

НАСТАВНО-НАУЧНОМ ВЕЋУ БИОЛОШКОГ ФАКУЛТЕТА УНИВЕРЗИТЕТА У БЕОГРАДУ

На IV редовној седници Наставно-научног већа Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одржаној 19. 1. 2024. године, на основу молбе ментора, др Душана Лалошевића, редовног професора Универзитета у Новом Саду – Медицинског факултета и др Марије Марин, доцента Универзитета у Београду – Биолошког факултета, одређена је Комисија за преглед и оцену докторске дисертације **Аните Ј. Бирињи**, под насловом: **„Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води“**, у саставу:

1. др Анита Радовановић, редовни професор, Универзитет у Београду - Факултет ветеринарске медицине
2. др Жељко Михаљев, виши научни сарадник, Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“
3. др Маја Чакић-Милошевић, ванредни професор, Универзитет у Београду-Биолошки факултет

Веће научних области природних наука је на седници, одржаној 21.04.2022. године донело одлуку да даје сагласност на предлог теме докторске дисертације.

Комисија је прегледала урађену докторску дисертацију кандидаткиње и Научно-наставном већу Универзитета у Београду – Биолошког факултета подноси следећи

ИЗВЕШТАЈ

Општи подаци о докторској дисертацији

Докторска дисертација **Аните Ј. Бирињи**, под насловом **„Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води“**, урађена је у сарадњи са Пастеровим заводом у Новом Саду, Медицинским факултетом Универзитета у Новом Саду, и са Биолошким факултетом Универзитета у Београду. Докторска дисертација написана је на 82 стране, од чега је нумерисано 64 стране. На уводним непагинираним странама (9 страна) се налазе: Насловне стране на српском и енглеском језику, Листа ментора и чланова комисије, Изјава захвалности, Сажети докторске дисертације на српском и енглеском језику и Садржај. Дисертација садржи седам поглавља: **Увод** (23 стране), **Циљ истраживања** (1 страна), **Материјал и методе** (5 страна), **Резултати** (24 стране), **Дискусија** (3 стране), **Закључци** (1 страна), **Литература** (8 страна). Дисертација садржи 22 слике, 9 графикона и 7 табела. У дисертацији је цитирано **117** литературних извора уз 3 интернет странице. На крају дисертације налазе се и следећи прилози (4 страна): Биографија аутора, Изјава о ауторству, Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада и Изјава о коришћењу.

Анализа докторске дисертације

У поглављу **УВОД**, кандидаткиња **Анита Ј. Бирињи** је кроз четири потпоглавља која су поткрепљена са шеснаест илустрација, дала детаљан преглед података из научне литературе који су у вези са предметом истраживања докторске дисертације. У почетном делу **УВОДА** наводи да се на територији Аутономне Покрајине Војводине становништво снабдева углавном подземним водама, које садрже високу концентрацију арсена.

У оквиру првог потпоглавља под насловом „*Хемијске особине арсена*“ кандидаткиња нас упознаје са хемијским особинама арсена, који се јавља у више валентних стања. Тривалентни и петовалентни арсен који су од значаја за животну средину, су од стране различитих агенција за заштиту животне средине препознати као токсичне материје. Износи литературне податке о примени арсена(III) у медицини, али са освртом да арсен изазива морфолошке промене и фрагментацију ДНК, и да се сматра узрочником стварања солидних тумора.

Потпоглавље „*Извори арсена*“ садржи детаљан опис присуства арсена у води као резултат природних процеса и антропогених утицаја, дати су подаци о штетности присуства арсена(III) и арсена(V) у природним водама, и покушајима да се смањи или неутралише њихова токсичност. Позивајући се на литературне податке, следи детаљан опис о пореклу арсена у подземним водама Војводине, и о проблему присуства арсена у води за пиће у концентрацији која је изнад дозвољених вредности.

У потпоглављу „*Арсен у организму*“ на основу података из литературе, износи се детаљан приказ дистрибуције арсена у организму, његовој способности да се акумулира у органима, нарочито у бубрезима, јетри, слезини, плућима, костима. Као последице хроничног излагања арсену наводе се инактивација ензима, оштећење функције многих органа, појава дијабетеса, исхемија срца, неуропатија. Посебно је дат преглед штетног ефекта арсена на женски репродуктивни систем, где изложеност арсену доводи до поремећаја неуроендокриног система, смањења броја зрелих фоликула и повећања броја атретичних, што смањује плодност.

Потпоглавље под насловом „*Репродуктивни систем*“ садржи детаљан опис репродуктивног система жена, неурохуморалних механизма контроле репродуктивног циклуса, детаљан опис грађе јајника и процеса овогенезе. Следи опис репродуктивног система женки миша, јајника, процеса овогенезе, као и приказ сличности и разлика између ова два репродуктивна система. Описан је и еструсни циклус женке миша који се састоји од проеструса, еструса, метеструса и диеструса, четири фазе које се могу идентификовати на основу цитолошких карактеристика десквамираних ћелија вагиналних епитела.

С обзиром на важност испитивања утицаја арсена у пијаћој води на репродуктивну способност женки мишева, током три узастопне генерације, кандидаткиња је у поглављу **ЦИЉ ИСТРАЖИВАЊА**, јасно дефинисала следеће циљеве: бројање младунаца по женки миша у свакој генерацији; мерење количине депонованог арсена у једнодневним младунцима и органима женки мишева; анализа нивоа естрогена и прогестерона; праћење еструсног циклуса; бројање жутих тела и фоликула; анализа потенцијалних хистолошких промена; детектовање рецептора за естроген; утврђивање броја микронуклеуса и статистичка обрада резултата.

Поглавље **МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДЕ** садржи детаљан опис дизајна експеримента, као и свих коришћених експерименталних метода. На почетку дати су подаци о

коришћеним експерименталним животињама мужјацима и женкама мишева соја NMRI старости 0-6 месеци, који су током експеримента држани у групним кавезима у контролисаним условима.

У првом потпоглављу *„Формирање генерација експерименталне групе“* дат је детаљан опис о броју мужјака и женки у кавезима, као и о начину формирање све три генерације. Мишеви су подељени у три групе – контролну, која је пила воду из водоводне мреже у којој нема арсена, и две експерименталне групе које су третиране арсен(III)-оксидом, у различитим концентрацијама, еквивалентним хуманим вредностима којима су изложени људи, с тим да је у другој групи примењена десет пута јача концентрација него у првој експерименталној групи.

Друго поглавље *„Бројање младунаца по женки миша“* садржи податке о бројању живорођених младунаца по женки миша у леглу у периоду од 75 дана, периоду од када су женке спојене са мужјацима у кавез до окота.

Треће поглавље *„Анализа количине депонованог укупног арсена“* представља употребу савремене методе (ICP-MS), за анализу количине депонованог укупног арсена у једнодневним младунцима, као и у јајницима, јетри, бубрезима и мозгу женки мишева.

У четвртном поглављу *„Анализа женских полних хормона (естрогена, прогестерона)“* описан је начин како је у диеструсу женки, након жртвовања, пункцијом срца узета крв ради анализе хормона ELISA тестом.

Пето поглавље *„Одређивање фазе еструсног циклуса“* даје опис о начину узимања вагиналног испирка, прављења размаза, ради одређивања фаза еструсног циклуса.

Шесто поглавље *„Бројање жутих тела и оваријалних фоликула миша“* садржи детаљне податке о броју анализираних женки мишева из сваке групе из три узастопне генерације, ради мерења укупног броја жутих тела и броја оваријалних фоликула.

У седмом поглављу *„Хистолошка анализа пресека оваријума“* дат је опис начина припреме узорка, како за рутинско хистолошко бојења, тако и за специјална бојења, у циљу откривања потенцијалних хистолошких промена оваријума.

Осмо поглавље *„Имунохистохемија“* представља опис припреме пресека оваријума за имунохистохемијску локализацију рецептора естрогена у јајницима.

Девето поглавље *„Микронуклеус тест“* даје детаљан опис о укупном броју мишева који је подељен у три групе у зависности да ли су примали арсен, физиолошки раствор или бензидин ради спровођења микронуклеус теста.

У десетом поглављу *„Статистичка анализа“* наведени су статистички тестови коришћени за обраду експерименталних резултата.

Поглавље **РЕЗУЛТАТИ** организовано је у неколико целина, добијене експерименталне резултате, кандидаткиња је приказала табеларно, графички и илустративно.

На почетку је констатовано да примењене концентрације арсена нису довеле до симптома тровања, женке су се спонтано париле са мужјацима и остајале gravidне. Резултати анализе броја окоћених младунаца по женки миша у првој и другој експерименталној групи, током три узастопне генерације, показали су смањен број младунаца у односу на контролну групу.

Резултати анализе количине укупног арсена депонованог у једнодневним младунцима показали су да су у обе експерименталне групе забележени раст количине депованог арсена из генерације у генерацију, али је количина акумулираног арсена била знатно већа у другој експерименталној групи у поређењу са првом. Следи приказ

депованог арсена у различитим органима женки мишева, где је констатовано да је највеће депоновање забележено у бубрезима, јетри, затим у јајницима и мозгу. Уочено је да се количина депованог арсена повећавала у свакој генерацији и да су вредности увек биле веће у другој експерименталној групи у односу на прву.

У наставку су представљени резултати анализе естрогена и прогестерона, где је забележен пад нивоа оба хормона у првој експерименталној групи све три генерације мишева у односу на контролу. Резултати у другој експерименталној групи показали су пад оба хормона у првој генерацији, али је у другој и трећој генерацији забележен пораст нивоа оба хормона у поређењу са првом генерацијом.

Следи анализа еструсног циклуса женки мишева, где је констатовано да није било промена у трајању појединачних фаза између контролне и прве експерименталне групе, у све три генерације, док је у другој експерименталној групи, уочено дуже трајање диеструсне фазе, у односу на прву експерименталну групу и контролу.

Резултати анализе броја жутих тела миша показали су да се број знатно смањило у другој и трећој генерацији прве експерименталне групе, и у све три генерације друге експерименталне групе у односу на контролну групу. Просечан број укупних фоликула био је смањен у обе експерименталне групе у све три генерације. Морфометријска анализа је показала да је просечан број антралних фоликула сличан укупном броју фоликула, док је просечан број атретичних фоликула већи у обе експерименталне групе у све три генерације.

Хистолошка анализа структуре јајника после примене специјалних метода бојења показала је да је у контролним групама структура јајника била очувана. У првој генерацији код обе експерименталне групе, бојење Азаном и бојење по Масону показало је присуство колагених влакана око *theca folliculi*, жутих тела, око крвних судова и у строми, док је PAS бојење било најинтензивније у *zona pellucida*. Експресија естрогених рецептора била је присутна у жутих телима, и гранулоза ћелијама антралних фоликула. У другој генерацији прве експерименталне групе, нису запажене структурне промене у односу на прву генерацију, експресија естрогених рецептора била је слична. Без битних промена била је и структура јајника друге експерименталне групе, осим што је експресија естрогених рецептора у овој групи била присутна и у гранулоза ћелијама атретичних фоликула. Трећа генерација обе експерименталне групе била је без битних разлика у односу на претходне две генерације, осим што је у другој експерименталној групи имунопозитивност естрогених рецептора показана и у ћелијама интерстицијалних жлезда.

На крају кандидатиња износи податке анализе броја микронуклеуса, где вредности добијене статистичком обрадом, показују да се број микронуклеуса код третираних животиња знатно повећао у односу на негативну контролну групу.

У поглављу **ДИСКУСИЈА** кандидатиња коментарише резултате докторске дисертације поредећи их са релевантним, али не тако бројним литературним подацима, с обзиром да нема података о ефекту било којег токсичног агенса на три узастопне генерације мишева. У првом делу коментарише како дуго излагање малим количинама арсена, доводи до кумулативног ефекта, који може да проузрокује настанак различитих оштећена у организму. Резултати ове студије су показали да долази до смањеног броја окоћених младунаца из генерације у генерацију, с тим да се у другој експерименталној групи гравидитет јављао касније у односу на прву експерименталну групу. Ови подаци указују да је кумулативан ефекат арсена директно узроковао поремећај у репродуктивној

функцији. Литературни подаци показују да излагање арсену током трудноће доводи до раличитих компликација, укључујући губитак фетуса и превремени порођај.

У наставку кандидаткиња наводи да је депоновање арсена било највеће код једнодневних младунаца треће генерације у обе експерименталне групе, као и да је пораст количине арсена из генерације у генерацију потврђен и у другим органима, са највишим вредностима такође у трећој генерацији.

Затим следи дискусија о утицају примењених концентрација арсена на репродуктивне хормоне, где су резултати показали да арсен доводи до смањења нивоа естрогена и прогестерона у првој експерименталној групи, док су резултати друге и треће генерације, друге експерименталне групе, показали да је ниво хормона повећан у односу на прву генерацију, и да се вратио на контролни ниво, што указује да се организам посебним механизмима адаптира на стресне ситуације.

Кандидаткиња затим коментарише да није било промена у трајању фаза еструсног циклуса код прве експерименталне групе у односу на контролу, али да је код друге експерименталне групе уочено дуже трајање диеструсне фазе, у односу на прву групу и контролу, што наводи на закључак да је узрок томе низак ниво естрогена.

Анализа просечног броја жутих тела и оваријалних фоликула разликовала се у свакој генерацији у обе експерименталне групе. За разлику од ниских доза арсена, високе дозе довеле су до постепеног смањења просечног броја одређених структура из генерације у генерацију, што наводи на закључак да организам има регулаторне механизме када је изложен већим дозама арсена.

Дискусија се даље наставља на примену специјаних бојења ради уочавања потенцијалних структурних промена јајника. PAS бојења су показала мале промене у *zona pellucida* у свим генерацијама код обе експерименталне групе, док је Азан и трихромно бојење по Масону детектовало повећано присуство колагених влакана око крвних судова, жутих тела и око атретичних фоликула, што је било у складу са подацима из литературе. Мали броје ћелија у апоптози уочених у трећој генерацији друге експерименталне групе, такође се сматра као последица кумулативног дејства арсена. Како већа оштећења ткива нису детектована, кандидаткиња претпоставља да организам под стресом активира специфичне механизме одбране са незнатним последицама по ткиво. Из литературе је познато да је арсен ендокрини ометач, и у овој дисертацији кандидаткиња је применом имунохистохемијских метода хтела да покаже да ли арсен утиче на локализацију рецептора за естроген у јајницима. У свим генерацијама код обе експерименталне групе, резултати су показали имунопозитивност у жутих телима, у ћелијама гранулозе антралних и атретичних фоликула.

На крају кандидаткиња коментарише да повећан број микронуклеуса код обе тестиране групе у односу на негативну контролу, иде у прилог констатацији да је арсен генотоксичан агенс.

У поглављу **ЗАКЉУЧЦИ** кандидаткиња је на основу добијених резултата, јасно формулисала закључке докторске дисертације.

Примењене дозе арсена(III) изазвале су смањење нивоа естрогена и прогестерона, што је за последицу имало смањен број младунаца из генерације у генерацију, чиме је доказано да је арсен снажан ендокрини ометач, који не утиче на плодност, али ремети функцију репродуктивног система женки мишева.

Иако је познато да арсен има кумулативан ефекат, у овој дисертацији је по први пут праћено депоновање арсена у три узастопне генерације мишева. Резултати су јасно

показали да се количина депонованог арсена повећавала у свакој следећој генерацији, како код једнодневних младунаца, тако и у ораганима женки мишева, с тим да је депоновање арсена било различито код различитих органа, али су највеће количине арсена регистроване у трећој генерацији друге експерименталне групе.

У овој дисертацији је први пут показано да кумулативан утицај арсена током три генерације, изазива промене у броју и динамици развића фоликула.

Такође се кумулативан утицај арсена одразио и на локализацију естрогених рецептора у обе експерименталне групе у све три генерације.

Повећан број микронуклеуса у обе експерименталне групе доказује да је дошло до оштећења хромозома, али дозна зависност и механизам деловања арсена није разјашњен. Кандидаткиња је на основу добијених резултата изнела закључак, да концентрација арсена која је измерена у водоводној мрежи у Банату, потенцијано може да има негативан утицај на репродуктивни капацитет животиња и људи.

У последњем поглављу **ЛИТЕРАТУРА** наведено је **117** релевантних библиографских јединица, и три инернет странице. Литературни извори су на адекватан начин цитирани у тексту докторске дисертације.

Радови и конгресна саопштења из докторске дисертације

Б1. Радови у часописима међународног значаја

М23 Рад у међународном часопису

1. **Birinji A.**, Lalošević D., Mihaljev Ž., Pogrmic –Majkić K., Radovanović A., Glišić R., Marin M. (2024). Impact of arsenic on the mouse ovaries over three generations. Acta Veterinaria Beograd, Vol 74, No 1. <https://doi.org/10.2478/acve-2024-0005>
2. **Birinji A.**, Pogrmic -Majkić K., Mihaljev Ž., Marin M., Lalošević D. (2024). Cumulative effect of arsenic on the number of mouse offspring and the female reproductive hormones in mice. Acta Veterinaria Hungarica. <https://doi.org/10.1556/004.2023.00965>

Б2. Рад у часопису националног значаја М52

Birinji A., Mihaljev Ž., Lalošević D., Marin M. (2022). Deposition of arsenic in the organs of an experimental model of male mice exposed to the maximum concentration equivalent to the water supply network of Banat. MD - Medical Data, 14(1-2), 041-044.

Б3. Конгресна саопштења на научним скуповима

М33 – Саопштења са међународног скупа штампана у целини

Birinji A., Mihaljev Ž., Lalošević D. (2021). The amount of arsenic deposited in the organs of male mice exposed to the concentration present in the water supply network of the municipality of Zrenjanin. XXV International ECO- conference, September 22-24, Novi Sad, Proceedings, pp. 94-101.

М34 Саопштење са међународног скупа штампана у изводу

1. **Birinji A.**, Pogrmic –Majkić K., Mihaljev Ž., Marin M., Lalošević D. (2023). The effects of orally administered arsenic on the number of mice cubs. 13th International Congress of the Serbian Society of Toxicology and 1st Tox SEE Regional Conference, May 10-12, Belgrade, Serbia, Book of Abstracts, p. 272.
2. **Birinji A.**, Lalošević D., Marin M. Effect of arsenic(III)- oxide on reproductive organs of female mices. (2022). 16th MCM, September 4-9, Brno, Czech Republic, Book of Abstracts, p. 242-243.

М64 Саопштења са скупа националног значаја штампана у изводу

1. **Birinji A.**, Lalošević D., Marin M. (2022). Influence of exposure to arsenic in drinking water in liver of mices. Treći kongres biologa, September 21-25, Zlatibor, Serbia, Book of Abstracts, p.184.
2. **Birinji A.**, Pogrmic –Majkić K., Marin M., Lalošević D. (2022). Potential changes in the estrous cycle of female mice exposed to arsenic(III)-oxide during three consecutive generations. XI Conference of the Serbian Biochemical Society, September 22-23, Novi Sad, Serbia, Book of Abstracts, p. 52.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације **„Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води“**, аутора **Аните Ј. Бирињи**, подударане текста износи 13%. Детаљном анализом добијеног Извештаја утврђено је да је подударане са пет извора било 1%, а у свим преосталим случајевима мање од 1%. Уочене подударности текста односе се на коришћење термина у претходно публикованим резултатима из исте области истраживања, као што су називи хемијских једињења, назива коришћених стандардизованих експерименталних метода и процедура, библиографских података о коришћеној литератури, назива институција, личних имена, научних звања и афилијација чланова комисије и аутора, као и коришћење кратких фраза, уобичајених у научним радовима, што је у складу са чланом 9. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду („Гласник Универзитета у Београду“ број 201/18).

На основу свега изнетог, Извештај указује на оригиналност докторске дисертације кандидата **Аните Ј. Бирињи**, под насловом **„Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води“**, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

Мишљење и предлог Комисије

Докторска дисертација **Аните Ј. Бирини**, под насловом „Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води“, представља прву студију о штетном кумулативном дејству арсена, на три узастопне генерације мишева. Комисија констатује да је тема дисертације оригинална, а дефинисани циљеви, методолошки приступ и добијени резултати представљају значајан допринос у области изучавања ефеката арсена на женски репродуктивни систем. Комисија посебно жели да истакне да је по први пут у овој студији показано, да је кумулативан утицај арсена у води за пиће, кроз три узастопне генерације мишева, довео до поремећаја овулације и дисбаланса женских полних хормона, што је за последицу имало смањену плодност женки мишева, и смањен број окоћених младунаца. Иако се резултати ове дисертације односе првенствено на анимални модел, они могу да укажу на превенцију очувања репродуктивног здравља људи, посебно у условима где је становништво принуђено да користи воду у којој се налазе тешки метали. Резултати ове докторске дисертације објављени су у међународним часописима, као и у часописима националног значаја, а представљени су и у виду неколико саопштења на међународним и националним научним скуповима, што иде у прилог значају проблематике и добијеним резултатима.

Имајући у виду истраживачку активност кандидаткиње и значај постигнутих резултата, Комисија има задовољство да предложи Наставно-научном већу Биолошког факултета Универзитета у Београду, да прихвати овај извештај и одобри **Анити Ј. Бирини** јавну одбрану докторске дисертације под насловом „Утицај различитих концентрација арсена(III) у пијаћој води“.

У Београду, 21. 2. 2024. године

КОМИСИЈА:

др Анита Радовановић, редовни професор,
Универзитет у Београду, Факултет ветеринарске медицине

др Жељко Михаљев, виши научни сарадник,
Научни институт за ветеринарство „Нови Сад“

др Маја Чакић-Милошевић, ванредни професор,
Универзитет у Београду, Биолошки факултет