

УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број захтева: 392/3-6.2.
Датум: 23.12.2015.

ВЕЋЕ НАУЧНИХ ОБЛАСТИ
БИОТЕХНИЧКИХ НАУКА

ЗАХТЕВ

за давање сагласности на реферат о урађеној докторској дисертацији
за кандидата на докторским студијама

Молимо да, сходно члану 47. став. 5. тачка 4. Статута Универзитета у Београду ("Гласник Универзитета", број 162/11-пречишћени текст, 167/12 и 172/13), дате сагласност на реферат о урађеној докторској дисертацији:

Кандидат **ТАЊА (Радисав) ШЋЕПОВИЋ**, студент докторских студија на студијском програму Пољопривредне науке, модул Фитомедицина, пријавила је докторску дисертацију под називом: "Осетљивост домаћег миша (*Mus musculus* L.) на бромадиолон и могућност његовог сузбијања",

из научне области Фитомедицина.

Универзитет је дана 13.05.2014. године, својим актом број 61206-2145/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације која је гласила: "**Осетљивост домаћег миша (*Mus musculus* L.) на бромадиолон и могућност његовог сузбијања**".

Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације образована је на седници одржаној 28.10.2015. године, одлуком Факултета број 392/1-5.2., у саставу:

име и презиме члана комисије, звање, научна област, установа у којој је запослен

1. др Петар Вукша, редовни професор, Пестициди, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет, у пензији од 01.10.2015. године,
2. др Марина Вукша, виши научни сарадник, Пестициди, Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд,
3. др Бојан Стојнић, ванредни професор, Ентомологија и пољопривредна зоологија, Универзитет у Београду - Пољопривредни факултет,
4. др Драган Катрановски, редовни професор, Биологија, Институт за биолошка истраживања "Синиша Станковић", Београд,
5. др Горан Јокић, научни сарадник, Пестициди, Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд

Наставно-научно веће факултета прихватило је реферат Комисије за оцену и одбрану докторске дисертације на седници одржаној 23.12.2015. године.

В. Д. ДЕКАН ФАКУЛТЕТА

Проф. др Милица Петровић

Универзитет у Београду
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
Број: 392/3-6.2.
Датум: 23.12.2015. године
БЕОГРАД-ЗЕМУН

На основу члана 123. Закона о високом образовању и члана 24. Правилника о последипломским студијама и докторату наука, Наставно-научно веће Факултета на седници одржаној 23.12.2015. године, донело је

О Д Л У К У

I ПРИХВАТА СЕ извештај о позитивној оцени урађене докторске дисертације коју је поднела **ТАЊА ШЋЕПОВИЋ**, дипл. инж. и одобрава јавна одбрана дисертације по добијању сагласности од Универзитета, под насловом: «ОСЕТЉИВОСТ ДОМАЋЕГ МИША (*Mus musculus* L.) НА БРОМАДИОЛОН И МОГУЋНОСТ ЊЕГОВОГ СУЗБИЈАЊА».

II Универзитет је дана 13.05.2014. године, својим актом број 61206-2145/2-14 дао сагласност на предлог теме докторске дисертације.

III Рад кандидата у часопису међународног значаја:

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.

<http://www.kobson.nb.rs.proxy.kobson.nb.rs:2048/kobson.82.html#.VjiHBSvdjIU>

П Р Е Д С Е Д Н И К
НАСТАВНО-НАУЧНОГ ВЕЋА
В. Д. Д Е К А Н

(Проф. др Милица Петровић)

Доставити: кандидату, менторима, Институту за фитомедицину, Студентској служби и архиви.

**УНИВЕРЗИТЕТ У БЕОГРАДУ – ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ
- НАСТАВНО-НАУЧНО ВЕЋЕ**

Дана 30.10.2015. године

Предмет: **Оцена урађене докторске дисертације Тање Р. Шћеповић, дипл. инж.**

Одлуком Наставно-научног већа Универзитета у Београду - Пољопривредног факултета број 392/1-5.2. од 28.10.2015. године именована је Комисија за оцену и одбрану докторске дисертације Тање Шћеповић, дипл. инж. под насловом „**Осетљивост домаћег миша (*Mus musculus L.*) на бромадиолон и могућност његовог сузбијања**“ у саставу: др Петар Вукша, редовни професор у пензији, др Марина Вукша, виши научни сарадник, др Бојан Стојнић, ванредни професор, др Драган Катарановски, редовни професор и др Горан Јокић, научни сарадник.

На основу прегледа поднетог рукописа докторске дисертације подносимо следећи:

ИЗВЕШТАЈ

1 ОПШТИ ПОДАЦИ О ДОКТОРСКОЈ ДИСЕРТАЦИЈИ

Докторска дисертација Тање Шћеповић, дипл. инж., написана је на 109 страна и има следећа поглавља: Увод (1-3); Преглед литературе (4-30); Материјал и методе (31-40); Резултати (41-79); Дискусија (80-90); Закључак (91-93); Литература (94-109). Уз то, садржи резиме на српском и енглеском језику, биографију аутора, те изјаве о ауторству, о истоветности штампане и електронске верзије и изјаву о коришћењу. Поред текстуалног дела има и 7 слика, 43 табеле и 20 графика.

2 ПРИКАЗ И АНАЛИЗА ДИСЕРТАЦИЈЕ

2.1 Увод

Аутор полази од тога да глодари припадају групи економски значајних штеточина. Вектори су бројних болести људи и животиња, због чега је неопходно вршити њихово сузбијање. За то се, најчешће, користе антикоагулантни родентициди, посебно у затвореном простору. Њих, уз низ предности, прати и проблем појаве резистентности, услед генетичке варијабилности популација глодара, и ширења резистентних алела.

Резистентност домаћег миша на антикоагуланте утврђена је у низу земаља Европе и у Америци. У нашој земљи до сада није проучавана резистентност домаћег миша на антикоагуланте, мада има наговештаја њеног постојања.

Открићем мутација у *vkorc1* гену олакшано је праћење развоја и дистрибуције резистентних популација, али генетска основа резистентности домаћег миша на антикоагуланте није у потпуности разјашњена. Сматра се да постоји више путева развоја резистентности. Због тога су, у овој дисертацији, истраживања била усмерена на проверу присуства резистентности на бромадиолон у дивљој популацији домаћег миша, са намером да се утврди веза између варијабилности *vkorc1* гена и испољавања резистентности, као и евентуални утицај других фактора и то, у функцији ефикаснијег сузбијања глодара и пројектовања антирезистентне стратегије.

2.2 ПРЕГЛЕД ЛИТЕРАТУРЕ

2.2.1 Основне морфолошке и биолошке карактеристике домаћег миша (*Mus musculus L.*)

Домаћи миш (*Mus musculus L.*) припада реду глодара (*Rodentia*), фамилији мишоликих глодара (*Muridae*). Распрострањен је широм света и настањује места у близини људске популације.

Домаћи миш има способност репродукције током целе године. У току године могу имати и до 13 окота годишње, са до 12 јединки у окоту. Полну зрелост постиже за 5-7 седмица, а просечан животни век јединки у природи је око годину дана. Одликује га изразита способност адаптације. Углавном је

активан ноћу и не удаљава се од склоништа и извора хране. У природи се храни семењем и плодовима, као и инсектима. У људском окружењу користи сву доступну храну.

2.2.2 Штетност домаћег миша

Домаћи миш, углавном, највеће штете наноси у затвореном простору, мада може довести до економски значајних губитака приноса и квалитета рода у пољу. Штете наноси исхраном и, посебно, загађењем производа. Урином, фецесом и длакама може да загади вишеструко веће количине хране, него што поједе (око 1 кг годишње). Поред тога, домаћи миш оштећује објекте, опрему и уређаје у окружењу.

Вектор је већег броја ендо и екто паразита. Посебно су значајни вируси узрочници лимфоцитарног хориоменингитиса, ласа грознице као и америчког енцефалитиса коња, лептоспира, салмонела, токсоплазми, узрочника куге и туларемије, крпељског енцефалитиса итд. Зоонозе се директно или индиректно преносе на људе, кућне љубимце и домаће животиње. До директних инфекција код људи долази конзумирањем контаминиране хране, а индиректни пут, преко прелазних домаћина, додатно подстиче ширење зооноза. Ризик по здравље људи још је већи, када се у обзир узме и репродуктивни потенцијал домаћег миша.

2.2.3 Хемијско сузбијање домаћег миша

Развој и примена антикоагулантних родентицида: Четрдесетих година прошлог века откривени су антикоагулантни родентициди (прва генерација: варфарин, кумафурил, куматетралил, кумахлор, хлофацинон, дифацинон и пиндон), чиме је учињен значајан помак у ефикасности и безбедности сузбијања глодара. Коришћени су широм света.

Крајем педесетих година прошлог века откривена је појава резистентности, прво у Шкотској, а потом у бројним земљама Европе, Азије и Америке. Почетком седамдесетих година откривена је друга генерација антикоагуланата (бромадиолон, дифенакум и бродифакум), који су били ефикасни у сузбијању и резистентних популација на прву генерацију антикоагуланата, чија је заступљеност у појединим земљама и до 75 %.

Преглед антикоагулантних родентицида (друге генерације): Бромадиолон се комерцијално користи од 1975. године у свету. Био је ефикасан и за јединке резистентне на варфарин. За кратко време је ушао у широку примену. Само пет-шест година касније утврђена је резистентност на ову супстанцу, прво на терену, а потом и у лабораторији. То је потврђивано у бројним истраживањима. У нашој земљи се бромадиолон користи већ три деценије. Запажена је његова смањена ефикасност, посебно у складиштима где је интензивно коришћен.

И дифенакум се врло дуго користи у свету. По увођењу, био је ефикасан и за сузбијање јединки резистентних на варфарин, најчешће коришћени антикоагулант прве генерације, али се убрзо појавила резистентност на ову супстанцу, прво у Енглеској, а потом и у другим земљама Европе и Америке. У нашој земљи до сада није практично коришћен у затвореном простору.

Бродифакум, такође, се користи од 1975. године. И он је био ефикасан за сузбијање јединки резистентних на варфарин. Широко је коришћен у свету, као нешто ефикаснији од бромадиолона и дифенакума. У нашој земљи је овај антикоагулант регистрован пре три деценије, као и бромадиолон, али је његова примена била много мањег обима.

Механизам деловања антикоагулантних родентицида: Сви антикоагулантни родентициди, иако се разликују по хемијском саставу и структури, имају готово истоветан механизам деловања. Припадају групи антивитамин К једињења (АВК) и ремете нормално функционисање витамин К циклуса.

Главно место деловања су им микростоми јетре, а мета је ензимски комплекс витамин К епоксид редуктазе (VKOR), који је лоциран у мембрани ендоплазматичног ретикулума (ЕР). Окружен је хидрофобним липидима. Његов полипептидни ланац чине хидрофобне аминокиселине.

Активна форма витамина К, хидрокинон (KH₂), делује као коензим ензима гама-глутамил карбоксилазе (GGXC) који учествује у синтези протромбина (фактор II), проконвертина (фактор VII), антихемофилног глобулина Б (фактор IX) и Stuart-Prover-овог чиниоца (фактор X) који су фактори коагулације крви. У карбоксилационом циклусу KH₂ се оксидује до витамин К 2,3- еоксида (КО), неактивне форме, која не реагује као коензим и враћа се у облик кинона посредством VKOR-а. За

превођење КО у форму кинона је неопходно присуство VKOR-а, док се превођење кинона у хидрокинон може одвијати и другим физиолошким реакцијама у организму.

Сви чиниоци коагулације крви, који су зависни од витамина К, садрже у свом коначном облику карбоксилвану глутаминску киселину, која учествује у биосинтези протеина. Остаци глутаминске киселине (GLU) се преводе у гама-карбоксиглутамат (GLA протеини), што каталише GGXS. Смањењем GLA протеина смањује се његово везивање за фосфолипидне мембране на повређеном месту и не формира се угрушак. За формирање угрушка потребни су јони калцијума.

Антикоагуланти су антагонисти витамину К преко инхибиције VKOR-а. Имају јак афинитет везивања за овај ензим и тако ремете превођење оксидованог у редуковани облик витамина К, а то инхибира синтезу фактора коагулације крви.

2.2.4 Механизам испољавања резистентности

Фармакодинамичка основа резистентности: Половином седамдесетих година прошлог века утврђено је да је појава резистентности домаћег миша на антикоагуланте под контролом "гена резистентности" (*War*), који се налази на хромозому 7 и да му је позиција аналогна гену код сивог пацова (*Rw*), на хромозому 1. Сматрало се да овај ген одређује синтезу протеина (ензима) укљученог у механизам резистентности на антикоагуланте.

Првих година овог века назначен је ген који одређује синтезу VKOR-а, а потом је идентификован први протеин VKOR-а, назван витамин К редуктазни комплекс подјединица 1 (VKORC1), који је главна мета антикоагулантних родентицида. То је трансмембрански ензим и налази се у мембрани EP и под контролом је *vkorc1* гена. Овај ген је полиморфан ген, има два алела (различита облика) на истом генском месту (локусу), на хомологим хромозомима. Промене у секвенци *vkorc1* гена доводе до фенотипских промена, односно до испољавања резистентности на антикоагуланте.

У нуклеотидима гена једна база бива замењена другом и настаје алел са измењеном секвенцом. Мутације у секвенци *vkorc1* гена се наслеђују доминантно-рецесивно, односно до испољавања резистентности на антикоагуланте долази код свих комбинација у којима је присутан измењени алел. *Vkorc1* ген је полиморфан, што одређује две категорије фенотипа, односно осетљиве и резистентне јединке. Фенотип осетљивих јединки карактерише присуство оба алела „дивљег“ типа, док остале комбинације алела резултирају појавом резистентности. Сматра се да различите варијанте гена и различита стања у којима се јављају (хетерозигот и хомозигот) имају велику улогу у модулацији ензимске активности што је предмет бројних фармакогенетичких истраживања.

Нису све измене на нивоу нуклеотида у *vkorc1* гену повезане са смањењем осетљивошћу на антикоагуланте. Измењена секвенца *vkorc1* гена диктира синтезу протеина са измењеном структуром. Сматра се да ова појава има за последицу немогућност везивања антикоагуланта за циљно место ензима само код измена на одређеним кодонима (врше тачке) који представљају везивна места антикоагуланата.

Фармакокинетичка основа резистентности: Сматра се да постоје и други фактори, који самостално или у синергији са полиморфизмом *vkorc1* гена утичу на резистентност глодара на антикоагуланте. Помињу се разлике у метаболизму, односно активност цитохром P450, која је много већа код резистентних него осетљивих јединки, што резултира и бржим метаболизмом антикоагулантних једињења. Тако код црног пацова (*Rattus rattus*) резистентност је последица бржег метаболизма варфарина под утицајем ензима цитохром P450. Полиморфизам *vkorc1* гена, заједно са полиморфизмом *CYP2C9* гена, који диктира синтезу ензима за метаболизам варфарина, цитохром P450, може бити од значаја јер поједине комбинације *vkorc1* и *CYP2C9* гена доводе до прекомерне коагулације крви код људи.

Остали фактори који могу утицати на механизам испољавања резистентности: Има мишљења да витамин К и поједини антикоагуланти имају сличну структуру и вежу се за исто место на ензиму. Постоји и протеин (калуменин) који има јачи афинитет за везивање за VKOR, па се овај ензимски комплекс чува од везивања за антикоагуланте. Концентрација калуменина у EP одређује степен инхибиције VKOR-а, односно активност карбоксилационог циклуса и резистентност на антикоагуланте. Има мишљења и да је механизам резистентности под контролом хормона, с обзиром да су женке просечно мање осетљиве од мужјака. Сматра се да старосно доба има утицаја на појаву

хеморагија код јединки. Старије јединке су осетљивије на промене садржаја витамина К у храни, што није детаљније испитано.

2.2.5 Појава и развој резистености домаћег миша на антикоагуланте

Појава и развој резистентности на антикоагуланте прве и друге генерације: Аутор истиче да су први подаци о смањеној осетљивости домаћег миша на антикоагуланте прве генерације (варфарин) у лабораторијским условима добијени половином шездесетих година прошлог века. Због ширења резистентности убрзано је рађено на изналажењу нових супстанци које би деловале на варфарин резистентне популације.

Половином седамдесетих година појавила се друга генерација антикоагуланата (дифенакум, бромадиолон и бродифакум), али је исте године запажено да ни ова супстанца није сасвим ефикасна у сузбијању популација резистентних на варфарин. У истраживањима која су касније уследила утврђено је постојање укрштене резистентност варфарин резистентних јединки домаћег миша на бромадиолон и дифенакум. Такође, утврђена је добра ефикасност бродифакума и предложано његово коришћење у ситуацијама развоја укрштене резистентности на варфарин, односно и на бромадиолон и дифенакум. Генетска основа резистентности домаћег миша на антикоагуланте: Ово питање аутор разматра у више праваца:

Од открића *vkorc1* гена сматра се да су промене у њему један од главних разлога смањења осетљивости домаћег миша на антикоагуланте. На основу секвенци овога гена могло се утврдити постојање резистентности код глодара на основу утврђених варијанти овог гена.

До сада је утврђено 9 промена у секвенци *vkorc1* гена код домаћег миша. Три типа аминокиселинских замена (VKOR варијанти) повезују се са променом осетљивости домаћег миша на антикоагуланте, због којих се значајно смањује осетљивост на комплетну прву генерацију антикоагуланата и неке антикоагуланте друге генерације. Даљим истраживањима је откривено да све аминокиселинске замене нису директни показатељ постојања резистентности. Промене на нуклеотидима не морају обавезно резултирати појавом резистентности на антикоагуланте, али је утврђено да су неке алелне варијанте *vkorc1* гена маркери за резистентност.

Сам механизам испољавања резистентности код домаћег миш није у потпуности разјашњен, али несумњиво постоји аналогност са резултатима истраживања на сивом пацову. Такође, и генетска основа резистентности домаћег миша мање је позната него код пацова. Сматра се да исти ген контролише синтезу истог протеина као и код јединки сивог пацова. И промене у овом гену резултирају променама у осетљивости на антикоагуланте, али је утврђено постојање популација резистентних јединки домаћег миша без утврђених промена у *vkorc1* гену, што указују на могући сложенији механизам развоја и наслеђивања резистентности код овог глодара.

VKOR варијанта Leu128Ser: Прве резистентне јединке домаћег миша са Leu128Ser варијантом утврђене су 1976. године, али је тек применом нових молекуларних метода на сачуваним узорцима потврђено да су те резистентне јединке домаћег миша заправо биле носиоци Leu128Ser VKOR варијанте. То је потврђено у Великој Британији, а потом и у Немачкој, Португалу и Швајцарској. Ова варијанта се јавила заједно са Спретус групом код јединки из Немачке, као и у комбинацији са варијантом Tug139Cys код јединки домаћег миша из Немачке и Португала.

Сматра се да је кодон 128 „врућа тачка“, односно место на коме је детектовано више типова аминокиселинских замена које се повезују са појавом резистентности на антикоагуланте код више врста организама. Замена леуцина са аргинином на овом кодону повезана је са резистентношћу људи на антикоагулантну терапију. Такође, замена леуцина са глицином код сивог пацова доводи до проблема у сузбијању ових јединки применом антикоагуланата.

Код носиоца Leu128Ser VKOR варијанте утврђена је ниска базална активност VKOR-а у поређењу са јединкама са дивљим типом у одсуству антикоагуланата. Активност VKOR ензима се у присуству антикоагуланта додатно смањила испод нивоа детекције у поређењу са активношћу ензима код јединки носилаца дивљег типа. Сматра се да смањена активност VKOR-а која има за последицу мањак витамина К код резистентних јединки, заправо може водити ка активацији других за сада непознатих механизма којима ће јединке надокнађивати недостатак витамина К за несметано функционисање витамин К циклуса.

Утврђено је да су носиоци ове варијанте резистентни на прву генерацију антикоагуланата и бромациолон и дифенакум као представнике друге генерације антикоагуланата.

VKOR варијанта Tyr139Cys: Резистентност код јединки домаћег миша са Tyr139Cys VKOR варијантом први пут је утврђена у Великој Британији. Такође и код ове варијанте је каснијим истраживањима и анализом сачуваних узорака применом молекуларних метода утврђено да су јединке домаћег миша које су преживеле тестове храњења заправо биле носиоци Tyr139Cys варијанте. Јединке домаћег миша са овом варијантом највише су распрострањене у Немачкој и Великој Британији а новија истраживања су потврдила присуство ове варијанте у *vkorc1* гену и код јединки домаћег миша у Швајцарској и Португалу. Осим што је ова VKOR варијанта утврђена заједно са Leu128Ser варијантом, такође је потврђено и њено истовремено јављање у комбинацији са Спретус групом код јединки домаћег миша у Немачкој и Швајцарској.

Кодон 139 истраживачи такође сматрају „врхом тачком“ јер су само код сивог пацова регистроване три врсте замена тирозина на истом кодону (Tyr139Cys, Tyr139Ser, Tyr139Phe) које се повезују са појавом резистентности. Аминокиселина тирозин на 139. кодону представља високо очувано место у *vkorc1* гену с обзиром да се јавља код кичмењака и комараца, па се сматра да све измене на овом кодону утичу на промену активности ензима. У неким *in-vitro* истраживањима утврђено је да је Tyr139 заправо везивно место антикоагуланата. Сматра се да замена тирозина другом аминокиселином резултира немогућношћу антикоагуланта да се веже за VKORC1.

Код носилаца Tyr139Cys варијанте утврђено је да имају базалну активност VKOR ензима мању од дивљег типа. У присуству антикоагуланата активност ензима се додатно смањује, али је и даље већа од активности VKOR-а у поређењу Leu128Ser варијантом.

Tyr139Cys варијанта је доста истраживана код сивог пацова и превалентна је у популацијама сивог пацова у европским државама као што су Немачка, Данска, Француска, Велика Британија, Белгија и Норвешка, а њено присуство је потврђено у Мађарској, што је до сада представљао једини резултат о резистентности глодара уопште на овим просторима. Резултати скоријих истраживања указују на угинуће мањег броја носилаца ове варијанте током третмана бромациолоном у популацијама сивог пацова.

До сада је утврђено да су јединке домаћег миша, носиоци ове VKOR варијанте, резистентни на прву генерацију антикоагуланата и бромациолон. Ефикасност осталих антикоагуланата друге генерације на ову варијанту до сада није утврђивана на домаћем мишу.

Спретус група (Arg12Trp/Ala26Ser/Ala48Thr/Arg61Leu): Укрштањем алжирског миша (*Mus spretus*) са домаћим мишем (*Mus musculus*) откривено је да се преносе аели резистентности, односно да долази до преноса групе везаних мутација (Спретус група). То је потврђено у Немачкој, Швајцарској и Португалу. Код домаћег миша ова варијанта може бити у комбинацији са Leu128Ser и Tyr139Cys варијантама.

У *in vitro* истраживањима појединачно је потврђен утицај сваке VKOR варијанте која се налази у Спретус групи. За Arg12Trp и Arg61Leu утврђена је ниска базална VKOR активност у односу на „дивљи тип“ (секвенце без промене), а за варијанте Ala26Ser и Ala48Thr је утврђена већа базална активност VKOR-а у односу на претходно поменуте две варијанте. У комбинацији са Спретус групом среће се и Arg58Gly варијанта која, такође, има јак утицај на монобазалну VKOR активност, док се у присуству антикоагуланта не одржава активност VKOR-а. За Спретус VKOR варијанту утврђено је да доводи до резистентности на прву генерацију антикоагуланата и поседује одређени степен резистентности на дифенакум.

2.2.6 Могућност сузбијања резистентних јединки домаћег миша

Плејотропни ефекат *vkorc1* гена: Поред разлике у секвенци *vkorc1* гена, између осетљивих и резистентних јединки утврђене су разлике у разним физиолошким процесима. Осетљиве јединке налазе се у биолошкој предности у односу на резистентне. Полиморфизам *vkorc1* гена поред тога што утиче на испољавање резистентности, у вези је са измењеном активности ензима чију синтезу контролише овај ген.

Као последица плејотропног ефекта *vkorc1* гена резистентне јединке имају природно смањену активност VKOR-а. Разлике у ензимској активности резистентних јединки за различите

антикоагуланте директно су указивале и на различите нивое резистентности јединки са истим типом *vkorc1* варијанте.

Полиморфизам *vkorc1* гена може утицати и на друге витамин К зависне реакције у организму као што су минерализација и артеросклеротична калцификација. Смањена активност VKOR-а може довести до смањења костне густине. Последице недостатака витамина К се код резистентних глодара могу одразити и преко смањеног нивоа репродукције и заостајања у порасту што указује на еволутивну предност осетљивих јединки у ситуацијама када се антикоагулант не примењује.

Разлике у потребама у витамину К посебно су изражене између различитих генотипова, односно хетерозиготних и хомозиготних јединки. Због драстично смањене активности VKOR ензима хомозиготне јединке имају захтеве у витамину К веће него хетерозиготне, што за последицу има израженију калцификацију аорте, као и мањи репродуктивни потенцијал код хомозиготних јединки.

Увођење нових антикоагуланата у практичну примену: Аутор истиче да је због појаве резистентности смањена ефикасност антикоагулантних родентицида. Количине примене неефикасних антикоагуланата могу бити и 10x веће него антикоагуланата на које није развијена резистентност. Уз то, садржај родентицида у резистентним јединкама може бити и до 5x већи у односу на осетљиве јединке јер резистентне јединке вишеструко дуже преживљавају, што може чинити еколошки проблем.

Први корак по утврђивању резистентности је искључивање супстанце из примене и замена са другим ефикаснијим родентицидима. У Немачкој се бродифакум, флокумафен и дифетиалон предлажу као решење за сузбијање популација у којима су присутне неке од три познате VKOR варијанте за које се везује смањена осетљивост домаћег миша. Примена ових антикоагуланата се препоручује само у областима где је регистрована резистентност на бромадиолон и дифенакум.

Скорија истраживања везана за налажење решења проблема сузбијања Tyr139Cys јединки пацова, које се повезују са високим нивоом резистентности на бромадиолон препоручују примену дифенакума. И бродифакум је испољио већу ефикасност од дифенакума у сузбијању резистентних јединки на бромадиолон. RRAC (Rodenticide Resistance Action Committee) препоручује да се бродифакум користи за сузбијање јединки сивог пацова у популацијама коју чине носиоци Tyr139Cys варијанте.

Сматра се да примена антикоагуланата, на које је резистентност већ развијена, за сузбијање популација са ниским степеном резистентности (хетерозиготних и евентуално мање хомозиготних јединки) може довести до значајног повећања учесталости резистентних алела (хомозиготних јединки). Насупрот томе искључивањем антикоагуланта из примене, на који је резистентност већ развијена, смањује се присуство резистентних алела у популацији. Због недостатака који прате резистентне јединке у односу на осетљиве (недостатак витамина К), осетљиве јединке могу бити фаворизоване у природи, када се не би користили антикоагуланати на које је већ развијена резистентност. Број хомозигота би се смањивао у односу на хетерозиготе. Сматра се да би за период од 2 до 4 године дошло до губљења резистентних алела, што је посебно важно на самом почетку појаве резистентности, који се заснива на појави хетерозигота.

Потенцијални фактори утицаја на ефикасност антикоагуланата: Неефикасност антикоагуланта на терену углавном се објашњава постојањем резистентних јединки. Али, до смањене ефикасности може доћи и због других разлога. Неправилно извођење дератизације чест је узрок неуспеха током сузбијања штетних глодара. Кратак период излагања мамца, и недоступност мамца, мала количина, као и загађивање неповољно се одражавају на ефикасност сузбијања глодара. Такође, насељавање нових јединки као и присуство алтернативних извора хране и понашање јединки током исхране додатно утичу на неуспех дератизације.

Како се витамин К (K₁ и K₂) налази у поврћу, млечним производима, месо, јајима и друго, могуће је да јединке у исто време уносе и антикоагулант и антидот. Неефикасност антикоагуланата као последицу понашања јединки регистрована је код домаћег миша. У неким популацијама установљено је да не узимају мамац на бази житарица јер имају смањени ниво или им недостаје ензим алфа амилаза у дигестивном тракту. Овај физиолошки проблем је наследан и с обзиром на брзину размножавања кућног миша врло брзо се шири унутар популације.

2.3 МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ

2.3.1 Локалитети и изловљавање јединки

За потребе експеримената изловљаване су јединке домаћег миша у складиштима у којима су антикоагуланти (првенствено бромадиолон) интензивно коришћени (Сурчин, Земун Поље, Смедеревска Паланка), односно умерено коришћени (Стара Пазова, Уљма, Бачки Јарак) и на приватном газдинству (Барајево), где родентициди раније нису коришћени.

Изловљавање је спровођено у периодима март-април и септембар-октобар. Коришћене клопке живоловке тип Longworth. На сваком локалитету изловљавање је спроведено у периоду од 4 узастопна дана. Са сваког локалитета у лабораторију је донето по 20 адултних јединки (10 мужјака и 10 женки). Јединке за које се сумњало да су гравидне, болесне или нису биле полно зреле нису доношене у лабораторију. Такође, у лабораторију нису доношене јединке које су показивале знакове стреса (дрхтање, слаба покретљивост).

2.3.2 Чување и аклиматизација јединки

Пре почетка експеримента, све изловљене јединке домаћег миша су прилагођаване на лабораторијске услове (21 дан). Чуване појединачно у стандардним пластичним кавезима на собној температури и влажности и једнаком односу светло/тама. Током периода аклиматизације јединке су храњене лабораторијском храном за мишеве. Вода је била стално доступна. На исти начин су чуване јединке које нису биле укључене у експерименте, као и јединке F₁ генерације, добијене укрштањем дивљих јединки домаћег миша ако су преживеле тест храњења бромадиолоном.

Спаривање преживелих дивљих јединки вршено је искључиво између јединки пореклом са истог локалитета. Све јединке F₁ генерације, старости три месеца, укључиване су у огледе са бромадиолоном по истој експерименталној шеми као и њихови родитељи. Такође, јединке преживеле тест храњења бромадиолоном укрштане су у сврху добијања потомства са смањеном осетљивошћу на бромадиолон с циљем утврђивања осетљивости на дифенакум и бродифакум. Са три месеца старости ове јединке су укључиване у тестове храњења бромадиолоном, после којих су добијене јединке са смањеном осетљивошћу на бромадиолон укључиване у огледе са дифенакумом и бродифакумом.

2.3.3 Коришћени мамци

За потребе експеримената мамци су припремани у складу са методом ЕРРО. Плацебо мамци добијену су мешањем уситњеног пшеничног зрна, кукурузног уља и пшеничног брашна у односу 90:5:5. Мамци на бази бромадиолона, дифенакума и бродифакума добијени су по истом принципу као и плацебо мамци уз додавање одговарајуће количине активне супстанце родентицида до садржаја у мамцима од 0,005 %. За припремање мамаца коришћени су течни концентрати активних супстанци произвођача Duoschem.

Сви мамци су припремљени у Лабораторији за примењену зоологију, а садржај активне супстанце проверен је у Лабораторији за примењену хемију Института за пестициде и заштиту животне средине.

2.3.4 Утврђивање осетљивости домаћег миша на бромадиолон

Утврђивање осетљивости домаћег миша на бромадиолон изведено је према методама ЕРРО (2004) и Guidobono-a и сар. (2010). У испитивање је укључивано по 10 мужјака и 10 женки са сваког локалитета. Након периода аклиматизације прво су излагане плацебо мамцима у трајању од четири дана. Потом им је понуђен мамац са садржајем бромадиолона од 0,005 % у трајању од 21 дан. За то време праћен је дневни унос мамаца и свакодневно је додаван свеж мамац. Вода је била стално доступна.

Поред конзумације мамаца свакодневно су праћени симптоми тровања антикоагулантима. Код свих угинулих јединки вршена је аутопсија како би се утврдило да ли су присутни симптоми тровања антикоагулантима према Катарановски и сар. (1980). По завршетку експеримента преживеле јединке су враћене на нормалан режим исхране, уз стално праћење појаве симптома тровања антикоагулантима у трајању од 21 дан. Јединке домаћег миша које преживе тест храњења антикоагулантима и додатни опсервацијски период у истом трајању, сматрају се резистентним

јединкама. Иста шема експеримента примењена је и на јединке Φ_1 генерације преживелих дивљих јединки.

Према методи EPPO (2004), да би антикоагулант био ефикасан на све јединке у популацији, узима се шири интервал телесних маса. Тако су почетне телесне масе дивљих јединки биле у интервалу од 10,4 - 22,9 г, а телесне масе јединки Φ_1 генерације у интервалу од 11,0 - 18,3 г. Свим јединкама измерена је и телесна маса на крају теста. Промена телесне масе утврђивана је према методи Gudobono-a и сар. (2010).

2.3.5 Утврђивање присуства мутација у *vkorc1* гену

За екстракцију DNA коришћени су делови ушне шкољке и то са угинулих јединки. Узорци су чувани на температури од -70 °C, а до саме анализе држани су у 80 % алкохолу. Укупно је анализирано 9 дивљих и 24 узорка Φ_1 генерације.

Екстракција DNA урађена је у лабораторији института Julius Kühn Institute, Vertebrate Research (Munster, Немачка) по протоколу за Puregene Core Kit A (Qiagen). Секвенционирање три егзона *vkorc1* гена урађено је у Немачкој компанији GATC према методи Pelz-a и сар. (2012) према којој су промене у секвенци *vkorc1* гена утврђиване на основу поређења са секвенцом, број NM_178 600, која је узета као дивљи тип из банке гена. Очитавања секвенци вршена су помоћу аутоматског апарата Beckman Coulter CEQ8000.

Секвенционирање сва три егзона *vkorc1* гена урађено је с циљем утврђивања присуства неких од већ познатих VKOR варијанти у егзону 3 овог гена, које се сматрају разлогом појаве резистентности код домаћег миша, као и евентуално присуство до сада неутврђених промена у секвенци *vkorc1* гена код домаћег миша.

2.3.6 Утврђивање осетљивости домаћег миша на дифенакум

Утврђивање осетљивости домаћег миша на дифенакум рађено је према методама EPPO (2004) и Rowe-a и сар. (1981). Јединке домаћег миша су излагане мамцима дифенакума у тесту храћења у трајању од 21 дан без избора хране. У огледе су укључиване само јединке које су претходно преживеле излагање бромадиолону у трајању од 21 дан. Временски период између излагања бромадиолону и дифенакуму био је седам месеци.

У тест су укључени адулти (9 мужјака и 11 женки), од којих је била позната секвенца *vkorc1* гена. Свакодневно је јединкама додаван свеж мамац дифенакума (0,005 %) и праћен је дневни унос на исти начин као у експерименту са бромадиолоном. Вода је била стално доступна. На почетку и крају теста измерена је телесна маса свих јединки. Промена телесне масе утврђивана је према методи Gudobono-a и сар. (2010).

Након 21 дан теста храћења, преживеле јединке се враћају на нормалан режим исхране уз стално праћење појаве симптома тровања антикоагулантима током периода опсервације у трајању од 21 дан.

2.3.7 Испитивање осетљивости домаћег миша на бродифакум

Испитивање осетљивости јединки домаћег миша на бродифакум урађено је према методама EPPO (2004) и Redfern-a и сар. (1976). Јединке су излагане мамцима са 0,005 % активне супстанце у трајању од један и два дана, уз стално доступну воду. У огледе су укључиване само јединке које су претходно преживеле тест храћења бромадиолоном у трајању од 21 дан. Временски период између излагања бромадиолону и бродифакуму био је седам месеци.

У периодима од 24 и 48 сати јединке су биле излагане мамцима на бази бродифакума. У оба огледа укључени су адулти (5 мужјака и 5 женки). По истеку периода храћења преживеле јединке су враћане на нормалан режим исхране, уз контролисане лабораторијске услове и стално праћење појаве симптома тровања током периода опсервације од 21 дан.

2.3.8 Обрада података

Времена преживљавања различитих група јединки домаћег миша поређена су коришћењем Log-rank теста. Ниво значајности био је $p < 0,05$. Вредности укупне и просечне конзумације израчунате су за цео период храћења за сваку јединку појединачно према следећим формулама: укупна, односно

просечна конзумација је добијена дељењем суме, односно просечне конзумације мамца током укупног периода храњења са почетном телесном масом.

За утврђивање утицаја различитих фактора на укупну конзумацију мамца антикоагуланата, као и просечну конзумацију мамца за све јединке из теста коришћен је Студентов t-тест и факторијална анализа варијансе (ANOVA). Даљом post-hoc анализом поређења су вршена коришћењем Tukey HSD теста. Ниво значајности за сва поређења био је $p < 0,05$.

Промена телесне масе израчуната је за сваку јединку појединачно према формули коју су дали Guidobono и сар. (2010). За податке о телесној маси који нису имали нормалну расподелу, након логаритамске трансформације, за статистичку обраду су коришћени непараметријски тестови (Mann-Whitney U тест и Kruskal Wallis тест). Добијени подаци су обрађени према упутствима Sokal i Rohlf-a (1995) и помоћу софтверског пакета Statistika for Windows 6.0 (Stat Soft Italia, 1997).

2.4 РЕЗУЛТАТИ

2.4.1 Осетљивост домаћег миша на бромадиолон

Конзумирање плацебо мамца: Током четири дана храњења мужјаци су укупно појели 890 г, док су женке појеле 807,9 г плацебо мамца. Просечне вредности конзумирања за мужјаке и женке износиле су $12,76 \pm 2,52$ г и $11,68 \pm 2,11$ г. Конзумирање плацебо мамца код мужјака на свим локалитетима, изузев јединки изловљених на локалитету Бачки Јарак, било је веће у односу на женке. Између мужјака и женки утврђене су статистички значајне разлике у укупној конзумацији плацебо мамака.

Време преживљавања: Тест излагања деловању бромадиолона преживело је 10 дивљих јединки са локалитета Сурчин и Земун Поље. Преживелих јединки са других локалитета није било али им се дужина периода преживљавања разликовала. Најдужи период преживљавања осетљивих јединки забележен је код јединки са локалитета Смедеревска Паланка (≤ 18 дана), потом Уљме и Бачког Јарка (≤ 15 дана). Период преживљавања осетљивих јединки са осталих локалитета био је ≤ 10 дана.

Тест излагања деловању бромадиолона преживело је 10 јединки Φ_1 генерације. Осетљиве јединке из Сурчина угинуле су до шестог дана теста, док је код осетљивих јединки са локалитета Земун Поље утврђен период преживљавања од ≤ 18 дана. На оба локалитета укупно је преживео већи број женки него мужјака. Код јединки Φ_1 генерације, које су добијене укрштањем преживелих јединки са локалитета Земун Поље, није било преживелих мужјака.

Најкраће време преживљавања утврђено је код јединки са локалитета Барајево, потом Бачки Јарак, Стара Пазова и Уљма (140–154 сата). Најдуже време преживљавања утврђено је за јединке са локалитета Земун Поље (287 сати) те Сурчин и Смедеревска Паланка (285 и 224 сата).

Време преживљавања домаћег миша са локалитета Стара Пазова, Уљма, Бачки Јарак и Барајево статистички се значајно разликовало од локалитета Сурчин, Земун Поље и Смедеревска Паланка. Такође, код женки (236 сати) је утврђено дуже време преживљавања у односу на мужјаке (185 сати). Разлике су статистички значајне. Такође, укупно је преживело већи број женки (17, %) у односу на мужјаке (7,1 %).

Код свих угинулих јединки аутопсијом су потврђени симптоми тровања антикоагулантима. Поред спољашњих симптома као што су крварење из носа, ануса и крвав фецес, потврђени су и знаци унутрашњег крварења у плућима и цревном тракту.

Конзумација бромадиолон мамца: У оквиру четири дела аутор приказује податке о конзумирању мамца по локалитетима, осетљивости и полу, као и одступањима у исхрани током експеримената.

Конзумација мамца према локалитетима и пореклу домаћег миша: Код дивљих јединки утврђено је веће укупно конзумирање бромадиолон мамца у односу на јединке Φ_1 генерације. Разлике су биле статистички значајне, а није било значајности разлика у просечној количини конзумираног мамца.

Код јединки са локалитета Барајево утврђено је најмање укупно конзумирање мамца. Следе локалитети Бачки Јарак, Стара Пазова и Уљма, а највише мамца појеле су јединке са локалитета Смедеревска Паланка, Земун Поље и Сурчин. Разлике су статистички значајне изузимајући локалитет Смедеревска Паланка. Значајне разлике у просечном конзумирању мамца утврђене су једино између јединки са локалитета Земун Поље и Смедеревска Паланка.

Најнижа летална доза код дивљих јединки домаћег миша утврђена је за јединке са локалитета Барајево, а највећа са локалитета Смедеревска Паланка. Најнижа летална доза код женке са локалитета Стара Пазова (21 мг/кг), а највећа са локалитета Сурчин (237,3 мг/кг). Код јединки из Сурчина утврђена је већа нелетална доза у односу на јединке из Земун Поља. Највећи летални период храњења утврђен је код јединки са локалитета Смедеревска Паланка, а најмањи код јединки са локалитета Барајево. Највећа летална и нелетална доза за јединке F_1 генерације утврђена је за јединке из Земун Поља.

Конзумација мамца према осетљивости домаћег миша: Код осетљивих јединки домаћег миша (дивље и F_1 генерација) утврђена је ниже укупно и просечно конзумирање хране у односу на резистентне.

Код резистентних јединки, утврђена је веће укупна конзумација код дивљих јединки у односу на F_1 генерацију, док се просечно конзумирање није разликовало. За јединке F_1 генерације утврђена је већа летална доза у односу на дивље јединке. Већа нелетална доза забележена је код дивљих јединки.

Конзумација мамца према полу домаћег миша: Пол је испољио утицај на укупно конзумирање мамца. Женке су показале већи ниво резистентности на бромадиолон у односу на мужјацима. И осетљивост је имала утицаја на укупно конзумирање јединки домаћег миша, док статистички значајног утицаја порекла као и интеракција ових фактора није била од значаја.

Одступања у конзумацији мамца током теста: Највише хране су конзумирале јединке које су угинуле после 14. дана храњења, али су укупне вредности конзумирања биле сразмерне са периодом храњења. Утврђено је да није било одступања у конзумирању мамца код резистентних јединки и да није било статистички значајних разлика у конзумирању мамца током теста.

Промена телесне масе: Константовано је да између дивљих и јединки F_1 генерације нису утврђене статистички значајне разлике у промени телесне масе. Између јединки пореклом са различитих локалитета утврђене су значајне разлике у промени телесне масе. Утврђено је да пол није имао утицаја на промену телесне масе, док је осетљивост имала значајан утицај. Интеракција ова два фактора није имала утицаја на промену телесне масе домаћег миша.

2.4.2 Полиморфизам *vkorc1* гена

Утврђене варијанте *vkorc1* гена: Утврђене су промене у секвенци *vkorc1* гена код свих анализираних дивљих и јединки F_1 генерације. VKOR варијанте Leu128Ser и Tyr139Cys потврђене су у трећем егзону *vkorc1* гена и код дивљих и јединки F_1 генерације. Такође, код неких јединки потврђено је присуство обе варијанте истовремено у егзону 3 (Leu128Ser/Tyr139Cys). Leu128Ser варијанта није утврђена код дивљих јединки. Ова варијанта се код дивљих јединки јављала само у комбинацији са Tyr139Cys варијантом.

Највећи број дивљих јединки (5/9) биле су носиоци Leu128Ser/Tyr139Cys варијанте. Код F_1 генерације утврђена је највећа заступљеност Tyr139Cys (9/24) и Leu128Ser (8/24) варијанти. Мањи број јединки (6/24) биле су носиоци комбинације ове две варијанте.

У егзону 1 утврђено је присуство нове промене у *vkorc1* гену Ala21Thr (замена аланина треонином на 21. кодону). Ова мутација утврђена је код једне дивље јединке и једног њеног потомка. Код дивље јединке ова варијанта јавила се заједно са варијантом Tyr139Cys (Ala21Thr/Tyr139Cys).

Све женке са Tyr139Cys варијантом биле су резистентне. VKOR варијанта Leu128Ser утврђена је само код осетљивих јединки. Обе варијанте истовремено су утврђене код резистентних и осетљивих јединки. До сада неутврђена варијанта Ala21Thr, утврђена је само код две резистентне јединке.

Све анализираних дивље резистентне јединке биле су хетерозиготи за све утврђене VKOR варијанте. Такође, све утврђене комбинације VKOR варијанти (Leu128Ser/Tyr139Cys и Ala21Thr/Tyr139Cys) биле су у хетерозиготном стању. Нова варијанта Ala21Thr такође је утврђена само у хетерозиготном стању. Хомозиготне јединке утврђене су код јединки F_1 генерације за носиоце Tyr139Cys и Leu128Ser варијанти.

Утицај VKOR варијанте на време преживљавања: Најкраће време преживљавања утврђено је код Leu128Ser јединки, док је најдуже време преживљавања забележено код јединки са комбинацијом варијанти Leu128Ser/Tyr139Cys. Такође, слично време преживљавања имале су и Tyr139Cys јединке. Оба носиоца Ala21Thr варијанте преживела су 21 дан теста храњења. На крају теста преживело је

66,67% јединки са Tyr139Cys варијантом и 63,64% Leu128Ser/Tyr139Cys јединки. Није било преживелих јединки са Leu128Ser варијантом.

Време преживљавања јединки домаћег миша са различитим типом VKOR варијанте статистички се значајно разликовало. Између Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys јединки није било статистички значајних разлика, док се време преживљавања Leu128Ser јединки статистички значајно разликовало од поменутих две варијанте.

Утицај VKOR варијанте на конзумацију мамца: Најниже укупно конзумирање мамца утврђено је за носиоце Leu128Ser варијанте, док је највеће конзумирање мамца утврђено код Leu128Ser/Tyr139Cys јединки. Најниже просечно конзумирање утврђено је код Leu128Ser јединки, док је највеће конзумирање утврђено код Leu128Ser/Tyr139Cys јединки. За различите типове варијанти *vkorc1* гена утврђена је статистички значајна разлика у укупном и просечном конзумирању између варијанти Leu128Ser/Tyr139Cys, Leu128Ser и Tyr139Cys.

Групе Ala21Thr и Ala21Thr/Tyr139Cys биле су искључене из статистичке обраде због недовољног броја јединки који је потребан за статистичку анализу у овим групама, али су њихови представници показали висок ниво резистентности на бромадиолон на основу вредности укупног конзумирања мамца. Утицај VKOR варијанте и генотипа на конзумирање није могао бити статистички анализиран с обзиром да није било довољно јединки у појединим групама. Утврђен је већи ниво резистентности на бромадиолон код хетерозиготних у односу на хомозиготне јединке. Такође, код хетерозиготних јединки утврђен је и већи дневни унос мамца.

Утицај VKOR варијанте на промену телесне масе: Код свих јединки, осим неких носиоца Leu128Ser/Tyr139Cys варијанте, утврђен је губитак у телесној маси током теста храњења бромадиолоном. Најмањи је био код Leu128Ser/Tyr139Cys јединки, а највећи код групе Leu128Ser јединки. Носиоци Ala21Thr варијанте, односно Ala21Thr и Ala21Thr/Tyr139Cys, такође су губили телесну масу током теста.

Утврђен је статистички значајан утицај VKOR варијанте на промену телесне масе. Статистички значајне разлике су утврђене између носиоца Leu128Ser и Leu128Ser/Tyr139Cys, а између носиоца Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys, као и Leu128Ser и Tyr139Cys није било статистички значајних разлика. Код Leu128Ser/Tyr139Cys женки утврђен је најмањи губитак телесне масе током теста храњења. Најмањи губитак телесне масе код мужјака утврђен је код носиоца Leu128Ser/Tyr139Cys варијанте. Код носиоца Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys женке утврђен је мањи губитак телесне масе у односу на мужјаке. Већи губитак телесне масе је забележен код хомозиготних у односу на хетерозиготне јединке, али разлике нису статистички значајне.

2.4.3 Осетљивост домаћег миша на дифенакум

Време преживљавања: Угинуле су све јединке (16 са познатим VKOR варијантама и 4 чија секвенца *vkorc1* гена није била позната), које су храњене мамцем са дифенакумом, а претходно преживеле храњење бромадиолоном у трајању од 21 дан. Сви носиоци Leu128Ser/Tyr139Cys варијанте и јединке чија секвенца *vkorc1* гена није била позната угинуле су до осмог дана теста. Све јединке са Tyr139Cys варијантом угинуле до дванаестог дана теста. Женка носилац комбинације варијанти, Ala21Thr/Tyr139Cys, угинула је до петог дана теста. Није било статистички значајне разлике у времену преживљавања између група јединки према VKOR варијанти.

Код мужјака је утврђен период преживљавања од 3 до 9 дана, док је код женки утврђен период био од 2 до 11 дана. Није било статистички значајних разлика у времену преживљавања. Период преживљавања од 2 до 7 дана утврђен је код хетерозиготних јединки, док је период од 4 до 11 дана утврђен за хомозиготне јединке, али генотип није испољио утицај на време преживљавања јединки домаћег миша у тесту храњења дифенакумом.

Код свих угинулих јединки аутопсијом су потврђени симптоми тровања антикоагулантима. Поред спољашњих симптома као што су крварење из носа, ануса и крвав фецес, потврђени су и знаци унутрашњег крварења у плућима и цревном тракту.

Конзумација мамца: Дифенакум је испољио подједнако добру ефикасност на све резистентне јединке без обзира на VKOR варијанту. За носиоце комбинација варијанти утврђене су номинално веће вредности укупног конзумирања мамца. Код женке са комбинацијом Ala21Thr/Tyr139Cys

забележена је највећа вредност укупног конзумирања. Јединке чија секвенца *vkorc1* гена није била позната конзумирале су мамац слично као носиоци Tyr139Cys варијанте.

Између носиоца Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys варијанти нису утврђене статистички значајне разлике у укупном и просечном конзумирању мамаца. Не постоје ни између хетерозиготних и хомозиготних јединки иако су код хетерозиготних утврђене номинално веће вредности просечног конзумирања мамаца. И код женки су утврђене номинално веће вредности укупног и просечног конзумирања, али разлике нису статистички значајне.

Промена телесне масе: Само код јединки чија секвенца *vkorc1* гена није била позната забележено је повећање телесне масе. Код осталих јединки домаћег миша или није било промене или су јединке губиле у телесној маси током теста.

Јединке са Tyr139Cys варијантом, која се јавила самостално (Tyr139Cys) или у комбинацији (Tyr139Cys /Leu128Ser), или нису мењали своју телесну масу или су губили на телесној маси. Највећи губитак телесне масе утврђен је код Tyr139Cys хомозиготне женке. Најмања просечна вредност промене телесне масе утврђена је код јединки са комбинацијом Leu128Ser/Tyr139Cys. Код јединки са Tyr139Cys варијантом и јединки чија варијанта није била позната утврђене су исте просечне вредности промене телесне масе. Номинално најмања вредност промене телесне масе од 0,03% утврђена је код женке са Ala21Thr/Tyr139Cys варијантом.

Статистички значајне разлике у промени телесне масе између носиоца Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys варијанти нису утврђене. Код мужјака и женки утврђена је приближно иста промена телесне масе, где пол није имао значајан утицаја на промену телесне масе. Број хомозиготних јединки укључених у тест храњења дифенакумом је био вишеструко мањи од броја хетерозиготних јединки, али је утврђена просечна вредност промене телесне масе била већа од промене телесне масе хетерозиготних јединки. Такође, утврђено је да на промену телесне масе током теста храњења дифенакумом мамаца није утицао ни генотип.

2.4.4 Осетљивост домаћег миша на бродифакум

Смртност јединки домаћег миша у тесту храњења бродифакумом при експозицији од 24 сата била је 90 %. Једна јединка је преживела период експозиције и период опсервације. При експозицији од 48 сати смртност јединки у тесту била је 100 %.

Све угинуле јединке из теста 24 сата експозиције угинуле су до шестог дана током периода опсервације. Код неких јединки спољашњи симптоми тровања (слаба покретљивост, крварење из носа) били су видни већ првог дана периода опсервације. Код јединки из теста излагања мамаца бродифакума у трајању од 48 сати током периода опсервације забележена су угињавања. Све женке су угинуле до седмог дана, док су мужјаци угинули у периоду од 4. до 18. дана периода опсервације. При обе експозиције (24 сата и 48 сати) код женки је утврђен већи унос мамаца бродифакума.

2.5 ДИСКУСИЈА

2.5.1 Тест храњења бромадиолоном

Разматрајући своје резултате и поредећи их са резултатима других истраживача аутор констатује да је потврђена резистентност јединки домаћег миша на бромадиолон на локалитетима Сурчин и Земун Поље. На остала четири локалитета, на којима је бромадиолон коришћен резистентност није потврђена. Преживљавање јединки током сузбијања на овим локалитетима последица је неуношења леталних доза бромадиолона, вероватно због присуства алтернативних извора хране или неког другог разлога.

Резистентност се могла очекивати и на локалитету Смедеревска Паланка, где је утврђена знатно мања осетљивост домаћег миша у односу на остале локалитете. Највећа осетљивост утврђена је на локалитету Барајево, где никада раније није било примене антикоагуланата и где су све јединке угинуле до осмог дана теста.

Да примена бромадиолона доводи до селекције резистентних јединки указао је и Guidobono и сар. (2010). Применом се не мења наследна основа јединки домаћег миша већ врши селекциони притисак на популацију. У складу са тим су и резултати Heiberg-a и сар. (2009). Они су на пацовима констатовали да сузбијање глодара не мора да се усклади са појавом и степеном резистентности.

Интензивна примена антикоагуланта, на који је резистентност већ развијена, доводи у предност резистентне јединке. У вези са тим Heiberg i sar. (2003) сматрају да бромадиолон не утиче на појаву резистентности код глодара већ само доводи до ширења резистентних алела.

Код јединки са локалитета на којима је потврђена резистентност утврђен је већи број преживелих женки у односу на мужјаке. У складу са тим су и резултати Rowe-a i Redfern-a (1967) који су кроз три тестиране категорије (родитељи, F₁ i F₂ генерација) утврдили већу смртност мужјака у свакој категорији у тестовима храњења варфарином. Насупрот томе Guidobono и сар. (2010) нису утврдили утицај пола на време преживљавања код дивљих и лабораторијских популација домаћег миша.

Већу смртност мужјака у тестовима храњења варфарином и бромадиолоном утврдио је и Prescott (1996). Такође, Heiberg и сар. (2003) су утврдили већу осетљивост мужјака пацова на промене садржаја витамина К у исхрани.

Јединке домаћег миша испољиле су различите нивое резистентности у зависности од дужине периода конзумирања, односно укупно конзумираног мамца бромадиолона. Највеће укупно конзумирање утврђено је код јединки из Сурчина и Земун Поља. Најмање конзумирање утврђено је код јединки из Барајева, док разлика у просечном конзумирању мамца није било. Такође, Guidobono и сар. (2010) су добили приближно исту вредност просечне леталне дозе код лабораторијске осетљиве популације домаћег миша у односу на јединке из Барајева.

Нелеталне дозе за преживеле јединке из Сурчина и Земун Поља су много веће у поређењу са нелеталним дозама у истраживању Rowe-a и сар. (1981), што указује на висок ниво резистентности јединки из Сурчина и Земун Поља на бромадиолон.

Резистентне јединке конзумирале су три пута више мамца од осетљивих јединки, што важи и за однос леталних и нелеталних доза у тесту. Деловање бромадиолона условило је промене у понашању осетљивих јединки и утицало на смањено конзумирање, за разлику од резистентних јединки које су наставиле са нормалним конзумирањем до краја теста. Rowe i Redfern (1964, 1965) у тесту храњења варфарином и Guidobono и сар. (2010) у тесту храњења бромадиолоном утврдили су разлике у исхрани резистентних јединки током теста, односно утврђен је прекид у конзумирања мамца уз појаву симптома тровања а након пар дана и поновни опоравак јединки и наставак нормалног конзумирања.

Осим разлика у времену преживљавања потврђена је разлика у конзумирању мамца између мужјака и женки. У свим категоријама формираним према пореклу и осетљивости, код женки је забележено веће укупно конзумирање мамца. Такође, су утврђене веће и леталне и нелеталне дозе код женки дивљих јединки и њихових потомака. Са тим нису у складу резултати Redfern-a i Gill-a (1980).

Телесна маса свих јединки током теста је варирала. Код осетљивих јединки већи је губитак масе у односу на резистентне јединке. Слично су утврдили Guidobono и сар. (2010). Ови истраживачи утврдили су мањи губитак телесне масе мужјака током теста код лабораторијске и дивље осетљиве и дивље резистентне популације домаћег миша.

Телесна маса не утиче на преживљавање јединки током теста. Насупрот томе Rowe i Redfern (1964) утврдили су да почетна телесна маса јединки утиче на стопу преживљавања јединки у тесту. Код њих се стопа смртности повећавала са смањењем телесне масе, што није био случај у овом истраживању.

2.5.2 Утицај VKOR варијанте на ниво резистентности

Аутор истиче да је секвенционирањем *vkorc1* гена потврђено је присуство VKOR варијанти (Leu128Ser и Tyr139Cys) код свих анализираних узорака, које се доводе у везу са резистентности домаћег миша на антикоагуланте (Pelz и сар., 2005; Rost и сар., 2009; Pelz и сар., 2012). Потврђене су у трећем егзону код већине јединки, а нађене су и њихове комбинације и код дивљих и код јединки F₁ генерације. Pelz и сар. (2005), Rost и сар. (2009) и Pelz и сар. (2012) су утврдили Leu128Ser и Tyr139Cys варијанте само код резистентних јединки домаћег миша. Код осетљивих јединки нису утврдили промене у секвенци *vkorc1* гена. Комбинацију поменутих варијанти код домаћег миша потврдили су једино Pelz и сар. (2012). Исти истраживачи су потврдили и комбинације ових варијанте са Спретус групом.

VKOR варијанта Ala21Thr до сада није утврђена код домаћег миша. У популацијама сивог пацова у Кореји и црног пацова у Јапану, утврђено је присуство ове промене у *vkorc1* гену (Rost и сар., 2009; Tanaka и сар., 2012). Могуће је да је Ala21 још једно место у *vkorc1* гену које је подложно изменама код више различитих врста, које би могло бити у вези са појавом резистентности на антикоагуланте.

Endepols и сар. (2011) утврдили су да се код домаћег миша јављају алелне варијанте *vkorc1* гена које немају утицаја на резистентност јединки, као што је случај са Arg58Gly варијантом. За нову варијанту Ala21Thr за сада је немогуће тврдити да је узрок појаве резистентности код јединки домаћег миша. Ни у истраживањима Rost-а и сар. (2009) и Tanaka-а и сар. (2012) није доказан утицај ове варијанте на резистентност код поменутих врста глодара. У овом истраживању оба носиоца ове варијанте преживела су тест храњења што указује на могући утицај ове варијанте на резистентност домаћег миша на бромадиолон.

Код свих анализираних дивљих јединки нађене VKOR варијанте биле су у хетерозиготном стању. И све комбинације варијанти су биле у хетерозиготном стању. То је у складу са резултатима Pelz-а и сар. (2012). Како су код дивљих јединки утврђена само хетерозиготна стања, која карактеришу почетне стадијуме развоја резистентности (Greaves, 1994), вероватно је на локалитетима Сурчин и Земун Поље развој резистентности на бромадиолон у почетној фази. Високи проценат хомозигота већ у првој генерацији потомака указује на потенцијалну брзину ширења алела у популацији домаћег миша.

Све резистентне јединке биле су носиоци неке од нађених VKOR варијанти. И све осетљиве јединке такође су биле носиоци различитих варијанти *vkorc1* гена. Неслагање између фенотипа и генотипа код домаћег миша потврдили су и Endepols и сар. (2011, 2013). До сада нема потврде да су осетљиве јединке домаћег миша биле носиоци неке од VKOR варијанти поменутог гена, као што је био случај у нашем истраживању.

Бројни аутори (Pelz и сар., 2005; Heiberg и сар., 2009; Endepols и сар., 2012) сматрају да поред полиморфизма *vkorc1* гена постоје и неки други механизми од којих зависи резистентност глодара. Pelz и сар. (2005) су према BCR методи јединке сивог пацова класификовали као осетљиве јединке, а код неких јединки је секвенционирањем *vkorc1* гена утврђено да су носиоци Tyr139Cys варијанте, што је тада сматран лажно негативним BCR резултатом. Heiberg и сар. (2009) су код сивог пацова BCR методом утврдили присуство осетљивих и резистентних јединки, али секвенционирањем сва три егзона нису потврђене промене у секвенци *vkorc1* гена. У истраживању Endepols и сар. (2012) код скоро 50 % јединки сивог пацова, које су угинуле током третмана бромадиолоном, потврђена је Tyr139Cys варијанта.

Код носилаца Leu128Ser варијанте смртност је била потпуна, за најкраће време. Највећа стопа и време преживљавања домаћег миша утврђена је у групи носилаца Tyr139Cys варијанте. Такође, у групи носилаца Leu128Ser/Tyr139Cys комбинације преживела је већина јединки. Оне се статистички значајно не разликују, а разлог може бити то што обе ове групе имају Tyr139Cys варијанту.

Код Leu128Ser/Tyr139Cys јединки утврђена је највећа летална и нелетална доза у односу на јединке са само једном од њих. Исто је утврђено и код носилаца нове, Ala21Thr, варијанте. Код јединке код које је ова варијанта нађена заједно са Tyr139Cys варијантом утврђена је већа нелетална доза. Исто је утврђено и за укупно конзумирање мамца бромадиолона.

Женке су укупно више конзумирале мамац, код свих варијанти *vkorc1* гена. Све Tyr139Cys женке преживеле су тест храњења. Просечне вредности укупног конзумирања мамца бромадиолона у групама Leu128Ser, Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys варијанти, биле су ниже од укупног конзумирања женки носиоца Ala21Thr/Tyr139Cys комбинације. Јединке са овом комбинацијом варијанти имале су и највећу нелеталну дозу.

Промене у телесној маси током трајања теста последица су израженијег и деструктивнијег деловања бромадиолона на Leu128Ser у односу на Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys јединке. Код носилаца комбинације Leu128Ser/Tyr139Cys утврђен је најмањи губитак телесне масе, а највећи код Leu128Ser јединки. Tyr139Cys јединке биле су према просечним вредностима између ове две групе јединки. Такође, у групи Leu128Ser/Tyr139Cys јединки утврђено је и повећање телесне масе, док су јединке из остале две групе губиле телесну масу током теста. Мањи губитак телесне масе био је код женки носиоца Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys варијанти.

До сада је потврђено присуство комбинација VKOR варијанти код домаћег миша једино у истраживању Pelz-a и сар. (2011, 2012). Утврђене су комбинације Спретус група/Arg58Gly, Спретус група/Leu128Ser, Спретус група/Tyr139Cys, Leu124Gln/Leu128Ser (замена леуцина на 124. кодону са глутамином) и Leu128Ser/Tyr139Cys. Утицај комбинација VKOR варијанти на ниво резистентности код глодара на бромадиолон и друге антикоагуланте до сада није испитиван, као ни утицај пола у комбинацији са VKOR варијантом. Утврдили смо већи ниво резистентности на бромадиолон код јединки са комбинацијама VKOR варијанти него што је то случај када се варијанте јаве самостално, што се односи и на женке у односу на мужјаке. Kohn и сар. (2008) у истраживању о степену калцификације аорте код сивог пацова приметили су разлику у односу на пол. Већи степен калцификације забележен је код мужјака што може објаснити већу стопу преживљавања женки у нашем истраживању.

Да су јединке са Tyr139Cys варијантом у биолошкој предности у односу на Leu128Ser варијанту доказали су и други истраживачи у *in vitro* истраживањима. Pelz и сар. (2005) у испитивању активности VKOR ензима код јединки носилаца дивљег типа и различитих VKOR варијанти указују да јединке са Leu128Ser варијантом пате од већег недостатка витамина К, односно да су јединке са Tyr139Cys варијантама у биолошкој предности у односу на ове јединке. Разлог је мања базална VKOR активност Leu128Ser варијанте, односно активност ензима код ових јединки када нису третиране антикоагулантима. У присуству варфарина активност ензима код Tyr139Cys варијанте смањила се на четвртину, док је код Leu128Ser варијанте активност била минимална. Да се базална активност ензима више смањује у присуству антикоагуланта код Leu128Ser него код Tyr139Cys варијанте потврдили су и Rost и сар. (2009).

Од укупног броја тест храњења преживело је више хетерозиготних јединки него хомозиготних јединки. Јединке, чији су секвенца и генотип *vkorc1* гена били познати већином су биле хетерозиготи. Код хетерозиготних јединки утврђено је веће укупно конзумирање мамца. Такође, код њих су веће и леталне и нелеталне дозе, као и мања промена телесне масе.

На биолошку предност хетерозиготних јединки указали су Greaves и Cullen-Ayres (1988) у истраживању на сивом пацову. Утврђено је да су потребе у витамину К код хомозиготних јединки чак 20x веће од потреба хетерозиготних јединки. Heiberg и сар. (2006) утврдили су већи степен репродукције код хетерозиготних женки сивог пацова, које су биле резистенте на бромадиолон, због мањих потреба у витамину К у условима непримењивања антикоагуланата.

2.5.3 Ефикасност дифенакума и бродифакума

Ефикасност дифенакума у тесту храњења била је потпуна без обзира на пол и VKOR варијанту. Све јединке су угинуле до дванаестог дана излагања. Разлике у времену преживљавања, з ависно од варијанте *vkorc1* гена, нису статистички значајне, па се може сматрати да су све подједнако осетљиве на дифенакум.

На ниво осетљивости домаћег миша на дифенакум, поред VKOR варијанте, нису утицали ни пол нити генотип. Јединке са Leu128Ser/Tyr139Cys комбинацијом имале су нешто веће леталне дозе од Tyr139Cys јединки. Buckle и сар. (2012) су код сивог пацова утврдили за Tyr139Cys јединке низак фактор резистентности, израчунавши га на основу резултата BCR методе, али се ефикасност дифенакума, у овом истраживању, није разликовала ни између хомозиготних и хетерозиготних јединки.

Nadler и сар. (1975) утврдили су нешто веће просечне леталне дозе дифенакума код женки домаћег миша него код мужјака. Ове јединке су биле носиоци Leu128Ser варијанте (Pelz и сар., 2005). Њихове вредности просечних леталних доза биле су мање од утврђених доза за носиоце Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys у овом истраживању, али су у оба истраживања код женки биле веће него код мужјака.

Промена телесне масе у тесту храњења дифенакумом, као и у тесту бромадиолоном, мања је код носилаца комбинације варијанти и код женки у односу на мужјаке.

Јединке домаћег миша испољиле су висок степен осетљивости на бродифакум. До сличних резултата дошли су и Redfern и сар. (1976). Леталне дозе у нашем истраживању биле су веће код женки. До

сличних резултата дошли су и Rowe i Bradfield (1976) у тестовима храњења у трајању од 21 дан, без и са избором хране.

Према Lund-у (1981) бродифакум је имао потпуну ефикасност у тесту храњења од један и два дана за варфарин осетљиве јединке, док је код варфарин-резистентних јединки смртност од 100 % постигнута након три дана храњења. Све јединке домаћег миша у истраживања Redfern-а и сар. (1976) и Rowe-а i Bradfield-а (1976) биле су носиоци Leu128Ser варијанте. У нашим огледима испитивања осетљивости домаћег миша на бродифакум VKOR варијанта није била позната.

Домаћи миш је испољи највећи ниво осетљивости на бродифакум, а најмањи на бромадиолон, што је у складу са резултатима *in vitro* истраживања ензимске активности Lasseur и сар. (2007) за носиоце различитих аминокиселинских замена тирозина на 139. кодону код сивог пацова. Сличне резултате имали су Buckle и сар. (2012), где су носиоци Tyr139Cys варијанте у популацији сивог пацова показали највећу осетљивост на бродифакум, а најмању на бромадиолон. Осетљивости на дифенакум била је између.

Носиоци Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys варијанте испољили су већу осетљивост на дифенакум него на бромадиолон. Разлика у просечном конзумирању за носиоце Tyr139Cys варијанте и Leu128Ser/Tyr139Cys варијанте у тестовима храњења бромадиолоном и дифенакумом није било, али је постојала разлика у просечном конзумирању за Tyr139Cys јединке. Носиоци Leu128Ser/Tyr139Cys комбинације имали су већу нелеталну и леталну дозу у односу на Tyr139Cys носиоце у тестовима храњења бромадиолоном и дифенакумом.

У свим тестовима храњења бромадиолон и дифенакум мамцима (21 дан) и краткорочним експозицијама (1 и 2 дана) бродифакум мамцима, за женке су утврђене веће леталне дозе у односу на мужјаке. Такође, у тесту храњења бромадиолоном била је већа нелетална доза за женке.

Период између излагања деловању бромадиолона и са друга два антикоагуланта у свим тестовима током истраживања био је седам месеци чиме су створени услови слични онима у пракси сузбијања глодара где се дератизација изводи најчешће два пута годишње. Постоји добра ефикасност дифенакума и бродифакума за бромадиолон резистентне јединке, али није утврђено да ли су до угињавања довели сами дифенакум, односно бродифакум мамци или је било синергичког деловања са раније коришћеним бромадиолоном. Без обзира на то шта је довело до смртности јединки домаћег миша резистентних на бромадиолон, за практичну примену је од значаја да их је могуће сузбити на локалитетима где бромадиолон више није ефикасан.

2.6 ЗАКЉУЧЦИ

Аутор закључује да је потврђена резистентност домаћег миша на бромадиолон на локалитетима Сурчин и Земун Поље. Потврђена је и код преко једне трећине потомака резистентних јединки домаћег миша. Смањена је и осетљивост и јединки са локалитета Смедеревска Паланка. На тим локалитетима је бромадиолон чешће коришћен за сузбијање домаћег миша. Највећа осетљивост јединки домаћег миша на бромадиолон утврђена је на локалитету Барајево, где антикоагуланти раније нису коришћени.

Такође, утврђена је мања осетљивост женки него мужјака како код јединки дивље популације, тако и код и њихових потомака у лабораторији. Женке су дуже преживљавале и код њих су биле веће леталне и нелеталне дозе ове супстанце.

Потврђене су промене у секвенци *vkorc1* гена свих дивљих јединки и њихових потомака (F₁ генерације). У егзону 1 *vkorc1* гена утврђена је нова варијанта, Ala21Thr код једне дивље јединке и једног њеног потомка. У егзону 2 није било промена у секвенци, а у егзону 3 овог гена потврђено је присуство Leu128Ser и Tyr139Cys варијанте, као и њихово истовремено јављање.

Све дивље јединке су биле хетерозиготне, а код јединки F₁ генерације хомозиготност је износила 37,5 %. Такође, већина (76,5 %) преживелих јединки биле су хетерозиготне код свих VKOR варијанти. Све комбинације (Leu128Ser/Tyr139Cys и Ala21Thr/Tyr139Cys) биле су у хетерозиготном стању.

Варијанта Leu128Ser је утврђена само код осетљивих јединки. Оне нису преживеле излагање деловању бромадиолона. Нова варијанта Ala21Thr утврђена је само код две резистентне јединке, а

варијанта Tyr139Cys, као и комбинација варијанти Leu128Ser/Tyr139Cys су утврђене код осетљивих и резистентних јединки.

Утврђено је да су пол и VKOR варијанта утицали на осетљивост домаћег миша на бромадиолон. Мања је осетљивост женки код свих типова и варијанти, а мању осетљивост на бромадиолон су испољили и носиоци комбинације (Leu128Ser/Tyr139Cys и Ala21Thr/ Tyr139Cys) у односу на носиоце само једне варијанте.

Бромадиолон је изазивао промене у понашању осетљивих јединки, што је довело до смањеног узимања мамца и већег губитак телесне масе. И ово је било израженије код мужјака, као и код Leu128Ser јединки у односу на све остале варијанте. Најмање је било изражено код јединки са комбинацијом Leu128Ser/Tyr139Cys.

Дифенакум је испољио добру ефикасност на носиоце Tyr139Cys и Leu128Ser/Tyr139Cys варијанте. Мањи губитак телесне масе забележен је код носиоца Leu128Ser/Tyr139Cys комбинације.

Домаћи миш је испољио већу осетљивост и на бродифакум него на бромадиолон. Ефикасност овог антикоагуланта била је 90 % и 100 %.

Закључено је да се промене у секвенци *vkorc1* гена не могу сматрати јединим узроком појаве резистентности домаћег миша на антикоагуланте. VKOR варијанта у комбинацији са полом има велики утицај на осетљивост домаћег миша на антикоагуланте.

Бромадиолоном се може користити за сузбијање носилаца Leu128Ser варијанте. Дифенакум и бродифакум се могу користити за сузбијање популација домаћег миша резистентне на бромадиолон. Од њих је нешто ефикаснији бродифакум.

2.7 ЛИТЕРАТУРА

У регистру леитературе наведена су 132 извора, претежно страна (116), као и домаћа (16). Спектар радова је врло широк, актуелан и покрива све делове истраживања и разматрања. Навођења су јасна и примерена како по садржају тако и по месту.

3 ЗАКЉУЧАК И ПРЕДЛОГ

Докторска дисертација Тање Шћеповић, дипл. инж. под насловом „**Осетљивост домаћег миша (*Mus musculus* L.) на бромадиолон и могућност његовог сузбијања**“ представља оригиналан истраживачки рад од великог научног и практичног значаја.

Обављена су сва истраживања назначена у пријави докторске дисертације. Коришћене су одговарајуће методе и добијени поуздани резултати. Обрада, приказ и разматрање добијених података, такође, су коректно урађени, а умешно је и њихово поређење са резултатима других истраживача.

Добијени резултати имају посебан значај тиме што је доказана резистентност домаћег миша на бромадиолон на локалитетима Сурчин и Земун Поље код јединки дивље популације и преко једне трећине њихових потомака у лабораторији. Утврђена је и смањена је и осетљивост и јединки са локалитета Смедеревска Паланка. На тим локалитетима је бромадиолон чешће коришћен за сузбијање домаћег миша.

Секвенционирањем *vkorc1* гена потврђено је присуство VKOR варијанти (Leu128Ser и Tyr139Cys) у трећем егзону код већине јединки, а нађене су и њихове комбинације и код дивљих и код јединки F₁ генерације.

Код домаћег миша први пут је утврђена VKOR варијанта Ala21Thr, која би могла бити у вези са појавом резистентности на антикоагуланте, јер су јединке њени носиоци преживеле тест храњења мамцима са бромадиолоном.

Утврђено је да су носиоци Leu128Ser варијанте осетљиви на бромадиолон, а да је смањена осетљивост јединки носилаца Tyr139Cys варијанте и носилаца комбинације Leu128Ser/Tyr139Cys. Мање су осетљиве женке него мужјаци, као и хетерозигота у односу на хомозиготе.

Утврђено је да је дифенакум ефикасан за сузбијање домаћег миша. На ниво осетљивости на дифенакум нису утицали ни VKOR варијанте, ни пол нити генотип. И код бродифакума је утврђен

висок степен осетљивости па се ове супстанце могу користити за сузбијање јединки резистентних на бромадиолон.

Имајући у виду напред наведено Комисија позитивно оцењује докторску дисертацију и предлаже Наставно-научном већу Пољопривредног факултета – Универзитета у Београду, да извештај прихвати и омогући кандидату да исту јавно брани.

Чланови Комисије:

др Петар Вукша, редовни професор у пензији, (Пестициди)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Марина Вукша, виши научни сарадник (Пестициди)
Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд

др Бојан Стојнић, ванредни професор (Ентомологија и пољопривредна зоологија)
Универзитет у Београду-Пољопривредни факултет

др Драган Катарановски, редовни професор (Биологија)
Институт за биолошка истраживања “Синиша Станковић”, Београд

др Горан Јокић, научни сарадник (Пестициди)
Институт за пестициде и заштиту животне средине, Београд

#

Прилог: **Сепарат објављеног рада дипл. инж. Тање Шћеповић у научном часопису на SCI листи**

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.

Припада категорији индикатора компетентности M21 (часопис међународног значаја са импакт фактором) за 2014. годину. Категоризација часописа је утврђена у бази: <http://www.kobson.nb.rs.proxy.kobson.nb.rs:2048/kobson.82.html#.VjiHBSvdjIU>

Проф. др Петар Вукша, ментор I

Др Марина Вукша, ментор II