

УДК 599.323.45: 614.484

МУТАЦИИ ГЕНА РЕЗИСТЕНТНОСТИ *VCORC1* К АНТИКОАГУЛЯНТАМ У СИНАНТРОПНЫХ ГРЫЗУНОВ НА УРБАНИЗИРОВАННЫХ ТЕРРИТОРИЯХ РОССИИ

© 2021 г. А. Н. Мальцев^{1,*}, С. В. Рябов², В. В. Стахеев³, Н. В. Панасюк³, С. Н. Гашев⁴, Н. В. Сорокина⁴, Ю. А. Баженов⁵, Е. В. Котенкова¹

Представлено академиком РАН В.В. Рожновым

Поступило 27.01.2021 г.

После доработки 06.03.2021 г.

Принято к публикации 06.03.2021 г.

Впервые для территории России проведен анализ изменчивости двух экзонов (1-го и 3-го) гена *VCORC1* у 125 *Mus musculus* и 19 *Rattus norvegicus*, отловленных в 13 населенных пунктах. Ранее в странах Западной Европы показано, что ряд мутаций в этих экзонах связаны с устойчивостью к антикоагулянтам у синантропных грызунов. У домовых мышей мы не обнаружили таких мутаций в России. Однако в первом экзоне выявлены две ранее не известные мутации, которые потенциально могут обладать таким действием (Lys58Arg и Ser31Trp). В трех округах г. Москвы найдены серые крысы, несущие в третьем экзоне ранее известную мутацию резистентности (Tyr139Ser) в гетерозиготном состоянии. Приводится обсуждение полученных результатов в связи с интенсивностью применения антикоагулянтов в населенных пунктах России и скоростью мутирования гена *VCORC1*.

Ключевые слова: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, резистентность к антикоагулянтам, *VCORC1*

DOI: 10.31857/S2686738921030094

В настоящее время дератизация стала одним из факторов отбора экстремального характера в эволюции синантропных грызунов, поскольку она представляет собой хорошо организованную систему мероприятий, проводимых в течение длительного срока в большей части населенных пунктов, прежде всего городах [1]. По мере совершенствования методов контроля численности в популяциях грызунов возникают адаптации к мерам дератизации как ответ на непрерывное действие химических факторов истребления. К числу таких адаптаций можно отнести физиоло-

го-генетическую устойчивость к родентицидам-антикоагулянтам, которые считаются эффективными и относительно безопасными с точки зрения сохранения биоразнообразия средствами контроля численности грызунов. Генетическая устойчивость к антикоагулянтам обусловлена возникающими и закрепленными естественным отбором мутациями гена *VCORC1*.

Впервые аминокислотные замены Leu128Ser и Tyr139Cys, отвечающие за резистентность к варфарину, были обнаружены в Англии [2, 3]. Ген резистентности *VCORC1* расположен у серых крыс (*Rattus norvegicus*) в хромосоме 1 [4], а у *Mus domesticus* – в хромосоме 7, которая является аналогичной хромосоме 1 у крыс [2]. Изначально в ряде стран Европы у *M. domesticus* было обнаружено две мутации гена *VCORC1* (Tyr139Cys, Leu128Ser), но благодаря относительно недавним исследованиям их список был значительно расширен [5, 6]. У серых крыс также выявлен ряд мутаций, обеспечивающих резистентность к антикоагулянтам первого и второго поколений (Leu128Ser, Leu120Gln, Ile82Ile, Ile82Ile, Trp59Gly, Tyr139Cys, Tyr139Ser, Tyr139Phe, Leu128Gln, Arg35Pro). Сведения о географическом распространении устойчивых к антикоагулянтам первого и второго поколения серых и черных крыс (*Rattus rattus*), *M. domesticus* можно найти в ряде работ [5, 7, 6, 8, 9]. В

¹ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова Российской академии наук, Москва, Россия

² Научно-исследовательский институт дезинфектологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

³ Федеральный исследовательский центр Южный научный центр Российской академии наук, Ростов-на-Дону, Россия

⁴ Тюменский государственный университет, Тюмень, Россия

⁵ Институт природных ресурсов, экологии и криологии Сибирского отделения Российской академии наук, Чита, Россия

*e-mail: mus-musculus@yandex.ru

странах Западной Европы географическое распространение отдельных мутаций гена *VCORC1* отличается [8]. Существуют наиболее часто встречающиеся мутации у крыс и мышей, такие как Tyr139Cys и Leu128Ser, но каждая страна или регион характеризуется, кроме того, уникальными мутациями, обеспечивающими резистентность к антикоагулянтам, встречающимися только там. В недавних исследованиях во Франции и Германии у домашних мышей обнаружено девять точечных мутаций гена *VCORC1*, выявлены носители одновременно двух мутаций, которые объясняются генетической рекомбинацией [5, 6]. До сих пор в России физиологическую резистентность к антикоагулянтам первого и второго поколения у синантропных грызунов оценивали только на основании устаревшего, дорогостоящего и инвазивного метода, основанного на поедании приманок, содержащих эти соединения, и определении летальной дозы. В нашей работе впервые для территории России проведена оценка генетической резистентности к антикоагулянтам у домашних мышей и серых крыс на основании анализа мутаций гена *VCORC1*.

Цели исследования: на основании анализа изменчивости гена *VCORC1* у домашних мышей (*M. musculus*) и серых крыс (*R. norvegicus*) из популяций, населяющих РФ, выявить наличие (или отсутствие) и географическое распространение мутаций, определяющих резистентность этих видов к антикоагулянтам; оценить эволюционное значение найденных мутаций и замен в экзонах у домашних мышей и серых крыс.

Материалом для молекулярно-генетического анализа служили 125 домашних мышей (*M. musculus*) и 19 серых крыс (*R. norvegicus*) из 13 населенных пунктов (городов и сел) России. Домовые мыши отловлены в: гг. Москва – 16, Подольск – 4, Ногинск – 4, Ростов-на-Дону – 18, Астрахань – 3, Тюмень – 24, Ямбург – 3, Чита – 19, а также сельских населенных пунктах: селах Тормосин (Волгоградская область) – 16, Балабаны (Волгоградская область) – 3, Дьяковка (Саратовская область) – 1, Большевик (Забайкальский край) – 3, Нижний Цасучей (Забайкальский край) – 7. Серые крысы отловлены в: гг. Москва – 18 и Тюмень – 1. После отлова грызунов содержали в стандартных пластиковых клетках для лабораторных животных. Перед взятием тканей зверьков умерщвляли смещением шейных позвонков. ДНК серых крыс и домашних мышей выделяли из тканей разных частей тела (хвост, сердце, мышцы конечностей), которые хранили в 96% спирте при температуре 6°C. Для выделения ДНК использовали наборы DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen). ПЦР проведена в термоциклере SimpliAmp™ (Applied Biosystems). Для амплификации геномной ДНК домашних мышей использовались следующие праймеры: экзон 1 – GACCAATCTTCCGG-

TAGGAG (прямой праймер), CGACCCAG-ACTCCAAAAT (обратный праймер); экзон 3 – GAAGCACCTGCTGTCTGTCA (прямой праймер), GCCTTCTAGGAACCCACACA (обратный праймер).

Амплификация проводилась с помощью набора 2x Мастер-микс HotStarTaq Plus (Qiagen). В 25 мкл реакционной смеси входил микс из смеси полимераз (HS-Taq и Pfu), смеси дезоксирибонуклеозидтрифосфатов, ПЦР-буфер, Mg²⁺ и другие реагенты (ДНК-матрица – 1–2 нг, деионизированная вода (H₂O) до 50 мкл, прямой и обратный праймеры – 0.1–800 нМ). Режим ПЦР включал следующие условия: 94°C в течение 3 мин, 25 циклов амплификации (94°C – 30 с, 58°C – 30 с и 72°C – 1 мин 30 с и финальную достройку цепей (72°C – 10 мин). ПЦР для тотальной ДНК серых крыс проведена с использованием следующих праймеров: экзон 1 – RE1AF CTCTTGTGTCTG-CGCTGTAC, RE1R GCTTTTCATTTCTGCACG-CA; экзон 3 – RE3F TGAGTTCCTGGTGTCT-GTC, RE3R TTTTAGGGACCCACACACGA [8]. Условия ПЦР: 94°C – 3 мин, 35 циклов амплификации (94°C – 30 с, 58°C – 30 с и 72°C – 1 мин и финальную достройку цепей (72°C – 10 мин). Для очистки ПЦР-продуктов использовался набор QIAquick PCR Purification Kit. Секвенирование ПЦР-продуктов проводилось по обеим цепям с помощью генетического анализатора 3500xL (Applied Biosystems). Было отсеквенировано 2 участка ДНК гена *VCORC1* у домашних мышей (250 п.н. – 1-й экзон, 330 п.н. – 3-й экзон) и серых крыс (209 и 227 п.н. соответственно). Выравнивание последовательностей ДНК произведено с помощью программы BioEdit v.7.0.5.3, анализ в MEGA V.10.05. Полученные нуклеотидные последовательности для обнаружения гомозиготных мутаций гена *VCORC1* сравнивались с диким типом контрольных последовательностей из базы данных GenBank/NCBI: (NM_203335.2 для *R. norvegicus* и NM_178600.2 для *M. musculus*). Для обнаружения гетерозиготных мутаций сравнивали хроматограммы положения нуклеотидов в последовательностях прямого и обратного праймеров. Для оценки соотношения синонимичных и несинонимичных замен (dN/dS) в экзонах у домашних мышей и серых крыс использовали программу DNAsp, v.6.

У домашних мышей не обнаружено мутаций гена *VCORC1*, отвечающих за резистентность к антикоагулянтам первого и второго поколения по позициям Leu128Ser и Tyr139Cys, локализованных в третьем экзоне [10, 5, 8]. Однако в городах мы обнаружили две ранее не описанные мутации в первом экзоне Lys58Arg и Ser31Trp. В Ростове у 13.7% от всех исследованных мышей, в Москве – 87.5%, в Тюмени – 13%, в Ногинске и Подольске – 100%. Мутации были вызваны применением ан-

тикоагулянтов первого и второго поколения: в г. Москва, Московская область — бромадиолон, бродифакум в концентрации 0.005%; в г. Ростов-на-Дону — бромадиолон в концентрации 0.005%, тетрафенацин в концентрации 0.25%, а также варфарин и дифенацин, в г. Тюмень — бромадиолон, бродифакум — 0.005% и дифацинон — 0.0075%. Таким образом, концентрация приманок в городах России не превышала нормы. Дератизационные мероприятия в городах России проводились согласно постановлению правительства РФ от 22 сентября 2014 г. № 58 (“Санитарно-эпидемиологические требования к организации и проведению дератизационных мероприятий”). В Западной Европе (Германии, Швейцарии, Франции) концентрации веществ были сходными (варфарин — 0.025%, куматетралил — 0.05%, бромадиолон — 0.005%, дефинакум — 0.005%, бродифакум — 0.005%, флорумафен — 0.005% [5, 6]).

В Швейцарии, Германии [5] и Франции [6] находили мутации в первом экзоне, повышающие резистентность к антикоагулянтам, причем Arg12Trp, Ala26Ser, Ala48Thr, Glu37Gly встречаются как во Франции, так и в Германии. В России в первом экзоне нами обнаружены две другие мутации Lys58Arg и Ser31Trp, которые могут быть либо нейтральными, либо повышать устойчивость к антикоагулянтам. Не исключено, что они могут быть уникальными для нашей страны. Аминокислотные замены (Lys58Arg и Ser31Trp) локализируются вместе у анализируемых образцов *M. musculus*, что, по-видимому, связано с эпистатическим эффектом.

Следует отметить, что процентное соотношение особей, несущих мутации резистентности и не имеющих эти мутации, существенно различается в разных странах и в разных районах одной и той же страны и может зависеть от интенсивности использования и набора применяемых антикоагулянтов. Так, в Европе частота встречаемости мышей-носителей мутаций гена *VCORC1* чрезвычайно высока и может составлять до 70–80%. Например, в Германии, Швейцарии и на Азорских островах было обнаружено, что 80% мышей, отловленных в 30 локалитетах, являются носителями одной мутации. И лишь один локалитет оказался свободен от мышей-носителей мутаций Leu128Ser и Tyr139Cys [5]. Напротив, в Австралии и Аргентине эти мутации не были обнаружены [11, 12], а в Италии только у одной особи из 30 была найдена мутация Tyr139Cys [13]. В городах России мы не выявили ранее описанных мутаций, обеспечивающих резистентность у домашних мышей.

Из 19 проанализированных серых крыс г. Москвы только у трех особей в гетерозиготном состоянии была найдена одна из мутаций (Tyr139Ser) резистентности к антикоагулянтам (варфарину). Процент резистентных особей со-

ставил 15.7%. Крысы, у которых была обнаружена резистентность, отловлены в трех округах г. Москвы: Юго-Западном, Северном и Северо-Восточном. Основными действующими веществами в Москве во время проведения мероприятий по дезинфекции и дератизации служили антикоагулянты второго поколения — бродифакум и бромадиолон с концентрацией активного действующего вещества 0.005%. По данным немецких коллег [5] антикоагулянты второго поколения (бромадиолон и бродифакум) могут стимулировать развитие генетической резистентности у домашних мышей и серых крыс по мутации Tyr139Ser.

Оценка соотношения синонимичных и несинонимичных замен (dN/dS) у анализируемых синантропных грызунов показала следующее: у домашних мышей, в первом экзоне $dN/dS > 2.74$, в третьем экзоне $dN/dS > 3.06$; у серых крыс в третьем экзоне $dN/dS > 3.0$. Таким образом, более высокие значения несинонимичных замен свидетельствуют о действии положительного отбора в изученных популяциях *M. musculus* и *R. norvegicus*.

Подводя итоги, следует отметить, что относительно низкий процент мутаций гена резистентности *VCORC1* у домашних мышей и серых крыс в населенных пунктах России может свидетельствовать об относительно редком и относительно недавнем начале использования антикоагулянтов по сравнению с большинством стран Западной Европы. Высокую частоту мутирования этого гена во Франции исследователи объясняют частым и постоянным применением антикоагулянтов населением, после которого значительная часть грызунов, получивших полудетальную дозу, выживает [6]. Именно в результате этого дератизация превращается в фактор отбора, приводящий к быстрому мутированию гена резистентности *VCORC1*, сохранению и закреплению в популяциях мышей все новых и новых мутаций, обеспечивающих резистентность.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-74-00148).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Содержание животных после отлова и их умерщвление проведены в соответствии с правилами Европейской конвенции о защите позвоночных. Одобрено Биоэтической комиссией ИПЭЭ им. А.Н. Северцова РАН. Протокол № 39 от 27.07.2020 г.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Рьльников В.А. Серая крыса (*Rattus norvegicus* Berk.). Экологические основы и подходы к управлению численностью. М.: НЧНОУ Институт пест-менеджмента, 2010.
2. Wallace M.E., Macswiney F.J. A major gene controlling warfarin resistance in the house mouse // *J. Hyg.* 1976. V. 76. № 2. P. 173–181.
3. Prescott C.V. A preliminary study of the genetics of resistance in house mice. In: Timm R.M., Crabb C. editors.: *Proceedings of the Seventeenth Vertebrate Pest Conference*; 1996; University of California, Davis: CA; 1996. V. 17. P. 83–87.
4. Greaves J.H., Ayres P. Heritable resistance to warfarin in rats // *Nature.* 1967. V. 215. № 5103. P. 877–878.
5. Pelz H.-J., Rost S., Müller E., et al. Distribution and frequency of *VKORC1* sequence variants conferring resistance to anticoagulants in *Mus musculus* // *Pest Management Science* 2012. V.68. № 2. P. 254–259.
6. Goulois J., Lambert V., Legros L., et al. Adaptive evolution of the *Vkorc1* gene in *Mus musculus domesticus* is influenced by the selective pressure of anticoagulant rodenticides // *Ecology and Evolution.* 2017. V. 7. № 8. P. 2767–2776.
7. Прескотт С.В. Резистентность к родентицидам-антикоагулянтам. Новая молекулярная методология определения мутаций гена резистентности *VKORC1* и понимание их возможного влияния на эффективность применения препаратов // *Пест-менеджмент.* 2013. № 4. С. 39–46.
8. Mooney J., Lynch M., Prescott C., et al. *VKORC1* sequence variants associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Irish populations of *Rattus norvegicus* and *Mus musculus domesticus* // *Scientific Reports.* 2018. V. 8. № 4535. P. 1–6.
9. McGee C.F., McGilloway D.A., Buckle A.P. Anticoagulant rodenticides and resistance development in rodent pest species – A comprehensive review // *Journal of Stored Products Research.* 2020. V. 88. № 101688. P. 1–18.
10. Pelz H.-J., Rost S., Hünerberg M., et al. The genetic basis of resistance to anticoagulants in rodents // *Genetics.* 2005. V. 170. № 4. P. 1839–1847.
11. Espinosa M.B. Efficacy of anticoagulant drugs as rodenticides and genetic variation on *Vkorc1* of *Mus musculus* from Buenos Aires province (Argentina) // *Journal of Basic & Applied Genetics.* 2013. V. 24. № 1. P. 27–31.
12. Duncan B.J.M.L., Koenders A., Burnham Q., et al. *Mus musculus* populations in Western Australia lack *VKORC1* mutations conferring resistance to first generation anticoagulant rodenticides: Implications for conservation and biosecurity // *PLOS ONE.* 2020. V. 15. № 9. P. 1–16.
13. Iannucci A., Natali C., Capizzi D., et al. First record of *VKORC1* sequence mutation associated with resistance to anticoagulant rodenticides in Italian individuals of *Mus musculus domesticus* // *Hystrix the Italian Journal of Mammalogy.* 2019. V. 30. № 2. P. 183–185.

MUTATIONS OF THE GENE RESISTANCE TO ANTICOAGULANTS *VKORC1* IN COMMENSAL RODENTS IN URBANIZED TERRITORIES OF RUSSIA

A. N. Maltsev^{a, #}, S. V. Ryabov^b, V. V. Stakheev^c, N. V. Panasjuk^c, S. N. Gashev^d,
N. V. Sorokina^d, Y. A. Bazhenov^e, and E. V. Kotenkova^a

^a Severtsov Institute of Problems of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Scientific Research Disinfectology Institute of Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being, Moscow, Russian Federation

^c The Federal Research Center Southern Scientific Centre of the Russian Academy of Sciences, Rostov-on-Don, Russian Federation

^d University of Tyumen, Tyumen, Russian Federation

^e Institute of Natural Resources, Ecology and Cryology, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Chita, Russian Federation

[#]e-mail: mus-musculus@yandex.ru

Presented by academician of the RAS V.V. Rozhnov

For the first time in the territory of Russia, we analyzed the variability of two exons (1st and 3rd) of the *VKORC1* gene in 125 *Mus musculus* and 19 *Rattus norvegicus* captured in 13 settlements. It was shown earlier that in the countries of Western Europe a number of mutations in these exons are associated with resistance to anticoagulants in synanthropic rodents. We did not find such mutations in house mice in Russia. However, in the first exon, two previously unknown mutations were identified that could potentially have such an effect (Lys58Arg and Ser31Trp). In three districts of Moscow, Norway rats were found carrying in the third exon a previously known resistance mutation (Tyr139Ser) in a heterozygous state. The results are discussed in connection with the intensity of the use of anticoagulants in the settlements of Russia and the rate of mutation of the *VKORC1* gene.

Keywords: *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, resistance to anticoagulants, *VKORC1*