

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Anita J. Birinji

**UTICAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA
ARSENA(III) U PIJAĆOJ VODI**

doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Anita J. Birinji

**INFLUENCE OF DIFFERENT
CONCENTRATIONS OF ARSENIC(III) IN
DRINKING WATER**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2024.

MENTORI:

Dr Marija Marin, docent

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Dr Dušan Lalošević, redovni profesor

Medicinski fakultet, Univerzitet u Novom Sadu

ČLANOVI KOMISIJE:

Dr Anita Radovanović, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Željko Mihaljev, viši naučni saradnik

Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad“

Dr Maja Čakić -Milošević, vanredni profesor

Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

Posvećeno mojim sinovima. Erik i Mark.

Hvala vam za svu ljubav, strpljenje i motivaciju koju ste mi pružali tokom doktorskih studija i izrade doktorske disertacije.

Eksperimentalni deo doktorske disertacije je izveden u Institutu za kontrolu besnila – Pasterov zavod, Novi Sad.

Zahvaljujem se:

Dr Dušanu Laloševiću mom mentoru, koji mi je omogućio izvođenje eksperimentalnog dela doktorske disertacije u Institutu za kontrolu besnila - Pasterov zavod, Novi Sad. Na nesebičnom zalaganju, pomoći, strpljenju, razumevanju i stručnim savetima koje mi je pružao od prvih koraka mog eksperimentalnog i naučnog rada, do kraja izrade doktorske disertacije. Hvala na prenetom znanju, savetima i podršci.

Dr Mariji Marin mentorki sa Biološkog fakulteta u Beogradu, na zalaganju, pomoći i savetima, koje mi je pružala tokom doktorskih studija. Zahvalna sam na pomoći prilikom pisanja naučnih radova, izradi i analizi histoloških preparata, na podršci pri učešću na naučnim skupovima. Hvala na pomoći razumevanju i strpljenju, tokom izrade, čitanja i ispravljanja doktorske disertacije.

Dr Aleksandri Korać na ukazanom poverenju i pruženoj prilici da upišem doktorske studije na Biološkom fakultetu u Beogradu, modul Biologija ćelija i tkiva. Hvala na podršci u teškim trenucima.

Dr Kristini Pogrmić-Majkić koja je omogućila analizu hormona u Laboratoriji za ispitivanje endokrinih ometača i ćelijsku signalizaciju (ENDOS), Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno – matematičkog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu i koja je svojim stručnim znanjem i sugestijama doprinela izradi naučnih radova i doktorske disertacije.

Dr Željku Mihaljev, na saradnji koji je omogućio analizu ukupne količine arsena u organima miševa u laboratoriji Odeljenja za hemijska i radiološka ispitivanja, Veterinarskog Instituta Novi Sad.

Dr Aniti Radovanović sa Fakulteta veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu, na saradnji prilikom analize histoloških preparata, i korisnim sugestijama tokom čitanja disertacije.

Dr Maji Čakić-Milošević na stručnim savetima i konstruktivnim sugestijama tokom čitanja disertacije, koje su bitno doprinele njenom kvalitetu.

Dr Ivanu Čapo šefu katedre za histologiju i embriologiju, Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Novom Sadu, koji je omogućio korišćenje laboratorije.

Natali Rakočević, Mileni Vujkov sa katedre za histologiju i embriologiju na saradnji i savetima.

Dragani Vujin, Nemanji Obradović i Đorđu Vukašinović na saradnji u vivarijumu Pasterovog zavoda u Novom Sad.

Dr Milici Matavulj koja me je usmerila na koja vrata da pokucam, za dalje usavršavanje nakon master studija Reproductivne biologije –embriologije u Novom Sadu.

Hvala mojim roditeljima, sestrama Klari i Juliji na razumevanju podršci i ljubavi. Posebnu zahvalnost dugujem mojoj porodici suprugu i sinovima.

Autor

UTICAJ RAZLIČITIH KONCENTRACIJA ARSENA(III) U PIJAĆOJ VODI

SAŽETAK

Prisustvo arsena u vodi za piće u koncentraciji iznad dozvoljenih vrednosti u Vojvodini postoji već duži niz godina. Zabrana upotrebe vode za piće u Zrenjaninu je na snazi od 2004. godine, međutim voda sa česme se upotrebljava za sve druge potrebe, ne postoji regulativa koja zabranjuje upotrebu takve vode i za životinje. Arsen ulazi u lanac ishrane, što se negativno odražava na zdravlje ljudi. Istraživanje uticaja arsena u vodi za piće, u koncentraciji koja je ekvivalentna koncentraciji arsena izmerenoj u vodovodnoj mreži opštine Zrenjanin, na reproduktivne sposobnosti, je vršeno na ženka miševa, kao animalnom modelu. Efekat je praćen tokom tri uzastopne generacije. Hronično izlaganje arsenu(III) u vodi za piće u primenjenim koncentracijama se negativno odrazilo na organizam, i pored odsustva simptoma trovanja. Pokazano je da arsen(III) u ispitivanoj koncentraciji predstavlja snažan endokrini ometač, jer smanjuje nivo reproduktivnih hormona, dovodeći do smanjenja prosečnog broja mladunaca po ženki miševa u leglu. Analiza količine deponovanog ukupnog arsena(III) u organima ženki miševa, je pokazala najveće prisustvo u bubrezima, jetri, jajnicima i mozgu. Analiza kumulativnog efekta arsena kroz tri generacije, pokazala je da je najveća količina arsena zabeležena u trećoj generaciji druge ogledne grupe. Po prvi put je pokazano da kumulativni efekat arsena tokom tri uzastopne generacije između dve eksperimentalne grupe, izaziva značajne promene u dinamici razvića folikula, njihovom broju kao i broju žutih tela. Različito lokalizovani estrogini receptori sugerisali su da arsen značajno utiče na reprodukciju. Registrovani mikronukleusi, su pokazali da arsen u ispitivanoj koncentraciji dovodi do hromozomskih aberacija, i da ima genotoksični efekat.

Značaj ovog istraživanja je što je po prvi put analizirano kumulativno, štetno, dejstvo arsena na tri uzastopne generacije. Rezultati ove studije mogu da ukažu da hronično izlaganje utiču arsena u koncentraciji koja je izmerena u vodovodnoj mreži u Banatu, potencijalno može da ima negativan uticaj na reproduktivni kapacitet životinja i ljudi.

Ključne reči: miševi, arsen(III)- oksid, deponovanje arsena, hormoni, estrogini receptori

Naučna oblast: Biologija

Uža naučna oblast: Biologija ćelija i tkiva

UDK broj:

INFLUENCE OF DIFFERENT CONCENTRATIONS OF ARSENIC(III) IN DRINKING WATER

ABSTRACT

The presence of arsenic in drinking water in concentrations above the permitted levels in Vojvodina has existed for many years. The ban on the use of drinking water in Zrenjanin has been in force since 2004, however tap water is used for all other needs, there is no regulation prohibiting the use of such water for animals. Arsenic enters the food chain, which has a negative impact on human health. Studies on the influence of arsenic in drinking water in a concentration corresponding to the arsenic concentration measured in the water supply network of the municipality of Zrenjanin on reproductive capacity were carried out on female mice as an animal model. The effect was followed over three successive generations. Chronic exposure to arsenic(III) in drinking water at the applied concentrations had a negative effect on the organism, although no symptoms of intoxication occurred. Arsenic(III) has been shown to be a potent endocrine disruptor at the concentration studied, as it lowers levels of reproductive hormones, leading to a reduction in the average number of pups per female mouse in the litter. Analysis of the amount of deposited total arsenic(III) in the organs of female mice showed the highest presence in the kidneys, liver, ovaries and brain. The analysis of the cumulative effect of arsenic over three generations showed that the highest amount of arsenic was found in the third generation of the second experimental group. It has been shown for the first time that the cumulative effect of arsenic over three consecutive generations between two experimental groups causes significant changes in the dynamics of follicle development, their number and the number of *corpora lutea*. Differently localized estrogen receptors indicate that arsenic significantly impairs reproduction. The registration of micronuclei showed that arsenic in the tested concentration leads to chromosome aberrations and has a genotoxic effect. The significance of this study lies in the fact that it is the first time that the cumulative, harmful effect of arsenic on three successive generations has been analyzed. The results of this study may indicate that chronic exposure to arsenic at the concentration measured in the water supply network in Banat may potentially have a negative impact on the reproductive capacity of animals and humans.

Keywords: mice, arsenic(III)- oxide, arsenic deposition, hormones, estrogen receptors

Scientific field: Biology

Scientific subfield: Biology of cells and tissues

UDK number:

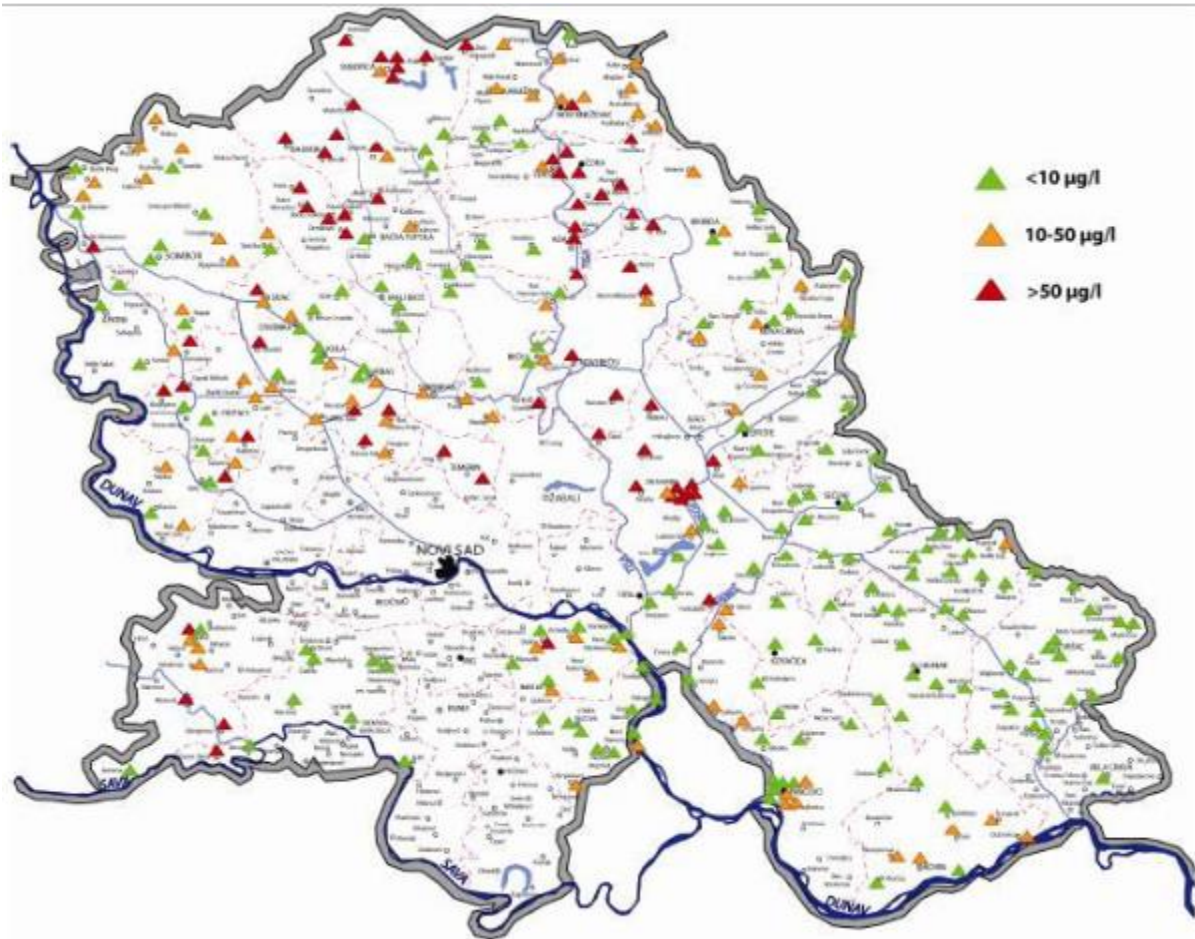
SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Hemijske osobine arsena.....	3
1.1.1. Arsen(III).....	4
1.2. Izvori arsena.....	5
1.2.1. Prisustvo arsena u vodi.....	5
1.2.2. Poreklo arsena u podzemnim vodama Vojvodine.....	6
1.2.3. Prisustvo arsena u vodovodnom sistemu Banata.....	6
1.3. Arsen u organizmu.....	7
1.3.1. Uticaj arsena na organizam.....	7
1.3.2. Akutno i hronično trovanje arsenom.....	8
1.3.3. Uticaj arsena na reproduktivni sistem.....	8
1.4. Reproductivni sistem.....	10
1.4.1. Ženski reproductivni sistem.....	10
1.4.1.1. Reproductivni ciklus.....	10
1.4.1.2. Jajnik (<i>ovarijum</i>).....	11
1.4.1.3. Ovogeneza.....	13
1.4.2. Reproductivni sistem miša.....	19
1.4.2.1. Jajnik (<i>ovarijum</i>).....	19
1.4.2.2. Estrusni ciklus ženke miša.....	23
2. CILJ ISPITIVANJA.....	25
3. MATERIJAL I METODE.....	27
3.1. Formiranje generacija eksperimentalne grupe.....	28
3.2. Brojanje mladunaca po ženki miša.....	29
3.3. Analiza količine deponovanog ukupnog arsena.....	29
3.4. Analiza ženskih polnih hormona (estrogena, progesterona).....	30
3.5. Određivanje faze estrusnog ciklusa.....	30
3.6. Brojanje žutih tela i ovarijalnih folikula miša.....	30
3.7. Histološka analiza preseka ovarijuma.....	31
3.8. Imunohistohemija.....	31
3.9. Mikronukleus test.....	32
3.10. Statistička analiza.....	32
4. REZULTATI.....	33

4.1. Brojanje mladunaca po ženki miša u leglu.....	34
4.2. Analiza količine ukupnog arsena.....	37
4.2.1. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u jednodnevnim mladuncima miševa.....	37
4.2.2. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u organima ženki miševa.....	38
4.2.2.1. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u jajnicima.....	38
4.2.2.2. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u jetri ženki miševa.....	39
4.2.2.3. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u bubrezima ženki miševa.....	39
4.2.2.4. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u mozgu ženki miševa.....	40
4.3. Analiza ženskih reproduktivnih hormona (estrogen, progesteron).....	40
4.4. Estrusni ciklus ženki miša.....	42
4.5. Analiza broja žutih tela i ovarijalnih folikula miša.....	43
4.5.1. Broj žutih tela.....	45
4.5.2. Ukupan broj folikula.....	46
4.5.3. Broj antralnih folikula.....	47
4.5.4. Broj atretčnih folikula	48
4.6. Histološke analize.....	49
4.6.1. Histološke analize jajnika posle primene specijalnih bojenja.....	49
4.7. Mikronukleus test.....	55
5. DISKUSIJA.....	58
6. ZAKLJUČAK.....	62
7. LITERATURA.....	64

1. UVOD

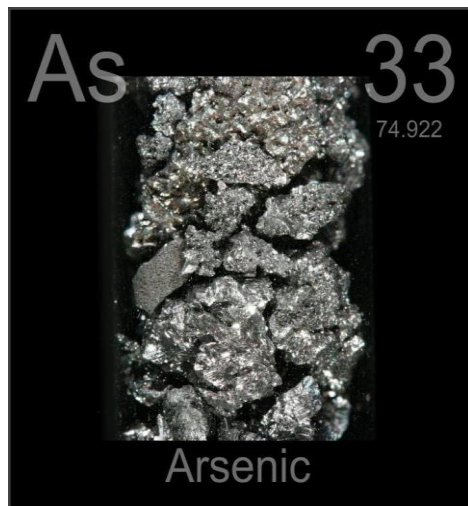
Intenzivnom urbanizacijom, industrijalizacijom, razvojem poljoprivrede, povećavaju se i potrebe za vodom, čija dostupnost i kvalitet ima ekološki, ekonomski i društveni značaj. Glavni izvor vode za većinu organizama na Zemlji su površinske ili podzemne vode. U Republici Srbiji osnovni resurs vodosnabdevanja čine podzemne vode, na teritoriji Autonomne Pokrajine Vojvodine snabdevanje stanovništva vodom je orijentisano isključivo na podzemne vode. Veliki deo podzemnih voda AP Vojvodine sadrži neprihvatljivo visoku koncentraciju arsena (Slika 1). Nažalost, većina sistema vodosnabdevanja u AP Vojvodini nema razvijenu tehnologiju za uklanjanje arsena iz podzemnih voda (Petruševski i drugi, 2005).



Slika 1. Sadržaj arsena u podzemnoj vodi koja se koristi za vodosnabdevanje u Vojvodini. (Preuzeto iz: Dalmacija, 2009).

Veći deo stanovništva Vojvodine koji koriste podzemnu vodu, se snabdeva vodom koja ne zadovoljava osnovne kriterijume koji se primenjuju u Srbiji, kao posledica geogenog zagađenja voda (Dalmacija, 2009).

1.1. Hemijske osobine arsena



Slika 2. Ilustracija arsena u periodnom sistemu elementa.
(Preuzeto sa: <https://periodictable.com/Items/033.7/index.html>).

Arsen (As) je metaloid (Slika 2) u zavisnosti od modifikacije može imati metalne ili nemetalne osobine, češće se javlja u vidu jedinjenja (organskih i neorganskih). U prirodi se u elementarnom stanju nalazi u manjim količinama, zbog toga ga i Međunarodna mineraloška asocijacija (*International Mineralogical Association* - IMA) svrstava u minerale (Slika 3). Do 2011. godine utvrđeno je 330 nalazišta elementarnog arsena u svetu. Arsen ima tri alotropske modifikacije (sivi, žuti i crni arsen). Javlja se u više valentnih stanja (+3, -3, 0, -5). Trovalentni i petovalentni oblici arsena su od značaja za životnu sredinu. Toksičnost trovalentnog arsena je vezana za njegov visok afinitet ka sulfhidrilnim grupama biomolekula kao što je glutation (GSH), lipoinjska kiselina i cisteinski ostaci mnogobrojnih enzima (Aposhian i Aposhian, 2006). Veća toksičnost trovalentnih arsenovih jedinjenja (Slika 4) u odnosu na petovalentna pripisuje se većem afinitetu ka generisanju reaktivnih kiseoničnih vrsta. (Nesnow i drugi, 2002). Međunarodna agencija za istraživanje raka (International Agency For Research On Cancer, IARC, 2004), Američka agencija za zaštitu životne sredine (U.S. Environmental Protection Agency - EPA, 1979, 1984 i 2007), kao i Agencija za registre opasnih i toksičnih supstanci SAD (U.S. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry - ATSDR, 2005) klasifikovale su neorganski arsen kao humani kancerogen, a petovalentni neorganski arsen, organski arsen kao i njihova jedinjenja svrstali u toksične materije. Toksičnost arsena zavisi od njegovog hemijskog oblika, koncentracije, trajanja izloženosti i ostalih faktora koji utiču na retenciju i distribuciju arsena (koncentracija arsena, vrsta organizma, kapacitet metilovanja, valentni oblik, način unošenja (EPA, 2005a, 2005b). Arsen gradi dva oksida; arsen(III)- oksid i arsen(V)- oksid.



Slika 3. Mineral arsena iz zbirke Nacionalnog muzeja u Pragu, Češka Republika.
(Preuzeto sa: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4c/Arsen_11.jpg).

1.1.1. Arsen(III)



Slika 4. Arsen(III)- oksid.(Preuzeto sa:https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a7/Arsenic_trioxide.jpg).

Arsen(III) ili arsenik u narodu poznat i pod nazivom mišomor, izuzetno je jak otrov, u vidu belog praha, bez mirisa, slatkastog ukusa, koji se slabo rastvara u vodi. Primenu je našao u sredstvima za deratizaciju, uništavanju korova, obradi kože, drveta i u sredstvima za prepariranje životinja. Primenjuje se i u medicini, smatra se efikasnim hemoterapeutikom u lečenju određenih karcinoma kod ljudi (Douer i Tallman, 2005). Među jedinjenjima arsena, As(III) se uspešno koristi u lečenju akutne promijelocitne leukemije (APL) (Soignet i drugi, 1998). Takođe se pokazalo da efikasno indukuje apoptozu u malignim APL ćelijama *in vitro* (Hu i drugi, 1999). Može da indukuje apoptozu i u drugim ćelijama leukemije, kao i u ćelijama raka želuca, ćelijama neuroblastoma, karcinoma prostate i jajnika (Zhang i drugi, 1999; Uslu i drugi, 2000). Arsen se obično smatra kao moćan kancerogen koji može izazvati stvaranje određenih vrste solidnih tumora (Smith i drugi, 1992; Liu i Waalkes, 2008). Mehanizam delovanja arsena(III) nije u potpunosti razjašnjen, smatra se da izaziva morfološke promene i fragmentaciju DNK karakteristične za apoptozu u ćelijama NB4 humane promijelocitne leukemije *in vitro*. Takođe, izaziva oštećenje ili degradaciju fuzionog proteina PML/RAR-alfa.

1.2. Izvori arsena

Izvori arsena mogu biti prirodnog i antropogenog porekla. Antropogeni izvori arsena i jedinjenja arsena se stvaraju kao posledica industrijskih delatnosti, kao što su rafinerije mineralnih ulja i gasa, termoelektrane i druga postrojenja za spaljivanje, proizvodnju i preradu metala, mineralna i hemijska industrija, postrojenja za spaljivanje otpada, proizvodnja i prerada drveta, proizvodnja papira, klanice, kao i primena hemikalija u poljoprivredi koje sadrže arsen (Mandal i Suzuki, 2002). Ljudi mogu biti izloženi uticaju različitih vrsta organskog i neorganskog arsena, jer može biti prisutan u hrani, vodi, vazduhu i zemljištu. Najčešći vid dospevanja arsena u organizam je oralnim putem (hranom i vodom - koja sadrži arsen), mada može i udisanjem i apsorpcijom preko kože, potencijalno je veća opasnost unosa arsena u organizam putem vode.

1.2.1. Prisustvo arsena u vodi

Arsen se u vodi može naći kao rezultat antropogenih uticaja i prirodnih procesa kao što su otapanje, biološke i vulkanske aktivnosti. Prirodnim putem se arsen izdvaja prilikom erodovanja stena andezita, nakon čega dospeva u životnu sredinu najčešće u podzemnim vodama (Eisler, 1994). U prirodnim vodama se pojavljuje najčešće u neorganskom obliku kao oksidovani trovalentni arsenit As(III) ili kao petovalentni As(V). Petovalentne vrste su dominantne i stabilne u aerobnim sredinama bogatim kiseonikom, dok su trovalentne vrste preovlađujuće u sredini sa umerenom redukcijom (Kim i drugi, 2002). Pod neoksidujućim uslovima As(III) je stabilan u obliku nejonizovane arsenitne kiseline (H_3AsO_3) i arsenitnog anjona ($H_2AsO_3^-$). As(V) oblik je dominantan u oksidovanim vodama, u kojima se nalazi u anjonskim oblicima $H_2AsO_4^-$, $HAsO_4^{2-}$ ili AsO_4^{3-} i to u opsegu pH vrednosti tipičnom za pijaće vode (pH 6-10) (Dalmacija, 2009). Iako su oblici katjonskog i anjonskog As potencijalno štetni po ljudsko zdravlje, As(III) se smatra

toksičnijim od As(V). Efikasnost uklanjanja As(III) je značajno manja od uklanjanja As(V), koristeći bilo koju komercijalnu tehnologiju za tretman vode. Kao jedino rešenje nameće se regulacija pH vrednosti ili oksidacija arsenita do arsenata za bilo koji tretman vode u cilju uklanjanja arsena (Marinković i drugi, 2007). Biometilacija utiče na mobilnost i transport As u podzemnim vodama (Maeda, 1994). Zbog oksido-redukcionih procesa arsen se oslobađa i izlučuje u vodu. Smatra se da se arsen oslobađa u prirodu oksidacijom arsenopirita (FeAsS) ili pirita (FeS₂) obogaćenih arsenom. Oksidacija ovih jedinjenja se odvija uz kiseonik, jona gvožđa (Fe⁺³) ili nitrata. Osim za gvoždehidroksid arsen se vezuje i za ostale minerale koji imaju veliku specifičnu površinu, kao što su oksidi mangana, aluminijuma, minerali glina i organske materije. U oksido-redukcionim procesima učestvuju i bakterije iz roda *Psychrobacter* koje mogu redukovati arsenat, odnosno oksidovati arsenit, a nalaze se u većini podzemnih voda kontaminiranih arsenom (Kukučka i Kukučka, 2013). Prisustvo specifičnih oblika arsena u vodi zavisi od više faktora kao što su adsorpcija-desorpcija, oksidacija-redukcija, jonska izmena, veličine čestica, sadržaja organskih materija, biološke aktivnosti (Dalmacija, 2009).

1.2.2. Poreklo arsena u podzemnim vodama Vojvodine

Još uvek nije jasno zbog čega se na nekim mestima arsen izdvaja prirodnim putem iz ruda dok se u drugim slučajevima to ne dešava. Najznačajnije zaključke vezano za slojeve podzemnih voda Panonske nizije, kojima pripada i voda iz većine bunara u Banatu dali su (Csalagovits, 1999) i (Varsanyi i Kovacs, 2006), arsen se stvara na mladim kvartarnim rečnim sedimentima i vezuje se za okside i hidrokside gvožđa, u sporotekućim podzemnim vodama arsen se nalazi u većim koncentracijama. Nastanak arsena vezuje se za oksidaciono-redukcione procese u barskim sedimentima. Kvartarni aluvijalni sedimenti, koji su prisutni u Panonskoj niziji sadrže minerale arsena, najčešće arsenopirit FeAsS, izomorfnu smešu FeS₂ i FeAs₂. Kontaminacija arsenom može biti i posledica aktivnosti čoveka. Arsen se stvara i kao nusprodukt pri preradi ruda (na području Banatskih planina i Transilvanije) koji kontaminira podzemne vode. Podzemne vode sa jačom koncentracijom arsena otiču ka Banatskoj niziji. Arsen kontaminira zemljište i usled agrotehničkih mera primenom veštačkih đubriva (prvenstveno fosfata) i pesticida sa sadržajem arsena. Zbog većih koncentracija arsena u zemljištu i vodopropusnih karakteristika sedimenata ispod zemljišta na prostoru Banata, arsen prodire do slojeva podzemnih voda iz kojih arteški bunari zahvtaju vodu.

1.2.3. Prisustvo arsena u vodovodnom sistemu Banata

Bitni izvori kontaminacije pijaće vode su: geološki sastav zemljišta kao i mobilizacija toksičnih metala sa mesta odlaganja otpada. Pojedini istraživači utvrdili su korelaciju između visoke koncentracije arsena i fluorida u pijaćoj vodi (Wyatt i drugi, 1998a; 1998b). Postoje različiti međunarodni standardi ili regulatorna ograničenja za prisustvo arsena u vodi za snabdevanje stanovništva kao potencijalno kancerogenog agensa. Za vodu, koja je namenjena za ljudsku upotrebu, utvrđena je parametarska vrednost od 10 µg/L bez razlike između različitih oblika arsena prema direktivi Saveta Evropske komisije (Council Directive 98/83EC), dok je prema direktivi

Saveta Evropske komisije (Commission Directive 2003/40/EC), utvrđen maksimalni nivo od 10 µg/L za ukupni arsen (tAs) u prirodnim mineralnim vodama, što je u saglasnosti i sa preporukama Svetske zdravstvene organizacije (World Health Organization - WHO, 2017). U Republici Srbiji u najvećem procentu, osnovni resurs vodosnabdevanja stanovništva čine podzemne vode. Pokrajina Vojvodina se administrativno sastoji od 45 opština a snabdevanje vodom se vrši isključivo iz podzemnih voda. Nacionalni program praćenja kvaliteta vode pokazuje da javni vodovodi u 20 opština (44,4% svih opština u Vojvodini) sadrže velike koncentracije arsena. Najveća izmerena vrednost koncentracije arsena u vodovodnoj mreži Banata izmerena u naselju Taraš iznosila je 0,859 mg/L (Jovanović i drugi, 2011).

U Vojvodini već oko 40 godina postoji problem prisustva arsena u vodi za piće u koncentraciji iznad dozvoljenih vrednosti. Problem je što većina sistema za vodosnabdevanje u Vojvodini nema adekvatnu tehnologiju za uklanjanje arsena iz podzemnih voda. Zabrana upotrebe vode za piće u Zrenjaninu je uvedena 2004. godine, međutim vodu sa česme upotrebljavaju za sve druge potrebe kao što su održavanje lične higijene, održavanje domaćinstva, zalivanje bašte, pojenje stoke, ne postoji regulativa koja zabranjuje upotrebu takve vode i za životinje.

1.3. Arsen u organizmu

Bioraspoloživost neorganskog arsena zavisi od puta unosa u organizam, njegove rastvorljivosti i prisustva drugih sastojaka i hranljivih materija u gastrointestinalnom traktu. Distribucija arsena u organizmu zavisi od krvne perfuzije, afiniteta samog tkiva, zapremine tkiva, difuzionog koeficijenta, membranskih karakteristika (Mandal i Suzuki, 2002). Poluživot neorganskog arsena kod ljudi je oko 10 sati (Rossman, 2007). Sudbina arsena unetog u organizam zavisi od oksido-redukcionih procesa, kao i od reakcije metilovanja u jetri (Mandal i Suzuki, 2002; Rossman, 2007), približno 70% arsena se izlučuje, uglavnom urinom (Rossman, 2007). Arsen ima sposobnost da prođe kroz moždanu barijeru, placentu, može se naći i u majčinom mleku. Nakon dve do tri nedelje od prestanka izlaganju uticaju arsena, arsen koji je ostao u telu se može naći u tkivima koja su bogata keratinom, kao što su kosa, nokti, koža (Klaasen i drugi, 1986; Lansdown, 1995; Underwood, 1977), u manjoj meri u kostima i zubima (Yip i Dart, 2001). Arsen se deponuje u organizmu naročito u jetri i bubrezima, crevnom zidu, slezini i plućima.

1.3.1. Uticaj arsena na organizam

Prema rezultatima novijih istraživanja zna se da arsen inhibira više od 200 enzima i prouzrokuje multisistemske zdravstvene efekte putem interferencije enzimske funkcije i regulacije transkripcije (Lage i drugi, 2006). Zbog hemijske sličnosti sa fosforom, sugerise se da arsen sprečava formiranje ATP tokom glikolize. U jednom koraku glikolitičkog puta fosfat se podstredstvom enzima vezuje za D-gliceraldehid-3-fosfat i obrazuje 1,3-difosfo-D-glicerat. U ovoj reakciji, arsenat može zameniti fosfat, pri čemu nastaje anhidrid 1-arsenato-3-fosfo-D-glicerat. Međutim, ovaj anhidrid je nestabilan i hidrolizuje na arsenat i 3-fosfoglicerat. Mala stabilnost arsen-anhidrida može biti objašnjena dužinom veze As-O koja je aproksimalno 10% duža od dužine veze P-O. Adenozin-3-fosfat (ATP) se generiše tokom glikolize u prisustvu fosfata, ali ne i u prisustvu arsenata (Tseng i drugi, 2003; Lage i drugi, 2006; Ratnaik, 2006). Neorganska i organska jedinjenja trovalentnog arsena su potentniji genotoksini u odnosu na petovalentna

jedinjenja arsena. Mehanizam genotoksične aktivnosti arsena uključuje generisanje ROS, inhibiciju reparacije DNK i izmenjeno metilovanje DNK (Rossman, 2003). Premda nije direktni mutagen, arsen je genotoksičan, indukujući delecije hromozoma, oksidativno oštećenje DNK, prekide u DNK lancima, hromozomske aberacije, aneuploidiju i mikronukleus (Hei i drugi, 1998; Basu i drugi, 2001; Rossman, 2003). Ostali efekti genotoksičnosti arsena uključuju amplifikaciju gena, transformaciju aktivnosti i nestabilnost genoma. Ovi efekti arsena primećeni su i u ćelijama sisara *in vitro*, i kod laboratorijskih životinja *in vivo* i ljudi (Basu i drugi, 2001; Rossman, 2003). Kod ljudi izloženih neorganskom arsenu (uglavnom arsenatima ili arsenitima u vodi za piće) uočena je povećana incidenca mikronukleusa, hromozomske aberacije (Ostrosky-Wegman i drugi, 1991; Warner i drugi, 1994; Lerda, 1994; Dulout i drugi, 1996; Moore i drugi, 1997; Gonsebatt i drugi, 1997; Mäki-Paakkanen i drugi, 1998; Harrington-Brock i drugi, 1999; Basu i drugi, 2001; Mahata i drugi, 2003; Ghosh i drugi, 2006; Lewinska i drugi, 2007). Slični efekti (indukcija mitotičkog crossing-overa, mikronukleus, hromozomska aberacija i ćelijska transformacija) indukovani su arsenatima, ali pri koncentracijama koje su oko 10 puta veće u odnosu na koncentracije arsenita (Gebel, 2001; Rossman, 2003; IARC, 2004). Pored generisanja ROS, arsen indukuje generisanje i reaktivnih azotnih vrsta, naročito azotnog oksida, koji je kako je opisano mutagen (Shi i drugi, 2004; Florea i drugi, 2005).

1.3.2. Akutno i hronično trovanje arsenom

Nakon izlaganja visokim koncentracijama arsena dolazi do razvoja simptoma akutnog trovanja, koji se razvijaju odmah nakon unošenja. Može da se javi kašalj osećaj pečenja očiju, curenje nosa, bol u grudima, a kasnije se javljaju i gastrointestinalne tegobe, oštećuju se funkcije jetre, bubrega, dolazi do srčanih i cerebralnih smetnji pa i smrti (Hughes, 2002). Hronično izlaganje uticaju niskih koncentracija arsena dovodi do ispoljavanja simptoma hroničnog trovanja. Često su ti simptomi slični simptomima drugih organskih bolesti, što stvara poteškoće prilikom registrovanja arsena kao primarnog uzročnika bolesti. Najčešće promene koje se javljaju kao posledica hroničnog izlaganja uticaju arsena su: inaktivacija enzima, hromozomske promene, vezivanje za proteine, ometanje vezivanja enzima na putu biosinteze hema, oštećenje funkcije jetre, pojava dijabetesa, ishemije srca, hipertenzija, periferna vaskularna oboljenja, periferna neuropatija, karcinom kože (Hughes, 2002).

1.3.3. Uticaj arsena na reproduktivni sistem

Poznato je da uticaj toksičnih materija na ženski reproduktivni sistem kod ljudi i životinja narušava plodnost. Podaci Svetske zdravstvene organizacije (SZO), govore da je više od 10% žena u opasnosti od neplodnosti usled izloženosti teškim metalima posebno arsenu, koji kao zagađivač životne sredine može da poremeti reproduktivne funkcije (Apostoli i Catalini, 2011). Arsen je vrlo toksičan i predstavlja opasnost tokom gestacionog perioda kod žena i životinja, jer može da dovede do poremećaja neuroendokrinog sistema, inhibirajući receptore za vezivanje estrogena, ne reguliše receptore progesterona i potencijalni je uzročnik estrogen zavisnih bolesti kao što su rak dojke,

endometritis, spontani pobačaji (Ishfaq Ahmad i drugi, 2021). Arsen igra potencijalnu ulogu u poremećaju funkcije ženskih polnih hormona, kao što je ometanje sinteze i normalne funkcije hormona. Svi hormoni se razlikuju po svojoj strukturi i funkciji i imaju različite puteve sinteze. Izlaganje arsenu kroz pesticide i druge proizvode može poremetiti lanac sinteze hormona, kao što je inhibicija biosinteze estrogena (Chatterjee i Chatterji, 2010), sprečavanje konverzije androgena u estrogen (Mason i drugi, 1987). Metilovani arsen može da poremeti aktivnost dopamin beta hidroksilaze, dovodeći do smanjenja konverzije dopamina u nor-epinefrin, utiče i na aktivnost kateholamina uključenog u stvaranje pro-estrusa u LH, koji stimuliše ovulaciju (Chattopadhyay i Gosh, 2010). Takođe inhibira razne druge enzime koji su uključeni u sintezu progesterona (Fugo i Butcher, 1966). Poremećaj vremenskog skoka LH može da promeni vitalnost i kvalitet oocita (Chattopadhyay i Gosh, 2010). Estrogeni receptori su važni za regulisanje rasta i razvoja folikula, oocita i granulosa ćelija jajnika, kao i za funkciju ovulacije. Ćelijski estrogeni receptori, kao što su nukleusni receptori i membranski estrogeni receptori, primarni su regulatori aktivnosti hormona (Tang i drugi, 2019). Receptor estrogena ima kapacitet za različite koregulatorne interakcije, i različite procese aktivacije/deaktivacije (Chatterjee i Chatterji, 2010). Estrogen i njegovi receptori imaju važan uticaj na patofiziologiju mnogih različitih sistema u ljudskom telu. Smatra se da estrogen povećava rizik od maligne transformacije površinskog epitela jajnika (La Vecchia, 2006). Hormonska neravnoteža nastala usled toksičnog efekta arsena predstavlja važan uzrok neplodnosti kod žena (Rattan i drugi, 2017), dovodeći do poremećaja ciklusa, kao što je smanjenje broja ciklusa estrusa i produženo trajanje diestrusa (Biswas i drugi, 2019). Poremećaj ovulacije, endokrina interferencija sa estrogenim svojstvima mogu inhibirati ovulaciju i porast LH sredinom ciklusa, što može dovesti do problema sa plodnošću kod žena (Ashby i drugi, 2002; Rattan i drugi, 2017). Međutim, većina studija je otkrila da izloženost arsenu putem pesticida i insekticida je glavni uzrok neplodnosti kod žena, jer je primećen smanjen broj zrelih folikula i povećan broj atretičnih folikula, što ukazuje na potencijalno smanjenje plodnosti (Stoker i drugi, 1993). Povećana izloženost metilovanom arsenu može dovesti do smanjenja težine materice, što može uticati na implantaciju i povećati gubitak embriona (Ma i drugi, 2003). Izloženost uticaju arsena može da utiče na angiogenezu u endometriju tokom trudnoće, ovi poremećaji dovode do disfunkcije endometrija, spontanih pobačaja, prevremenog porođaja, neplodnosti, steriliteta (Milton i drugi, 2017). Brojni su podaci o vezi između rizika pojave raka i konzumiranja vode sa visokom koncentracijom arsena u vodi za piće, ali sam mehanizam kojim arsen dovodi do kancerogenih promena još uvek nije dovoljno istražen. Uticaj arsena u koncentraciji koja je izmerena u vodovodnoj mreži opštine Zrenjanin, na reproduktivne funkcije nije ispitan. Nema literaturnih podataka o potencijalno štetnom, hroničnom uticaju arsena na reproduktivne funkcije, praćeno kroz tri uzastopne generacije, što nas je i navelo da pokušamo da damo odgovore na pitanje, da li je voda kontaminirana arsenom povezana sa problemima plodnosti.

1.4. Reproductivni sistem

1.4.1. Ženski reproductivni sistem

Ženski reproduktivni sistem je građen od unutrašnjih i spoljašnjih polnih organa. Untrašnji polni organi su smešteni većinom u šupljini male karlice i čine ih jajnici, jajovodi, materica i vagina.

Spoljašnji polni organi su *vestibulum vagine*, *himen*, *Labia minora*, *Labia majora*, *clitoris* i spoljašnji otvor mokraćnog kanala.

Placenta se zbog svoje funkcionalne i fiziološke povezanosti sa uterusom tokom trudnoće, klasifikuje i obrađuje u okviru ženskog reproduktivnog sistema (Ross i Pawlina, 2016).

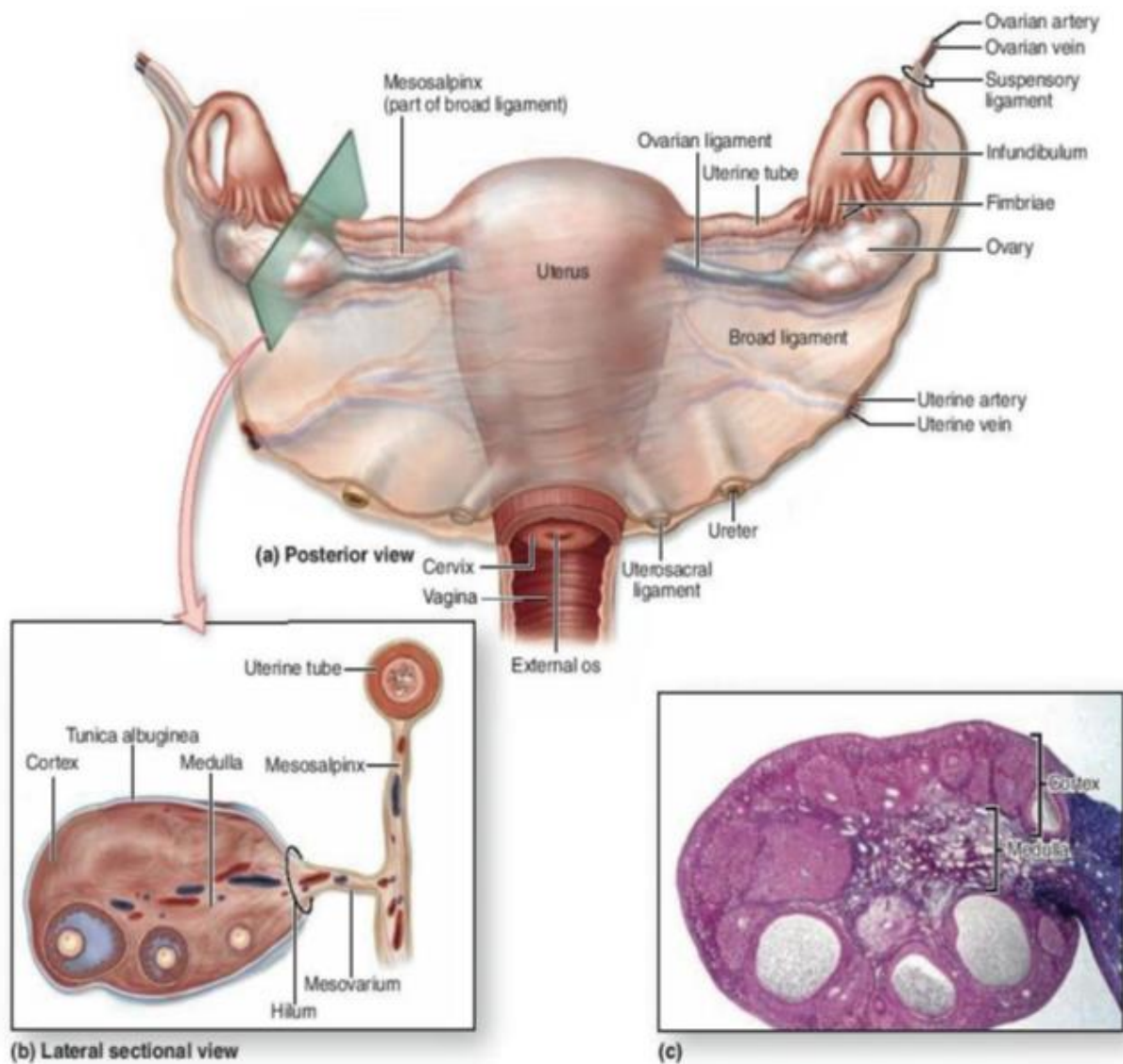
1.4.1.1. Reproductivni ciklus

Ženski reproduktivni organi u periodu od puberteta, tačnije od prve menstruacije do menopauze, osim tokom trudnoće su izloženi cikličnim promenama koje se nazivaju reproduktivnim ciklusom. Jedan reproduktivni ciklus traje u proseku 28 dana, uz određen uzan raspon individualnih razlika (Nikolić, 2010). Cilj reproduktivnog ciklusa jeste da obezbedi zrelu jajnu ćeliju u svakom ciklusu, uslove za njeno oplodjenje, pripremi endometrijum za prihvatanje zametka ukoliko dođe do oplodjenja. Reproductivni ciklus je pod kontrolom neurohumoralnog mehanizma, pri čemu centralno mesto u kontroli pravilnosti i sinhronizacije ciklusa ima hipotalamus koji preko hormona hipofize (FSH) folikulostimulirajućeg hormona i LSH–luteinizirajućeg hormona u potpunosti reguliše funkciju jajnika. Hormoni jajnika (progesteron i estrogen) utiču na ostale reproduktivne organe i usklađuju promene na njima (Nikolić, 2010). Glavni posrednik u delovanju estrogena su estrogeni receptori ER. Estrogeni receptori (ERs1) su faktori transkripcije aktivirani ligandom koji pripadaju superfamiliji nukleusnih hormonskih receptora. Kod sisara se unutarćelijski ER dominantno javlja u dve izoforme, ER α i ER β , kodirane odvojenim genima, ESR1 i ESR2, lociranim na hromozomima, 6q25.1 i 14q23.2 (Deroo i Korach, 2006; Jameera Begman i drugi, 2017). ER α je protein molekulske mase 66 kDa, izgrađen od 595 aminokiselina, dok je ER β veličine 54 kDa i gradi ga 530 aminokiselina (Jameera Begman i drugi, 2017). Identičnost u redosledu aminokiselina ER α i ER β je oko 97 % u domenu koji vezuje DNK i oko 56% u domenu koji vezuje ligand, dok je u N terminusu podudarnost 24%. Ovi receptori imaju različitu raspodelu u tkivima, pri čemu je ER α najviše eksprimiran u reproduktivnim tkivima (uterusu, teka ćelijama jajnika, dojčkama, stromi prostate, Lajdigovim ćelijama testisa, epididimis), bubrezima, belom adipoznom tkivu i jetri, a ER β u granuloza ćelijama jajnika, epitelu prostate, testisima, debelom crevu, centralnom nervnom sistemu, kardiovaskularnom sistemu, plućima i kostnoj srži (Jia i drugi, 2015; Jameera Begman i drugi, 2017). U normalnom reproduktivnom tkivu jajnici su najvažnije mesto biosinteze estrogenih hormona kod žena u reproduktivnom dobu, koje nisu trudne. Ekspresija aromataza enzimskog kompleksa, odgovornog za konverziju androgena iz ćelija *theca* je dobro regulisana u zrelih granuloza ćelijama, antralnim folikulima i takođe je izražena u ćelijama unutar žutog tela (Turner i drugi, 2002). Imunohistohemijske studije su dokumentovale ekspresiju ER β kod granuloza ćelija nezrelih i zrelih (antralnih) folikula, gde dolazi do intenzivnog bojenja, kao i kod teka ćelija, žutog tela i površinskog epitela ovarijuma. U ovarijumu žena imunoekspresija ER α je ograničena na površinski epitel, *theca* ćelije i granuloza ćelije zrelih folikula (Saunders i drugi, 2000). Aktivnost ER je, osim u razvoju i regulaciji reproduktivnog sistema, važna i za kontrolu različitih funkcija

kardiovaskularnog, skeletnog, imunskog i centralnog nervnog sistema (Ba Miro i drugi, 1995; Jameera Begman i drugi, 2017). Signalizacija putem ER ima ulogu i u razvoju različitih patoloških stanja: kancera (dojke, jajnika, endometrijuma, debelog creva), metaboličkih, kardiovaskularnih i neurodegenerativnih poremećaja, endometrioze, inflamacije, osteoporoze i gojaznosti (Ascenzi i drugi, 2006; Jia i drugi, 2015).

1.4.1.2. Jajnik (*ovarijum*)

Jajnik je paran organ, smešten bočno od tela materice. Jajnik ima dvojaku funkciju, stvaranje ženskih polnih ćelija (*oogeneza*) i steroidnih hormona žene (progesteron i estrogen) steroidogeneza. Progesteron i estrogen imaju značajnu ulogu u menstrualnom ciklusu i pripremanju uterusa za implantaciju ukoliko dođe do oplodjenja ili u suprotnom do menstruacije (Ross i Pawlina, 2016). Jajnici kod žena koje nisu rađale (*nulliparous*) su parni organi bademastog oblika, ružičasto - bele boje, oko 3 cm dužine, 1,5 cm širine, debljine oko 1 cm. Svaki jajnik je pričvršćen za zadnju površinu širokog ligamenta pomoću peritonealnog nabora, mezoovarijuma (Slika 5). Jajnik je sa gornje strane (strane jajovoda) vezan ovarijalnim supresornim ligamentom, koji sadrži i ovarijalne krvne sudove i nerve, za zid karlice. Sa donje strane (strane uterusa) vezan je za uterus ovarijalnim ligamentom, koji je ostatak gubernaculum, embrionalnog fibroznog vlakna, kojim se gonade povezuju sa podom karlice (Ross i Pawlina, 2016).



Slika 5. Građa unutrašnjih reproduktivnih organa žene. (Preuzeto iz: Mescher, 2016).

U periodu do puberteta, površina jajnika je glatka. Tokom reproduktivnog perioda života, na površini jajnika se uočavaju nepravilni ožiljci, koji nastaju nakon svake ovulacije, broj ožiljaka raste sa brojem ovulacija. Kod žena posle menopauze veličina jajnika se smanjuje za oko četvrtinu u odnosu na veličinu jajnika tokom reproduktivnog perioda života žene (Ross i Pawlina, 2016). Na površini jajnika nalazi se jedan sloj pločastih do kockastih ćelija, koje formiraju površinski (germinativni epitel), ispod kojeg se nalazi *tunica albuginea*, tanki sloj gustog vezivnog tkiva.

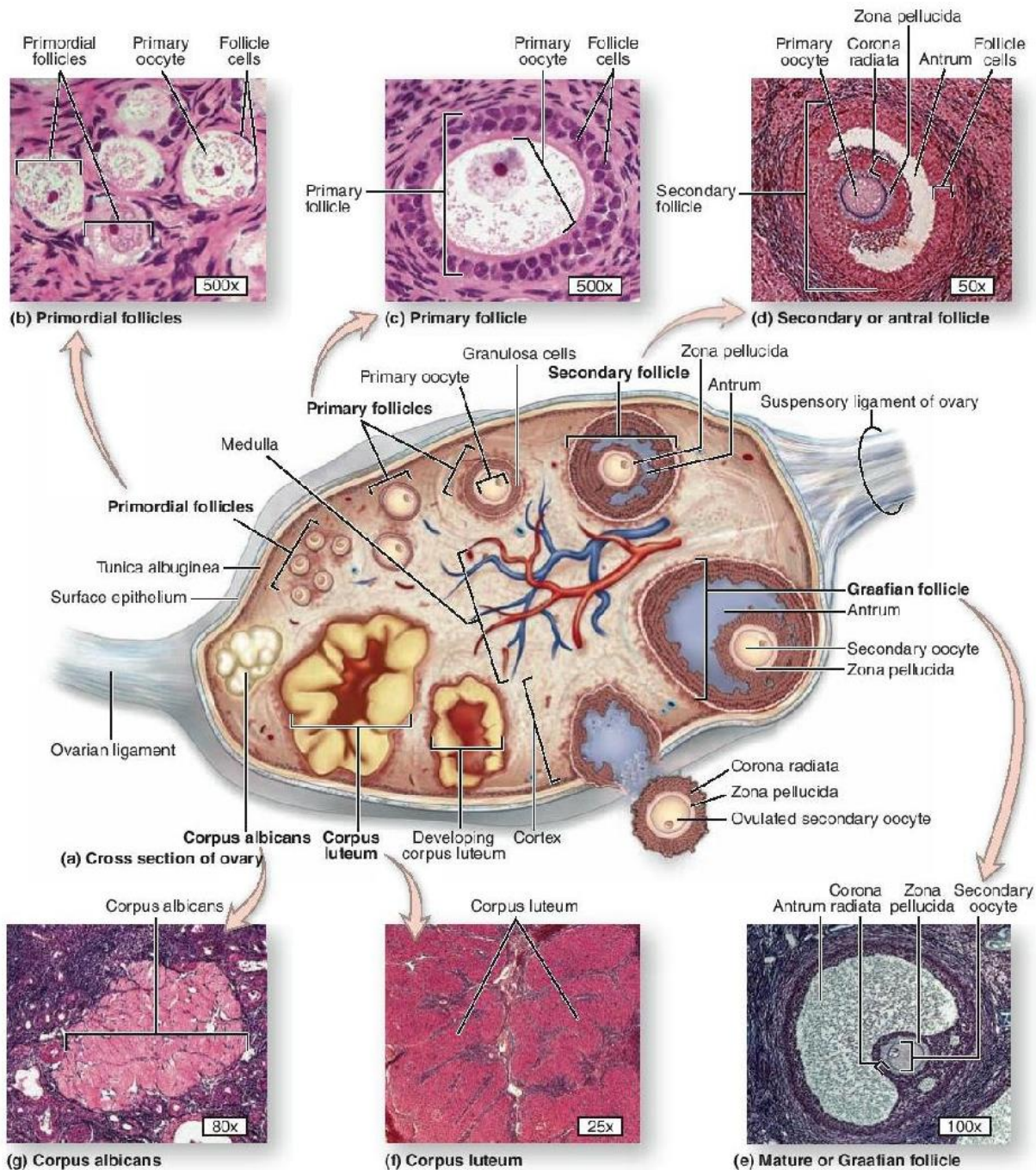
Na poprečnom preseku ovarijuma uočava se *cortex* kora jajnika (kortikalni region) i *medulla* srž (medularni region), između kojih ne postoji jasna granica (Mescher, 2016). Kora (*cortex*) jajnika predstavlja periferni deo jajnika i naleže na srž jajnika. Kora sadrži ovarijalne folikule u različitim fazama razvika (ili regresije) i bogatu međucelijsku supstancu koju čini vezivno tkivo i tanka mišićna vlakna (*zona parenhimatosa*).

Srž (*medulla*) čini središnji deo jajnika, građena je od rastresitog vezivnog tkiva, bogata je brojnim krvnim, limfnim sudovima i nervima, i naziva se *zona vasculosa* (Mescher, 2016).

Reproduktivna sposobnost kod žena se ogleda u cikličnoj aktivnosti koja vodi ka rastu i razvoju dominantnog folikula. Razvojne faze dominantnog folikula su folikulogeneza, ovulacija i luteogeneza. Proces folikulogeneze započinje fenomenom regrutacije primordijalnih folikula u kohortu rastućih folikula čiji će se razvojni put završiti ovulacijom ili atrezijom. Folikulogeneza traje dugo, oko godinu dana, od perioda primordijalnog folikula do razvoja u preovulatorni stadijum. Folikulogeneza se deli na dve faze preantralna i antralna faza. Oko 14 dana menstrualnog ciklusa koji traje 28 dana preovulatorni folikul oslobađa zrelu jajnu ćeliju obavijenu ćelijama *corona radiata*. Sam proces ovulacije zahteva idealan balans aktivnosti endokrinog sistema imunskih signala, intraovarijalnih parakrinih faktora. Nakon ovulacije folikul se transformiše u žuto telo, tako što ćelije *theca interna* i granuloza ćelije postaju *theca* luteinske, odnosno granuloza luteinske ćelije, a deo šupljine folikula biva ispunjen vezivnim tkivom i krvnim sudovima. U periodu nakon ovulacije, ćelije granuloze su veličine oko 35 μm u prečniku to su granuloza-luteinske ćelije, *theca* intersticijalne ćelije takođe ulaze u sastav žutog tela i nazivaju se *theca* luteinske ćelije. Ukoliko ne dođe do implantacije žuto telo se degeneriše procesom luteoliza. Histološki degenerisano žuto telo predstavlja samo nodus čvstog vezivnog tkiva i naziva se *corpus albicans* (Williams i drugi, 2000).

1.4.1.3. Ovogeneza

Ovogeneza je proces stvaranja ženskih gameta. U prvom mesecu embrionalnog života, manja populacija primordijalnih germinativnih ćelija migrira iz žumančane kese u primordijalne gonade, gde se ćelije dele mitotičkom deobom i diferenciraju u oogonije. U drugom mesecu embrionalnog života ovarijum sadrži oko 600.000 oogonija. Broj oogonija raste, već do 5 meseca embrionalnog života ih ima i više od 7 miliona, kada se nekoliko miliona oogonija diferencira u primarne oocyte (Mescher, 2016).



Slika 6. Ovogeneza i promene unutar jajnika tokom ovogeneze. (Preuzeto iz: Mescher, 2016).

Primarne oocite ulaze u prvu mejotičku deobu i bivaju zaustavljene u profazi prve mejotičke deobe (ali nakon što se stvaranje sinapsi i rekombinacija gena završi). Oko svake primarne oocite se formira omotač od jednog sloja pločastih folikuarnih ćelija-**primordijalni jajni folikuli** (Slika 6). Do 7 meseca intrauterinog života većina oogonija se transformiše u primarne oocite. Veliki broj primarnih oocita i nestane u toku degenerativnog procesa (atrezija) koji se nakon završetka intrauterinog života nastavlja i traje tokom celog reproduktivnog perioda života

žene (Mescher, 2016). Od tog trenutka se broj primarnih oocita neprekidno smanjuje, za razliku od muških polnih ćelija, one se više ne stvaraju. Od nekoliko miliona primarnih oocita prisutnih u petom mesecu intrauterinog života, na rođenju ih ima oko 2.000.000, do puberteta 400.000 tokom reproduktivnog perioda života žene od prve menstruacije do menopauze, samo oko 400 primarnih oocita nastavi svoju prvu mejotičku deobu (Nikolić, 2010). Tokom puberteta, mala grupa folikula podleže cikličnom rastu i sazrevanju. Nakon prve menstruacije ovulacija se ne dešava još 1 do 2 godine, nakon čega se sazrevanje i ovulacija stabilizuju i paralelno se odvijaju sa menstrualnim ciklusom (Ross & Pawlina, 2016). Tokom svakog menstrualnog ciklusa najčešće po jedna (dominantna) oocita neposredno pred ovulaciju dovršava deobu, pri čemu nastaje **sekundarna oocita** i prvo polarno telo, ona odmah započinje drugu mejotičku deobu ali se i ona prekida u metafazi mejoze II. Završetak mejoze dešava se tek ukoliko dođe do oplodjenja kada se sekundarna oocita posle ulaska spermatozoida deli na **ženski gamete** i drugo polarno telo (Nikolić, 2010). Histološki gledano, prema stadijumu razvića razlikuju se tri osnovna tipa ovarijalnih folikula:

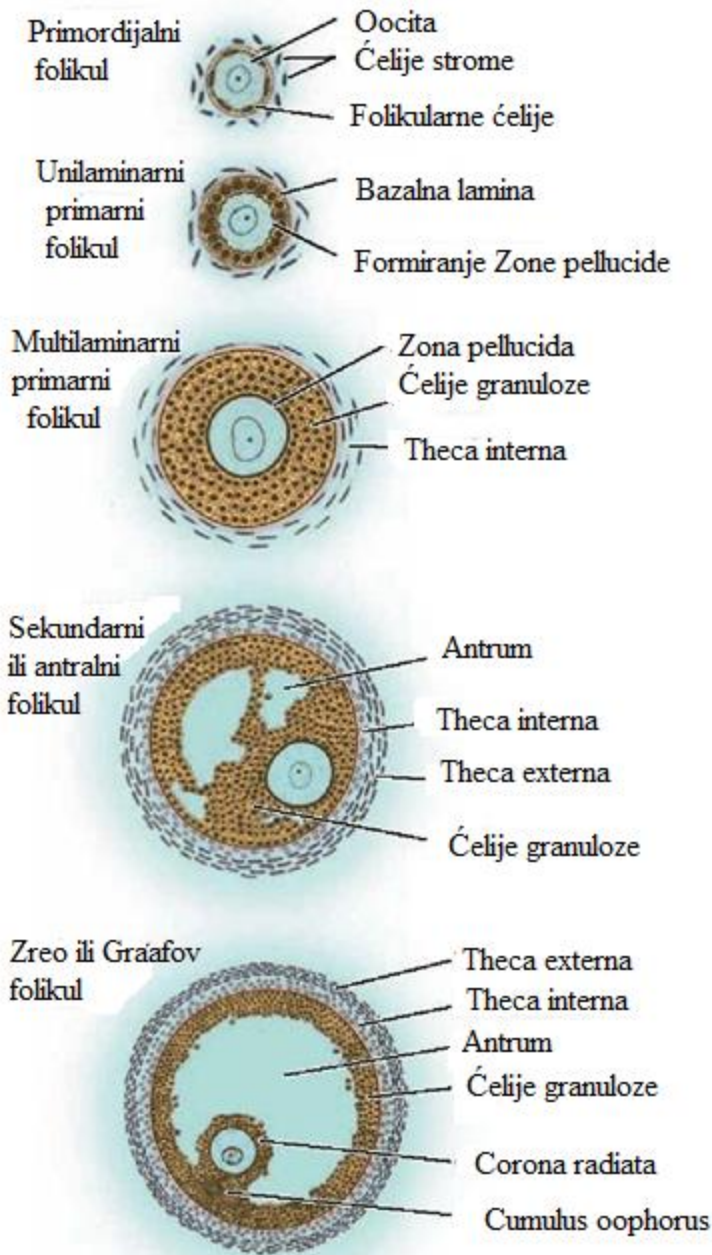
- a. Primordijalni folikul.
- b. Rastući folikuli (primarni i sekundarni folikuli)
- c. Zreli folikul (Graafov folikul)

a. Primordijalni folikul

Primordijalni folikul predstavlja najraniji stadijum razvoja folikula. Pojavljuju se tokom trećeg meseca intrauterinog života. Razvoj primordijalnih folikula zavisi od uticaja gonadotropne stimulacije. Kod zrelih ovarijuma primordijalni folikuli se nalaze u stromi kore janika odmah ispod *tunice albuginee*. Oocita je okružena jednoslojnim, spljoštenim folikularnim ćelijama, spojašnja površina folikularnih ćelija se graniči sa bazalnom laminom. U ovom periodu primordijalni folikuli su pribijeni jedan uz drugi. Veličina oocite u folikulu iznosi 3 μm u prečniku, uočava se veliko ekscentrično postavljeno jedro, sa dva ili više jedaraca. Citoplazma (ooplazma) sadrži Balbinijevo telo (mesto gde su akumulirane organele: Goldžijev kompleks, endoplazmin retikulum, centriole, veliki broj mitohondrija, lizozomi) (Ross i Pawlina, 2016).

b. Razvojni folikuli:

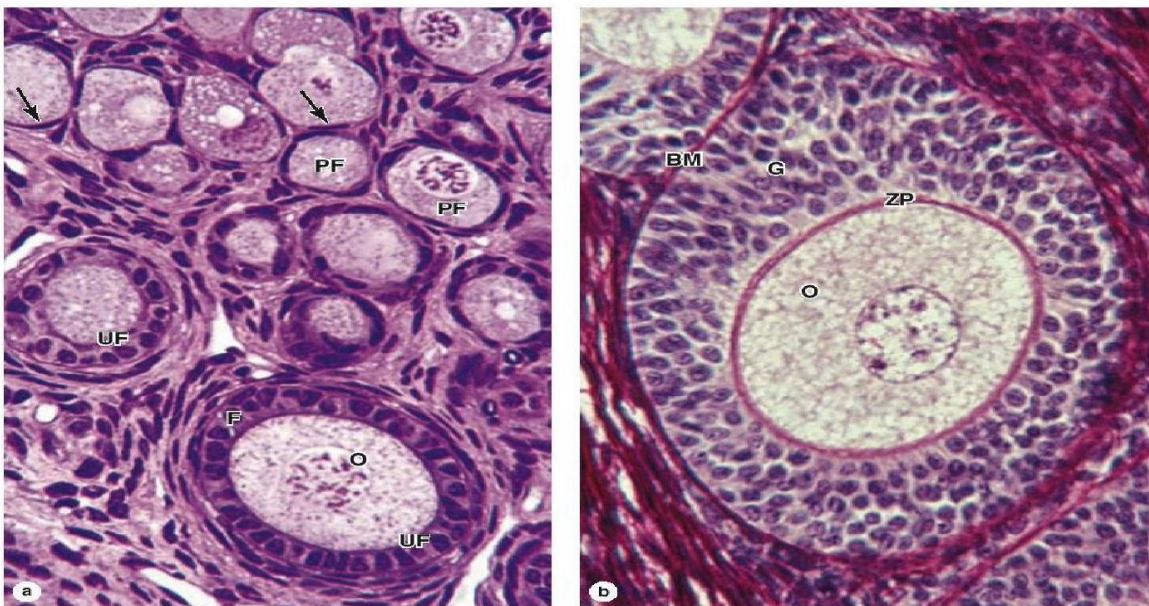
Primarni folikuli predstavljaju prvu fazu razvojnog folikula (Slika 7). Diferencijacijom primordijalnih folikula nastaju razvojni folikuli kod kojih se dešavaju promene u oocitama, folikularnim ćelijama i stromi. Oocite rastu (50 – 80 μm). Jedan sloj folikularnih ćelija koje okružuju oocitu dobijaju kockast oblik. Oocite, kako rastu, sekretuju specifične proteine koje grade sloj između oocite i folikularnih ćelija nazvan *zona pellucida*.



Slika 7. Razvoj folikula (jednoćelijski i višećelijski). (Preuzeto i modifikovano iz: Mescher, 2016).

Brzom mitotičkom deobom folikularnih ćelija jednoćelijskog folikula dolazi do formiranja granuloznog epitela (*membrana granulosa*) koja okružuje oocitu. Proliferacijom granuloznih ćelija, stromalne ćelije ih odmah okružuju i formiraju *theca folliculi* od ćelija vezivnog tkiva, smeštenu sa spoljne strane bazalne membrane. Ona se dalje diferencira u dva sloja *theca interna* i *theca externa* (Slika 8). *Theca interna* je unutrašnji visoko vaskularizovan sloj kockastih sekretornih ćelija. Potpuno diferencirane ćelije *theca interne* imaju karakteristike steroidproduktivnih ćelija, jer ćelije *theca interne* poseduju veliki broj receptora lutenizirajućeg hormona. Kao odgovor na LH stimulaciju, one sintetišu i sekretuju androgene koji su prekursori estrogena.

Pored sekretornih ćelija *theca interna* sadrži i fibroblaste, kolagena vlakna i bogatu mrežu krvnih sudova, tipične za endokrine organe (Ross i Pawlina, 2016). *Theca externa* je spoljašnji sloj koji čine ćelije vezivnog tkiva, pored njih sadrži i glatke mišićne ćelije i kolagena vlakna. Razlika između slojeva *theca* kao i razlika između *thecae externe* i okolne stome nije jasna. Dok jasna granica postoji između *thecae interne* i bazalne lamine zbog prisustva krvnih sudova (Ross i Pawlina, 2016).

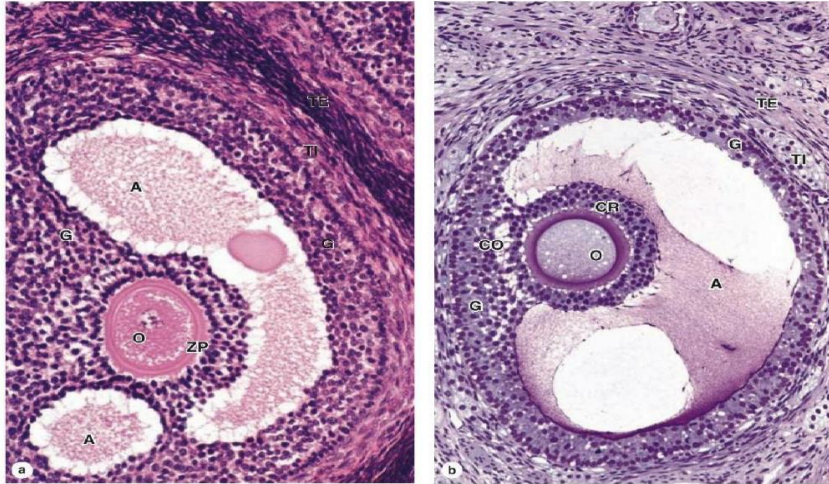


Slika 8. Mikrografija kore jajnika sa primarnim folikulom -jednoćelijski i višećelijski. (Preuzeto iz: Mescher, 2016).

Maturacijom primarnih folikula menja se distribucija organela u oociti, povećava se broj slobodnih ribzoma, mitohondrija, endoplazminog retikuluma, Goldži kompleksa, vakuola, prisutne su i lipidne kapi i masa lipohrom pigmenta. Faktori koji utiču na rast i promene u primarnom folikulu su:

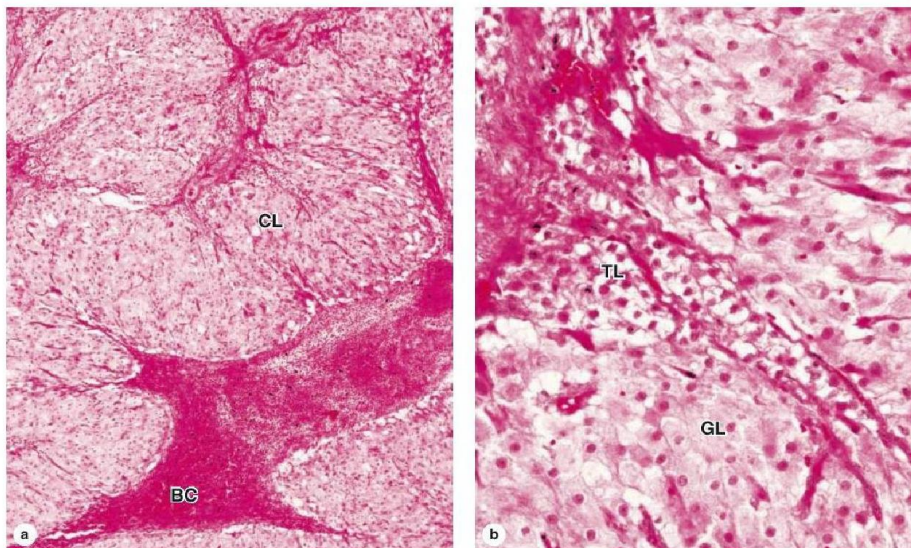
FSH folikulostimulirajući hormon, faktori rasta (IGF -I, EGF), joni kalcijuma (Ca^{2+}) Kada granulozni sloj dostigne debljinu od 6 do 12 slojeva granuloza ćelija, stvara se šupljina (*antrum*) između granuloza ćelija, koja je ispunjena folikularnom tečnošću (*liquor folliculi*) ovakva forma folikula se naziva **sekundarni (mehurasti) folikul** (Ross i Pawlina, 2016). Oocita je ekscentrično postavljena, kada dostigne veličinu od 125 μm , dalje ne raste zbog prisustva peptida (*oocytta maturacion inhibitor*, OMI) koje sekretuju granuloza ćelije u folikularnu tečnost antruma i inhibišu rast oocite. Kako se sekundarni folikul povećava, povećavaju se i antrum i slojevi granuloza ćelije. Debljina sloja granuloza ćelija je gotovo ujednačena osim na mestu gde je postavljena oocita, oko koje se formira sloj granuloza ćelija (*cumulus oophorus*) koja štrči u antrum. Kumulusne ćelije koje okružuju oocitu ostaju i nakon ovulacije i nazivaju se *corona radiata* (Ross i Pawlina, 2016).

c. Zreo folikul se naziva Graafov folikul, veličine je oko 10 mm, zbog svoje veličine formira ispučenje na površini ovarijuma (Slika 9). Kako folikul dostiže maksimalnu veličinu, mitotička aktivnost granuloza ćelija se smanjuje, antrum folikula se povećava i tako sloj granuloza ćelija postaje sve tanji i priprema se za ovulaciju.



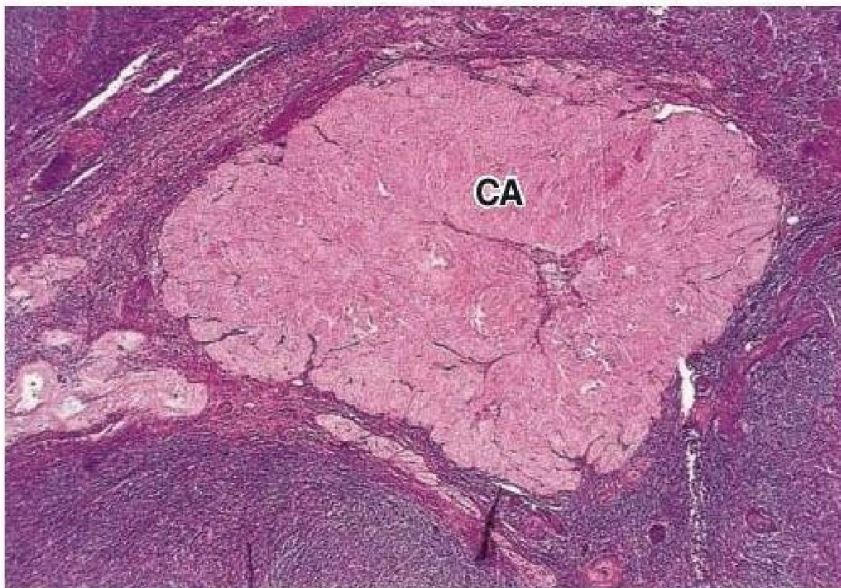
Slika 9. Antralni i zreo folikul. (Preuzeto iz: Mescher, 2016).

Nakon ovulacije, folikul sadrži krv iz krvnih sudova *theca interna*, javlja se i krvni ugrušak i nastaje formacija pod nazivom *corpus hemorrhagicum*. Čelije granuloze i *theca interna* se procesom luteinizacije, diferenciraju u lutealne ćelije, postaju veće, ispunjene lipidnim kapima i liosolubilnim pigmentima lipohromima u citoplazmi ćelije, pri čemu daju žutu obojenost novonastaloj formaciji koja se usled toga i naziva *corpus luteum* (Slika 10).



Slika 10. Žuto telo - *corpus luteum*. (Preuzeto iz: Mescher, 2016).

Žuto telo stvara progesteron i manje količine estrogena. Ukoliko do oplodjenja ne dođe, 10-12 dana posle ovulacije žuto telo počinje da involuiše i degeneriše, pretvarajući se u ožiljno belo telo *corpus albicans* (Slika 11).



Slika 11. Ožiljno telo - *corpus albicans*. (Preuzeto iz: Mescher, 2016).

Ukoliko dođe do oplodjenja sinciciotrofoblast stvara horionski gonadotropin koji “spašava” žuto telo odlažući njegovu degeneraciju. Ono tokom prvih 20 nedelja trudnoće ostaje aktivno, nakon čega posteljica preuzima njegovu ulogu (Nikolić, 2010).

1.4.2. Reproductivni sistem miša

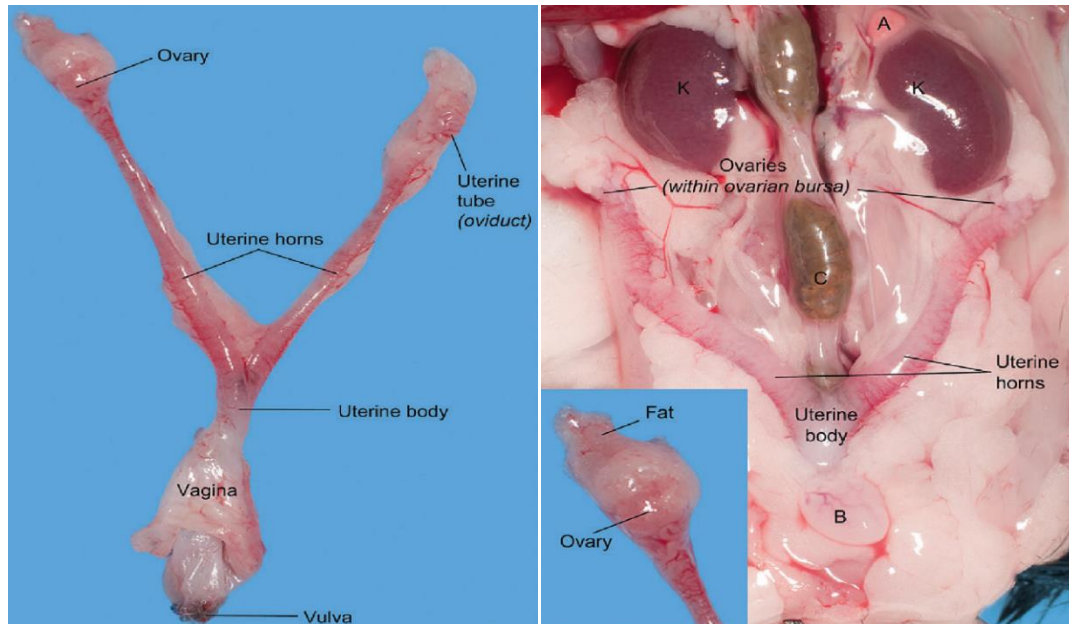
Reproduktivni sistem miševa se kao i kod žena, karakteriše morfološkim promenama koje se javljaju tokom menstrualnog (žena) i estrusnog ciklusa kod miševa, a koje se odvijaju pod kontrolom hormona. Miševi su sisari, odlikuju se sličnim reproduktivnim sistemom organa kao i ljudi. Reproductivni organi miševa su jajnici, materica, vagina i vulva (Slika 12). Pored sličnosti sa reproduktivnim sistemom organa žena, postoje i značajne razlike u građi i funkciji.

1.4.2.1. Jajnik (*ovarijum*)

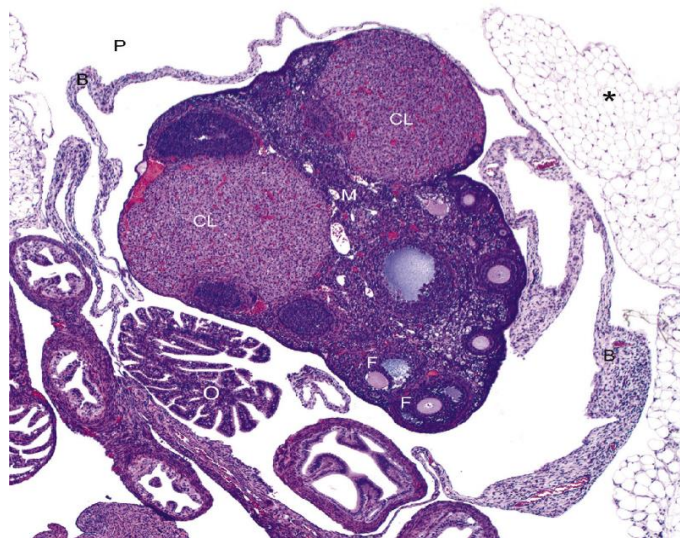
Jajnik je paran organ sferičnog oblika, smešten neposredno uz donju stranu bubrega, često uronjen u masno tkivo. Jajnici su obavijeni providnom elastičnom membranom, *bursa*. Ovarialna *bursa* je sa svoje spoljašnje i unutrašnje strane prekrivena mezotelijumom, koja je građena od krvnih sudova, nerava i manjeg broja glatkih mišićnih vlakana. Periovarijalni prostor odvaja jajnike od trbušne šupljine sa kojom je povezana jedino krvnim sudovima i nervima koji izlaze ili ulaze u ovarijum kroz otvor u predelu *hilusa* ovarijuma. Najčešće se u predelu *hilusa* akumulira masno tkivo (Slika 12).

Parenhim jajnika miševa je kao i kod žena, podeljen na dve oblasti koje nisu jasno razgraničene. Kora (*cortex*) je periferni deo jajnika koja naleže na srž jajnika. Kora sadrži ovarijalne folikule u različitim fazama razvoja, žuta tela, međućelijsku supstancu, koju čini vezivno tkivo, tanka mišićna vlakna i krvni sudovi (Slika 13).

Srž (*medulla*) je središnji deo jajnika, sačinjen od vezivnog tkiva, nerava i krvnih sudova, u njoj nema žutih tela niti folikula (Treuting i drugi, 2018).



Slika 12. Ženski urogenitalni sistem. Sastoji se od parnih jajnika, materice i bešike (B). Bubrezi (K), nadbubrežna žlezda (A), bešika (B) i debelo crevo (C). (Preuzeto iz: Treuting i drugi, 2018).

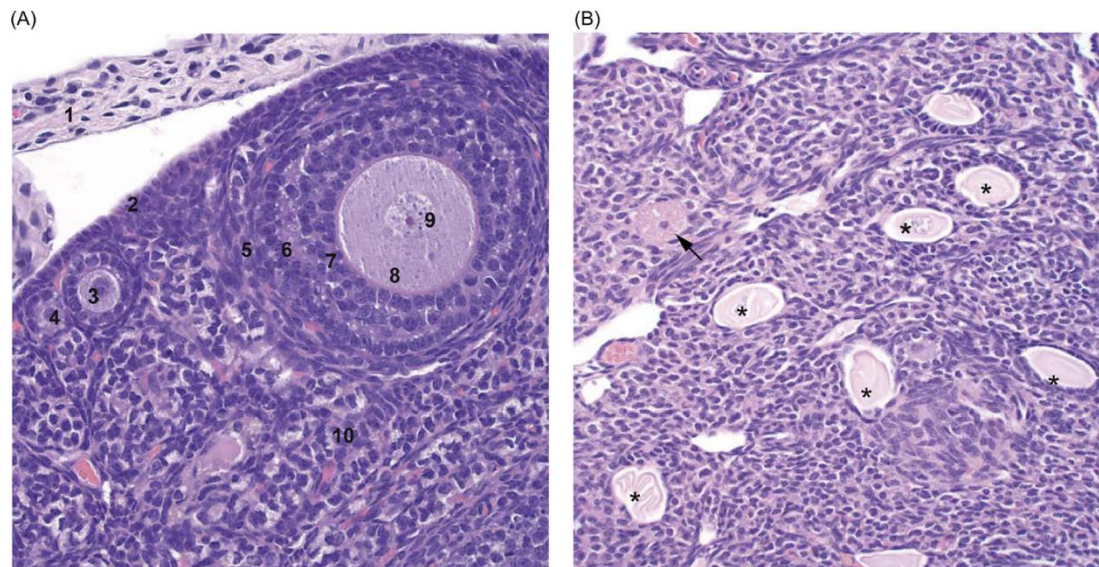


Slika 13. Jajnik miša. Jajnici miša su parni organi uronjeni u masno tkivo (zvezdica) smešteni odmah ispod bubrega. Potpuno su okruženi burzom jajnika (B). Estrusni ciklusa miša obično traje 4-6 dana i ima više folikula (F) koji sazrevaju istovremeno. Kod miševa održavanje trudnoće zavisi od progesterona koji luči žuto telo *corpus luteum* (CL). Jajnik sadrži centralnu srž *medulu* (M) i kompaktniju spoljašnju koru *cortex* sastavljenu od folikula u različitim fazama razvoja i žutog tela. Jajovod (O) i peritonealna šupljina (P). (Preuzeto iz: Treuting i drugi, 2018).

Proces ovogeneze i ovulacije kod miševa je sličan kao kod žena. I kod miševa se javljaju folikuli u različitim fazama razvoja. Primordijalni folikuli, razvojni folikuli i zreli folikuli.

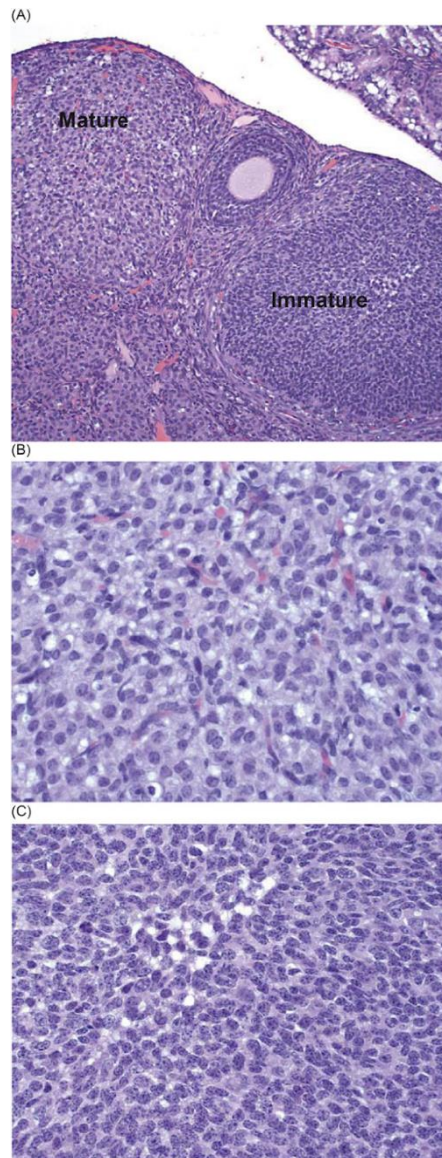
Primordijalni folikuli su najbrojniji i smešteni su u kori jajnika neposredno ispod germinativnog epitela i *tunica albuginea*. Sferična primarna oocita je okružena sa jednim slojem pljosnatih folikularnih ćelija. Iako većina primordijalnih folikula sadrži samo jednu oocitu, kod mladih ženki miševa nije neuobičajena pojava *poliovularnih folikula*, dok kod žena to nije uobičajena pojava. Primordijalni folikuli koji su kroz ovulaciju ili atreziju istrošeni postaju gusto fibrovaskularno tkivo koje gradi *tunica albuginea* (Slika 14).

Primarni razvojni folikul nastaje diferencijacijom primordijalnog folikula, pri čemu se promene dešavaju u oociti, folikularnim ćelijama i stromi. Folikularne ćelije koje obavijaju oocitu postaju kockaste. Brzom mitotičkom deobom folikularnih ćelija od jednoslojnog, primarnog folikula dolazi do formiranja višeslojnog primarnog folikula. Oko oocite se aktivnošću folikularnih ćelija i oocite formira *zona pellucida* od glikoproteina, sekundarna membrana jajne ćelije, u nju su uronjene mikrovile oocite i citoplazmatični nastavci folikularnih ćelija. Ćelije vezivnog tkiva koje se nalaze sa spoljašnje strane bazalne membrane, formiraju *theca folliculi* koja se dalje diferencira u dva sloja. Unutrašnji sloj *theca interna* predstavlja visoko vaskularizovani sloj kockastih sekretornih ćelija. Spoljašnji sloj *theca externa* sadrži ćelije vezivnog tkiva, a pored njih glatke mišićne ćelije i kolagena vlakna. Između folikularnih ćelija se formiraju pukotine, prostori različitog oblika veličine (*antrum*) koji su ispunjene tečnošću (*liquor folliculi*). Rastom folikula, oocita štrči u šupljinu antruma, oko nje se nalaze lokalno zadebljani sloj granuloznih ćelija koje čine (*cumulus oophorus*). Sloj folikularnih ćelija, neposredno oko oocite preko *zone pellucide* koja je u kontaktu sa oocitom naziva se *corona radiata*. Zreo folikul ili *Graafov folikul* je spreman za ovulaciju (Treuting i drugi, 2018).



Slika 14. Jajnik (miša). (A) 1 - bursa jajnika, 2 - germinativni epitel, 3 - primarni jednoćelijski folikul, 4 - primordijalni folikul, 5 - *theca*, 6 - luteinske ćelije, 7 - granulozna ćelije i *cumulus oophorus*, 8 - *zona pellucida*, 9 - oocit, 10 - stroma jajnika. (B) Degenerisani ili atretični folikuli (zvezdice), akumulacija ćelija sa svetlosmeđim citoplazmatskim pigmentom (strelica) primećene su kod starijih miševa. (Preuzeto iz: Treuting i drugi, 2018).

Kao i kod žena više folikula sazreva istovremeno, međutim kod ljudi samo jedan jajnik oslobađa jajnu ćeliju, dok se kod miševa oslobađa više jajnih ćelija. Nakon ovulacije kod miševa, kao i kod ljudi, ćelije granulose hipertrofiraju, postaju vaskularizovane iz *theca interne* i formiraju žuto telo. Zrele luteinske ćelije sadrže bistru vakuolizovanu eozinofilnu citoplazmu sa krupnim jedrom. Kod miševa, nakon ovulacije prisutno je više zrelih žutih tela, koja mogu biti prisutna istovremeno u istom jajniku. Nezrela žuta tela su manja i bazofilna, dok su starija zrela žuta tela velika i eozinofilna sa ćelijama raspoređenim u vidu stubića oko sinusoida (Slika 15). Progesteron je neophodan za pripremanje materice za implantaciju, a kasnije i za održavanje graviditeta (Treuting i drugi, 2018).

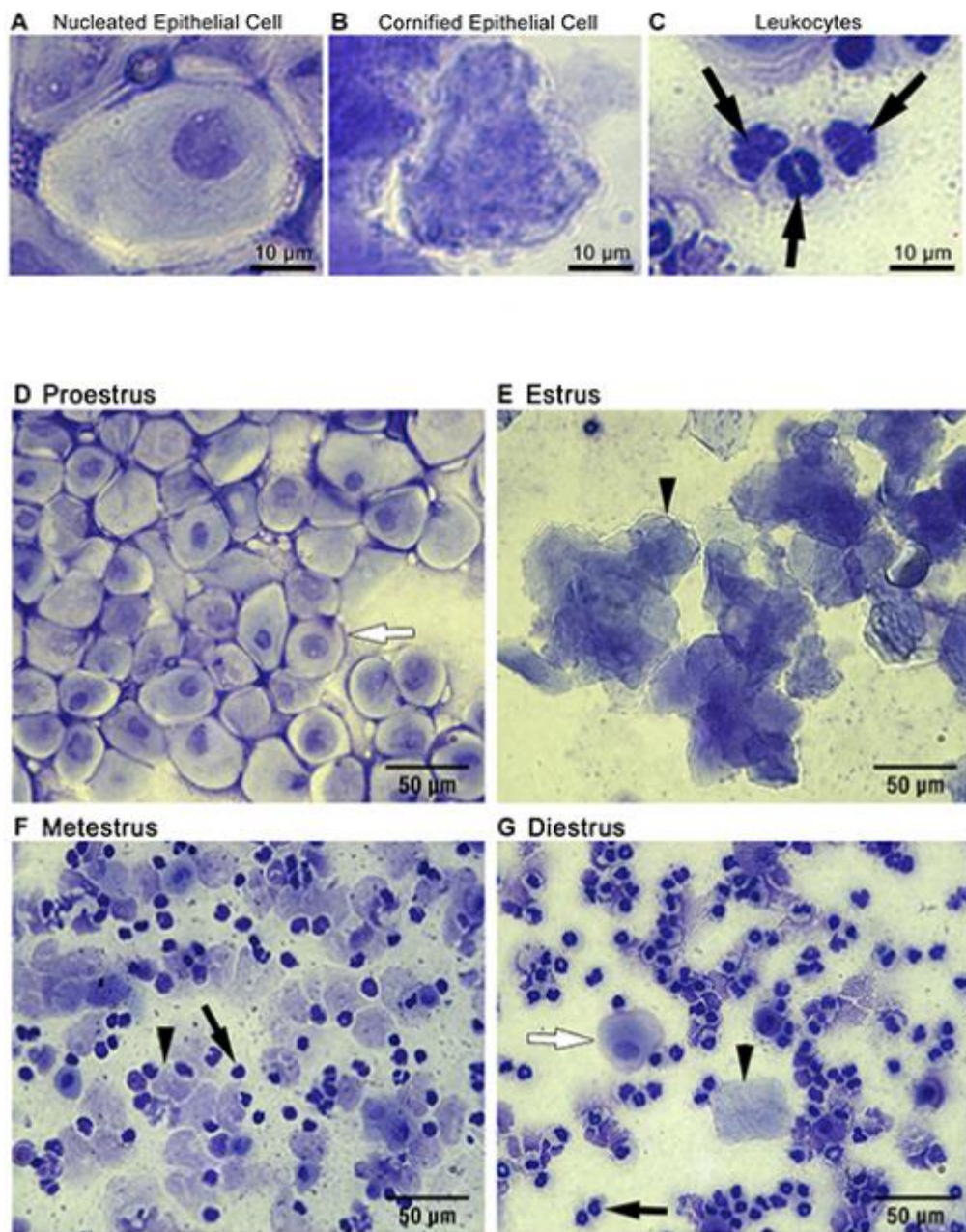


Slika 15. Žuto telo miša. (A) Zrelo žuto telo miša sa eozinofilnim ćelijama raspoređenim u vidu stubića oko sinusoida. (B) zrelo žuto telo i (C) nezrelo žuto telo sa malim i bazofilnim ćelijama. (Preuzeto iz: Treuting i drugi, 2018).

1.4.2.2. Estrusni ciklus ženke miša

Miš je poliestrusni sisar, ispoljava znake estrusa, (ukoliko ne dođe do trudnoće ili pseudotrudnoće) uključujući ponašanje pri parenju, svakih 4 ili 5 dana. Pojedinačni ciklusi predstavljaju komplekse povezanih sekretornih, anatomskih i bihevioralnih ciklusa, u čijoj osnovi je interakcija hormona hipofize i jajnika sa ciljem da se omogući oplodjenje. Estrusni ciklus, je pod uticajem hormona hipotalamohipofizno gonadne osovine. Čine ga četiri faze jedinstvenog citološkog izgleda: proestrusa, estrusa, metestrusa i diestrusa. Citološki izgled svake faze je odraz funkcije hipotalamohipofizno gonadnog sistema, odnosno dominacije lučenja određenih hormona. Faza proestrus estrusnog ciklusa odgovara ljudskoj folikularnoj fazi menstrualnog ciklusa (Hawkins i drugi, 2008). U proestrusu se povećano luče: LH, FSH i 17 beta estradiol. U vaginalnom brisu miševa u proestrusu, uočavaju se ovalne epitelne ćelije sa jedrom. Kada FSH dostigne pik počinje estrus, pri čemu nivoi LH i 17 beta estradiola padaju, a prolaktin dostiže pik.

Vaginalni razmaz karakteriše skoro isključiva detekcija orožalih ćelija skvamoznog epitela nepravilnog oblika često u vidu grudvica. Sledeća faza, metestrus, karakteriše se postepenim rastom progesterona (Walmer i drugi, 1992), ova faza odgovara početku humane lutealne faze (Mihm i drugi, 2011). Tipovi ćelija prisutni u vaginalnom razmazu tokom metestrus faze su fragmentovane, orožale epitelne ćelije i manji tamniji obojeni leukociti (Slika 16). Kada nivo cirkulišućeg progesterone dostigne svoj pik, dolazi do ulaska u diestrus kod miševa, što odgovara kasnoj lutealnoj fazi kod ljudi (Walmer i drugi, 1992; Mihm i drugi, 2011). Regresija žutog tela dovodi do naknadnog oštrog pada nivoa progesterona (Stocco i drugi, 2007; Rudolph i drugi, 2012) i ciklus kreće iz početka (McLean i drugi, 2012; Cora i drugi, 2015). Tokom diestrusa u brisevima preovlađuju leukociti. Učestalost orožalih epitelnih ćelija je manja i epitelne ćelije sa jedrom se pojavljuju neposredno pre prelaska na proestrus (McLean i drugi, 2012).



Slika 16. Citološka procena vaginalnih razmaza može se koristiti za identifikaciju estrusnog stadijuma. Tri glavna tipa ćelija su otkrivena u uzorcima vaginalnog razmaza (A) epitelne ćelije sa nukleusom, (B) rožnate ćelije skvamoznog epitela i (C) leukociti. Odnos ovih tipova ćelija prisutnih u razmazu može se koristiti za identifikaciju miševa u (D) proestrusu, (E) estrusu, (F) metestrusu ili (G) diestrusu. Crni vrhovi strelica u E, F i G ukazuju na reprezentativne rožnate ćelije skvamoznog epitela. Crne strelice u C, F i G ukazuju na reprezentativne leukocite. Bele strelice u D i G ističu reprezentativne epitelne ćelije sa nukleusom. (Preuzeto iz: McLean i drugi, 2012).

2. CILJ ISPITIVANJA

Cilj istraživanja je ispitivanje uticaja arsena u vodi za piće, u koncentraciji koja je ekvivalentna koncentraciji arsena izmerenoj u vodovodnoj mreži opštine Zrenjanin na reproduktivne sposobnosti ženki miševa, kao animalnom modelu. Praćenje efekata će se vršiti tokom tri uzastopne generacije.

- Uticaj arsena ispitivaće se na osnovu:
- Utvrđivanje broja okoćenih mladunaca po ženki miša u svakoj generaciji.
- Merenje količine deponovanog ukupnog arsena u jednodnevnim mladuncima, kao i u organima ženki miševa (jajnicima, jetri, bubrezima i mozgu).
- Analiziranjem nivoa reproduktivnih hormona (estrogena i progesterona).
- Praćenja estrusnog ciklusa radi uočavanja mogućih promena.
- Brojanje žutih tela i ovarijalnih folikula miša.
- Registrovanje potencijalnih histoloških promena jajnika.
- Detektovanje receptora za estrogen primenom imunohistohemijskih metoda.
- Utvrđivanje genotoksičnog efekta arsena brojanjem mikronukleusa.
- Statistička obrada podataka.
- Očekuje se ispoljavanje kumulativnog dejstva arsena, kroz tri uzastopne generacije miševa u vidu poremećaja estrusnog ciklusa, ovulacije, nivoa ženskih polnih hormona. Dobijeni rezultati bi značajno doprineli utvrđivanju potencijalno štetnog, hroničnog uticaja arsena određenih koncentracija, iz generacije u generaciju, na reproduktivno zdravlje žena. Eventualna primena dobijenih podataka koristila bi u prevenciji ili uspostavljanju preciznije dijagnoze u lečenju reproduktivnih bolesti žena.

3. MATERIJAL I METODE

Eksperiment je odobren od strane Etičkog saveta – Uprava za veterinu, Ministarstvo poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede Srbije (br.: 323-07-00615 / 2019-05 datum 29.01.2020). Životinje koje su korišćene za ovaj eksperiment su mužjaci i ženke miševa (*Mus musculus*, soj: NMRI) starosti 0-6 meseci, koji potiču iz (Naval Medical Research Institute) i odgojeni su u vivarijumu Instituta za kontrolu besnila – Pasterov zavod, Novi Sad. Tokom eksperimenta životinje su držane u grupnim kavezima na temperaturi od 20-22 °C, relativne vlažnosti od 50 ± 5% i 12h ciklusu svetlo-mrak. Ishrana je obezbeđena po formuli Veterinarskog instituta Subotica, suva peletirana hrana. Dnevna masa hrane unesena u organizam iznosila je oko 20% njihove telesne mase, ta masa je udvostručena tokom laktacije, ishrana je vršena rano ujutro i u sumrak (2x dnevno). Vodu su konzumirali *ad libitum* po potrebi, a dnevni unos vode je u proseku iznosio 7 ml po mišu. Životinje su konzumirale rastvor od 500 ml po kavezu 10 dana (6 životinja u kavezu). Zdravstveno stanje miševa pratili su veterinari jedanput dnevno tokom eksperimenta. Poštovan je protokol koji je propisala Služba za javno zdravlje, definisan kao „Vodič za negu i upotrebu laboratorijskih životinja” prema (National Research Council - NRC, 2011). U eksperimentu je korišćena supstanca arsen(III)-oksid (Centrohema, Stara Pazova). Arsen (III)-oksid u čvrstom stanju rastvoren je u destilovanoj vodi. Koncentrovani rastvor arsena od 212 mg/L razblažen je do ispitivane koncentracije vodom iz novosadske vodovodne mreže, u kojoj nije detektovano prisustvo arsena.

Najviša izmerena vrednost koncentracije arsena u vodovodnoj mreži Zrenjanina 0,859 mg/L (mereno u naselju Taraš, Srbija) (Jovanović i drugi, 2011) je odabrana koncentracija za ispitivanje uticaja arsena(III) u vodi za piće. U eksperimentu na animalnom modelu je primenjena koncentracija ekvivalentna humanoj vrednosti. Ako vrednost izmerene koncentracije arsena, koristimo za konverziju humane vrednosti na animalnu vrednost, modifikacijom, prema protokolu (Nair i Jacob, 2016) dobijamo ekvivalentnu vrednost koncentracije arsena(III) rastvorenog u vodi za piće miševa u iznosu od 10,6 mg/L. U eksperimentu se pored dobijene animalne vrednosti koncentracije arsena primenila i od nje deset puta veća vrednost koncentracije. Deset puta veća koncentracija arsena(III) je određena empirijski, radi lakše histološke analize eventualnih patoloških promena. Kontrolna grupa miševa dobijala je vodu iz novosadske vodovodne mreže u kojoj nema arsena i nikad nije bila zabranjena za piće.

3.1. Formiranje generacija eksperimentalne grupe

Prva ogledna grupa životinja je bila izložena arsenu(III) u koncentraciji od 10,6 mg/L (A grupa), dok je druga eksperimentalna grupa, bila izložena koncentraciji od 106 mg/L (B grupa). Kontrolna grupa životinja (K) dobijala je vodu iz novosadske vodovodne mreže. Sve tri grupe životinja su posmatrane kroz tri uzastopne generacije. Kontrolna grupa (K1, K2, K3) predstavljala je rutinski uzgoj miševa u Vivarijumu Pasterovog zavoda, Novi Sad. Radi formiranja prvih generacija eksperimentalnih grupa životinja (A i B) i kontrolne grupe, bilo je potrebno formirati nultu grupu. Nasumičnim odabirom su za svaku grupu odabrane jedinice (6 ženki i 3 mužjaka) koje su raspoređene u tri kaveza, svaki kavez sadržao je 2 ženke i 1 mužjaka. Mladi miševi (mužjaci i ženke, stari oko 3 nedelje) su izabrani slučajnim odabirom iz rutinskog uzgoja, sa ciljem da se prikupe njihovi potomci za formiranje prvih generacija ispitivanih grupa. Prvu generaciju činili su miševi čiji su roditelji bili izloženi uticaju primenjenih koncentracija arsena(III). Prva

eksperimentalna grupa (A) je u prvoj generaciji imala ukupno 18 životinja (12 ženki i 6 mužjaka) raspoređenih u tri kaveza. Svaki kavez je sadržao 6 životinja (4 ženke i 2 mužjaka) koje nisu bile u srodstvu. Isti broj i raspored životinja u kavezima korišćen je za formiranje prve generacije u drugoj eksperimentalnoj grupi (B) i u kontrolnoj grupi. Od trenutka kada su miševi smešteni u kaveze, svaka eksperimentalna grupa je bila izložena određenoj koncentraciji arsena(III), konstantno iz generacije u generaciju. Tokom estrusnog ciklusa kod ženki, miševi su se spontano parili. Nakon graviditeta, okota i završetka laktacije, mladunci, stari oko tri nedelje, odvojeni su od majke iz kaveza i smešteni u „jaslice”. Tamo su ostali dok nisu dostigli polnu zrelost (u dobi od 8 do 10 nedelja). Odatle su izabrani mladunci za formiranje naredne generacije. Slučajnim odabirom mužjaka i ženki mladih miševa (u dobi od 8 do 10 nedelja) su izdvojeni iz "jaslica". Raspoređivanje mladih po kavezima se vršilo tako da su se spajali miševi iz različitih "jaslica" kako bi se izbegao *inbreeding*, ukrštanje u srodstvu. Nakon kopulacije i registrovanja gravidnosti ženke, mužjaci su uklonjeni iz kaveza. Posle okota ženki, prebrojani su mladunci u leglu. Da bi formirali sledeću generaciju, mladunci su ostali u kavezima sa svojim majkama do 3 nedelje starosti. Potom su premeštani u "jaslice" dok nisu dostigli polnu zrelost. Mladi mužjaci i ženke birani su iz "jaslica" za formiranje treće generacije, prema gore navedenom rasporedu i broju životinja u kavezu. Nakon laktacije, ženke su odvojene u posebne kaveze prema oglednim grupama i generaciji kojoj su pripadale, radi uzimanja uzoraka krvi za analizu reproduktivnih hormona, uzoraka organa, radi analize sadržaja ukupnog arsena i histoloških analiza.

3.2. Brojanje mladunaca po ženki miša

Brojanje mladunaca po ženki miša u leglu je vršeno u periodu od 75 dana (period od 75 dana predstavlja vreme od kada su ženke spojene sa mužjacima u kavez do okota). U svakoj generaciji, ženke su bile izložene samo jednom reproduktivnom ciklusu. Prebrojani su živorođeni jednodnevni mladunci po ženki u leglu, podaci su statistički obrađeni.

3.3. Analiza količine deponovanog ukupnog arsena

Analiza količine deponovanog ukupnog arsena je vršena na jednodnevnim mladuncima miševa i uzorcima organa ženki (jajnicima, jetri, bubrezima i mozgu). Žrtvovanje ženki i jednodnevnih mladunaca je izvršeno cervikalnom dislokacijom. Uzorci su zamrznuti na -20°C do vremena analize.

Analiza ukupnog sadržaja arsena je rađena metodom masene spektrometrije induktivno spregnute plazme *Inductively coupled plasma mass spectrometry* (ICP-MS) u Naučnom veterinarskom institutu „Novi Sad”. Uzorci za merenje pripremljeni su metodom mikrotalasne digestije u sistemu Ethos, Microvave Labstation, Milestone. Destrukcija uzoraka je izvršena sa 8 ml razblažene HNO_3 (2:1) i 2 ml H_2O_2 (30%) na $t_{\text{max}} 180^{\circ}\text{C}$. Zadati program mikrotalasne digestije trajao je ukupno 30 minuta pri maksimalnoj snazi od 1000 V. Koncentracija arsena je merena tehnikom kompozitne plazme sa detekcijom mase na Agilent ICP-MS 7700k instrumentu preko izotopa ^{75}As .

Određivanje je izvršeno u helijumskom režimu sa vremenskom integracijom od 1 sekunde po tački (He-M, IT 1 s/P). Kalibraciona kriva je generisana korišćenjem sertifikovanog AccuTrace™ Reference Standard, USA, sa koncentracijom od 1000 mg/ml. Da bi se utvrdila efikasnost mikrotalasne digestije, uzorci su lemljeni na poznatu koncentraciju standardnih rastvora ispitivanog elementa. Eksperimentalno određena granica kvantifikacije *limit of quantification* (LoQ) za arsen korišćen ovom metodom bila je <0,001 mg/kg. Ukupan sadržaj arsena izračunat je na osnovu izmerenog broja impulsa (odbrojavanje), funkcije kalibracije i razblaženja korišćenjem *MassHunter Workstation software*, programa.

3.4. Analiza ženskih polnih hormona (estrogena, progesterona)

Određivanje faze estrusnog ciklusa ženki izolovanih u odvojenim kavezima nakon okota i završetka laktacije vršilo se svakodnevno u isto vreme u prepodnevnim časovima, sve dok se nije utvrdilo da su neke od ženki bile u diestrusnoj fazi estrusnog ciklusa. Nakon što je registrovan diestrus kod ženke, pristupilo se njenom žrtvovanju, cervikalnom dislokacijom. Krv je sakupljena direktnom punkcijom srca, a uzorci su čuvani na sobnoj temperature do koagulacije. Posle koagulacije, izdvojeni serum je centrifugiran na 3000 rpm tokom 15 minuta. Prečišćeni serum je odvojen u mikroeprovete i čuvan na -70°C do analize hormona. Analiza hormona estradiola i progesterona obavljena je ELISA testom prema protokolu / čovek / majmun / miš / E2 (estradiol) ELISA komplet (kataloški br. E-EL0150 96T uputstvo za upotrebu Elabscience; Pg (progesteron) ELISA komplet; kataloški br: E-EL -0154 96T uputstvo za upotrebu Elabscience).

3.5. Određivanje faze estrusnog ciklusa

Estrusni ciklus je praćen kod ukupno 45 ženki. Ženkama miševa je od prvog dana eksperimenta, svaki dan u isto vreme (u jutarnjim časovima) uzet uzorak vaginalnog ispirka, sa minimalno invazivnom metodom korišćenjem 0,9% natrijum-hlorida (NaCl, Hemofarm, Srbija). Od ispirka je napravljen razmaz koji je fiksiran metanolom (Zorka Pharma Srbija), obojen po Gimzi (Bio Optica Italija), razmazi su analizirani na svetlostnom mikroskopu (200x i 400x). Određivanje faza estrusnog ciklusa je vršeno prema dominantnom prisustvu ćelija u vaginalnom ispirku, karakteristične morfologije po ključu Kore Mišel (Cora i drugi, 2015).

3.6. Brojanje žutih tela i ovarijalnih folikula miša

Analiziran je ukupan broj od 45 ženki miševa. Eksperiment je koncipiran na osnovu tri grupe: kontrolne i dve eksperimentalne grupe u tri uzastopne generacije. Svaka grupa sadržala je po 15 ženki miševa, predstavljenih sa 5 ženki miševa po generaciji. Analiza je vršena po preseku jajnika. Svetlosni mikroskop, *Optical microscope* "Leica DC 100" (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka) je korišćen za analizu histoloških uzoraka jajnika pri različitim uvećanjima (50x, 100x,

200x, 400x i 630x, uzorci su fotografisani korišćenjem odgovarajućeg softvera “*Digital Camera System*” Leica DC100, (Microsystems, Hererbrugg, Švajcarska) analiza slike je izvršena korišćenjem softvera ImageJ. U dve eksperimentalne grupe i kontrolnoj grupi merene su sledeće karakteristike: ukupan broj žutih tela, ukupan broj ovarijalnih folikula (rastući i zreli folikul, dok primordijalni folikuli nisu brojani), ukupan broj antralnih folikula i ukupan broj atretičnih folikula (samo u populaciji antralnih folikula).

3.7. Histološka analiza preseka ovarijuma

Ženke miševa su eutanazirane, a uzorci organa su fiksirani u puferovanom formalinu (pH=7,4), dehidracija je izvršena u 70%, 80%, 96% i 100% etanolu, prosvetljeni u ksilolu, i uklapani u parafin. Parafinski blokovi su sečeni na poprečne preseke od 5 μ m, korišćenjem Leica RM2125 RTS rotacionog mikrotoma. Za proučavanje histoloških promena ovarijuma, preseci su obojeni prema protokolu proizvođača, hematoksilin-eozinom (H/E, HEMG3-25/21, BioGnost Ltd. Zagreb, Hrvatska). U cilju otkrivanja glikogenskog poremećaja korišćena su i specifična bojenja, periodnom kiselinom (PAS -Periodic acid-Schiff, 36221, Bio-Optica, Milano, Italy), a radi detekcije potencijalnih promena vezivnih vlakana primenjeni su (Azan, Bio-Optica, Milano, Italy) i (trihromno bojenje po Massonu, MST-71/21, BioGnost LTD. Zagreb, Hrvatska). Analiza preseka izvršena je svetlosnim mikroskopom, Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka).

3.8. Imunohistohemija

Za imunohistohemijsku lokalizaciju receptora estrogena u jajnicima miša, preseci debljine 3 mikrometara su deparafinizovani, hidratizani, inkubirani u 0,1 M natrijum citratnom puferu (pH 6,0) tokom 21 minuta u mikroatalsnoj pećnici u cilju demaskiranja antigena (Heat Induced Epitope Retrieval -HIER) a zatim tretirani sa 3% (v/v) H₂O₂ u PBS tokom 30 minuta, kako bi se blokirala aktivnost endogene peroksidaze. Nespecifično bojenje je blokirano inkubacijom preseka sa goveđim serumom na sobnoj temperaturi. Preseci su zatim inkubirani sa monoklonskim zečijim anti-humanim estrogen receptorom α -antitelom (Monoclonal Rabbit Anti-Human Estrogen Receptor α , Clone EP1, Dako, Aligent Tehnlogies, Denmark), 1 sat na sobnoj temperaturi, a zatim su inkubirani sa koktelom konjugovanih sekundarnih antitela (En Vision FLEX, High pH, Dako, Aligent Tehnlogies, Denmark) u trajanju od 30 minuta na sobnoj temperaturi. Primarno antitelo nije inkubirano na presecima koji su služili kao negativne kontrole. Za vizuelizaciju je izvršeno kontrastiranje sa hematoksilinom, a lokalizacija estrogenih receptora je analizirana korišćenjem svetlosnog mikroskopa Leica DMLB (Leica Microsystems, Wetzlar, Nemačka).

3.9. Mikronukleus test

Ukupan broj miševa za analizu mikronukleusa bio je 16, podeljenih u 3 grupe: (I grupa životinja – arsen(III) - 5 miševa; II grupa životinja (fiziološki rastvor- negativna kontrola) - 5 miševa; III grupa životinja (benzidin - pozitivna kontrola) - 6 miševa). Korišćeni su reagensi iz laboratorije Zavoda za histologiju i embriologiju Medicinskog fakulteta u Novom Sadu, benzidin i arsen(III), proizvođača “Centrohem” d.o.o. Stara Pazova. Prema protokolu (Organisation for Economic Co-operation and Development - OECD, 2016) Ispitivano jedinjenje je miševima primenjeno u dve različite doze:

Niska doza: vodeni rastvor arsen(III) u koncentraciji od 10,6 mg/L u vidu jedne intraperitonealne injekcije od 1ml.

Visoka doza: vodeni rastvor arsen(III) u koncentraciji od 10,6 mg/L, u vidu jedne intraperitonealne injekcije od 1ml, tri uzastopna dana.

Pozitivna kontrola: benzidin (100 mg u 30 ml fiziološkog rastvora) u vidu jedne intraperitonealne injekcije od 1ml.

Negativna kontrola: fiziološki rastvor, u vidu jedne intraperitonealne injekcije od 1ml.

Uzorci su uzeti prema grupi kojoj pripadaju nakon 18, 24 ili 48 časa po aplikovanju odgovarajuće supstance. Uzorak, periferna krv, dobijena je zarezivanjem repa miša. Krvni razmazi pravljani su na predmetnom staklu, zatim su bojeni po Papenhajmu (razmaz je prelivan koncentrovanom bojom May-Grünwald (Alfapanon, Novi Sad, Srbija) (1ml), kasnije je nalivana destilovana voda ili pufer (1 ml), nakon čega se dobijen rastvor odlivao i preparati su se preivali radnim rastvorom Giemsa boje (Alfapanon, Novi Sad, Srbija). Gotovi preparati su posmatrani, svetlosnim mikroskopom, pod imerzionim objektivom, na prisustvo ili odsustvo mikronukleusa. Kod brojanja mikronukleusa akcenat je stavljen na traženje isključivo onih koji se nalaze u vidnom polju u kome ne dolazi do međusobnog preklapanja eritrocita, jer u tom slučaju dolazi do pojave struktura koje liče na mikronukleuse. Da bi se ispunila norma pregledanih eritrocita, koje nameću smernice (OECD, 2016), odabrano je reprezentativno vidno polje, koje je postalo standard, i u njemu je izbrojano 174 mikronukleusa. Pregledano je 20 takvih vidnih polja.

3.10. Statistička analiza

Statistički podaci su analizirani analizom varijanse (ANOVA), Tukey's, post-hoc testom, korišćenjem softvera GraphPad Prism 6. Rezultat je statistički značajan ako je $p < 0,05$.

Podaci dobijeni primenom mikronukleus testa obrađeni su metodom Hi-kvadrat (X^2) radi pronalaženja prisustva ili odsustva statičke povezanosti.

4. REZULTATI

Izlaganje uticaju arsena(III) u primenjenim koncentracijama, tokom eksperimenta nije dovelo do akutnih simptoma trovanja, zdravstveno stanje eksperimentalnih životinja je bilo dobro. Na spoljašnjoj građi tela životinja nisu primećene promene u vidu rana, krvarenja, gubitka dlake, anomalija udova. Životinje izložene 10 puta jačoj koncentraciji bile su vidno sitnije građe, koža i nokti bili su bledosive boje, dlaka je imala sivi sjaj u odnosu na kontrolnu grupu životinja i prvu oglednu grupu. Bez obzira na koncentraciju kojoj su izložene sve životinje su bile aktivne. Nije zabeležena smrt većeg broja životinja u odnosu na kontrolnu grupu. Ženke su se spontano parile sa mužjacima i ostajale su gravidne, graviditet je protekao uredno, nije zabeležena smrt gravidnih ženki. Okoćeni mladunci su bili slepi, goli, broj mrtvo okoćenih mladunaca nije zabeležen. Rast i razvoj mladunaca tokom eksperimenta je uredno prošao.

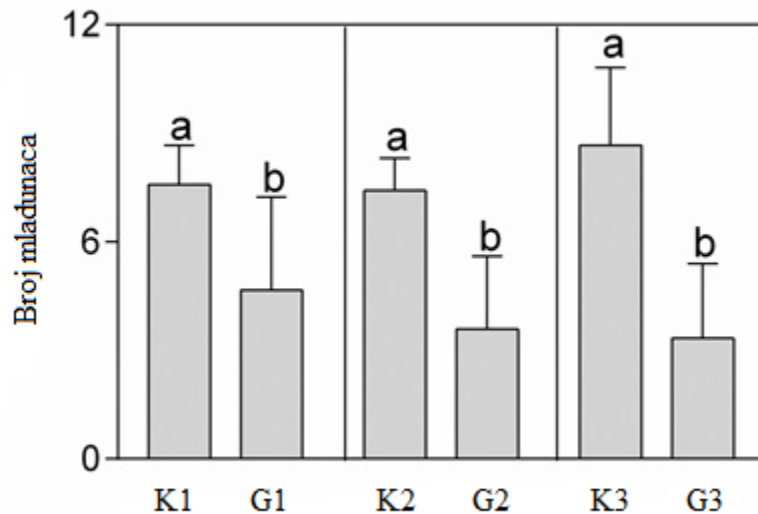
4.1. Brojanje mladunaca po ženki miša u leglu

Rezultati brojanja okoćenih mladunaca u leglu po ženki miša prikazuju da postoje razlike u broju okoćenih mladunaca između eksperimentalnih grupa i kontrolne grupe. Rezultati su prikazani u Tabeli 1.

Tabela 1. Uticaj različitih koncentracija arsena(III) na broj mladunaca po ženki miša praćeno kroz tri generacije (G1, G2, G3).

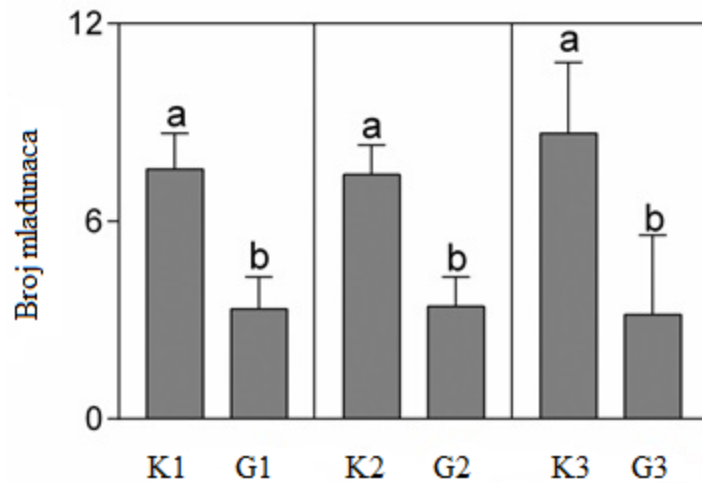
Redni broj ženke	Kontrolna grupa			<u>A grupa</u> Prva eksperimentalna grupa (10,6 mg/L)			<u>B grupa</u> Druga eksperimentalna grupa (106 mg/L)		
	G1	G2	G3	G1	G2	G3	G1	G2	G3
1	8	8	8	0	7	4	4	3	4
2	8	8	8	0	4	5	3	4	6
3	8	9	12	4	4	4	5	4	4
4	6	6	8	6	3	5	3	4	5
5	6	7	6	4	4	5	3	5	4
6	7	8	6	4	5	4	4	3	5
7	8	8	6	5	5	4	3	4	5
8	7	7	10	8	5	5	5	3	5
9	8	7	10	6	3	0	3	2	0
10	8	8	12	8	3	4	3	4	0
11	10	7	10	5	0	0	2	2	0
12	7	6	8	6	0	0	2	3	0
Ukupno	91	89	104	56	43	40	40	41	38

Analizom rezultata brojanja okoćenih mladunaca u leglu po ženki miša u eksperimentalnoj grupi životinja (A) i kontrolnoj grupi tokom tri uzastopne generacije (G1, G2, G3) je utvrđeno da je prosečan broj mladunaca znatno niži u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultat je statistički značajan. Analizom prosečnih vrednosti ispitivanih grupa životinja iz generacije u generaciju u poređenju sa odgovarajućom kontrolnom grupom uočava se postepeno opadanje vrednosti (Grafik 1).



Grafik 1. Prosečan broj okoćenih mladunaca po ženki miša (u periodu od 75 dana) u prvoj (A) eksperimentalnoj grupi miševa izloženoj arsenu(III) u koncentraciji od 10,6 mg/L i odgovarajućim kontrolnim grupama (K1, K2, K3) tokom tri generacije (G1, G2, G3). Stubići predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM broja mladih od 12 ženki miševa po grupi. Statistički značaj ako je $p < 0,05$ predstavljen je slovima (a, b) između miševa tretiranih arsenom i odgovarajućih kontrola.

Analizom rezultata brojanja okoćenih mladunaca po ženki miša u leglu druge eksperimentalne grupe (B) je utvrđeno da prosečan broj mladunaca opada u odnosu na kontrolnu grupu. Rezultat je statistički značajan. Poređenjem (G1, G2, G3) generacija uočava se gotovo ujednačen pad prosečnog broja mladunaca u odnosu na odgovarajuću kontrolnu grupu, rezultat je statistički značajan (Grafik 2).



Grafik 2. Prosečan broj mladunaca po ženki miša (u periodu od 75 dana) u drugoj eksperimentalnoj grupi (B) miševa izloženoj arsenu(III) u koncentraciji od 106 mg/L i odgovarajućim kontrolnim grupama (K1, K2, K3) tokom tri generacije (G1, G2, G3). Stubići predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM broja mladih od 12 ženki miševa po grupi. Statistički značaj ako je $p < 0,05$ predstavljen je slovima (a,b) između miševa tretiranih arsenom i odgovarajućih kontrola.

4.2. Analiza količine ukupnog arsena

4.2.1. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u jednodnevnim mladuncima miševa

Rezultati analize količine ukupnog arsena deponovanog u jednodnevnim mladuncima je izražena u mikrogramima po 1 kilogramu, telesne mase su prikazani u Tabeli 2. U prvoj eksperimentalnoj grupi (A) najmanja količine deponovanog arsena bila je u prvoj generaciji G1, dok se u drugoj generaciji G2 uočava blagi porast, u trećoj generaciji G3 količina deponovanog arsena je najveća. Rezultati druge eksperimentalne grupe (B) nisu pokazali značajnu razliku u odnosu na rezultate prve eksperimentalne grupe A. Uočeno je da se arsen akumulira iz generacije u generaciju. Poređenje dobijene vrednosti deponovanog arsena u G1 sa G3 ukazuje da se u G3 taloži skoro dva puta više arsena u jednodnevnim mladuncima miša.

Tabela 2. Rezultati analize količine ukupnog arsena deponovanog u jednodnevnim mladuncima u poređenju sa kontrolnom vrednošću, na osnovu pula koji predstavlja 5 jednodnevnih mladunaca po generaciji.

Generacija jednodnevnih mladunca	Kontrolna grupa	A eksperimentalna grupa (As 10.6 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)	B eksperimentalna grupa (As 106 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)
G ₁	12.60	224.56	364.79
G ₂	12.60	225.56	531.57
G ₃	12.60	325.25	535.13

4.2.2. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u organima ženki miševa

4.2.2.1. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u jajnicima

Rezultati analize količine ukupnog arsena deponovanog u jajnicima miševa prikazani su u Tabeli 3. U prvoj eksperimentalnoj grupi (A) rezultati prikazuju da se količina deponovanog arsena povećava iz generacije u generaciju. Sadržaj deponovanog arsena u trećoj generaciji (G₃) je dvostruko veći nego u prvoj generaciji prve eksperimentalne grupe. Analizom druge eksperimentalne grupe (B) utvrđeno je postepeno povećavanje količine deponovanog arsena iz generacije u generaciju. Upoređivanjem po generacijama, između A i B eksperimentalnih grupa, vrednost deponovanog arsena u G₁ eksperimentalne grupe (B) je bila skoro tri puta veća nego u G₁ eksperimentalne grupe (A). U eksperimentalnoj grupi (B) u G₂ i G₃ sadržaj arsena je bio skoro dvostruko veći nego u G₂ i G₃ eksperimentalne grupe (A).

Tabela 3. Rezultati količine ukupnog arsena deponovanog u jajnicima miša u tri uzastopne generacije (G₁, G₂ i G₃), eksperimentalnih grupe A i B u poređenju sa kontrolnom vrednošću. Rezultati sadržaja ukupnog arsena deponovanog u jajnicima miševa ($\mu\text{g/kg}$ jajnika) su mereni na osnovu pula, koji predstavlja uzorak jajnika od 5 miševa.

Generacija ♀ (jajnik)	Kontrolna grupa	A eksperimentalna grupa (As 10.6 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)	B eksperimentalna grupa (As 106 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)
G ₁	36.15	429.21	1132.20
G ₂	36.15	701.49	1280.50
G ₃	36.15	851.56	1473.27

4.2.2.2. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u jetri ženki miševa

Rezultati analize količine ukupnog arsena deponovanog u jetri ženki miševa eksperimentalnih grupa su prikazani u Tabeli 4. U prvoj eksperimentalnoj grupi (A) rezultati prikazuju da se količina deponovanog arsena znatno povećava u svakoj sledećoj generaciji, vrednost količine ukupnog arsena je najveći u G3, skoro dvostruko puta više nego u G1. U drugoj eksperimentalnoj grupi (B) je utvrđeno postepeno povećanje količine arsena iz generacije u generaciju. Kada se upoređi količina deponovanog arsena grupe A i B po generacijama, vrednost deponovanog arsena G1 grupe B je blizu četiri puta veća nego u G1 grupe A. U generacijama G2 i G3 grupe B, količina arsena je bila više nego dvostruko veća nego u G2 i G3 A grupe životinja.

Tabela 4. Rezultat količine ukupnog arsena deponovanog u jetri ženki miševa u tri uzastopne generacije (G1, G2 i G3), eksperimentalnih grupa miševa označenih sa A i B u poređenju sa kontrolnom vrednošću. Rezultati količine ukupnog arsena deponovanog u jetri miševa ($\mu\text{g/kg}$ jetre) su mereni na osnovu pula, koji predstavlja uzorak od 5 jetri miševa.

Generacija ♀ (Jetra)	Kontrolna grupa	A eksperimentalna grupa (As 10.6 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)	B eksperimentalna grupa (As 106 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)
G ₁	9,81	374,33	1398,89
G ₂	9,81	609,22	1432,37
G ₃	9,81	705,39	1754,52

4.2.2.3. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u bubrežima ženki miševa

Rezultati analize količine ukupnog arsena deponovanog u bubrežima, ženki miševa eksperimentalnih grupa A i B prikazani su u Tabeli 5. U eksperimentalnim grupama A i B se količina deponovanog arsena postepeno povećavala u svakoj sledećoj generaciji, tako da je vrednost količine ukupnog arsena bila najveća u trećoj generaciji. Upoređivanjem vrednosti deponovanog arsena eksperimentalne grupe A sa eksperimentalnom grupom B, posmatrajući sve tri generacije G1, G2 i G3 uočeno je da se pri 10 puta jačoj koncentraciji arsen(III) taložio u znatno većoj količini u bubrežima miševa.

Tabela 5. Količina ukupnog arsena deponovanog u bubrežima ženki miševa u tri uzastopne generacije (G1, G2 i G3), eksperimentalnih grupa A i B u poređenju sa kontrolnom. Rezultati količine ukupnog arsena u organima miševa ($\mu\text{g/kg}$ bubreg) su mereni na osnovu pula, koji predstavlja uzorak organa (bubrezi) sakupljenih od 5 miševa.

Generacija ♀ (Bubrezi)	Kontrolna grupa	A eksperimentalna grupa (As 10.6 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)	B eksperimentalna grupa (As 106 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)
G ₁	1011.6	1089.02	4619.64
G ₂	1011.6	1222.07	4681.09
G ₃	1011.6	1893.13	5258.77

4.2.2.4. Analiza količine ukupnog arsena deponovanog u mozgu ženki miševa

Rezultati analize količine ukupnog arsena deponovanog u mozgu, ženki miševa eksperimentalnih grupa A i B su prikazani u Tabeli 6. U eksperimentalnoj grupi A rezultati prikazuju da se količina deponovanog arsena postepeno povećavala iz generacije u generaciju, tako da je vrednost količine ukupnog arsena najveća u G3. U grupi B je takođe primećeno postepeno povećanje količine deponovanog arsena iz generacije u generaciju. Poređenjem dobijenih vrednosti deponovanog arsena po generacijama, utvrđeno je da su vrednosti u svim generacijama grupe B bile dva puta veće nego u svim generacijama grupe A.

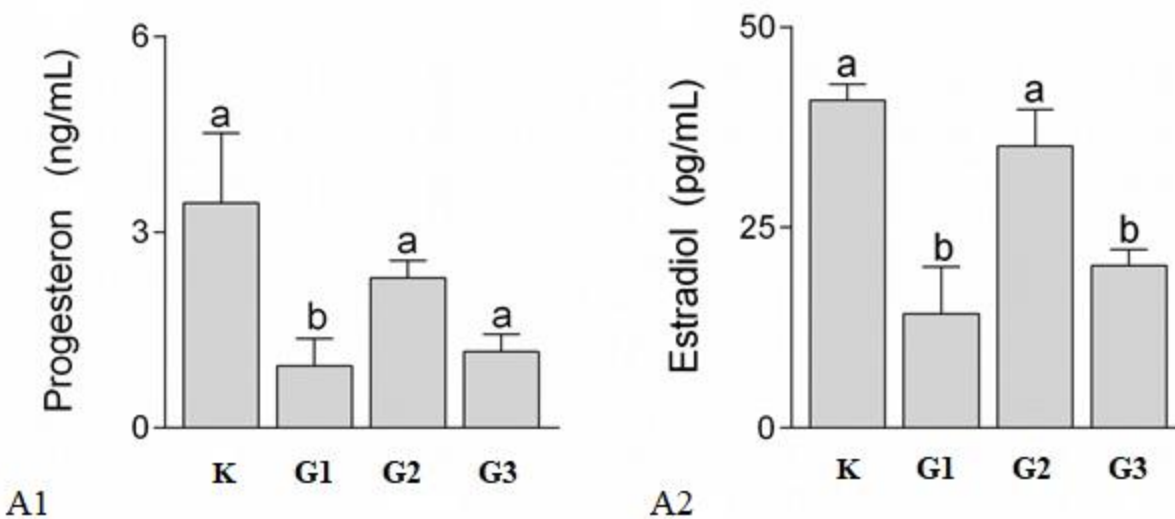
Tabela 6. Količina ukupnog deponovanog arsena u mozgu ženki miševa u tri uzastopne generacije (G1, G2 i G3), u eksperimentalnim grupama A i B u poređenju sa kontrolnom vrednošću. Rezultati količine ukupnog arsena u organima miševa ($\mu\text{g/kg}$ mozga) su mereni na osnovu pula, koji predstavlja uzorak organa sakupljen od 5 miševa.

Generacija ♀(Mozak)	Kontrolna grupa	A eksperimentalna grupa (As 10.6 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)	B ekperimentalna grupa (As 106 mg/L) količina ukupnog As ($\mu\text{g/kg}$)
G ₁	4.75	111.34	223.06
G ₂	4.75	118.11	319.96
G ₃	4.75	163.64	328.60

4.3. Analiza ženskih reproduktivnih hormona (estrogen, progesteron)

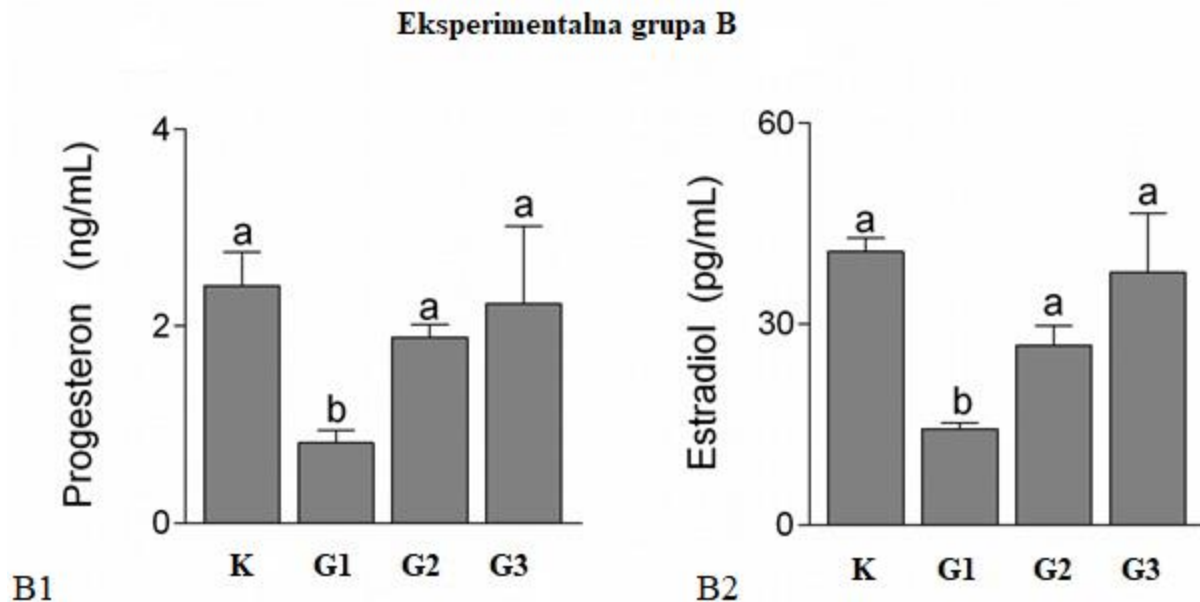
U prvoj eksperimentalnoj grupi A izloženoj arsenu(III) u koncentraciji od 10,6 mg/L u tri uzastopne generacije analizirani su nivoi progesterona i estradiola. Rezultati su pokazali da je nivo progesterona statistički značajno opao u prvoj generaciji miševa, dok je u drugoj i trećoj generaciji smanjen nivo progesterona, međutim ove vrednosti se nisu statistički razlikovale od kontrolne (Grafik 3 A1). Nivoi estradiola su se smanjili u serumu miševa prve i treće generacije u koncentraciji arsena od 10,6 mg/L. S druge strane, nivo estradiola nije značajno promenjen u drugoj generaciji u poređenju sa kontrolnom grupom (Grafik 3 A2).

Eksperimentalna grupa A



Grafik 3. (A1 i A2). Koncentracije progesterona i estradiola u serumu ženki miševa prve eksperimentalne grupe (A) izloženih arsenu(III) u koncentraciji od 10,6 mg/L tokom tri uzastopne generacije (G1, G2, G3). Serum je sakupljen i od kontrolnih (K) i od miševa tretiranih arsenom(III), žrtvovanih u fazi diestrusa, a nivoi progesterona i estradiola su određeni ELISA testom. Kolone predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM od 10 životinja po grupi. Statistička značajnost je predstavljena slovima (a, b) ako je $p < 0,05$. a) statistički nije značajan rezultat, b) statistički značajan rezultat.

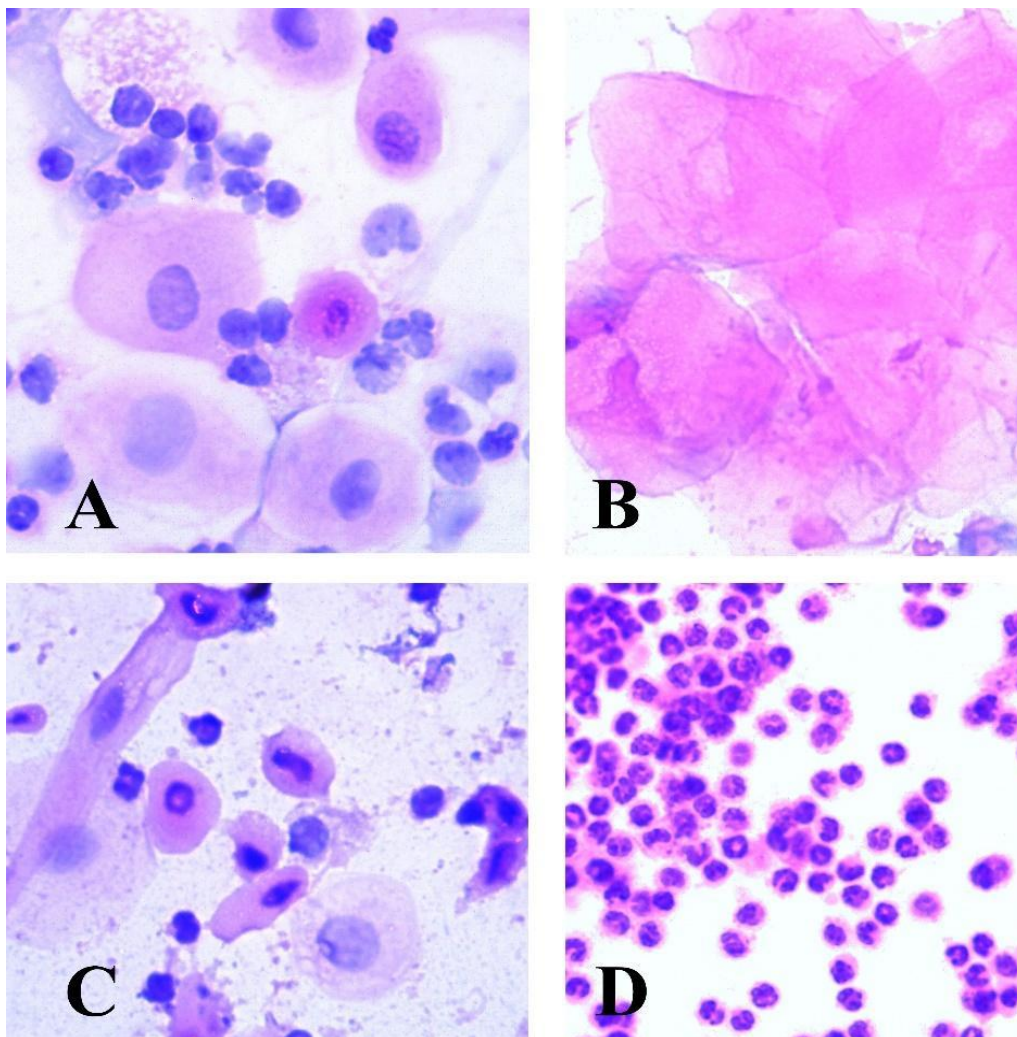
U drugoj eksperimentalnoj grupi B, izloženoj koncentraciji arsena(III) od 106 mg/L u tri uzastopne generacije, mereni su nivoi progesterona i estradiola. Rezultati su pokazali da su se nivoi progesterona i estradiola statistički značajno smanjili u prvoj generaciji (Grafik 4 B1 i 4 B2). Pored toga, rezultati su pokazali da su se nivoi progesterona i estradiola u drugoj i trećoj generaciji povećali u poređenju sa prvom generacijom ženki miševa (Grafik 4 B1 i 4 B2).



Grafik 4. (B1 i B2). Koncentracije progesterona i estradiola u serumu ženki miševa izloženih uticaju arsena(III) u koncentraciji od 106 mg/L tokom tri uzastopne generacije (G1, G2,G3). Serum je sakupljen od kontrolnih (K) i od miševa tretiranih arsenom(III), žrtvovanih u fazi diestrusa, a nivoi progesterona i estradiola su određeni ELISA testom. Kolone predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM od 10 životinja po grupi. Statistička značajnost je predstavljena slovima (a, b) ako je $p < 0,05$. a) statistički nije značajan rezultat, b) statistički značajan rezultat.

4.4. Estrusni ciklus ženki miša

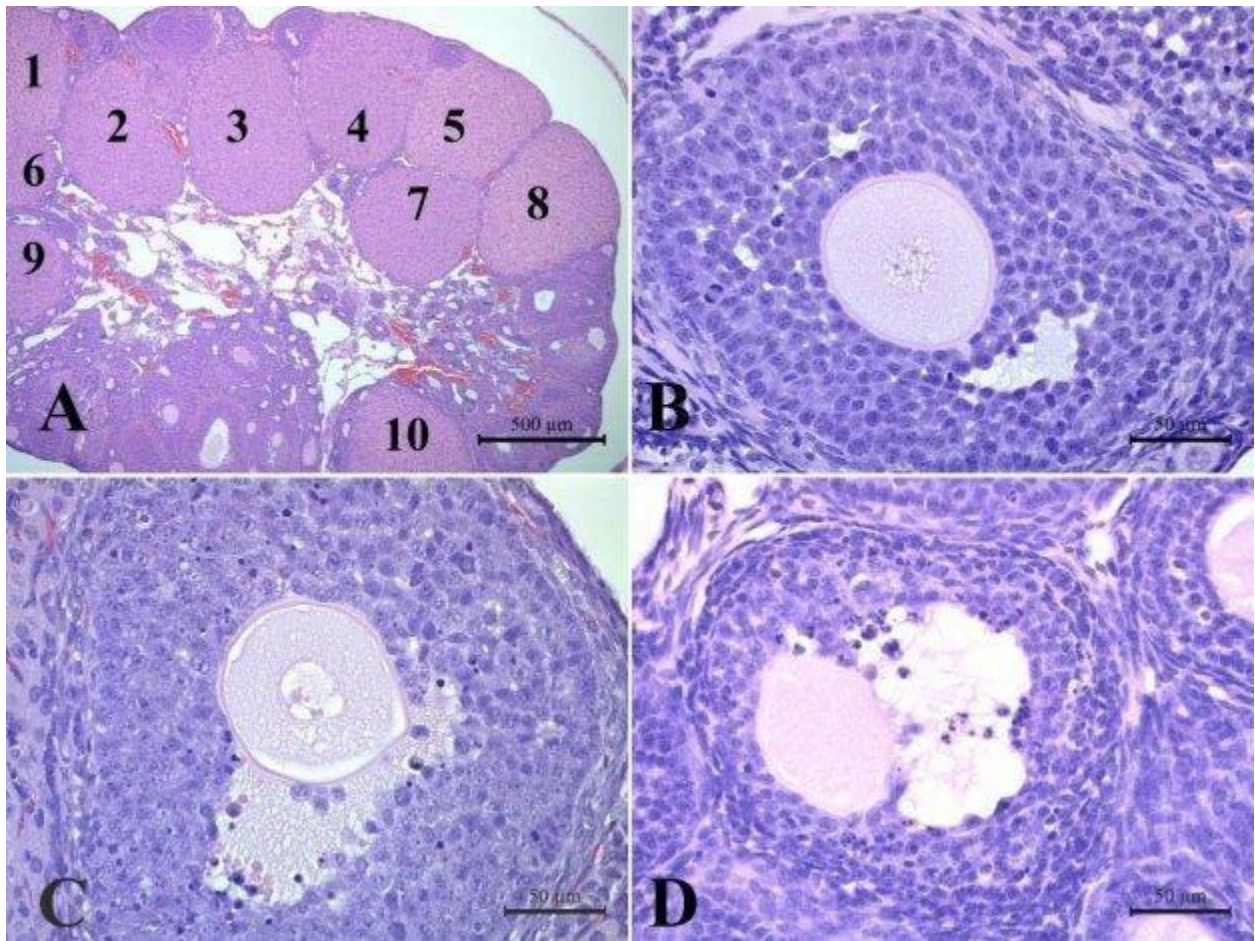
Analizom vaginalnog ispirka ženki miševa kontrolne i eksperimentalnih grupa uočen je estrusni ciklus kod svih ženki, koji se sastoji od četiri faze: *proestrusa*, *estrusa*, *metestrusa* i *diestrusa*. Proestrus se karakteriše dominantnim prisustvom epitelnih ćelija sa jedrom. Estrus sadrži orožale (bezjedarne) epitelne ćelije. Metestrus sadrži kombinaciju orožalih epitelnih ćelija i neutrofilnih granulocita. Diestrus se karakteriše kombinacijom neutrofilnih granulocita i epitelnih ćelija sa jedrom (Slika 17). Analizom estrusnih ciklusa ženki miševa izloženih uticaju arsena(III) u primenjenim koncentracijama nisu uočene neregularnosti u fazama estrusnog ciklusa, sve faze su bile prisutne sa karakterističnom morfologijom, između kontrolne i eksperimentalnih grupa tokom sve tri uzastopne generacije.



Slika 17. Prikaz reprezentativnih faza estrusnog ciklusa ženki miševa a) *proestrus* - uočava se dominantno prisustvo epitelnih ćelija sa jedrom (Gimza, x 400); b) *estrus* - uočava se prisustvo orožalih (bezjedarnih) ćelija (Gimza, x 400); c) *metestrus* - uočava se prisustvo neutrofilnih granulocita i orožalih (bezjedarnih) ćelija (Gimza, x 400); d) *diestrus* - uočava se prisustvo neutrofilnih granulocita i epitelnih ćelija sa jedrom.

4.5. Analiza broja žutih tela i ovarijalnih folikula miša

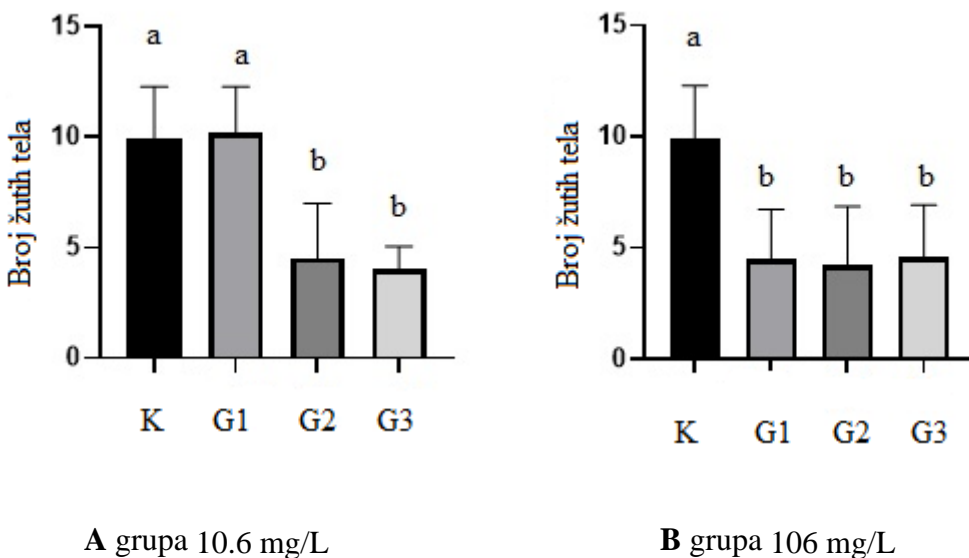
U cilju analize histoloških struktura ovarijuma, bojenih hematoksilin-eozinom (H&E), kako kontrolnih grupa, tako i grupa životinja tretiranih različitim koncentracijama arsena, utvrđivan je broj folikula u različitim stupnjevima razvića. Rezultati analize pokazivali su vidljive promene u histološkoj strukturi jajnika tretiranih grupa. Uočen je veći broj folikula sa degeneracijom. U folikulima su registrovane degenerišuće oocite i apoptotične granulosa ćelije. Promene su najizraženije u granuloznim ćelijama antralnih folikula (Slika 18).



Slika 18. Morfometrijska analiza strukture jajnika (A) *corpora lutea*. Bar = 500 µm; (B) očuvani rani antralni folikul. Bar = 50 µm; (C, D) degenerisane oocyte u folikulima. Bar = 50 µm (H/E).

4.5.1. Broj žutih tela

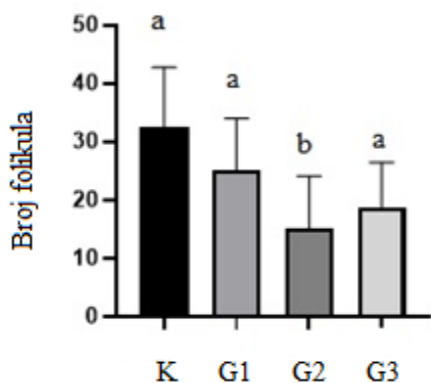
Rezultati morfometrijske analize su pokazali da se prosečan broj žutih tela u eksperimentalnoj grupi (A) nije smanjio u G1 generaciji, dok je u G2 i G3 došlo do statistički značajnog smanjenja u poređenju sa kontrolom. U eksperimentalnoj grupi (B) rezultati su pokazali statistički značajno smanjenje broja žutih tela, ali za razliku od A grupe, smanjenje je ujednačeno bez statistički značajnih razlika u broja žutih tela između generacija (Grafik 5).



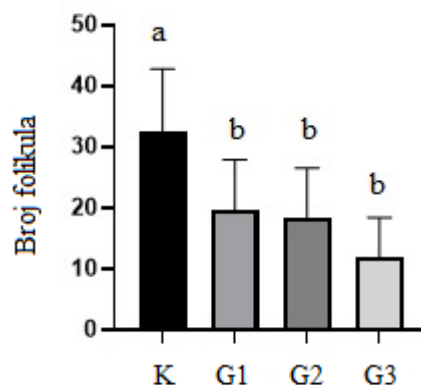
Grafik 5. Prosečan broj žutih tela kroz tri uzastopne generacije (G1, G2, G3) tretiranih koncentracijama arsena(III) od 10,6 mg/L (A grupa) i 106 mg/L (B grupa). Stubići predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM broja žutih tela na osnovu 5 ženki miševa po grupi. Različita slova (a, b) ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između odgovarajuće kontrole (a) i grupe miševa tretiranih arsenom (b).

4.5.2. Ukupan broj folikula

U grupi A je prosečan broj folikula u generacijama G1 i G3 smanjen u odnosu na kontrolnu grupu, dok je broj folikula u generaciji G2 značajno smanjen. Rezultati prosečnog broja folikula u B grupi pokazali su postepeno smanjenje iz generacije u generaciju, ali je uočeno da je broj folikula u G1 generaciji značajno manji od broja folikula u G1 generaciji grupe A (Grafik 6).



A grupa 10.6 mg/L

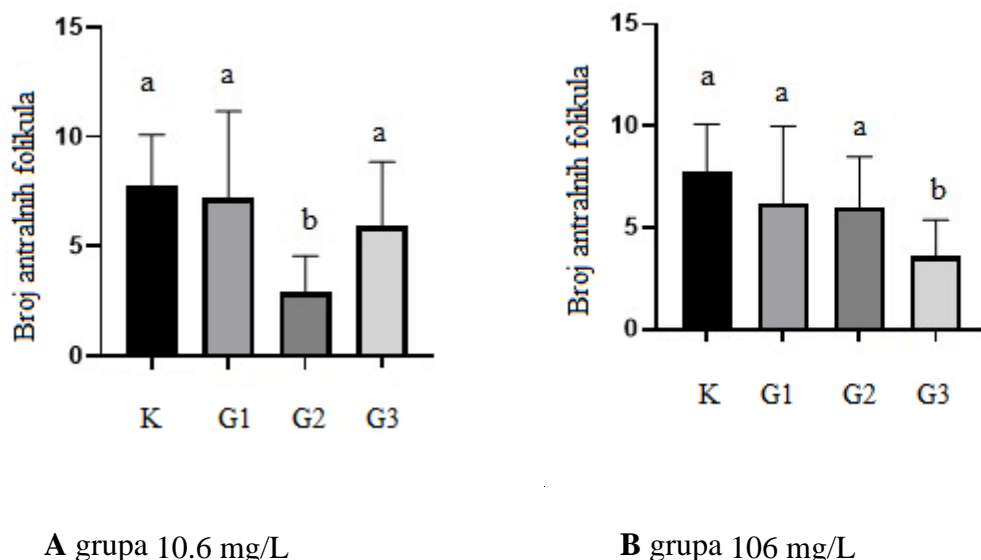


B grupa 106 mg/L

Grafik 6. Prosečan broj ovarijalnih folikula u tri uzastopne generacije (G1, G2, G3) tretiranih sa koncentracijama arsena(III) od 10,6 mg/L (A grupa) i 106 mg/L (B grupa). Stubići predstavljaju srednje vrednosti \pm SEM broja ovarijalnih folikula na osnovu 5 ovarijuma miša po grupi. Različita slova (a, b) ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između odgovarajuće kontrole (a) i grupa miševa tretiranih arsenom (b).

4.5.3. Broj antralnih folikula

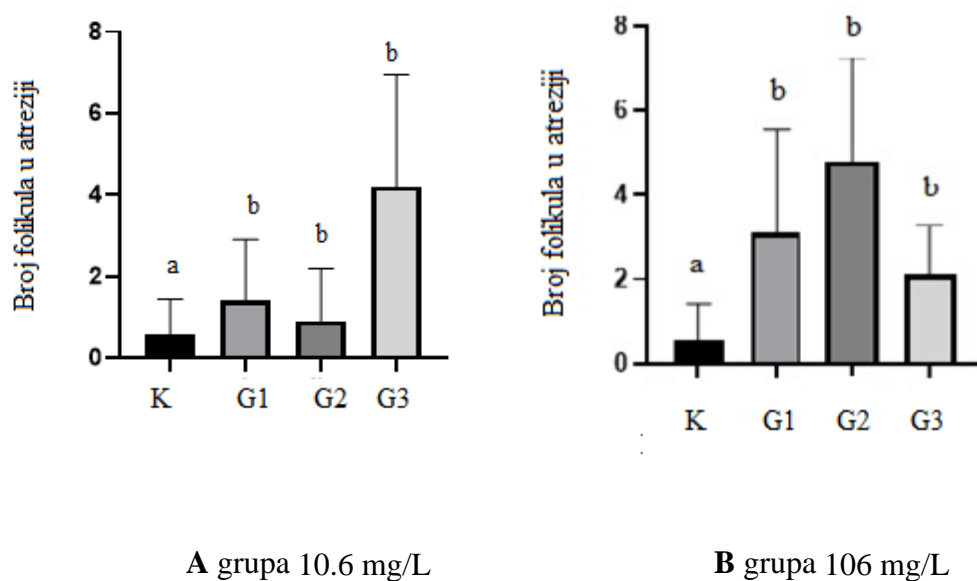
Rezultati prosečnog broja antralnih folikula u A grupi pokazali su smanjenje u sve tri generacije u odnosu na kontrolnu, što je posebno izraženo u G2 generaciji. Prosečan broj antralnih folikula u B grupi postepeno se smanjivao iz generacije u generaciju, broj antralnih folikula u G3 generaciji je značajno smanjen. Poređenjem G2 između eksperimentalnih grupa A i B, uočava se da je broj antralnih folikula u G2 eksperimentalne grupe B veći u odnosu na eksperimentalnu grupu A (Grafik 7).



Grafik 7. Prosečan broj antralnih folikula jajnika tokom tri uzastopne generacije (G1, G2, G3) tretiranih koncentracijama arsena(III) od 10,6 mg/L (A grupa) i 106 mg/L (B grupa). Stubići predstavljaju srednju vrednost \pm SEM broja antralnih folikula jajnika na osnovu 5 jajnika miša po grupi. Različita slova (a, b) ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između odgovarajuće kontrole (a) i grupa miševa tretiranih arsenom (b).

4.5.4. Broj atretičnih folikula

U eksperimentalnoj grupi A zabeležen je rast prosečnog broja atretičnih folikula. Najveća vrednost prosečnog broja atretičnih folikula je kod miševa treće generacije G3, rezultat je statistički značajan, najmanja vrednost zabeležena je u G2. U eksperimentalnoj grupi B porast vrednosti prosečnog broja atretičnih folikula beleži se u sve tri generacije miševa. Rezultati su statistički značajni. Najveća vrednost zabeležena je u G2 a najmanja vrednost u G3 (Grafik 8).



Grafik 8. Prosečan broj atretičnih folikula tokom tri uzastopne generacije (G1, G2, G3) miševa tretiranih koncentracijama arsena(III) od 10,6 mg/L (A grupa) i 106 mg/L (B grupa). Kolone pokazuju srednje vrednosti \pm SEM broja atretičnih folikula jajnika na osnovu 5 jajnika miša po grupi. Oznake (a, b) ukazuju na statistički značajne razlike ($p < 0,05$) između odgovarajuće kontrole (a) i grupe miševa tretiranih arsenom (b).

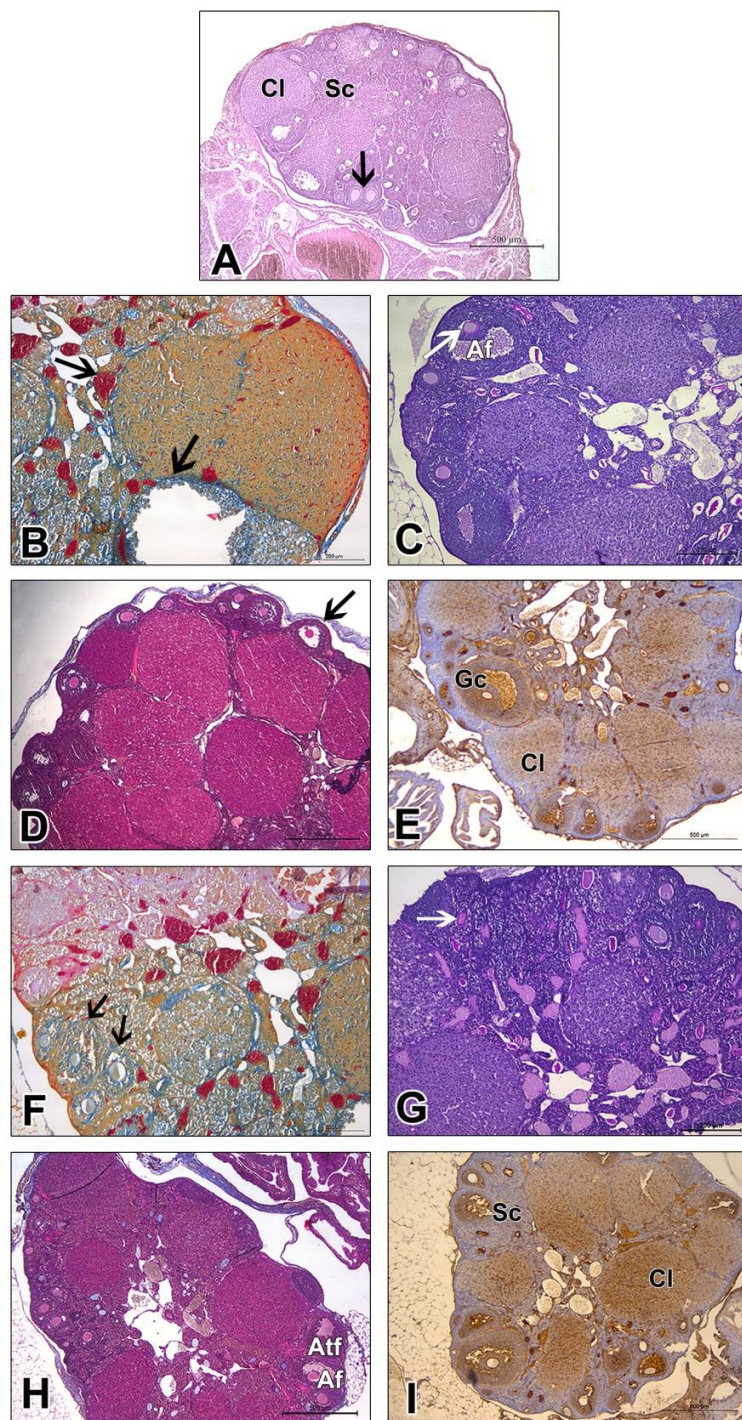
4.6. Histološke analize

4.6.1. Histološke analize jajnika posle primene specijalnih bojenja

U prvoj generaciji (G1) kontrolnu grupu karakteriše očuvana struktura površinskog epitela jajnika, ispod koga se u kori uočavaju brojni folikuli u različitim fazama razvoja, brojna žuta tela i vezivnotkivna stroma (Slika 19A). Na preparatima jajnika prve eksperimentalne grupe (A) koji su obojeni azanom, vezivna vlakna se uočavaju oko *theca* ćelija i žutih tela, kao i u stromi, naročito oko velikih krvnih sudova (Slika 19B). PAS pozitivna reakcija je bila najizraženija u *zona pellucida* i antralnim folikulima (Slika 19C). Na preparatima obojenim po Massonu (Slika 19D) primećeno je plavo bojenje ekstracelularnog matriksa i kolagenih vlakana, dok je citoplazma oocita, folikularnih ćelija i ćelija žutog tela obojena različitim nijansama ružičaste boje.

Ekspresija estrogenih receptora je prisutna u žutom telu, ali nije istog intenziteta u svim ćelijama. Pozitivna reakcija je takođe prisutna i u granuloza ćelijama antralnih folikula, dok u ćelijama strome i intersticijalnim žlezdama nema pozitivnosti (Slika 19E).

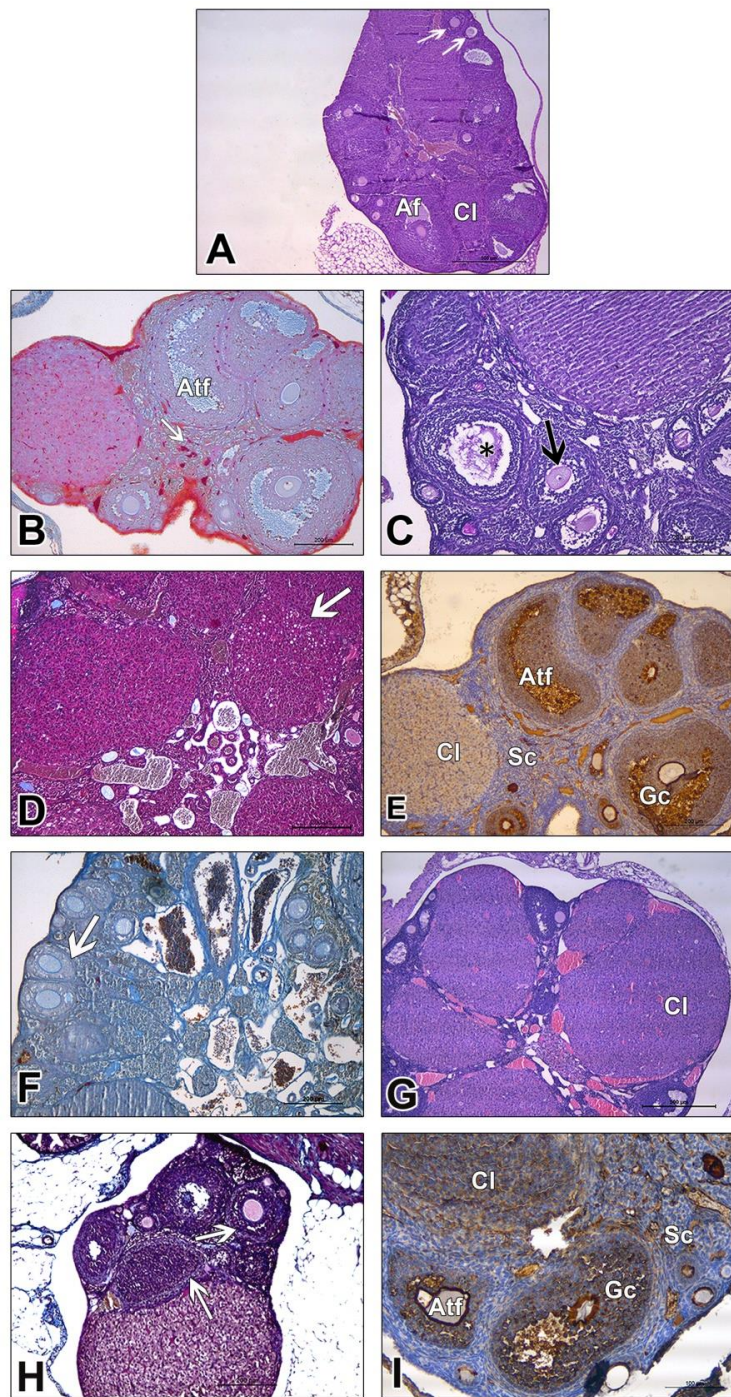
U prvoj generaciji (G1) druge eksperimentalne grupe (B), bojenje Azanom je pokazalo kolagena vlakna u *theca folliculi* kao i u stromi jajnika (Slika 19F). Intenzivna PAS pozitivna reakcija prisutna je u *zona pellucida*, od faze sekundarnog folikula. *Zona pellucida* je uočljiva i u atretičnim folikulima (Slika 19G). Bojenje po Massonu je pokazalo da nema promena u zastupljenosti kolagenih vlakana u *theca folliculi* i stromi u odnosu na A grupu. Ćelije zone granuloze antralnih i atretičnih folikula su intenzivno ružičasto obojene (Slika 19H). Estrogeni receptori u B grupi pokazali su veću ekspresiju u *corpora lutea*, kao i u ćelijama zone granuloze u blizini *oocita* nego u A grupi. U ćelijama strome nije prisutna imunopozitivnost estrogenih receptora (Slika 19I).



Slika 19. A) Presek jajnika miša kontrolne grupe H/E - žuto telo (Cl), stromalne ćelije (Sc), folikuli (strelica). Preseci jajnika miša G1 generacije A grupe obojeni specijalnim metodama bojenja: B) Azan - krvni sud i vezivna vlakna (strelice); C) PAS - antralni folikul (Af), zona pellucida (strelica); D) Bojenje po Massonu - vezivna vlakna (strelica); E) Imunohistohemijsko bojenje estrogenih receptora - žuto telo (Cl), ćelije granuloze (Gc). Bar = A, D, E (500 μm); B, C (200 μm). Preseci jajnika miša G1 generacije B grupe obojeni specijalnim metodama bojenja: F) Azan - theca folliculi (strelice); G) PAS - zona pellucida (strelica); H) Bojenje po Massonu - antralni folikul (Af), atretični folikul (Atf). I) Imunohistohemijsko bojenje estrogenih receptora - žuto telo (Cl), stromalne ćelije (Sc). Bar = F, G (200 μm); H, I (500 μm).

U drugoj generaciji (G2) ne postoje bitne razlike u strukturi jajnika kontrolne grupe u odnosu na kontrolu G1 generacije (Slika 20A). U G2 generaciji, grupa A, ne uočavaju se razlike u prisustvu i distribuciji analiziranih komponenti jajnika (Slika 20B-20D). Zapažena je imunopozitivnost u ćelijama žutog tela po sličnom obrascu kao i u prethodnim grupama, dok su ćelije zone granulose antralnih folikula pokazale izrazitu imunopozitivnost. U ovoj generaciji je primećena i blaga imunopozitivnost površinskog epitela (Slika 20E).

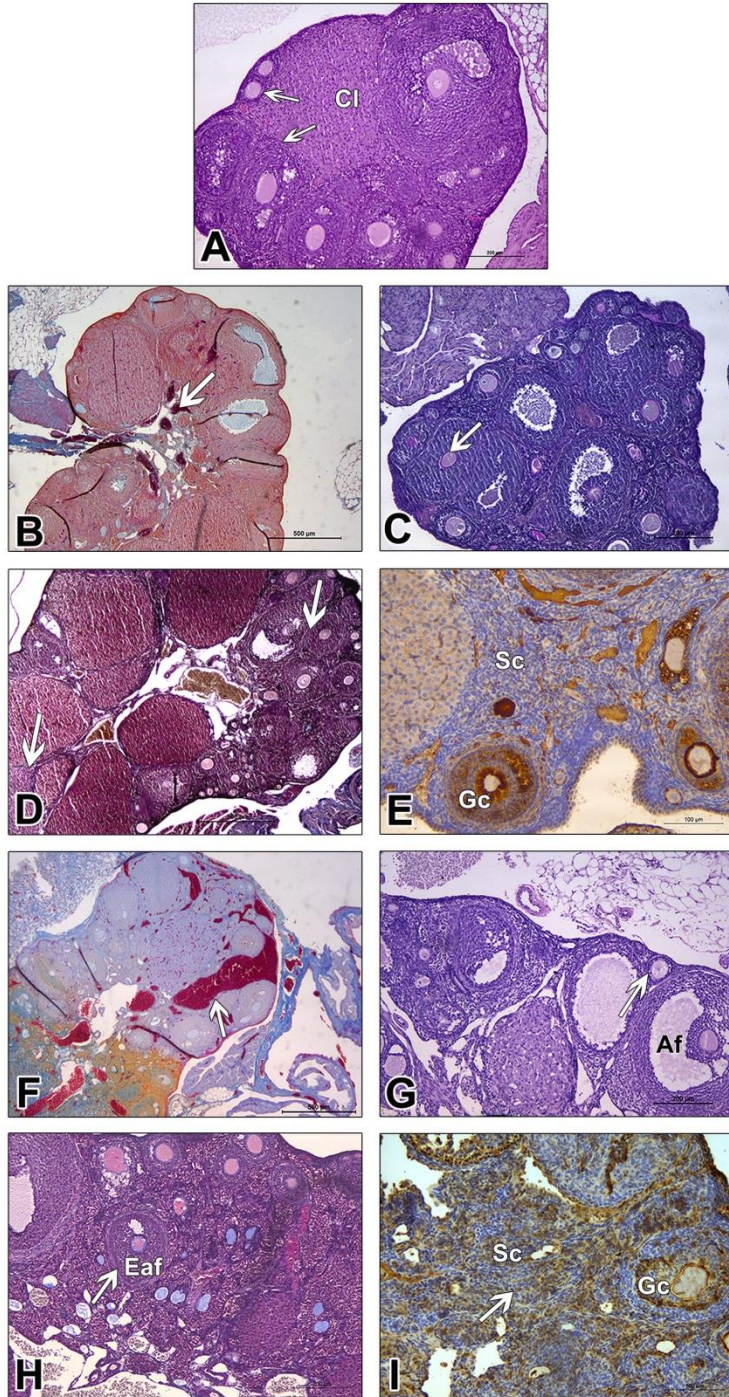
U drugoj generaciji (G2) druge eksperimentalne grupe (B) na presecima obojenim Azanom zapažaju se snopovi kolagenih vlakna oko folikula (Slika 20F). Takođe, vezivna vlakna su vidljiva i oko intersticijalnih žlezda i proširenih krvnih sudova. Ne uočavaju se značajne razlike u analiziranim strukturama jajnika (Slika 20G-H). Ekspresija estrogenih receptora je uočljiva u žutim telima i granulosa ćelijama očuvanih, ali i atretičnih folikula. U stromi, u pojedinim ćelijama intersticijalnih žlezda, uočava se specifična imunopozitivnost estrogenih receptora (Slika 20I).



Slika 20. A) Presek jajnika miša kontrolne grupe H/E - žuto telo (Cl), antralni folikul (Af), brojni folikuli u različitim fazama razvoja (strelice). Preseci jajnika miša G2 generacije A grupe obojeni specijalnim metodama bojenja: B) Azan - atretični folikul (Atf), krvni sud (strelica); C) PAS - antrum (zvezdica), *zona pellucida* (strelica); D) Bojenje po Massonu - kolagena vlakna (strelica). E) Imunohistohemijsko bojenje estrogenih receptora - žuto telo (Cl), stromalne ćelije (Sc), ćelije granuloze (Gs), atretični folikul (Atf). Bar = A (500 μ m); B-E (200 μ m). Preseci jajnika miša G2 generacije B grupe obojeni specijalnim metodama bojenja: F) Azan - kolagena vlakna (strelica); G) PAS - žuto telo (Cl); H) Bojenje po Massonu - vezivna vlakna (strelice). I) Imunohistohemijsko bojenje estrogenih receptora - žuto telo (Cl), stromalne ćelije (Sc), ćelije granuloze (Gs), atretični folikul (Atf). Bar = F, H (200 μ m); G (500 μ m); I (100 μ m).

U trećoj generaciji (G3) jajnici kontrolne grupe imaju jasno vidljive folikule u različitim fazama razvoja i žuta tela (Slika 21A). Histochemijska bojenja jajnika prve eksperimentalne grupe (A) nisu ukazala na promenu strukture kore i srži u jajnicima (Slika 21B-D). Ekspresija estrogena je pokazala pozitivnu reakciju u ćelijama žutog tela i intenzivniji, ali neravnomerno zastupljen pozitivan odgovor u ćelijama zone granuloze folikula. Pozitivna reakcija je takođe primećena u površinskom epitelu jajnika (Slika 21E).

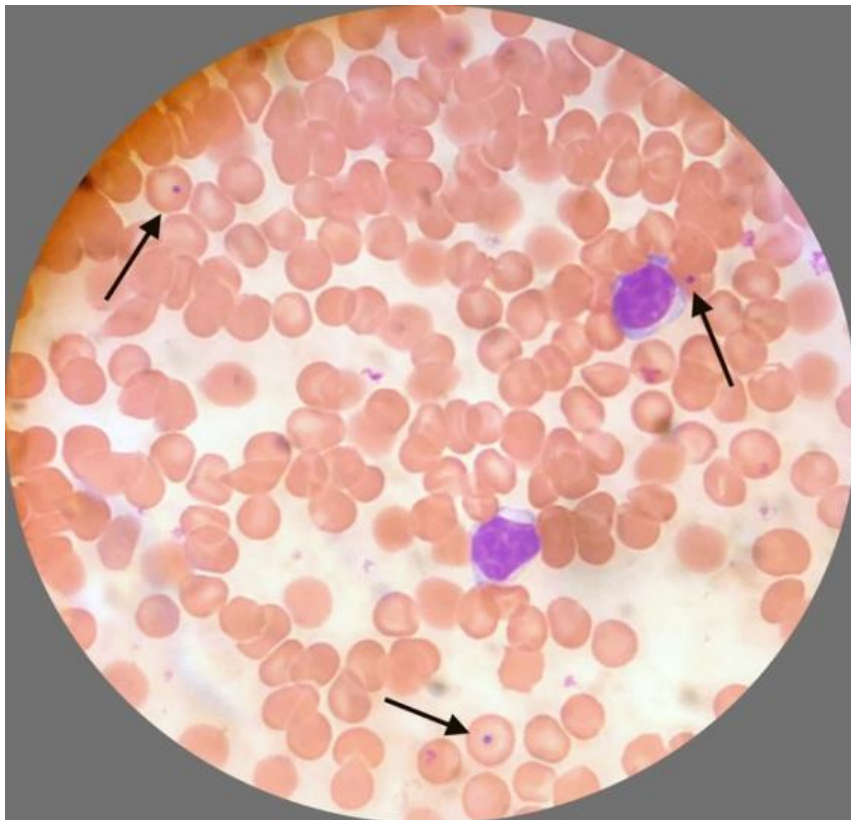
U trećoj generaciji (G3) druge eksperimentalne grupe (B) bojenje Azanom je pokazalo da su krvni sudovi i u kori i u srži izrazito prošireni (Slika 21F). Zastupljenost i distribucija PAS pozitivnih struktura se ne razlikuje u odnosu na prethodne grupe (Slika 21G). Na preparatima obojenim po Massonu uočavaju se izražena vezivna vlakna u *theca folliculli* i veliki broj intersticijalnih žlezda (Slika 21H). Jaka imunopozitivnost estrogenih receptora se zapaža u pojedinim granulozna ćelijama, dok je slabije izražena u žutim telima. Veći broj ćelija intersticijalnih žlezda pokazuje pozitivnost, što nije bila karakteristika jajnika ostalih kontrolnih i tretiranih grupa životinja (Slika 21I).



Slika 21. A) Presek jajnika miša kontrolne grupe H/E - žuto telo (Cl), folikuli u različitim fazama razvoja (strelice). Preseci jajnika miša G3 generacije A grupe obojeni specijalnim metodama bojenja: B) Azan – krvni sud (strelica); C) PAS – *zona pellucida* (strelica); D) Bojenje po Massonu – vezivna vlakna (strelice). E) Imunohistohemijsko bojenje estrogenih receptora - stromalne ćelije (Sc), ćelije granuloze (Gs). Bar = A, C (200 μ m); B, D (500 μ m); E (100 μ m). Preseci jajnika miša G3 generacije B grupe obojeni specijalnim metodama bojenja: F) Azan – krvni sud (strelica); G) PAS – *zona pellucida* (strelica), antralni folikul (Af); H) Bojenje po Massonu - rani antralni folikul (Eaf), *theca folliculli* (strelica). I) Imunohistohemijsko bojenje estrogenih receptora - stromalne ćelije (Sc), ćelije zone granuloze (Gs), ćelije u apoptozu (strelica). Bar = F (500 μ m); G, H (200 μ m); I (100 μ m).

4.7. Mikronukleus test

Rezultati testa pokazuju brojčane vrednosti mikronukleusa, vidljivim u svakom prikupljenom uzorku periferne krvi miševa. Mikronukleusi su brojani na svetlosnom mikroskopu, nakon odgovarajućeg bojenja (Slika 22).



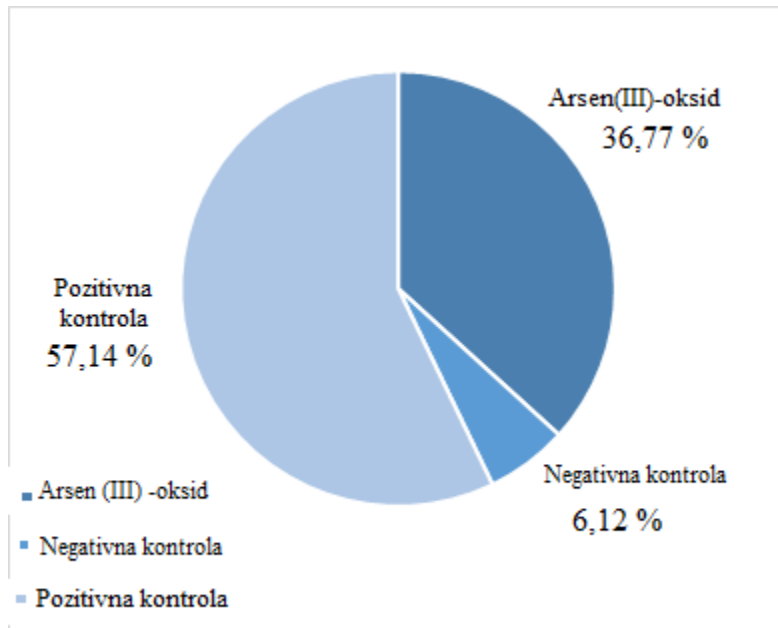
Slika 22. *Howell-Jolly*-jeva telašca, mikronukleusi na svetlosnoj mikroskopiji

Tabela 7. Brojčane vrednosti mikronukleusa (MN) po grupama, koncentracijama i vremenu uzorkovanja.

Tretman	Koncentracija	Vreme uzorkovanja	Redni broj životinje	Broj MN	Broj MN u (%) u odnosu na broj eritrocita
Arsen(III)	1 x 1 ml 10,6 mg/l	24h	1.	8	2,3
		48h	2.	6	1,72
			3.	5	1,45
	3 x 1ml 10,6 mg/l	24h	4.	7	2,01
			5.	10	2,87
				<i>srednja vrednost MN</i> $X^2 = 7,2$	
				SD = 1,92	
Kontrola	1 x 1ml NaCl 0.9%	24h	6.	1	0,29
			7.	0	0
			8.	2	0,57
			9.	1	0,29
			10.	2	0,29
				<i>srednja vrednost MN</i> $X^2 = 1,2$	
				SD = 0,84	
Pozitivna kontrola (Benzidin)	1 x 1ml Benzidin 100mg u 30ml NaCl 0.9%	18h	11.	7	2,01
			12.	5	1,45
			13.	8	2,3
		48h	14.	10	2,87
			15.	14	4,02
			16.	12	3,44
				<i>srednja vrednost MN</i> $X^2 = 9,33$	
				SD = 3,33	

Statističkom obradom dobijenih podataka, vidi se da je broj MN kod životinja tretiranih arsenom(III), statistički značajan, i znatno je povećan u odnosu na broj MN kod životinja negativne kontrole ($X^2 = 12,2807$, $p = 0.000458$ iz čega sledi da je $p < 0.05$). Broj mikronukleusa iz grupe arsen(III) i MN pozitivne kontrole statistički nije značajan ($X^2 = 2,999$, $p = 0,138019$ iz čega sledi da je $p > 0.05$). Broj MN iz pozitivne kontrole je takođe statistički značajan jer ima veći broj MN u odnosu na broj MN iz negativne ($X^2 = 24,0758$, $p = 0.00001$ iz čega sledi da je $p < 0.05$).

Od ukupno 98 uočenih MN u istraživanju - 36 MN (36,77%) je nađeno kod miševa tretiranih arsenom(III), 6 MN (6,12%) kod negativne kontrolne grupe i 56 MN (57,14%) kod životinja pozitivne kontrole. Broj mikronukleusa izraženih u procentima su prikazani na (Grafik 9).



Grafik 9. Procentualni prikaz broja mikronukleusa

5. DISKUSIJA

Prisustvo arsena, ekološkog toksina u podzemnim vodama, predstavlja potencijalni, veliki zdravstveni problem. Duže izlaganje, malim količinama dovodi do kumulativnog efekta, koji može izazvati simptome raznih bolesti, uključujući hipertenziju, hroničnu bolest pluća, pigmentaciju, keratozu, hromozomske aberacije i povećanje incidencije mikronukleusa (Guha Mazumder i Dasgupta, 2011). Do sada u literaturi nije bilo podataka o dugoročnim efektima izloženosti arsenu kod miševa tokom više uzastopnih generacija, tako da rezultati ove studije pružaju izuzetnu važnost u sagledavanju ove problematike.

Koncentracije arsena korišćene u ovom eksperimentu nisu izazivale simptome akutnog trovanja, ženke su ostajale gravidne u obe ispitivane grupe, ali su rezultati broja okoćenih mladunaca po ženki u leglu ukazali da arsen remeti reproduktivne funkcije, jer je došlo do pada broja mladunaca, mada nije bilo mrtvo okoćenih mladunaca. Na osnovu smanjenog broja mladunaca u periodu od tri generacije, smatramo da postoji funkcionalni nedostatak u reproduktivnoj funkciji. U prvoj generaciji prve eksperimentalne grupe, bilo je statistički manje mladih nego u kontrolnoj grupi. U eksperimentalnoj grupi sa 10 puta jačom koncentracijom se graviditet javljao kasnije u odnosu na prvu eksperimentalnu grupu. Slične studije koje su proučavale toksičnost kadmijuma, olova ili žive na jajnike, pokazale su promene u vidu smanjenog rasta folikula, folikularne atrezije, degeneracije žutog tela, kao i promene u reproduktivnom procesu (Ghersevich i drugi, 1994a, 1994b; Hopenhayn i drugi, 2006).

Merenja ukupnog sadržaja arsena kod jednodnevnih miševa u obe eksperimentalne grupe, pokazala su da se u organizmu akumuliraju velike količine arsena. U obe eksperimentalne grupe, deponovana ukupna količina arsena se iz generacije u generaciju postepeno povećavala, ali su u drugoj ogleđnoj grupi uočene značajne promene, koje su se manifestovale naročito promenom boje kože i noktiju. Rezultati deponovanja ukupnog arsena u organima ženki pokazali su da je došlo do akumulacije velike količine arsena najviše u bubrezima, zatim jetri, jajnicima, i mozgu. Posmatrajući vrednosti deponovanog arsena iz generacije u generaciju u okviru eksperimentalnih grupa, uočeno je da su analizirani organi životinja trećih generacija, imali najveću količinu deponovanog arsena, što potvrđuje kumulativan efekat arsena tokom hroničnog izlaganja.

Slične studije na miševima su pokazale da izloženost arsenu tokom trudnoće dovodi do nastanka raka kod potomaka u adultnom periodu (Chatterjee i Chateerji, 2010). U mnogim radovima je pokazano da arsen može proći kroz placentu do fetusa u razvoju, a prenatalna izloženost neorganskom arsenu je rezultirala akumulacijom arsena u fetusima uzrokujući razne poremećaje (Rodriguez i drugi, 2002; Miyazaki i drugi, 2005). Tokom trudnoće, visoka izloženost arsenu u vodi za piće izazivala je komplikacije u trudnoći, uključujući gubitak fetusa i prevremeni porođaj (Chakraborti i drugi, 2003), a izlaganje arsenu pri niskim koncentracijama uticalo je na rast materice i placente, što je uzrokovalo smanjenja porođajne težine mladunca (Hopenhayn i drugi, 2006; Rahman i drugi, 2009). Poznato je da se arsen u većim koncentracijama deponuje u jetri, bubrezima, plućima i koži, manje u mišićima i kostima, u kosi i noktima može se otkriti tek posle hroničnog izlaganja. Negativni efekti arsena se ogledaju i u inaktivaciji enzima, oštećenju jetre, dijabetesu, ishemiji, hipertenziji, perifernoj neuropatiji i raku kože (Hughes i drugi, 2002).

Rezultati analize ženskih polnih hormona su pokazali da su primenjene koncentracije arsena dovele do snižavanja nivoa reproduktivnih hormona kod ženki miševa, koje se nije odrazilo na plodnost, već je narušila reproduktivnu sposobnost, što je za posledicu imalo smanjen broj potomaka. U drugoj eksperimentalnoj grupi, rezultati druge i treće generacije pokazali su da je nivo hormona povećan u odnosu na prvu generaciju, i da se vratio na kontrolni nivo u trećoj generaciji, ovaj podatak ukazuje da organizam ima svoje mehanizme adaptacije u stresnim situacijama. Rezultati možda nisu iznenađujući za stručnjake u oblasti toksikologije arsena, ali

navodi se pitanje, zašto bi ovakvi rezultati mogli biti verodostojni i prihvatljivi uprkos nelogičnim efektima dve koncentracije arsena koje su bile primenjene. Objašnjenje razlike između linearnog odgovora na dozu i hormetičkog (u obliku slova U) dozno-zavisnog odgovora, je ključno za razumevanje kako supstanca kao što je arsen utiče na biološke sisteme. Linearni odgovori pokazuju direktno i proporcionalno povećanje štete ili efekta sa dozom, dok hormetički odgovori pokazuju obrazac u obliku slova U, gde male doze mogu imati štetan ili stimulativni efekat, umerene doze povećavaju odgovor, a visoke doze dovode do smanjenja odgovora. Pošto je naša studija koristila samo dve doze arsena, nedostatak sistemskog testiranja više doza implicira ograničeno razumevanje skupa podataka o potpunom odnosu doza-odgovor za izloženost arsenu. Vrednosti dobijene iz naše studije verovatno predstavljaju samo dve relevantne tačke na krivoj doza-odgovor u obliku slova U – jednu pri niskoj dozi i jednu pri visokoj dozi. Međutim, da bi se u potpunosti razumeo odnos između doze arsena i bioloških efekata koje izaziva, potrebne su dalje detaljne studije o dozi i odgovoru.

Istraživanjem efekta primenjenih doza arsena na estrusni ciklus, pokazano je da postoji prisustvo svih faza estrusnog ciklusa, sa karakterističnom morfologijom. Kod prve eksperimentalne grupe promene u vidu redosleda i trajanja pojedinačnih faza estrusnog ciklusa nisu uočene u odnosu na kontrolnu grupu, dok je kod druge eksperimentalne grupe uočeno duže trajanje diestrusne faze u odnosu na prvu eksperimentalnu grupu i kontrolu. Ova zapažanja sugerišu da bi nizak nivo estradiola u plazmi mogao biti uzrok duže diestrusne faze.

Analize broja žutih tela i ovarijalnih folikula su pokazale da arsen izaziva strukturne promene u jajnicima. Između dve eksperimentalne grupe u svakoj generaciji identifikovane su značajne razlike u prosečnom broju žutih tela i folikula jajnika. Prosečan broj žutih tela bio je smanjen u drugoj i trećoj generaciji, dok je prosečan broj antralnih folikula u drugoj generaciji bio značajno smanjen u prvoj eksperimentalnoj grupi, za razliku od druge grupe, gde je primećeno postepeno smanjenje iz generacije u generaciju. U obe eksperimentalne grupe broj atretičnih folikula bio je najveći u drugoj, a najmanji u trećoj generaciji. Može se zaključiti da niske doze arsena ne izazivaju pravilnost u strukturnim promenama između generacija, dok izloženost većim dozama dovodi do postepenog smanjenja prosečnog broja pojedinih struktura iz generacije u generaciju, što može ukazivati na to da organizam ima regulatorne i kontrolne mehanizme kada je izložen većim dozama arsena. Izuzetak su bili folikuli u atreziji, gde nije uočena međugeneracijska pravilnost ni u jednoj eksperimentalnoj grupi.

Kako bismo pokazali da li primenjene doze arsena dovode do promena u histološkoj organizaciji jajnika, pored (H&E) bojenja koja su pokazala da su kontrolne grupe imale normalnu strukturu jajnika, primenili smo i specijalna bojenja poput PAS, koja mogu da ukažu na prisustvo glikoproteina u cilju detekcije degenerisane *zona pellucida* ili degenerisane oocite. Naši rezultati pokazali su neznatna oštećenja u strukturi stromalnih ćelija, i u *zona pellucida*, proširene krvne sudove, dok su folikuli u atreziji pokazali veća oštećenja, posebno u ćelijama granulose druge eksperimentalne grupe. Trihromno bojenje po Massonu i Azan pokazali su povećano prisustvo kolagenih vlakana oko krvnih sudova, žutih tela, kao i oko atretičnih folikula, što se podudara sa rezultatima (Khalaf H.A. i drugi, 2019). Kako je proces folikulogeneze povezan sa interakcijom ćelija granulose i oocita, oštećenja ili smrt ćelija granulose predstavljaju mehanizam koji potencijalno izaziva folikularnu atreziju (Yeunget i drugi, 2017). U našem istraživanju uočen je mali broj ćelije u apoptozi, u trećoj generaciji druge eksperimentalne grupe, što navodi na zaključak da kumulativno dejstvo arsena štetno utiče na strukturu jajnika, međutim tumorske promene nisu primećene. Apoptoza izazvana arsenom u jetri pacova, kao i histopatološke promene uočene u jetri i mozgu, pokazana su i u radovima (Bashir i drugi, 2006a; Bashir i drugi, 2006b).

Istraživanja (Khalaf i drugi, 2019; i An i drugi, 2021, 2022; Efendic i drugi, 2022), su ukazala da oksidativni stres takođe izaziva apoptozu ćelija granulose jajnika pacova, kao i da inicira apoptozu u antralnim folikulima (Luderer i drugi, 2014). Kako je u našem istraživanju deponovani arsen u organima doveo do manjih histoloških promena, pretpostavlja se da organizam pod stresom aktivira sopstvene, specifične odbrambene mehanizme, za suprotstavljanje stresnim situacijama sa minimalnim posledicama po tkivo.

U ćelijama različitih tkiva, nalaze se receptori za estrogen alfa (ER- α) i beta (ER- β) čija aktivacija inicira različite signalne puteve u organizmu, regulišući ekspresiju gena i razne biološke procese. Neke studije su pokazale da estrogen ima protektivnu ulogu protiv toksičnih stimulusa, najverovatnije zbog imunomodulatornih i anti-inflamatornih efekata. U radu (Quirk i drugi, 2004) je pokazano da estradiol stimuliše proliferaciju ćelija granulose, povećava otpornost na apoptozu, jer ima sposobnost da promoviše progresiju kroz ćelijski ciklus.

Razumevanje uloge ovih receptora važno je za razvoj različitih terapija, uključujući i bolesti reproduktivnog sistema, jer ovi receptori podstiču razvoj reproduktivnih organa i utiču na plodnost. Primenom imunohistohemijske metode u našem istraživanju, želeli smo da pokažemo da li primena različitih doza arsena utiče na lokalizaciju receptora za estrogen u jajnicima, u obe eksperimentalne grupe, u sve tri generacije. U prvoj generaciji kod obe eksperimentalne grupe rezultati su pokazali pozitivnu reakciju u žutim telima i u folikulima granulosa ćelija antralnih folikula, s tim da je reakcija bila intenzivnija u drugoj eksperimentalnoj grupi. U drugoj generaciji druge eksperimentalne grupe reakcija je bila najintenzivnija u granuloznim ćelijama antralnih folikula i folikulima u atreziji. Slični rezultati bili su uočljivi i u trećoj generaciji.

Potencijal arsena da istovremeno poremeti nekoliko sistema hormonskih receptora pokazan je u različitim studijama (Bodwell i drugi, 2006; Davey i drugi, 2007). U veoma niskim koncentracijama, arsen utiče na aktivaciju gena posredovanu glukokortikoidnim receptorom (GR), ali ne i na supresiju gena posredovanu GR (Bodwell i drugi, 2004). Kao što je ranije pokazano (Bodwell i drugi, 2004), arsen je moćan endokrini ometač koji utiče na regulaciju gena preko strukturno povezanih steroidnih receptora za glukokortikoide, mineralokortikoide, progesteron i androgene. Arsen utiče i na ekspresiju i funkciju estrogenog receptora-alfa u ćelijama raka dojke MCF-7 (Stoica i drugi, 2000). On aktivira ER- α interakcijom sa domenom receptora koji vezuje hormone, što pokazuje inhibicija delovanja arsena antiestrogenom (Stoica i drugi, 2000). Arsen takođe deluje na udaljenije receptore estrogena i *in vivo* i u ćelijskoj kulturi (Liu i Vaalkes, 2008).

Naša istraživanja su pokazala da postoji povećan broj mikronukleusa, kod obe testirane grupe tretirane arsenom(III) u odnosu na negativnu kontrolu. Rezultati dobijeni za negativnu kontrolu, slažu se sa rezultatima sličnih istraživanja, gde je korišćen fiziološki rastvor u mikronukleus testu. Detektovana je pravilnost da srednja vrednost mikronukleusa potpada u raspon od 1 do 3 MN na 1000 testiranih eritrocita (Salamone i drugi, 1994). Benzidin, genotoksični agens, koji je doveden u vezu sa kancerom mokraćne bešike i pankreasa, je takođe kao u našem istraživanju, i u drugim studijama primenjen na miševima u dozi od 100 mg u 30 ml fiziološkog rastvora (Sanderson i drugi, 1993). Rezultati našeg istraživanja su pokazali da je učestalost mikronukleusa uočenih u eritrocitima znatno veća od negativne kontrole, a da je statistički slična sa vrednostima dobijenim arsenom. Između utvrđenog citotoksičnog agensa (benzidina) i naše ispitivane supstance, nema statistički značajne razlike, čime se potvrđuje da je i arsen(III) genotoksičan agens, koji dovodi do citološke deformacije eritrocita.

6. ZAKLJUČAK

Na osnovu dobijenih rezultata mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Hronično izlaganje arsenu(III) u vodi za piće u primenjenim koncentracijama, negativno se odrazilo na organizam i pored odsustva simptoma trovanja.
- Rezultati analize nivoa ženskih reproduktivnih hormona (progesterona i estrogena) ukazuju da arsen(III) u ispitivanoj koncentraciji predstavlja snažan endokrini ometač, jer smanjuje nivo reproduktivnih hormona, dovodeći do smanjenja prosečnog broja mladunaca po ženki miševa u leglu.
- Poznato je da arsen ima sposobnost deponovanja, u našem istraživanju analiza količine deponovanog ukupnog arsena(III) u organima ženki miševa, je pokazala najveće prisustvo u bubrezima, jetri, jajnicima i mozgu. Analiza kumulativnog efekta arsena kroz tri generacije, pokazala je da je najveća količina arsena zabeležena u trećoj generaciji druge ogledne grupe.
- Značaj ovog istraživanja je što je po prvi put pokazano da kumulativni efekat arsena tokom tri uzastopne generacije između dve eksperimentalne grupe, izaziva značajne promene u dinamici razvića folikula, njihovom broju kao i broju žutih tela.
- Estrogeni receptori bili su različito lokalizovani u različitim eksperimentalnim grupama i generacijama, što sugeriše da arsen značajno utiče na reprodukciju.
- Registrovani su mikronukleusi, čime je pokazano da je došlo do hromozomskih aberacija i da arsen u primenjenoj koncentraciji ima genotoksični uticaj. Pokazano je da je došlo do oštećenja hromozoma pri apliciranju, kako niske tako i visoke koncentracije rastvora arsen(III), međutim dozna zavisnost, kao i sam mehanizam delovanja arsena na ćelijsku DNK ostaje nerazjašnjen.

Rezultati dobijeni ovim istraživanjem ukazuju da dugoročna izloženost uticaju arsena u koncentraciji koja je izmerena u vodovodnoj mreži u Banatu, potencijalno može da ima negativan uticaj na reproduktivni kapacitet životinja i ljudi. Ova studija ukazuje na izuzetan značaj, i neophodnost razvoja sistema za prečišćavanje voda i odlaganja otpada, kao i podizanju svesti i promovisanju prevencije u cilju očuvanja zdravlja.

7. LITERATURA

- An, R., Wang, X., Yang, L., Zhang, J., Wang, N., Xu, F., Hou, Y., Zhang, H., Zhang, L. (2021). Polystyrene microplastics cause granulosa cells apoptosis and fibrosis in ovary through oxidative stress in rats. *Toxicology*, 15, 449, 152665.
- An, R., Wang, X., Yang, L., Zhang, J., Wang, N., Xu, F., Hou, Y., Zhang, H., Zhang, L. (2022). Corrigendum to "Polystyrene microplastics cause granulosa cells apoptosis and fibrosis in the ovary through oxidative stress in rats". *Toxicology*, 478, 153291.
- Aposhian, H.V., Aposhian, M.M. (2006). Arsenic toxicology: five questions. *Chemical Research in Toxicology*, 19, 1-15.
- Apostoli, P., Catalani, S. (2011). Metal ions affecting reproduction and development. *Metal Ions in Life Science*, 8(5), 263-303.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Marino, M. (2006). Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine*, 27, 299–402.
- Ashby, J., Tinwell, H., Stevens, J., Pastoor, T., Breckenridge, C. (2002). The effects of atrazine on the sexual maturation of female rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 35(3), 468-473.
- Ba, Z., Miro, F., Smyth, C.D., Whitelaw, P.F., Milne, M., Hillier, S.G. (1995). Regulation of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase delta 5/delta 4-isomerase and cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 by activin in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 136, 3247-3252.
- Bashir, S., Sharma, Y., Irshad, M., Nag, T.C., Tiwari, M., Kabra, M., Dogra, T.D. (2006a). Arsenic induced apoptosis in rat liver following repeated 60 days exposure. *Toxicology*, 217 (1), 63-70.
- Bashir, S., Sharma, Y., Irshad, M., Gupta, S.D., Dogra, T.D. (2006b). Arsenic-induced cell death in liver and brain of experimental rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 98(1), 38-43.
- Basu, A., Mahata, J., Gupta, S., Giri, A.K. (2001). Genetic toxicology of a paradoxical human carcinogen, arsenic: a review. *Mutation Research*, 488(2), 171-194.
- Biswas, P., Mukhopadhyay, A., Kabir, S.N., Mukhopadhyay, P.K. (2019). High-protein diet ameliorates arsenic-induced oxidative stress and antagonizes uterine apoptosis in rats. *Biological Trace Element Research*, 192(2), 222-233.
- Bodwell, J.E., Kingsley, L.A., Hamilton, J.W. (2004). Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR- mediated gene repression: Complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. *Chemical Research in Toxicology*, 17 (8), 1064-1076.
- Bodwell, J.E., Gosse, J.A., Nomikos, A.P., Hamilton, J.W. (2006). Arsenic disruption of steroid receptor gene activation: Complex dose-response effects are shared by several steroid receptors. *Chemical Research in Toxicology*, 19 (12), 619-629.
- Chakraborti, D., Mukherjee, S.C., Pati, S., Sengupta, M.K., Rahman, M.M., Chowdhury, U.K., Lodh, D., Chanda, C.R., Chakraborti, A.K., Basu, G.K. (2003). Arsenic groundwater contamination in Middle Ganga Plain, Bihar, India: a future danger? *Environmental Health Perspectives*, 111, 1194–1201.
- Chatterjee, A., Chatterji, U. (2010). Arsenic abrogates the estrogen-signaling pathway in the rat uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 8, 80.
- Chattopadhyay, S., Ghosh, D. (2010). The involvement of hypophyseal-gonadal and hypophyseal-adrenal axes in arsenic-mediated ovarian and uterine toxicity: Modulation by hCG. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 24(1), 29-41.

- Commission Directive 2003/40/EC of 16 May 2003 establishing the list, concentration limits and labelling requirements for the constituents of natural mineral waters and the conditions for using ozone-enriched air for the treatment of natural mineral waters and spring waters. OJ L126, 22.5.2003, pp. 34–39.
- Cora, M.C., Kooistra, L., Travlos, G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse: review and criteria for the staging of the estrous cycle using stained vaginal smears. *Toxicologic Pathology*, 43, 776-793.
- Council Directive 98/83/EC of 3 November 1998 on the quality of water intended for human consumption. OJ L 330, 5.12.1998, pp. 1–28.
- Csalagovits, I. (1999). Arsenic-bearing artesian waters of Hungary. *Annual report of the Geological Institute of Hungary, 1992-1993/II*, 85-92.
- Dalmacija, B. (2009). Strategija vodosnabdevanja i zaštite voda u AP Vojvodini. Univerzitet u Novom Sadu, Prirodno-matematički fakultet, Departman za hemiju, Novi Sad. <http://www.ekourbapv.vojvodina.gov.rs/wp-content/uploads/2018/09/sajt-strategija-vodosnabdevanja-i-zastite-voda-apv.pdf>.
- Davey, J.C., Bodwell, J.E., Gosse, J.A., Hamilton, J.W. (2007). Arsenic as an Endocrine Disruptor: Effects of Arsenic on Estrogen Receptor-Mediated Gene Expression. *In Vivo and in Cell Culture. Toxicological Sciences: an official journal of the Society of Toxicology*, 98 (1), 75-86.
- Deroo, B.J., Korach, K.S., (2006). Estrogen receptors and human disease *The Journal of Clinical Investigation*, 116, 561–570.
- Douer, D., Tallman, M.S. (2005). Arsenic trioxide: new clinical experience with an old medication in hematologic malignancies. *Journal of Clinical Oncology*, 23, 2396-2410.
- Dulout, F.N., Grillo, C.A., Seoane, A.I., Maderna, C.R., Nilsson, R., Vahter, M., Darroudi, F., Natarajan, A.T. (1996). Chromosomal aberrations in peripheral blood lymphocytes from native Andean women and children from Northwestern Argentina exposed to arsenic in drinking water. *Mutation Research*, 370, 151–158.
- Efendic, F., Sapmaz, T., Canbaz, H.T., Pence, H.H., Irkorucu, O. (2022). Histological and biochemical apoptosis changes of female rats' ovary by Zinc oxide nanoparticles and potential protective effects of l-arginine: An experimental study. *Annals of Medicine and Surgery*, 74, 103290.
- Eisler, R. (1994). A review of arsenic hazards to plants and animals with emphasis on fishery and wildlife resources. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environment, Part II: Human Health and Ecosystem Effects*, (pp. 185-259). John Wiley & Sons, Inc. New York.
- Florea, A.M., Yamoah, E.N., Dopp, E. (2005). Intracellular calcium disturbances induced by arsenic and its methylated derivatives in relation to genomic damage and apoptosis induction. *Environmental Health Perspectives*, 113, 659–664.
- Fugo, N., Butcher, R.L. (1966). Overripeness and the mammalian ova: I. Overripeness and early embryonic development. *Fertility and Sterility*, 17(6), 804-814.
- Gebel, T.W. (2001). Genotoxicity of arsenical compounds. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203, 249–262.
- Ghersevich, S., Nokelainen, P., Poutanen, M., Orava, M., Autio-Harmainen, H., Rajaniemi, H. (1994a). Rat 17 beta-hidroxyseroid dehidrogenase type 1: primary structure and regulation of enzyme expression in rat ovary by dietilhystilbestrol and gonadotropins *in vivo*. *Endocrinology*, 135, 1477-1487.

- Ghersevich, S., Poutanen, M., Tapanainen, J., Vihko, R. (1994b). Hormonal regulation of rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in cultured rat granulosa cells: Effects of recombinant follicle-stimulating hormone, estrogens, androgens, and epidermal growth factor. *Endocrinology*, 135, 1963-1971.
- Ghosh, P., Basu, A., Mahata, J., Basu, S., Sengupta, M., Das, J.K., Mukherjee, A., Sarkar, A.K., Mondal, L., Ray, K., Giri, A.K. (2006). Cytogenetic damage and genetic variants in the individuals susceptible to arsenic-induced cancer through drinking water. *International Journal of Cancer*, 118, 2470–2478.
- Gonsebatt, M.E., Vega, L., Salazar, A. M., Montero, R., Guzman, P., Blas, J., Del Razo, L.M., Garcia-Vargas, G., Albores, A., Cebrian, M.E., Kelsh, M., Ostrosky-Wegman, P. (1997). Cytogenetic effects in human exposure to arsenic. *Mutation Research*, 386, 219–228.
- Guha Mazumder D., Dasgupta U.B. (2011). Chronic arsenic toxicity: studies in West Bengal, India. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 27(9), 360-370.
- Harrington-Brock, K., Cabrera, M., Collard, D.D., Doerr, C.L., McConnell, R., Moore, M.M., Sandoval, H., Fuscoe, J.C. (1999). Effects of arsenic exposure on the frequency of HPRT-mutant lymphocytes in a population of copper roasters in Antofagasta, Chile: A pilot study. *Mutation Research*, 431, 247–257.
- Hawkins, S.M., Matzuk, M.M. (2008). The menstrual cycle: basic biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1135, 10-18.
- Hei, T.K., Liu, S.X., Waldren, C. (1998). Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: role of reactive oxygen species, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 8103–8107.
- Hopenhayn, C., Bush, H.M., Bingchang, A., Hertz-Picciotto, I. (2006). Association between arsenic exposure from drinking water and anemia during pregnancy. *Journal of Occupational and Environmental Medicine*, 48, 635-643.
- Hu, J., Shen, Z.X., Sun, G.L., Chen, S.J., Wang, Z.Y., Chen, Z. (1999). Long-term survival and prognostic study in acute promyelocytic leukemia treated with all-transretinoic acid, chemotherapy, and As₂O₃: an experience of 120 patients at a single institution. *International Journal of Hematology*, 70, 248-260.
- Hughes, M.F. (2002). Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicology Letters*, 133, 1-16.
- IARC (2004). Some drinking-water disinfectants and contaminants, including arsenic. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 84, 1-477.
- Ishfaq Ahmad, H., Bilal Bin Majeed, M., Jabbar, A., Arif, R., Afzal, G. (2021). 9. Chapter - Reproductive Toxicity of Arsenic: What We Know and What We Need to Know? In: Otsuki, T. (Ed.), *Environmental Health*, Intech Open.
- Jameera Begam, A., Jubie, S., Nanjan, M.J. (2017). Estrogen receptor agonists/antagonists in breast cancer therapy: A critical review. *Bioorganic Chemistry*, 71, 257-274.
- Jia, M., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.Å. (2015). Estrogen receptor alpha and beta in health and disease. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 29, 557–568.
- Jovanović, D., Jakovljević, B., Rašić-Milutinović, Z., Paunović, K., Peković, G., Knežević, T. (2011). Arsenic occurrence in drinking water supply systems in ten municipalities in Vojvodina Region, Serbia. *Environmental Research*, 111, 315-318.
- Khalaf, H.A., Elmorsy, E., Mahmoud, El-H.M., Aggour, A.M., Amer, S.A. (2019). The role of oxidative stress in ovarian toxicity induced by haloperidol and clozapine - a histological and biochemical study in albino rats. *Cell and Tissue Research*, 378, 371–383.

- Kim, M.J., Nriagu, J., Haack, S. (2002). Arsenic species and chemistry in groundwater of southeast Michigan. *Environmental Pollution*, 120(2), 379-390.
- Klaassen, C.D., Amdur, M.O., Doull, J. (1986). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*. Macmillan Publishing. New York, pp.1-974.
- Kukučka, M.Đ., Kukučka, N.M. (2013). *Fizičko-hemijski sastav svetskih prirodnih voda*. Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu. Beograd.
- Lage, C.R., Nayak, A., Kim, C.H. (2006). Arsenic ecotoxicology and innate immunity. *Integrative and Comparative Biology*, 46(6), 1040-1054.
- Lansdown, A.B. (1995). Physiological and toxicological changes in the skin resulting from the action and interaction of metal ions. *Critical Reviews in Toxicology*, 25, 397-462.
- La Vecchia, C. (2006). Estrogen-progestogen replacement therapy and ovarian cancer: an update. *European Journal of Cancer Prevention*, 15, 490-492.
- Lerda, D. (1994). Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Mutation research*, 312, 111-120.
- Lewinska, D., Palus, J., Stepnik, M., Dziubaltowska, E., Beck, J., Rydzynski, K., Natarajan, A.T., Nilsson, R. (2007). Micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes and buccal mucosa cells of copper smelter workers, with special regard to arsenic exposure. *International Archives of Occupational and Environmental Health*, 80, 371-380.
- Liu, J., Waalkes, M.P. (2008). Liver is a target of arsenic carcinogenesis. *Toxicological Sciences*, 105 (1), 24-32.
- Luderer, U. (2014). Ovarian toxicity from reactive oxygen species. *Vitamins and Hormones*, 94, 99-127.
- Ma, W-G., Song, H., Das, S.K., Paria, B.C., Dey, S.K. (2003). Estrogen is a critical determinant that specifies the duration of the window of uterine receptivity for implantation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(5), 2963-2968.
- Maeda, S. (1994). Chapter 8: Biotransformation of arsenic in the freshwater environment. In: Nriagu, J.O. (Ed.), *Arsenic in the Environment Part I; Cycling and Characterization*. (pp. 155-187). Wiley, New York.
- Mahata, J., Basu, A., Ghoshal, S., Sarkar, J.N., Roy, A.K., Poddar, G., Nandy, A.K., Banerjee, A., Ray, K., Natarajan, A.T., Nilsson, R., Giri, A.K. (2003). Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India. *Mutation Research*, 534, 133-143.
- Maki-Paakkanen, J., Kurttio, P., Paldy, A., Pekkanen, J. (1998). Association between the clastogenic effect in peripheral lymphocytes and human exposure to arsenic through drinking water. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32, 301-313.
- Mandal, B.K., Suzuki, K.T. (2002). Arsenic round the world: a review. *Talanta*, 58, 201-235.
- Marinković, D., Vidović, M., Mladenović, N., Tomić, I. (2007). Uklanjanje arsena iz podzemnih voda sa područja Zapadnobačkog okruga, *Proceedings - The 7th international conference Water Supply and Sewerage Systems*, (pp. 118-124).
- Mason, J.I., Carr, B.R., Murry, B.A. (1987). Imidazole antimycotics: selective inhibitors of steroid aromatization and progesterone hydroxylation. *Steroids*, 50(1), 179-189.
- McLean, A.C., Valenzuela, N., Fai, S., Bennett, S.A. (2012). Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *Journal of Visualized Experiments*, 67, e4389.
- Mescher, A.L. (2016). *Junquiera's Basic Histology: Text and Atlas*. 14th Edition. McGraw Hill Education, New York.

- Mihm, M., Gangooly, S., Muttukrishna, S. (2011). The normal menstrual cycle in women. *Animal Reproduction Science*, 124(3–4), 229–236.
- Milton, A.H., Hussain, S., Akter S., Rahman, M., Mouly, T.A., Mitchell, K. (2017). A Review of the Effects of Chronic Arsenic Exposure on Adverse Pregnancy Outcomes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(6), 556.
- Miyazaki, K., Watanabe, C., Mori, K., Yoshida, K., Ohtsuka, R. (2005). The effects of gestational arsenic exposure and dietary selenium deficiency on selenium and selenoenzymes in maternal and fetal tissues in mice. *Toxicology*, 208, 357–3650.
- Moore, L.E., Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Biggs, M. L., Kalman, D.A., Smith, M.T. (1997). Micronuclei in exfoliated bladder cells among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 6, 31–36.
- Nair, A.B., Jacob, S. (2016). A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacology*, 7, 27–31.
- National Research Council of National Academies: Committee for the Update of the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Institute for Laboratory Animal Research: Division on Earth and Life Studies (NRC). (2011). *Guide for the care and use of laboratory animal*, Eighth Edition. National Academic Press. Washington, D.C.
- Nesnow, S., Roop, B.C., Lambert, G., Kadiiska, M., Mason, R.P., Cullen, W.R., Mass, M.J. (2002). DNA damage induced by methylated trivalent arsenicals is mediated by reactive oxygen species. *Chemical Research Toxicology*, 15, 1627–1634.
- Nikolić, I.R. (2010). *Embriologija čoveka: tekst i atlas*. 4. izdanje. Data status, Novi Sad.
- Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD, 2016). *Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4*. https://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-474-mammalian-erythrocyte-micronucleus-test_9789264264762-en.
- Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palao, A., Cortinas, C., Garcia-Vargas, G., del Razo, L.M., Cebrian, M. (1991). Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Research*, 250, 477–482.
- Petruševski, B., Sharma, S., Schippers, J.C. (2005). Arsen u vodi za piće – osnovna hemija, detekcija, standardi, rasprostranjenost i efekat na zdravlje. *Voda i sanitarna tehnika*, 35, 11–18.
- Quirk, S.M., Cowan, R.G., Harman, R.M., Hu, C.L., Porter, D.A. (2004). Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival. 82:(E-Suppl) E40–E52.
- Rahman, A., Vahter, M., Smith, A.H., Nermell, B., Yunus, M., El Arifeen, S., Persson, L.-A., Ekström, E.-C. (2009). Arsenic Exposure During Pregnancy and Size at Birth: A Prospective Cohort Study in Bangladesh. *American Journal of Epidemiology*, 169(3), 304–312.
- Ratnaike, R.N. (2006). Chapter 16: Arsenic in health and disease. In: Naidu, R., Smith, E., Owens, G., Bhattacharya, P., Nadebaum, P.(Eds.), *Managing Arsenic in the Environment*, (pp. 297–311) CSIRO Publishing, Australia, Collingwood.
- Rattan, S., Zhou, C., Chiang, C., Mahalingam, S., Brehm, E., Flaws, J.A. (2017). Exposure to endocrine disruptors during adulthood: consequences for female fertility. *Journal of endocrinology*, 233(3), R109–R29.
- Rodríguez, V.M, Carrizales, L., Mendoza, M.S., Fajardo, O. R., Giordano, M. (2002). Effects of sodium arsenite exposure on development and behavior in the rat. *Neurotoxicology and Teratology*, 24, 743–750.

- Ross, M.H., Pawlina, W. (2016). *Histology: Text and Atlas with Correlated Cell and Molecular Biology*, 17th Edition. Wolters Kluwer, London.
- Rossmann, T.G. (2003). Mechanism of arsenic carcinogenesis: an integrated approach. *Mutation Research*, 533(1-2), 37-65.
- Rossmann, T. (2007). Arsenic. In: Rom, W. & Markowitz, S. (Eds.) *Environmental and Occupational Medicine*, 4th ed. (pp. 1006-1017). Hagerstown, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- Rudolph, M., Döcke, W.D., Müller, A., Menning, A., Röse, L., Zollner, T.M., Gashaw, I. (2012). Induction of overt menstruation in intact mice. *PLoS One*, 7(3), e32922.
- Salamone, M., Mavournin, K. (1994). Bone marrow micronucleus assay: A review of the mouse stocks used and their published mean spontaneous micronucleus frequencies. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 23(4), 239-273.
- Sanderson, B.J.S., Clark A.M. (1993). Micronuclei in adult and foetal mice exposed in vivo to heliotrine, urethane, monocrotaline and benzidine. *Mutation Research*, 285, 27-33.
- Saunders, P.T., Millar, M.R., Williams, K., Macpherson, S., Harkiss, D., Anderson, R.A., et al. (2000). Differential expression of estrogen receptor -alpha and -beta and androgen receptor in the ovaries of marmosets and humans. *Biology of Reproduction*, 63, 1098-1105.
- Shi, H., Shi, X., Liu, K.J. (2004). Oxidative mechanism of arsenic toxicity and carcinogenesis. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 255, 67-78.
- Smith, A.H., Hopenhayn-Rich, C., Bates, M.N., Goeden, H.M., Hertz-Picciotto, I., Duggan, H.M., Wood, R., Kosnett, M.J., Smith, M.T. (1992). Cancer risks from arsenic in drinking water. *Environ Health Perspectives*, 97, 259-267.
- Soignet, S.L., Maslak, P., Wang, Z.G., Jhanwar, S., Calleja, E., Dardshti, L.J., Corso, D., DeBlasio, A., Gabrilove, J., Scheinberg, D.A., Pandolfi, P.P., Warrell, Jr R.P. (1998). Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *The New England Journal of Medicine*, 339, 1241-1348.
- Stocco, C., Telleria, C., Gibori, G. (2007). The molecular control of corpus luteum formation, function, and regression. *Endocrine Reviews*, 28, 117-149.
- Stoica, A., Pentecost, E., Martin, M.B. (2000). Effects of arsenite on estrogen receptor-alpha expression and activity in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology*, 141 (10), 3595-3602.
- Stoker, T.E., Goldman, J.M., Cooper, R.L. (1993). The dithiocarbamate fungicide thiram disrupts the hormonal control of ovulation in the female rat. *Reproductive Toxicology*, 7(3), 211-218.
- Tang, Z.R., Zhang, R., Lian, Z.X., Deng, S.L., Yu, K. (2019). Estrogen-receptor expression and function in female. *Cells*, 8 (10), 1123.
- Treuting, P.M., Dintzis, S.M., Montine, K.S. (Eds.) (2018). *Comparative Anatomy and Histology: A Mouse, Rat, and Human Atlas*. Second Edition. Elsevier/Academic Press, London, United Kingdom.
- Tseng, C.H., Chong, C.K., Tseng, C.P., Hsueh, Y.M., Chiou, H.Y., Tseng, C.C., Chen, C.J. (2003). Long-term arsenic exposure and ischemic heart disease in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Toxicology Letters*, 137, 15-21.
- Turner, K.J., Macpherson, S., Millar, M.R., McNeilly, A.S., Williams, K., Cranfield, M. et al. (2002). Development and validation of a new monoclonal antibody to mammalian aromatase. *The Journal of Endocrinology*, 172, 21-30.
- Underwood, E.J. (1977). *Trace Elements in Human and Animal Nutrition*. 4th Edition, Academic Press, New York.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 1979). Asbestos. *Ambient Water Quality Criteria*. Washington, D.C.: *Criteria and Standards Division, Office of Water Planning and Standards*,

- U.S. Environmental Protection Agency. 149 pp. Available from the National Technical Information Service, Springfield, Va., as Publ. No. PB-297-917.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 1984). US Environmental Protection Agency, EPA-600/18-83-021F, *Assessment for Inorganic Arsenic, Final Report*.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 2005a). *STORET data warehouse*. U.S. Environmental Protection Agency. <http://www.epa.gov/storet/dbtop.html>.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 2005b). U.S. Environmental Protection Agency. Technology Transfer Network. *National Air Toxics Assessment. Pollutant - Specific Data Tables*. <http://www.epa.gov/ttnatw01/nata/tablemis.html>.
- U.S. Environmental Protection Agency (EPA, 2007). *Arsenic and Your Distribution System*. <https://www.epa.gov/sites/default/files/>.
- U.S. Agency for Toxic Substances and Diseases Registry (ATSDR, 2005). *Toxicological Profile for Arsenic*. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp2.pdf>.
- Uslu, R., Sanli, U.A., Sezgin, C., Karabulut, B., Terzioglu, E., Omay, S.B., Goker, E. (2000). Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines. *Clinical Cancer Research*, 6, 4957-4964.
- Varsányi, I., Kovács, L.Ó. (2006). Arsenic, iron, and organic matter in sediments and groundwater in the Pannonian Basin, Hungary. *Applied Geochemistry*, 21, 949-963.
- Walmer, D.K., Wrona, M.A., Hughes, C.L., Nelson, K.G. (1992). Lactoferrin expression in the mouse reproductive tract during the natural estrous cycle: correlation with circulating estradiol and progesterone. *Endocrinology*, 131, 1458-1466.
- Warner, M.L., Moore, L. E., Smith, M.T., Kalman, D. A., Fanning, E., Smith, A.H. (1994). Increased micronuclei in exfoliated bladder cells of individuals who chronically ingest arsenic-contaminated water in Nevada, *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 3, 583-590.
- Williams, C.J., Erickson, G.F. (2000-). Morphology and Physiology of the Ovary. [Updated 2012 Jan 30]. In: Feingold, K.R., Anawalt, B., Blackman, M.R. et al., (Eds.), *Endotext* [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK278951/>.
- World Health Organization (WHO, 2017). *Guidelines for drinking-water quality: forth edition incorporation first addendum*. 4th edition + 1st add. World Health Organization. pp. 315-318.
- Wyatt, C.J., Fimbres, C., Romo, L., Méndez, R.O., Grijalva, M. (1998a). Incidence of heavy metal contamination in water supplies in northern Mexico. *Environmental Research*, 76(2), 114-119.
- Wyatt, C.J., Lopez Quiroga, V., Olivas Acosta, R.T., Méndez, R.O. (1998b). Excretion of arsenic (As) in urine of children, 7-11 years, exposed to elevated levels of As in the city water supply in Hermosillo, Sonora, Mexico. *Environmental Research*, A, 78(1), 19-24.
- Yeung, C.K., Wang, G., Yao, Y., Liang, J., Chung, C.Y.T., Chuai, M., Lee, K.K.H., Yang, X. (2017). BRE modulates granulosa cell death to affect ovarian follicle development and atresia in the mouse. *Cell Death and Disease*, 8 e2697.
- Yip, L., Dart, R. (2001). Arsenic. In: Sullivan, J., Kreiger, G., (Eds.), *Clinical Environmental Health and Toxic Exposures*. Second Edition. (pp. 858-865). Philadelphia, PA, Lippincott Williams & Wilkins.

Zhang, T.C., Cao, E.H., Li, J.F., Ma, W., Qin, J.F. (1999). Induction of apoptosis and inhibition of human gastric cancer MGC-803 cell growth by arsenic trioxide. *European Journal of Cancer*, 35, 1258-1263.

<https://periodictable.com/Items/033.7/index.html>

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4c/Arsen_11.jpg

https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/a7/Arsenic_trioxide.jpg

BIOGRAFIJA

Anita (Janko) Birinji je rođena 1980.godine u Novom Sadu. Osnovne studije biologije, smer profesor biologije završava 2007. godine, na Prirodno-matematičkom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu.

Master studije, modul Reproaktivna biologija sa embriologijom završava 2016. godine, na Prirodno -matematičkom fakultetu i Medicinskom fakultetu, Univerziteta u Novom Sadu.

Doktorske studije biologije, modul biologija ćelije i tkiva, upisuje 2017. godine na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu.

Od 2008 -2017. godine, Anita je zaposlena u Osnovnoj Školi "Jožef Atila" u Novom Sadu i Osnovnoj Školi "Ivo Andrić" u Budisavi, Srednjoj školi za dizajn "Bogdan Šuput" Novi Sad, na radnom mestu nastavnika biologije. Anita je do sada bila autor/koautor i recenzent na radovima u časopisima međunarodnog značaja. Učestvovala na međunarodnim i nacionalnim naučnim skupovima sa 6 saopštenja. Iz doktorske disertacije proistekla su 2 rada, u časopisima M23 kategorije. Anita je aktivni član Srpskog biološkog društva Srbije, Udruženja toksikologa Srbije. Udata i majka dvoje dece.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписана Анита Ј. Бирињи

број индекса Б3042/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

**Изјава о истоветности штампане и електронске верзије
докторског рада**

Име и презиме аутора Анита Ј. Бирињи _____

Број индекса
Б3042/2017 _____

Студијски програм Биологија ћелија и ткива _____

Наслов рада Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води _____

Ментор

др Марија Марин, доцент, Биолошки факултет, Универзитет у Београду

др Душан Лалошевић, редовни професор, Медицински факултет, Универзитет у Новом Саду _____

Потписани/а Анита Ј. Бирињи _____

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

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

Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.