

*Originalni članci /  
Original articles*

TALOŽENJE ARSENA U ORGANIMA  
EKSPERIMENTALNOG MODELA MUŽJAKA  
MIŠEVA EKSPONIRANIH MAKSIMALNOJ  
KONCENTRACIJI EKVIVALENTNOJ U  
VODOVODNOJ MREŽI BANATA

DEPOSITION OF ARSENIC IN THE ORGANS  
OF AN EXPERIMENTAL MODEL OF MALE  
MICE EXPOSED TO THE MAXIMUM CON-  
CENTRATION EQUIVALENT TO THE  
WATER SUPPLY NETWORK OF BANAT

*Correspondence to*

Birinji Anita  
e-mail: ani.birinji@gmail.com

Anita Birinji<sup>1</sup>, Željko Mihaljev<sup>2</sup>, Dušan Lalošević<sup>3</sup>,  
Marija Marin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Beogradu, Biološki fakultet, Studentski trg 16, 11000 Beograd

<sup>2</sup> Naučni institut za veterinarstvo „Novi Sad”, Rumenački put 20, 21113 Novi Sad, Srbija

<sup>3</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet i Zavod za antirabičnu zaštitu - Pasterov zavod Novi Sad, Hajduk Veljkova 1, 21000 Novi Sad, Srbija

*Ključne reči*

arsen(III)-oksid, miševi, eksperimentalni model

*Key words*

arsenic(III)-oxide, mice, experimental model.

*Sažetak*

Prisustvo arsena u životnoj sredini predstavlja ozbiljan zdravstveni problem. Na teritoriji Srbije najviše je prisutan u Vojvodini. Postavili smo eksperimentalni model izloženosti arsena u vodi za piće kroz tri generacije miševa. Koncentracija arsena je određena prema formuli za preračunavanje vrednosti kojima mogu biti izloženi ljudi u vodovodu Banata na animalni model. Postavljene su dve grupe miševa eksponiranih arsen (III)-oksidu od 10,6 mg/L i deset puta veća, 106 mg/L. U radu su prikazani rezultati sadržaja ukupnog arsena deponovanog u organima mužjaka miševa (jetra, bubrezi, testisi, mozak) praćeni kroz tri uzastopne generacije. Rezultati ukazuju da se arsen taloži u organima i da sadržaj ukupnog arsena tokom generacija ne opada. Nisu registrovane promene u aktivnosti miševa, ishrani, ni većem gubitku telesne težine. Nema registrovanih tumoroznih promena na spoljašnjoj i unutrašnjoj građi tela. Nisu zabeležena masovna uginuća životinja tokom oglada.

*UVOD*

Arsen je široko rasprostranjen u životnoj sredini i ljudska populacija dolazi u kontakt sa arsenom iz različitih izvora (prirodnih i antropogenih). Antropogeni izvori kao što su farmaceutska i hemijska industrija, metalurgija, rudarstvo, poljoprivreda, sagorevanje fosilnih goriva, spaljivanje otpada, emituju veću količinu arsena od prirodnih i time povećavaju koncentraciju arsena u prirodi. Arsen se tako može naći u vodi, zemljištu, vazduhu, hrani koju ljudi koriste za životne potrebe.<sup>(1)</sup> U organizmu arsen dospeva najčešće oralnim putem, udisanjem, apsorpcijom preko kože. Potencijalno je veća opasnost od unosa arsena u organizam putem vode. Voda za piće kontaminirana arsenom se

uzima iz raznih izvora u zavisnosti od lokaliteta, površinske vode (reke, jezera) i podzemne vode (izvori, bunari). Voda je najvažniji transportni sistem arsena u prirodi. U vodi se arsen javlja u dva oksidativna stanja, As (V), As (III). Petovalentni arsen se najčešće javlja u dobro oksidovanoj površinskoj vodi. U podzemnim vodama u sedimentima dubokih jezera najčešće se nalazi u obliku trovalentnog arsena, koji je toksikološki potentniji u odnosu na petovalentni arsen.<sup>(2)</sup>

Poseban nacionalni i svetski problem predstavlja prisustvo arsena u podzemnim vodama koje su prirodni izvor snabdevanja vodom za piće. Svetska zdravstvena organizacija (SZO) je dala preporuku za maksimalnu dozvoljenu koncen-

traciju arsena u vodi za piće 10 µg/L koju je usvojila i domaća zakonska regulativa koja se bavi ispravnošću vode za piće u javnim vodovodima (Pravilnik o higijenskoj ispravnosti vode za piće, Službeni list SRJ, 42/1998). Redovnom analizom vode prikupljaju se informacije o koncentraciji arsena u vodi. Na teritoriji Srbije arsen je najviše prisutan na teritoriji Banata, gde su i zabeležene najviše koncentracije arsena u prirodnim izvorima vode za vodosnabdevanje stanovništva. Prema izveštajima o monitoringu arsena u vodi bunara za vodosnabdevanje stanovništva na području južnog Banata iz 2008. godine najveće koncentracije arsena zabeležene su na teritoriji opštine Zrenjanin: grad Zrenjanin 0,315-0,580 mg/L; Elemir 0,569-0,586 mg/L; Taraš 0,687-0,859 mg/L). Kvalitet podzemnih voda je najbolji u Sremu gde je koncentracija arsena ujednačenih vrednosti do 0,1 mg/L.<sup>(3)</sup>

Prisustvo arsena u vodi ne menja ukus, boju i miris vode. Iako stanovništvo ne koristi vodu za piće koja sadrži arsen, takva voda se koristi za održavanje higijene, pripremanje hrane, zalivanje biljaka, napajanje stoke, što može indirektno predstavljati veliki zdravstveni problem.

Poznato je da arsenit (AsIII) i arsenat (AsV) izazivaju akutno i hronično trovanje kod mnogih organizama uključujući i ljude.<sup>(4)</sup> Toksičnost arsena zavisi od njegovog hemijskog oblika, koncentracije, dužine izloženosti i ostalih faktora koji utiču na retenciju i distribuciju arsena.<sup>(1)</sup> Organi koji imaju ulogu u apsorpciji, akumulaciji i/ili u izlučivanju su najčešće podložni negativnom uticaju arsena.<sup>(5)</sup> Hronična izloženost neorganskom arsenu (As) je povezana sa gubitkom telesne težine,<sup>(6)</sup> karcinomom kože i unutrašnjih organa,<sup>(7)</sup> osećaju pečenja u očima, otokom nogu, fibrozi jetre, hroničnom oboljenju pluća, gangreni nožnih prstiju.<sup>(8)</sup> Takođe je zapažen i metabolički poremećaj kao što je dijabetes, disfunkcija endokrinog sistema,<sup>(9,10,11,12)</sup> nervnog sistema<sup>(13)</sup> i reproduktivnog sistema.<sup>(14,15,16)</sup> Arsen ima sposobnost da se deponuje, tako da se veće koncentracije arsena deponuju u jetri, bubrezima, plućima i koži, a manje koncentracije se mogu naći u mišićima i kostima, dok je akumulacija u kosi i noktima rezultat hronične izloženosti. Arsen ima sposobnost da prođe kroz krvno-moždanu barijeru, placentu, a može se naći i u majčinom mleku.<sup>(17,18)</sup>

Uticaj hroničnog izlaganja relativno niskim koncentracijama arsena u vodi za piće, a iznad granice dozvoljenih vrednosti, praćeno kroz više generacija organizama, nije do sada istražen. Ne postoje ni literaturni podaci o uticaju kumulativnog efekta arsena deponovanog u organima kroz tri uzastopne generacije, što je i cilj ovog istraživanja. Studija je dizajnirana sa ciljem da se istraži uticaj relativno niskih koncentracija arsena, a koje prelaze granicu dozvoljene vrednosti arsena u vodi (10 µg/L) na sposobnost taloženja i promena koje mogu da izazovu na organima mužjaka miševa. U ovom istraživanju tokom tri meseca na tri uzastopne generacije miševa praćen je kumulativan efekat apliciranih koncentracija arsen (III)-oksida 10,6 mg/L i deset puta jače koncentracije od 106 mg/L.

## MATERIJAL I METODE

Ogled je sproveden u vivarijumu Zavoda za antirabičnu zaštitu - Pasterov zavod Novi Sad, tokom približno 10 meseci. Ogled je odobren od strane Etičkog saveta-Uprava za veterinu, Ministarstva poljoprivrede šumarstva i vodoprivrede

Srbije (Rešenje pod brojem: 323-07-00615/2019-05 od 29.01.2020).

Životinje korišćene u ogledu su miševi (*Mus musculus*, soj: NMRI koji potiču iz „*Naval Medical Research Institute*“), a čuvaju se u vivarijumu Zavoda za antirabičnu zaštitu - Pasterov zavod, Novi Sad. Nasumično odabrani, muškog i ženskog pola, starosti (0 do 6 meseci), prosečne telesne mase od (25-30 g). Zdravstveno stanje i dobrobit životinja bilo je pod kontrolom veterinara, pridržavajući se protokola od strane Javnog zdravstvenog servisa definisanog kao „*Guide for the care and use of laboratory animals*“ prema *National Research Council, 2011*“. Smeštaj životinja bio je u kaveznom grupnom sistemu na temperaturi od 20-22 °C, relativnoj vlažnosti vazduha 50+/-5% i 12h svetlost/tama ciklusu. Ishrana se sprovodila *ad libitum* prema formuli Veterinarskog zavoda Subotica. Voda za piće korišćena je iz vodovodne mreže Novi Sad, u kojoj se razređuje koncentrovani rastvor arsen (III)-oksida, *ad libitum*.

Supstanca korišćena u ogledu je arsen (III)-oksid proizvođača „Centrohem“ Stara Pazova.

Čvrsta supstanca je rastvorena prvobitno u destilovanoj vodi, a koncentrovani rastvor arsen (III)-oksida se razređivao do željene koncentracije vodom za piće komunalne vodovodne mreže grada Novog Sada u kojoj nije utvrđeno prisustvo arsena, prema izveštaju Instituta za javno zdravlje Vojvodine iz 2017. na osnovu studije „Utvrđivanje i praćenje ispravnosti vode za piće iz javnog vodovoda na teritoriji grada Novog Sada i naselja tokom 2016. godine“. Konverzija vrednosti koncentracije supstance sa čoveka na miševu vršila se prema protokolu publikovanom od strane Nair et Jacob.<sup>(19)</sup>

Formiranje oglednih grupa životinja je sprovedeno na sledeći način: mladunci stari oko 3 nedelje, nakon završenog perioda laktacije su izdvojeni iz legla u tzv. „zabavište“ (5 nedelja starosti). Dostizanjem reproduktivne zrelosti miševi su se raspoređivali po kavezima. Kontrolna grupa, prva ogledna grupa (konc. arsen (III)-oksida 10,6 mg/l) i druga ogledna grupa (konc. arsen (III)-oksida 106 mg/l) imale su po tri generacije miševa. U okviru svake generacije bila su po tri kaveza sa miševima. Broj miševa u kavezu bio je 6 od kojih su 4 ženke i 2 mužjaka.

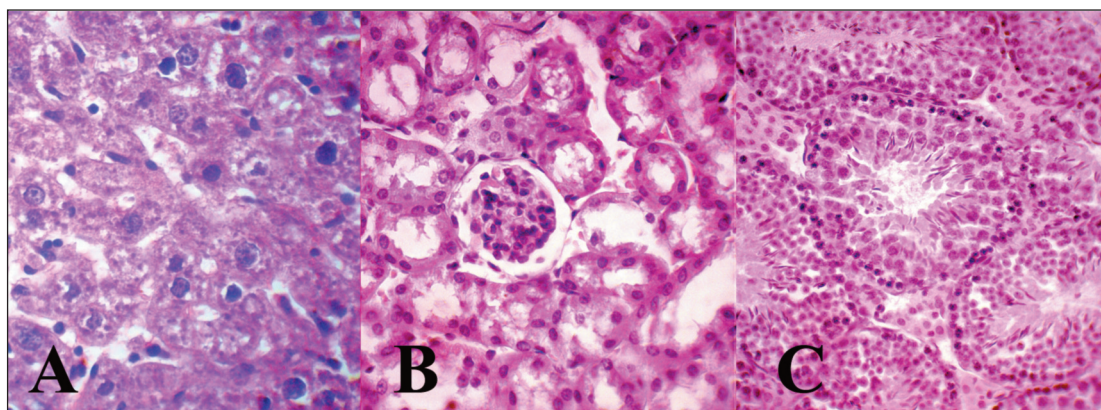
Ogledne grupe životinja bile su izložene dejstvu arsen (III)-oksida u trajanju od 3 meseca. Mužjaci reproduktivno zreli nakon kopulacije i uspostavljenog graviditeta ženki i njihovog okota, su izdvojeni u zaseban kavez gde su ostajali do navršanih ukupno tri meseca izlaganja uticaju .arsen(III)-oksida. Postupak se ponavljao u okviru svake generacije kontrolne i oglednih grupa. Nakon perioda od 3 meseca izlaganja uticaju arsen (III)-oksida mužjaci su žrtvovani cervikalnom dislokacijom, disekcijom su izdvojeni organi; jetra, bubrezi, mozak, testisi. Organi su čuvani na temperaturi od -20°C do momenta analize.

Analiza uzoraka je vršena u Naučnom institutu za veterinarstvo „Novi Sad“ metodom induktivno spregnute plazme sa masenom detekcijom (ICP/MS). Uzorci za merenje pripremljeni su metodom mikrotalasne digestije u sistemu Ethos, Microwave Labstation, Milestone. Razaranje uzoraka je izvršeno sa 8 ml razblažene HNO<sub>3</sub> (2:1) i 2 ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%) na t<sub>max</sub>=180 °C. Zadati program mikrotalasne digestije

je ukupno je trajao 30 min. sa max. snagom od 1000W. Merenje koncentracije arsena izvršeno je tehnikom spregnute plazme sa masenom detekcijom na instrumentu Agilent ICP-MS 7700x preko izotopa <sup>75</sup>As. Određivanje je izvršeno u helijumskom modu sa vremenom integracije od 1 sekunde po tački (He-M, IT 1 s/P). Kalibraciona kriva je izrađena korišćenjem certifikovanih standarda *AccuTrace™ Reference Standard* (USA) koncentracije 1000 µg/ml. Za utvrđivanje efikasnosti mikrotalasne digestije uzorci su spajkovani poznatom koncentracijom standardnih rastvora ispitivanog elementa. Eksperimentalno određena granica kvantifikacije (LoQ) za arsen korišćenom metodom iznosi <0.001 mg/kg. Sadržaj arsena u nativnim uzorcima izračunat

uginuća u odnosu na kontrolnu grupu. Na spoljašnjoj građi tela nisu uočene patološke promene. Disekcijom i obdukcijom mužjaka miševa nisu registrovane tumorozne promene na unutrašnjim organima. ICP/MS analizom uzoraka meren je ukupan sadržaj arsena u unutrašnjim organima miševa (jetra, bubrezi, mozak, testisi). Vrednosti ukupnog sadržaja arsena u unutrašnjim organima mužjaka miševa su prikazane u tabeli 1.

Histološkom analizom organa miševa nisu nađene patološke promene (slika 1).



**Slika 1.** A-jetra; B-bubreg; C-testis miševa prve grupe na kraju eksperimenta intoksikacije arsenom, bez patoloških promena; bojenje hematoksilin-eozin.

je na osnovu izmerenog broja impulsa (odbroja), kalibracione funkcije i upotrebljenog razblaženja koristeći softverski program MassHunter Workstation.<sup>(20)</sup>

Histološka analiza organa mužjaka miševa urađena je klasičnom parafinskom tehnikom na preparatima bojenim hematoksilinom i eozinom.

### REZULTATI

Životinje izložene uticaju arsen (III)-oksida u koncentraciji 10,6 mg/l, tokom oglada nisu imale promene u aktivnostima, u ishrani i pojenju. Nije registrovan značajan gubitak u telesnoj težini miševa. Nisu zabeležena masovna

### DISKUSIJA I ZAKLJUČAK

Rad je imao za cilj da utvrdi ukupan sadržaj arsena deponovanog u organima (jetra, bubrezi, testis, mozak) kroz tri uzastopne generacije mužjaka miševa i praćenje da li se tokom generacija ukupan sadržaj arsena nataložen u organima menja.

Životinje korišćene u ogledu tokom eksperimenta oglednih grupa u sve tri generacije nisu pokazivale znakove bolesti, njihova svakodnevna aktivnost, ishrana, unos vode se nije razlikovala od kontrolne grupe. Nije bilo promena u telesnoj težini. Tokom oglada nije dolazilo do masovnog uginuća, broj uginulih se nije razlikovao od broja uginuća u

**Tabela 1.** Rezultati analize uzoraka na sadržaj deponovanog arsena u organima mužjaka miševa izloženih uticaju arsen(III)-oksida u periodu od tri meseca praćeno kroz tri uzastopne generacije miševa, u mikrogramu po gramu nativnog uzorka.

Vrsta uzorka	Generacija miševa	Kontrola	Ogledna grupa konc. As 10,6 mg/L sadržaj As (µg /g)	Ogledna grupa konc. As 106 mg/L sadržaj As (µg /g)
Jetra	I	0,0098	4,7713	6,7364
	II	0,0098	1,2276	5,126
	III	0,0098	0,9903	8,0647
Bubreg	I	0,0167	6,573	6,7364
	II	0,0167	1,6035	5,843
	III	0,0167	1,5081	6,3282
Testisi	I	0,0149	1,392	1,7631
	II	0,0149	0,5877	0,5877
	III	0,0149	0,428	1,3011
Mozak	I	0,0298	0,5872	0,9866
	II	0,0298	0,291	0,468
	III	0,0298	0,3733	0,7873



kontrolnoj grupi. Na spoljašnjoj građi tela nisu uočene promene u vidu ulkusa, rana, gubitka dlake, anomalija na udovima. Disekcijom i histološkom analizom nisu primećene patološke promene. Merenjem sadržaja arsena je utvrđeno da se arsen taložio u organima i da je sadržaj ukupnog arsena taloženog u organima znatno viši u odnosu na kontrolnu grupu, naročito u jetri i bubrezima. Tokom generacija se sadržaj ukupnog arsena taloženog u organima smanjivao, što navodi na zaključak da se razvija adaptacija na intoksikaciju. Upadljivo je da je u prvoj generaciji sadržaj akumuliranog arsena u organima najveći, dok se u drugoj i trećoj generaciji smanjuje, mada su životinje pod istim uslovima. Tolerancija koja se može izazvati malim dozama arsena poznata je još iz antičkih vremena.

Praćenjem kroz tri uzastopne generacije miševa utvrđeno je da se u svakoj generaciji mužjaka miševa taložio arsen u organima u relativno velikoj količini. Pošto nataloženi arsen u organima nije doveo do vidljivih patoloških promena, može se prepostaviti da organizam pod uticajem stresa aktivira svoje mehanizme odbrane koji mu omogućavaju da prevaziđe stresne situacije sa što manje posledica.

Rezultati našeg istraživanja ukazuju da arsen ima sposobnost da se taloži u organima kao što su jetra, bubrezi, mozak i testisi, ali i da se količina deponovanog arsena tokom triju uzastopnih generacija menja. U ovoj studiji nisu registrovani simptomi bolesti niti patološke promene na organima kao efekat intoksikacije primenjenim dozama arsena.

### Abstract

The presence of arsenic in the environment is a serious health problem. On the territory of Serbia, it is most present in Vojvodina. We set up an experimental model of arsenic exposure in drinking water through three generations of mice. The concentration of arsenic was determined according to the formula for converting the values to which people can be exposed in the Banat water supply system to the animal model. Two groups of mice exposed to arsenic (III)-oxide of 10.6 mg/L and ten times higher, 106 mg/L, were placed. The paper presents the results of the content of total arsenic deposited in the organs of male mice (liver, kidneys, testicles, brain) followed through three consecutive generations. The results indicate that arsenic is deposited in organs and that the content of total arsenic does not decrease over generations. No changes were registered in the mice's activity, diet, or significant loss of body weight. There are no registered tumorous changes on the external and internal structure of the body. No mass deaths of animals were recorded during the experiment.

### LITERATURA

- Mandal BK, Ogra Y, Anzai K, Suzuki KT. Speciation of arsenic in biological samples. *Toxicol Appl Pharmacol* 2004; 198: 307-18.
- Kristoforović-Ilić M. Arsenic. *Medicinski Pregled* 2004; 57 (7-8), 319-322.
- Jovanović B, Ljubisavljević D, Rajaković Lj. Uklanjanje arsena iz vode adsorpcijom na nekonvencionalnim materijalima. *Vodoprivreda* 2011, 43 (252-254): 127-150.
- Kitchin KT. Recent research in arsenic carcinogenesis: modes of action, animal model system, and methylated arsenic metabolites. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 172: 249-61.
- Duker AA, Carranza EJM, Hale M. Arsenic geochemistry and health. *Environ Internat* 2005; 31: 631-41.
- Nandi D, Patra RC, Swarup D. Effect of cysteine, methionine, ascorbic acid and thiamine on arsenic-induced oxidative stress and biochemical alterations in rats. *Toxicology* 2005; 211: 26-35.
- Kapaj S, Peterson H, Liber K, Bhattacharya P. Human health effects from chronic arsenic poisoning – a review. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2006; 41: 2399-428.
- Guha Mazumder DN. Chronic arsenic toxicity: clinical features, epidemiology, and treatment: experience in West Bengal. *J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng* 2003; 38(1):141-63.
- Longnecker MP, Danials JL. Environmental contaminations as etiologic factors for diabetes. *Environ Health Perspect* 2001; 69: 871-6.
- Tseng CH, Tai TY, Chong CK, Tseng CP, Lai MS, Lin BJ, et al. Long-term arsenic exposure and incidence of non-insulin-dependent diabetes mellitus: a cohort study in arseniasis-hyperendemic villages in Taiwan. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 847-51.
- Tseng CH, Tseng CP, Chiou HY, Hsueh YM, Chong CK, Chen CJ. Epidemiologic evidence of diabetogenic effect of arsenic. *Toxicol Lett* 2002; 133: 69-76.
- Rahman M, Tondel M, Ahmad SA, Axelson O. Diabetes mellitus associated with arsenic exposure in Bangladesh. *Am J Epidemiol* 1998; 148: 198-203.
- Del Razo LM, Styblo M, Cullen WR, Thomas DJ. Determination of trivalent methylated arsenicals in biological matrices. *Toxicol Appl Pharmacol* 2001; 174: 282-93.
- Borzsonyi M, Bereczky A, Rudnai P, Scanady M, Horvath A. Epidemiological studies on human subjects exposed to arsenic in drinking water in Southeast Hungary. *Arch Toxicol* 1992; 66: 77-8.
- Hopenhayn-Rich C, Browning SR, Hertz-Picciotto I, Ferrsccio C, Peralta C, Gibb H. Chronic arsenic exposure and risk of infant mortality in two areas of Chile. *Environ Health Perspect* 2000; 108: 667-73.
- Singh N, Kumar D, Sabu AP. Arsenic in the environment: effects on human health and possible prevention. *J Environ Biol* 2007; 28: 359-65.
- ATSDR (Agency for Toxic Substances and Disease Registry) 2005; Toxicological profile for arsenic. Draft for public comment. Update. US Department of Health and Human Services, Public Health Service
- Cohen SM, Arnold LL, Eldan M, Lewis AS, Beck BD. Methylated arsenicals: the implications of metabolism and carcinogenicity studies in rodents to human risk assessment. *Crit. Rev.Toxicol.* 2006; 36(2), 99-133.
- Nair A.B., Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy* 2016; 7: 27-31.
- Nelms S. (Ed.) 2005. Inductively coupled plasma mass spectrometry handbook. Blackwell Publishing, pp. 504.

■ The paper was received / Rad primljen: 01.12.2021.  
Accepted / Rad prihvaćen: 01.06.2022.