

STANISŁAW SZULIŃSKI, ARTUR STRUSIŃSKI

PLASTYCZNOŚĆ PAMIĘCIOWA MÓZGU BIAŁYCH SZCZURÓW
NARAŻONYCH DŁUGOOKRESOWO NA TYTAN W WODZIE DO PICIA

BRAIN MEMORY PLASTICITY IN WHITE RATS EXPOSED FOR LONG TIME
BY TITANIUM IN DRINKING WATER

Zakład Higieny Komunalnej
Państwowy Zakład Higieny
00–791 Warszawa, ul. Chocimska 24
Kierownik: doc. dr hab. S. Maziarka

Białym szczurom samcom podawano przez szesnaście miesięcy z wodą do picia roztwory wodne chlorku tytanu (TiCl₃) w stężeniach 5 i 25 mg w litrze. Po trzech i piętnastu miesiącach narażenia wykonano test sprawności różnicowania i zapamiętywania bodźców wzrokowych przez szczury. Stwierdzono, iż długotrwałe podawanie tytanu nie powodowało istotnych różnic w efektywności uczenia się szczurów z tych grup w porównaniu z wynikami grupy kontrolnej.

WSTĘP

Tytan jest pierwiastkiem wszechobecnym w glebie, wodzie i powietrzu, choć występuje w ilościach mało znaczących. Ze względu na cenne właściwości jest on w coraz większych ilościach wydobywany, przetwarzany i zużywany. Wzrasta więc jego zawartość w środowisku. Tytan jest stosowany przy produkcji stopów metali o dużej twardości i odporności na korozję. Dwutlenek tytanu to pigment do farb, tworzywno i kosmetyków. Trójtlenek tytanu jest półproduktem przy wytwarzaniu związków tyta-noorganicznych oraz katalizatorów dla przemysłu chemicznego.

Ustalono, że w powietrzu miejskim stężenia tytanu wynoszą poniżej 0,1 µg/m³, a w powietrzu wiejskim są jeszcze niższe. Poza ekspozycją zawodową ilość tytanu absorbowanego przez płuca ma małe znaczenie – wynosi bowiem mniej niż 1% całej pobieranej przez człowieka ilości. Mała rozpuszczalność związków tytanu w wodzie jest przyczyną występowania niewielkich jego ilości w wodach powierzchniowych. Stężenie tytanu w wodzie zależy zarówno od jego związków rozpuszczalnych jak i ilości cząstek tytanu zawieszonych w wodzie. Dzielne przyswajanie tytanu z wodą do picia ocenia się jako bardzo niskie – poniżej 5 µg na dzień.

Głównym źródłem ekspozycji człowieka na tytan jest żywność. Przyczynia się do tego stosowanie dwutlenku tytanu do przyspieszania procesu dojrzewania niektórych serów i do poprawy ich jakości. Ustalono, że typowe diety w USA zawierały 300–400 µg, a w Wielkiej Brytanii 800 µg tytanu na dzień, jednak tylko około 3% dostarczonej dawki jest absorbowane przez organizm. Istotnym powodem trudności precyzyjnego

ustalenia dziennego wchłaniania tytanu przez człowieka są zasadnicze różnice między regionalnymi upodobaniami konsumpcyjnymi [4, 5, 8, 10, 16].

Chociaż tytan jest słabo absorbowany i zatrzymywany przez rośliny i zwierzęta to jednak znaczne jego ilości mogą występować w zbiorach na ograniczonych obszarach jako wynik zanieczyszczenia gleby przez opady skażonego popiołu oraz wykorzystywanie przemysłowych i domowych odpadów do nawożenia ziemi uprawnej. Dotychczas brak jest dowodów na to, iż związki tytanu w stężeniach występujących w środowisku mogą być szkodliwe dla ludzi, chociaż takiej ewentualności nie można wykluczyć. Doniesienia z piśmiennictwa wskazują, że tytan podawany w postaci związków rozpuszczalnych w wodzie wpływa na przeżywalność, reprodukcję oraz masę ciała zwierząt laboratoryjnych. Stwierdzono też, że może kumulować się w mózgu przechodząc przez łożysko oraz barierę krew – mózg, ale nie znaleziono danych dotyczących badania wpływu na sprawność czynnościową ośrodkowego układu nerwowego [11, 12].

Wydawało się celowe zbadanie czy w warunkach eksperymentu u szczurów narażonych długotrwale na tytan w wodzie do picia wystąpią zakłócenia efektywności uczenia się świadczące o wpływie na plastyczność pamięciową mózgu podobnie jak przy ekspozycji na inne substancje chemiczne [1–3, 6, 7, 9, 14, 15, 17, 18].

MATERIAŁ I METODY

Badanie przeprowadzono na dziewięćdziesięciu białych szczurach, samcach ze stada Pzh: WIS hodowli własnej. Podzielono je losowo na trzy grupy po 30 sztuk w każdej. Grupa pierwsza (kontrolna) piła wodę wodociągową, a pozostałe grupy – wodne roztwory chlorku tytanu (TiCl_3). Grupa druga otrzymywała 5 mg tytanu rozpuszczonego w litrze wody do picia – co w przeliczeniu stanowiło przyjmowaną w czasie 1 doby dawkę 0,45 mg na 1 kg masy ciała szczura. Grupa trzecia piła wodę zawierającą 25 mg tytanu w litrze, a więc otrzymywała dawkę dobową 2,25 mg/kg masy ciała. Wszystkie płyny podawano bez ograniczeń, a ich zużycie rejestrowano. Zwierzęta karmiono granulowaną mieszanką standardową LSM Wytwórni Pasz Centralnego Laboratorium Przemysłu Paszowego zawierającą: otręby, śruty zbożowe, mączkę rybną, mleko w proszku, drożdże pastewne, mączkę z suszu zielonek oraz dodatki mineralne i witaminy.

Szczury umieszczono po pięć sztuk w hodowlanych klatkach polietylenowych o powierzchni podłogi 1700 cm^2 każda. W pomieszczeniu, w którym przebywały szczury utrzymywano temperaturę $21\text{--}23^\circ\text{C}$, wilgotność ok. 55%, a oświetlenie trwało 12 godzin na dobę. W czasie doświadczenia szczury były okresowo ważone.

Po trzech i piętnastu miesiącach ekspozycji szczury przekładano do specjalnie przystosowanych klatek hodowlanych, w których uczyły się różnicowania i zapamiętywania bodźców wzrokowych. W okresie uczenia wszystkie zwierzęta otrzymywały do picia wodę wodociągową. Originalna elektroniczna przystawka rejestrowała wszystkie próby prawidłowe i nieprawidłowe w cyklu całodobowym [13]. Badanie każdego zespołu szczurów przebywających uprzednio w jednej klatce hodowlanej trwało pięć dni i nocy. Trening prowadzono równolegle na przedstawicielach wszystkich grup aby zminimalizować wpływ niekontrolowanych, zmiennych czynników zewnętrznych na wyniki uczenia się. Wykonanie powtórnego cyklu uczenia po piętnastomiesięcznym narażeniu miało na celu stwierdzenie czy ślady pamięciowe wytworzone w czasie pierwszego uczenia w mózgu eksponowanych szczurów wywarły uchwytyny wpływ na wyniki otrzymane w drugim cyklu uczenia.

Efektywność uczenia się każdej z grup szczurów oceniano na podstawie wskaźnika procentowego – stosunku liczby omyłek do ogólnej liczby prób w każdej grupie, a wyniki grup intoksykowanych porównywano z wynikami grupy kontrolnej. Do statystycznego opracowania wyników zastosowano test „u”. Poziom istotności różnic przyjęto przy $p \leq 0,05$.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Uzyskane wyniki badań przedstawiono w tabeli I i II.

Tabela I. Liczba prób prawidłowych i błędnych po trzech i piętnastu miesiącach narażania na tytan
Number of correct and incorrect attempts after three and fifteen months exposition to titanium

Cykl uczenia	Grupy zwierząt	Liczba prób	% błędnych prób
I	kontrolna	9650	31,4
	5 mg/l	10 261	31,7
	25 mg/l	9946	31,9
II	kontrolna	5093	20,6
	5 mg/l	4927	20,0
	25 mg/l	4771	21,1

Tabela II. Masa ciała szczurów w gramach (wartości średnie i odchylenia standardowe) w kolejnych miesiącach ekspozycji na tytan
Body mass of the rats in grams (means and standard deviations) in successive months of exposition to titanium

Grupy zwierząt	Miesiące	0	3	6	12	15
	Kontrolna		103 + 12	351 + 26	400 + 23	430 + 32
5 mg/l		105 + 12	349 + 31	433 + 34	433 + 34	455 + 58
25 mg/l		104 + 14	335 + 3	418 + 37	418 + 37	427 + 41

W czasie trwającego piętnaście dni pierwszego cyklu uczenia się różnicowania i zapamiętywania bodźców wzrokowych, szczury wszystkich grup wykonały łącznie 29857 prób. Wyniki uczenia szczurów grupy kontrolnej różniły się nieznacznie od wyników uzyskanych przez szczury grupy drugiej otrzymującej 5 mg tytanu w litrze wody i trzeciej otrzymującej 25 mg w litrze. Szczury grupy kontrolnej wykonały 9650 prób, w tym 31,4% prób błędnych. Wyniki grupy drugiej, to odpowiednio 10261 prób, w tym 31,7% błędów, a grupy trzeciej – 9946 prób, 31,9% prób błędnych. Tak więc dawka dobową wynosząca 0,45 mg/kg w grupie drugiej okazała się nie działająca choć ponad stukrotnie przewyższała dawkę 4,3 mg/kg pobieraną z żywnością i wodą przez człowieka w czasie jednej doby. Także dawka 2,25 mg/kg przyjmowana przez grupę trzecią, choć ponad pięćsetkrotnie wyższa, nie wywarła wpływu na plastyczność pamięciową mózgu białych szczurów.

W czasie drugiego cyklu uczenia się, a więc po piętnastu miesiącach narażenia, zwierzęta wykonały łącznie 14791 prób. W tym czasie grupa I (kontrolna) popełniła 20,6% błędów, grupa II 20,0%, a trzecia 21,1%. Okazało się, że szczury wszystkich grup posiadały jednakowo utrwalone ślady pamięciowe po wyuczonym i zapamiętanym przed dwunastoma miesiącami sposobie reagowania na bodźce świetlne. Świadczą o tym wskaźniki procentowe błędów u obu grup zatrutowanych i kontrolnej – niemal

identyczne i o około połowę niższe niż poprzednio. Powyższe wyniki wskazują na brak istotnych różnic między wynikami grupy kontrolnej a grupami narażonymi. Dotyczy to uczenia w obu cyklach badań. Także inne oceniane parametry (spożycie płynów, masa ciała, wygląd zwierząt i ich zachowanie) nie wykazywały różnic między grupami.

WNIOSKI

1. Długotrwałe narażanie na tytan (TiCl_3) w stężeniach 5 i 25 mg na litr wody do picia nie spowodowało zakłócenia plastyczności pamięciowej mózgu szczurów.
2. Tytan w stężeniach występujących w środowisku nie stanowi zagrożenia dla ośrodkowego układu nerwowego organizmów stałocieplnych.

S. Szuliński, A. Strusiński

BRAIN MEMORY PLASTICITY IN WHITE RATS EXPOSED FOR LONG TIME BY TITANIUM IN DRINKING WATER

Summary

The experiment was conducted on male white rats from breeding base of the National Institute of Hygiene: WIS own breeding. During sixteen months the drinking water with TiCl_3 in concentrations 5 and 25 mg/l, what is equivalent respectively 0,45 and 2,25 mg per 1 kg of daily weight of rats, was given the animals. After 3 and 15 months of exposure the rats were taught to differentiate and remember sight effects. The investigation of each cluster of rats, living previously in the same cage, was going non-stop by 24 hours for 5 days. The training was carried on in the special adopted cages making possible to record all correct and incorrect attempts in daylong cycle.

Percentage indicator, the ratio of mistakes to all number of the attempts, was used for assessment the training effectiveness in each group and the result in intoxicated group were compared with control group. During the whole time of exposition the supplying drinking water with TiCl_3 in concentrations 5 and 25 mg/l has not caused changes in rats confirming possibility to evoke disorders of brain memory plasticity.

PIŚMIENICTWO

1. *Chyba A.*: Toksyczność chlorku winylu podawanego drogą oddechową. Roczn. PZH 1980, 30, 615–621.
2. *Chyba A.*: Badanie toksyczności mieszaniny chlorku winylu i fenolu w powietrzu. Roczn. PZH 1981, 32, 357–361.
3. *Chyba A., Szulińska G., Szuliński S.*: Toksyczność mieszaniny chloroformu i 2,4-dichloro-fenolu podawanych w wodzie do picia białym szczurom. Roczn. PZH 1987, 38, 313–321.
4. *Hamilton E.I., Minski M.J.*: Abundance of the chemical elements in man's diet and possible relations with environmental factors. Sci. Total Environ. 1972/1973, 1, 375–394.
5. *Hamilton E.I., Minski M.J., Cleary J.J.*: The concentration and distribution of some stable elements in healthy human tissues from the United Kingdom. An environmental study. Sci. Total Environ. 1972/1973, 1, 341–347.
6. *Kossut M.*: Uczenie się i pamięć – modyfikacja połączeń synaptycznych. W: Mechanizmy plastyczności mózgu, red.: M. Kossut. PWN, Warszawa 1994, 116–133.
7. *Lederer R., Elsner J., Zbinden G.*: Animal Models in Behavioural Toxicology and Teratology. Recent Developments in Toxicology: Trends, Methods and Problems. Arch. Toxicol., Suppl. 1991, 14, 15–19.
8. *Nikonow M., Urbanek-Karłowska B.*: Toksykologia żywności, PZWL, Warszawa 1987.

9. *Sadowski S., Szuliński S., Szulińska G.*: Wpływ pór roku na wyniki intoksykacji szczurów fosforem. Roczn. PZH 1981, 32, 351–356.
10. *Schroeder H.A., Balassa J.J., Tipton J.H.*: Abnormal trace metals in man: titanium. J. Chron. Dis. 1963, 16, 55–69.
11. *Schroeder H.A., Balassa J.J., Vinton Jr W.H.*: Chromium, lead, cadmium, nickel and titanium in mice: Effect on mortality, tumors and tissue levels. J. Nutr. 1964, 83, 239.
12. *Schroeder H.A., Mitchener M.*: Toxic Effects of Trace Elements on the Reproduction of Mice and Rats. Arch. Environ. Health 1971, 23, 102–106.
13. *Szuliński S.*: Zastosowanie szybkiej metody oceny sprawności ośrodkowego układu nerwowego małych zwierząt laboratoryjnych w badaniach sanitarno – toksykologicznych. Roczn. PZH 1978, 29, 677–681.
14. *Szuliński S., Chyba A., Maziarka S.*: Przewlekłe toksyczne działanie substancji powierzchniowo czynnych o różnej budowie chemicznej. Roczn. PZH 1996, 47, 159–162.
15. *Szuliński S., Szulińska G.*: Badania toksyczności przewlekłej mieszaniny ołowiu, kadmu i żelaza podawanych białym szczurom w wodzie do picia. Roczn. PZH 1994, 45, 225–230.
16. Titanium. Environmental Health Criteria 24, WHO, Geneva 1982
17. *Wiaderna D., Tomas T., Łuczak C., Gralewicz S.*: Ocena baterii testów do wykrywania neurotoksyczności na podstawie narażenia na chlorfenwinfos. Med. Pracy 1993, 2, 141–152.
18. Zasady i metody oceny neurotoksycznych skutków narażenia na związki chemiczne. Kryteria Zdrowotne Środowiska. Instytut Medycyny Pracy, Łódź 1991.

Otrzymano: 1999.11.25