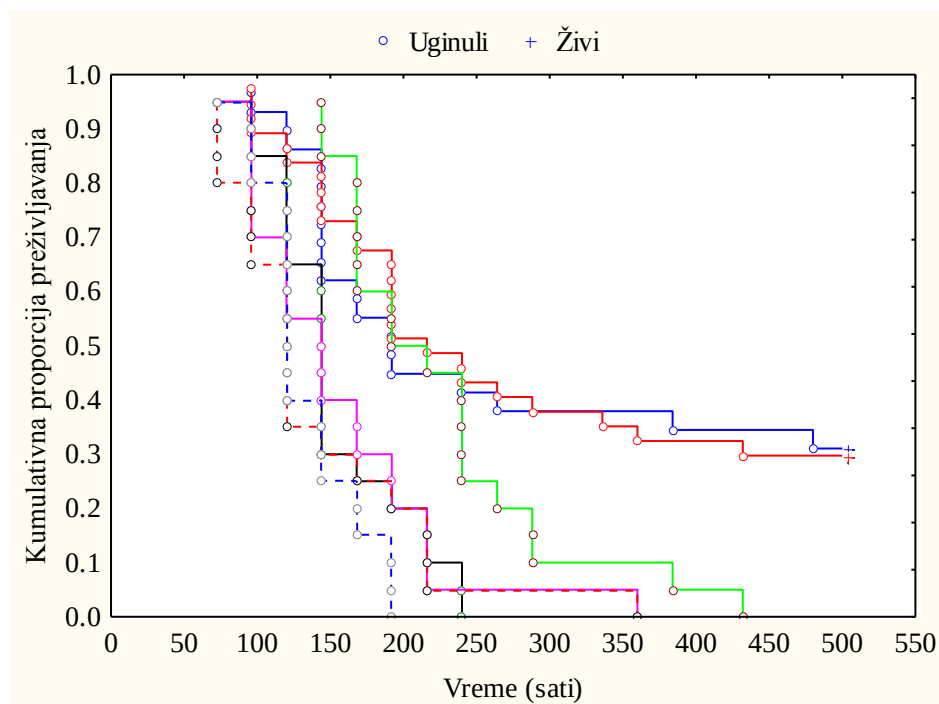
Na oba lokaliteta ukupno je preživeo veći broj ženki u odnosu na mužjake. Kod jedinki  $F_1$  generacije, koje su dobijene ukrštanjem preživelih jedinki sa lokaliteta Zemun Polje, nije bilo preživelih mužjaka.

Tabela 11. Vreme preživljavanja (h) i smrtnost jedinki domaćeg miša tokom testa hranjenja bromadiolonom za divlje jedinke (D) i njihove potomke ( $F_1$ )

| Lokalitet | Ms $\pm$ Sd       | Broj uginulih     |                     | Broj preživelih   |                     | Ukupan broj |
|-----------|-------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------|
|           |                   | Ženke (D/ $F_1$ ) | Mužjaci (D/ $F_1$ ) | Ženke (D/ $F_1$ ) | Mužjaci (D/ $F_1$ ) |             |
| Surčin    | 284,7 $\pm$ 169,1 | 7/1               | 9/3                 | 3/2               | 1/3                 | 29          |
| Z.Polje   | 286,7 $\pm$ 160,1 | 6/4               | 8/8                 | 4/5               | 2/0                 | 37          |
| S.Pazova  | 151,2 $\pm$ 47,4  | 10/0              | 10/0                | 0/0               | 0/0                 | 20          |
| Uljma     | 153,6 $\pm$ 66,7  | 10/0              | 10/0                | 0/0               | 0/0                 | 20          |
| B.Jarak   | 140,4 $\pm$ 71,1  | 10/0              | 10/0                | 0/0               | 0/0                 | 20          |
| Barajevo  | 133,2 $\pm$ 34,4  | 10/0              | 10/0                | 0/0               | 0/0                 | 20          |
| S.Palanka | 224,4 $\pm$ 78,4  | 10/0              | 10/0                | 0/0               | 0/0                 | 20          |
| Ukupno    |                   | 68                | 78                  | 14                | 6                   | 166         |

Najkraće vreme preživljavanja zabeleženo je kod jedinki sa lokaliteta Barajevo. Takođe, niski periodi preživljavanja (140,4 h do 153,6 h) utvrđeni su za jedinke sa lokaliteta Bački Jarak, Stara Pazova i Uljma. Najduže vreme preživljavanja zabeleženo je kod

jedinki sa lokaliteta Zemun Polje sa prosečnom srednjom vrednošću od 286,7 h. Kod jedinki sa lokaliteta Surčin i Smederevska Palanka utvrđeno je vreme preživljavanja od 284,7 h i 224,4 h. Na kraju testa, odnosno nakon isteka 504. sata testa preživelo je 31 % jedinki sa lokaliteta Surčin i 29,7 % jedinki sa lokaliteta Zemun Polje (grafik 1).



Grafik 1. Kumulativna proporcija preživljavanja za sve jedinke domaćeg miša tokom testa hranjenja bromadiolon mamcima sa lokaliteta: Surčin (—), Zemun Polje (—), Stara Pazova (—), Uljma (—), Bački Jarak (····), Barajevo (····) i Smederevska Palanka (—)

Vreme preživljavanja jedinki domaćeg miša sa različitih lokaliteta statistički se značajno razlikovalo (tabela 12). Između lokaliteta Stara Pazova, Uljma, Bački Jarak i Barajevo, odnosno lokaliteta koje je karakterisalo kraće vreme preživljavanja, nije bilo statistički značajnih razlika. Razlika između lokaliteta Surčin, Zemun Polje i Smederevska Palanka, koje je karakterisalo duže vreme preživljavanja, nije bilo. Između ove dve grupe lokaliteta postojale su statistički značajne razlike.

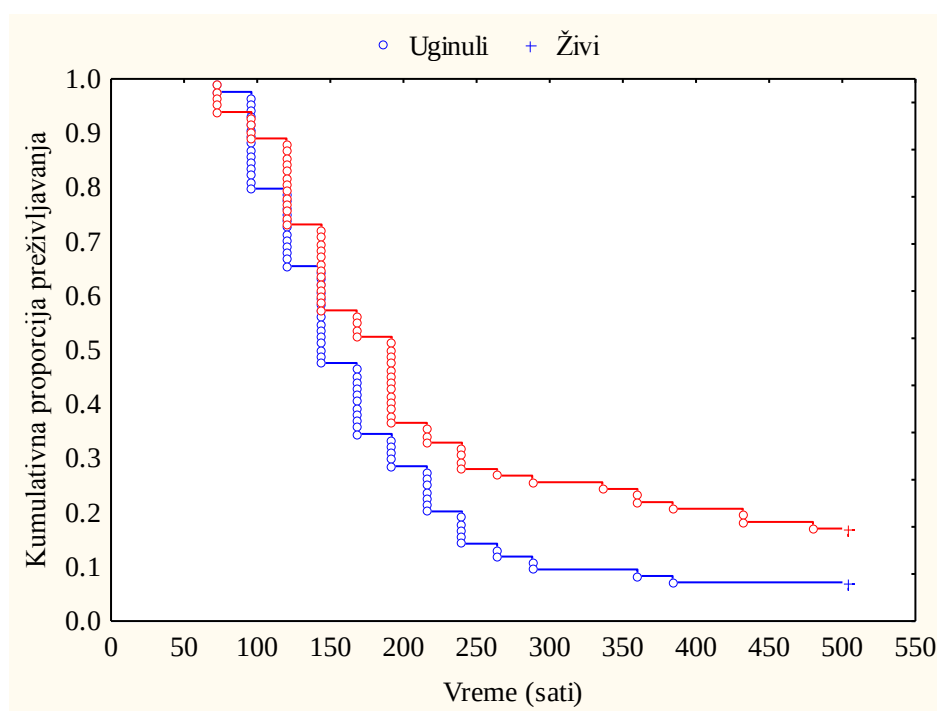
Kod ženki je utvrđeno duže vreme preživljavanja u odnosu na mužjake (tabela 13). Na kraju testa preživelo je 17,1 % ženki od ukupnog broja ženki i 7,1 % mužjaka od ukupnog broja mužjaka (grafik 2). Između mužjaka i ženki utvrđene su statistički značajne razlike u vremenu preživljavanja ( $WW=12,769$ ;  $p<0,0202$ ).



Tabela 12. Statistička značajnost razlika za vreme preživljavanja domaćeg miša sa različitih lokaliteta prema Log-rank testu

|           | Surčin               | Z.Polje              | S.Pazova             | Uljma                | B.Jarak               | Barajevo              | S.Palanka            |
|-----------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|
| Surčin    | -                    | 0,289 <sup>nz</sup>  | -8,326 <sup>**</sup> | -8,526 <sup>**</sup> | -9,600 <sup>**</sup>  | -9,651 <sup>**</sup>  | -4,345 <sup>nz</sup> |
| Z.Polje   | 0,289 <sup>nz</sup>  | -                    | -9,690 <sup>**</sup> | -9,678 <sup>**</sup> | -10,460 <sup>**</sup> | -10,980 <sup>**</sup> | -5,445 <sup>nz</sup> |
| S.Pazova  | -8,326 <sup>**</sup> | -9,690 <sup>**</sup> | -                    | -0,238 <sup>nz</sup> | -1,914 <sup>nz</sup>  | -4,009 <sup>nz</sup>  | 8,353 <sup>**</sup>  |
| Uljma     | -8,526 <sup>**</sup> | -9,678 <sup>**</sup> | -0,238 <sup>nz</sup> | -                    | -1,305 <sup>nz</sup>  | -3,402 <sup>nz</sup>  | 7,684 <sup>**</sup>  |
| B.Jarak   | -9,600 <sup>**</sup> | 10,460 <sup>**</sup> | -1,914 <sup>nz</sup> | -1,305 <sup>nz</sup> | -                     | -1,522 <sup>nz</sup>  | 8,376 <sup>**</sup>  |
| Barajevo  | -9,651 <sup>**</sup> | 10,980 <sup>**</sup> | -4,009 <sup>nz</sup> | -3,402 <sup>nz</sup> | -1,522 <sup>nz</sup>  | -                     | 10,178 <sup>**</sup> |
| S.Palanka | -4,345 <sup>nz</sup> | -5,445 <sup>nz</sup> | 8,353 <sup>**</sup>  | 7,684 <sup>**</sup>  | 8,376 <sup>**</sup>   | 10,178 <sup>**</sup>  | -                    |

Napomena: <sup>nz</sup> Nije značajno ( $p < 0,05$ ); \* Značajno ( $0,01 < p < 0,05$ ); \*\* Značajno ( $p < 0,01$ )



Grafik 2. Kumulativna proporcija preživljavanja za sve mužjake (—) i ženke (—) domaćeg miša tokom testa hranjenja bromadiolon mamcima

Kod svih uginulih jedinki autopsijom su potvrđeni simptomi trovanja antikoagulantima. Pored spoljašnjih simptoma kao što su krvarenje iz nosa, anusa i krvav feces, potvrđeni su i znaci unutrašnjeg krvarenja u plućima i crevnom traktu.

Tabela 13. Vreme preživljavanja (h) jedinki domaćeg miša u testu hranjenja bromadiolon mamcima

| Pol     | Ms $\pm$ Sd       | Broj uginulih | Broj preživelih | Ukupan broj |
|---------|-------------------|---------------|-----------------|-------------|
| Mužjaci | 185,4 $\pm$ 107,5 | 78            | 6               | 84          |
| Ženke   | 235,9 $\pm$ 147,0 | 68            | 14              | 82          |
| Ukupno  |                   | 146           | 20              | 166         |

### 4.1.3 Konzumacija bromadiolon mamca

#### 4.1.3.1 Konzumacija mamca prema lokalitetima i poreklu domaćeg miša

Kod divljih jedinki utvrđena je veća ukupna konzumacija mamca bromadiolona u odnosu na jedinke F<sub>1</sub> generacije (tabela 14). Utvrđene vrednosti ukupne konzumacije za sve jedinke bile su u intervalu od 0,42 gg<sup>-1</sup> tm do 5,97 gg<sup>-1</sup> tm, odnosno od 0,42 gg<sup>-1</sup> tm do 5,97 gg<sup>-1</sup> tm kod divljih jedinki i od 0,61 gg<sup>-1</sup> tm do 5,44 gg<sup>-1</sup> tm kod jedinki F<sub>1</sub> generacije.

Tabela 14. Konzumacija mamca (gg<sup>-1</sup> tm) kod divljih jedinki domaćeg miša i njihovih potomaka u testu hranjenja bromadiolon mamcima

| Jedinke                   | Ukupna          | Prosečna        |
|---------------------------|-----------------|-----------------|
| Divlje                    | 1,61 $\pm$ 1,13 | 0,19 $\pm$ 0,04 |
| F <sub>1</sub> generacija | 2,71 $\pm$ 1,76 | 0,20 $\pm$ 0,04 |

Između divljih i jedinki F<sub>1</sub> generacije utvrđene su statistički značajne razlike u ukupnoj konzumaciji (t=4,12; df=164; p<0,0000). Statistički značajnih razlika nije bilo između divljih i jedinki F<sub>1</sub> generacije u prosečnoj konzumaciji mamca (t=0,48; df=164; p<0,6310).

Kod jedinki sa lokaliteta Barajevo utvrđena je najmanja ukupna konzumacija (1,07 gg<sup>-1</sup> tm). Takođe, niske prosečne vrednosti ukupne konzumacije utvrđene su kod jedinki sa lokaliteta Bački Jarak, Stara Pazova i Uljma (1,09 gg<sup>-1</sup> tm do 1,32 gg<sup>-1</sup> tm). Veće prosečne vrednosti ukupne konzumacije (2,02 gg<sup>-1</sup> tm do 2,30 gg<sup>-1</sup> tm) utvrđene su kod jedinki sa lokaliteta Smederevska Palanka, Zemun Polje i Surčin (tabela 15).

Tabela 15. Konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) kod divljih jedinki domaćeg miša i njihovih potomaka u testu hranjenja bromadiolon mamcima

| Lokaliteti | Ukupna    |    |                           |   | Prosečna  |    |                           |   |
|------------|-----------|----|---------------------------|---|-----------|----|---------------------------|---|
|            | Divlje    |    | F <sub>1</sub> generacija |   | Divlje    |    | F <sub>1</sub> generacija |   |
| Surčin     | 2,30±1,60 | b  | 2,68±1,80                 | a | 0,20±0,04 | ab | 0,21±0,04                 | a |
| Z.Polje    | 2,28±1,77 | b  | 2,77±1,77                 | a | 0,17±0,05 | a  | 0,18±0,03                 | a |
| S.Pazova   | 1,19±0,51 | a  | -                         |   | 0,18±0,04 | ab | -                         |   |
| Uljma      | 1,32±0,64 | a  | -                         |   | 0,20±0,03 | ab | -                         |   |
| B.Jarak    | 1,09±0,57 | a  | -                         |   | 0,19±0,04 | ab | -                         |   |
| Barajevo   | 1,07±0,29 | a  | -                         |   | 0,19±0,03 | ab | -                         |   |
| S.Palanka  | 2,02±0,79 | ab | -                         |   | 0,21±0,02 | b  | -                         |   |

Statistički značajne razlike u ukupnoj konzumaciji utvrđene su kod divljih jedinki sa različitih lokaliteta ( $F_{6,133}=6,04$ ;  $p<0,0000$ ). Razlike u konzumaciji nisu postojale između jedinki sa lokaliteta Surčin i Zemun Polje. Takođe, razlike u konzumaciji nisu utvrđene između jedinki sa lokaliteta Stara Pazova, Uljma, Bački Jarak i Barajevo. Konzumacija jedinki sa lokaliteta Smederevska Palanka nije se razlikovala od konzumacije jedinki sa ostalih šest lokaliteta (tabela 15).

Kod divljih jedinki iz Zemun Polja utvrđena je najniža prosečna konzumacija ( $0,17 \text{ gg}^{-1} \text{tm}$ ). Veće srednje vrednosti ( $0,18 \text{ gg}^{-1} \text{tm}$  do  $0,19 \text{ gg}^{-1} \text{tm}$ ) utvrđene su kod jedinki sa lokaliteta Stara Pazova, Bački Jarak i Barajevo. Visoki prosečni unosi bromadiolon mamca ( $0,20 \text{ gg}^{-1} \text{tm}$  do  $0,21 \text{ gg}^{-1} \text{tm}$ ) utvrđeni su kod jedinki sa lokaliteta Uljma, Surčin i Smederevska Palanka.

Razlike u prosečnoj konzumaciji između divljih jedinki poreklom sa različitih lokaliteta utvrđene su statističkom analizom ( $F_{6,133}=2,67$ ;  $p<0,0176$ ). Razlike u prosečnoj konzumaciji utvrđene su jedino između jedinki domaćeg miša sa lokaliteta Zemun Polje i Smederevska Palanka.

Najniža letalna doza kod divljih jedinki utvrđena je kod onih sa lokaliteta Barajevo, dok je najveća utvrđena kod jedinki poreklom sa lokaliteta Smederevska Palanka (tabela 16). Najniža letalna doza u testu utvrđena je kod ženke sa lokaliteta Stara Pazova ( $21 \text{ mg/kg}$ ). Najveća letalna doza u testu od  $237,3 \text{ mg/kg}$  utvrđena je, takođe, kod ženke sa lokaliteta Surčin. Kod jedinki iz Surčina utvrđena je veća neletalna doza u odnosu na

jedinke iz Zemun Polja. Najveći letalni period hranjenja utvrđen je kod jedinki sa lokaliteta Smederevska Palanka, a najmanji kod jedinki sa lokaliteta Barajevo.

Veća letalna doza kod jedinki F<sub>1</sub> generacije utvrđena je kod jedinki iz Zemun Polja. Takođe, kod ovih jedinki je utvrđena i veća neletalna doza i LFP.

Tabela 16. Letalna/neletalna doza za domaćeg miša prema poreklu i lokalitetima

| Lokaliteti                | Osetljive               |            |     |          | Rezistentne               |             |
|---------------------------|-------------------------|------------|-----|----------|---------------------------|-------------|
|                           | Letalna doza<br>(mg/kg) |            | LFP |          | Neletalna doza<br>(mg/kg) |             |
|                           | Ms±Sd                   | min-max    | Ms  | Interval | Ms±Sd                     | min-max     |
| Divlje jedinke            |                         |            |     |          |                           |             |
| Surčin                    | 83,2±51,5               | 37,0-237,3 | 8,1 | 4-20     | 241,4±29,5                | 209,0-270,0 |
| Z.Polje                   | 62,7±33,8               | 29,5-137,5 | 7,9 | 4-14     | 234,3±44,1                | 191,0-298,5 |
| S.Pazova                  | 59,6±25,7               | 21,0-108,0 | 6,3 | 4-10     | -                         | -           |
| Uljma                     | 65,9±31,9               | 29,0-167,5 | 6,4 | 4-15     | -                         | -           |
| B.Jarak                   | 54,5±28,7               | 28,5-150,5 | 5,8 | 3-15     | -                         | -           |
| Barajevo                  | 53,3±14,3               | 30,5-79,0  | 5,5 | 3-8      | -                         | -           |
| S.Palanka                 | 100,9±39,5              | 56,5-200,5 | 9,3 | 6-18     | -                         | -           |
| F <sub>1</sub> generacija |                         |            |     |          |                           |             |
| Surčin                    | 47,1±19,1               | 30,5-74,0  | 6,2 | 4-10     | 211,5±21,0                | 182,0-234,0 |
| Z.Polje                   | 84,5±50,6               | 34,5-191,0 | 8,3 | 4-19     | 252,9±21,2                | 224,5-272,0 |

#### 4.1.3.2 Konzumacija mamca prema osetljivosti domaćeg miša

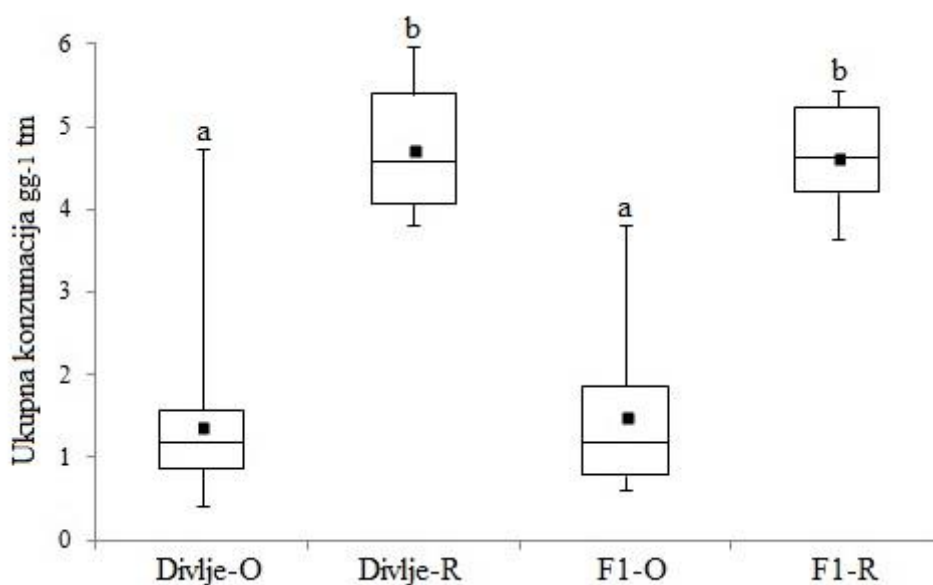
Na osnovu rezultata testa hranjenja bromadiolonom bez izbora hrane jedinke su podeljene u dve grupe: rezistentne (jedinke koje su preživele 21 dan testa hranjenja i 21 dan perioda opservacije) i osetljive jedinke (jedinke koje su uginule tokom testa ili perioda opservacije).

Kod osetljivih jedinki utvrđena je niža ukupna i prosečna konzumacija u odnosu na rezistentne i kod divljih i kod jedinki F<sub>1</sub> generacije (tabela 17). Kod osetljivih jedinki F<sub>1</sub> generacije zabeležena je veća ukupna konzumacija u odnosu na divlje jedinke. Prosečna konzumacija nije se razlikovala između ove dve grupe jedinki. Kod rezistentnih jedinki,

utvrđena je veća ukupna konzumacija divljih jedinki u odnosu na  $F_1$  generaciju, dok se prosečna konzumacija nije razlikovala.

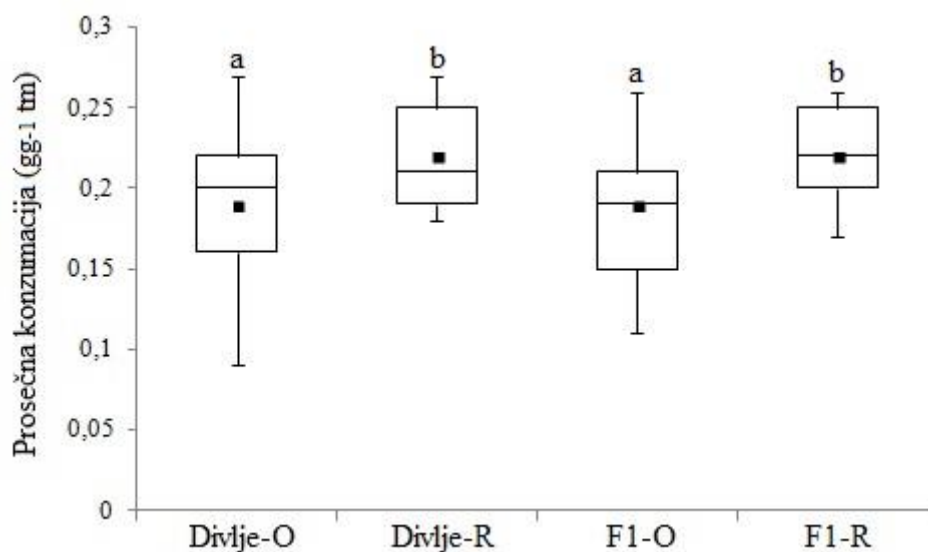
Utvrđene vrednosti ukupne konzumacije za divlje osetljive jedinke bile su u intervalu od  $0,42 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $4,75 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ , dok je interval vrednosti za divlje rezistentne jedinke bio od  $3,82 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $5,97 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ . Vrednosti ukupne konzumacije za jedinke  $F_1$  generacije bile su intervalima od  $0,61 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $3,82 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za osetljive i od  $3,64 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $5,44 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za rezistentne jedinke (grafik 3).

Utvrđeni intervali vrednosti prosečne konzumacije bili su od  $0,18 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $0,28 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za rezistentne i od  $0,09 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $0,27 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za osetljive divlje jedinke. Intervali vrednosti prosečne konzumacije bili su od  $0,17 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $0,26 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za rezistentne jedinke i od  $0,11 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $0,27 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za osetljive jedinke  $F_1$  generacije (grafik 4).



Grafik 3. Ukupna konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{ tm}$ ) za divlje i jedinke  $F_1$  generacije domaćeg miša podeljene u grupe prema rezultatima testa hranjenja (O-osetljive; R-rezistentne)

Na ukupnu konzumaciju poreklo jedinki nije imalo uticaja ( $F_{1,162}=0,01$ ;  $p<0,9277$ ) za razliku od osetljivosti koja je ispoljila značajan uticaj na konzumaciju ( $F_{1,162}=283,14$ ;  $p<0,0000$ ). Interakcija porekla i osetljivosti nije imala uticaj na ukupnu konzumaciju mamca ( $F_{1,162}=0,36$ ;  $p<0,5479$ ).



Grafik 4. Prosečna konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) za divlje i jedinke  $F_1$  generacije domaćeg miša podeljene u grupe prema rezultatima testa hranjenja (O-osetljive; R-rezistentne)

Tabela 17. Konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) kod divljih jedinki domaćeg miša i njihovih potomaka prema rezultatima testa hranjenja bromadiolon mamcima

| Jedinke          | Ukupna          |                 | Prosečna        |                 |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  | Osetljive       | Rezistentne     | Osetljive       | Rezistentne     |
| Divlje           | $1,37 \pm 0,73$ | $4,74 \pm 0,74$ | $0,19 \pm 0,04$ | $0,22 \pm 0,04$ |
| $F_1$ generacija | $1,50 \pm 0,94$ | $4,64 \pm 0,69$ | $0,19 \pm 0,04$ | $0,22 \pm 0,03$ |

Tabela 18. Letalna/neletalna doza za domaćeg miša prema rezultatima testa hranjenja i poreklu

| Parametri        | Osetljive            |            |     |          | Rezistentne            |             |
|------------------|----------------------|------------|-----|----------|------------------------|-------------|
|                  | Letalna doza (mg/kg) |            | LFP |          | Neletalna doza (mg/kg) |             |
|                  | $Ms \pm Sd$          | min-max    | Ms  | Interval | $Ms \pm Sd$            | min-max     |
| Divlje           | $68,4 \pm 36,4$      | 21,0-237,5 | 7,0 | 3-20     | $237,1 \pm 47,2$       | 191,0-298,5 |
| $F_1$ generacija | $75,1 \pm 47,2$      | 30,5-191,0 | 7,8 | 4-18     | $232,2 \pm 29,5$       | 182,0-272,0 |

Na prosečnu konzumaciju poreklo jedinki nije imalo uticaja ( $F_{1,162}=0,28$ ;  $p<0,5989$ ) za razliku od osetljivosti koja je ispoljila značajan uticaj na konzumaciju ( $F_{1,162}=10,21$ ;

$p < 0,0017$ ). Interakcija porekla i osetljivosti nije imala uticaj na prosečnu konzumaciju mamca ( $F_{1,162}=0,02$ ;  $p < 0,9000$ ).

Jedinke  $F_1$  generacije imale su veću letalnu dozu u odnosu na divlje jedinke. Veća neletalna doza zabeležena je kod divljih jedinki (tabela 18).

#### 4.1.3.3 Konzumacija mamca domaćeg miša prema polu

Pol je ispoljio uticaj na ukupnu konzumaciju mamca. Ženke su pokazale veći nivo rezistentnosti na bromadiolon u odnosu na mužjake, sa srednjom vrednošću konzumacije od  $2,07 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  (tabela 19).

Poređenjem vrednosti ukupne konzumacije između polova utvrđene su statistički značajne razlike ( $t=2,85$ ;  $df=164$ ;  $p < 0,0048$ ), dok razlika u prosečnoj konzumaciji nije bilo ( $t=1,39$ ;  $df=164$ ;  $p < 0,1656$ ).

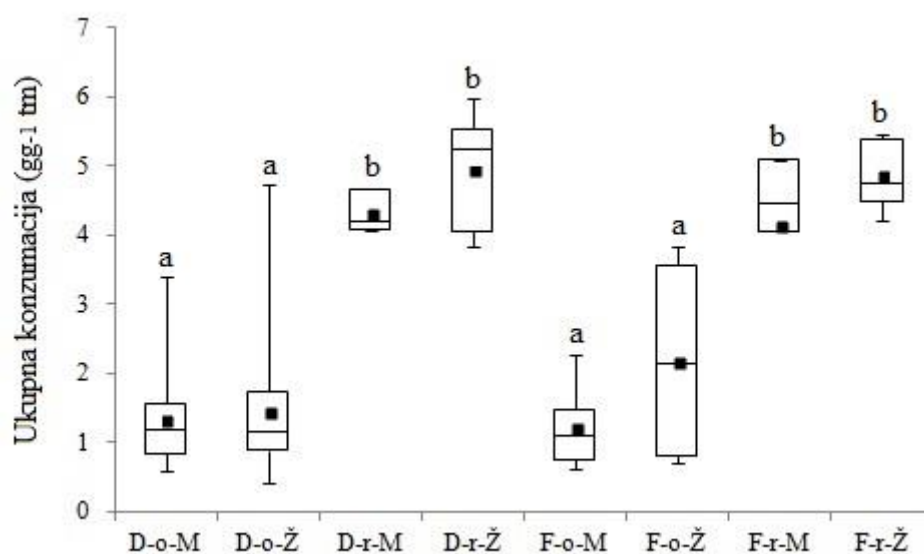
Statistički značajne razlike u ukupnoj konzumaciji utvrđene su između grupa jedinki koje su formirane prema polu, poreklu i osetljivosti. Srednje vrednosti ukupne konzumacije za sve rezistentne grupe jedinki bile su veće od  $4,1 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ , dok su srednje vrednosti kod svih osetljivih grupa jedinki bile manje od  $2,2 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ . U svim grupama jedinki kod ženki je utvrđena veća konzumacija u odnosu na mužjake, odnosno osetljive ženke u odnosu na osetljive mužjake, rezistentne ženke u odnosu na rezistentne mužjake i kod divljih i kod jedinki  $F_1$  generacije (tabela 19).

Tabela 19. Konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{ tm}$ ) divljih jedinki domaćeg miša i njihovih potomaka na osnovu rezultata testa hranjenja bromadiolon mamcima prema polu

|                  | Ukupna          |                 | Prosečna        |                 |
|------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                  | Ženke           | Mužjaci         | Ženke           | Mužjaci         |
| Sve jedinke      | $2,07 \pm 1,56$ | $1,50 \pm 0,94$ | $0,20 \pm 0,04$ | $0,19 \pm 0,03$ |
| Divlje jedinke   |                 |                 |                 |                 |
| Osetljive        | $1,43 \pm 0,85$ | $1,31 \pm 0,58$ | $0,19 \pm 0,04$ | $0,19 \pm 0,03$ |
| Rezistentne      | $4,93 \pm 0,81$ | $4,31 \pm 0,32$ | $0,23 \pm 0,04$ | $0,20 \pm 0,01$ |
| $F_1$ generacija |                 |                 |                 |                 |
| Osetljive        | $2,17 \pm 1,39$ | $1,20 \pm 0,48$ | $0,19 \pm 0,06$ | $0,18 \pm 0,04$ |
| Rezistentne      | $4,87 \pm 0,49$ | $4,12 \pm 0,52$ | $0,23 \pm 0,02$ | $0,19 \pm 0,02$ |

Tabela 20. Trofaktorijska analiza varijanse (ANOVA) za konzumaciju mamca jedinki domaćeg miša u testu hranjenja bromadiolon mamcima

| Parametri               | Ukupna |        | Prosečna |        |
|-------------------------|--------|--------|----------|--------|
|                         | F      | p      | F        | p      |
| Poreklo                 | 0,22   | 0,6412 | 0,28     | 0,6000 |
| Pol                     | 8,98   | 0,0032 | 2,90     | 0,0904 |
| Osetljivost             | 216,31 | 0,0000 | 5,17     | 0,0243 |
| Poreklo*Pol             | 1,39   | 0,2395 | 0,07     | 0,7936 |
| Poreklo*Osetljivost     | 1,13   | 0,2887 | 0,00     | 1,0000 |
| Pol*Osetljivost         | 0,10   | 0,7474 | 2,00     | 0,1595 |
| Poreklo*Pol*Osetljivost | 0,79   | 0,3758 | 0,02     | 0,8943 |



Grafik 5. Ukupna konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) svih jedinki domaćeg miša uključenih u test hranjenja bromadiolon mamcima razvrstane u grupe prema poreklu (D- divlje; F-  $F_1$  generacija), osetljivosti (o-osetljive; r- rezistentne) i polu (M- mušjaci; Ž- ženke)

Trofaktorijskom analizom varijanse utvrđen je uticaj pola i osetljivosti na ukupnu konzumaciju jedinki domaćeg miša, dok statistički značajnog uticaja porekla, kao i interakcije svih faktora nije bilo (tabela 20 i grafik 5).



Istim postupkom analize podataka utvrđen je uticaj osetljivosti na prosečnu konzumaciju kod jedinki domaćeg miša. Ostali faktori kao i njihove interakcije nisu imali statistički značajan uticaj na prosečan dnevni unos bromadiolon mamca (tabela 20).

Tabela 21. Letalna/neletalna doza za domaćeg miša prema osetljivosti, poreklu i polu

| Parametri                 | Osetljive            |            |      |          | Rezistentne            |             |
|---------------------------|----------------------|------------|------|----------|------------------------|-------------|
|                           | Letalna doza (mg/kg) |            | LFP  |          | Neletalna doza (mg/kg) |             |
|                           | Ms±Sd                | min-max    | Ms   | Interval | Ms±Sd                  | min-max     |
| Divlje jedinke            |                      |            |      |          |                        |             |
| Mužjaci                   | 65,4±29,2            | 28,5-169,5 | 6,7  | 3-16     | 215,3±16,1             | 203,5-233,5 |
| Ženke                     | 71,6±45,8            | 21,0-237,5 | 7,3  | 3-20     | 246,5±40,6             | 191,0-298,5 |
| F <sub>1</sub> generacija |                      |            |      |          |                        |             |
| Mužjaci                   | 59,9±24,3            | 30,5-113,0 | 6,5  | 4-12     | 206,2±26,2             | 182,0-234,0 |
| Ženke                     | 108,7±69,6           | 34,5-191,0 | 10,6 | 6-18     | 243,4±24,4             | 210,0-272,0 |

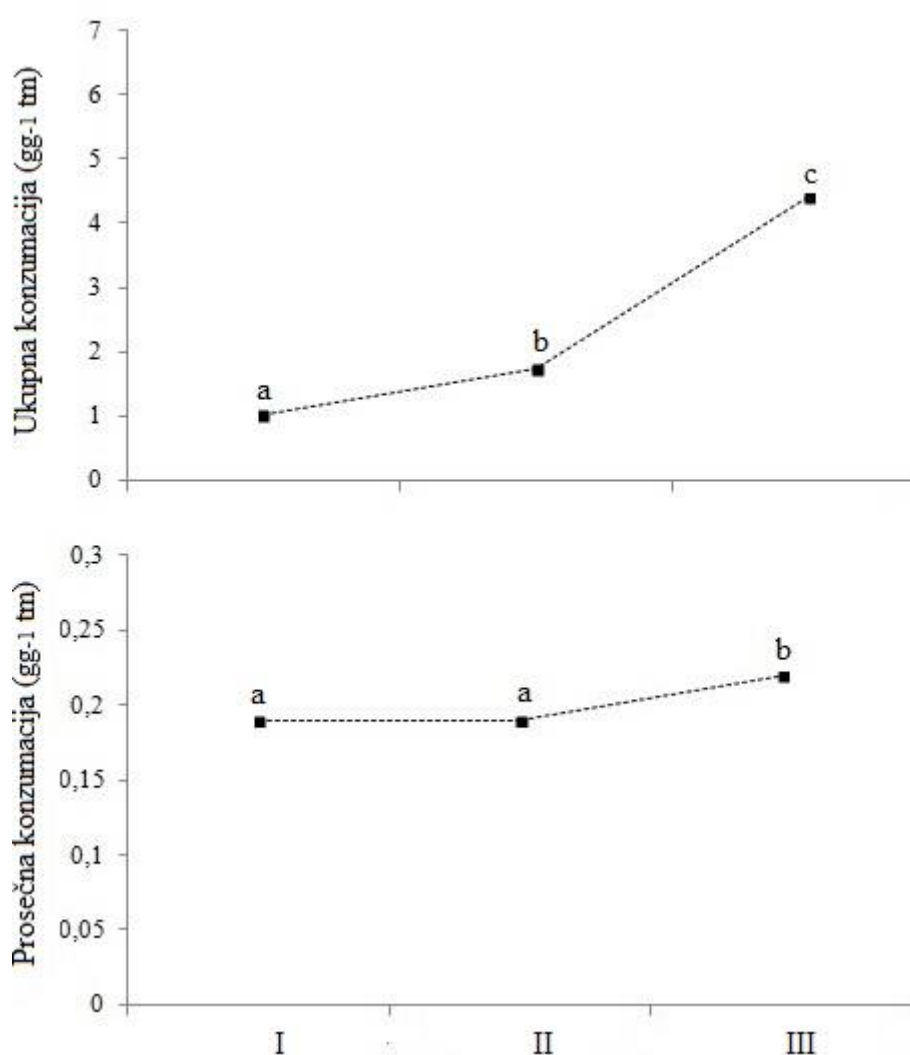
Kod divljih ženki i ženki F<sub>1</sub> generacije utvrđena je veća letalna doza u odnosu na mužjake. Najveća letalna doza od 108,7 mg/kg utvrđena je kod ženki F<sub>1</sub> generacije. Najniža letalna doza od 59,9 mg/kg zabeležena je kod mužjaka F<sub>1</sub> generacije. Takođe, veće neletalne doze utvrđene su kod ženki. Najniža neletalna doza utvrđena je kod mužjaka F<sub>1</sub> generacije, dok je najveća neletalna doza utvrđena kod divljih ženki (tabela 21).

#### 4.1.3.4 Odstupanja u konzumaciji mamca tokom testa

Razvrstavanjem jedinki domaćeg miša u tri grupe prema danu uginuća, odnosno dužini perioda hranjenja (I- sve jedinke koje su uginule do 7. dana, II- jedinke koje su uginule u periodu od 8-14 dana i III- jedinke koje su uginule 15 dana testa hranjenja) praćena je konzumacija bromadiolon mamca tokom ukupnog perioda hranjenja. Vrednosti ukupne konzumacije bile su najveće u III grupi jedinki s obzirom na najduži period hranjenja (tabela 22). Vrednosti prosečne konzumacije su takođe bile veće u grupama sa dužim

periodom hranjenja, odnosno jedinke iz grupe sa najdužim periodom preživljavanja imale su najveći prosečan dnevni unos u odnosu na ostala dve grupe jedinki (grafik 6). Utvrđeni intervali za vrednosti prosečne konzumacije bili su od  $0,11 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $0,27 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za I grupu jedinki, od  $0,09 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $0,26 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za II grupu i od  $0,17 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  do  $0,28 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  za III grupu jedinki.

Između ove tri grupe jedinki, koje su formirane prema intervalu uginuća, utvrđene su statistički značajne razlike u ukupnoj i prosečnoj konzumaciji (Ukupna-  $F_{2,163}=585,51$ ;  $p<0,0000$  i prosečna-  $F_{2,163}=8,13$ ;  $p<0,0004$ ).



Grafik 6. Prosečne vrednosti ukupne i prosečne konzumacije mamka ( $\text{gg}^{-1} \text{ tm}$ ) za sve jedinke domaćeg miša iz testa hranjenja bromadiolon mamcima svrstane u tri grupe (I, II, III) prema periodu hranjenja

Utvrđeno je da nije bilo odstupanja u konzumaciji mamca kod rezistentnih jedinki tokom testa hranjenja, odnosno kod jedinki je utvrđen ujednačen unos mamca tokom testa. Utvrđivanjem prosečnih vrednosti unosa mamca u toku podperioda hranjenja od 1-7 dana, od 8-14 dana i od 15-21 dana za svaku rezistentnu jedinku pojedinačno, utvrđeno je da nije bilo statistički značajnih razlika u konzumaciji mamca između ova tri podperioda ( $F_{2,57}=0,00$ ;  $p<0,9984$ ), odnosno nije bilo odstupanja u konzumaciji mamca tokom testa hranjenja (tabela 22).

Tabela 22. Konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) za tri grupe osetljivih jedinki domaćeg miša prema periodu hranjenja (I, II i III) i srednja konzumacija (g) za tri podperioda (A, B i C) u toku testa za rezistentne jedinke

| Grupe | Ukupna    | Prosečna  | Podperiodi | Srednja   |
|-------|-----------|-----------|------------|-----------|
| I     | 1,02±0,31 | 0,19±0,04 | A (1-7)    | 3,34±0,51 |
| II    | 1,74±0,47 | 0,19±0,04 | B (8-14)   | 3,33±0,69 |
| III   | 4,41±0,77 | 0,22±0,03 | C (15-21)  | 3,34±0,58 |

#### 4.1.4 Promena telesne mase

Između divljih i jedinki  $F_1$  generacije domaćeg miša nisu utvrđene statistički značajne razlike u promeni telesne mase ( $t=0,65$ ;  $df=164$ ;  $p<0,5162$ ).

Najmanja promena u telesnoj masi utvrđena je kod jedinki sa lokaliteta Surčin (tabela 23 i grafik 7). Kod ovih jedinki utvrđeno je najveće povećanje telesne mase (-10,6 %) kao i najmanji gubitak telesne mase (15,2 %). Kod jedinki iz Zemun Polja takođe je zabeleženo povećanje telesne mase kod pojedinih jedinki. Povećanje telesne mase utvrđeno je i kod jedinki iz Bačkog Jarka. Najmanji gubitak telesne mase kod osetljivih jedinki utvrđen je kod onih iz Bačkog Jarka (6,3 %). Kod jedinki iz Stare Pazove i Uljme je utvrđeno smanjenje telesne mase. Kod pojedinih jedinki je utvrđeno da nisu promenile telesnu masu. Kod svih jedinki sa lokaliteta Barajevo i Smederevska Palanka utvrđeno je smanjenje telesne mase.

Između jedinki poreklom sa različitih lokaliteta utvrđene su značajne razlike u promeni telesne mase ( $F_{6,159}=2,67$ ;  $p<0,0171$ ).

Najmanja promena u telesnoj masi utvrđena je kod rezistentnih ženki sa srednjom vrednošću od 3,3 % (tabela 24 i grafik 8). U ovoj grupi jedinki utvrđen je najmanji

gubitak telesne mase (13,1 %), ali i najveće povećanje telesne mase (-10,6 %). Kod rezistentnih mužjaka je utvrđen, takođe, manji gubitak u telesnoj masi sa srednjom vrednošću promene od 9,3 % u odnosu na sve osetljive jedinke. Međutim kod ovih jedinki nije utvrđeno povećanje telesne mase. Najveća promena u telesnoj masi utvrđena je kod osetljivih ženki. U ovoj grupi jedinki utvrđen je i najveći gubitak u telesnoj masi u toku testa (55,9 %). Kod osetljivih mužjaka je utvrđen manji gubitak u telesnoj masi od osetljivih ženki ali veći od svih rezistentnih jedinki.

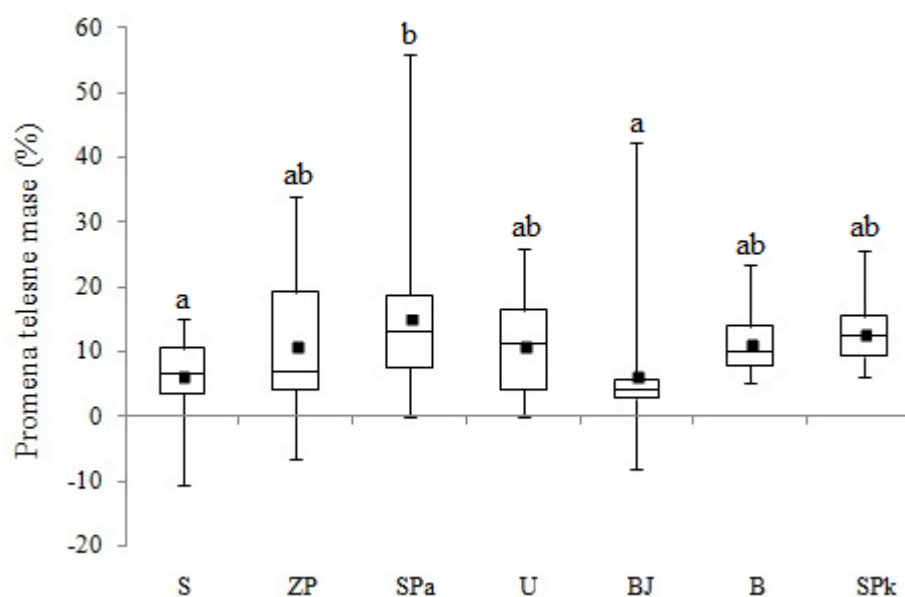
Tabela 23. Promena telesne mase (%) svih jedinki domaćeg miša tokom testa hranjenja bromadiolon mamcima

| Lokalitet | Ms±Sd     |
|-----------|-----------|
| Surčin    | 7,9±5,9   |
| Z.Polje   | 9,8±7,2   |
| S.Pazova  | 15,2±11,9 |
| Uljma     | 10,9±7,2  |
| B.Jarak   | 6,3±4,5   |
| Barajevo  | 11,3±4,6  |
| S.Palanka | 13,1±5,4  |

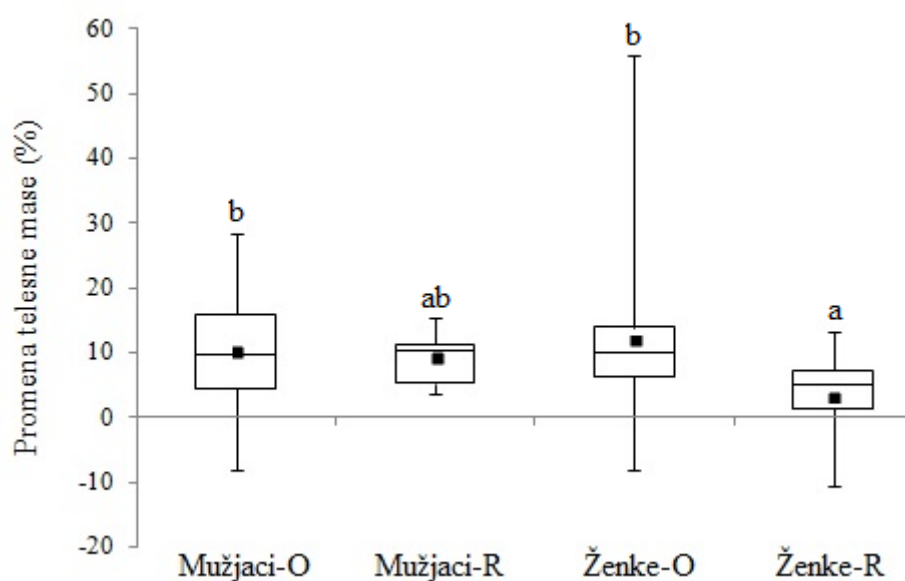
Dvofaktorijskom analizom varijanse utvrđeno je da pol nije imao uticaja na promenu telesne mase ( $F_{1,162}=1,01$ ;  $p<0,3167$ ), dok je osetljivost imala značajan uticaj na promenu telesne mase ( $F_{1,162}=4,92$ ;  $p<0,0289$ ). Interakcija nije imala uticaja na promenu telesne mase jedinki domaćeg miša ( $F_{1,162}=3,15$ ;  $p<0,0779$ ).

Tabela 24. Promena telesne mase (%) svih jedinki domaćeg miša prema polu i rezultatima testa hranjenja

|       | Osetljive |          | Rezistentne |         |
|-------|-----------|----------|-------------|---------|
|       | Mužjaci   | Ženke    | Mužjaci     | Ženke   |
| Ms±Sd | 10,3±7,5  | 12,0±9,9 | 9,3±4,3     | 3,3±2,2 |



Grafik 7. Promena telesne mase (%) svih jedinki domaćeg miša prema lokalitetima (S- Surčin; ZP- Zemun Polje; SPa- Stara Pazova; U- Uljma; BJ- Bački Jarak; B- Barajevo; SPk- Smederevska Palanka)



Grafik 8. Promena telesne mase (%) svih jedinki domaćeg mišasvrstane u grupe prema polu i rezultatima testa hranjenja (O- osetljive jedinke; R- rezistentne jedinke)

Razvrstavanjem jedinki domaćeg miša u četiri grupe sa približno istim brojem jedinki u svakoj grupi (grupe formirane prema raspoloživom uzorku) utvrđeno je da je najveći

procenat smrtnosti zabeležen u grupi sa najmanjom telesnom masom (grupa A). Najmanja smrtnost jedinki utvrđena je u grupi C, odnosno predposlednjoj grupi jedinki formiranoj prema porastu telesne mase (tabela 25).

Tabela 25. Smrtnost domaćeg miša (%) prema početnim telesnim masama (g)

| Obeležje               | Grupe |           |           |       |
|------------------------|-------|-----------|-----------|-------|
|                        | A     | B         | C         | D     |
| Interval telesnih masa | ≤13,3 | 13,5-15,0 | 15,1-16,2 | ≥16,3 |
| Ukupan broj jedinki    | 45    | 43        | 38        | 40    |
| Broj preživelih        | 3     | 4         | 9         | 4     |
| Smrtnost               | 93,3  | 90,7      | 76,3      | 90,0  |

## 4.2 POLIMORFIZAM VKORC1 GENA

### 4.2.1 Utvrđene varijante *vkorc1* gena

Sekvencioniranjem sva tri egzona *vkorc1* gena utvrđene su promene u sekvenci ovog gena kod svih analiziranih divljih i jedinki F<sub>1</sub> generacije domaćeg miša. VKOR varijante Leu128Ser i Tyr139Cys potvrđene su u trećem egzonu *vkorc1* gena i kod divljih i jedinki F<sub>1</sub> generacije. Takođe, kod 11 jedinki potvrđeno je prisustvo obe varijante istovremeno u egzonu 3 (Leu128Ser/Tyr139Cys). Leu128Ser varijanta nije utvrđena kod divljih jedinki. Ova varijanta se kod divljih jedinki javljala samo u kombinaciji sa Tyr139Cys varijantom.

Najveći broj divljih jedinki (5/9) bile su nosioci Leu128Ser/Tyr139Cys varijante. Kod F<sub>1</sub> generacije najveću zastupljenost imali su Tyr139Cys (9/24) i Leu128Ser (8/24) varijante. Manji broj jedinki (6/24) bile su nosioci kombinacije ove dve varijante.

U egzonu 1 utvrđeno je prisustvo nove promene u *vkorc1* genu Ala21Thr (zamena alanina treoninom na 21. kodonu). Ova mutacija utvrđena je kod jedne divlje jedinke i jednog njenog potomka. Kod divlje jedinke ova varijanta javila se zajedno sa varijantom Tyr139Cys (Ala21Thr/Tyr139Cys). Rezultati sekvencioniranja *vkorc1* gena svih analiziranih jedinki predstavljeni su u tabeli 26.

Sve ženke sa Tyr139Cys varijantom bile su rezistentne. VKOR varijanta Leu128Ser utvrđena je samo kod osetljivih jedinki. Obe varijante istovremeno utvrđene su kod

rezistentnih i osetljivih jedinki. Do sada neutvrđena varijanta Ala21Thr nađena je samo kod dve rezistentne jedinke.

Sve analizirane divlje rezistentne jedinke bile su heterozigoti za sve utvrđene VKOR varijante. Takođe, sve utvrđene kombinacije VKOR varijanti (Leu128Ser/Tyr139Cys i Ala21Thr/Tyr139Cys) bile su u heterozigotnom stanju. Nova varijanta Ala21Thr takođe je utvrđena samo u heterozigotnom stanju. Homozigotne jedinke utvrđene su kod jedinki F<sub>1</sub> generacije za nosioce Tyr139Cys i Leu128Ser varijanti.

Tabela 26. Utvrđene promene u *vkorc1* genu kod svih analiziranih jedinki domaćeg miša svrstane prema poreklu, polu i osetljivosti (OS-osetljive; RZ-rezistentne) i genotipu (Ho-homozigot; He-heterozigot)

| VKOR varijanta (genotip) |    | Divlje jedinke |    |         |    | F <sub>1</sub> generacija |    |         |    |
|--------------------------|----|----------------|----|---------|----|---------------------------|----|---------|----|
|                          |    | Ženke          |    | Mužjaci |    | Ženke                     |    | Mužjaci |    |
|                          |    | OS             | RZ | OS      | RZ | OS                        | RZ | OS      | RZ |
| Leu128Ser                | Ho | -              | -  | -       | -  | -                         | -  | 3       | -  |
|                          | He | -              | -  | -       | -  | 3                         | -  | 2       | -  |
| Tyr139Cys                | Ho | -              | -  | -       | -  | -                         | 2  | 2       | 2  |
|                          | He | -              | 1  | -       | 2  | -                         | 1  | 2       | -  |
| Leu128Ser/<br>Tyr139Cys  | He | -              | 4  | -       | 1  | 2                         | 2  | 2       | -  |
| Ala21Thr                 | He | -              | -  | -       | -  | -                         | -  | -       | 1  |
| Ala21Thr/<br>Tyr139Cys   | He | -              | 1  | -       | -  | -                         | -  | -       | -  |

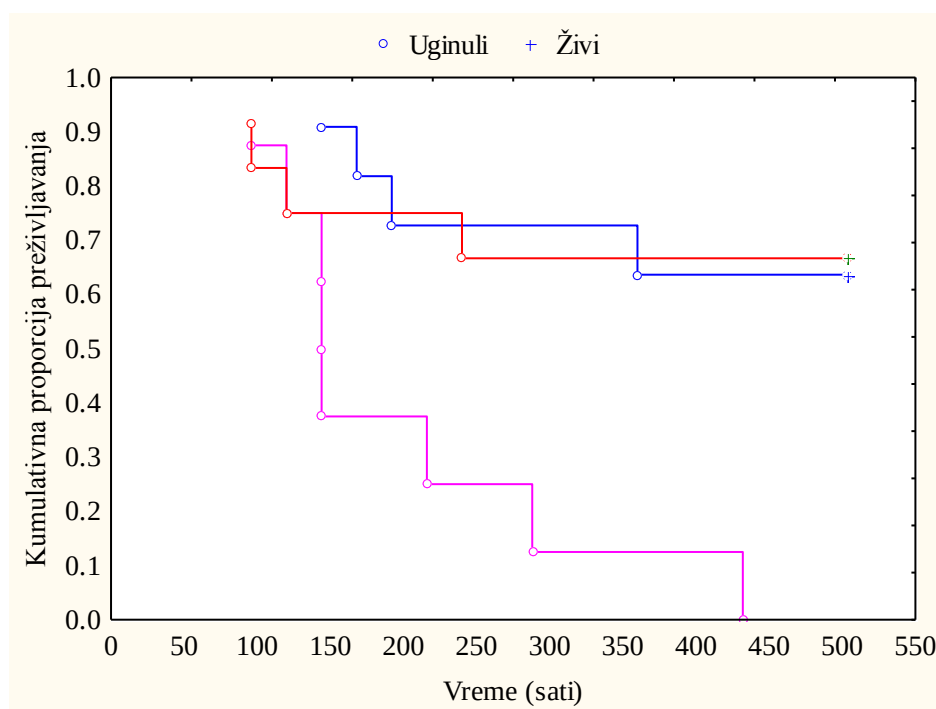
#### 4.2.2 Uticaj VKOR varijante na vreme preživljavanja

Najkraće vreme preživljavanja domaćeg miša utvrđeno je kod Leu128Ser jedinki sa srednjom vrednošću od 198 h, dok je najduže vreme preživljavanja zabeleženo kod jedinki sa kombinacijom varijanti Leu128Ser/Tyr139Cys. Takođe, slično vreme preživljavanja imale su i Tyr139Cys jedinke. Oba nosioca Ala21Thr varijante preživela su 21 dan testa hranjenja, odnosno 504 h (tabela 27).

Na kraju testa preživelo je 66,67% jedinki sa Tyr139Cys varijantom i 63,64% Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki. Nije bilo preživelih jedinki sa Leu128Ser varijantom (grafik 9).

Tabela 27. Vreme preživljavanja (sati) i smrtnost domaćeg miša prema tipu VKOR varijante

| VKOR varijanta          | Vreme preživljavanja | Broj uginulih |         | Broj preživelih |         | Broj jedinki |
|-------------------------|----------------------|---------------|---------|-----------------|---------|--------------|
|                         | MS $\pm$ SD          | Ženke         | Mužjaci | Ženke           | Mužjaci |              |
| Leu128Cys               | 198,0 $\pm$ 112,4    | 3             | 5       | 0               | 0       | 8            |
| Tyr139Cys               | 382,0 $\pm$ 183,8    | 0             | 4       | 4               | 4       | 12           |
| Leu128Cys/<br>Tyr139Cys | 399,3 $\pm$ 154,9    | 2             | 2       | 6               | 1       | 11           |
| Ala21Thr                | 504,0 $\pm$ -        | 0             | 0       | 0               | 1       | 1            |
| Ala21Thr/<br>Tyr139Cys  | 504,0 $\pm$ -        | 0             | 0       | 1               | 0       | 1            |
| Ukupno                  |                      | 5             | 11      | 11              | 6       | 33           |



Grafik 9. Kumulativna proporcija preživljavanja domaćeg miša za nosioce Leu128Ser (—), Tyr139Cys (—) i Leu128Ser/ Tyr139Cys (—) varijanti

Vreme preživljavanja jedinki domaćeg miša sa različitim tipom VKOR varijante statistički se značajno razlikovalo. Između Tyr139Cys i Leu128Cys/Tyr139Cys jedinki nije bilo statistički značajnih razlika, dok se vreme preživljavanja Leu128Cys jedinki statistički značajno razlikovalo od pomenute dve varijante (tabela 28).



Tabela 28. Statistička značajnost razlika za vreme preživljavanja domaćeg miša sa različitim tipom VKOR varijante prema Log-rank testu

|                     | Leu128Cys            | Tyr139Cys           | Leu128Cys/Tyr139Cys  |
|---------------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| Leu128Cys           | -                    | -4,034 <sup>*</sup> | -4,589 <sup>**</sup> |
| Tyr139Cys           | -4,034 <sup>*</sup>  | -                   | -0,027 <sup>nz</sup> |
| Leu128Cys/Tyr139Cys | -4,589 <sup>**</sup> | 0,027 <sup>nz</sup> | -                    |

Napomena: <sup>nz</sup> Nije značajno ( $p < 0,05$ ); <sup>\*</sup> Značajno ( $0,01 < p < 0,05$ ); <sup>\*\*</sup> Značajno ( $p < 0,01$ )

#### 4.2.3 Uticaj VKOR varijante na konzumaciju mamca

Najniža ukupna konzumacija mamca utvrđena je kod nosioca Leu128Ser varijante ( $1,49 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ ), dok je najveća konzumacija mamca utvrđena kod Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki (tabela 29 i grafik 10).

Najniža prosečna konzumacija utvrđena je kod Leu128Ser jedinki ( $0,17 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ ), dok je najveća konzumacija utvrđena kod Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki (tabela 29 i grafik 11).

Za različite tipove varijanti *vkorc1* gena utvrđena je statistički značajna razlika u ukupnoj konzumaciji između varijanti Leu128Ser/Tyr139Cys, Leu128Ser i Tyr139Cys ( $F_{2,28}=5,81$ ;  $p < 0,0080$ ).

Statističkom analizom varijanse utvrđene su značajne razlike u prosečnoj konzumaciji između ove tri grupe jedinki ( $F_{2,28}=8,36$ ;  $p < 0,0014$ ).

Grupe Ala21Thr i Ala21Thr/Tyr139Cys bile su isključene iz statističke obrade zbog nedovoljnog broja jedinki koji je potreban za statističku analizu u ovim grupama, ali su njihovi predstavnici pokazali visok nivo rezistentnosti na bromadiolon na osnovu vrednosti ukupne konzumacije (tabela 29 i grafik 12).

Uticaj VKOR varijante i genotipa na konzumaciju nije mogao biti statistički analiziran s obzirom da nije bilo dovoljno jedinki u pojedinim grupama. Utvrđeno je veći nivo rezistentnosti na bromadiolon, sa srednjom vrednošću ukupne konzumacije od  $3,35 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ , kod heterozigotnih u odnosu na homozigotne jedinke ( $2,6 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ ). Takođe, kod heterozigotnih jedinki utvrđen je i veći dnevni unos mamca sa srednjom vrednošću prosečne konzumacije od  $0,21 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$  u odnosu na homozigotne jedinke ( $0,19 \text{ gg}^{-1} \text{ tm}$ ).

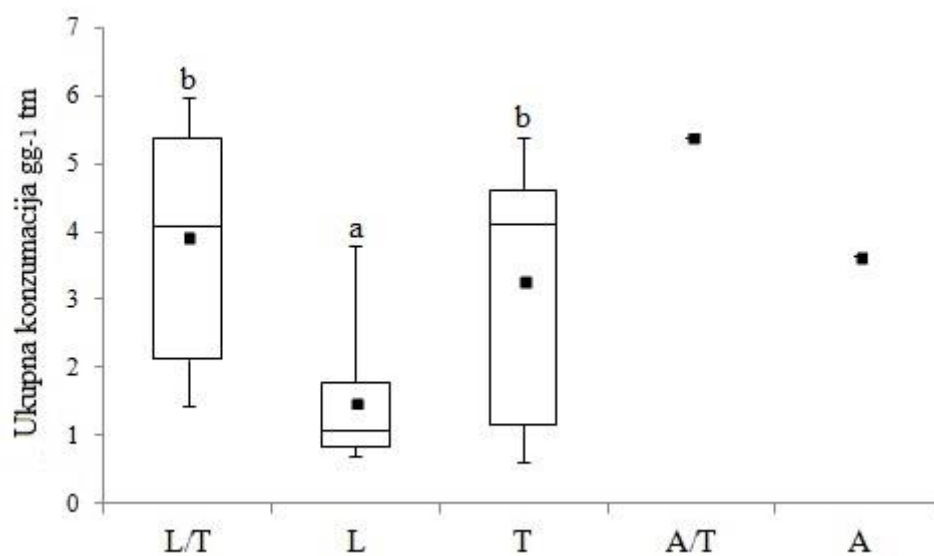
Između ove dve grupe jedinki nije bilo statistički značajne razlike u ukupnoj ( $t=1,06$ ;  $df=31$ ;  $p<0,2949$ ) i prosečnoj konzumaciji mamca ( $t=0,88$ ;  $df=31$ ;  $p<0,3849$ ).

Tabela 29. Konzumacija mamca ( $gg^{-1} tm$ ) jedinki domaćeg miša prema VKOR varijanti i genotipu

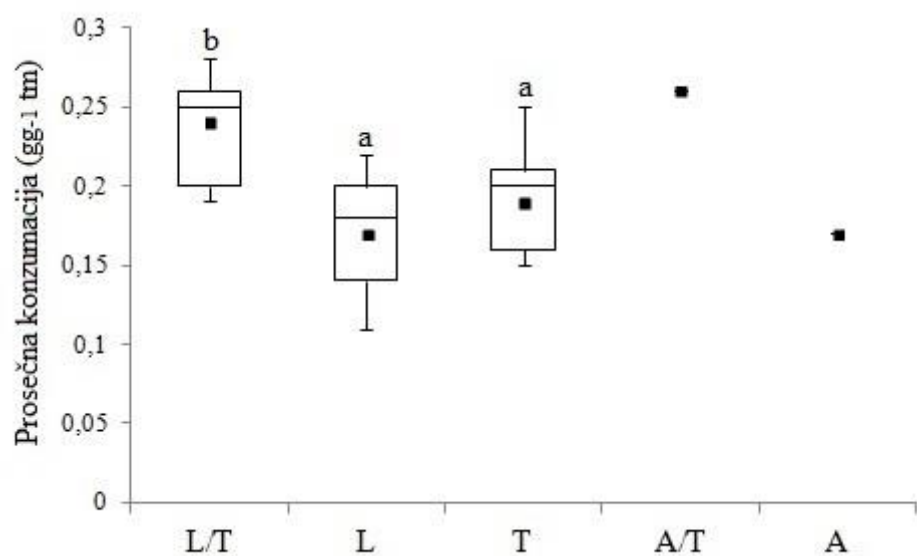
| VKOR varijanta/genotip | Ukupna            | Prosečna        |
|------------------------|-------------------|-----------------|
| Leu128Ser              | $1,49 \pm 1,06^*$ | $0,17 \pm 0,04$ |
| Tyr139Cys              | $3,30 \pm 1,81$   | $0,20 \pm 0,03$ |
| Leu128Ser/Tyr139Cys    | $3,95 \pm 1,63$   | $0,24 \pm 0,03$ |
| Ala21Thr               | $3,64 \pm -$      | $0,17 \pm -$    |
| Ala21Thr/Tyr139Cys     | $5,40 \pm -$      | $0,26 \pm -$    |
| Heterozigoti           | $3,35 \pm 1,73$   | $0,21 \pm 0,04$ |
| Homozigoti             | $2,60 \pm 2,01$   | $0,19 \pm 0,04$ |

Najveća prosečna vrednost ukupne konzumacije utvrđena je kod homozigotnih Tyr139Cys ženki ( $5,00 \pm 0,59 gg^{-1} tm$ ). Takođe, visoka konzumacija utvrđena je kod heterozigotnih ženki sa Tyr139Cys ( $4,16 \pm 0,47 gg^{-1} tm$ ) i Leu128Ser/Tyr139Cys ( $4,55 \pm 1,30 gg^{-1} tm$ ) varijantom. Kod nosioca varijante Leu128Ser, odnosno homozigotnih mužjaka i heterozigotnih mužjaka i ženki, utvrđena je niska konzumacija ( $1,67 \pm 0,83 gg^{-1} tm$ ,  $1,81 \pm 1,74 gg^{-1} tm$  i  $1,81 \pm 1,74 gg^{-1} tm$ ). Kod heterozigotne ženke sa Ala21Thr/ Tyr139Cys i mužjaka sa Ala21Thr varijantom, koji su preživeli test hranjenja bromadiolon mamcima, zabeležena je visoka konzumacija istog. Utvrđena vrednost ukupne konzumacije za Ala21Thr/ Tyr139Cys ženku od  $5,4 gg^{-1} tm$  predstavlja najveću vrednost konzumacije mamca kod ženki, dok utvrđena vrednost od  $3,64 gg^{-1} tm$  za Ala21Thr mužjaka predstavlja najveću vrednost konzumacije kod mužjaka (grafik 12).

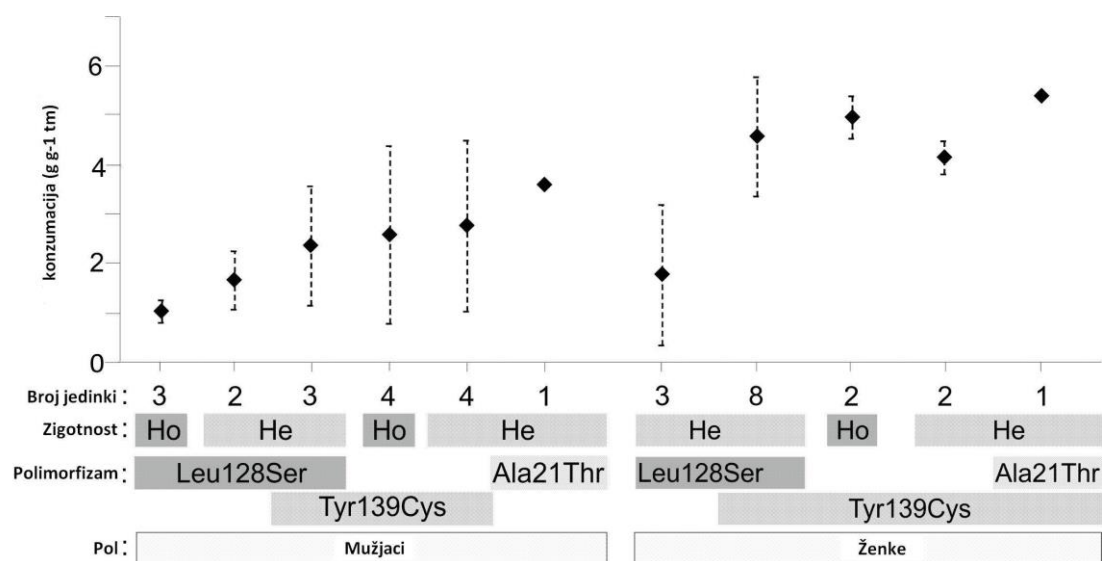
Najveća letalna i neletalna doza utvrđene su kod Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki. Najniža letalna doza utvrđena je kod Tyr139Cys jedinki. Kod jedinke koja je imala novu Ala21Thr varijantu utvrđena je manja neletalna doza nego kod jedinke koja je ovu varijantu imala u kombinaciji sa Tyr139Cys varijantom. Veća letalna i neletalna doza utvrđene su kod heterozigotnih u odnosu na homozigotne jedinke (tabela 30).



Grafik 10. Ukupna konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) divljih i jedinki  $F_1$  generacije domaćeg miša prema tipu VKOR varijante L/T- Leu128Ser/Tyr139Cys, L- Leu128Ser, T- Tyr139Cys, A/T- Ala21Thr/Tyr139Cys i A- Ala21Thr



Grafik 11. Prosečna konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) divljih i jedinki  $F_1$  generacije domaćeg miša prema tipu VKOR varijante L/T- Leu128Ser/Tyr139Cys, L- Leu128Ser, T- Tyr139Cys, A/T- Ala21Thr/Tyr139Cys i A- Ala21Thr



Grafik 12. Srednje vrednosti i standardna devijacija za ukupnu konzumaciju mamca ( $\text{gg}^{-1}\text{tm}$ ) od strane domaćeg miša sa brojem jedinki u grupama raspoređenim prema genotipu (Ho- homozigot, He-heterozigot), VKOR varijanti i polu

Tabela 30. Letalna/neletalna doza za domaćeg miša prema VKOR varijanti (L-Leu128Ser; T-Tyr139Cys; L/T-Leu128Ser/Tyr139Cys; A-Ala21Thr; A/T-Ala21Thr/Tyr139Cys) i genotipu (He-Heterozigoti; Ho-Homozigoti)

| VKOR<br>varijanta | Letalna doza<br>(mg/kg) |            | LFP |          | Neletalna doza<br>(mg/kg) |             |
|-------------------|-------------------------|------------|-----|----------|---------------------------|-------------|
|                   | Ms±Sd                   | min-max    | Ms  | Interval | Ms±Sd                     | min-max     |
| L                 | 74,3±53,2               | 34,5-191,0 | 8,2 | 4-18     | -                         | -           |
| T                 | 47,3±23,4               | 30,5-74,0  | 6,3 | 4-10     | 221,6±23,4                | 191,0-262,0 |
| L/T               | 105,9±42,4              | 71,0-165,5 | 9,0 | 6-15     | 250,0±36,8                | 203,0-298,5 |
| A                 | -                       | -          | -   | -        | 182,0±-                   | -           |
| A/T               | -                       | -          | -   | -        | 270,0±-                   | -           |
| He                | 87,9±52,1               | 30,5-191,0 | 8,8 | 4-18     | 235,4±37,0                | 182,0-298,5 |
| Ho                | 48,2±13,5               | 37,5-65,5  | 6   | 4-9      | 231,2±29,8                | 202,5-262,0 |

#### 4.2.4 Uticaj VKOR varijante na promenu telesne mase

Kod svih jedinki, osim nekih nosilaca Leu128Ser/Tyr139Cys varijante, utvrđen je gubitak u telesnoj masi tokom testa hranjenja bromadiolon mamcima (grafik 13). Najmanji gubitak telesne mase tokom testa hranjenja utvrđen je kod

Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki. Najveći gubitak telesne mase zabeležen je u grupi Leu128Ser jedinki. Nosioći Ala21Thr varijante, odnosno Ala21Thr i Ala21Thr/Tyr139Cys, takođe su gubili na telesnoj masi tokom trajanja testa (tabela 31).

Tabela 31. Promena telesne mase domaćeg miša prema VKOR varijanti

| VKOR varijanta       | Promena (%) |       |       | Broj jedinki |
|----------------------|-------------|-------|-------|--------------|
|                      | Ms±Sd       | Min   | Max   |              |
| Leu128Ser            | 15,89±8,60  | 5,36  | 28,31 | 8            |
| Tyr139Cys            | 9,52±5,49   | 1,77  | 20,47 | 12           |
| Leu128Ser/ Tyr139Cys | 1,97±2,85   | -8,27 | 7,86  | 11           |
| Ala21Thr             | 10,13±-     | -     | -     | 1            |
| Ala21Thr /Tyr139Cys  | 5,38±-      | -     | -     | 1            |

Tabela 32. Promena telesne mase mužjaka i ženki domaćeg miša prema VKOR varijanti

| VKOR varijanta       | Pol     | Promena (%) |       |       | Broj jedinki |
|----------------------|---------|-------------|-------|-------|--------------|
|                      |         | Ms±Sd       | Min   | Max   |              |
| Leu128Ser            | Ženke   | 16,91±9,12  | 10,34 | 27,33 | 3            |
|                      | Mužjaci | 15,28±9,31  | 5,36  | 28,31 | 5            |
| Tyr139Cys            | Ženke   | 6,40±4,86   | 1,77  | 13,12 | 4            |
|                      | Mužjaci | 11,08±5,37  | 4,37  | 20,47 | 8            |
| Leu128Ser/ Tyr139Cys | Ženke   | 1,96±6,69   | -8,27 | 7,86  | 8            |
|                      | Mužjaci | 1,99±3,81   | -2,34 | 4,82  | 3            |
| Ala21Thr             | Ženke   | -           | -     | -     | 0            |
|                      | Mužjaci | 10,13±-     | 10,13 | 10,13 | 1            |
| Ala21Thr/ Tyr139Cys  | Ženke   | 5,38±-      | 5,38  | 5,38  | 1            |
|                      | Mužjaci | -           | -     | -     | 0            |

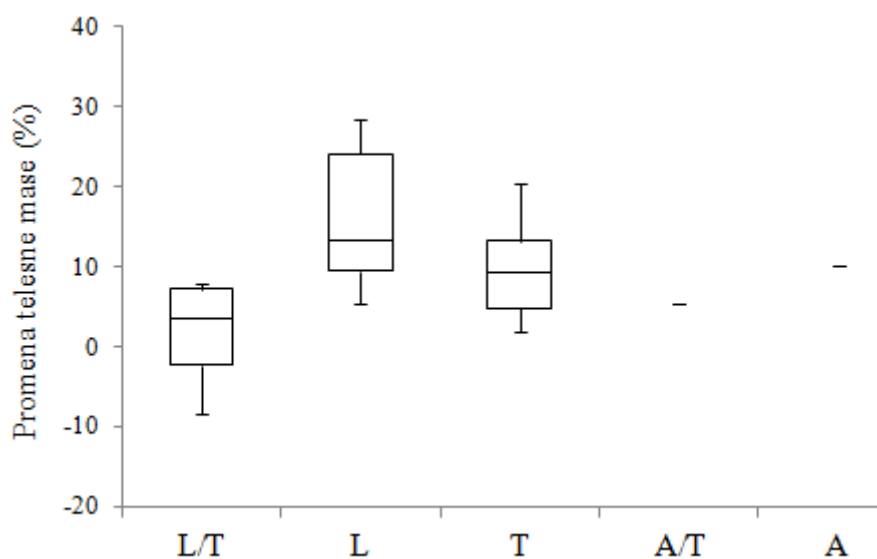
Utvrđen je statistički značajan uticaj VKOR varijante na promenu telesne mase ( $H=13,24$ ;  $p<0,0013$ ). Statistički značajne razlike u promeni telesne mase utvrđene su između nosilaca Leu128Ser i Leu128Ser/Tyr139Cys. Između nosilaca Tyr139Cys i

Leu128Ser/Tyr139Cys, kao i Leu128Ser i Tyr139Cys nisu utvrđene statistički značajne razlike.

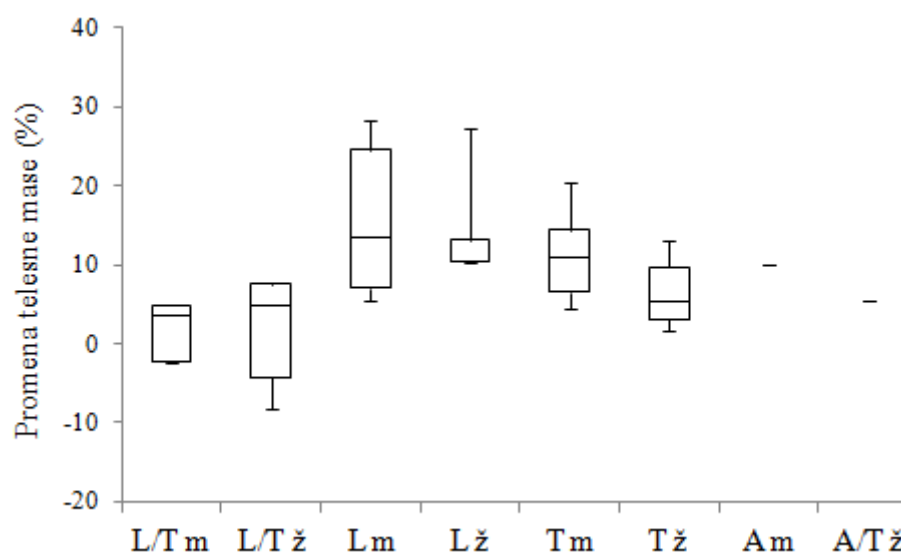
Kod Leu128Ser/Tyr139Cys ženki utvrđen je najmanji gubitak telesne mase tokom testa hranjenja (tabela 32 i grafik 14). Najmanji gubitak telesne mase kod mužjaka utvrđen je kod nosilaca Leu128Ser/Tyr139Cys varijante. Kod nosilaca Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys ženke utvrđen je manji gubitak telesne mase u odnosu na mužjake.

Razlike u promeni telesne mase između pripadnika različitih grupa formiranih prema polu i VKOR varijanti su potvrđene statističkom analizom ( $H=15,40$ ;  $p<0,0088$ ).

Veći gubitak telesne mase zabeležen je kod homozigotnih u odnosu na heterozigotne jedinke (tabela 33). Statistički značajne razlike u promeni telesne mase između ove dve grupe jedinki nisu utvrđene ( $z=1,82$ ;  $P<0,0689$ ).



Grafik 13. Promena telesne mase (%) divljih i jedinki  $F_1$  generacije domaćeg miša prema VKOR varijanti (L/T- Leu128Ser/Tyr139Cys, L- Leu128Ser, T- Tyr139Cys, A/T- Ala21Thr/Tyr139Cys i A- Ala21Thr)



Grafik 14. Promena telesne mase (%) divljih i jedinki F<sub>1</sub> generacije domaćeg miša prema VKOR varijanti i polu (L/Tm- Leu128Ser/Tyr139Cys mužjaci; L/Tž- Leu128Ser/Tyr139Cys ženke; Lm- Leu128Ser mužjaci; Lž- Leu128Ser ženke; Tm- Tyr139Cys mužjaci; Tž- Tyr139Cys ženke; Am- Ala21Thr mužjak; A/Tž- Ala21Thr/Tyr139Cys ženka)

Tabela 33. Promena telesne mase (%) domaćeg miša prema genotipu

| Genotip      | Promena (%) |       |       | Broj jedinki |
|--------------|-------------|-------|-------|--------------|
|              | Ms±Sd       | Min   | Max   |              |
| Heterozigoti | 7,28±8,36   | -8,27 | 27,33 | 24           |
| Homozigoti   | 11,74±7,48  | 1,77  | 28,31 | 9            |

#### 4.3 OSETLJIVOST DOMAĆEG MIŠA NA DIFENAKUM

##### 4.3.1 Vreme preživljavanja

Smrtnost jedinki u testu hranjenja difenakum mamcima, koje su prethodno preživele testove hranjenja bromadiolon mamcima u trajanju od 21 dan, bila je 100 %. Svih 16 jedinki čije su VKOR varijante bile poznate, kao i 4 jedinke čija sekvenca *vkorc1* gena nije bila poznata ali su bile rezistentne na bromadiolon, uginule su tokom testa hranjenja difenakum mamcima (tabela 34).

Sve jedinke koje su bile uključene u test hranjenja difenakumom bile su nosioci Tyr139Cys varijante. Osam jedinki bile su nosioci samo Tyr139Cys varijante, dok su

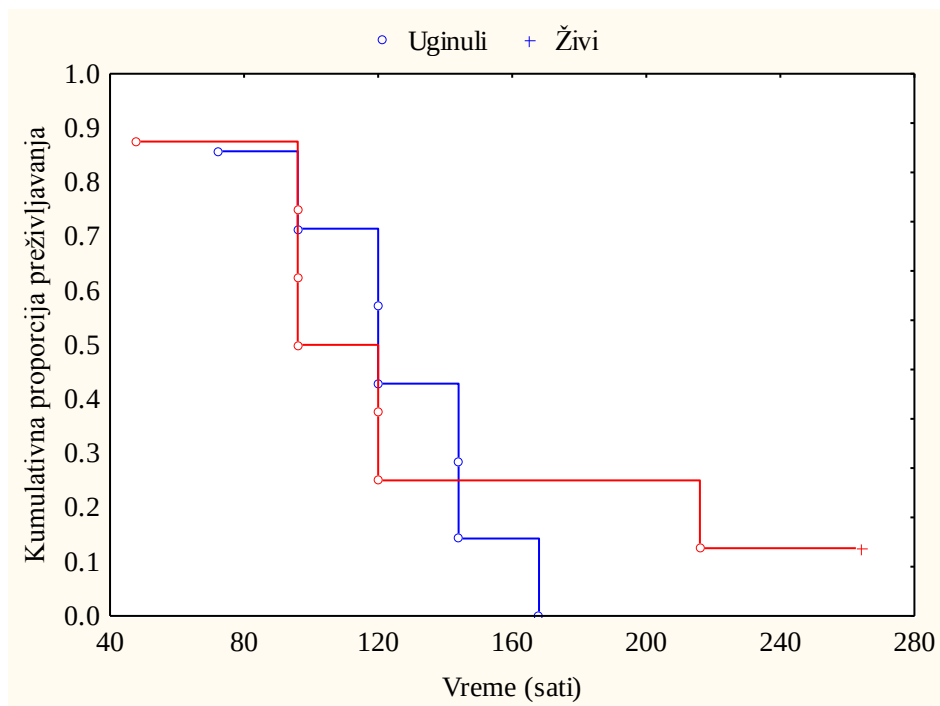
ostale jedinke bile nosioci ove varijante u kombinaciji sa drugim varijantama (Ala21Thr i Leu128Ser).

Do dvanaestog dana testa je uginulo svih 20 jedinki domaćeg miša (grafik 15). Svi nosioci Leu128Ser/Tyr139Cys varijante uginuli su do osmog dana testa, dok su sve jedinke sa Tyr139Cys varijantom uginule do dvanaestog dana testa. Jedinke čija sekvenca *vkorc1* gena nije bila poznata uginule su do osmog dana testa. Ženka nosilac kombinacije varijanti, Ala21Thr/ Tyr139Cys, uginula je do petog dana testa.

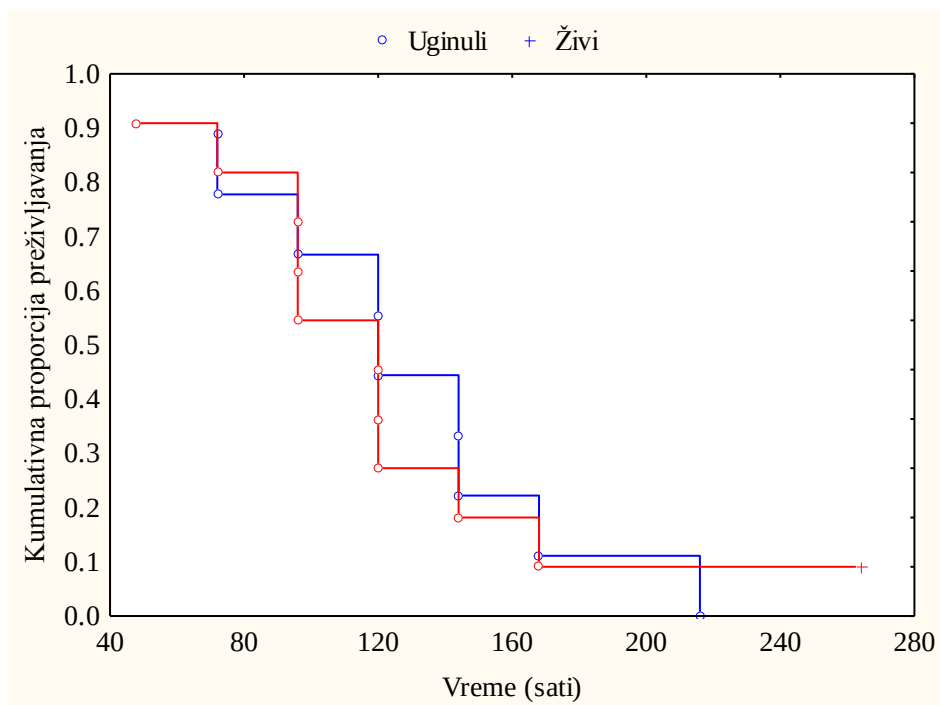
Tabela 34. Osnovni podaci o jedinkama domaćeg miša koje su uključene u test hranjenja difenakum mamcima

| Poreklo                   | Pol     | VKOR varijanta       | Genotip     |
|---------------------------|---------|----------------------|-------------|
| Divlje jedinke            | Mužjaci | Tyr139Cys            | heterozigot |
|                           |         | Tyr139Cys            | heterozigot |
|                           |         | Leu128Ser/ Tyr139Cys | heterozigot |
|                           | Ženke   | Leu128Ser/ Tyr139Cys | heterozigot |
|                           |         | Leu128Ser/ Tyr139Cys | heterozigot |
|                           |         | Tyr139Cys            | heterozigot |
|                           |         | Ala21Thr/ Tyr139Cys  | heterozigot |
|                           |         | Leu128Ser/ Tyr139Cys | heterozigot |
|                           |         | Leu128Ser/ Tyr139Cys | heterozigot |
|                           |         |                      |             |
|                           |         |                      |             |
| F <sub>1</sub> generacija | Mužjaci | Tyr139Cys            | homozigot   |
|                           |         | Tyr139Cys            | homozigot   |
|                           |         | -                    | heterozigot |
|                           |         | -                    | heterozigot |
|                           |         | -                    | heterozigot |
|                           | Ženke   | -                    | heterozigot |
|                           |         | Leu128Ser/ Tyr139Cys | heterozigot |
|                           |         | Leu128Ser/ Tyr139Cys | heterozigot |
|                           |         | Tyr139Cys            | homozigot   |
|                           |         | Tyr139Cys            | homozigot   |
|                           |         | Tyr139Cys            | heterozigot |

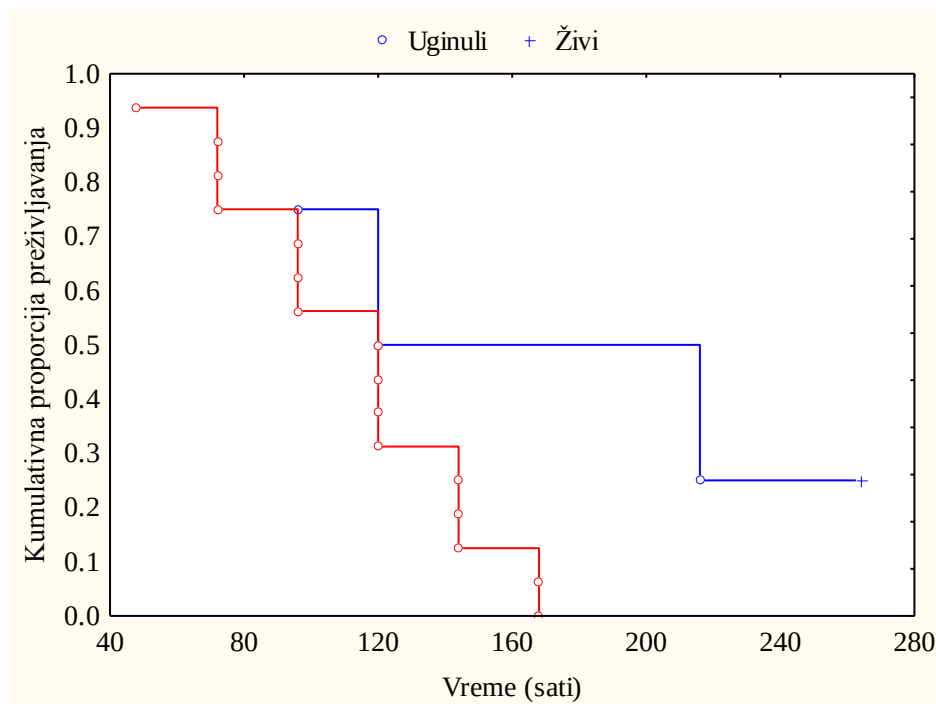




Grafik 15. Kumulativna proporcija preživljavanja domaćeg miša za nosioce Leu128Ser/Tyr139Cys (—) i Tyr139Cys (—) varijanti tokom testa hranjenja difenakum mamcima



Grafik 16. Kumulativna proporcija preživljavanja za mužjake (—) i ženke (—) domaćeg miša tokom testa hranjenja difenakum mamcima



Grafik 17. Kumulativna proporcija preživljavanja za homozigotne (—) i heterozigotne (—) jedinke domaćeg miša tokom testa hranjenja difenakum mamcima

Za Tyr139Cys jedinke utvrđeno je duže vreme preživljavanja jedinki domaćeg miša u testu hranjenja difenakum mamcima ( $132,0 \pm 71,4$  h) u odnosu na nosioce Leu128Ser/Tyr139Cys varijante ( $123,4 \pm 32,3$  h). Sve testirane jedinke uginule su u roku od 264 sata (11 dana).

Statistički značajne razlike u vremenu preživljavanja nisu utvrđene između grupa jedinki prema VKOR varijanti, odnosno smrtnost jedinki bila je ista kod svih pomenutih grupa nakon testa hranjenja difenakum mamcima ( $WW=0,432$ ;  $p<0,7831$ ).

Kod mužjaka je utvrđen period preživljavanja od 3 do 9 dana, dok je kod ženki bio od 2 do 11 dana. Kod mužjaka je utvrđena nominalno veća prosečna vrednost vremena preživljavanja ( $128,0 \pm 46,5$  h) u odnosu na ženke ( $122,2 \pm 57,2$  h).

Statistički značajne razlike u vremenu preživljavanja između mužjaka i ženki nisu utvrđene ( $WW=-0,335$ ;  $p<0,8532$ ).

Period preživljavanja od 2 do 7 dana utvrđen je kod heterozigotnih jedinki, dok je period od 4 do 11 dana utvrđen za homozigotne jedinke. Nominalno veće prosečne

vrednosti vremena preživljavanja utvrđene su kod homozigotnih jedinki ( $174,0 \pm 79,3$  h) u odnosu na heterozigotne jedinke ( $112,0 \pm 32,3$  h).

Genotip nije ispoljio uticaj na vreme preživljavanja jedinki domaćeg miša u testu hranjenja difenakum mamcem ( $WW=2,626$ ;  $p<0,0581$ ).

Kod svih uginulih jedinki autopsijom su potvrđeni simptomi trovanja antikoagulantima. Pored spoljašnjih simptoma kao što su krvarenje iz nosa, anusa i krvav feces, potvrđeni su i znaci unutrašnjeg krvarenja u plućima i crevnom traktu.

#### **4.3.2 Konzumacija mamca**

Difenakum je ispoljio podjednako dobru efikasnost na sve rezistentne jedinke bez obzira na VKOR varijantu. Za nosioce kombinacija VKOR varijanti utvrđene su nominalno veće vrednosti ukupne konzumacije mamca. Kod ženke sa kombinacijom Ala21Thr/Tyr139Cys zabeležena je najveća vrednost ukupne konzumacije. Jedinke čija sekvenca *vkorc1* gena nije bila poznata, konzumirale su mamac slično kao nosioci Tyr139Cys varijante (tabela 35 i grafik 18).

Između nosilaca Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys varijanti nisu utvrđene statistički značajne razlike u ukupnoj konzumaciji mamca ( $t=0,78$ ;  $p<0,4479$ ).

Najmanje vrednosti prosečne konzumacije utvrđene su kod jedinki sa Tyr139Cys varijantom, dok je nominalno najveća vrednost prosečne konzumacije utvrđena kod ženke sa Ala21Thr/Tyr139Cys varijantom (tabela 35 i grafik 19).

Između nosilaca Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys varijanti nisu utvrđene statistički značajne razlike u prosečnoj konzumaciji mamca ( $t=1,83$ ;  $p<0,0896$ ).

Nominalno veće vrednosti ukupne konzumacije difenakum mamca utvrđene su kod homozigotnih jedinki (tabela 36). Genotip nije ispoljio uticaj na ukupnu konzumaciju mamca, odnosno statističkim analizama nisu utvrđene razlike u konzumaciji mamca kod ove dve grupe jedinki ( $t=0,71$ ;  $p<0,4849$ ).

Kod heterozigotnih jedinki su utvrđene nominalno veće vrednosti prosečne konzumacije mamca (tabela 36). Statističke razlike u prosečnoj konzumaciji mamca između ove dve grupe jedinki nisu utvrđene ( $t=1,84$ ;  $p<0,0862$ ).

Kod ženki su utvrđene nominalno veće vrednosti ukupne i prosečne konzumacije (tabela 36). Statistički značajne razlike nisu potvrđene u ukupnoj ( $t=0,54$ ;  $p<0,5941$ ) i prosečnoj ( $t=0,49$ ;  $p<0,6291$ ) konzumaciji difenakum mamca.

Tabela 35. Konzumacija difenakum mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) od strane domaćeg miša prema VKOR varijantama

| VKOR varijanta        | Ukupna          | Prosečna        |
|-----------------------|-----------------|-----------------|
| Tyr139Cys             | $0,63 \pm 0,31$ | $0,12 \pm 0,03$ |
| Leu128Ser/ Tyr139Cys  | $0,74 \pm 0,23$ | $0,15 \pm 0,03$ |
| Nepoznat polimorfizam | $0,66 \pm 0,14$ | $0,15 \pm 0,06$ |
| Ala21Thr/ Tyr139Cys   | $0,79 \pm -$    | $0,16 \pm -$    |

Tabela 36. Konzumacija mamca ( $\text{gg}^{-1} \text{tm}$ ) od strane domaćeg miša prema polu i genotipu

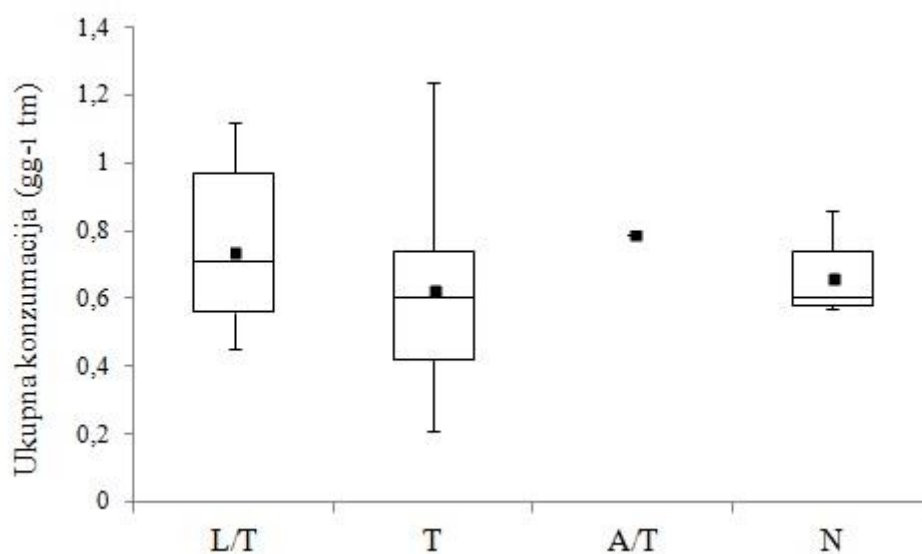
| Parametri | Pol             |                 | Genotip         |                 |
|-----------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|           | Mužjaci         | Ženke           | Heterozigoti    | Homozigoti      |
| Ukupna    | $0,65 \pm 0,14$ | $0,71 \pm 0,31$ | $0,65 \pm 0,25$ | $0,77 \pm 0,36$ |
| Prosečna  | $0,13 \pm 0,04$ | $0,14 \pm 0,03$ | $0,14 \pm 0,03$ | $0,11 \pm 0,03$ |

Tabela 37. Letalne doze za domaćeg miša prema VKOR varijanti

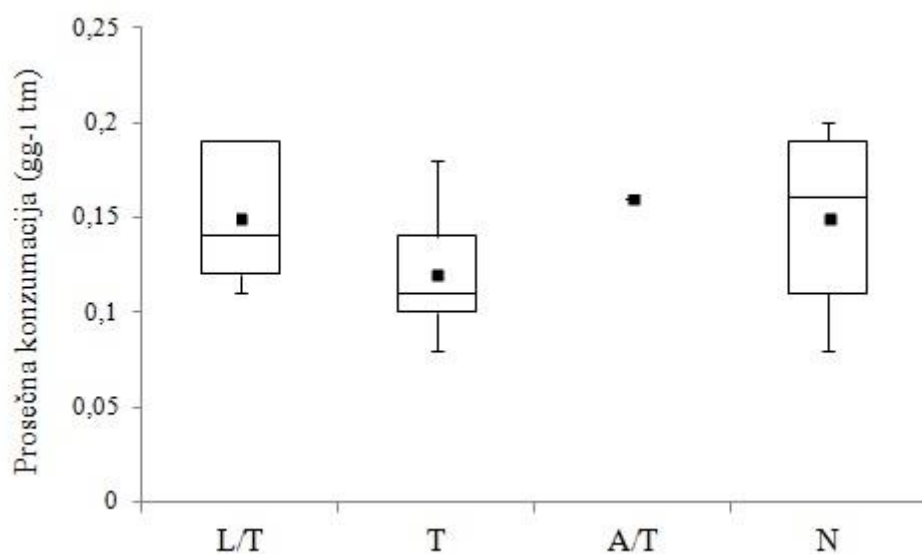
| VKOR varijanta      | Letalna doza<br>( $\text{mg/kg}$ ) |           | LFP |          |
|---------------------|------------------------------------|-----------|-----|----------|
|                     | $\text{Ms} \pm \text{Sd}$          | min-max   | Ms  | Interval |
| Tyr139Cys           | $31,6 \pm 15,7$                    | 10,5-63,0 | 5,5 | 2-11     |
| Leu128Ser/Tyr139Cys | $37,2 \pm 11,5$                    | 22,5-56,0 | 5,1 | 3-7      |
| Ala21Thr/Tyr139Cys  | $39,5 \pm -$                       | -         | -   | -        |
| Nepoznata varijanta | $33,0 \pm 7,1$                     | 28,5-43,5 | 4,7 | 3-7      |

Kod jedinki sa kombinacijom varijanti utvrđena je veća letalna doza u odnosu na Tyr139Cys jedinke. Jedinke čija sekvenca *vkorc1* gena nije bila poznata približno su imale istu letalnu dozu kao i Tyr139Cys jedinke. Letalna doza Ala21Thr/Tyr139Cys nominalno je bila veća od prosečnih vrednosti za ostale grupe jedinki (tabela 37).

Nominalno veće letalne doze utvrđene su kod ženki. Takođe, kod homozigotnih jedinki je utvrđena nominalno veća letalna doza (tabela 38).



Grafik 18. Ukupna konzumacija difenakum mamca (gg<sup>-1</sup> tm) od strane jedinki domaćeg miša koje su nosioci L/T- Leu128Ser/Tyr139Cys, T- Tyr139Cys, A/T-Ala21Thr/Tyr139Cys varijanti i jedinki čija sekvenca *vkorc1* gena nije bila poznata (N)



Grafik 19. Prosečna konzumacija difenakum mamca (gg<sup>-1</sup> tm) od strane jedinki domaćeg miša koje su nosioci L/T- Leu128Ser/Tyr139Cys, T- Tyr139Cys, A/T-Ala21Thr/Tyr139Cys varijanti i jedinki čija sekvenca *vkorc1* gena nije bila poznata (N)

Tabela 38. Letalne doze za domaćeg miša prema polu i genotipu

| Pol/Genotip  | Letalna doza<br>(mg/kg) |           | LFP |          |
|--------------|-------------------------|-----------|-----|----------|
|              | Ms±Sd                   | min-max   | Ms  | Interval |
| Mužjaci      | 32,5±6,9                | 20,5±43,5 | 5,3 | 3-9      |
| Ženke        | 35,6±15,5               | 10,5±63,0 | 4,9 | 3-11     |
| Heterozigoti | 33,1±12,1               | 10,5±56,0 | 4,7 | 2-7      |
| Homozigoti   | 38,7±18,0               | 20,5±63,0 | 7,2 | 4-11     |

### 4.3.3 Promena telesne mase

Povećanje telesne mase zabeleženo je jedino kod jedinki čija sekvenca *vkorc1* gena nije bila poznata. Kod ostalih jedinki domaćeg miša ili nije bilo promene ili su jedinke gubile na telesnoj masi tokom testa (tabela 39 i grafik 20).

Jedinke sa Tyr139Cys varijantom, odnosno nosioci Tyr139Cys ili Tyr139Cys /Leu128Ser varijante ili nisu menjali svoju telesnu masu ili su gubili na telesnoj masi. Najveći gubitak telesne mase utvrđen je kod Tyr139Cys homozigotne ženke.

Tabela 39. Promena telesne mase jedinki domaćeg miša prema VKOR varijanti

| VKOR varijanta       | Promena (%) |       |      | Broj jedinki |
|----------------------|-------------|-------|------|--------------|
|                      | Ms±Sd       | Min   | Max  |              |
| Tyr139Cys            | 0,07±0,09   | 0     | 0,26 | 8            |
| Leu128Ser/ Tyr139Cys | 0,04±0,04   | 0     | 0,12 | 7            |
| Ala21Thr /Tyr139Cys  | 0,03±-      | -     | -    | 1            |
| Nepoznata varijanta  | 0,07±0,06   | -0,02 | 0,14 | 4            |

Najmanja prosečna vrednost promene telesne mase utvrđena je kod jedinki sa kombinacijom Leu128Ser/Tyr139Cys. Kod jedinki sa Tyr139Cys varijantom i jedinki čija varijanta nije bila poznata utvrđene su iste prosečne vrednosti promene telesne mase. Nominalno najmanja vrednost promene telesne mase od 0,03 % utvrđena je kod ženke sa Ala21Thr/Tyr139Cys varijantom.

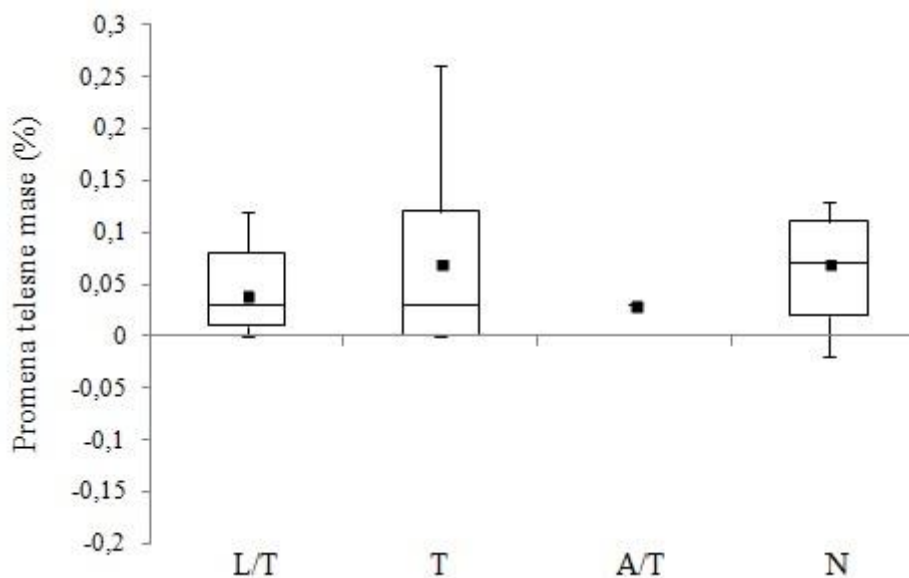
Tabela 40. Promena telesne mase za jedinke domaćeg miša prema polu i genotipu

| Pol/Genotip  | Promena (%) |       |      | Broj jedinki |
|--------------|-------------|-------|------|--------------|
|              | Ms±Sd       | Min   | Max  |              |
| Mužjaci      | 0,05±0,06   | -0,02 | 0,15 | 9            |
| Ženke        | 0,06±0,08   | 0     | 0,26 | 11           |
| Heterozigoti | 0,04±0,04   | 0     | 0,12 | 12           |
| Homozigoti   | 0,10±0,13   | 0     | 0,26 | 4            |

Statistički značajne razlike u promeni telesne mase između nosilaca Tar139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys varijanti nisu utvrđene ( $z=0,17$ ;  $p<0,8622$ ).

Kod mužjaka i ženki utvrđena je približno ista promena telesne mase. Veći opseg variranja telesne mase utvrđen je kod mužjaka (tabela 40).

Statističkim analizama je utvrđeno da pol nije imao uticaja na promenu telesne mase ( $z=0,15$ ;  $p<0,88792$ ).



Grafik 20. Promena telesne mase (%) za nosioce L/T- Leu128Ser/Tyr139Cys, T- Tyr139Cys, A/T-Ala21Thr/Tyr139Cys i jedinke domaćeg miša čija varijanta nije bila poznata (N)

Broj homozigotnih jedinki uključenih u test hranjenja difenakum mamcem je bio višestruko manji od broja heterozigotnih jedinki, ali je utvrđena prosečna vrednost promene telesne mase bila veća od promene telesne mase heterozigotnih jedinki. Takođe je utvrđeno da na promenu telesne mase tokom testa hranjenja difenakum mamcem nije imao uticaja ni genotip ( $z=0,24$ ;  $p<0,8084$ ).

#### 4.4 OSETLJIVOST DOMAĆEG MIŠA NA BRODIFAKUM

Smrtnost jedinki domaćeg miša u testu hranjenja brodifakum mamcem pri ekspoziciji od 24 h bila je 90 %, odnosno jedna jedinka je preživela period ekspozicije i period opservacije. Pri ekspoziciji od 48 h smrtnost jedinki u testu bila je 100 % (tabela 41).

Tabela 41. Dnevni unos brodifakum mamca i smrtnost jedinki domaćeg miša koje su izlagane brodifakum mamcima u trajanju od 24 h i 48 h

| Pol     | Unos mamca (g) | Smrtnost | Unos mamka (g) |        | Smrtnost |
|---------|----------------|----------|----------------|--------|----------|
|         |                |          | 1. dan         | 2. dan |          |
| Ženke   | 2,9            | 4/5      | 3,6            | 3,6    | 5/5      |
|         | 3,6            |          | 4,3            | 4,4    |          |
|         | 3,1            |          | 4,9            | 4,7    |          |
|         | 4,1            |          | 5,4            | 5,5    |          |
|         | 4,4            |          | 5,1            | 4,5    |          |
| Mužjaci | 3,2            | 5/5      | 3,3            | 3,3    | 5/5      |
|         | 3,0            |          | 2,9            | 3,2    |          |
|         | 4,2            |          | 2,3            | 2,7    |          |
|         | 4,2            |          | 3,4            | 4,4    |          |
|         | 3,0            |          | 3,9            | 4,4    |          |

Sve uginule jedinke iz testa 24 h ekspozicije uginule su do šestog dana tokom perioda opservacije. Kod nekih jedinki spoljašnji simptomi trovanja (slaba pokretljivost, krvarenje iz nosa) bili su vidni već prvog dana perioda opservacije. Kod jedinki iz testa izlaganja brodifakum mamcima u trajanju od 48 h tokom perioda opservacije zabeležena su uginjavanja. Sve ženke su uginule do sedmog dana, dok su mužjaci uginuli u periodu od 4. do 18. dana perioda opservacije. Pri obe ekspozicije (24 i 48 h) kod ženki je utvrđen veći unos brodifakum mamca. Prosečna vrednost konzumacije u



testu od 48 h ekspozicije bila je manja nego u testu 24 h kod mužjaka, dok je kod ženki bila veća (tabela 42).

Kod ženki je utvrđena nominalno veća letalna doza u oba testa, odnosno pri ekspoziciji od 24 i 48 h (tabela 43). Neletalna doza za ženku koja je preživela ekspoziciju od 24 h i period opservacije od 21 dan, bila je manja od letalne doze ženki u istom testu. Svi mužjaci su uginuli tokom perioda opservacije nakon oba perioda ekspozicije. U oba testa hranjenja brodifakum mamcem, 24 i 48 h, kod ženki je utvrđena veća letalna doza.

Kod svih uginulih jedinki autopsijom su potvrđeni simptomi trovanja antikoagulantima. Pored spoljašnjih simptoma kao što su krvarenje iz nosa, anusa i krvav feces, potvrđeni su i znaci unutrašnjeg krvarenja u plućima i crevnom traktu.

Tabela 42. Prosečna količina konzumiranog brodifakum mamca i uginuće tretiranih jedinki domaćeg miša

| Parametri | Unos mamca (g) |           |           |           |
|-----------|----------------|-----------|-----------|-----------|
|           | 24 h           |           | 48 h      |           |
|           | Mužjaci        | Ženke     | Mužjaci   | Ženke     |
| Ms ±Sd    | 3,52±0,63      | 3,62±0,64 | 3,38±0,69 | 4,60±0,66 |
| Smrtnost  | 5/5            | 4/5       | 5/5       | 5/5       |

Tabela 43. Letalna/neletalna doza za domaćeg miša u testovima hranjenja brodifakum mamcem u periodima ekspozicije od 24 i 48 sati

| Parametri | Letalna doza<br>(mg/kg) |             | Neletalna doza<br>(mg/kg) |         |
|-----------|-------------------------|-------------|---------------------------|---------|
|           | Ms±Sd                   | min-max     | Ms±Sd                     | min-max |
| 24h       |                         |             |                           |         |
| Ženke     | 12,82±1,29              | 11,07-14,19 | 11,15±-                   | -       |
| Mužjaci   | 10,55±1,78              | 8,87-12,57  | -                         | -       |
| 48h       |                         |             |                           |         |
| Ženke     | 29,22±2,86              | 25,71-32,83 | -                         | -       |
| Mužjaci   | 21,19±3,10              | 16,67-24,69 | -                         | -       |

## 5 DISKUSIJA

### 5.1 TEST HRANJENJA BROMADIOLONOM

S obzirom da su sve jedinice domaćeg miša zadovoljile preporuke EPPO standarda (2004b), odnosno da je unos mamka na bazi bromadiolona tokom prvog dana testa veći od 20 % vrednosti ukupnog unosa placebo mamka tokom četvorodnevno testiranja, nijedna jedinka nije isključena iz testa hranjenja bromadiolonom. Na osnovu dnevnog unosa mamka sa sadržajem bromadiolona u odnosu na prethodni unos placebo mamka potvrđeno je da su jedinice domaćeg miša u našim ogledima dobro prihvatile mamak što je u skladu sa metodom EPPO standarda (2004b). Uginuće jedinki koje su u testu hranjenja deklarirane kao osetljive ne predstavlja posledicu gladi usled ne prihvatanja mamka, već posledicu unosa letalnih doza bromadiolona što je potvrđeno i naknadnom autopsijom uginulih jedinki.

Rezistentnost je potvrđena na lokalitetima Surčin i Zemun Polje. Iako proteklih godina suzbijanje domaćeg miša uglavnom nije bilo potpuno uspešno i na ostala četiri lokaliteta, na kojima je bilo primene bromadiolona, prisustvo rezistentnosti na tim lokalitetima ipak nije potvrđeno. Preživljavanje jedinki tokom suzbijanja na ovim lokalitetima stoga predstavlja posledicu neunošenja letalnih doza bromadiolona zbog prisustva alternativnih izvora hrane ili grešaka prilikom suzbijanja. Rowe i Redfern (1964, 1965) u istraživanju na jedinkama domaćeg miša utvrdili su da na uspešnost suzbijanja pored osetljivosti populacije veliki uticaj ima i ponašanje jedinki.

Intenzivna primena bromadiolona na lokalitetima Surčin i Zemun Polje dovela je do selekcionog pritiska i širenja rezistentnosti, što se moglo očekivati i na lokalitetu Smederevska Palanka. Iako na ovom lokalitetu nije bilo preživelih jedinki, utvrđen je znatno smanjen nivo osetljivosti na bromadiolon u poređenju sa ostalim lokalitetima. Jedinke sa ovog lokaliteta živele su i do osamnaestog dana testiranja. Utvrđeno je da razlika u vremenu preživljavanja kod jedinki sa ova tri lokaliteta nije bilo. Najveći nivo osetljivosti utvrđen je na lokalitetu Barajevo na kome nikada ranije nije bilo primene antikoagulanata. Sve jedinice sa ovog lokaliteta uginule su do osmog dana testa.

Da primena bromadiolona dovodi do selekcije rezistentnih jedinki ukazuju i rezultati Guidobono-a i sar. (2010) koji su testove hranjenja primenjivali na jedinice domaćeg miša izlovljene u području u kojoj se primena bromadiolona vrši i do šest puta godišnje.

Rezistentnost domaćeg miša potvrđena je u toj argentinskoj oblasti. Osetljive jedinke živele su do osamnaestog dana testa kao i osetljive jedinke sa lokaliteta Smederevska Palanka u našem istraživanju. Prosečno vreme preživljavanja za osetljive divlje jedinke iz Surčina i Zemun Polja bilo je 12 dana, dok je za ostalih pet lokaliteta, na kojima su utvrđene samo osetljive jedinke, prosečno vreme preživljavanja bilo od pet do devet dana.

Primena bromadiolona ne dovodi do promene nasledne osnove jedinki domaćeg miša već isključivo vrši selekциони pritisak na populaciju. U skladu sa tim su i rezultati Heiberg-a i sar. (2009) koji su u svom istraživanju na pacovima utvrdili da program suzbijanja glodara ne mora biti povezan sa pojavom i stepenom rezistentnosti, s obzirom da su rezistentne jedinke potvrđene i na lokalitetima gde prethodno dugi niz godina nije primenjivan nijedan antikoagulant. Međutim, intenzivna primena antikoagulanta, na koji je rezistentnost već razvijena, dovodi u prednost rezistentne jedinke. U vezi sa tim su i prethodno objavljeni rezultati Heiberg i sar. (2003) koji potvrđuju da bromadiolon ne utiče na pojavu rezistentnosti kod glodara već samo dovodi do širenja rezistentnih alela.

Kod jedinki sa lokaliteta na kojima je potvrđena rezistentnost utvrđen je veći broj preživelih ženki u odnosu na mužjake, odnosno 25 % mužjaka i 38,5 % ženki iz Surčina i 11,1 % mužjaka i 47,4 % ženki iz Zemun Polja. Duže vreme preživljavanja kod osetljivih jedinki, takođe, je utvrđeno kod ženki. U skladu sa ovim rezultatima su i rezultati Rowe-a i Redfern-a (1967) koji su kroz tri testirane kategorije (roditelji,  $F_1$  i  $F_2$  generacija) utvrdili veću smrtnost mužjaka u svakoj kategoriji u testovima hranjenja varfarinom. Takođe, razdvajanjem jedinki u našem istraživanju u kategorije divljih jedinki i njihovih potomaka u obe kategorije je potvrđena veća smrtnost mužjaka. Kod jedinki  $F_1$  generacije sa lokaliteta Zemun Polje nije bilo preživelih mužjaka dok je preživelo pet ženki. Nasuprot tome Gudobono i sar. (2010) nisu utvrdili uticaj pola na vreme preživljavanja kod divljih i laboratorijskih populacija domaćeg miša.

Veća smrtnost mužjaka u testovima hranjenja varfarinom kao i u kratkoročnim izlaganjima bromadiolonu, utvrđena je i u istraživanju Prescott-a (1996). Na manju osetljivost ženki u odnosu na mužjake ukazuju i razlike u efektivnim dozama dobijenim na osnovu rezultata BCR testa, gde su utvrđene doze veće za ženke nego za mužjake

(RRAC, 2003; Grandemange i sar., 2009). Takođe, Heiberg i sar. (2003) su utvrdili veću osetljivost mužjaka pacova na promene sadržaja vitamina K u ishrani, odnosno da niski nivoi vitamina K u hrani rezultiraju hemoragijama kod mužjaka, dok je za ženke utvrđeno da nije bilo odgovora na niske nivoe vitamina K u hrani.

Jedinke domaćeg miša ispoljile su različite nivoe rezistentnosti u zavisnosti od dužine perioda konzumacije, odnosno ukupne konzumacije mamka bromadiolona. Najveća ukupna konzumacija utvrđena je kod jedinki iz Surčina i Zemun Polja. Najmanja konzumacija utvrđena je kod jedinki iz Barajeva, dok razlika u prosečnoj konzumaciji mamka nije bilo. Jedinke iz Smederevske Palanke imale su najveću prosečnu letalnu dozu od 100,92 mg/kg dok je najmanja utvrđena kod jedinki iz Barajeva (53,32 mg/kg). Guidobono i sar. (2010) su približno istu vrednost prosečne letalne doze od 52,20 mg/kg utvrdili kod laboratorijske osetljive populacije domaćeg miša. Kod osetljivih divljih jedinki utvrđena je letalna doza od 77,90 mg/kg. Neletalne doze za preživele iz Surčina i Zemun Polja od 241,4 mg/kg i 234,3 mg/kg su mnogo veće u poređenju sa neletalnim dozama u istraživanju Rowe-a i sar. (1981) u kome je maksimalna neletalna doza u testu hranjenja bromadiolonom (0,005 %) bila 217 mg/kg, što ukazuje na visok nivo rezistentnosti jedinki iz Surčina i Zemun Polja na bromadiolon.

Rezistentne jedinke konzumirale su tri puta više mamca od osetljivih jedinki, što važi i za odnos letalnih i neletalnih doza u testu. Delovanje bromadiolona uslovalo je promene u ponašanju osetljivih jedinki i uticalo na smanjenu konzumaciju, za razliku od rezistentnih jedinki koje su nastavile sa normalnom konzumacijom do kraja testa. Rowe i Redfern (1964, 1965) u testu hranjenja varfarinom i Guidobono i sar. (2010) u testu hranjenja bromadiolonom utvrdili su moguća odstupanja u ishrani rezistentnih jedinki tokom testa, odnosno utvrđen je prekid u konzumaciji mamca uz pojavu simptoma trovanja a nakon par dana i ponovni oporavak jedinki i nastavak normalne konzumacije. Utvrđen je ujednačen unos mamca tokom 21 dan testa kod rezistentnih jedinki. Konzumacija bromadiolon mamca tokom prvih sedam dana, kao i dve naredne sedmice nije se razlikovala kod rezistentnih jedinki. Jedinke nisu preživele tako što su „izbegavale“ konzumaciju mamca već na osnovu mehanizama rezistentnosti koji ovim jedinkama omogućavaju da prežive tronedeljno izlaganje mamcima bromadiolona.

Osim razlika u vremenu preživljavanja potvrđena je razlika u konzumaciji mamca između mužjaka i ženki. U svim kategorijama formiranim prema poreklu i osetljivosti, kod ženki je zabeležena veća ukupna konzumacija mamca. Takođe, su utvrđene veće i letalne i neletalne doze kod ženki divljih jedinki i njihovih potomaka. Rezultati Redfern-a i Gill-a (1980) nisu u skladu sa tim s obzirom da je utvrđena prosečna letalna doza za mužjake od 63 mg/kg, dok je za ženke utvrđena letalna doza bila 46 mg/kg. Letalna doza za divlje mužjake u našem istraživanju bila je približno ista kao u pomenutom istraživanju i iznosila je 65,39 mg/kg. Međutim, kod divljih ženki utvrđena je veća letalna prosečna doza u odnosu na pomenuto istraživanje od 71,63 mg/kg.

Telesna masa svih jedinki tokom testa varirala je od -10,65 % do 55,89 %. Kod osetljivih jedinki je zabeležen veći gubitak telesne mase tokom testa sa prosečnom vrednosti od 11,2 % u odnosu na rezistentne jedinke sa prosečnom promenom telesne mase od 6,3 %. Interval variranja telesne mase za osetljive jedinke bio je -8,3 % do 55,9 %, dok se promena telesne mase za rezistentne jedinke kretala u intervalu od -10,6 % do 15,4 %. Da je kod osetljivih jedinki veća promena telesne mase potvrdili su Guidobono i sar. (2010). Međutim, ovi istraživači utvrdili su manji gubitak telesne mase mužjaka tokom testa kod laboratorijske i divlje osetljive i divlje rezistentne populacije domaćeg miša. U skladu sa tim su dobijeni rezultati samo u grupi osetljivih jedinki, dok je u grupi rezistentnih jedinki manja promena i gubitak telesne mase zabeležen kod ženki.

Grupisanjem jedinki prema početnoj telesnoj masi utvrđeno je da telesna masa ne utiče na preživljavanje jedinki tokom testa. Najveća smrtnost jedinki je utvrđena u grupi sa najmanjom telesnom masom, međutim u grupi sa najvećom telesnom masom nije bila najmanja smrtnost jedinki kao što je bilo očekivano. Rowe i Redfern (1964) utvrdili su da početna telesna masa jedinki utiče na stopu preživljavanja jedinki u testu. Najmanja smrtnost jedinki utvrđena je u grupi sa najvećom telesnom masom. Stopa smrtnosti se povećavala sa smanjenjem telesne mase, što nije bio slučaj u našem istraživanju.

## **5.2 UTICAJ VKOR VARIJANTE NA NIVO REZISTENTNOSTI**

Sekvencioniranjem *vkorc1* gena potvrđeno je prisustvo VKOR varijanti kod svih analiziranih uzoraka. VKOR varijante Leu128Ser i Tyr139Cys, koje se smatraju uzročnicima rezistentnosti kod domaćeg miša (Pelz i sar., 2005; Rost i sar., 2009; Pelz i sar., 2012), potvrđene su u trećem egzonu kod većine jedinki. Kombinacije ove dve

varijante su, takođe, potvrđene i kod divljih i kod jedinki  $F_1$  generacije. Pelz i sar. (2005) utvrdili su Leu128Ser i Tyr139Cys varijante samo kod rezistentnih jedinki domaćeg miša, dok kod osetljivih jedinki nisu utvrdili promene u sekvenci *vkorc1* gena. Rezistentnost ovih jedinki je prethodno utvrđena putem testa hranjenja. Iste varijante kod domaćeg miša potvrdili su Rost i sar. (2009) i Pelz i sar. (2012). Do sada su jedina potvrda o kombinacijama pomenutih varijanti kod domaćeg miša rezultati Pelz-a i sar. (2012). Ovi istraživači su, takođe, potvrdili i kombinacije ove dve varijante sa Spretus grupom.

VKOR varijanta Ala21Thr do sada nije utvrđena kod domaćeg miša. U populacijama sivog pacova u Koreji i crnog pacova u Japanu, utvrđeno je prisustvo ove promene u *vkorc1* genu (Rost i sar., 2009; Tanaka i sar., 2012). Moguće je da je Ala21 još jedna „vruća tačka“ u *vkorc1* genu koja je podložna izmenama kod više različitih vrsta. Ove promene bi stoga mogle biti povezane sa pojavom rezistentnosti na antikoagulate. Endepols i sar. (2011) utvrdili su da se kod domaćeg miša javljaju alelne varijante *vkorc1* gena koje nemaju uticaja na rezistentnost jedinki, kao što je u pomenutom istraživanju bio slučaj sa Arg58Gly varijantom. Za novu varijantu Ala21Thr za sada je nemoguće tvrditi da je uzrok pojave rezistentnosti kod jedinki domaćeg miša. U istraživanjima Rost-a i sar. (2009) i Tanaka-a i sar. (2012) nije ispitivan uticaj ove varijante na rezistentnost kod pomenutih vrsta glodara, dok su u našem istraživanju oba nosioca ove varijante preživela test hranjenja što ukazuje na mogući uticaj ove varijante na rezistentnost domaćeg miša na bromadiolon.

Kod svih analiziranih divljih jedinki utvrđene VKOR varijante bile su u heterozigotnom stanju. Kod jedinki  $F_1$  generacije utvrđeno je 37,5 % homozigotnih jedinki. Sve utvrđene kombinacije varijanti, takođe, su bile u heterozigotnom stanju što je u skladu sa utvrđenim rezultatima Pelz-a i sar. (2012). S obzirom da su kod divljih jedinki utvrđena samo heterozigotna stanja koja karakterišu početne stadijume razvoja rezistentnosti (Greaves, 1994) postoji verovatnoća da je na lokalitetima Surčin i Zemun Polje razvoj rezistentnosti na bromadiolon u početnoj fazi. Dobijanje visokog procenta homozigota već u prvoj generaciji potomaka ukazuje na potencijalnu brzinu širenja alela u populaciji domaćeg miša.

Testom hranjenja i molekularnim analizama utvrđeno je da su sve rezistentne jedinke bile nosioci neke od utvrđenih VKOR varijanti. Sve analizirane osjetljive jedinke takođe su bile nosioci različitih varijanti *vkorc1* gena. Neslaganje između fenotipa i genotipa kod domaćeg miša potvrdili su Endepols i sar. (2011, 2013) koji su u terenskim ispitivanjima utvrdili nisku efikasnost varfarina i difenakuma kod jedinki domaćeg miša koje su bile nosioci divljeg tipa. Takođe, Espinosa (2013) nije utvrdio postojanje promena u sekvenci *vkorc1* gena na uzorcima jedinki koje su izlovljavane u oblasti gde su prethodno Guidobono i sar. (2010) kod izlovljenih jedinki domaćeg miša testovima hranjenja utvrdili rezistentnost na bromadiolon. Do sada nema potvrđenih rezultata da su jedinke domaćeg miša deklarirane kao osjetljive, bile takođe i nosioci neke od VKOR varijanti pomenutog gena, što je bio slučaj u našem istraživanju.

U prilog tome da pored polimorfizma *vkorc1* gena možda postoje i neki dodatni mehanizmi, od kojih zavisi rezistentnost glodara, su utvrđeni rezultati u populacijama sivog pacova (Pelz i sar., 2005; Heiberg i sar., 2009; Endepols i sar., 2012). Pelz i sar. (2005) su prema BCR metodi 142 jedinke sivog pacova klasifikovali kao BCR-negativne, odnosno osjetljive jedinke. Sekvencioniranjem *vkorc1* gena utvrđeno je da su 137 jedinki bile nosioci divljeg tipa dok je kod pet jedinki potvrđena Tyr139Cys varijanta. Ovaj rezultat je tada smatran lažno negativnim BCR rezultatom. Heiberg i sar. (2009) su kod sivog pacova koji je izlovljavan u području intenzivne primene bromadiolona, BCR metodom utvrdili prisustvo osjetljivih i rezistentnih jedinki. Međutim, sekvencioniranjem sva tri egzona nisu potvrđene promene u sekvenci *vkorc1* gena ni u jednoj grupi jedinki. U istraživanju Endepols-a i sar. (2012) kod 44 % jedinki sivog pacova, koje su uginule tokom tretmana bromadiolonom, potvrđena je Tyr139Cys varijanta dok su ostalih 56 % jedinki bile nosioci divljeg tipa.

Najveća stopa preživljavanja od 66,7 % utvrđena je u grupi nosilaca Tyr139Cys varijante. U grupi nosilaca Leu128Ser/Tyr139Cys kombinacije preživelo je 63,6 % jedinki. Kod nosilaca Leu128Ser varijante utvrđena je smrtnost od 100 %. Grupe Ala21Thr i Ala21Thr/Tyr139Cys činila je po jedna jedinka u svakoj grupi i obe jedinke su preživele test hranjenja. Najduže vreme preživljavanja zabeleženo je u grupi Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki, dok je najkraće vreme zabeleženo kod Leu128Ser jedinki. S obzirom da statističkih razlika u vremenu preživljavanja između Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki nije bilo i da obe grupe jedinki imaju Tyr139Cys

varijantu, za koju je utvrđen visok nivo rezistentnosti, može se zaključiti da su obe grupe jedinki imale slične stope preživljavanja i vreme preživljavanja upravo kao posledica prisustva Tyr139Cys varijante.

Kod Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki utvrđena je najveća letalna i neletalna doza u odnosu na jedinke sa samo jednom od ove dve varijante. Isti rezultat je utvrđen i kod nosioca nove, Ala21Thr, varijante. Kod jedinke kod koje je ova varijanta utvrđena zajedno sa Tyr139Cys varijantom utvrđena je veća neletalna doza od jedinke koja je bila nosilac samo Ala21Thr varijante. Isti rezultati utvrđeni su i za ukupnu konzumaciju bromadiolon mamca.

Veća ukupna konzumacija mamaca kod svih varijanti *vkorc1* gena utvrđena je kod ženki. Sve Tyr139Cys ženke preživele su test hranjenja. Prosečne vrednosti ukupne konzumacije bromadiolon mamca u grupama Leu128Ser, Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys varijanti, bile su niže od ukupne konzumacije Ala21Thr/Tyr139Cys ženke. Takođe, kod jedinke sa ovom kombinacijom varijanti utvrđena je najveća neletalna doza.

Promene u telesnoj masi tokom trajanja testa posledica su destruktivnijeg delovanja bromadiolona na Leu128Ser u odnosu na Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys jedinke. Kod nosilaca kombinacije Leu128Ser/Tyr139Cys utvrđen je najmanji gubitak telesne mase, dok je najveći gubitak zabeležen kod Leu128Ser jedinki. Tyr139Cys jedinke bile su prema prosečnim vrednostima između ove dve grupe jedinki. Takođe, u grupi Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki utvrđeno je i povećanje telesne mase, dok su jedinke iz ostale dve grupe isključivo gubile na telesnoj masi tokom testa. U grupama Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys jedinki utvrđen je manji gubitak telesne mase kod ženki.

Do sada je potvrđeno prisustvo kombinacija VKOR varijanti kod domaćeg miša jedino u istraživanju Pelz-a i sar. (2011, 2012). Utvrđene su kombinacije Spretus grupa/Arg58Gly, Spretus grupa/Leu128Ser, Spretus grupa/Tyr139Cys, Leu124Gln/Leu128Ser (zamena leucina na 124. kodonu sa glutaminom) i Leu128Ser/Tyr139Cys. Uticaj kombinacija VKOR varijanti na nivo rezistentnosti kod glodara na bromadiolon i druge antikoagulate do sada nije ispitivan, kao ni uticaj pola u kombinaciji sa VKOR varijantom. Utvrdili smo veći nivo rezistentnosti na bromadiolon kod jedinki sa kombinacijama VKOR varijanti nego što je to slučaj kada



se varijante jave samostalno, što se odnosi i na ženke u odnosu na mužjake. Kohn i sar. (2008) u istraživanju o stepenu kalcifikacije aorte kod sivog pacova primetili su razliku u stepenu kalcifikacije u odnosu na pol, odnosno veći stepen kalcifikacije kod mužjaka što može objasniti veću stopu preživljavanja ženki u našem istraživanju.

Da su jedinke sa Tyr139Cys varijantom u biološkoj prednosti u odnosu na Leu128Ser varijantu dokazuju i drugi istraživači na osnovu rezultata *in-vitro* istraživanja. Pelz i sar. (2005) u ispitivanju aktivnosti VKOR enzima kod jedinki nosilaca divljeg tipa i različitih VKOR varijati ukazuju da jedinke sa Leu128Ser varijantom pate od većeg nedostatka vitamina K, odnosno da su jedinke sa Tyr139Cys varijantama u biološkoj prednosti u odnosu na ove jedinke. Razlog je manja bazalna VKOR aktivnost, odnosno aktivnost enzima kod jedinki koje nisu tretirane antikoagulantima i koja je kod Leu128Ser jedinki bila niža od 17 % u odnosu na aktivnost ovog enzima kod divljeg tipa. Bazalna aktivnost Tyr139Cys varijante bila je 48 % u odnosu na divlji tip. U prisustvu varfarina aktivnost enzima kod Tyr139Cys varijante smanjila se na 25 %, dok je kod Leu128Ser varijante aktivnost bila ispod minimuma detekcije - manja od 3 %. Da se bazalna aktivnost enzima procentualno više smanjuje u prisustvu antikoagulantata kod Leu128Ser nego kod Tyr139Cys varijante potvrdili su i Rost i sar. (2009).

Od ukupnog broja heterozigotnih jedinki test hranjenja preživelo je 54,2 %, dok je taj procenat kod homozigotnih jedinki iznosio 44,4 %. Posmatrajući samo preživele jedinke, čiji su sekvenca i genotip *vkorc1* gena bili poznati, 76,5 % bile su heterozigoti za utvrđene varijante. Kod heterozigotnih jedinki utvrđena je veća ukupna konzumacija u odnosu na homozigotne jedinke. Takođe, kod heterozigotnih jedinki su utvrđene veće letalne i neletalne doze, kao i manja promena telesne mase.

Na biološku prednost heterozigotnih jedinki ukazali su Greaves i Cullen-Ayres (1988) u istraživanju na sivom pacovu gde je utvrđeno da su potrebe u vitaminu K kod homozigotnih jedinki čak 20 puta veći od potreba heterozigotnih jedinki. Heiberg i sar. (2006) utvrdili su veći stepen reprodukcije kod heterozigotnih nego kod homozigotnih ženki sivog pacova, koje su bile rezistente na bromadiolon, kao posledica manjih potreba u vitaminu K.

### 5.3 EFIKASNOST DIFENAKUMA I BRODIFAKUMA

Efikasnost difenakuma u testu hranjenja bila je 100 %. Bez obzira na pol i VKOR varijantu sve jedinke su uginule do dvanaestog dana izlaganja. Da razlika u vremenu preživljavanja nije bilo u odnosu na varijantu *vkorc1* gena utvrđeno je i statističkim analizama. Nepostojanje razlika u ukupnoj konzumaciji pored vremena preživljavanja ukazuje na podjednak nivo osetljivosti svih jedinki u testu. Uticaj na nivo osetljivosti na difenakum pored VKOR varijante nisu imali ni pol ni genotip. Kod jedinki sa Leu128Ser/Tyr139Cys kombinacijom utvrđene su nominalno veće letalne i neletalne doze od Tyr139Cys jedinki. U istraživanju Buckle-a i sar. (2012a) za Tyr139Cys jedinke utvrđeni su niski faktori rezistentnosti koji su izračunati na osnovu rezultata BCR metode i iznosili su 2,5 što je rezultiralo uginućem većeg broja nosilaca ove varijante u populaciji sivog pacova. Efikasnost difenakuma u ovom istraživanju nije se razlikovala između homozigotnih i heterozigotnih jedinki.

Hadler i sar. (1975) utvrdili su prosečne letalne doze difenakuma od 19 mg/kg do 20 mg/kg kod ženki domaćeg miša za različite grupe jedinki, dok je kod mužjaka utvrđena prosečna letalna doza od 18 mg/kg za sve ispitivane grupe. Ove jedinke bile su nosioci Leu128Ser varijante, što su potvrdili Pelz i sar. (2005). Utvrđene vrednosti su manje od dobijenih prosečnih letalnih doza za nosioce Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys varijanti u našem istraživanju koje su bile veće od 32 mg/kg, ali su u oba istraživanja utvrđene veće letalne doze kod ženki.

Podaci o promeni telesne mase iz testa hranjenja difenakumom pokazuju da je kao i u testu hranjenja bromadiolonom manji gubitak telesne mase utvrđen je kod nosilaca kombinacije varijanti i kod ženki u odnosu na mužjake.

Jedinke domaćeg miša ispoljile su visok stepen osetljivosti na brodifakum (0,005 %) s obzirom da je smrtnost pri izlaganjima od jedan i dva dana bila 90 % i 100 %. Do sličnih rezultata došli su i Redfern i sar. (1976) gde je smrtnost ženki i mužjaka bila 100 % pri obe ekspozicije. Do sličnih rezultata ovi istraživači su došli i u testovima sa izborom hrane u trajanju od dva dana, odnosno nije bilo preživelih jedinki. Letalne doze pri obe ekspozicije u našem istraživanju bile su veće kod ženki, dok su rezultati u pomenutom istraživanju isti samo pri ekspoziciji od jednog dana. Do sličnih rezultata došli su i Rowe i Bradfield (1976) u testovima hranjenja u trajanju od 21 dan, bez i sa

izborom hrane. Smrtnost od 100 % postignuta je u testovima bez izbora hrane kao i testovima sa izborom hrane u kavezima manje površine sa grupno postavljenim jedinkama, dok je smrtnost od 98,4 % postignuta u istom tipu testa ali u kavezima veće površine.

Prema Lund (1981) brodifakum je imao 100 % efikasnost u testu hranjenja od jedan i dva dana za varfarin osetljive jedinke, dok je kod varfarin-rezistentnih jedinki smrtnost od 100 % postignuta nakon tri dana hranjenja. Prosečna letalna doza kod varfarin-rezistentnih jedinki pri ekspoziciji od jedan dan bila je 4,6 mg/kg i 21,2 mg/kg pri ekspoziciji dva dva dana, što predstavlja niže letalne doze od dobijenih u našem istraživanju.

Sve jedinke domaćeg miša iz pomenutih istraživanja Redfern-a i sar. (1976) i Rowe-a i Bradfield-a (1976) bile su nosioci Leu128Ser varijante. U našim ogledima ispitivanja osetljivosti jedinki domaćeg miša na brodifakum VKOR varijanta nije bila poznata. Domaći miš je ispolji najveći nivo osetljivosti na brodifakum, a najmanji na bromadiolon, što je u skladu sa rezultatima *in-vitro* istraživanja enzimske aktivnosti Lasseur-a i sar. (2007) za nosioce različitih aminokiselinskih zamena tirozina na 139. kodonu kod sivog pacova. Isti rezultati su zabeleženi i u skorijem istraživanju Buckle-a i sar. (2012b) u kome su nosioci Tyr139Cys varijante u populaciji sivog pacova pokazali najveću osetljivost na brodifakum, a najmanju na bromadiolon, dok je nivo osetljivosti na difenakum bio između ova dva antikoagulantna tokom suzbijanja ovih jedinki na terenu.

Nosioci Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys varijante ispoljili su veću osetljivost na difenakum nego na bromadiolon. Razlika u prosečnoj konzumaciji za nosioce Tyr139Cys varijante u testovima hranjenja bromadiolonom i difenakumom nije bilo, što važi i za nosioce Leu128Ser/Tyr139Cys varijante. Međutim, srednja vrednost ukupne konzumacije za Tyr139Cys jedinke u testu sa bromadiolonom bila je 3,30 gg<sup>-1</sup> tm, dok je srednja vrednost konzumacije iz testa sa difenakumom bila 0,63 gg<sup>-1</sup> tm. Srednja vrednost ukupne konzumacije Leu128Ser/Tyr139Cys jedinke u testu hranjenja bromadiolonom bila je 3,95 gg<sup>-1</sup> tm, dok je srednja vrednost u testu hranjenja difenakumom bila 0,74 gg<sup>-1</sup> tm. Nosioci Leu128Ser/Tyr139Cys kombinacije imali su

veću neletalnu i letalnu dozu u odnosu na Tyr139Cys nosioce u testovima hranjenja bromadiolon i difenakum mamcima.

U svim testovima, odnosno testovima hranjenja bromadiolon mamcima i difenakum mamcima u trajanju od 21 dan i kratkoročnim ekspozicijama od 24 i 48 sati brodifakum mamcima, ženke su imale veću letalnu dozu u odnosu na mužjake. Takođe, u testu hranjenja bromadiolon mamcima veća neletalna doza utvrđena je kod ženki.

Period između tretmana bromadiolonom i sa druga dva antikoagulantima u svim testovima tokom našeg istraživanja bio je sedam meseci čime su stvoreni uslovi slični onima u praksi suzbijanja glodara gde se deratizacija izvodi najčešće dva puta godišnje. Neophodan period između dva tretiranja antikoagulantima prema metodi EPPO (2004b) standarda je 21 dan koji je dovoljan da se uspostavi normalna koagulacija krvi. Naši rezultati ukazuju na dobru efikasnost difenakuma i brodifakuma na bromadiolon rezistentne jedinke. Nije utvrđeno da li je do uginuća dovela samo primena difenakuma i brodifakuma ili se radi o sinergičnom dejstvu primenjivanih antikoagulanata sa prethodno primenjivanim bromadiolonom. Bez obzira na to koji od dva moguća puta dovodi do uginuća jedinki domaćeg miša rezistentnih na bromadiolon svakako da se radi o značajnom doprinosu u praksi kada je reč o suzbijanju ovakvih jedinki na lokalitetima gde to primenom bromadiolona više nije moguće.

## 6 ZAKLJUČAK

Na osnovu analize dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- ❖ Rezistentnost na bromadiolon potvrđena je u divljim populacijama domaćeg miša na lokalitetima Surčin i Zemun Polje. Takođe, rezistentnost je potvrđena kod 36,5% potomaka rezistentnih roditelja sa oba lokaliteta.
- ❖ Najveća osetljivost domaćeg miša na bromadiolon utvrđena je kod izlovljenih jedinki sa lokaliteta Barajevo na kome nije bilo prethodne primene bromadiolona. Kod ovih jedinki utvrđena je najmanja dok je kod jedinki iz Smederevske Palanke utvrđena najveća letalna doza. Zbog utvrđenog smanjenog nivoa osetljivosti u populaciji domaćeg miša iz Smederevske Palanke može se očekivati pojava rezistentnosti i na ovom lokalitetu.
- ❖ Manja osetljivost ženki utvrđena je u sva tri testa hranjenja. Testove hranjenja bromadiolonom preživeo je veći broj ženki nego mužjaka i kod divljih i kod jedinki  $F_1$  generacije. Osetljive ženke imale su duže vreme preživljavanja u odnosu na osetljive mužjake. U svim testovima hranjenja veće neletalne i letalne doze utvrđene su za ženke..
- ❖ Prisustvo promena u sekvenci *vkorc1* gena potvrđeno kod svih analiziranih divljih i jedinki  $F_1$  generacije. U egzonu 1 *vkorc1* gena utvrđena je nova varijanta, Ala21Thr, kod jedne divlje jedinke i jednog njenog potomka. Promene u sekvenci *vkorc1* gena nisu utvrđene u egzonu 2. U egzonu 3 *vkorc1* gena potvrđeno je prisustvo Leu128Ser i Tyr139Cys varijante. U istom egzonu potvrđeno je istovremeno javljanje Leu128Ser i Tyr139Cys varijanti.
- ❖ Sve analizirane divlje jedinke bile su heterozigoti za sve utvrđene varijante, dok je kod jedinki  $F_1$  generacije utvrđeno 37,5% homozigota. Najveći broj preživelih jedinki, 76,47%, bile su heterozigoti za sve utvrđene VKOR varijante. Sve utvrđene kombinacije varijanti (Leu128Ser/Tyr139Cys i Ala21Thr/Tyr139Cys) bile su u heterozigotnom stanju.
- ❖ Varijanta Leu128Ser utvrđena je samo kod osetljivih jedinki tj. kod jedinki koje nisu preživele testove hranjenja bromadiolonom. Nova varijanta Ala21Thr utvrđena je samo kod dve rezistentne jedinke. Varijanta Tyr139Cys, kao i

kombinacija varijanti Leu128Ser/Tyr139Cys utvrđene su kod osetljivih i rezistentnih jedinki.

- ❖ Utvrđena je manja osetljivost nosilaca kombinacije varijanti u odnosu na nosioce samo jedne varijante. U testu hranjenja bromadiolonom, duži period preživljavanja, veće srednje vrednosti ukupne konzumacije i letalnih neletanih doza utvrđene su za nosioce Leu128Ser/Tyr139Cys u odnosu na nosioce samo jedne od ove dve varijante.
- ❖ Pol i VKOR varijanta su ispoljili uticaj na osetljivost domaćeg miša. Utvrđena je manja osetljivost ženki kod svih tipova varijanti.
- ❖ Delovanje bromadiolona uslovalo je promene u ponašanju osetljivih jedinki što je uticalo na smanjenu konzumaciju, za razliku od rezistentnih jedinki kod kojih nisu utvrđene promene u konzumaciji mamca bromadiolona tokom 21 dan testa hranjenja. Takođe veći gubitak i variranje u telesnoj masi utvrđeno je kod osetljivih jedinki. Utvrđeno je da početna telesna masa domaćeg miša nije imala uticaja na osetljivost jedinki u testu hranjenja bromadiolonom. Veće variranje i gubitak u telesnoj masi utvrđen je kod mužjaka. Takođe, najveći gubitak u telesnoj masi utvrđen je kod Leu128Ser jedinki, a najmanji kod Leu128Ser/Tyr139Cys.
- ❖ Difenakumom je ispoljio dobru efikasnost na nosioce Tyr139Cys i Leu128Ser/Tyr139Cys varijante. Manji gubitak telesne mase u testu hranjenja difenakumom zabeležen je kod jedinki nosioca Leu128Ser/Tyr139Cys kombinacije.
- ❖ Jedinke domaćeg miša ispoljile su najveći nivo osetljivosti na brodifakum a najmanji na bromadiolon. U testovima hranjenja brodifakumom u trajanju od jedan i dva dana efikasnost ovog antikoagulanta bila je 90 % i 100 %.
- ❖ Kombinovanjem metode test hranjenja i molekularnih metoda utvrđeno je da se promene u sekvenci *vkorc1* gena ne mogu smatrati jedinim uzrokom pojave rezistentnosti na antikoagulate kod domaćeg miša. Rezultati ovog istraživanja ukazuju da VKOR varijanta u kombinaciji sa polom ispoljava veliki uticaj na osetljivost domaćeg miša na antikoagulate.

- ❖ Na osnovu dobijenih rezultata iz testova hranjenja bromadiolon mamcima može se zaključiti da se ovaj antikoagulant može primenjivati u suzbijanju nosioca Leu128Ser varijante.
- ❖ Na osnovu rezultata efikasnosti difenakuma i brodifakuma može se zaključiti da se ovi antikoagulanti mogu primenjivati za suzbijanje populacija domaćeg miša koje su rezistentne na bromadiolon i da se najbolja efikasnost postiže primenom brodifakuma.

Buduća istraživanja usmerena na praćenje promena u *vkorc1* genu kod domaćeg miša, njihov uticaj na ispoljavanje rezistentnosti, kao i praćenje fenotipskog izraza zajedno sa istraživanjima na terenu, omogućiće prognozu o opravdanosti primene antikoagulanata u praktičnim uslovima primene.

## 7 LITERATURA

- Anonimus (2013): Sredstva za zaštitu bilja u prometu u Srbiji (2013). *Biljni lekar* **1-2**: 271-276.
- Battersby, S., Hirschhorn, R.B, Amman, B.R. (2008): Commensal rodents. In: Public health significance of urban pests (eds. Bonnefoy X, Kampen H and Sweeney K). WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark.
- Bentley, E.W. (1972): A review of anticoagulant rodenticides in current use. *Bulletin World Health Organization*, **47**: 275-280.
- Berny, P. (2011): Challenges of anticoagulant rodenticides: resistance and ecotoxicology. In: Pesticides in the modern world-pests control and pesticides exposure and toxicity assessment (ed. Stoytcheva, M). InTech, France.
- Berny, P., Caillis, P., Vey, D. (2011): Accumulation of chlorophacinone in susceptible and resistant Norway rat strains. In: 8<sup>th</sup> European Vertebrate Pest Management Conference (eds. Jacob J and Esther A). Germany, Berlin, pp. 56-57.
- Bishop, J.A., Hartley, D.J., Patrige, G.G. (1977): The population dynamics of genetically determined resistance to warfarin in *Rattus norvegicus* from mid Wales. *Heredity*, **39**: 389-398.
- Bodin, L., Verstuyft, C., Tregouet, D-A., Robert, A., Dubert, L., Funck-Brentano, C., Jaillon, P., Beaune, P., Laurent-Puig, P., Becquemont, L., Lorient, M-A. (2005): Cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) and vitamin K epoxide reductase (VKORC1) genotypes as determinants of acenocoumarol sensitivity. *Blood*, **106**: 135-141.
- Boyle, M. (1960): A case of apparent resistance of *Rattus norvegicus* to anticoagulant poisons. *Nature*, **188**: 517-517.
- Božina, N. (2010): Farmakogenetika varfarina u kliničkoj praksi. *Biochemia Medica*, **20**: 33-44.



- Brooks, J.E., Fiedler, R.A. (1999): Vertebrate pests: damage on stored foods. Food and agricultural organization (FAO) of the United States. Dostupno na: [http://www.fao.org/fileadmin/user\\_upload/inpho/docs/Post\\_Harvest\\_Compendium\\_-\\_Pests-Vertebrates.pdf](http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/inpho/docs/Post_Harvest_Compendium_-_Pests-Vertebrates.pdf)
- Brown, P.R., Singleton, G.R. (2000): Impacts of house mice on crops in Australia-costs and damage. Human Conflicts with Wildlife: Economic Considerations University of Nebraska, Lincoln, pp. 47-58.
- Buckle, A.P. (1994): Rodent control methods: chemical. In: Rodent pests and their control (eds. Buckle AP and Smith RH). CAB International, Oxon, UK.
- Buckle, A.P. (2013): Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Pest Management Science*, **69**: 334-341.
- Buckle, A.P., Endepols, S. (2008): Genetic research in anticoagulant rodenticide resistance: A summary of the 2008 RRAC seminar. Advances in anticoagulant rodenticide resistance research. Rodenticide Resistance Action Committee. Dostupno: [http://www.rrac.info/content/uploads/RRAC\\_Seminar\\_2008\\_Summary1.pdf](http://www.rrac.info/content/uploads/RRAC_Seminar_2008_Summary1.pdf)
- Buckle, A.P., Endepols, S., Klemann, N., Jacob, J. (2012a): Resistance testing and the effectiveness of difenacoum against Norway rats (*Rattus norvegicus*) in a tyrosine139cysteine focus of anticoagulant resistance, Westphalia, Germany. *Pest Management Science*, DOI 10.1002/ps.3373.
- Buckle, A.P., Klemann, N., Colin, P. (2012b): Brodifacoum is effective against Norway rats (*Rattus norvegicus*) in tyrosine139cysteine focus of anticoagulant resistance in Westphalia, Germany. *Pest Management Science*, DOI 10.1002/ps.3352.
- Buckle, A.P., Prescott, C. (2012): The current status of anticoagulant resistance in rats and mice in the UK. Reading, Rodenticide Resistance Action Group. Dostupno: <http://www.bpca.org.uk/assets/RRAG-ReportAnticoagulantResistanceintheUK.pdf>

- Buckle, A.P., Prescott, C.V., Ward, K.J. (1994): Resistance to the first and second generation anticoagulant rodenticides-a new perspective. In: Proceedings of the 16<sup>th</sup> Vertebrate Pest Conference (eds. Halverson WS and Crabb AC). University of California, Davis, pp. 138-144.
- Cain, D., Hutson, S.M., Wallin, R. (1997): Assembly of the warfarin-sensitive vitamin K 2,3-epoxide reductase enzyme complex in the endoplasmatic reticulum membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **272**: 29068-29075.
- Clapperton, K. (2006): A review of current knowledge of rodent behavior in relation to control devices. Science for Conservation, New Zealand. Dostupno na: <http://pestcontrolresearch.com/docs-other/rodentcontrolreview.pdf>
- D'Andrea, G., D'Ambrosio, R.L., Di Perna, P., Chetta, M., Santacroce, R., Brancaccio, V., Grandone, E., Margaglione, M. (2005): A polymorphism in the *VKORC1* gene is associated with an interindividual variability in the dose-anticoagulant effect of warfarin. *Blood*, **105**: 645-650.
- Damon, M., Zhang, N.Z., Haytowitz, D.B, Booth, S.L. (2005): Phylloquinone (vitamin K<sub>1</sub>) content of vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, **18**: 751-758.
- Daniells, L., Buckle, A., Prescott, C.V. (2011): Resistance as a factor in environmental exposure of anticoagulant rodenticides - a modeling approach. In: 8<sup>th</sup> European Vertebrate Pest Management Conference (eds. Jacob J and Esther, A). Germany, Berlin, pp. 58-59.
- Đukić, N., Horvatić, A., Kataronovski, D., Maletin, S., Matavulj, M., Pujin, V., Sekulić, R. (2005): Poljoprivredna zoologija sa ekologijom i fiziologija prirode, opšta zoologija i sistematika životinja. Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Endepols, S., Klemann, N., Jacob, J., Buckle, A.P. (2012): Resistance test and field trials with bromadiolone for the control of Norway rats (*Rattus norvegicus*) on farms in Westphalia, Germany. *Pest Management Science*, **68**: 348-354.

- Endepols, S., Klemann, N., Song, Y., Kohn, M.H. (2011): Field trials to assess resistance to warfarin and difenacoum of house mice in relation to the occurrence of variants in the *vkorc1*-gene before and after the treatments. In: 8<sup>th</sup> European Vertebrate Pest Management Conference (eds. Jacob J and Esther A), Germany, Berlin, pp. 70-71.
- Endepols, S., Klemann, N., Song, Y., Kohn, M.H. (2013): *Vkorc1* variation in house mice during warfarin and difenacoum field trials. *Pest Management Science*, **69**: 409-413.
- EPPO (1995): Guideline for the evaluation of resistance to plant protection products. Testing rodents for resistance to anticoagulant rodenticides. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin*, **25**: 575-593.
- EPPO (2004a): Efficacy evaluation of rodenticides: Laboratory tests for evaluation of the toxicity and acceptability of rodenticides and rodenticide preparations – PP1/113(2), in EPPO (2004): Efficacy Evaluation of Plant Protection Products Miscellaneous. Rodenticides, **5**: 23-35.
- EPPO (2004b): Efficacy evaluation of rodenticides: Testing rodents for resistance to anticoagulant rodenticides – PP1/198(1), in EPPO (2004): Efficacy Evaluation of Plant Protection Products Miscellaneous. Rodenticides, **5**: 65-71.
- Espinosa, M.B. (2013): Efficacy of anticoagulant drugs as rodenticides and genetic variation on *vkorc1* of *Mus musculus* from Buenos Ayres province (Argentina). *Journal of Basic and Applied Genetics*, **24**: 27-31.
- Esther, A., Endepols, S., Freise, J., Klemann, N., Runge, M., Pelz, H.J. (2014): Rodenticide resistance and consequences. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, in press, DOI: 10.1007/s00103-013-1930-z.
- Fasco, M., Principe, L. (1982): R- and S- warfarin inhibition of vitamin K and vitamin K 2,3-epoxide reductase activities in the rat. *The Journal of Biological Chemistry*, **257**: 4894-4901.

- Fasco, M.J., Principe, L.M., Walsh, W.A., Friedman, P.A. (1983): Warfarin inhibition of vitamin K 2,3-epoxide reductase in rat liver microsomes. *Biochemistry*, **22**: 5655-5660.
- Fisher, P. (2005): Review of house mouse (*Mus musculus*) susceptibility to anticoagulant poisons. Department of Convergence, Wellington. Dostupno na: <http://www.doc.govt.nz/Documents/science-and-technical/dsis198.pdf>
- Fuehrer, H-P., Baumann, T.A., Riedl, J., Treiber, M., Igel, P., Swoboda, P., Joachim, A., Noedl, H. (2012): Endoparasites of rodents from the Chittagong Hill tracts in southeastern Bangladesh. *Wiener Klinische Wochenschrift*, **124**: 27–30.
- Garcia, A.A., Reitsma, P.H. (2008): VKORC1 and the vitamin K cycle. *Vitamins & Hormones*, **78**: 23-33.
- Grandemange, A., Kohn, M.H., Lasseur, R., Longin-Sauvageon, C., Berny, P., Benoit, E. (2009): Consequences of the Y139F Vkorc1 mutation on resistance to AVKs: in-vivo investigation in a 7<sup>th</sup> generation of congenic Y139F strain of rats. *Pharmacogenetics and Genomics*, **19**: 742-750.
- Gratz, N.G. (1994): Rodents as carriers of disease. In: Rodent pests and their control (eds. Buckle AP and Smith RH). CAB International, Oxon, UK.
- Greaves, J.H. (1994): Resistance to anticoagulant rodenticides. In: Rodent pests and their control (eds. Buckle AP and Smith RH). CAB International, Oxon, UK.
- Greaves, J.H., Cullen-Ayres, P.B. (1988): Genetics of difenacoum resistance in the rat. In: Current advances in vitamin K research (ed. Suttie JW). 17<sup>th</sup> Steenbock Symposium, Elsevier, New York, pp. 387-397.
- Greene-Till, R., Zhao, Y., Hardies, S.C. (2000): Gene flow of unique sequences between *Mus musculus domesticus* and *Mus spretus*. *Mammalian Genome*, **11**: 225-230.

- Guidobono, J.S., León, V., Villafañe, I.E.G., Buscha, M.(2010): Bromadiolone susceptibility in wild and laboratory *Mus musculus* L. (house mice) in Buenos Aires, Argentina. *Pest Management Science*, **66**: 162-167.
- Hadler, M.R, Redfern, R., Rowe, F.P. (1975): Laboratory evaluation of difenacoum as a rodenticide. *Journal of Hygiene*, **74**: 441-448.
- Hadler, M.R., Buckle, A.P. (1992): Forty five years of anticoagulant rodenticides-past, present and future trends. In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> Vertebrate Pest Conference (eds. Borrecco JE and Marsh RE), Nebraska, Lincoln, pp. 149-155.
- Hadler, M.R., Shadbolt, R.S. (1975): Novel 4-hydroxycoumarin anticoagulants active against resistant rats. *Nature*, **253**: 275-277.
- Heiberg, A.C., Leirs, H., Siegismund, H. R. (2003). Bromadiolone resistance does not respond to absence of anticoagulants in experimental populations of Norway rats. In: Rats, Mice and People: Rodent Biology and Management (eds. Singleton R, Hinds LA, Krebs CJ and Spratt DM). Canberra.
- Heiberg, A-C. (2009): Anticoagulant resistance: a relevant issue in sewer rat (*Rattus norvegicus*) control? *Pest Management Science*, **65**: 444-449.
- Heiberg, A-C., Leirs, H., Siegismund, H.R. (2006): Reproductive success of bromadiolone-resistant rats in absence of anticoagulant pressure. *Pest Management Science*, **62**: 862-871.
- Hrgović, N., Vukićević, Z., Kataranovski, D. (1991): Deratizacija. Suzbijanje populacija štetnih glodara. Dečje novine, Beograd, Srbija.
- Humphries, R.E., Meehan, A.P., Sibly, R.M. (1992): The characteristics and history of behavioural resistance in inner-city house mouse (*Mus domesticus*) in the U.K. In: Proceedings of the 15<sup>th</sup> Vertebrate Pest Conference (eds. Borrecco JE and Marsh RE), University of California, Davis, pp. 161-164.

- Humphries, R.E., Sibly, R.M., Meehan, A.P. (2000): Cereal aversion in behaviourally resistant mice in Birmingham, UK. *Applied Animal Behaviour Science*, **66**: 323-333.
- Ishizuka, M., Okajima, F., Tanikawa, T., Min, H., Tanaka, K.D., Sakamoto, K.Q., Fujita, S. (2007): Elevated warfarin metabolism in warfarin-resistant roof rats (*Rattus rattus*) in Tokyo. *Drug Metabolism and Disposition*, **35**: 62-66.
- Ishizuka, M., Tanikawa, T., Tanaka, K.D., Heewon, M., Okajima, F., Sakamoto, K.Q., Fujita, S. (2008): Pesticide resistance in wild mammals-Mechanisms of anticoagulant resistance in wild rodents. *The Journal of Toxicological Sciences*, **33**: 283-291.
- Jacob, J., Endepols, S., Pelz, H-J., Kampling, E., Cooper, T.G., Yeung, C.H., Redmann, K., Schlatt, S. (2012): Vitamin K requirement and reproduction in bromadiolone resistant Norway rats. *Pest Management Science*, **68**: 378-385.
- Janjić, V., Elezović, I. (2010): Pesticidi u poljoprivredi i šumarstvu u Srbiji. XVI izdanje. Društvo za zaštitu bilja Srbije.
- Jokić, G., Vukša, M., Đedović, S. (2007): Efficacy of rodent control in alfalfa and wheat crops using chemical and natural rodenticides. *Pesticides and Phytomedicine*, **22**: 241-246.
- Kaneki, M., Hosoi, T., Ouchi, Y., Orimo, H (2006): Pleiotropic actions of vitamin K: protector of bone health and beyond? *Nutrition*, **22**: 842-852.
- Kataranovski, D. (1988): Analiza osnovnih parametara populacija vrste *Rattus norvegicus* Berkenhout, 1768, u uslovima urbanih i suburbanih staništa. Doktorska disertacija. Prirodno-matematički fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Kataranovski, D., Savić, I., Dunderski, Z., Janković, D., Milosavljević, S. (1980): Eksperimentalno testiranje dejstva antikoagulantnih rodenticida. Zbornik radova. II simpozijum-DDD u zaštiti zdravlja ljudi, Beograd, str. 180.

- Kataranovski, D., Savić, I.R., Kataranovski, M., Soldatović, B. (1988): Tromboelastography and the six-day test as reliable methodological approaches to the discovery of resistance towards anticoagulant rodenticides in the Norway rat (*Rattus norvegicus* BERK., 1769). *Acta Veterinaria*, **38**: 3-12.
- Kataranovski, M., Zolotarevski, L., Belij, S., Mirkov, I., Stošić, J., Popov, A., Kataranovski, D. (2010): First record of *Calodium hepaticum* and *Taenia taeniaeformis* liver infection in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) in Serbia. *Archives of Biological Science*, **62**: 431-440.
- Kid, P.M. (2010): Vitamin D and K as pleiotropic nutrients: clinical importance to the skeletal and cardiovascular systems and preliminary evidence for synergy. *Alternative Medicine Review*, **15**: 199-222.
- Klimpel, S., Förster, M., Schmahl, G. (2007): Parasites of two abundant sympatric rodent species in relation to host phylogeny and ecology. *Parasitology Research*, **100**: 867-875.
- Kohn, M.H., Pelz, H.J. (2000): A gene-anchored map position of the rat warfarin-resistance locus, *Rw*, and its orthologs in mice and humans. *Blood*, **96**: 1996-1998.
- Kohn, M.H., Price, R.E., Pelz, H.-J. (2008): A cardiovascular phenotype in warfarin-resistant *Vkorc1* mutant rats. *Artery Research*, **2**: 138-147.
- Kovač, M., Rakićević, Lj., Maslač, A., Radojković, D. (2009): Uticaj polimorfizma c.-1639G>A VKORC1 gen na terapijski odgovor u toku primene oralnih antikoagulanasa. *Vojnosanitetski pregle*, **66**: 617-621.
- Lasseur, R., Grandemange, A., Longin-Sauvageon, C., Berny, P., Benoit, E. (2007): Comparison of the inhibition effect of different anticoagulants on vitamin K epoxide reductase activity from warfarin-susceptible and resistant rat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **88**: 203–208.

- 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**: 541-544.
- Link, K.P. (1944): The anticoagulant from spoiled sweet clover hay. *The Harvey Lecture Series*, **39**: 162-216.
- Lund, M (1981): Comparative effect of the three rodenticides warfarin, difenacoum and brodifacoum on eight rodent species in short feeding periods. *Journal of Hygiene*, **87**: 101-107.
- Lund, M (1984): Resistance to the second generation anticoagulant rodenticides. In: Proceedings of the 11<sup>th</sup> Vertebrate Pest Conference (ed. Clark DO). University of California, Davis, pp. 88-94.
- Lund, M. (1994): Commensal rodents. In: Rodent pests and their control (eds. Buckle AP and Smith RH). CAB International, UK, Oxon, pp. 23-43.
- MacNicoll, A.D. (1986): Resistance to 4-hydroxycoumarin anticoagulants in rodents. In: Pesticide resistance: strategies and tactics for management. National Academy Press, Washington, pp. 87-99.
- MacNicoll, A.D., Gill, J.E. (1993): Revised methodology for a blood-clotting response test for identification of warfarin-resistant Norway rats (*Rattus norvegicus*). *EPPO Bulletin*, **23**: 701–707.
- MacSwiney, F.J., Wallace, M.E. (1978): Genetic of wafarin-resistance in house mice of three separate localities. *Journal og Hygiene*, **80**: 69-75.
- MacVicker, H., Buckle, A., Smith, R.H. (2005): Environmental effects of rodenticide resistance. In: Proceedings 5<sup>th</sup> European Vertebrate Pest Management Conference, Hungary, Budapest, pp. 53.
- Marinković, D., Tucić, N., Kekić, V. (1989): Genetika. Naučna knjiga, Beograd.
- Marsh, R.E. (1977): Bromadiolone, a new anticoagulant rodenticide. *EPPO Bulletin*, **7**: 495-502.



- Matagrín, B., Hodroge, A., Montagut-Romans, A., Andru, J., Fourel, I., Besse, S., Benoit, E., Lattard, V. (2013): New insight into the catalytic mechanism of vitamin K epoxide reductase (VKORC1) – The catalytic properties of the major mutations of rVKORC1 explain the biological cost associated to mutations. *FEBS Open Bio*, **3**: 144-150.
- Meyer, A.N. (1994): Rodent control in practice: food stores. In: Rodent pests and their control (eds. Buckle AP and Smith RH). CAB International, UK, Oxon.
- Meyer, A.N. (1999): Commensal rodent control: challenges for the new millenium. In: Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on Urban Pests (eds. Robinson WH, Rettich F and Rambo GW). Czech Republic, Prague, pp. 99-103.
- Misenheimer, T.M., Lund, M., Miller-Baker, A.E., Sutties, J.W. (1994): Biochemical basis of warfarin amd bromadiolone resistance in the house mouse, *Mus musculus domesticus*. *Biochemical Pharmacology*, **47**: 673-678.
- Müller, E., Keller, A., Fregin, A., Müller, C.R., Rost, S. (2014): Confirmation of warfarin resistance of naturally occurring VKORC1 variants by coexpression with coagulation factor IX and *in silico* protein modeling. *BMC Genetics*, DOI :10.1186/1471-2156-15-17.
- Murphy, R.G., Williams, R.H., Hide, G. (2005): Population biology of the urban mouse (*Mus domesticus*) in the UK. Proceedings of the 5<sup>th</sup> International Conference on Urban Pests (eds. Lee C-Y and Robinson W H). Singapore, pp. 351-355.
- Namue, C., Wongsawad, C. (1997): A survey of helminth infection in rats (*Rattus spp*) from Chiang Mai Moat. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **1**: 179-183.
- Oldenburg, J., Watzka, M., Rost, S., Müller, R. (2007): VKORC1: molecular target of coumarins. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, **5**: 1-6.
- Pelz, H.-J. (2001): Extensive distribution and high frequency of resistance to anticoagulant rodenticides in rat populations from northwestern Germany. In:

Advances in vertebrate pest management II (eds. Pelz J-H and Cowan D). Fimander Verlag, Fürth.

- Pelz, H.-J., Rost, S., Müller, E., Esther, A., Ulrich, R.G., Müller, C.R. (2011): Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. In: 8<sup>th</sup> European Vertebrate Pest Management Conference (eds. Jacob J and Esther A). Germany, Berlin, pp. 66.
- Pelz, H.-J., Rost, S., Müller, E., Esther, A., Ulrich, R.G., Müller, C.R. (2012): Distribution and frequency of VKORC1 sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus*. *Pest Management Science* **68**: 254–259.
- Pelz, H.-J. (2007): Spread of resistance to anticoagulant rodenticide in Germany. *International Journal of Pest Management*, **53**: 299-302.
- Pelz, H.-J., Rost, S., Hünnerberg, 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.
- Pelz, H.-J., Rost, S., Müller, C.R. (2007): DNA-based field monitoring of warfarin resistance in rats (*Rattus norvegicus*). *International Journal of Pest Management*, **53**: 281-284.
- Prescott, C.V. (1996): Preliminary study of the genetics of resistance in the house mouse. In: Proceedings 17<sup>th</sup> Vertebrate Pest Conference (eds Timm RM and Crabb AC). University of California, Davis, pp. 82-87.
- Prescott, C.V. (2011): Development of rodenticides and the impact of resistance on anticoagulant rodenticides. Proceedings of the 7<sup>th</sup> International Conference on Urban Pests (eds. Robinson WH and Carvalho Campos AE). Brazil, São Paulo, pp. 33-36.
- Quy, R.J., Shepherd, D.S., Inglis, I.R. (1992): Bait avoidance and effectiveness of anticoagulant rodenticides against warfarin- and difenacoum- resistant populations of Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Crop Protection*, **11**: 14-20.

- Rafique, A., Rana, S.A., Khan, H.A., Sohail, A. (2009): Prevalence of some helminthes in rodents captured from different city structures including poultry farms and human population of Faisalabad, Pakistan. *Pakistan Veterinary Journal*, **29**: 141-144.
- Redfern R., Gill, J.E. (1980): Laboratory evaluation of bromadiolone as a rodenticide for use against warfarin-resistant and non-resistant rats and mice. *Journal of Hygiene* **84**: 263-268.
- Redfern, R., Gill, J.E., Hadler, M.R. (1976): Laboratory evaluation of WBA 8119 as a rodenticide for use against warfarin-resistant and non-resistant rats and mice. *Journal of Hygiene* **77**: 419-426.
- Rost, S., Fregin, A., Hünnerberg, A., Bevans, C.G., Müller, C.R., Oldenburg, J. (2005): Site-directed mutagenesis of coumarin-type anticoagulant sensitive VKORC1: evidence that highly conserved amino acids defines structural requirements of enzymatic activity and inhibition by warfarin. *Thrombosis and Haemostasis*, **94**: 780-786.
- Rost, S., Fregin, A., Ivaskevicius, V., Conzelmann, E., Ho, K., Pelz, H-J., Lappegard, K., Seifried, E., Scharrer, I., Tuddenham, E.G.D., Mu, C.R., Strom, T.M., Oldenburg, J. (2004): Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, **427**: 531-547.
- Rost, S., Pelz, H-J., Menzel, S., MacNicoll, A.D., León, V., Song, K-J., 5, Jäkel, T., Oldenburg, J., Müller, C.R. (2009): Novel mutations in the VKORC1 gene of wild rats and mice – a response to 50 years of selection pressure by warfarin? *BMC Genetics*, **10**: 4-4.
- Rowe, F.P., Bradfield, A. (1976): Trials of the anticoagulant rodenticide WBA8119 against confined colonies of warfarin-resistant house mice (*Mus musculus* L.). *Journal of Hygiene*, **77**: 427-431.

- Rowe, F.P., Plant, C.J., Bradfield, A. (1981): Trials of the anticoagulant rodenticides bromadiolone and difenacoum against the house mouse (*Mus musculus* L.). *Journal of Hygiene* **87**: 171-177.
- Rowe, F.P., Redfern, R. (1964): The toxicity of 0.025% warfarin to wild house mice (*Mus musculus* L.). *Journal of Hygiene*, **62**: 389-393.
- Rowe, F.P., Redfern, R. (1965): Toxicity tests on suspected warfarin resistant house mice (*Mus musculus* L.). *Journal of Hygiene*, **63**: 417-425.
- Rowe, F.P., Redfern, R. (1967): The effect of sex and age on the response to warfarin in non-inbred strain mice. *Journal of Hygiene*, **65**: 55-60.
- Rowe, F.P., Redfern, R. (1968): The effect of warfarin on plasma clotting time in wild house mice (*Mus musculus* L.). *Journal of Hygiene*, **66**: 159-174.
- Rowe, F.P., Swinney, T., Plan, C. (1978): Field trials of brodifacoum (WBA8119) against the house mouse (*Mus musculus* L.). *Journal of Hygiene*, **81**: 197-201.
- RRAC (2003): A reappraisal of blood clotting response tests for anticoagulant resistance and a proposal for a standardized BCR test methodology. Technical monograph 2003. Rodenticide resistance Action Committee. Dostupno na: [http://www.rrac.info/content/uploads/technical\\_monograph\\_2003\\_BCR.pdf](http://www.rrac.info/content/uploads/technical_monograph_2003_BCR.pdf)
- RRAC (2010): Anticoagulant resistance in the Norway rat and guidelines for the management of resistant rat infestations in the UK. Rodenticide resistance Action Committee. Dostupno na: [http://www.bPCA.org.uk/assets/RRAG\\_Resistance\\_Guideline.pdf](http://www.bPCA.org.uk/assets/RRAG_Resistance_Guideline.pdf)
- RRAG (2012): RRAG house mouse resistance guideline. Derby, Rodenticide Resistance Action Group. Dostupno na: <http://www.bPCA.org.uk/assets/RRAG-HousemouseResistanceGuideline1.pdf>
- Šćepović, T., Jokić, G., Esther, A., Kataranovski, D., Vukša, P., Đedović, S., Vukša, M. (2015): VKOR variant and sex are the main influencing factors on bromadiolone

- tolerance of the house mouse (*Mus musculus* L.). Pest Management Science, DOI 10.1002/ps.4027, *in press*.
- Schorka, N.J., Fallina, D., Lanchburyd, J.S. (2000): Single nucleotide polymorphisms and the future of genetic epidemiology. *Clinical Genetics*, **58**: 250-264.
- Smith, P., Townsend, G., Smith, R.H. (1991): A cost of resistance in the brown rat? Reduced growth rate in warfarin-resistant line. *Functional Ecology*, **5**: 441-447.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J., Jenkins, J.B. (1997): Principles of genetics. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Sokal, R.R., Rohlf, F.J. (1995): Biometry: The Principles and Practice of Statistics in Biological Research (3<sup>rd</sup> edition). W.H. Freeman and Company. New York, USA.
- Song, Y., Endepols, S., Klemann, N., Richter, D., Matuschka, F-R., Shih, C-H., Nachman, M.W., Kohn, M.H. (2011): Adaptive introgression of anticoagulant rodent poison resistance by hybridization between old world mice. *Current Biology*, **21**: 1269-1301.
- Song, Y., Vera, N., Kohn, M.H. (2008): Vitamin K epoxide reductase complex subunit 1 (*Vkorc1*) haplotype diversity in mouse priority strains. *BMC Research Notes*, DOI:10.1186/1756-0500-1-125, *in press*.
- Sutcliffe, F.A., MacNicoll, D.A., Gibson, G.G. (1990): Hepatic microsomal warfarin metabolism in warfarin-resistant and susceptible mouse strains: influence of pretreatment with cytochrome P-450 inducers. *Chemico-Biological Interactions*, **75**: 171-184.
- Tanaka, K.D., Kawai, Y.K., Ikenaka, Y., Harunari, T., Tanikawa, T., Ando, S., Min H., Okajima, F., Fujita, S., Ishizuka, M. (2012): The genetic mechanisms of warfarin resistance in *Rattus rattus* found in the wild in Japan. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **103**: 144-151.

- Timm, R.M. (1991): Chemical control of rodent pests in bulk-stored grains. In: Ecology and management of food-industry pests (ed. Gohram JR). Association of official analytical chemists, Virginia, Arlington.
- Timm, R.M. (1994): House mice. U: Prevention and Control of Wildlife Damage (eds. Hygnstrom SE, Timm RM and Larson GE). University of Nebraska, Lincoln, pp. 31-46.
- Vein, J., Vey, D., Fouel, I., Berny, P. (2013): Bioaccumulation of chlorophacinone in strains of rats resistant to anticoagulants. *Pest Management Science*, **69**: 397-402.
- Vujanić, M., Ivoić V, Kataranovski, M., Nikolić, A., Bobić, B., Klun, I., Villena, I., Kataranovski, D., Djurković-Djaković, O. (2011): Toxoplasmosis in naturally infected rodents in Belgrade, Serbia. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, **11**: 1209-1211.
- Vukićević-Radić, O., Jovanović, T.B., Matić, R., Kataranovski, D. (2005): Age structure of yellow-necked mouse (*Apodemus flavicolis* Melchior, 1834) in two samples obtained from live traps and owl pellets. *Archives of Biological Science* **57**: 53-56.
- Vukša, M. (2008): Glodari u skladištima i njihovo suzbijanje. U: Zaštita uskladištenih biljnih proizvoda od štetnih organizama (aut. Kljajić P). Beograd.
- Wallace, M.E., MacSwiney, F.J. (1976): A major gene controlling warfarin-resistance in the house mouse. *Journal of Hygiene*, **76**: 173-181.
- Wallin, R., Hutson, M.S., Cain, D., Sweatt, A., Sanec, D. (2001): A molecular mechanism for genetic warfarin resistance in the rat. *The FASEB Journal*, **15**: 2542-2544.
- Wallin, R., Sane, D.C., Hutsonb, S.M. (2003): Vitamin K 2,3-epoxide reductase and the vitamin K-dependent g-carboxylation system. *Thrombosis Research*, **108**: 221-226.

- Wang, J., Feng, Z., Yao, D., Sui, J., Zhong, W., Li, M., Dai, J. (2008): Warfarin resistance in *Rattus losea* in Guang dong Province, China. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, **91**: 90-95.
- West, B.C., Messmer, T.A. (2010): Commensal rodents. Wildlife Damage Management Series. Utah State University Cooperative Extension. Llogan, Utah, pp.1-4.  
Dostupno na:  
[https://extension.usu.edu/files/publications/publication/NR\\_WD\\_010.pdf](https://extension.usu.edu/files/publications/publication/NR_WD_010.pdf)
- White, P.C.L., Harris, S. (2002): Economic and environmental costs of alien vertebrate species in Britain. In: Biological invasions: economic and environmental of alien plant, animal and microbe species (ed. Pimentel D). CRC Press LLC, Florida.
- WHO (1970): Provisional instructions for determining the susceptibility of rodents to anticoagulants. World Health Organization. WHO Technical Rep 443, pp. 140-147.

## **BIOGRAFIJA**

Tanja R. Šćepović rođena je 29.08.1986. godine u Priboju. Osnovnu školu završila je u Beogradu. Prirodno-matematički smer Gimnazije u Priboju završila je 2005. godine. Iste godine upisala je Poljoprivredni fakultet Univerziteta u Beogradu. Studije je završila 27. decembra 2010. godine na Odseku za zaštitu bilja i prehrambenih proizvoda sa prosekom 9,71 i ocenom 10 na diplomskom ispitu.

Poslediplomske studije upisala je oktobra 2011/12 na Poljoprivrednom fakultetu Univerziteta u Beogradu na modulu fitomedicina. Od 27.03.2012. godine bila je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od aprila 2012. godine uključena je u rad Laboratorije za primenjenu zoologiju u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine kao stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Od 01.11.2015. godine zaposlena je u Institutu za pesticide i zaštitu životne sredine, Beograd, u Laboratoriji za primenjenu zoologiju.

Tokom dosadašnjeg istraživačkog rada uključena je u projekat Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije: III-46008: Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim organizmima u biljnoj proizvodnji sa ciljem prevazilaženja rezistentnosti i unapređenja kvaliteta i bezbednosti hrane, potprojekat: Razvoj integrisanih sistema upravljanja štetnim artropodama, puževima i glodarima u funkciji efikasnosti i prevazilaženja rezistentnosti.

Tanja R. Šćepović do sada je objavila ili saopštila 14 naučnih radova. Govori engleski i služi se ruskim jezikom.



**Прилог 1.**

**Изјава о ауторству**

Потписани-а Тања Шћеповић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 11/16

**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом:

Осетљивост домаћег миша (*Mus musculus* L.) на бромадиолон и могућност његовог  
сузбијања

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

**Потпис докторанда**

У Београду, 08.10.2015.

Шћеповић Тања

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске  
верзије докторске дисертације**

Име и презиме аутора Тања Шћеповић

Број индекса или пријаве докторске дисертације 11/16

Студијски програм Пољопривредне науке, модул: фитомедицина

Наслов докторске дисертације Осетљивост домаћег миша (*Mus musculus* L.) на  
бромациолон и могућност његовог сузбијања

Ментор Проф. др Петар Вукша

Потписани/а Тања Шћеповић

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 08.10.2015.

Шћеповић Тања

### Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

Осетљивост домаћег миша (*Mus musculus* L.) на бромадиолон и могућност његовог  
сузбијања

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
- ③. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

Потпис докторанда

У Београду, 08.10.2015.

Штефан Мана

**1. Ауторство** - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

**2. Ауторство** – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

**3. Ауторство** - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

**4. Ауторство** - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

**5. Ауторство** – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

**6. Ауторство** - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.