

**INSTYTUT FIZYKI JADROWEJ
INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS
ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ**



KRAKÓW

INP - RAPORT No 1335/B

**MUTACJE SOMATYCZNE U TRADESCANTIA
JAKO UKŁAD MODELOWY DO BADANIA
SKUTKÓW CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH**

ANTONINA CEBULSKA-WASILEWSKA

KRAKÓW 1986

**MUTACJE SOMATYCZNE U TRADESCANTIA JAKO UKŁAD MODELOWY
DO BADANIA SKUTKÓW CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH**

**SOMATIC MUTATIONS IN TRADESCANTIA AS A MODEL SYSTEM FOR
STUDYING THE EFFECTS OF THE ENVIRONMENTAL AGENTS**

Antonina Cebulska-Wasilewska

Instytut Fizyki Jądrowej, Kraków 1988

**WYDANO NAKŁADEM
INSTYTUTU FIZYKI JĄDROWEJ W KRAKOWIE
UL. RADZIKOWSKIEGO 152
NA PRAWACH RĘKOPISU**

Kopię kserograficzną, druk i oprawę wykonano w IFJ Kraków

Wydanie I

Zam. 269/86

Nakład 75 egz.

Praca prezentuje zastosowanie roślinnego układu modelowego do badań skutków biologicznych działania mutagenów chemicznych i promieniowania jonizującego. Przedstawiona metoda oparta jest na pomiarze częstości mutacji somatycznych w komórkach włosków pręcików heterozygotycznych ze względu na kolor kwiatów klonów *Tradescantia*.

Przedstawiono wyniki badań nad współdziałaniem mutagenów chemicznych z promieniowaniem w indukowaniu mutacji. Wykazano, że zachodzi efekt synergistyczny w przypadku skojarzonego działania promieniowania i takich mutagenów jak EMS oraz DBE. Stwierdzono, że efekt ten w rejonie niskich dawek jest proporcjonalny do wielkości dawki promieniowania i ekspozycji na chemiczny mutagen. Stwierdzono ponadto, że traktowanie roślin przed napromienianiem roztworem fluorku sodu modyfikuje efekt promieniowania. Z przeprowadzonych badań wynika, że fluor zaburza prawdopodobnie procesy naprawy DNA. Wykazano również, przydatność metody do badań efektywności mutagennej przemysłowych zanieczyszczeń powietrza.

This work presents the application of the plant model system for studying the biological effects of ionizing radiation and chemical mutagens. The model system is based on the somatic mutation frequency in stamen hair cells of *Tradescantia* clones heterozygous for flower color. The interaction of chemical mutagens with radiation in the induction of somatic mutations were investigated.

The results demonstrate the synergistic interaction between radiation and chemical mutagens like EMS and DBE. The synergistic effect is clearly manifested after combined treatment with radiation and chemicals. In the low dose region the effect depends on the radiation dose and chemical exposure. Other results show the influence of the fluoride treatment on the radiation effect. The fluoride treatment is likely to alter the DNA double strand breaks repair processes. Additionally the usefulness of the model system for studying the mutagenic effectiveness of the pollution in the ambient air is presented.

Spis treści

Wstęp	7
1. Zagrożenie człowieka i środowiska	
1.1. Chemizacja	8
1.2. Promieniowanie	9
1.3. Współdziałanie różnych czynników	15
2. Problemy szacowania ryzyka w zakresie niskich dawek	
2.1. Modele przyjęte w ochronie radiologicznej	20
2.2. Propozycje dla mutagenyzy środowiskowej - Rad-ekwiwalent	28
3. Tradescantia jako układ modelowy do badań laboratoryj- nych i środowiskowych	33
3.1. Pomiar częstotliwości somatycznych mutacji u Tradescantia - metodyka	34
3.1.1. Hodowla i rozwój	38
3.1.2. Rozwój pręcika i mierzenie zdarzeń letalnych.	39
3.1.3. Tworzenie barwy i mierzenie mutacji	41
3.2. Stosowane czynniki i sposób traktowania	46
3.2.1. Związki chemiczne	48
3.2.2. Napromieniowanie	50
4. Badania efektywności mutagennej promieniowania i mutagenów chemicznych	
4.1. Porównanie radiowrażliwości klonów	52
4.2. Porównanie efektywności mutagennej promieniowania i chemicznych mutagenów w działaniu niezależnym i skojarzonym	
4.2.1. Promieniowanie, EMS	59
4.2.2. Promieniowanie, DBE	65

4.2.3. Promieniowanie, fluor	74
4.2.4. Zastosowanie modelu Tradescantia do ozna- czania skażeń środowiskowych	80
5. Wnioski	
5.1. Podsumowanie wyników	84
5.2. Przydatność metody do badań	85
5.3. Znaczenie uzyskanych wyników dla ochrony środo- wiska	86
Pismienictwo	90
Wykaz ważniejszych skrótów	107

Wstęp

Jednym z głównych celów niniejszej pracy jest prezentacja metody badawczej mającej szereg zalet, szczególnie cennych w naszych warunkach. Metoda oparta na pomiarze częstotliwości mutacji somatycznych w komórkach słosków pręcików *Tradescantia* jest prosta, szybka i ekonomiczna. Mijamy nadzieję, że rezultaty tej pracy wykażą, że prezentowana metodyka przydatna jest zarówno do rozwiązywania problemów badawczych /tutaj głównym zagadnieniem będzie współdziałanie promieniowania jonizującego i chemicznych mutagenów w indukowaniu mutacji/ jak i problemów praktycznych, do jakich niewątpliwie należy próba oceny szkodliwości zanieczyszczeń środowiskowych.

Ze względu na wagę problemów związanych ze stanem środowiska naturalnego wydaje się, że niezależnie od stosowanych klasyfikacji i podziałów na badania podstawowe i użytkowe, laboratoryjne i środowiskowe, jeden cel nadrzędny jest wspólny - ochrona środowiska i człowieka. Jest to niewątpliwie idea przyświecająca ogromnej ilości prowadzonych obecnie badań. Tkwiła ona u podłoża poczynań badawczych zarówno autorki, jak i - zapewne - uczestników prac, których rezultaty będą oszczędnie omawiane w niniejszej pracy.

1. Zagrożenie człowieka i środowiska

1.1. Chemizacja

Zagrożenie środowiska stało się na całym świecie przedmiotem nie tylko ogromnego zainteresowania opinii publicznej, ale również przedmiotem licznych badań, analiz, rozważań i dyskusji. Powodem tego są ogromnie niekorzystne zmiany, jakie w wyniku dotychczasowej działalności człowieka wystąpiły niemal na całej kuli ziemskiej. Środowisko naturalne oraz prawdopodobnie jego struktura organizacyjna zostało zaburzone przez niekontrolowaną ekspansję czynników chemicznych (6,7,17,49,56,82,94,97,108-110,116,118,145,146) oraz fizycznych, do których należy zaliczyć promieniowanie zarówno jonizujące, jak i niejonizujące (2,12,27,35,132).

Konsekwencją chemizacji i przemysłowej ekspansji jest skażone środowisko: powietrze, woda i gleba (109,110,145,146). Każdego roku nowe związki chemiczne są wprowadzane na rynek w postaci preparatów medycznych, kosmetyków, pestycydów, dodatków do żywności czy też innych związków przemysłowych. Naturalną konsekwencją tego faktu jest wystąpienie zagrożenia niesunikioną ekspozycją człowieka na związki chemiczne: toksyczne lub mutagenne i także rakotwórcze. Około $2.5 \cdot 10^5$ nowych związków dochodzi każdego roku do dwóch milionów zarejestrowanych w 1972 roku (116) będących już w użyciu na świecie. Według N.Loprieno (79) w najlepszym przypadku można ocenić, że co najwyżej dla tysiąca z nich oznaczono ich mutagenną aktywność, podczas gdy liczbę chemicznych związków, które są produkowane w istotnych dla ryzyka ilościach, można oszacować na podstawie danych dla USA na co najmniej 25 000. Część tych związków, jak również produktów biologicznej syntezy (51)

może powodować mutacje. Istnieje duże ryzyko, że mutacje te akumulowane w populacji będą oddziaływać na przyszłą generację. Nie jest to jedyny aspekt zagrożenia. Wykazano, że wiele związków mutagennych ma charakter rakotwórczy. Korelacja ta dla pewnych związków organicznych wynosi aż 80 - 90 % (8,9,57).

1.2. Promieniowanie

W zasadzie jakakolwiek forma życia istniejącego na Ziemi jest nierozzerwalnie związana z ekspozycją na promieniowanie naturalnego pochodzenia, a nawet pod pewnymi względami uzależnione od niego. Promieniowanie to może pochodzić z dwóch źródeł: zewnętrznego (promieniowanie kosmiczne) oraz ziemskiego (promieniowanie pochodzące od radioaktywnych substancji wchodzących w skład chemicznej budowy skorupy ziemskiej lub występujących w atmosferze (Tabl. 1.2.1.)). Ekspozycja na te naturalnie występujące źródła promieniowania nie jest bynajmniej jednolita. Jest ona uzależniona od wielu czynników, takich jak: geograficzne uwarunkowania, poziom technologii, mobilność człowieka.

W oparciu o szczegółowe i bardzo obszerne badania Komitet ONZ d/s Efektów Promieniowania UNSCEAR 1982 (132) stwierdza, że główny udział w dawce uzyskiwanej przez człowieka pochodzi od źródeł naturalnych (2 mSv rocznie).

Pojęciem dawki pochłoniętej określamy energię przekazaną materii na drodze jonizacji przez promieniowanie przechodzące przez materię (68,132)

$$D = \bar{d}\bar{e}/dm$$

gdzie: $\bar{d}\bar{e}$ - średnia energii przekazana materii o masie dm

Tabela 1.2.1.

Roczny równoważnik dawek efektywnych od naturalnych źródeł promieniowania w rejonach "naturalnego" tła (152)

Źródło	Roczny efektywny równoważnik dawki (mSv)		
	Zewnętrzne promieniowanie	Wewnętrzne	Suma
Kosmiczne promieniowanie:			
Udział jonizującego	0.28		0.28
Udział neutronów	0.02		0.02
Kosmiczne pierwiastki		0.015	0.015
Ziemskie pierwiastki:			
Potas - 40	0.12	0.18	0.30
Rubid - 87		0.006	0.006
Uran - 238	0.09	0.95	1.04
Tor - 232	0.14	0.19	0.33
Suma	0.65	1.34	2.0

W układzie SI jednostką dawki jest 1 grej (Gy)

$$1 \text{ Gy} = 1 \text{ J kg}^{-1},$$

tradycyjna jednostka dawki

$$1 \text{ rad} = 10^{-2} \text{ Gy}.$$

W ochronie radiologicznej stosowane jest pojęcie równoważnika dawki:

$$H = DQN$$

gdzie:

D = dawka pochłonięta w (Gy)

Q = współczynnik uwzględniający rodzaj promieniowania, który przyjmuje wartości wyższe od 1 dla promienio-

wania o wysokim współczynniku liniowego przekazywania energii (LET), np. protony, neutrony, cząstki alfa charakteryzujące się wysoką (bezpośrednią lub pośrednią) gęstością jonizacji

N = współczynnik uwzględniający inne czynniki modyfikujące efekt biologiczny, ale przyjęty aktualnie przez UNSCEAR $N = 1$

Jednostką równoważnika dawki w układzie SI jest Sivert (Sv)

$$1 \text{ Sv} = 1 \text{ Jkg}^{-1}$$

dawna jednostka

$$1 \text{ rem} = 10^{-2} \text{ Sv}$$

Ze względu na różną wrażliwość różnych części i narządów ciała wprowadzono również pojęcie efektywnego równoważnika dawki

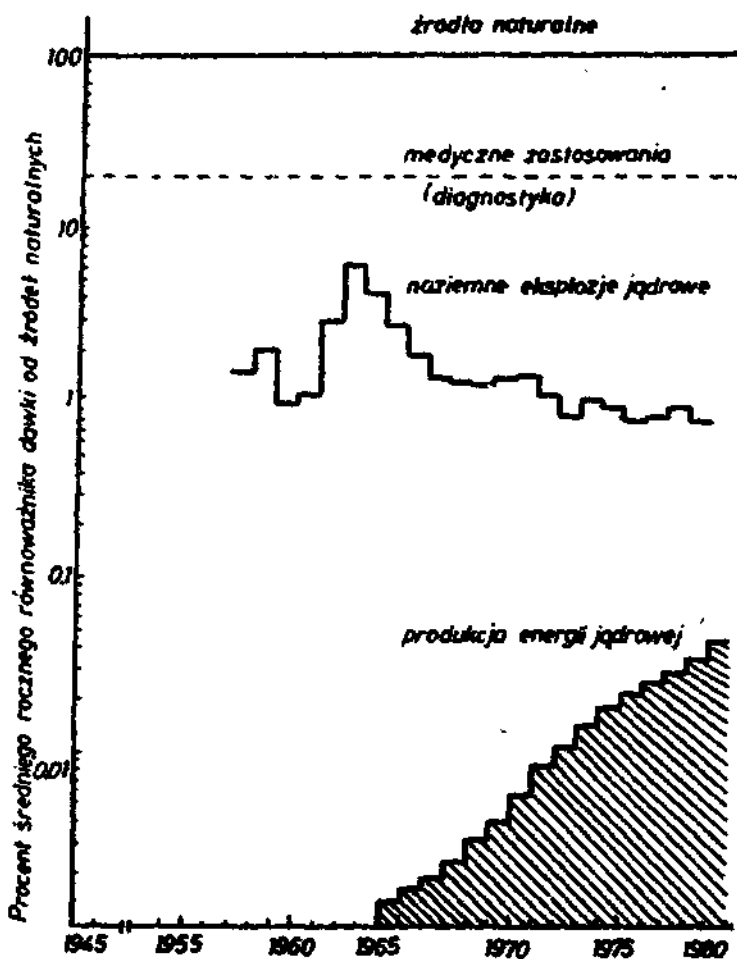
$$H_{\text{ef}} = \sum w_T \cdot H_T$$

gdzie:

w_T jest wagą statystyczną narządu T reprezentującą proporcje prawdopodobieństwa wystąpienia efektu stochastycznego w wyniku napromienienia narządu lub tkanki T do prawdopodobieństwa wystąpienia takiego efektu, gdy napromienowane jest jednolicie całe ciało

H_T jest średnim równoważnikiem dawki dla narządu T

Rys. 1.2.1. obrazuje kształtowanie się rozkładu dawek uzyskiwanych od różnych źródeł promieniowania w okresie ostatnich dziesięcioleci. Z przedstawionej zależności wynika, że drugie



Rys. 1.2.1. Rozkład równoważników dawek uzyskiwanych od różnych źródeł promieniowania (132)

w kolejności są zastosowania medyczne (0.1 - 0.2 mSv/rok). Mają one stosunkowo duży udział w całkowitej dawce i stanowią niewątpliwie największą część dawki pochodzącej od źródeł wyprodukowanych przez człowieka. W niektórych wysoko uprzemysłowionych krajach ekspozycje medyczne osiągnęły poziom dawek uzyskiwanych od naturalnych źródeł. Główną różnicą między tym źródłem ekspozycji a wszystkimi pozostałymi jest fakt, że osoby, które uzyskują tę dawkę są jednocześnie osobami bezpośrednio

oczekującymi potencjalnego zysku wynikającego z podjętego ryzyka. Wydaje się natomiast pozytywnym fakt, że całkowity efektywny udział w równoważniku dawki pochodzący od wszystkich eksplozji do 1981 roku nie przekracza jednego procenta efektywnej dawki rocznie, chociaż pochodzi on od stosunkowo dużej liczby różnorodnych radioizotopów, które drogą czy to kontrolowanych wybuchów, czy awarii dostały się do środowiska człowieka (Tabl.1.2.2.).

Różniąc się w sposób znaczny od głównej grupy jest subpopulacja pracowników wszystkich gałęzi zastosowań energii jądrowej, którzy zawodowo mogą być ekspozowani do poziomów wielokrotnie przekraczających poziom naturalnego promieniowania. Wprawdzie ta grupa mieści się w obrębie niskich dawek, ale jej liczebność wyraźnie wzrasta.

W miarę rozwijania się nowoczesnych technologii rośnie poziom ekspozycji populacji na promieniowanie niejonizujące. Instalacje radarowe, telekomunikacyjne, linie wysokiego napięcia, UV, a nawet ultradźwięki wprowadzają nowy czynnik do środowiska. Dotychczasowe badania wykazały tylko dla UV zagrożenie możliwością indukcji raka, jednak nie należy lekceważyć doniesień, że promieniowanie niejonizujące może również zwiększyć skuteczność działania innych czynników rakotwórczych(27).

Tabela 1.2.2.

Udziały w równoważniku dawki efektywnej pochodzące od radioizotopów produkowanych w wyniku wybuchów jądrowych prowadzonych do końca 1980 roku (μSv) (średnia światowa) (132)

Radioizotopy	Zewnętrzne promieniowanie	Wchłanianie (oddychanie)	Połykanie	Suma
^3H		3	44	47
^{14}C		0.3	2600	2600
^{54}Mn		0.04		0.04
^{55}Fe			9	9
^{85}Kr	0.005			0.005
^{89}Sr		2	1	3
^{90}Sr		9	110	120
^{95}Zr	200			200
^{103}Ru	17			17
^{106}Ru	53	30		83
^{131}I			33	33
^{136}Cs			0.06	0.06
^{137}Cs	370	0.4	170	540
^{140}Ba	25	0.2	0.2	25
^{141}Ce	1			1
^{144}Ce	17	37		54
^{238}Pu		1	0.005	1
^{239}Pu		25	2	27
^{240}Pu		16	1	17
^{241}Pu		9	0.04	9
^{241}Am		2	2	4
Suma	680	130	3000	3800
	18 %	3 %	79 %	100 %

1.5. Współdziałanie różnych czynników

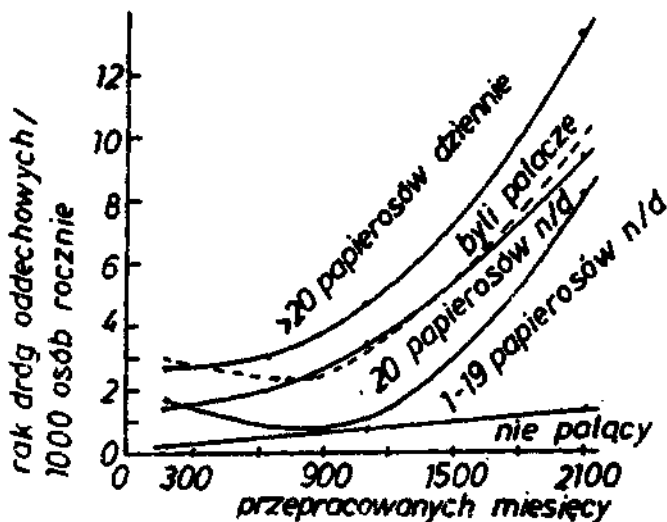
Raport UNSCEAR (1982) po raz pierwszy rozważa współdziałanie fizycznych, chemicznych i biologicznych czynników z promieniowaniem jonizującym. Z bogatej listy chemicznych czynników obecnych w środowisku i mogących oddziaływać z promieniowaniem specjalną uwagę poświęca raport tym, dla których stwierdzono kancerogenny charakter. Zalicza do nich: kurz, włókna, przemysłowe emisje zawierające takie elementy, jak arsen, nikiel i chrom, lub też środki chemiczne obecne w żywności. Współdziałanie kilku czynników może być rozpatrywane pod względem rodzaju i czasu procesu współdziałania. Samo działanie może mieć charakter krótki jednorazowy lub może być ciągłe i może się oczywiście różnić zarówno dawkami, jak i mocami dawek. Przypadki związane z niskimi dawkami a długimi ekspozycjami mają najistotniejsze znaczenie dla oszacowania ryzyka, a zatem dla całej skomplikowanej problematyki ochrony radiologicznej oraz ochrony środowiska. Jeżeli końcowy efekt nie przewyższa sumy indywidualnych efektów, mówimy wtedy o addytywności. Jeżeli efekt współdziałania dwóch czynników przewyższa sumę efektów ich niezależnych oddziaływań, wtedy zachodzi zjawisko synergizmu. Natomiast, gdy efekt współdziałania jest niższy niż suma efektów niezależnych oddziaływań, zjawisko jest określane jako współdziałanie antagonistyczne. W przypadku, gdy promieniowanie współdziała z czynnikami nie dającymi w indywidualnym oddziaływaniu efektu, odpowiednie zjawiska noszą nazwę efektu ochronnego lub uształwienia. Może się również zdarzyć, że charakter współdziałania pomiędzy różnymi czynnikami zmienia się w zależności od zakresu dawek.

Raport UNSCEAR bardzo krytycznie ustosunkowuje się do więk-

szości dotychczasowych doniesień odnośnie skojarzonego działania znanych kancerogenów i promieniowania jonizującego oraz kładzie duży nacisk na skomplikowany charakter biologicznych oddziaływań i ich silne uzależnienie od wielu czynników mających wpływ na końcowy efekt. Raport zaleca ostrożność w definiowaniu charakteru współdziałania różnych czynników, jak również zaleca wszechstronne przebadanie wszelkich możliwych mechanizmów mogących mieć swój udział w procesie. Zważywszy na znaczenie, jakie istnienie ewentualnych synergistycznych lub antagonistycznych oddziaływań między czynnikami obecnymi w środowisku może mieć dla problemu ustalenia dopuszczalnych norm, wymagania odnośnie konieczności dogłębnych badań, zależności czasowych, kontroli warunków zewnętrznych mogących zmieniać efekt, wydają się być oczywiście uzasadnione.

Pomimo bardzo skomplikowanych uwarunkowań tego zjawiska, pojawiają się coraz częściej dane odnośnie badań laboratoryjnych, oraz prób teoretycznych rozwiązań dotyczących tego efektu (19, 22, 24, 28, 40, 46, 50, 69, 73-75, 93, 100, 111, 131). Zainteresowanie problemem współdziałania czynników środowiskowych rośnie w miarę pojawiających się doniesień, które stwierdzają ten efekt na podstawie badań zagrożeń zawodowych odnośnie współdziałania promieniowania jonizującego z mikrofalami lub też z nikotyną (82, 94, 132) (Rys. 1.3.1.).

Podana w raporcie metoda oceny, w oparciu o sporządzenie izobolicznych diagramów, czy współdziałanie jest antagonistyczne, addytywne czy synergistyczne, ma charakter matematycznej analizy danych. Próby wyjaśnienia synergizmu można spotkać zarówno w pracach dotyczących współdziałania dwóch różnych typów



Rys. 1.3.1. Śmiertelność u różnych grup palaczy papierosów spowodowana rakiem płuc w zależności od czasu trwania zawodowej ekspozycji na pochodne radonu (132)

promieniowania (147), jak i promieniowania i chemicznych mutagenów (28,69,74). Jedną z takich prób jest opracowana przez K.H. Chadwick'a i H.P. Leenhouts'a, autorów *The Molecular Theory of Radiation Biology*, teoria współdziałania na poziomie DNA pomiędzy promieniowaniem jonizującym i jakimkolwiek innym mutagenem lub czynnikiem działającym również na DNA. Jako generalne założenie prezentowanej molekularnej teorii oddziaływania promieniowania autorzy przyjmują, że:

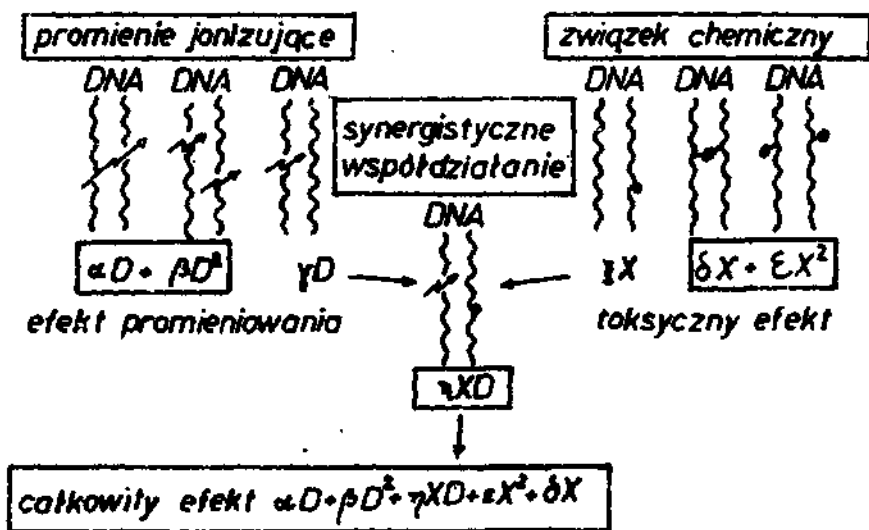
- 1) integralność cząsteczki DNA, która zawiera genetyczną informację, jest fundamentalną sprawą dla normalnego rozwoju komórki;
- 2) pęknięcie obydwu nici DNA, powodujące całkowite rozzerwanie całości cząsteczki, stanowi najbardziej krytyczne uszkodzenie;
- 3) różne ostateczne biologiczne efekty mogą być bezpośrednio skorelowane z pęknięciami łańcucha cząsteczki DNA;
- 4) ostrość obserwowanych efektów jest proporcjonalna do średniej ilości wywołanych i nie zreperowanych pęknięć obydwu nici DNA przypadających na jedną komórkę;
- 5) ilość pęknięć obydwu nici DNA jest zależna od fizycznych, chemicznych i fizykochemicznych procesów przekazywania i przenoszenia energii, współzawodnictwa udziału rodników w odniesieniu do struktury oraz chemicznego środowiska DNA w trakcie napromieniania;
- 6) ilość wytworzonych pęknięć, która pozostaje efektywna, jest zależna od biochemicznych procesów reparacji DNA, których wydajność jest kontrolowana przez metaboliczne warunki komórki w czasie i po napromienianiu.

Przedstawiony na Rys. 1.3.2. czynniki $\alpha D + \beta D^2$ odzwierciedla liczbę pęknięć obydwu nici DNA wywołanych zaabsorbowaniem dawki promieniowania D .

Według Chadwick'a i Leenhouts'a cząsteczka DNA może być rozzerwana przez:

- 1) przejście jednej cząstki promieniowania jonizującego, która da w wyniku dwa równoczesne przekazy energii w pobliżu DNA. Liczba indukowanych w ten sposób pęknięć przez promieniowanie powinna być wprost proporcjonalna do pochłoniętej dawki

$$N = \alpha D$$



Rys. 1.3.2. Przyjęty przez Chadwick'a i Leenhouts'a schemat oddziaływania promieniowania i chemicznego mutagenu na cząsteczkę DNA. (74,75)

2) Połączenie zbliżonych przestrzennie dwóch niezależnych przekazów energii zachodzących w pobliżu DNA i powstających w wyniku przejścia dwóch cząstek promieniowania. Liczba pęknięć obydwu nici indukowanych w ten sposób przez promieniowanie powinna być wprost proporcjonalna do kwadratu pochłoniętej dawki

$$N = \beta D^2$$

Czynnik γD obrazuje tę część spowodowanych przez promieniowanie pojedynczych pęknięć spirali DNA, która może zostać zreperowana. Współczynniki α, β, γ zależne są od różnorodnych procesów, które przebiegają w następstwie pochłonięcia określonej energii w materiale komórkowym. Zawierają one w sobie pe-

rametry uwzględniające fizyczne, fizykochemiczne i chemiczne procesy prowadzące do pęknięcia spirali, jak również biochemiczne procesy zaangażowane w zjawisku naprawy. Przez analogię do promieniowania założono, że każdy inny mutagen może powodować również uszkodzenia spirali DNA, których średnią liczbę N obrazuje zależność $(\delta X + \xi X^2)$, gdzie X jest miarą ekspozycji komórki na mutageny czynnik, natomiast δ jest liczbą uszkodzeń obydwu nici w spirali DNA na jednostkę ekspozycji, podobnie ξ jest liczbą uszkodzeń obydwu nici w spirali DNA na kwadrat jednostki ekspozycji, które powstały z kombinacji pojedynczych uszkodzeń nici DNA. Czynniki mutageny działające na DNA może również powodować występowanie uszkodzeń nici, których liczbę obrazuje czynnik ξX , w których ξ jest liczbą takich uszkodzeń powstających na jednostkę ekspozycji. Uszkodzenia te, podobnie jak pęknięcia jednej nici spirali DNA wywołane działaniem promieniowania, mogą być eliminowane w procesach reperacji. W przypadku, gdy mutagen i promieniowanie są zastosowane razem, wtedy dodatkowo do produkowanej niezależnie przez oba czynniki ilości uszkodzeń, wytworzy się pewna ilość pęknięć obydwu nici łańcucha DNA, w wyniku koincydencji wywołanych przez promieniowanie i chemiczny mutagen uszkodzeń pojedynczej nici. Liczba tych dodatkowo utworzonych uszkodzeń będzie zatem określona przez

ηKD , przy czym w czynniku η jest zawarte również prawdopodobieństwo, że pęknięcie jednej nici oraz wywołane chemicznym mutagenem uszkodzenie drugiej nici, dadzą w efekcie pęknięcie obydwu nici odczynki DNA. W efekcie, w przypadku połączonego działania dwóch czynników, liczba uszkodzeń spirali DNA decydująca o całkowitym efekcie wynosi

$$N_t = \alpha D + \beta D^2 + \gamma XD + \delta X + \xi X^2$$

Z tej bardzo uproszczonej w tłumaczeniu formuły można ocenić, w jakim stopniu należy się spodziewać w badanych układzie efektu synergistycznego wzmocnienia. Przy czym należy podkreślić, że rozumowanie autorów teorii dotyczy układów, w których bezwzględnie spełnione są trzy przedstawione już pośrednio warunki.

- Po pierwsze, ostatecznym skutkiem działającego równocześnie z promieniowaniem czynnika jest rzeczywiście uszkodzenie spirali DNA;
- po drugie, zależność efektu od dawki promieniowania działającego niezależnie ma charakter liniowo-kwadratowy;
- po trzecie, w przypadku chemicznego mutagenu zależność efektu od ekspozycji na mutagen powinna również mieć generalnie charakter liniowo-kwadratowy (tzn., że mutagen może powodować uszkodzenie zarówno jednej, jak i obydwu nici DNA - podobnie jak w przypadku promieniowania).

Stwierdzenie, że efekt synergistyczny odgrywa dominującą rolę w rejonie niskich dawek, dla których krzywa dawka-efekt wykazuje charakter najbardziej zbliżony do liniowego, jest jedną z ważniejszych konkluzji, wynikających z przeprowadzonej przez Chadwick'a i Leenhouts'a analizy synergistycznego współdziałania. Analiza ta wykazała również, że efekt ten ma istotniejsze znaczenie w przypadku słabo jonizującego promieniowania niż w przypadku gęsto jonizujących cząstek. Jest to wniosek bardzo ważny z punktu widzenia ochrony środowiska, gdyż zarówno niskie dawki, jak i duże dawki są charakterystyczne dla występującego w naturalnym środowisku słabo jonizującego promieniowania.

Wszelkie biologiczne efekty: śmierć komórki, mutacje, abe-

racje zachodzące w regionie niskich dawek oraz dla słabo jonizującego promieniowania powinny być przedmiotem szczególnego zainteresowania ochrony radiologicznej oraz ochrony środowiska. Takie jest też stanowisko UNSCEAR 62, który pomimo stwierdzenia, że jest za wcześnie, aby Komitet był w stanie w oparciu o istniejące dane udokumentować w sposób jednoznaczny potrzebę zmiany systemu szacowania ryzyka, zaleca jednak konieczność badania efektu współdziałania i to zarówno na poziomie badań podstawowych, jak i praktycznych, na poziomie komórki i organizmów wyższych. Specjalnie podkreślono potrzebę i znaczenie prowadzenia badań na poziomie molekularnym i chromosomowym, badań nad współdziałaniem chemicznych, fizycznych i wirusowych czynników w procesach powiązanych z replikacją DNA, naprawą uszkodzeń radiacyjnych (zarówno na poziomie prostych, jak i wysoko zorganizowanych organizmów) i wszystkich badań niezbędnych dla zrozumienia mechanizmów mutagenezy i oszacowania ryzyka genetycznego dla człowieka. Te właśnie badania powinny, gdy tylko to możliwe, koncentrować się w rejonie niskich dawek i ekspozycji na różne czynniki oraz powinny być skorelowane z najistotniejszymi skutkami biologicznymi takimi, jak: mutacje, aberracje chromosomowe, różnicowanie komórek, zaburzenia systemu immunologicznego, rozwijanie się organizmów i oczywiście kancerogeneza.

2. Problemy szacowania ryzyka w zakresie niskich dawek

2.1. Modele przyjęte w ochronie radiologicznej

Właściwe oszacowanie ryzyka wynikającego z istniejących zagrożeń stanowi niezależny i skomplikowany problem. Odczucie opinii publicznej nie zawsze jest oparte na racjonalnych przesłankach (45). Na przykład ryzyko, jakim jest związane z prześwietlaniem klatki piersiowej (Tabl. 2.1.1.) jest liczbowo równoważne ryzyku związanemu z przejechaniem samochodem 100 kilometrów. Tymczasem historycznie uwrażliwione na promieniowanie odczucie opinii publicznej przypisuje na pewno większą wagę pierwszemu (96).

Opinia publiczna jest stosunkowo najbardziej wyczulona na zagrożenie związane z promieniowaniem jonizującym. Zrozumienie biologicznych efektów promieniowania, chociaż jeszcze niekompletne, jest daleko bardziej szczegółowe niż dotyczące działania bardziej szkodliwych substancji chemicznych. Również praktyka ochrony radiologicznej jest daleko bardziej rozwinięta i zaawansowana niż jakiegokolwiek metodyki stosowane w przypadku chemicznych zagrożeń. Także generalne podejście w kwestiach oszacowania ryzyka w rejonie niskich dawek, przyjmujące tylko modele dopuszczające przybliżenia w kierunku przeceniania ryzyka a nie odwrotnie, ustanawia jakby dodatkowe zabezpieczenie i może być modelem wzorcowym dla ochrony środowiska przed zanieczyszczeniem. Nie zmienia to jednak faktu obecności promieniowania jonizującego w życiu człowieka.

W przypadku promieniowania jonizującego, którego biologiczne skutki działania są od wielu lat badane, należy rozpatrywać

Tabela 2.1.1. Porównanie ryzyka związanego z różnymi formami diagnostyki (96)

Promieniowanie X	Średnia ekspozycja na skórę (R/film)	Szacowane dawki na całe ciało (cGy)	Ryzyko śmierci z powodu raka	Równoważnik ryzyka śmierci z powodu	
				przejecha-nych km	ilości wypalonych papierosów
Głowa (CT)	2 - 10	1	$1/10^4$	9982	500
Głowa	0.739	0.078	$1/1.3 \cdot 10^5$	767.97	38
Kręgosłup piersiowy	1.050	0.247	$1/4 \cdot 10^4$	2495.50	125
Piersi	0.036	0.010	$1/10^6$	99.82	5
Ciało	2 - 10	1	$1/10^4$	9982	500
Cholecystografia	0.898	0.168	$1/6 \cdot 10^4$	1663.13	83
Jama brzuszna	0.951	0.147	$1/6.8 \cdot 10^4$	1468.32	74
Miednica	0.827	0.093	$1/1.1 \cdot 10^5$	908.04	45
Kręgosłup lędźwiowy	1.400	0.347	$1/2.9 \cdot 10^4$	3442.18	172
Zęby	1.170	0.009	$1/1.1 \cdot 10^6$	90.16	5

dwie kategorie zagrożeń. Pierwsza dotyczy ekspozycji na bardzo wysokie dawki i związana jest z możliwością wystąpienia efektów niestochastycznych. Są to efekty charakteryzujące się wartością progową dawki, powyżej której występuje uszkodzenie narażonego na ekspozycję organu i dla których ostrość występującego efektu jest związana z wielkością dawki. Zagrożenie wystąpieniem efektów niestochastycznych jest związane z ekspozycją na dawki rzędu 1 Gy - 100 Gy (80). Druga kategoria zagrożeń dotyczy ekspozycji na niskie dawki i niskie moce dawek (z tego punktu widzenia jest interesująca dla badań środowiskowych) i związana jest z występowaniem efektów stochastycznych, do których należy zaliczyć mutacje, kancerogenezę i śmierć komórek. Cechą efektów stochastycznych jest brak progę i zależność wielkości efektu od dawki. Niezmiernie istotna jest znajomość zależności dawka-efekt, a w szczególności kształtu krzywej w rejonie niskich dawek. Jeżeli efekty są mierzone w rejonie wysokich dawek, a zależność jest nieliniowa, np. $y = ax^2$, wtedy w rejonie niskich dawek przyrost efektu jest znacznie mniejszy niż w przypadku zależności liniowej. Ze względu na bardzo ograniczoną ilość badań w rejonie niskich dawek występują ciągle kontrowersje czy w przypadku szacowania ryzyka należy przyjmować zależność liniową, czy kwadratową.

Aktualnie w ochronie radiologicznej obowiązuje podejście, że ryzyko w rejonie niskich dawek jest bezpośrednio proporcjonalne do dawki promieniowania i, że nawet najmniejsza dawka (ekspozycja) wiąże się z określonym zagrożeniem. Jest to równoznaczne z przyjęciem założenia, że prawdopodobieństwo indukcji raka lub genetycznych efektów zmienia się proporcjonalnie do dawki. i że, gdy duża grupa ludzi ekspozowana jest na niskie dawki, licz-

ba możliwych przypadków będzie proporcjonalna do sumy indywidualnie uzyskanych dawek.

Obecnie (Tabl. 2.1.2.) przyjmowane oszacowania mieszczą się w następujących rzędach wielkości: a) $1 \cdot 10^{-5}$ nieuleczalnych przypadków raka na 1 mSv, to znaczy 1 przypadek na 10 000 osób, z których każda eksponowana była na dawkę 10 mSv (1 rem) na całe ciało w przeciągu okresu życia; b) podobne lub niewiele większe jest prawdopodobieństwo wystąpienia przypadków uleczalnych (większość przypadków np. raka tarczycy nie jest śmiertelna); c) $2 \cdot 10^{-5}/\text{mSv}$ przypadków poważnych defektów genetycznych w przyszłej generacji będących wynikiem ekspozycji narządów rodnych przed reprodukcją.

Współczynniki prawdopodobieństwa podane przez UNSCEAR oraz przez ICRP i BEIR szacowane były przy założeniu różnych modeli wyjściowych. Jak widać, zgodność efektów końcowych jest wyjątkowo dobra. Pomimo to, szacowane ryzyko jest obciążone ciągle dużym współczynnikiem niepewności. Wynika ona z: a) niepewności spowodowanej ekstrapolacją z regionu dawek wysokich do niskich; b) z ekstrapolacji danych uzyskanych na modelach zwierzęcych, ciągle nie dającej pełnego obrazu.

Fakt, że proces kancerogenezy jest wynikiem skojarzenia inicjacji oraz promocji dodatkowo komplikuje badania (7,85). Ponieważ aktualnie około jednej piątej zgonów stanowią umierający na raka, którego przyczyną, co należy podkreślić, nie jest promieniowanie, wykrycie istotnego statystycznie efektu kancerogennego w badaniach epidemiologicznych w grupie eksponowanych na niskie dawki jest sprawą niesłychanie trudną (2,12,29,30,33,132).

Pomimo wspomnianych niejasności i przybliżeń jednolity system, zmierzający do ograniczenia dawek promieniowania, został

Tabela 2.1.2.

Aktualne oszacowania maksimum prawdopodobieństwa efektów powodowanych ekspozycją populacji na niskie dawki promieniowania (2)

Źródło szacowania	Prawdopodobny efekt ekspozycji 10 000 osób w wysokości 1 rem na osobę			
	Liczba śmiertelnych przypadków raka	Liczba nieśmiertelnych przypadków raka	Liczba defektów genetycznych w I generacji	Liczba defektów genetycznych we wszystkich generacjach
UNSCEAR 1977	1	1	0.24	0.74
ICRP 1977	1.25	1.25	-	0.8
BEIR 1980	0.8(0.1-1.7) lub 2.3(0.3-5.0) ^{x/}	podobnie jak dla śmiertelnych	0.02-0.3	0.24-4.4

x/ Wartości uzyskane w oparciu o model względnego ryzyka, pozostałe wartości dla kancerogenezy uzyskane w oparciu o model absolutnego ryzyka

osiągnięty na poziomie międzynarodowym. Ogólnie przyjęto pragmatyczną filozofię unikania niepotrzebnych ekspozycji i ograniczania ich, jak tylko możliwe, z racjonalnego punktu widzenia. Dla człowieka, jego indywidualny rachunek korzyści jest czynnikiem rozsądzającym o podjęciu ryzyka (jest to czynnik decydujący przy ekspozycjach medycznych). Skutki biologiczne nieuniknionych ekspozycji związanych z tzw. chemizacją i zanieczyszczeniem środowiska często okazują się znacznie wyższe od efektu biologicznego dawki przyjętej jako graniczna ekspozycja (50 mSv) dla osób za-

trudnionych zawodowo przy promieniowaniu. W ostatnich latach podobne rozważania prowadzone są w stosunku do zagrożenia wynikającego z innych czynników środowiskowych, w szczególności mutagenów chemicznych.

2.2. Propozycje dla mutagenezy środowiskowej - RAD-ekwiwalent

Szacowanie genetycznego i somatycznego ryzyka jest nadal zadaniem niezwykle trudnym ze względu na złożoność problemu, a także różnorodność i zmienność wytworzonych przez człowieka związków chemicznych. Przyjęto, że w pewnym zakresie doświadczenia zebrane w dziedzinie ochrony radiologicznej mogą być pomocne w rozwijaniu i opracowywaniu norm dopuszczalnych dla stozowania chemicznych mutagenów (33,98,119). Zaproponowano dziedzinę ochrony przed promieniowaniem jako model oraz tzw. Rad-ekwiwalent (REC) jako wartość porównawczą, pozwalającą na usystematyzowanie skutków biologicznych różnych czynników w odniesieniu do efektów promieniowania.

W 1973 roku Crow oraz Bridges (97) zasugerowali, że efekt chemicznego czynnika, który daje genetyczne skutki może być przyrównywany do dawki promieniowania jonizującego, która powinna wywołać ten sam efekt ilościowy dla tego samego wskaźnika biologicznego.

W latach późniejszych sformułowano tę myśl definiując równoważnik dawki REC jako iloczyn koncentracji przez czas trwania traktowania, które produkują ilościowo taki sam efekt, jaki byłby wywołany działaniem chronicznego promieniowania o dawce jednego rema. Metoda porównywania efektów chemicznych mutagenów i promieniowania zapewne nie jest idealnym rozwiązaniem i wzbudza również pewne kontrowersje (5,18,77,119). Do najpoważniejszych zarzutów należy

pozornosc rozwiązania problemu ze względu na fakt, że sam sposób szacowania ryzyka w ochronie radiologicznej zawiera pewną dozę niepewności. Pomimo wspomnianych zastrzeżeń koncepcja ta jednak istotnie daje możliwość pewnej systematyzacji i ujednolicenia ryzyka wynikającego ze środowiskowych zagrożeń. Należy pamiętać, że szacowanie ryzyka wynikającego z zagrożeń chemicznymi czynnikami środowiskowymi, w oparciu o wyznaczenie RBC, wymaga spełnienia pewnych założeń odnośnie następujących problemów(97):

1/ Prawo wzajemności

W przypadku ekspozycji na promieniowanie jonizujące dawka promieniowania D jest określana jako iloczyn zaabsorbowanego strumienia energii /mocy dawki/ przez czas trwania ekspozycji - $D = P \cdot t$, natomiast dawka czynnika chemicznego określona jest jako $D = c \cdot t$, gdzie c jest stężeniem. Tak zdefiniowane dawki są zgodne z powyższym warunkiem wtedy, gdy równocześnie zmieniające się parametry w iloczynie, dające tę samą wartość, wiążą się z tym samym efektem biologicznym. Znajomość badań radiobiologicznych pozwala przewidzieć, w jakich warunkach spełniony jest ten warunek dla promieniowania jonizującego. Wiadomo z nich, że parametr czasu jest w przypadku promieniowania mało istotny, natomiast krytyczną rolę odgrywa zróżnicowanie odpowiedzi biologicznej od zmieniającej się mocy dawki, zwłaszcza dla różnych rodzajów promieniowania (2,4,28,132,148). W przypadku chemicznej ekspozycji czas jest parametrem krytycznym, zależnym od biofizycznych warunków środowiska docelowego, decydującym o stopniu penetracji w komórce, stałości związku, metabolizacji itp.. A zatem należy spodziewać się ograniczeń i w związku z tym w każdym konkretnym przypadku musi być zbadana wzajemność między

czasem i koncentracją, jak również określony poziom nasycenia dla krzywych dawka-efekt (16,95,117).

2/ Kształt krzywych dawka-efekt.

W porównaniu efektów od chemicznego związku i od promieniowania musi być również wzięty pod uwagę charakter krzywych dawka-efekt. W zasadzie, jeżeli tego samego typu zależność jest obserwowana, to bezpośrednio porównywanie jest oczywiste. Znajomość krzywych dawka-efekt dla promieniowania jonizującego została opracowana bardzo szczegółowo zarówno doświadczalnie, jak i teoretycznie (4,28). W zasadzie dla większości biologicznych efektów wiadomo jest, jakiego typu zależności i dla jakiego typu promieniowania oraz w jakich zakresach należy się spodziewać. Znacznie trudniej przedstawia się sprawa w dziedzinie dużo młodszej od radiobiologii, a mianowicie w mutagenie środowiskowej. O wiele mniej danych jest dostępnych w tej dziedzinie, a kształt badanych zależności jest bardzo różnorodny. W większości przypadków problem ten może być uproszczony do prowadzenia badań w zakresie niskich dawek i porównanie może być dokonane z szacowaniem obowiązującego przedziału dawek.

3/ Ekstrapolacja wniosków z danych eksperymentalnych na układy zwierzęcych i innych na człowieka

Ze względu na bardzo ograniczoną ilość danych obserwowanych na ludziach zarówno dla promieniowania, jak i dla chemicznych mutagenów, taka ekstrapolacja musi być opyniona niezależnie od tego, jakie ilościowe metody są przyjęte. Według Moustachiego oczekiwanie na uzyskanie wystarczających danych dotyczących człowieka jest oczekiwaniem na ekologiczną katastrofę, która spowoduje ewidentnymi danymi epidemiologicznymi /statystycznymi/.

Tymczasem jednak jest bardzo istotne, aby systemy adoptowane w celu oznaczenia REC były możliwie jak najbliższe poziomowi zorganizowania i metabolizmu komórek ludzkich. W takim znaczeniu systemy eukariotyczne powinny być bardziej preferowane od systemów prokariotycznych. Natomiast wśród eukariotycznych, kultury komórek ludzkich lub somatycznych komórek ssaków wydają się najlepiej spełniać postawione zadanie (97,98,119).

4/ Inne czynniki modyfikujące efekt.

Wiadomo, że wiele czynników fizjologicznych i genetycznych może modyfikować wrażliwość na napromieniowanie i na mutageny. Wśród tych czynników szczególną uwagę należy zwrócić na te które są związane z cyklem komórkowym, różną wrażliwością charakterystyczną dla różnych faz cyklu oraz na procesy reperacji, które dość istotnie wpływają na końcowy efekt biologiczny (5).

Reasumując, kontrola i regulacja zagrożeń środowiskowych wymaga przyjęcia jednolitego kryterium ilościowego oraz odpowiednich standardów dla oceny ryzyka zarówno w odniesieniu do wczesnych, jak i tak zwanych późnych efektów, obecnych w środowisku chemicznych czynników włączając w to możliwie ich współdziałania z promieniowaniem jonizującym. Przyjęta teza odnośnie występowania późnych efektów, nawet najniższych dawek promieniowania, odegrała kluczową rolę w kształtowaniu się efektywnych standardów w ochronie przed promieniowaniem. Ponad 30 lat poświęcono intensywnym badaniom, aby zgromadzić niezbędne informacje i naukowe dane konieczne dla ustalenia narodowych limitów ograniczających ekspozycję na promieniowanie (35). Zbieżność i podobieństwo większości stochastycznych efektów biologicznych powodowanych przez promieniowanie oraz mutageny chemiczne sugerują możli-

ność stosowania tych systemów porównawczo.

Porównanie skutków promieniowania jonizującego i mutagenu chemicznego można z jednej strony przedstawić w postaci dawki promieniowania, która daje ten sam efekt biologiczny, a z drugiej strony, znając równoważniki dawki, można określić poziom chemicznego mutagenu dający taki sam efekt biologiczny jak promieniowanie o dawce dopuszczalnej, określonej normami międzynarodowymi (18,119). Przyjęcie takiej metodyki może rzeczywiście być bardzo użyteczne oraz pomocne w usystematyzowaniu norm obowiązujących w mutagenicizacji środowiskowej, względnie ich uregulowaniu lub wręcz ustaleniu (18,35,42,119). Może też w końcu służyć /przy zachowaniu w świadomości wszystkich ograniczeń/ do oszacowania ryzyka dla zdrowia wynikającego z ekspozycji na dany mutagen. Gdy tylko /przy świadomości obowiązujących restrykcji i zastrzeżeń/ równoważność jest uzyskana, można próbować ekstrapolacji reguł i praw ochrony przed promieniowaniem na dziedzinę ochrony przed czynnikami chemicznymi (37,39,44,54,98,117).

3. Tradescantia jako system modelowy do badań laboratoryjnych i środowiskowych

Jak już wspomniano, układ człowieka nie może być przedmiotem bezpośrednich genetycznych eksperymentów. Znamienna część wysiłku badaczy musi być zatem poświęcona innym eukariotycznym systemom, których podobieństwo organizacji chromosomów, DNA, narządów komórkowych implikuje fakt podobnego jak u człowieka procesu wywoływania uszkodzeń w jądrze i cytoplazmie.

W ostatnich dziesięciu latach, w miarę jak rozwijała się w opinii publicznej świadomość zagrożeń wynikających ze zmian zachodzących w naturalnym środowisku, intensywnie rozwijały się badania nad zastosowaniem najprzeróżniejszych biologicznych testów oceniających biologiczne skutki różnych czynników środowiskowych. Ze względu na wysoki koszt testu kancerogenności na zwierzętach (300 000 \$ na jeden związek chemiczny) oraz długi okres oczekiwania na wyniki (3 lata) opracowano setki "krótko-okresowych" metod wykrywających mutageniczny i rakotwórczy potencjał różnych czynników (56,57). Są wśród nich testy z użyciem roślin i komórek roślinnych, cwadów, prokariotycznych i eukariotycznych mikroorganizmów, hodowli komórkowych, roztworów DNA, cytogenetyczne testy komórek rakowych in vivo oraz in vitro, testy transformacji rakowej, testy biochemiczne (9,55-57,71,78).

Wśród układów prezentowanych na zorganizowanym w 1978 roku Sympozjum poświęconym zastosowaniu biologicznych monitorów skażeń środowiska (71) dwa z nich uznano za wybitne. Pierwszy, to znany test Bruce Amesa z Uniwersytetu w Kalifornii, w którym mutageniczne działanie jest rejestrowane przez pomiar częstotliwości mutacji różnych szczepów bakterii *SALMONELLA TYPHIMURIUM*,

przechodzących z formy histydyno zależnej w histydyno niezależną. W ostatnich kilku latach opublikowano rezultaty przebadania tym testem ponad 2 600 związków, a ponadto przebadano setki związków w prywatnych i usługowych laboratoriach przewyszłowych (57,78,126). Test ten został też zaproponowany przez Organizację Zdrowia i Bezpieczeństwa Pracy (OSHA) do klasyfikacji rakotwórczych związków w miejscach pracy oraz przez Agencję Ochrony Środowiska (EPA) do oceny toksyczności ścieków (70).

Drugi test prezentowany przez L. Schairera (114) z National Brookhaven Laboratory - to test oparty na pomiarze częstotliwości somatycznych mutacji w komórkach włosków pręcików trzykrotki. Heterozygotyczna ze względu na kolor odmiana *Tradescantia* jest najczulszym na świecie biologicznym monitorem promieniowania. Zalety tego testu i ogromną rolę, jaką odegrał w dziedzinie radiobiologii przedstawił Victor Bond w przeglądowym referacie na XIV Kongresie Fizyki Zdrowia w 1981 roku (14). *Tradescantia* okazała się wspaniałym monitorem nie tylko promieniowania, ale również czynników chemicznych. Rezultaty badań szeregu ostatnich lat dowiodły, że może ona znakomicie służyć zarówno jako laboratoryjny, jak i polowy monitor zanieczyszczeń środowiskowych obecnych w powietrzu, wodzie i glebie (15).

3.1. Pomiar częstotliwości somatycznych mutacji u *Tradescantia* - metodyka.

Kilka gatunków z rodziny *Commelinaceae*, do których należy *Tradescantia* posiada cechy kwalifikujące je do prowadzenia badań nad skutkami promieniowania i chemicznych mutagenów. Skutki działania badanych czynników mogą być mierzone w formie:

- aberracji chromosomowych w mikrosporach, wierzchołkach wzrostu korzeni, włoskach pręcików (10, 11, 112, 129);
- mutacji somatycznych w płatkach kwiatów i komórkach włosków pręcików klonów heterozygotycznych ze względu na kolor kwiatów (31, 86-92);
- śmiertelności pyłku (130);
- skróceń włosków pręcików (34, 61, 62, 64, 107, 133, 140).

Z tych czterech typów badań najczęściej stosowana jest metoda oparta na pomiarze częstotliwości somatycznych mutacji w komórkach włosków pręcików. Odkryta około 1958 roku w kolekcji prof. W.V. Browna z Uniwersytetu w Austin (133) już w 1960 roku została zaproponowana przez S. Ichikawę jako biologiczny monitor otoczenia elektromagnetycznego (16). Wprawdzie minęło parę lat badań poświęconych na opracowanie testu (34, 86-92, 107, 120), ale wysiłek ten wynagrodzony został setkami rezultatów niezwykle cennych dla radiobiologów. W ostatnim dziesięcioleciu ukazało się szereg bardzo ważnych prac dotyczących skuteczności biologicznej różnych rodzajów promieniowania (15, 36, 135-138), zależności efektu promieniowania od różnych parametrów biologicznych (14, 15, 59, 62, 64, 103, 134, 139, 143), mocy dawki (61, 104), frakcjonowania (81), niskich dawek (58, 60, 124) czy też nawet efektu promieniowania kosmicznego (34).

Jak już wspomniano, test ten okazał się również wrażliwy na chemiczne mutageny (125, 133). Zwłaszcza niektóre z klonów znalazły zastosowanie w badaniach laboratoryjnych najprzeróżniejszych chemicznych mutagenów (3, 66, 101, 102, 105, 121-123, 125, 130, 141, 142), a także w monitoringu środowiskowym (15, 16, 89, 113-115, 127). O powodzeniu tego testu zdecydowały głównie następujące jego zalety:

- włoszek pręcika poprzez swój rozród może być porównywany z sys-

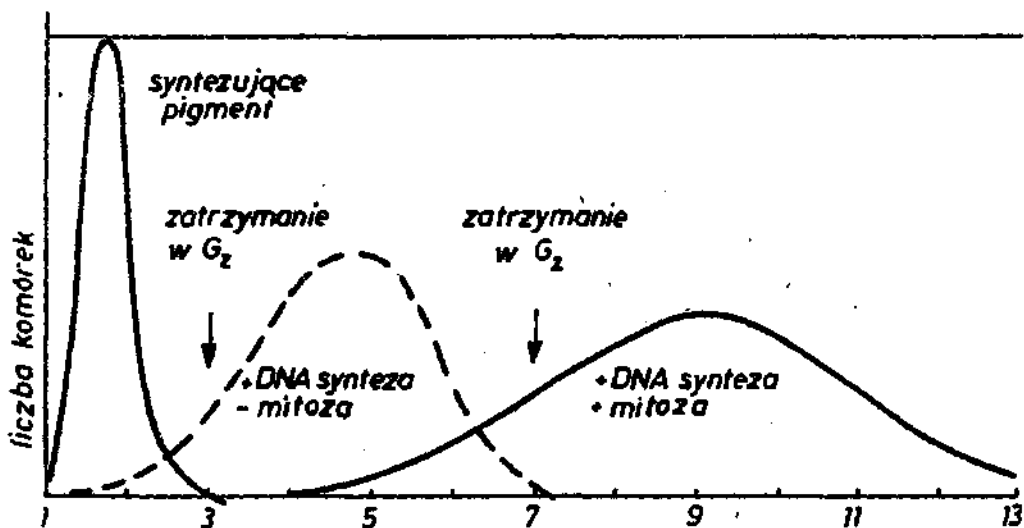
temami kultur komórkowych,

- kwiatostan zawierający upakowane pączki niewielkich rozmiarów znakomicie nadaje się do napromieniowania nawet małymi wiązkami promieniowania,
- daje możliwość badania dużej populacji komórek,
- zarówno prowadzenie plantacji, jak i metoda pomiarów nie sprawiają żadnych trudności (do mierzenia mutacji wystarczy zwykła lupa binokularna),
- w relatywnie krótkim czasie daje rezultaty pomiarów częstotliwości mutacji (przeciętnie 2 - 3 tygodnie),
- rośliny rosną dobrze w zwykłej szklarni, a warunki hodowli i fizjologia rośliny są szczegółowo poznane i opisane,
- wrażliwość *Tradescantia* na promieniowanie jest bardzo wysoka, zbliżona do wrażliwości komórek ssaków (dawki rzędu 2,5 mGy wywołują już mierzalne efekty),
- duża ilość klonów *Tradescantia* pozwala dobierać je do badań w zależności od ich cech genotypowych i specyfiki badań,
- rozmnażanie wegetatywne roślin zapewnia minimalną zmienność genetyczną.

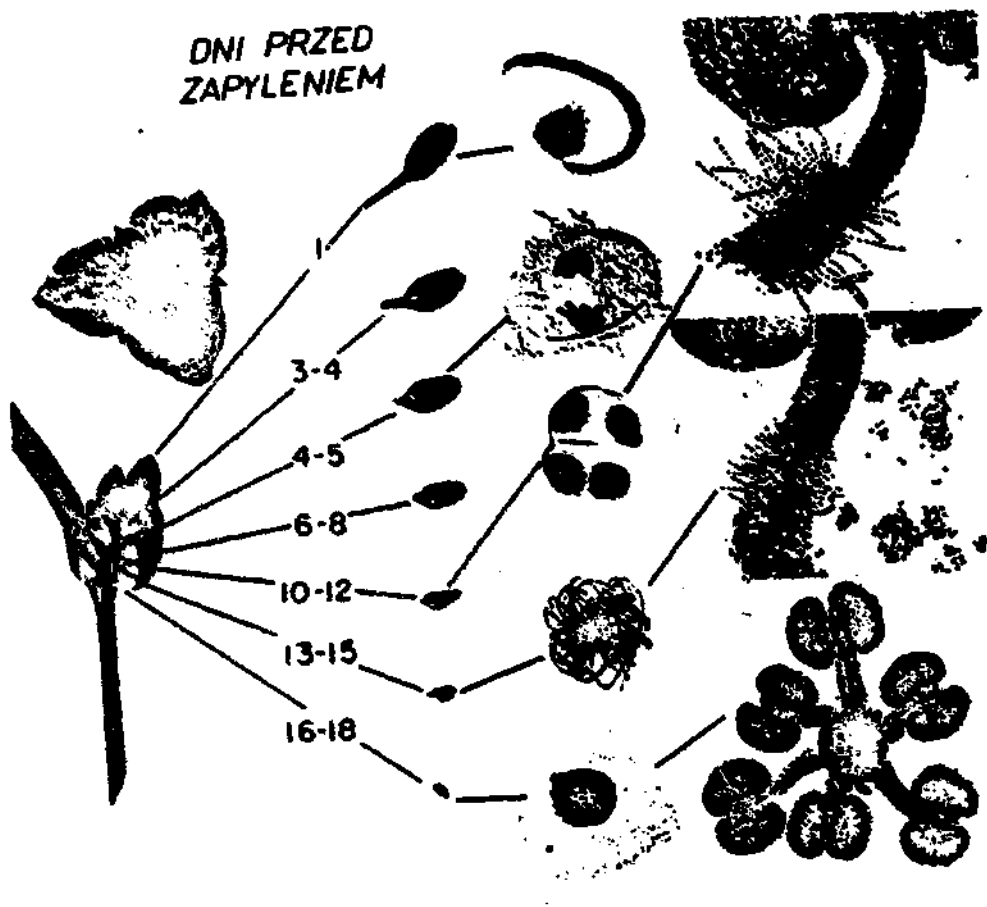
3.1.1. Hodowla i rozwój

Tradescantia jest rośliną długiego dnia i daje się łatwo prowadzić w zwykłej szklarni lub komorze wzrostowej. Choć jest rośliną wrażliwą na zmieniające się czynniki środowiskowe takie, jak: temperatura, wilgotność czy zanieczyszczenie powietrza (105, 106, 120), użyteczność jej do celów badawczych można łatwo zabezpieczyć przez umieszczenie roślin na okres dwóch tygodni przed eksperymentem w kontrolowanych warunkach. Zapewnienie plantacji 18-godzinnego

cyklu świetlnego prowokuje ją do ciągłego kwitnienia. Kwiatostan ukorzonej rośliny może kwitnąć przez około 5 miesięcy produkując aż 140 kwiatów (115,135). W kwiatostanie pączki są uporządkowane według rozmiarów, którym odpowiada określone zaawansowanie rozwoju (Rys. 3.1.1. i 3.1.2.). Ciągłe eksploatowana plantacja wymaga przesadzenia w odstępie 6 - 8 miesięcy. Stosowanie środków ochrony roślin musi być prowadzone ostrożnie, ze względu na ich potencjalną mutagenność. Do eksperymentów przycinane są najbardziej żywotne łodygi (ok. 20 cm długości) zakończone kwiatostanami, których najstarsze pączki są jeszcze przed zapyleniem. Taka selekcja zapewnia bardzo długą żywotność i ujednoczenie wrażliwości.



Rys. 3.1.1. Zależność pomiędzy wiekiem pączka (1 najstarszy, 13 najmłodszy) a liczbą komórek w różnych fazach cyklu oraz syntezą pigmentu (115)



Rys. 3.1.2. Rozwój kwiatostanu ilustrujący reprezentatywne fazy rozwoju mikrospor oraz włosków pręcika w odniesieniu do lokalizacji i rozmiarów pączka (115)

W najmniejszym pączku i równocześnie najmłodszym najlicze-
niejsza jest grupa komórek w fazie G_1 , natomiast pozostałe są
rozłożone pomiędzy fazy S, G_2 i M. Liczba komórek w mitozie, a
także ich proporcja do pozostałych maleje z wiekiem pączków.
Podobnie liczba komórek w fazie S początkowo spada z wiekiem pącz-
ków, ale gdy mitozy zanikają, ponownie rośnie tuż przed barwieniem.
Ta ostatnia faza syntezy DNA sygnalizuje masowe przejście komó-
rek do fazy G_2 , w której komórki zostają zatrzymane. W czasie
rozwoju pączka są zatem dwa okresy syntezy DNA:

- wczesny prowadzący do mitoz,
- późniejszy, który występuje, gdy komórki przestają się dzie-
lić.

3.1.2. Rozwój pręcika i mierzenie zdarzeń letalnych

Cytologiczne obserwacje młodych włosków pręcików wykazały,
że szczytowe i podszczytowe komórki stanowią więcej niż 90 %
dzielących się komórek. Częstotliwość dzielenia się podszczyto-
wych komórek jest niższa (39 - 45 %) od szczytowych (55 - 61 %).
Poza tym wykazano, że podszczytowe komórki jeżeli dzielą się, to
dzielą się tylko raz (34,62,63,88). Konsekwencją tego jest fakt,
że włoszek pręcika jest wynikiem powtarzających się podziałów
szczytowych komórek i może być rozważany jako klasyczny układ
jednokomórkowy.

Daje to możliwość obserwowania skutków biologicznych badanych
czynników w postaci ograniczonej przeżywalności komórek. We włos-
kach pręcików *Tradescantia*, manifestowana jest ona w postaci
"skróconych" włosków (Rys. 3.1.3.1).

Jezeli nie rowninięty w pełni włosok jest potraktowany czynnikiem, który zabamuje podział szczytowej komórki, to pozostanie on w formie "skróconej", tzn. zawierającej mniejszą ilość komórek, gdyż żadna komórka nie przejawuje merystematycznej zdolności podziału. Procent włosków kontynuujących wzrost do normalnej długości /zblizonej do średniej ilości komórek na włoskach, a zatem świadczacej o tym, że szczytowa komórka podzieliła się 5-6 razy/ dajo obraz przeżywalności.

Podobne kryteria, oparte na zdolności komórek do podziału, przyjęte są w testach in vitro, w których przeżywalność ocenia się z ilości utworzonych kolonii.

Ilość komórek we włosku pręcika jest dla danego klonu określona. Szczytowa partia włosków najpóźniej kończy cykl rozwojowy i w niej najwcześniej pojawiają się skrócenia, jezeli działają na kwiatostan czynnik hamujący lub zabijający dzielącą się komórkę. Posiada ona nieznacznie mniej komórek, dlatego średnie ilość komórek w górnej 1/3 pręcika jest niższa niż dla pozostałych włosków. Pojawienie się skróconych włosków w tej partii pręcika przyjęto za miarę letalności (62,65,137,140,142).

Jako kryterium przeżywalności przyjęto natomiast dla klonu:

- Tradescantia - 02 więcej niż 11 komórek (137,140),
- Tradescantia - 4430 więcej niż 16 komórek (142),
- Tradescantia - KU9 więcej niż 12 komórek (65).

Założenie, że włosok składający się z ilości komórek mniejszej niż 75% średniej ilości komórek przypadającej na włosok uznaje się za letalny, stanowiło podstawę dla przyjęcia powyższych kryteriów.

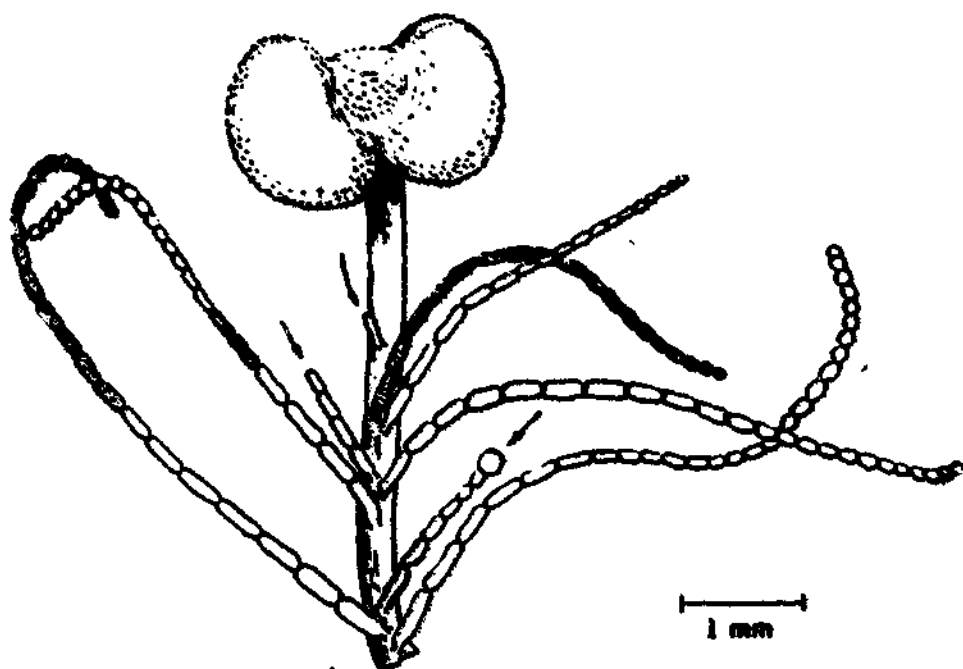
3.1.3. Tworzenie larwy i mierzenie mutacji

Poddane traktowaniu kwiatostany, heterozygotyczne ze względu na kolor kwiatów, klonów *Tradescantia* wykazują szereg zmian w komórkach włosków pręcika (Rys. 3.1.3.1.) . Powstają komórki różowe, bezbarwne, karłowate, gigantyczne itp.. Wśród tych zmian mutacje komórki z koloru niebieskiego na różowy jest najczęściej stosowanym wskaźnikiem.

Badania Mericle'a prowadzone na klonie *Tradescantia* -02 (86) wykazały, że co najmniej dwa dni przed otwarciem kwiatu formują się antocjanowy barwnik.

W oparciu o połączone badania hodowlane i spektrofotometryczne (86-90) stwierdzono, że wszystkie różowe mutacje (spontaniczne i indukowane) pojawiające się w diploidalnym klonie 02 ($2n = 12$), traktowanym jako międzygatunkowa hybryda *Tradescantia occidentalis* i *Tradescantia ohlensis*., powstają w konsekwencji cytogenetycznej utraty lub mutacyjnej inaktywacji delfinidynowego czynnika D w tym samym chromosomowym locus. Ponieważ nie udało się ustalić, czy klon *Tradescantia* -02 jest homozygotyczny ze względu na D, czy też heterozygotyczny dla recesywnego amorficznego allela d, postanowiono więc przyjąć, że T-02 posiada gen D - odpowiedzialny za produkcję delfinidyny, natomiast komórki różowe wykazują jego brak (D^- , D^-) i produkują cjanidynę zamiast delfinidyny.

W Brookhaven National Laboratory opracowano szereg nowych klonów również heterozygotycznych ze względu na kolor kwiatów. Należy do nich klon *Tradescantia* -4430. Ten diploidalny klon ($2n = 12$) jest hybrydą pomiędzy niebiesko kwitnącym *Tradescantia hirsutiflora* i różowo kwitnącym *Tradescantia subcaulis*.



Rys. 3.1.31. Rysunek dojrzałego przecika ilustrujący typowe zmiany w komórkach obserwowane po działaniu czynnika mutagenego (107). Skrócenia, gigantyczne komórki i różowe (zakropkowane).

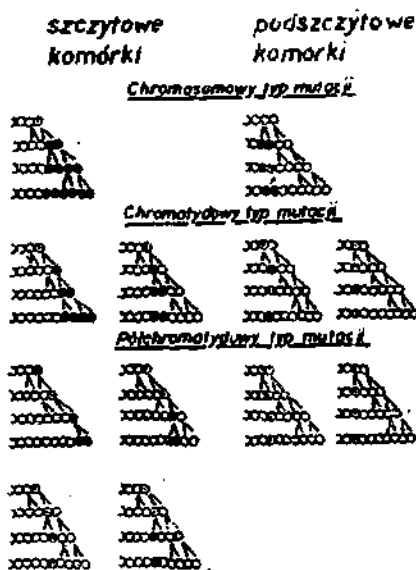
Genetyczne podstawy (113, 140) obserwowanych różowych mutacji komórek potwierdzone były w teście krzyżowym. Test ten potwierdził hipotezę, że kolor różowy zmutowanych komórek T-4430 jest określony parą alleli w pojedynczym locus i że niebieski B jest dominujący w stosunku do różowego b. Dodatkową zaletą klonu T-4430, oprócz genetycznie wyjaśnionej istoty zmiany koloru komórek, jest niski poziom spontanicznego zamierania pyłku, stabilność majotyczna, obecność, a przy tym wyraźny kontrast między komórkami podstawowymi niebieskimi a zmutowa-

nymi różowymi. Z tych właśnie powodów oraz ze względu na fakt, że T -4430 jest wyjątkowo wrażliwy na chemiczne mutageny, klon ten stosowano w Brookhaven National Laboratory we wszystkich badaniach powietrza przemysłowego (113, 115, 141, 142). W 1972 roku S. Ichikawa (65) zaprezentował tryploidalny klon, cechujący się niezwykle żywotnością, korzystnym fenotypem i heterozygotycznością ze względu na kolor kwiatów. *Tradescantia* klon KU 9 ($2n = 18$) jest hybrydą pomiędzy *Tradescantia paludosa* And. et Woods. ($2n = 12$) oraz *Tradescantia ohimensis* Raf. (= *T.reflexa* Raf., $2n = 24$). Charakterystyczna dla tego klonu cecha, związana ze stosunkowo trudniejszym do pomiarów kontrastem pomiędzy komórkami niebieskimi i różowymi, jest kompensowana niezwykle intensywnym kwitnieniem oraz wygodną z punktu widzenia statystyki dużą liczbą włosków na pręcik (ponad 100).

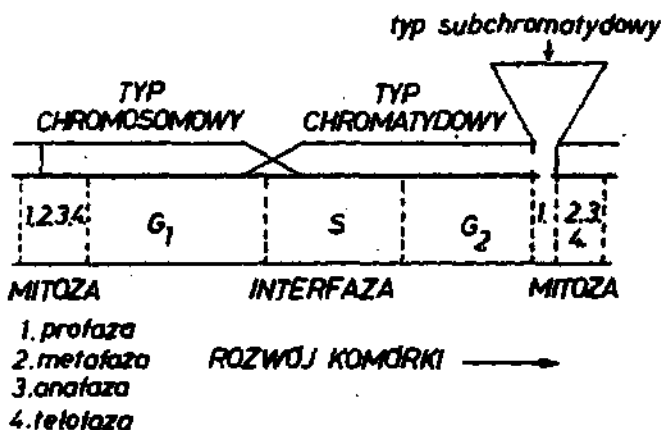
Duża ilość opracowanych dla tej metodyki klonów pozwala na wybranie klonu najodpowiedniejszego z punktu widzenia specyfiki prowadzonych badań. Do porównania skuteczności mutagennej promieniowania i chemicznych mutagenów stosowane były w niniejszej pracy omówione powyżej klony. Czynnikiem decydującym o zastosowaniu klonu T -02 była jego największa wrażliwość na promieniowanie, klonu T -4430 wyjątkowa wrażliwość na chemiczne mutageny, natomiast klonu T -KU 9 jego dostępność i wyjątkowa żywotność.

Jak już wspomniano, potraktowanie kwiatostanu czynnikiem mutagennym powoduje powstanie określonych zmian, które w komórkach dzielących się mogą być wyrażone w postaci różnego typu mutacji. Starsze pączki, które zawierają głównie grupy komórek zatrzymanych w fazie G_2 i w których proces pigmentacji rozpoczął się przed traktowaniem nie będą wykazywały mutacji ze względu na brak możliwości

Ich ekspresji. Procent komórek posiadających tę możliwość oraz będących w fazie syntezy, w której indukowanie zmian jest najbardziej efektywne rośnie z obniżającym się wiekiem pączka. W konsekwencji kwiatki kwitnące w pierwszych dniach po traktowaniu nie będą jeszcze wykazywały mutacji. Około szóstego dnia po traktowaniu pojawiają się kwiatki wykazujące pierwsze zmiany mutacyjne, ilość mutacji rośnie stopniowo do dnia jedenastego, około którego mutacje uzyskują poziom plateau, charakteryzujący efektywność mutagenną zastosowanego czynnika. Poziom ten utrzymuje się przeważnie aż do piętnastego dnia po traktowaniu, następnie stopniowo zanika. Ta faza cyklu świadczy o tym, że kwitnące kwiatki były w momencie traktowania na etapach rozwoju pączka charakteryzujących się zmniejszającą się liczebnością grupy komórek posiadających zdolność podziału. Różowe mutacje będące najczęściej stosowanym wskaźnikiem pojawiają się wśród oryginalnie niebieskich komórek w postaci pojedynczych różowych komórek lub sektorów kilkukomórkowych. Każda taka komórka lub różowy sektor traktowany jest jako jedno zdarzenie mutacyjne (133). Pojedyncze różowe komórki pojawiają się zdecydowanie rzadziej od wielokomórkowych sektorów. Jeżeli przyjąć, że ekspresja mutacji w rozwijającym się włosku zachodzi zgodnie z prezentowanym przez niektórych autorów (65,107) schematem przedstawionym na Rys. 3.1.3.2, to obserwowane pojedyncze różowe komórki powinny być wskaźnikiem tej części zmian, które powstały w późnej fazie syntezy lub w fazie G_2 . Takie założenie zgodne jest również z przedstawioną na Rys. 3.1.3.3. zależnością powstawania różnego typu aberracji od fazy cyklu komórkowego. Obserwowanie stosunku ilości występujących pojedynczych różowych komórek do wszystkich różowych mutacji daje zatem możliwość kontrolowania, czy nie na-



Rys. 3.1.3.2. Schematyczne przedstawienie indukowania mutacji w komórkach włosków pręcika *Tradescantia* (107). Komórka punktowana oznacza komórkę, w której za-
szła mutacja, zaciemnione komórki reprezentują
komórki zmutowane, linie wskazują podziały.



Rys. 3.1.3.3. Zależność pomiędzy typem indukowanej przez pro-
mieniowanie aberracji a fazą cyklu komórkowego (148).

stąpiło zaburzenie cyklu komórkowego.

W niniejszej pracy za miarę efektywności mutagennej badanego czynnika przyjmowano średnią wartość z częstotliwości mutacji, mierzonych między 11 a 15 dniem po traktowaniu.

$$Y = \frac{\sum M_i}{5} \quad M_i = \frac{NoM}{NoH}$$

gdzie: NoM = ilość mierzonych zdarzeń mutacyjnych w oglądanej ilości włóków, tzn. NoH

Przyjmowano, że wartość ta jest obarczona błędem standardowym średniej równemu pierwiastkowi z wariancji tej zmiennej:

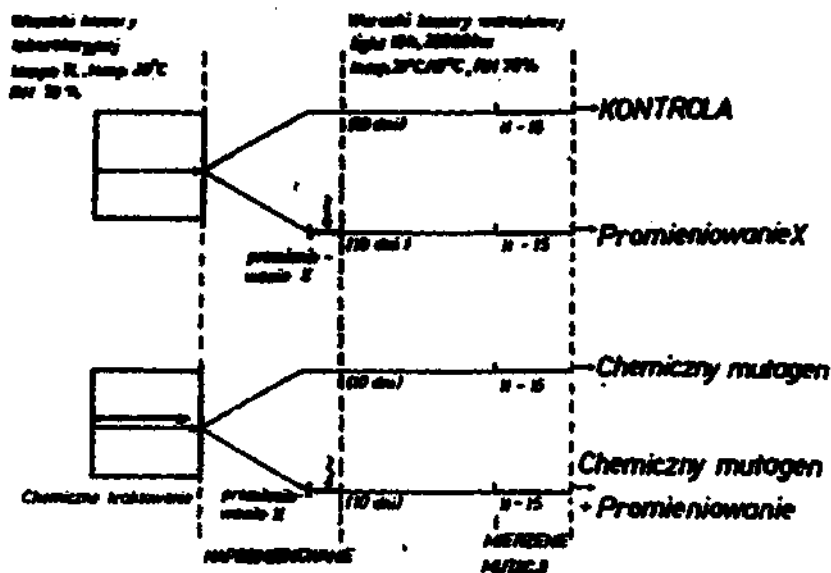
$$SE = \frac{1}{\sqrt{n}} \sqrt{\sum \frac{NoM}{NoH^2}}$$

gdzie: n = ilość dni, w których prowadzone są obserwacje.

W przypadku ekspozycji ciągłej lub przy kontroli skażeń środowiskowych okres mierzenia mutacji rozciąga się na czas dłuższy, proporcjonalny do okresu działania badanego czynnika. Zakończenie okresu obserwacji w takim przypadku powinno nastąpić (w zależności od potrzeb i kondycji roślin) w 15-tym dniu od końca działania badanego czynnika.

3.2. Stosowane czynniki i sposób traktowania

W badaniach, w których celem było porównanie efektywności mutagennej promieniowania i chemicznego czynnika (działających niezależnie lub współdziałających) przyjęto generalnie zasadę, że porównanie musi być przeprowadzone w warunkach zapewniających stałość wszystkich zmiennych niezależnych, mogących mieć wpływ na końcowy efekt biologiczny. Ogólny schemat eksperymentów przedstawiono na Rys. 3.2.1. Traktowaniu poddawano przycięte kwiaty-



Rys. 3.2.1. Schemat doświadczeń porównujących indywidualne i skomponowane działanie promieniowania i chemicznego mutagenu

stany. Dwie z czterech losowo wybranych grup roślin poddawane były traktowaniu chemicznemu, z których jedna po zakończeniu traktowania była napromieniana określoną dawką promieniowania. We wszystkich eksperymentach pozostałe dwie grupy roślin, przeznaczone na kontrolę oraz do porównania skutków promieniowania, poddawane były identycznej procedurze, ale bez obecności chemicznego mutagenu. Po zakończeniu traktowania wszystkie rośliny kultywowane były w kontrolowanych warunkach: światła (długość dnia ~ 18 godzin), wilgotności (65 %), temperatury (17 °C noc, 21 °C dzień) aż do zakończenia okresu sierzenia mutacji. Obserwacjom poddawane były kwiatki kwitnące od 11-tego dnia po traktowaniu.

3 2.1. Związki chemiczne

Prezentowana praca oparta jest na badaniach, w których stosowano trzy różnego typu związki chemiczne:

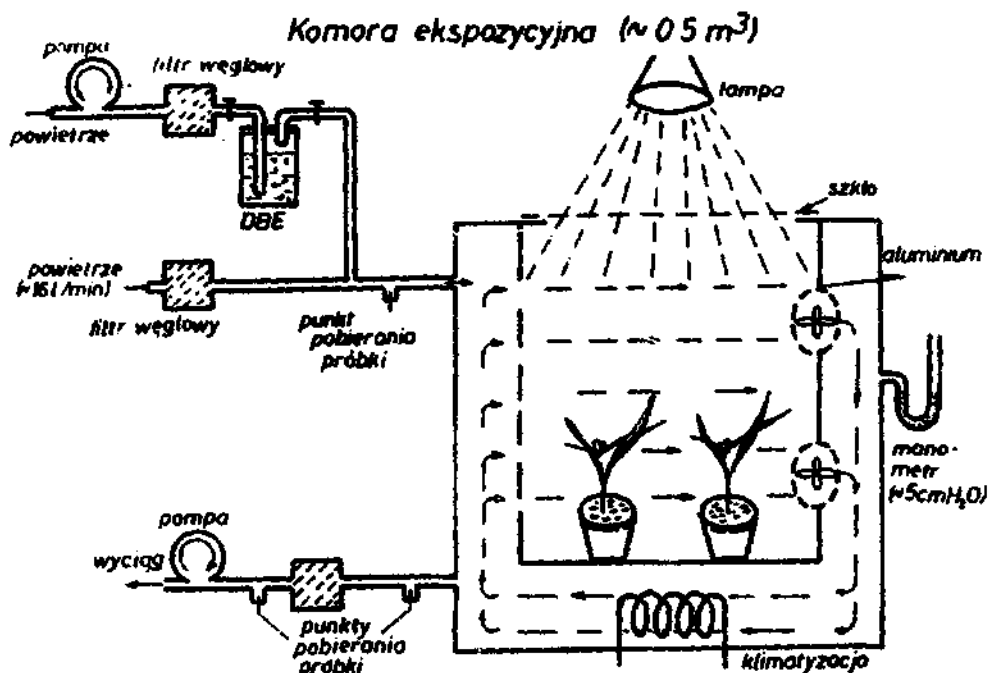
- metylosulfonian etylu - EMS (22,24)
- 1,2 dwubromoetan - DBE (23,73,76)
- fluorek sodu - NaF (25,26)

EMS jest znanym i szeroko stosowanym mutagenem z grupy związków alkilujących (43,71). Do traktowania roślin stosowano 0.04 molarowy roztwór EMS w 0.025 molarowym buforze fosforanowym. Czas półtrwania EMS w 0.1 molarowym buforze fosforanowym o pH 7 wynosi 9 godzin, natomiast w wodzie 11.5 godziny (41). Roztwór EMS w rozcieńczonym roztworze buforu stosowano zgodnie z sugestią cytofizjologów roślin, aby zmniejszyć efektywność toksycznego działania kwasu metylosulfonowego - jednego z produktów hydrolizy EMS. (24,83). Ze względu na nietrwałość tego związku i jego potencjalną kancerogenność do każdego traktowania sporządzano świeże roztwory, a samo traktowanie przeprowadzano stosując zalecane przez Ehrenberga środki ostrożności. Ekspozycje na EMS trwające od 4 do 8 godzin prowadzone były w komorze z pleksi z zabezpieczonym źródłem światła. W komorze utrzymywano niewielkie podciśnienie, aby zapobiec wydostawaniu się lotnego EMS na zewnątrz komory. Wymagana temperatura utrzymywana była przez regulowaną termometrem kontaktowym ekspansję ciekłego azotu. Przycięte kwiatostany o równej długości łodygi zamurzano w roztworach umieszczonych w specjalnych pojemnikach ekspozycyjnych. Rośliny przeznaczone do traktowania kontrolnego zamurzane były w roztworze buforu fosforanowego.

Traktowanie roślin poprzez zanurzenie łodyg kwiatostanu w roztworze badanego związku zastosowano również w przypadku fluorku sodu. Fluorek sodu wybrano do badań ze względu na rolę, jaką fluor odgrywa w zanieczyszczeniach środowiska. Należy on do grupy związków mających ogromny udział w emisjach przemysłowych. Fluorek przedstawiany jest jako inhibitor wielu reakcji enzymatycznych (52,53,67,70), natomiast są kontrowersje odnośnie jego mutagennego charakteru. Rośliny traktowane były w warunkach laboratoryjnych roztworem 2,4 mM fluorku sodu przez okres około 5 godzin (25, 26).

W trakcie badań nad porównaniem skuteczności mutagennej EMS oraz promieniowania stwierdzono, że przycięcie kwiatostanu wpływa na radiowrażliwość roślin i że zmiana radioczułości jest zależna od długości przerwy między przycięciem roślin a traktowaniem (21). Na efekt ten nie zwrócono uwagi w pracach amerykańskich ani japońskich. Ponieważ stwierdzono, że obniżenie radioczułości prawie zanika po upływie 24 godzin od przycięcia, do tych i wszystkich pozostałych badań stosowano ukorzenione kwiatostany (w których efekt nie występuje) lub przycięte 24 - 48 godzin przed traktowaniem.

Trzecim badanym związkiem był gazowy 1,2 dwubromoetan, również znany mutagen i szeroko stosowany dodatek do paliw, środków agrotechnicznych itp. (12,13,32,43,128). Traktowanie roślin gazowym DBE w szczelnej komorze (Rys. 3.2.1.1.), przez którą przepływał stały strumień powietrza zawierający określoną i kontrolowaną ilość DBE. Cechowanie układu oraz pomiary kontrolne na wejściu i wyjściu powietrza z komory wykonano z zastosowaniem chromatografii gazowej (chromatograf Varian 1740 z kolumną szklaną,



Rys. 3.2.1.1. Schemat komory ekspozycyjnej stosowanej w eksperymentach z gazowym 1.2 dwubromoetanem (23,76)

wypełnioną wypełniaczem Tenax GC). Pomiary chromatograficzne na wyjściu komory wykonywane w odstępach 20-minutowych wykazywały, że po upływie czasu ok. 1 godziny od włączenia strumienia z DBE ustalała się równowaga w komorze i poziom DBE pozostawał stały. Po godzinie od przzerwania dopływu strumienia gazowego DBE rośliny były wyjmowane z komory i transportowane do napromieniania.

3.2.2. Napromienianie

Do napromieniania roślin promieniowaniem X stosowano 250 kV źródło promieni X stosując filtr (0.4 Sn + 0.25 Cu + 1.0 Al)

zachowu ęc stałą moc dawki 0.3 Gy/min. Do napromieniowania roślin promieniowaniem gamma stosowano źródło ^{60}Co Gammatronu-3 Instytutu Onkologii w Krakowie (135). Moc dawki wynosiła 0.75 Gy/min.

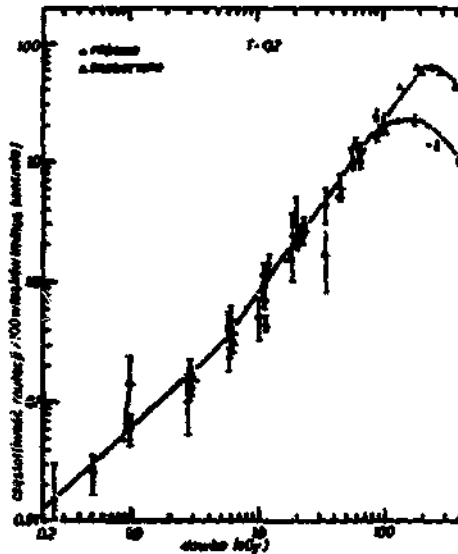
W trakcie napromieniowania, rośliny były umieszczane dla utrzymania wilgotności w torebkach foliowych i przykryte płytką z pleksiglasu o grubości 0.6 mm.

Po napromieniowaniu rośliny przenoszone do komory warstowej, gdzie pozostawiano je w kontrolowanych warunkach w pojemnikach z napowietrzaną pożywką wodną aż do zakończenia okresu mierzenia mutacji.

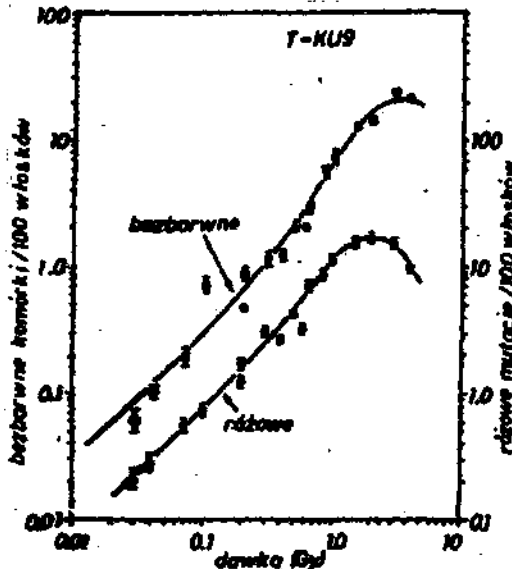
4. Badania efektywności mutagennej promieniowania i chemicznych mutagenów

4.1. Porównanie radiowrażliwości klonów

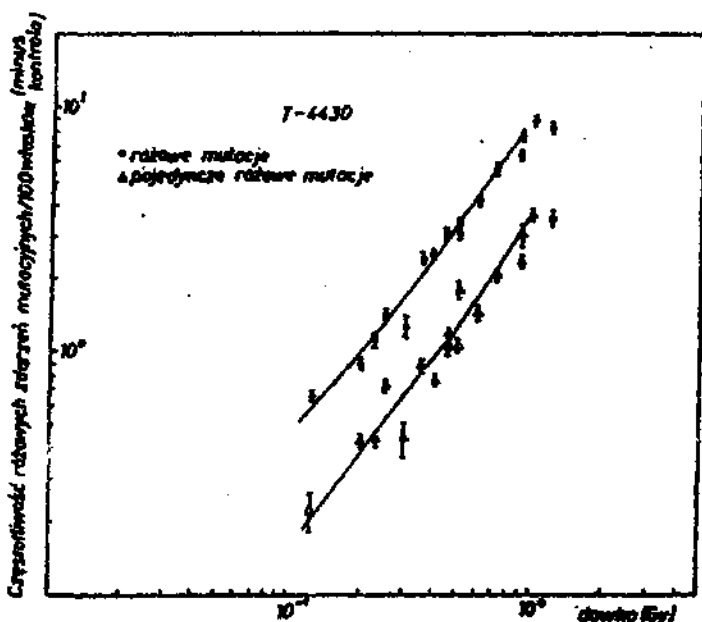
Zastosowanie trzech różnych klonów *Tradescantia* do badań zależności efektu biologicznego od wielkości dawki pozwala na porównanie wrażliwości badanych klonów. Na Rys. 4.1.1. przedstawiono krzywe zależności częstotliwości mutacji od dawki promieniowania X dla klonu *Tradescantia* -02. W zakresie niskich dawek (do 0.05 Gy) krzywa dawka-efekt zarówno dla różowych, jak i bezbarwnych mutacji ma charakter zbliżony do liniowej zależności. Dla dawek większych krzywa zmienia kąt nachylenia i wykazuje nasycenie. Maksimum (ok. 22 mutacje/100 włosków) częstotliwości mutacji różowych występuje przy dawkach rzędu 2 Gy, natomiast dla mutacji bezbarwnych maksimum (60 mutacji/100 włosków) występuje przy dawce 2.5 Gy. Rys. 4.1.2. przedstawia zależność występowania bezbarwnych komórek oraz różowych mutacji od dawki promieniowania X dla klonu *Tradescantia* KU 9. Krzywe dawka-efekt mają charakter liniowo-kwadratowy. Maksimum częstotliwości w rejonie dawek nasycenia występuje dla różowych mutacji ok. wartości 18 mutacji/100 włosków przy dawce 2.0 Gy, natomiast dla bezbarwnych komórek ok. wartości 22 mutacji/100 włosków przy dawce ok. 3.0 Gy. Zależność częstotliwości różowych i pojedynczych różowych mutacji od dawki promieniowania gamma dla klonu *Tradescantia* 4430 przedstawia Rys. 4.1.3. Wydaje się, że w przypadku klonu T.-4430 nasycenie występuje już dla wartości 10 mutacji/100 włosków przy dawce 1.0 Gy. Pojedyncze różowe mutacje występują z częstotliwością stanowiącą ok. 37 % częstotliwości mutacji różowych w zakresie



Rys. 4.1.1. Zależność efekt-dawka dla różowych i bezbarwnych mutacji po napromienianiu kwiatostamu klonu T-02 promieniowaniem X (135)



Rys. 4.1.2. Zależność efekt-dawka dla różowych i bezbarwnych mutacji po napromienianiu kwiatostanów T KU 9 promieniowaniem X (24)



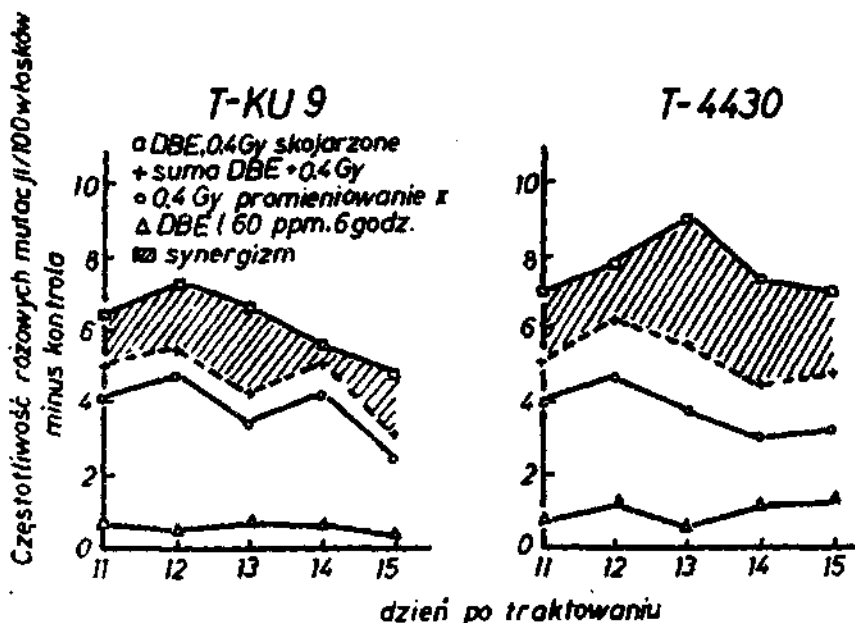
Rys. 4.1.3. Zależność efekt-dawka dla pojedynczych różowych i różowych mutacji po napromienieniu kwiatostanów klonu T-4430 promieniowaniem gamma (25)

dawk od 0.1 Gy - 1.0 Gy. Krzywe dla tych mutacji są przesunięte równolegle w stosunku do siebie i mają również liniowo kwadratowy charakter.

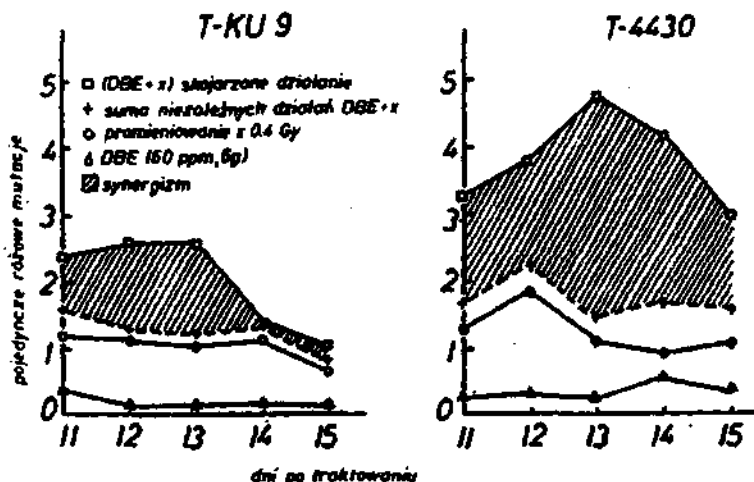
Z porównania tych trzech klonów wynika, że istotnie klon *Tradescantia* O2 jest najbardziej wrażliwym klonem. Potwierdza to literaturowe informacje o wyjątkowej przydatności tego klonu w radiobiologii. Ze względu na częstotliwość indukowania mutacji różowych klon T-KU 9 ma zbliżoną wrażliwość do klonu T-O2, natomiast indukowaniu komórek bezbarwnych promieniowanie jest znacznie efektywniejsze w przypadku klonu T-O2. Klon T-4430 wykazuje w tych badaniach najniższą wrażliwość na promieniowanie w porównaniu z pozostałymi klonami. Maksymalne wartości uzyskiwane dla różowych mutacji dla dawek w rejonie nasycenia są niższe niż w pra-

cach amerykańskich (15 mutacji/100 włosków) (122). W pracach amerykańskich dawka nasycenia dla klonu T-4430 jest bliższa 1.5 Gy, gdy tymczasem w naszych pracach tylko 1.0 Gy. Wydaje się, że główną przyczyną występujących różnic jest zmiana w metodyce traktowania roślin, wprowadzona po wykazaniu różnic w radiowrażliwości świeżo przycinanych kwiatostanów. Przeanalizowanie podobnej różnicy stwierdzonej wcześniej dla klonu T-KU 9 (zaciemnione punkty na Rys. 4.1.2.) było treścią dodatkowej pracy poświęconej przyczynom tych odchyżeń. W efekcie tych badań zaproponowano poprawkę do metodyki stosowania klonów *Tradescantia* (21). Jeżeli uwzględnimy takie wyjaśnienie różnicy we wrażliwości kwiatostanów T-4430, traktowanych w prezentowanych badaniach 24 - 48 godzin po przycięciu, przedstawione rezultaty wykazują dobrą korelację z dotychczasowymi danymi.

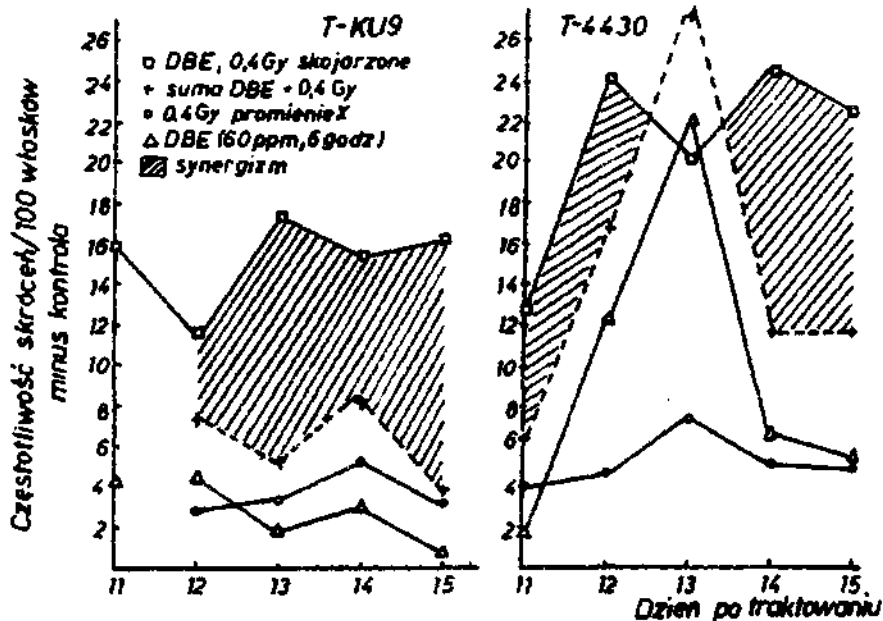
Z prac amerykańskich wynika, że T-4430 jest klonem o wyjątkowej wrażliwości na chemiczne mutageny. Dlatego postanowiono porównać wrażliwość klonu T-4430 i T-KU 9 na działanie promieniowania i jednego z badanych chemicznych mutagenów (1,2 dwubromoetanu) zastosowanych w traktowaniach niezależnych i skojarzonych. Kształtowanie się w czasie po traktowaniu częstotliwości różowych mutacji przedstawiono na Rys. 4.1.4., pojedynczych różowych mutacji (Rys. 4.1.5.) i zdarzeń letalnych (Rys. 4.1.6.), wywołanych różnymi traktowaniami: gazowym DBE, samym promieniowaniem X o dawce 0.4 Gy oraz ich skojarzonym działaniem. Po lewej stronie przedstawione są rezultaty uzyskane dla klonu T-KU 9, natomiast po prawej stronie rezultaty uzyskane w tych samych eksperymentach dla klonu T-4430. Rezultaty te wykazują, że istotnie dla klonu T-4430 obserwowane częstotliwości mutacji są nieco wyższe niż w przypadku



Rys. 4.1.4. Kształtowanie się, w zależności od dnia po traktowaniu, występowania różowych mutacji w komórkach włosków pręcików dwóch klonów *Tradescantia* poddanych kombinacji traktowań (23)



Rys. 4.1.5. Kształtowanie się, w zależności od dnia po traktowaniu, występowania pojedynczych różowych mutacji u dwóch klonów *Tradescantia* poddanych kombinacji traktowań (23)



Rys. 4.1.6. Kształtowanie się, w zależności od dnia po traktowaniu, występowanie skróconych włosów u dwóch klonów *Tradescantia* poddanych kombinacji traktowań

klonu T-KU 9. Różnice te jednak nie są tak duże (Tabl. 4.1.1.) jak można się było spodziewać z Brookhaven National Laboratory (125), gdzie stwierdzono, że klon T-4430 jest aż 9 razy bardziej wrażliwy na chemiczne mutageny niż klon T-02. Klon T-4430 wykazał istotnie aż 3.3 razy większą wrażliwość na DBE od klonu T KU 9, ale w przypadku efektu letalnego mierzonego częstością występowania skróconych włosów (Rys. 4.1.6.). W przypadku mutacji różowych i pojedynczych różowych stwierdzono dla klonu T-4430 dwukrotnie większą wrażliwość (1.8, 2.0 odpowiednio). Rezultaty te, jak również fakt, że klon T-KU 9 cechuje się wyjątkową żywotnością hodowli zdecydowały o wybraniu do badań z EMS oraz DBE klonu T-KU 9.

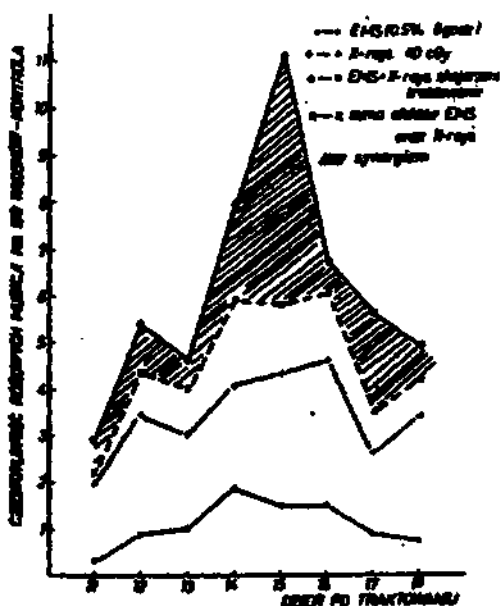
Tabela 4.1.1. Wpływ promieniowania oraz DBE w traktowaniu skojarzonym oraz indywidualnym na wielkość mierzonych efektów biologicznych

Klon	Dawka	Traktowanie chemiczne		Ilość mierzonych włosków	Częstotliwość mierzonych efektów		
		stężenie	czas		mutacje		
					różowe	pojed. różowe	skrócenia
KU-9	-	-	-	31017	0.17 ± 0.02	0.03 ± 0.01	0.78 ± 0.02
KU-9	0.4 Gy	-	-	10323	4.00 ± 0.19	1.06 ± 0.09	4.48 ± 0.09
KU-9	-	60 ppm	6 h	26334	0.73 ± 0.05	0.20 ± 0.03	3.70 ± 0.03
KU-9	0.4 Gy	60 ppm	6 h	10423	6.30 ± 0.25	2.01 ± 0.14	18.40 ± 0.18
T-4430	-	-	-	14474	0.27 ± 0.04	0.12 ± 0.03	0.86 ± 0.03
T-4430	0.4 Gy	-	-	6450	4.00 ± 0.25	1.37 ± 0.15	6.25 ± 0.14
T-4430	0.4 Gy	60 ppm	6 h	6286	7.90 ± 0.35	3.92 ± 0.25	21.67 ± 0.26
T-4430	-	60 ppm	6 h	5388	1.30 ± 0.15	0.46 ± 0.09	10.46 ± 0.17

4.2. Porównanie efektywności mutagennej promieniowania i mutagenów chemicznych w działaniu niezależnym i skojarzonym

4.2.1. Promieniowanie, EMS

Dla działających niezależnie, EMS oraz DBE stwierdzono liniowo-kwadratową zależność efektu od dawki mutagenów 24, 76. Natomiast w tabeli 4.2.1.1 przedstawiono rezultaty różnych efektów biologicznych trzech kombinacji skojarzonych i niezależnych traktowań kwiatostanów T-KU9 różnymi dawkami promieniowania oraz roztworem EMS. Rysunek 4.2.1.1. obrazuje kształtowanie się częstotliwości różowych mutacji w zależności od czasu po eksperymencie dla trzech różnych traktowań: chemiczny mutagen 0.5% roztwór EMS przez okres 4 godzin, 0.4 Gy dawka promieniowania i skojarzone traktowanie EMS 0.5% - przez 4 godziny + dawka 0.4 Gy. Porównanie zależności uzyskanych dla indywidualnych traktowań potwierdza literaturowe doniesienia, że EMS jest bardzo efektywnym mutagenem. Według fizjologów roślin traktowanie roślin roztworem przez

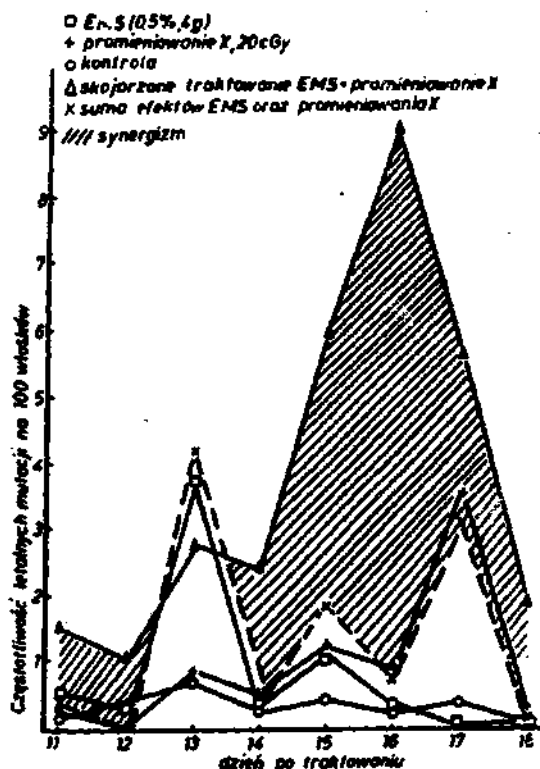


Rys.4.2.1.1. Różowe mutacje u T-KU9 po kombinacji traktowań

Tabela 4.2.1.1. Wpływ promieniowania oraz EMS w traktowaniu skojarzonym oraz indywidualnym na wielkość mierzonych efektów biologicznych

Traktowanie			Ilość mierzonych włosków	Częstotliwość różowych mutacji \pm SE	Częstotliwość mutacji na 100 włosków			Intensywność kwitnienia	
Dawka (Gy)	Stężenie (%)	Czas (godz)			pojedynczych różowych	bezbarwnych	letalnych		
	0	0	24880	0.13 \pm 0.2	0	0.28	0.49	0.56	100
0.2	0	0	10192	1.23 \pm 0.1	0.26	0.50	0.56	0.64	114.3
-	0.5	4	12734	0.35 \pm 0.05	0.15	0.28	1.21	0.60	107.1
0.2	0.5	4	8921	2.03 \pm 0.14	0.62	0.66	2.73	0.54	96.4
Synergizm				0.68	0.21	0.16	1.45		
0.4	0	0	10566	2.77 \pm 0.16	1.13	1.24	1.81	0.66	108.9
kontrola	0	0	20482	0.20 \pm 0.10	0.04	0.21	0.35	0.61	100.0
0.4	0.5	4.0	8697	4.22 \pm 0.22	1.85	2.26	5.20	0.42	68.2
-	0.5	4.0	13775	0.58 \pm 0.06	0.30	0.72	1.78	0.66	108.2
Synergizm				1.07	0.46	0.51	1.96		
0.6	0	0	8340	3.27 \pm 0.20	0.82	2.03	3.47	0.42	68.4
kontrola	0	0	15686	0.15 \pm 0.20	0.01	0.11	0.68	0.62	100.0
0.6	0.5	8.0	3947	7.08 \pm 0.39	2.54	4.52	16.28	0.33	53.4
-	0.5	8.0	9845	1.08 \pm 0.10	0.59	0.90	3.91	0.52	83.9
Synergizm				2.88	1.14	1.70	9.58		

zanurzanie łądyg jest najmniej skuteczne, W pracach amerykańskich (115) i japońskich (66) stosowano gazową ekspozycję, względnie zanurzanie kwiatostanów w roztworze. W prezentowanej pracy zdecydowano się na traktowanie łądyg ze względu na konieczność z jednej strony ujednoczenia w prosty sposób warunków ekspozycji, a z drugiej strony na możliwość dowolnego regulowania czasu traktowania. Prawdopodobnie mniej skuteczne traktowanie jest jedną z przyczyn różnicy w efektywności EMS uzyskanej po traktowaniu ziarniaków jęczmienia przez Ehrenberga (43). Zbadana przez niego efektywność mutagenna wynosi 40 % na poziomie CL_{50} , gdy tymczasem w prezentowanych danych efektywność mutagenna wynosi 0.93 % na poziomie 3.91 % zdarzeń letalnych (Tabl. 4.2.1.1. i Rys. 4.2.1.2.)



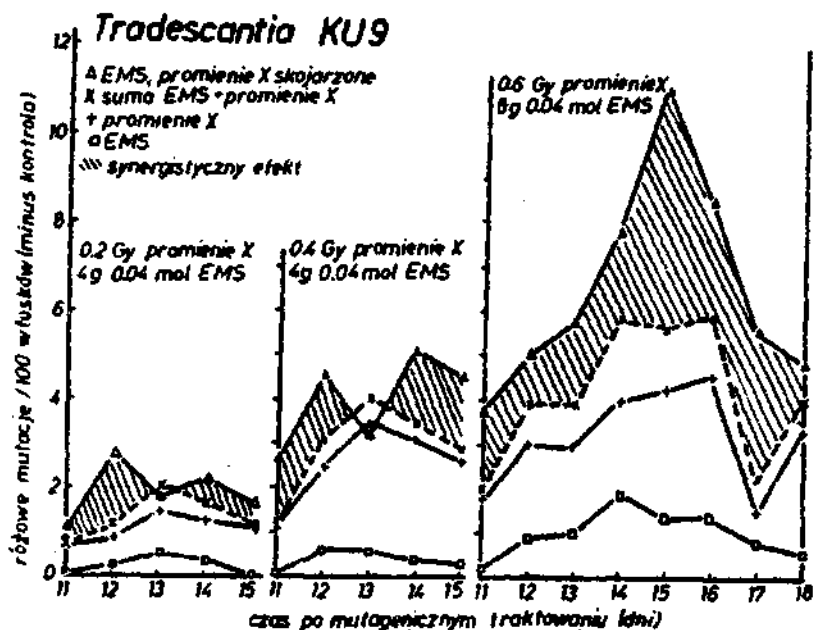
Rys. 4.2.1.2. Występowanie skróconych włóków u T-KU9 po kombinacji traktowań

Przyjmując liniową korelację do oszacowania efektu na poziomie 50 % przeżywalności uzyskujemy efektywność mutagenną 11.5 %.

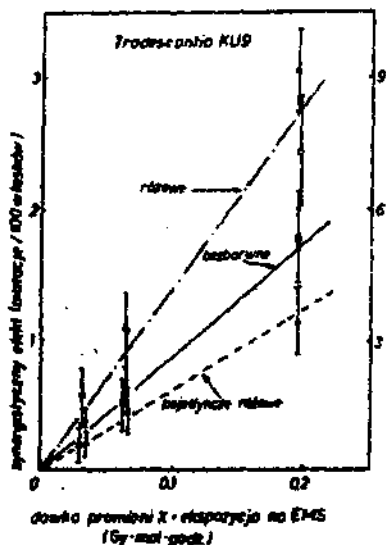
Wprawdzie z uzyskanych danych wynika, że należałoby przyjąć do szacowania zależność liniowo-kwadratową (24), niemniej jednak nie zmieniło by to zasadniczo różnicy w szacowaniu. Natomiast efektywność indukowania zdarzeń letalnych ($-\frac{1}{LD_{50}}$) jest wyraźnie wyższa u Ehrenberga, tzn. $1.7 \cdot 10^{-3} \text{ (mM}^{-1} \text{godz)}^{-1}$, gdy tymczasem dla *Tradescantia* w eksperymentach z ekspozycją 0.5 EMS/8 godz. wynosi ono $0.24 \cdot 10^{-3} \text{ (mM}^{-1} \text{godz)}^{-1}$. Świadczy to o dobrze dobranych warunkach ekspozycji zapobiegających silnej toksyczności EMS. Porównując wrażliwość *Tradescantia* na promieniowanie oraz na EMS na poziomie indukowania różowych mutacji uzyskujemy wartości REC od $1.8 - 2.8 \cdot 10^{-2} \text{ M} \text{ godz}$, w przypadku indukowania zdarzeń letalnych REC przyjmuje wartości od $3.7 - 4.7 \cdot 10^{-3} \text{ M} \text{ godz}$. Wartości te są zdecydowanie wyższe od cytowanych przez Moustachiego dla konwersji genu u drożdży, dla których REC wynosi $4.2 \cdot 10^{-5} \text{ M} \text{ godz}$ (97). Również wartości, które można by spróbować oszacować z danych amerykańskich wydają się być zdecydowanie niższe ($3 \cdot 10^{-5} \text{ M} \text{ godz}$), ale porównanie to nie jednoznaczne, gdyż po pierwsze w pracach amerykańskich brak jest szczegółowej informacji odnośnie czasu trwania ekspozycji, a po drugie stosowany był w nich gazowy mutagen. Sam fakt, że rośliny w jednym przypadku pobierają mutagen z roztworu lodygami, a w drugim - gazowy mutagen dyfunduje do tkanki, implikuje różne procesy pośrednie na drodze mutagenu do komórki tarczowej. Występujące więc różnice w REC potwierdzają generalnie zdefiniowane wcześniej zastrzeżenia (54,97) odnośnie wpływu różnych parametrów na wartość REC.

Z rezultatów przedstawionych na rysunkach 4.2.1.1. oraz 4.2.1.2. wynika bardzo ważne spostrzeżenie, że EMS oraz promieniowanie X, zastosowane w warunkach eksperymentalnych i w skojarzonym traktowaniu indukują więcej mutacji niż należałoby się spodziewać zakładając addytywny charakter współdziałania. Linia przerywaną zaznaczono na rysunkach sumę efektów niezależnych oddziaływań. Przestrzeń zakreskowana obrazuje zatem zakres synergistycznego współdziałania tych dwóch czynników. Dane w tabeli 4.2.1.1. przedstawiają rezultaty pomiarów badanych efektów biologicznych dla kombinacji różnych stężeń i dawek, przedstawionych w wartościach średnich z efektów mierzonych pomiędzy 11 a 15 dniem po traktowaniu. W przypadku intensywności kwitnienia wartości uzyskiwane dla poszczególnych traktowań nie wykazują dramatycznych różnic; wyraźniejsze obniżenie wystąpiło tylko w przypadku skojarzonego działania, co wpływało ujemnie na statystykę pomiarów. Natomiast efekt synergistyczny wyraźnie występuje dla wszystkich mutacji koloru oraz zdarzeń letalnych. Wartości efektu synergistycznego sugerują zależność efektu od zastosowanej dawki czy ekspozycji. Widać to wyraźnie na rysunku 4.2.1.3., na którym rezultaty uzyskane dla częstotliwości różowych mutacji są przedstawione w kolejności rosnącej całkowitej ekspozycji, tzn. iloczynu dawki, stężenia i czasu traktowania. Sugestię, że wartość efektu synergistycznego rośnie proporcjonalnie do całkowitej ekspozycji potwierdzają dane z rysunku 4.2.1.4. Przedstawiono na nim wartości synergizmu uzyskane dla różnych typów mutacji w funkcji iloczynu dawki oraz stężenia i czasu traktowania. Wartość efektu synergistycznego liczono według zależności:

$$Y = Y_{skoj} - (Y_{prom} + Y_{chem})$$



Rys. 4.2.1.3. Kształtowanie się różowych mutacji indukowanych przez trzy różne kombinacje traktowań EMS oraz promieniowania X (24)



Rys. 4.2.1.4. Zależność efektu synergistycznego, występującego przy skojarzonym działaniu EMS oraz promieniowania X, od całkowitej ekspozycji (24)

gdzie:

- Y_{skoj} = częstotliwość mutacji indukowana przy skojarzonym traktowaniu chemicznym mutagenem (x moli t godz) i dawką D promieniowania i pomniejszona o wartość kontrolną
- Y_{prom} = częstotliwość mutacji indukowana przez promieniowanie o dawce D i pomniejszona o wartość kontroli
- Y_{chem} = częstotliwość mutacji indukowana przez ekspozycję na chemiczny mutagen (x moli t godz) i pomniejszona o wartość kontroli.

Uzyskane rezultaty są zgodne z wyjaśnieniem zjawiska synergizmu przez K.H.Chadwick'a i H.P.Leenhouts'a. W oparciu o molekularną teorię działania promieniowania efekt synergistyczny powinien być proporcjonalny do iloczynu ekspozycji:

$$N = \eta \cdot XD$$

Przedstawiona na rysunku 4.2.1.4. liniowa zależność najwyraźniej potwierdza przyjętą hipotezę. W badaniach A. Aspreita (1) oraz Wallace'a (143) sygnalizowano występowanie efektu synergistycznego dla indukowania mutacji w skojarzonym działaniu EMS oraz promieniowania gamma, natomiast Favret (46) i Doll (3) nie stwierdzili tego efektu prawdopodobnie na skutek pominięcia w badaniach istotnych czynników wpływających na efekt takich, jak kolejność traktowania i przedział czasowy pomiędzy traktowaniem.

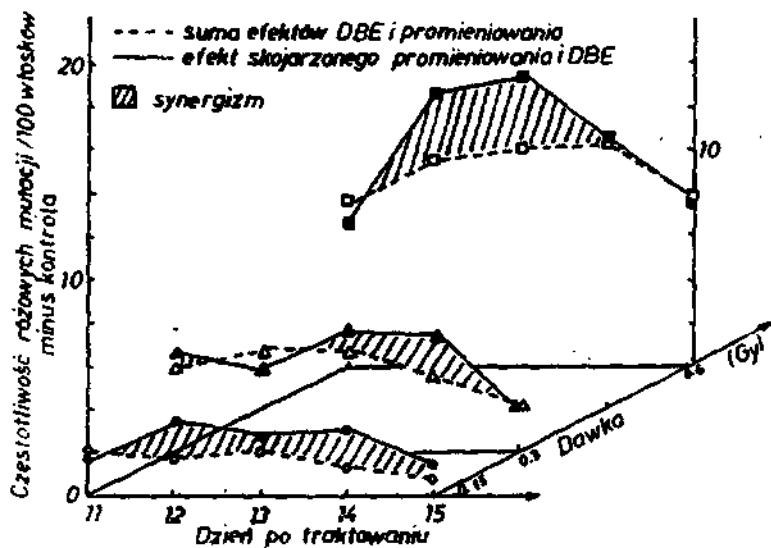
4.2.2. Promieniowanie, DBE

Przy porównanku wrażliwości klonów T-KU 9 oraz T-4430 na

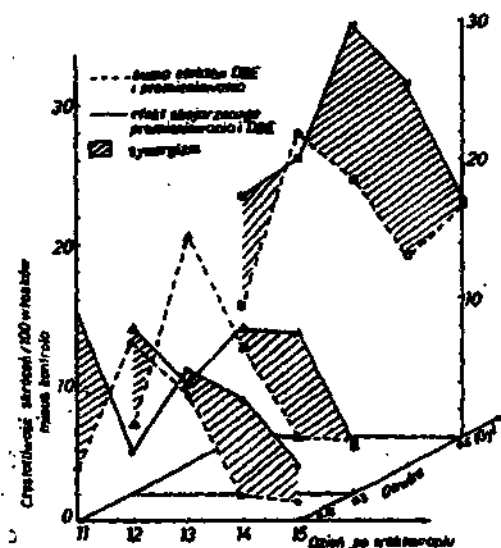
różne mutageny (Rys. 4.2.1. i 4.2.3. oraz 4.2.4.) stosowano także skojarzone traktowanie gazowym DBE i promieniowaniem X. W badaniach tych stwierdzono również występowanie synergistycznego efektu dla wszystkich badanych typów mutacji. Sprawdzone, jaki efekt występuje dla innych kombinacji traktowań. Tabela 4.2.2.1. prezentuje przykłady mierzonych wartości różnych efektów biologicznych, natomiast na rysunku 4.2.2.1. przedstawiono część wyników uzyskanych dla różowych mutacji. Przerywaną linią zaznaczono algebraiczną sumę efektów uzyskanych dla indywidualnych oddziaływań, natomiast linia ciągła reprezentuje dane uzyskane po skojarzonym działaniu obu czynników. Zakreskowane powierzchnie obrazują więc zakres synergistycznego współdziałania różny dla trzech różnych dawek promieniowania (oś "Z"). Rysunek 4.2.2.2. przedstawia w ten sam sposób wyniki uzyskane dla pomiarów częstości skróceń. Zarówno wartości indywidualnych efektów, jak i zakres synergistycznego współdziałania jest jeszcze silniej wyrażony niż w przypadku mutacji różowych. Jeżeli porównamy skuteczność indukowania różowych mutacji przez DBE i promieniowanie, to w oparciu o uzyskane dane RBC dla dwubromostanu liczone na poziomie różowych mutacji wynosi 44 ppm godz. Mając na uwadze fakt, że badania te różnią się od badań amerykańskich zarówno sposobem przygotowania kwiatostanów, jak i samą ekspozycją na DBE a także klonem stosowanym do badań, uzyskany RBC jest bardzo zbliżony do szacowanego na podstawie danych Schairera, tzn. 11 ppm godz (115). Natomiast w kontekście oszacowanego równoważnika dawki oraz stwierdzonego synergistycznego współdziałania DBE z promieniowaniem jonizującym, a zatem potencjalnie również z innymi mutagenami, maksymalna norma dopuszczalna dla stę-

Tabela 4.2.2.1. Wpływ promieniowania oraz DBE w traktowaniu skojarzonym oraz indywidualnym na wielkość mierzonych efektów biologicznych

Klon	Dawka	Traktowanie chemiczne		Ilość mierzonych włosków	Częstotliwość efektów mierzonych					
		stężenie	czas		mutacje			synergistyczny efekt		
					różowe	poj.różowe	skrócenia	różowe	poj.różowe	skrócenia
KU-9	-	-	-	30338	0.14±0.02	0.03±0.01	1.05±0.03			
KU-9	0.15 Gy	-	-	15720	1.15±0.08	0.27±0.04	1.99±0.05			
KU-9	0.32 Gy	-	-	8467	3.40±0.20	0.99±0.11	4.56±0.10			
KU-9	0.60 Gy	-	-	8082	8.60±0.33	3.13±0.20	12.28±0.18			
KU-9	-	60 ppm	6 h	12714	0.70±0.09	0.70±0.04	5.84±0.10			
KU-9	0.15 Gy	60 ppm	6 h	13033	2.47±0.13	0.74±0.07	9.57±0.12	0.76	0.31	2.79
KU-9	0.32 Gy	60 ppm	6 h	9160	4.72±0.22	1.99±0.15	11.21±0.16	0.76	0.83	1.85
KU-9	0.60 Gy	60 ppm	6 h	7925	12.10±0.35	4.11±0.23	23.01±0.24	2.91	0.81	5.93



Rys. 4.2.2.1. Kształtowanie się, w zależności od dnia po traktowaniu, częstotliwości różnorodnych mutacji indukowanych u T-KU 9 przez trzy różne kombinacje traktowań - DBE i promieniowania X



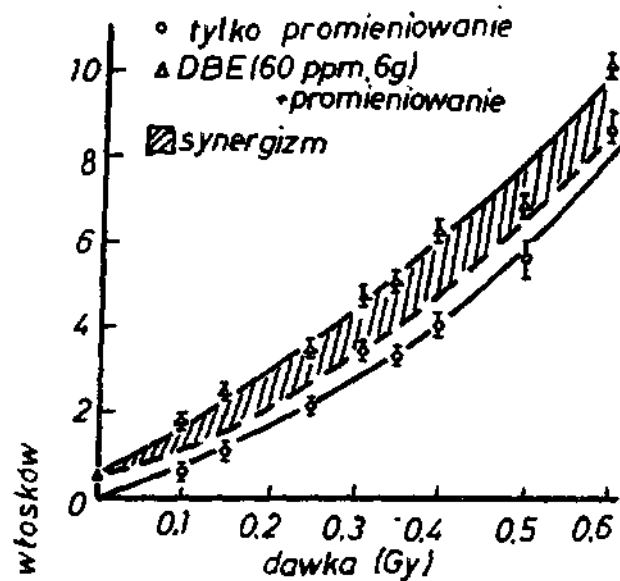
Rys.4.2.2.2. Kształtowanie się częstotliwości skróceń u T-KU9 indukowanych przez różne kombinacje traktowań

zeń DBE = 25 ppm (32) wydaje się być zdecydowanie za wysoko.

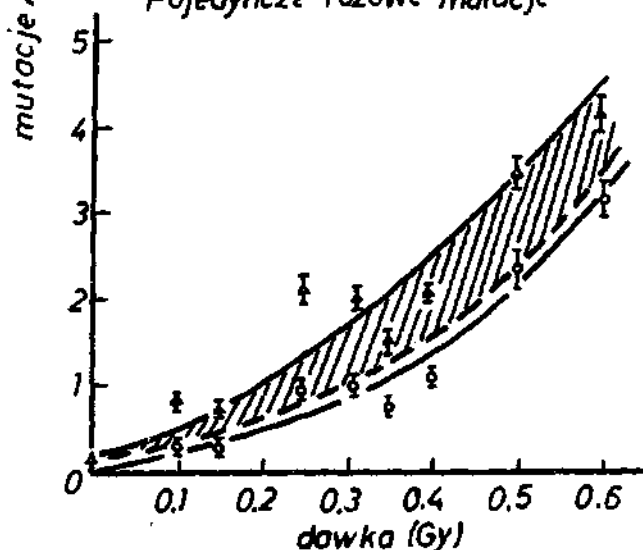
Zależność efektu synergistycznego od wielkości ekspozycji dla skojarzonego działania DBE oraz promieniowania jest wyraźnie widoczna na rysunku 4.2.2.3. Przedstawiono tu rezultaty kolejnych kombinacji skojarzonego traktowania, w którym zastosowano stałą ekspozycję na gazowy dwubromoetan oraz różne dawki promieniowania (23,73). Efekt biologiczny mierzono jako średnią częstotliwości mutacji różowych i pojedynczych różowych obserwowanych w okresie od 11 do 15 dnia po traktowaniu. Linią przerywaną oznaczono sumę efektów indywidualnych oddziaływań, natomiast zakreskowana przestrzeń ponownie obrazuje wielkość synergistycznego efektu, który w rejonie niskich dawek rośnie proporcjonalnie do dawki. Górna część rysunku prezentuje wyniki uzyskane dla wszystkich różowych mutacji, natomiast dolna dla pojedynczych różowych mutacji.

W przedstawionych rezultatach wydają się bardzo istotne dwie sprawy. Pierwsza, to wspomniane już spostrzeżenie, że w rejonie niskich dawek wyraźnie jest manifestowana korelacja wielkości efektu z wartością ekspozycji. Podkreśla to z jednej strony słuszność przyjętych założeń teorii Chadwick'a - Leenhouts'a, z drugiej strony powinno mieć ogromne znaczenie dla ochrony środowiska, gdyż niskie dawki i moce dawek są właśnie potencjalnie obecne w środowisku. Po drugie, stosowanie jakichkolwiek metod, mających na celu ujednoczenie wartości ryzyka wynikającego z różnych badanych niezależnie zagrożeń i sumaryczne szacowanie całkowitego zagrożenia, ma sens tylko w przypadku, gdy nie zachodzi zjawisko ani synergizmu ani antagonizmu (54). Jeżeli synergistyczny efekt dla indukowania mutacji istnieje i występuje

Różowe mutacje



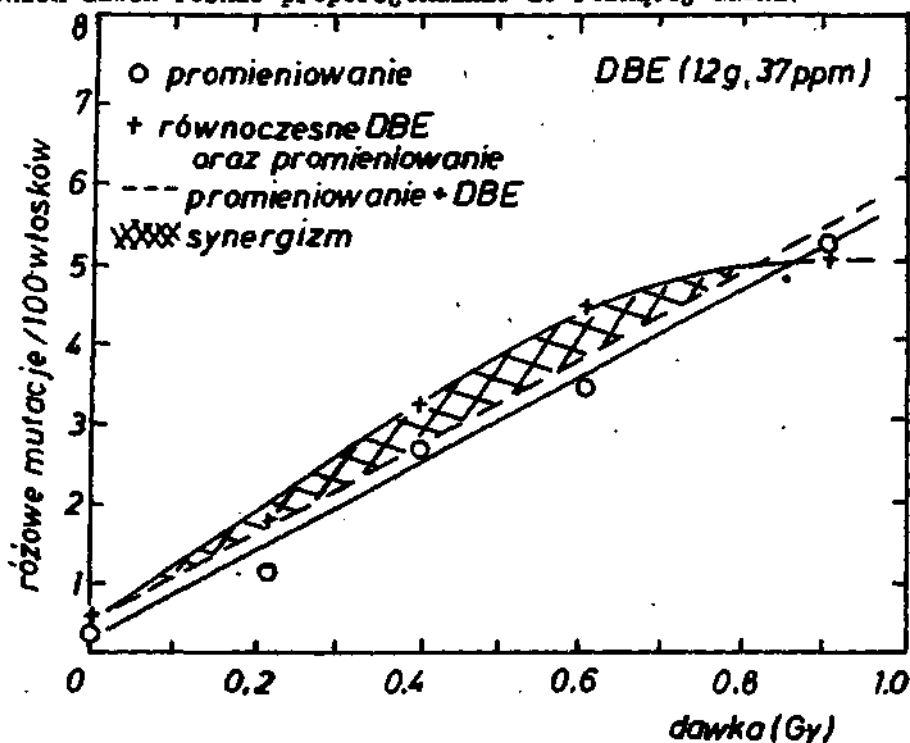
Pojedyncze różowe mutacje



Rys. 4.2.2.3. Zależność od dawki promieniowania częstotliwości mutacji indukowanych u *Tradescantia* KU 9 w różnych kombinacjach traktowań różnymi dawkami promieniowania i gazowym DBE (23,75)

w rejonie niskich dawek, to znaczy to, że konieczne są badania nad charakterem współdziałania różnych istotnych dla środowiska i jego ochrony czynników mutagennych.

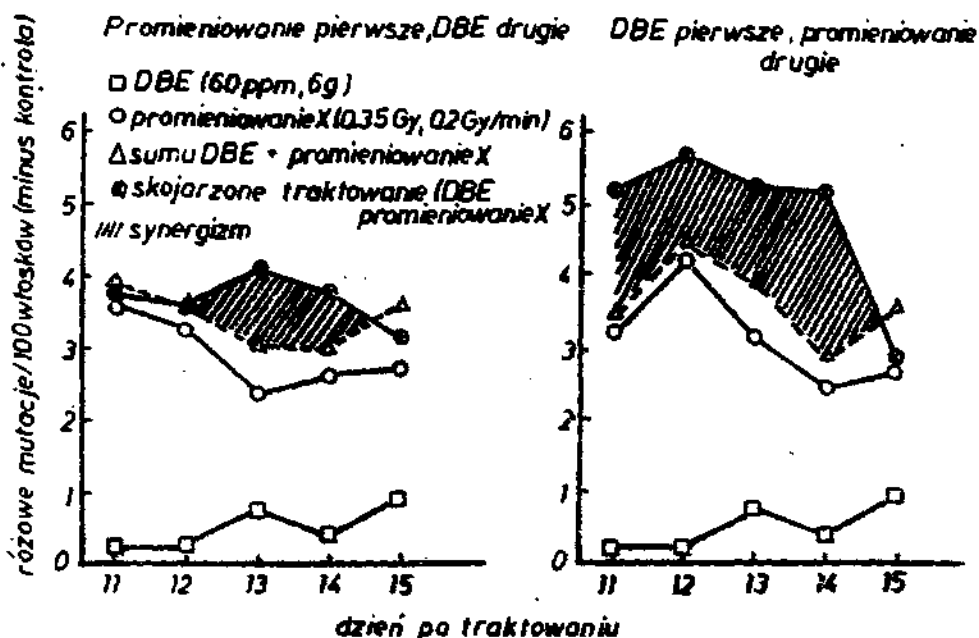
Znaczenie wykazanego efektu synergistycznego dla ochrony środowiska jeszcze wyraźniej podkreślają prezentowane na rysunku wyniki eksperymentów, w których ciągła i równoczesna ekspozycja na promieniowanie i mutagen chemiczny sprawiała, że warunki doświadczalne były bardzo zbliżone do naturalnych ekspozycji. Ponownie widzimy na tym rysunku synergistyczny efekt, który dla niskich dawek rośnie proporcjonalnie do rosnącej dawki.



Rys. 4.2.2.4. Zależność częstości różowych mutacji, indukowanych u *Tradescantia* KU 9 przez równoczesne działanie DBE oraz promieniowania X, od całkowitej dawki promieniowania (76)

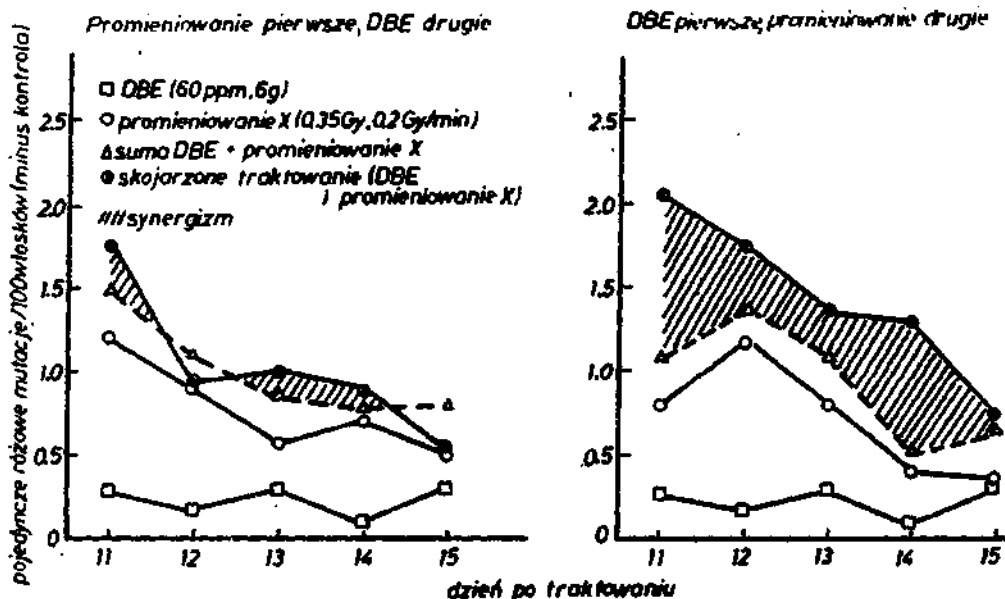
Kolejnym, niezmiernie ważnym dla ochrony środowiska wnioskiem wpływającym z przedstawionych rezultatów jest fakt, że wielkość synergistycznego efektu jest porównywalna lub większa od efektu biologicznego zastosowanego niezależnie chemicznego mutagenu.

Ze względu na pewną ilość kontrowersyjnych doniesień (38, 46,99) odnośnie występowania synergizmu, sprawdzono, w jakim stopniu metoda eksperymentalna wpływa na wielkość współdziałania. Przeprowadzono zgodnie z podanym schematem eksperymentów badania, w których zastosowano identyczne ekspozycje (ekspozycja chemiczna była wspólna dla obydwu eksperymentów), ale zmieniono kolejność traktowania.



Rys. 4.2.2.5. Zależność efektywności mutagennej skojarzonego działania DBE i promieniowania X od kolejności traktowań (23,76)

Lewa strona rysunku 4.2.2.5. obrazuje kształtowanie się częstości mutacji indukowanych przez kombinacje traktowań: przez DBE, promieniowanie oraz skojarzone DBE plus promieniowanie w przypadku, gdy napromieniowanie poprzedzało ekspozycję na chemiczny mutagen. Zakres synergistycznego współdziałania (zakreskowana powierzchnia) jest bardzo niewielki. Po prawej stronie przedstawione są rezultaty częstości mutacji mierzonych u roślin, które napromieniowane zostały taką samą dawką promieniowania, ale po chemicznej ekspozycji. W tym przypadku efekt synergistyczny jest wyraźny. W prezentowanych eksperymentach wielkość efektu synergistycznego zależna jest tylko od kolejności traktowań, gdyż w badaniach nad wpływem przycięcia kwiatostanów na wrażliwość roślin wykazano stabilność radiowrażliwości niezależnie od różnych pór napromieniowania.



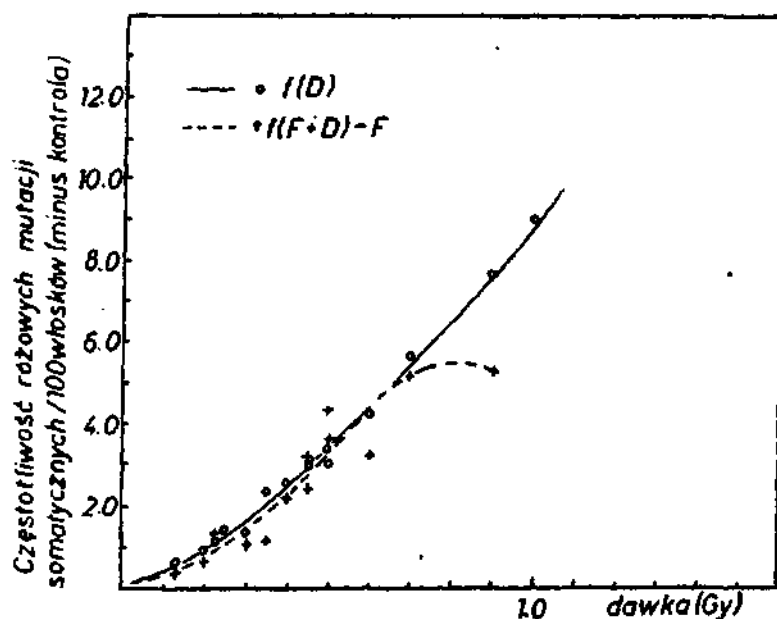
Rys. 4.2.2.6. Zależność efektywności mutagennej skojarzonego działania DBE i promieniowania X od kolejności traktowań (23,76)

Jeszcze wyraźniej widać to w przypadku pojedynczych różowych mutacji przedstawionych na rysunku 4.2.2.6. Gdy chemiczna ekspozycja poprzedza promieniowanie (prawa strona rysunku), zakres synergistycznego współdziałania (zakreskowana przestrzeń na rysunkach) jest wyraźnie widoczny.

Jeżeli przyjąć, że synergistyczny efekt jest spowodowany współdziałaniem subuszkodzeń wywołanych promieniowaniem z subuszkodzeniami pochodzącymi od chemicznego mutagenu, to w pierwszym przypadku, gdy napromienianie poprzedza ekspozycję na chemiczny mutagen, subuszkodzenia od promieniowania ulegają re-peracji (w relatywnie krótkim czasie - ok 1 godziny), prawdopodobnie zanim mutagen osiągnie komórkę tarczową. W drugim przypadku subuszkodzenia od promieniowania powstają już w obecności subuszkodzeń od chemicznego mutagenu i synergistyczne współdziałanie w wyraźny sposób zachodzi.

4.2.3. Fluor, promieniowanie

Ze względu na brak niezaprzeczalnych dowodów odnośnie mutagennego charakteru związków fluoru spodziewano się niskich wartości mierzonych częstotliwości mutacji i dlatego do badań tych zastosowano klon T-4430. Na podstawie uzyskanych w tych badaniach wyników również nie można w sposób jednoznaczny określić, czy stosowany do badań roztwór fluorku sodu jest mutagenny. (25,26). Stwierdzone w większości badanych przypadków podwyższenie częstotliwości mutacji po niezależnym działaniu fluorku sodu wymaga potwierdzenia przez zbadanie zależności dawka-efekt, której nie udało się jeszcze uzyskać. Nie stwierdzono również wystę-



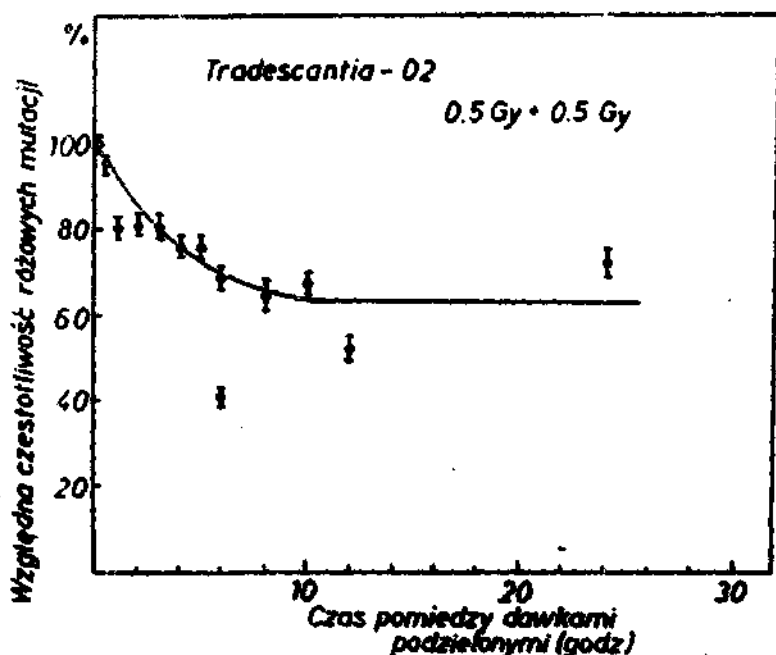
Rys. 4.2.3.1. Zależność częstotliwości mutacji indukowanych u roślin przed napromieniowaniem traktowanych i nie traktowanych fluorkiem od dawki promieniowania gamma (26)

powania synergizmu w przypadku skojarzonego działania fluorku i promieniowania gamma (Rys. 4.2.3.1.).

Jednak z porównania krzywych dawka-efekt dla roślin nie traktowanych i traktowanych fluorem wynika, że nasycenie krzywej, charakterystyczne dla mutacji z supresją, występuje dla różowych mutacji u roślin traktowanych fluorem już przy wartościach 5.5 mutacji/100 włosków dla dawki 0.7Gy. Jest to wyraźne obniżenie maksimum piku mutacji. Takie zjawisko według The Molecular Theory of Radiation Biology Chadwick'a i Leenhouts'a sugeruje zaburzenie procesów reperacji pęknięć obydwu nici w cząsteczce DNA, w układach komórkowych, w których występuje niezależna mutacja zapobiegająca lub ukrywająca ekspresję obserwowanej mu-

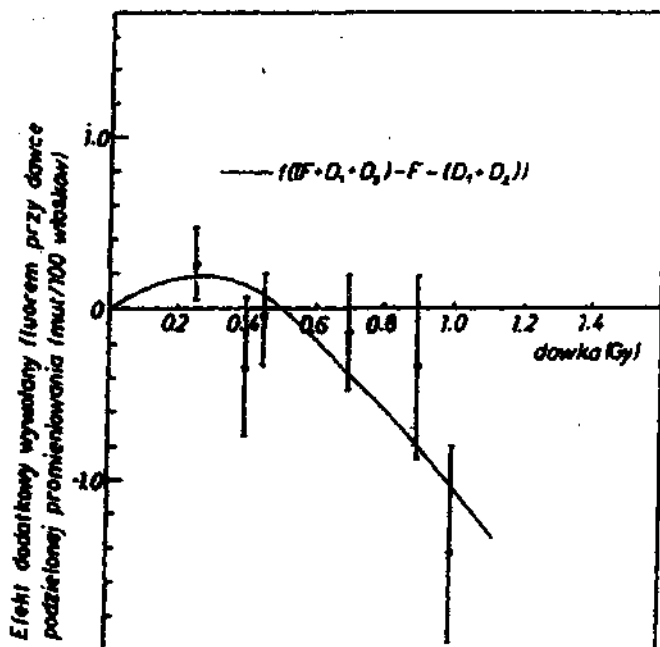
tacji. Tak jest w przypadku *Tradescantia*. Fluor sugerowany był jako potencjalny inhibitor procesów naprawy, wydawało się więc interesujące kontynuowanie badań w tym kierunku, zwłaszcza z uwzględnieniem możliwości badania procesów naprawy DNA, jakie dają eksperymenty zarówno z zastosowaniem dawki podzielonej, jak i z modyfikacją warunków po napromieniowaniu. Zastosowanie dawki podzielonej w przypadku promieniowania powoduje zmniejszenie efektu końcowego ze względu na przebiegające procesy reperacji pęknięć pojedynczych nici DNA.

Zależność efektywności procesów naprawy od czasu pomiędzy dawkami przedstawia rysunek 4.2.3.2.

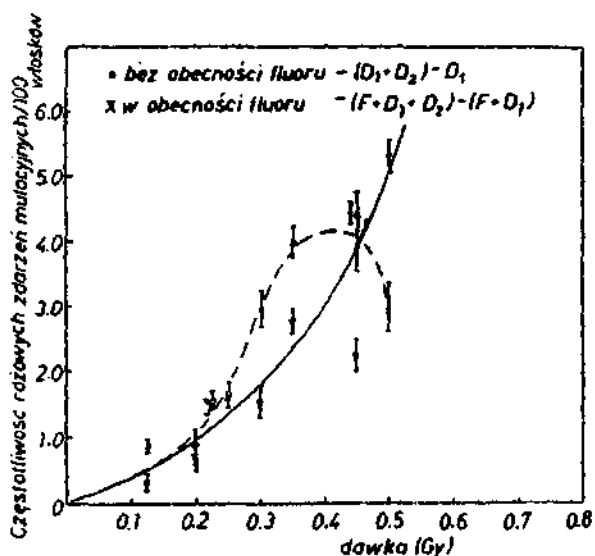


Rys. 4.2.3.2. Wpływ czasu pomiędzy dawkami podzielonymi na wielkość efektu wywołanego całkowitą dawką promieniowania. Efekt dawki podzielonej przedstawiono w procencie dawki jednorazowej (1 Gy) (23)

Wykonano cykl eksperymentów według podanego wcześniej schematu. Napromieniowanie prowadzono dwoma sposobami - stosując dawkę jednorazową oraz dawkę podzieloną z przedziałem czasowym ok. 1 godziny. Rysunek 4.2.3.3. przedstawia emergentny efekt uzyskany dla częstotliwości różowych mutacji w funkcji całkowitej dawki w doświadczeniach z dawką podzieloną. Dla wyższych dawek przyjmuje on wartości ujemne, co mogłoby sugerować, że fluor działa ochronnie. Na rysunku 4.2.3.4. przedstawiono efektywność jednej z dawek w eksperymentach z dawką podzieloną w obecności i bez fluoru. Wyniki te wykazują wyraźną zmianę w szczycie częstotliwości mutacji.



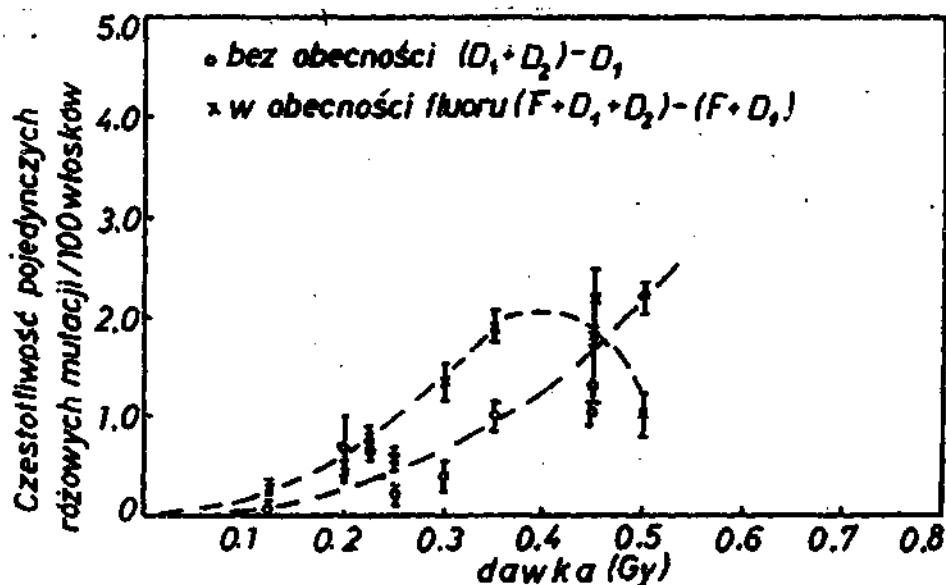
Rys. 4.2.3.3. Zmiana dodatkowego efektu mierzonego dla różowych mutacji wywołanego traktowaniem roślin fluorkiem przed napromieniowaniem dawką podzieloną, od całkowitej dawki promieniowania gamma (26)



Rys. 4.2.3.4. Zależność dawka-efekt dla jednej dawki w eksperymentach z dawką podzieloną, dla roślin traktowanych i nie traktowanych fluorkiem przed napromienianiem (26)

Zgodnie z teorią Chadwick'a - Leenhouts'a zmiana w procesie naprawy pęknięć obydwu nici DNA, po napromienianiu, może wpłynąć na prawdopodobieństwo, że powstałe pęknięcie obydwu nici DNA doprowadza do specyficznej mutacji. Dopóki naprawa pęknięć pozostaje niezmienną szczyt częstotliwości mutacji powinien być taki sam, niezależnie od rodzaju promieniowania, mocy dawki i użytych substancji mogących zmienić wrażliwość komórek na promieniowanie. Natomiast zmiana warunków po napromienianiu może wpłynąć na procesy reperacji i tym samym zmienić szczyt częstotliwości mutacji. Wydaje się więc, że traktowanie fluorkiem roślin *Tradescantia* przed napromienianiem sprawia, że jest on

obecny i po napromieniowaniu, powodując zmianę procesów naprawy pęknięć obydwu nici DNA. Należy tutaj wykluczyć prawdopodobieństwo zaburzenia cyklu komórkowego na skutek działania chemicznego czynnika, gdyż nie stwierdzono żadnej istotnej zmiany w proporcji komórek różowych do pojedynczych różowych. Zabamowanie względnie przesunięcie faz cyklu musiałoby się odzwierciedlić w zaburzeniu tej proporcji zgodnie z przedstawionymi poprzednio założeniami. Wyniki dla pojedynczych różowych mutacji prezentowane na rysunku 4.2.3.5., pokazującym skutek drugiej dawki w doświadczeniach z dawką podzieloną w obecności i bez fluoru, wykazują jeszcze wyraźniej zmianę w szczycie częstotliwości mutacji. Na podstawie otrzymanych rezultatów nie można wyjaśnić, czy fluor wpływa tylko na naprawę pęknięć obydwu nici, czy też pojedynczej nici DNA. Należy jednak podkreślić, że fluor



Rys. 4.2.3.5. Zależność dawka-efekt dla jednej dawki w eksperymentach z dawką podzieloną dla roślin traktowanych i nie traktowanych fluorkiem przed napromieniowaniem (26)

wpływa na procesy naprawy i co więcej można sugerować, że w konsekwencji obecności fluoru podczas i po napromieniowaniu może się zmienić spektrum mutacji.

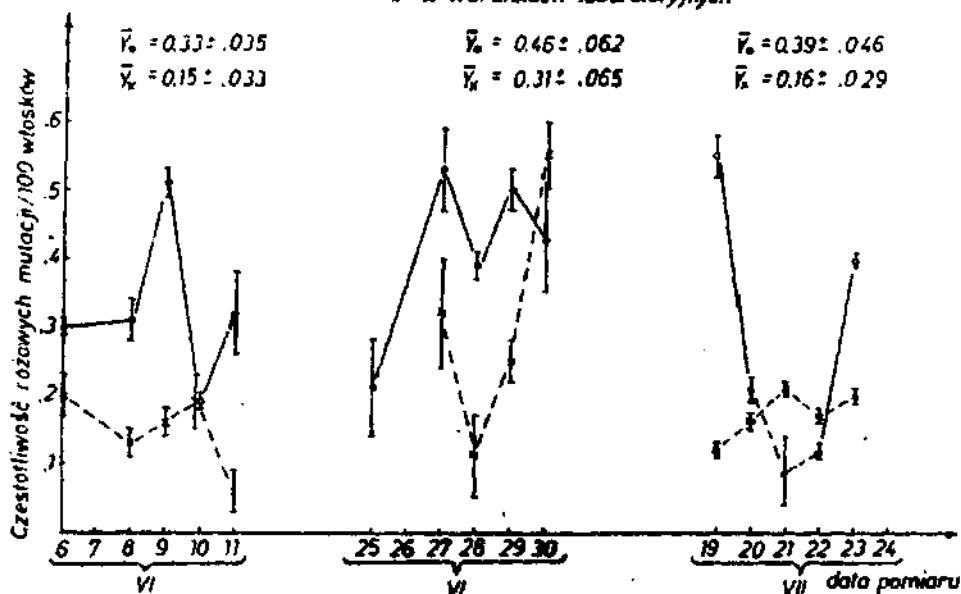
Wniosek wypływający z interpretacji uzyskanych wyników wydaje się być uzasadniony tym, że fluorki tworzą łatwo rozpuszczalne kompleksy z jonami Mg, hamując wiele Mg-zależnych enzymów i wśród nich mogą też hamować aktywowane magnezem enzymy reparacyjne (26). W kontekście uzyskanych wyników byłoby niezmiernie interesujące zbadanie w podobnych warunkach między innymi spektrum mutacji oraz prześledzenie badanych efektów w kontrolowanych warunkach punktu widzenia stężonych jonów Mg warunkach doświadczalnych. Zbadanie szczegółowe początkowej fazy krzywej może również dać interesujące dla ochrony środowiska rezultaty.

4.2.4. Zastosowanie modelu Tradescantia do oznaczenia skażeń środowiskowych

Mając na uwadze bardzo pomyślne amerykańskie rezultaty zastosowań Tradescantia do monitoringu środowiskowego, poddano rośliny klonu Tradescantia 4430 ekspozycji ciągłej na zanieczyszczone z powodu awarii filtrów powietrze w otoczeniu zakładów farmaceutycznych (25). Do badań porównawczych przeznaczono taką samą grupę roślin, lecz eksponowaną na powietrze w laboratoryjnej komorze wzrostowej na terenie Instytutu Fizyki Jądrowej. Z przedstawionych na rysunku 4.2.4.1. danych wynika, że w badanym okresie dają się zauważyć trzy etapy podwyższonej częstotliwości mutacji w stosunku do laboratoryjnej przyjętej za kontrolną:

- pierwszy, pomiędzy 6 a 11 czerwca, charakteryzuje się dwukrotnie wyższym niż w próbie kontrolnej poziomem mutacji;

• - w warunkach otoczenia zakładów przemysłowych
 x - w warunkach laboratoryjnych



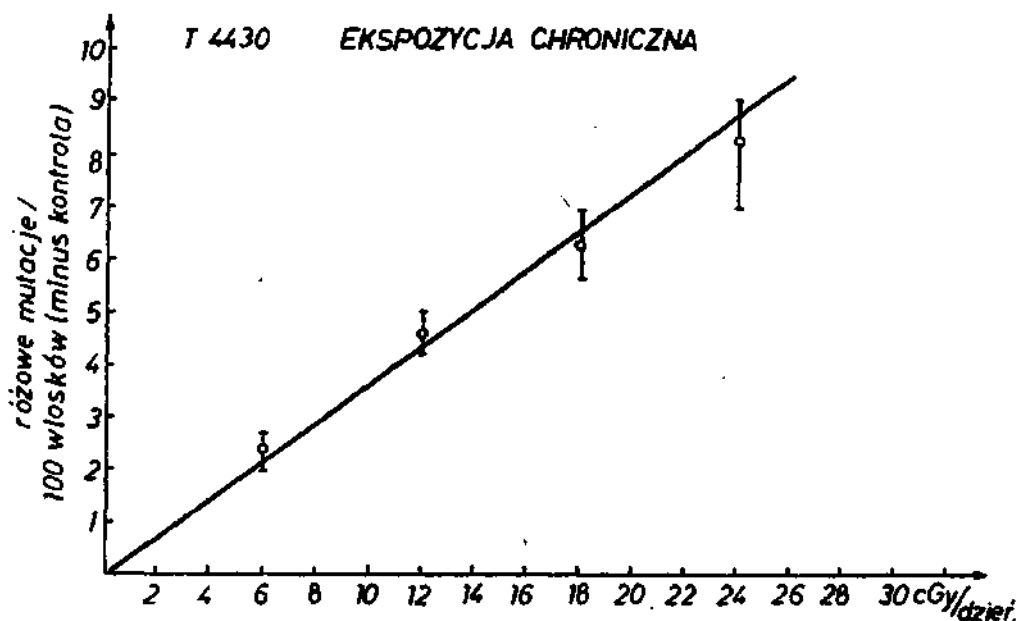
Rys. 4.2.4.1. Częstotliwość różowych mutacji indukowanych u roślin w warunkach laboratoryjnych oraz wystawianych na działanie powietrza w otoczeniu zakładów przemysłowych (25)

- drugi okres, pomiędzy 27 a 30 czerwca, wykazuje również wyższą częstotliwość mutacji niż w kontroli, ale należy zaznaczyć, że różnica ta jest mniejsza i to głównie z powodu znacznego wzrostu częstotliwości mutacji w próbie prowadzonej w laboratorium. W tym przypadku równie prawdopodobne mogą być dwa wyjaśnienia: emisja w rejonie zagrożenia pozostawała względnie stała, natomiast wystąpił czynnik działający mutagennie w miejscu przyjętym za kontrolne. Jako drugie wyjaśnienie można przyjąć, że emisja w rejonie zagrożenia obniżyła się nieznacznie, natomiast w obydwóch miejscach zadziałał czynnik starzenia się roślin podwyższający częstotliwość mutacji spontanicznych. Należy dodać, że intensywność kwitnienia w badanym przypadku jest prawie dwu-

krotnie wyższa niż w warunkach laboratoryjnych. W związku z powyższym wartości kontrolne obciążone są większym błędem.

- Pomiar prowadzone pomiędzy 19 a 23 lipca potwierdzają również tę drugą wersję. Z wyników uzyskanych na młodych roślinach, wystawionych ponownie na ekspozycję z początkiem lipca, wynika że powietrze w rejonie zakładów wpływa w sposób istotny na podwyższenie częstotliwości mutacji somatycznych. Skutek ten jest jeszcze bardziej wyraźny, gdy nie weźmiemy pod uwagę rezultatów dwóch pomiarów (zaczernione punkty na rysunku 4.2.4.1.), które są wątpliwe ze względu na fakt, że oglądane kwiatki były w bardzo zniszczonym stadium, co prawdopodobnie wprowadziło dodatkowy błąd pomiarowy.

Porównując częstotliwości mutacji wywołane u *Tradescantia* 4430 ekspozycją na powietrze otaczające zakłady z przedstawioną na rysunku 4.1.3. krzywą dawka-efekt można stwierdzić, że Rad-ekwiwalent dla zmierzonych efektów waha się w granicach 4 - 6 radów. Biorąc pod uwagę fakt, że badane emisje przemysłowe mogą mieć chroniczny charakter, wydaje się, że uzyskany efekt jest nadspodziewanie wysoki. Jeżeli porówna się uzyskane częstotliwości mutacji z danymi dla tego klonu uzyskanymi przez Schairera dla warunków chronicznej ekspozycji(115), to badane efekty są porównywalne ze skutkami chronicznej ekspozycji o mocy dawki 0.32 rada/dzień. Nawet przyjmując, że badania te były przeprowadzone w warunkach ekstremalnych, tzn. w okresie awarii filtrów, trzeba przyznać, że są to wartości bardzo wysokie. Dane uzyskane w tych badaniach są zbliżone w wartościach do uzyskanych w Stnie Elizabeth w otoczeniu przemysłu przetwórstwa nafty. Dane te przekraczają również 10-krotnie wartość efektu biologicznego,



Rys. 4.2.4.2. Zależność częstotliwości mutacji indukowanych u *Tradescantia* w warunkach ekspozycji ciągłej od mocy dawki promieniowania (cyt. za Schairem 115)

który odpowiada przyjętej granicy rocznego narażenia ludności na promieniowanie, tzn. 0,5 rem. Rezultaty te bardzo wyraźnie podkreślają fakt, że skutki zagrożeń wynikających z chemicznych zanieczyszczeń środowiska są nieporównywalnie większe od skutków wynikających z kontaktów człowieka z promieniowaniem jonizującym.

5. Wulski

5.1. Podsumowanie wyników

W niniejszej pracy przedstawiono:

- Zależności dawka-efekt dla różnych typów mutacji w trzech klonach *Tradescantia*.
- Porównanie wrażliwości trzech klonów na promieniowanie gamma i promieniowanie X.
- Porównanie wrażliwości dwóch klonów - T-KU9 i T-4430 - na działanie gazowego dwubromostanu.
- Badania nad efektywnością indukowania somatycznych mutacji w *Tradescantia* przez chemiczne mutageny EMS i DBE.
- Porównanie efektywności mutagennej promieniowania i chemicznych mutagenów oraz oszacowanie REC dla badanych związków chemicznych.
- Badania nad współdziałaniem czynników chemicznych z promieniowaniem. W ich wyniku:
 - a/ potwierdzono istnienie efektu synergistycznego dla zdarzeń letalnych;
 - b/ wykazano istnienie synergistycznego współdziałania EMS i promieniowania w indukowaniu mutacji somatycznych;
 - c/ wykazano zależność efektu synergistycznego od całkowitej ekspozycji;
 - d/ wykazano synergistyczne współdziałanie dwubromostanu z promieniowaniem, zarówno w indukowaniu zdarzeń letalnych, jak i mutacji somatycznych;
 - e/ wykazano w rejonie niskich dawek dodatnią korelację między wielkością efektu synergistycznego a dawką.

- Zależność efektu synergistycznego od kolejności traktowań.
- Występowanie efektu synergistycznego w warunkach równoczesnej ekspozycji na chemiczny mutagen i promieniowanie o niskiej mocy dawki.
- Wpływ traktowania roślin fluorkiem sodu na wartość częstości mutacji charakteryzującej szczyt mutacji dla danego promieniowania.
- Badania z dawką podzieloną, potwierdzające hipotezę, że traktowanie fluorem wpływa na procesy naprawy DNA.
- Wysoką zgodność uzyskanych danych z założeniami teorii Chadwick'a i Leenhouts'a.
- Istotne statystycznie podwyższenie mutacji na skutek ekspozycji na powietrze w rejonie zakładów przemysłowych.

5.2. Przydatność metody do badań.

Presentowane w niniejszej pracy badania w pełni potwierdzają amerykańskie i japońskie doniesienia o zaletach układu modelowego opartego na pomiarze częstości somatycznych mutacji w komórkach włosków pręcików *Tradescantia*. Potwierdzają przydatność tego modelu do badań w zakresie mutagenyzy środowiskowej, tak laboratoryjnych jak i kontrolujących zanieczyszczenie środowiska.

Oprócz niezaprzeczalnych zalet tego systemu - takich jak prostota, dostępność, szybkość - dodatkową jego wartością jest fakt, że ustalenie zależności dawka-efekt dla promieniowania jonizującego pozwala wyrazić wszelkie inne dane opisujące ekspozycję środowiska w jednostkach wspólnych dla różnych systemów kontrolujących. Pozwala badać czynniki obecne w powietrzu, glebie i wodzie, a nadto czułość tej metody pozwala określić mutagenny

charakter emisji przemysłowych.

Badania wykazały, że metoda jest również niezwykle ekonomiczna. Stosunkowo niewielkim nakładem może być zastosowana do kontroli zanieczyszczeń środowiskowych. Jako prosty i szybki układ wykrywający zanieczyszczenia może wskazywać miejsca, gdzie niezbędne będzie, droższe i bardziej czasochłonne, badanie kompleksowe.

W badaniach laboratoryjnych metoda ta oddaje nieocenione usługi, gdyż pozwala na porównywanie efektywności mutagennej czynników fizycznych i chemicznych. Badania wykazały użyteczność różnych klonów *Tradescantia* do obserwacji efektów promieniowania jonizującego oraz wpływu różnych czynników biologicznych i fizycznych na te efekty /różnorodność klonów, efekt zranienia, procesy reperacji przy dawkach podzielonych, czas pomiędzy ekspozycjami, itp./. Stosowanie metody nie wymaga żadnych skomplikowanych procedur, takich jakie na przykład są niezbędne w metodach opartych na sterylnych hodowlach kultur tkankowych. Nie bez znaczenia jest również to, że metoda ta wciąż ma potencjalne możliwości rozwoju, pod warunkiem przeprowadzenia dalszych cytogenetycznych i molekularnych badań nad chemiczną i genetyczną naturą obserwowanych mutacji.

5.3. Znaczenie uzyskanych wyników dla ochrony środowiska.

Rezultaty pracy, obrazując szerokie możliwości metodyki do badań podstawowych z dziedziny współdziałania różnych czynników środowiskowych, pokazują dwa typy współdziałań między chemicznymi mutagenami i promieniowaniem jonizującym.

Po pierwsze badania nad współdziałaniem EMS, DBE i promienio-

wania w indukowaniu mutacji somatycznych wykazały istnienie synergizmu. Co najmniej trzy dziedziny pośrednio lub bezpośrednio związane z działalnością użytkową człowieka są w ścisły sposób uzależnione od efektywności mutagennej różnej kategorii mutagenów fizycznych i chemicznych: mutageneza, ochrona radiologiczna i ochrona środowiska. Dla nich wszystkich bardzo istotne jest ustalenie addytywności bądź synergizmu wzajemnych oddziaływań. Synergistyczne współdziałanie chemicznych mutagenów i promieniowania zostało dotychczas dowiedzione na podstawie badania przeżywalności komórek dla szeregu czynników mutagennych. Występowanie synergizmu dla mutacji, i to w rejonie niskich dawek, może mieć ogromne znaczenie nie tylko dla ochrony środowiska, ale i dla pozostałych dziedzin. Dlatego niezmiernie ważne jest stwierdzenie, że chemiczny mutagen w skojarzonym działaniu z promieniowaniem jonizującym indukuje więcej mutacji niż suma mutacji indukowanych przez oba te czynniki niezależnie. Prezentowane rezultaty wykazały ten synergizm.

Wydaje się więc, że fakt ten powinien być wzięty pod uwagę przy ustalaniu norm dopuszczalnych skażeń środowiskowych. Należy, co więcej, podkreślić, że rezultat synergistycznego współdziałania czynników chemicznych i promieniowania jest porównywalny z efektem biologicznym czynników chemicznych zastosowanych niezależnie. Silne powiązania między zdolnościami mutagennymi oraz kancerogennymi prowadzą do wniosku, że efektu synergistycznego należy spodziewać się również w przypadku pobudzenia i rozwoju komórek rakowych.

Prezentowane badania zwracają ponadto uwagę na fakt, że skutki biologiczne środowiskowych zanieczyszczeń chemicznych są niepo-

równywalnie większe niż skutki wynikające z kontaktu człowieka z promieniowaniem jonizującym obecnym w środowisku.

Po drugie stwierdzono, że fluorek sodu modyfikuje efekt promieniowania jonizującego. Modyfikacja ta jest prawdopodobnie skutkiem zaburzenia procesu naprawy DNA. Ze względu na fakt, że fluorki występują powszechnie w środowisku, a zaobserwowany proces może powodować zmianę widma mutacji zamiast spodziewanego efektu ochronnego, zjawisko to ze wszelkich miar zasługuje na uwagę.

Podziękowanie

Bardzo wiele osób ma swój udział w powstawaniu tej pracy. Nie sposób ich tu wszystkich wymienić. Szczególnie jednak wdzięczność winna jestem swoim Namascycielom, Kolegom i Współpracownikom z trzech ośrodków naukowych.

Kolegom z Zakładu Radiobiologii IPJ, a szczególnie jego Szefowi, dr Jerzemu Buzonkowskemu, który zainicjował moje badania nad *Tradescantia*, za merytoryczną i techniczną pomoc w realizacji pracy.

Dr Konowi Chadwick'owi i Dr Henkowi Leenhouts'owi, Association Euratom-Ital, Wageningen, Holandia, za inspirację i współpracę w badaniach nad efektami synergistycznymi.

Dr Alanowi Underbrinkowi za metodyczne konsultacje w ciągu kilku lat wspólnej pracy w naszym Instytucie.

Koleżankom z Pracowni Cytofizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk za wieloletnie owocne współdziałanie w badaniach nad biologicznymi skutkami promieniowania.

P I Ś M I E N N I C T W O

- 1/ Aestreit K., Effects of combination of mutagens on mutation frequency in berley. Mutation in plant breeding. Proc. Panel Vienna 1967.II IAEA 5, Vienna 1968.
- 2/ AECL - 7164. Biological effects of ionizing radiation. Ed. by A.M. Marko - Chalk River Nuclear Laboratories, Chalk River, Ontario, Canada, May 1981.
- 3/ Abraham S.: Genetical and cytological changes induced by crowding in Trad Clone 02. - Cytologia 39, 537 - 542, 1974.
- 4/ Alper T.: Cellular Radiobiology, Cambridge University Press, London 1979.
- 5/ Altmann H., Wottawa A.: Biological effects of radiation and chemical agents with special regard to repair processes. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting, Vienna 12 - 16 December 1977, IAEA Vienna 1980.
- 6/ Ames B.N.: Dietary carcinogens and anticarcinogens. - Science, 221, 23 September 1983.
- 7/ Ames B.N., Gold L.S., Sawyer Ch.B., Havender W.: Carcinogenic Potency. in: Environmental Mutagens and Carcinogens. Ed. by Takashi Sigimura, Sohei Kondo, Hiraoku Takebe, University of Tokyo Press, 663 - 669, 1982.
- 8/ Ames B.N., McCann J., Yamasaki E.: Methods for detecting carcinogenus and mutagens with the Salmonella /mammalian microsome mutagenicity test. - Mutation Res., 31, 347 - 364, 1975.
- 9/ Anderson D.: An apraisal of the current state of mutagenicity testing. - J. Soc. Cosmet. Chem., 29; 207 - 223, 1978.
- 10/ Bailey P.C., Bechtelheimer-Luquire K.: The chromosome morphology of some Alabama populations of Tradescantia. - Bulletin

of the Torrey Botanical Club, 94, 2, 71 - 78, 1967.

- 11/ Bailey P.C., Bechtelheimer-Luquire K.: The chromosome morphology of some populations of *Tradescantia* exposed to chronic low - level radiation. - Bulletin of the Torrey Botanical Club, 94, 2, 79 - 89, 1967.
- 12/ BEIR. The effects on populations of exposure to low levels of ionizing radiation. - National Academy Press, Washington, D.C. 1980.
- 13/ Bladeren P.J., Breimer D.D., Roffereveel-Smijs G.M.T., Jong R.A.W. de, Brijs W., Gen A. van der, Mohn G.R.: The role of glutathione conjugation in the mutagenicity of 1,2-dibromoethane. - Biochem. Pharmacology, 29, 2975 - 2982, 1980.
- 14/ Bond V.P.: Invited paper delivered at the 25th Annual Meeting of the Health Physics Society: Radiobiological input to radiation protection standards. - Health Phys., 41, 6, 799 - 806, 1981.
- 15/ Bond V.P.: RBE of ^3H Beta Rays and other low - let radiation at low doses and/or dose rates. - The 6th Symposium on Microdosimetry Commission of the European Communities, Brussels. 22 - 26 May 1978 April 1979 ENL - 26650.
- 16/ Bond V.P. /interview/: The Spiderwort System: Small plant shows promise in certain environmental research. - Brookhaven National Laboratory, 32, 44, December 1, 1978.
- 17/ Borstel R.C.: von: Comparative dosimetry of chemical mutagens and radiation. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting, Vienna 12 - 16 December 1977, IAEA Vienna 1980.
- 18/ Bridges B.A.: Perspectives of the radiation - equivalents concept for chemical mutagens. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting, Vienna 12 - 16 December 1977, IAEA Vienna 1980.

- 19/ Burton G.W.: Effect of recurrent thermal-neutron and ethyl methane sulphonate seed treatments on general and specific combining ability for Pearl Millet /*Pennisetum typhonoides* forage yields. - Report IAEA-SM - 121/31, 433 - 443, 1966.
- 20/ Calleman C.J.: The alkylation of macromolecules as a basis for the evaluation of human genetic risk. in: *Environmental Mutagens and Carcinogens*. Eds.: Takashi Sugimura, Sohei Kondo, Hiraku Takebe, University of Tokyo Press, 671 - 677, 1982.
- 21/ Cebulska-Wasilewska A., Sisma M.J., Chadwick K.H., Leenhouts H.P.: The influence of storage of *Tradescantia* cuttings on the radiation sensitivity. - *Int. J. Radiat. Biol.*, 41, 5, 569 - 574, 1982.
- 22/ Cebulska-Wasilewska A., Leenhouts H.P., Chadwick K.H.: Synergisme von EMS met straling bij mutaties in *Tradescantia* - *NUS-NIEUWS*, 7, 11, 12, 1982.
- 23/ Cebulska-Wasilewska A.: Investigations carried out at ITAL during IAEA-fellowship in the period January 1981 - September 1982. Association Euratom - ITAL, Technical and Preliminary Research Report No. 94, October 1982.
- 24/ Cebulska-Wasilewska A., Leenhouts H.P., Chadwick K.H.: Synergism between EMS and X - rays for the induction of somatic mutations in *Tradescantia*. - *INT J. Radiat. Biol.*, 40, 2, 163 - 173, 1981.
- 25/ Cebulska-Wasilewska A., Huczowski J., Kuternosińska W., Dutkiewicz E.: Application of *Tradescantia* model system for studying the modification of radiation effects by pollutants. *ESRB, Proc. of 18th Annual Meeting, Zurich, September 9 - 13, 1984.*
- 26/ Cebulska-Wasilewska A., Gumińska M., Huczowski J., Kuternosińska W.: Studies of the influence of ionizing radiation and sodium fluoride on the frequency of somatic mutations in *Tradescantia*. - *Folia Medica* /in press/.

- 27/ Chadwick K.H.: A brief review of the biological effects of non-ionizing radiation. - Annales de l'Association de Radioprotection, 6, 1, 1981.
- 28/ Chadwick K.H., Leenhouts H.P.: The Molecular Theory of Radiation Biology. - Springer, Berlin 1981.
- 29/ Chmelevsky D.: Radiation carcinogenesis at low doses of different radiations - consideration of some recent findings. - Euratom Contract 208 - 76 - 7810 D /unpublished data/.
- 30/ Cohen B.L.: Effects of ICRP publication 30 and the 1980 BEIR report on hazard assessments of high - level waste. - Health Physics, 42, 2, 133 - 143, 1982.
- 31/ Christianson M.L.: Mitotic crossing - over as an important mechanism of floral sectoring in Tradescantia. - Mutation Research 28, 389 - 395, 1975.
- 32/ Criteria for a recommended standard ... Occupational Exposure to Ethylene Dibromide. - U.S. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service, Center for Disease Control National Institute for Occupational Safety and Health, 182 - 203, August 1977.
- 33/ Crow J.F.: Can we assess genetic risks? 6th Rad. Research Congr. Tokyo 70 - 78, 1979.
- 34/ Davies D.R.: Radiation - induced chromosome aberrations and loss of reproductive integrity in Tradescantia. - Radiation Research 20, 726 - 740, 1963.
- 35/ Dennis J.A.: The ICRP scheme for limiting the intakes of radioactive nuclides. - Journal of the Society for Radiological Protection 2, 1, 1982.
- 36/ Dennis J.A.: Somatic aberration induction in Tradescantia occidentalis by neutrons, X- and gamma radiations. I. Dosimetry. - Int. J. Rad. Biol. 29, 4, 323 - 342, 1976.
- 37/ Djalali-Behzad G., Hussein S., Osterman-Golkar S., Seger-

- back D.: Estimation of genetic risks of alkylating agents. VI. Exposure of mice and bacteria to methyl bromide. Mutation Research, 1 - 9, 1981.
- 38/ Doll H., Sandfaero J.: Mutagenic effects of gamma rays, diethyl sulphate, ethyl methanesulphonate, and various combinations of gamma rays and the chemicals. IAEA-SM-121/5. 196 - 206, 1969.
- 39/ Ehling U.H.: Evaluation of genetic hazards in man from radiation and chemical mutagens. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting. Vienna 12 - 16 December 1977, -AG-97/8, 71 - 81, Vienna 1980.
- 40/ Elkind M.M.: Fundamental questions in the combined use of radiation and chemicals in the treatment of cancer. - Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys., 5, 1711 - 1720, 1979.
- 41/ Ehrenberg L., Wachtmeister C.A.: Handling of mutagenic chemicals; - Experimental Safety, unpublished data.
- 42/ Ehrenberg L.: Methods of comparing risks of radiation and chemicals. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting. Vienna 12 - 16 December 1977, IAEA -AG-97/3, 11 - 21, 1980.
- 43/ Ehrenberg L., Osterman-Golkar S.: On the reaction kinetics and mutagenic activity of methylating and halogenoethylating gasoline additives. - Rad. Bot., 14, 185 - 194, 1974.
- 44/ Ehrenberg L.: Proposes and methods of comparing effects of radiation and chemicals. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting. Vienna 12 - 16 December 1977, IAEA -AG-97/4, 23 - 36, 1980.
- 45/ Fairclough A.J.: Risk evaluation and decision-taking, 1983 /unpublished paper/.

- 46/ Pavret E.A.: Genetic effects of single and combined treatment of ionizing radiations and ethyl methanesulphonate on barley seeds. - Proceedings of the First International Barley Genetics Symposium. Wageningen 26 - 31 August, 1963.
- 47/ Fishbein L.: Industrial mutagens and potential mutagens. - Mutation Research, 32, 267 - 308, 1975.
- 48/ Fishbein L.: Atmospheric mutagens. - Mutation Research, 32, 309 - 330, 1976.
- 49/ Flora S. de: Biotransformation and interaction of chemicals as modulators of mutagenicity and carcinogenicity. in: Environmental mutagens and carcinogenesis. Eds.: Takachi Sugimura et al., University of Tokyo Press. 527 - 541, Tokyo 1982.
- 50/ Gerber G.B.: Interactions: Dose effect relationship and isoeffect curves. - Radiat. Environ. Biophys., 20, 235 - 243, 1982.
- 51/ Goth-Goldstein R.: Cell killing by various nitrosoureas and the potentiating effects of caffeine. - Mutation Research, 94, 237 - 244, 1982.
- 52/ Gumińska M.: Biochemiczne mechanizmy działania fluoru na żywy organizm. - Folia Med. Crac., XXIII, 305 - 321, 1981.
- 53/ Gumińska M., Skowron-Sula M.: Wpływ różnych stężeń magnezu i fluorków na glikolizę erytrocytów in vitro.- Folia Med. Crac., XXVI, 1 - 2 PL ISSN 0015 - 5616, 1985.
- 54/ Heddle J.A.: Extrapolation of mutation - rate data from experimental organisms to man. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting. Vienna 12 - 16 December 1977, IAEA -AG-97/5, 37 - 43, 1980.
- 55/ Hollaender A.: A history attempts to quantify mutagenesis in environmental mutagens and carcinogenesis. Eds.: Tokachi Sugimura et al., University of Tokyo Press, 21 - 37, Tokyo 1982.

- 56/ Hollaender A., Serres P.J. de: Chemical Mutagen Principles and Methods for their Detection. Vol. 4 - 5, Plenum, New York 1978.
- 57/ Hollstein M., McCann J.: Short-term tests for carcinogens and mutagens. - Mutation Research, 65, 199 - 226, 1979.
- 58/ Huczowski J., Cebulka-Wasilewska A., Lazaraka B.: *Tradescantia* stamen hairs: A biological monitor of doses outside the neutron beam used in cancer therapy. - Radiobiol. Radiother., 26, 1, 65 - 69, 1985.
- 59/ Ichikawa S.: Polyploidy and radiosensitivity in higher plants. Mutagenesis in relation to ploidy level. Gammafield Symposia 9, 1 - 16, 1970.
- 60/ Ichikawa S.: Comparison of genetic effects of scattering radiation with direct gamma rays in the stamen hairs of *Tradescantia ohiensis* KU7 clone. - Jap. J. Genetics, 48, 1, 35 - 40, 1973.
- 61/ Ichikawa S.: Influence of radiation exposure rate on somatic mutation frequency and loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. - Mutation Research, 52, 171 - 180, 1978.
- 62/ Ichikawa S., Sparrow A.H.: Radiation induced loss of reproductive integrity in the stamen hairs of a polyploid series of *Tradescantia* species. - Radiation Botany, 7, 429 - 441, 1967.
- 63/ Ichikawa S., Sparrow A.H.: The use of induced somatic mutations to study cell division rates in irradiated stamen hairs of *Tradescantia virginiana* L. - Jap. J. of Genetics, 43, 1, 57 - 63, 1968.
- 64/ Ichikawa S., Sparrow A.H.: Radiation - induced loss of reproductive integrity in the stamen hairs of *Tradescantia blanda* Mildhr., a twelve-ploid species. - Radiation Botany, 7, 333 - 345, 1967.

- 65/ Ichikawa S.: Radiosensitivity of triploid clone of *Tradescantia* determined in its stamen hairs. - *Radiation Botany*, 12, 179 - 189, 1972.
- 66/ Ichikawa S., Takahashi C.S.: Somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs exposed to ethyl methanesulphonate. - *Environ. and Experimen. Botany* 18, 19 - 24, 1978.
- 67/ Jachimczak D., Skotarczyk B.: The effect of fluorine and lead ions of the chromosome of human leucocytes in vitro. - *Genetica Polonica*, 19, 353, 1978.
- 68/ Johns T.F.: Purpose and practice of radiation monitoring. - *IEE Proc.*, 129, Pt. A, 2, March 1982.
- 69/ Kada T., Inoue T., Yokoyama A.: Combined genetic effects of chemicals and radiation. - 6th Rad. Research Congr., 711 - 720, Tokyo 1979.
- 70/ Kram D., Schneider E.-L., Singer L., Martin G.R.: The effects of high and low fluoride diets on the frequencies of sister chromatid exchanges. - *Mutat. Res.*, 57, 51, 1978.
- 71/ IRE: How hazardous are effluents from today's technologies? Reprinted from *Environmental Science and Technology*, 12, 508, May 1978.
- 72/ Lawley P.D.: Some chemical aspects of dose - response relationships in alkylation mutagenesis. - *Mutat. Res.*, 23, 283 - 295, 1974.
- 73/ Leenhouts H.P., Slama N.J., Cebulska-Wasilewska A., Chadwick K.H.: Synergism between Dibromoethane and X-rays at low dose rates of radiation. - *Proc. of 7th Int. Rad. Res. Congress, Amsterdam, July 3 - 8, 1983, sessions E. Martinus Nijhoff Publ.*
- 74/ Leenhouts H.P., Chadwick K.H.: An analysis of synergistic sensitisation. - *Br. J. Cancer*, 37, suppl. III, 198, 1978.
- 75/ Leenhouts H.P., Chadwick K.H., Cebulska-Wasilewska A.: An

analytical approach to the comparison of chemical and radiation hazards to man. - Intern. Congr. Rad. Protection IRPA, Israel, 2, 1155 - 1158, Israel 1980.

- 76/ Leenhouts H.P., Sijms M.J., Cebulska-Wesilewska A., Chadwick K.H.: The combined effect of DBE and X-rays on the induction of somatic mutations in *Tradescantia*. - Int. J. Radiat. Biol. Vol. 49, No 1, 109 - 119, 1986.
- 77/ Legator M.S.: Radiation equivalents for chemical mutagens - a critique. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting, Vienna 12 - 16, December 1977, IAEA -AG-97/10, 87 - 90, 1980.
- 78/ Levin D.E., Yamasaki E., Amos B.N.: A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. - Mutat. Res., 94, 315 - 330, 1982.
- 79/ Loprieno N.: Use of yeast as an assay system for industrial mutagens. In: Chemical Mutagens Principles and Methods for their detection. Ed. by A Hollaender. Plenum, New York 1978, vol. 5.
- 80/ Luckey T.D.: Hormesis with ionizing radiation. - CRC PRESS, 1979.
- 81/ McNulty P.J.: Influence of X-ray dose fractionation on the frequency of somatic mutations induced in *Tradescantia* stamen hairs. - Mutat. Res., 44, 235 - 246, 1977.
- 82/ Magee P.M.: Importance of metabolism of environmental chemicals for mutagenic effects. - Ambio Special Report. Evaluation of genetic risks of environmental chemicals. Ed. by Claes Ramel Environmental Toxicology Unit Wallenberg Laboratory University of Stockholm 1973.
- 83/ Małuszyński M., Małuszyńska J., Malepszy S.: Wybrane zagadnienia mutagenyzo roślin wyższych. w: Mutagenese roślin wyższych, Uniw. Śl. Katowice 1978, 11 - 15, 1978.
- 84/ Marimuthu K.M.: Effects of space flight /biosatellite II/

- and radiation on female gametophyte development in *Tradescantia*. - Reprinted from *American Journal of Botany*, 59, 4, 359 - 366, April 1972.
- 85/ Maugh T.H.: Tracking exposure to toxic substances. - *Science*, 266, 7 December 1984.
- 86/ Mericle R.P., Mericle L.W.: Spectrophotometric study of somatic mutations in flowers of clone O2 *Tradescantia*. - Reprinted from: *Genetics*, 60, 203 - 204, 1968.
- 87/ Mericle R.P., Mericle L.W.: Resolving the enigma of multiple mutant sectors in stamen hairs of *Tradescantia*. - *Genetics*, 73, 575 - 582, 1973.
- 88/ Mericle L.W., Hazard R.M.: Stamen hair initiation and development in *Tradescantia* clone O2. - *Environ. and Experiment. Botany*, 20, 233 - 241, 1980.
- 89/ Mericle L.W., Mericle R.P.: Diurnal temperature difference as a modifier of mutagenesis. - *EMS newsletters*, 5, 28 - 29, 1971.
- 90/ Mericle L.W., Mericle R.P.: Genetic nature of somatic mutations for flower color in *Tradescantia* clone O2. - *Radiation Botany*, 7, 449 - 464, 1967.
- 91/ Mericle L.W.: Induced somatic mutations for interpreting floral development and inflorescence aging. - *IAEA - AM - 121/28*, 591 - 601, 1969.
- 92/ Mericle L.W.: Somatic mutations in clone O2 *Tradescantia*. - *J. of Heredity*, 62, 6, 1971.
- 93/ Michel C., Cordt-Riehle J., Pritz-Niggli H., Schappi K.: Combined application of misonidazole and Plotron Pions on mouse embryos. - *Radiat. Environ. Biophys.*, 21, 155 - 162, 1983.
- 94/ Miller R.W.: The discovery of human teratogens, carcinogens and mutagens. - In: *Chemical Mutagens Principles and Methods*

for their Detection. Ed. by A. Hollaender, Plenum, New York 1978, vol. 5, 101 - 121.

- 95/ Montesano R., Bartsch H.: Mutagenic and carcinogenic N-nitroso compounds: possible environmental hazards. - *Mutat. Res.*, 32, 179 - 223, 1976.
- 96/ Moosman K.L.: Analysis of risk in computerized tomography and other diagnostic radiology procedures. - *Computerised Radiol.*, 6, 251 - 256, 1982.
- 97/ Moustacchi B., Latarjet R.: Radiation equivalences for genetically active chemicals: Current status and limitations. in: 6th Radiation Research Congress, 721 - 728, Tokyo 1979.
- 98/ Mukherje R.N.: Summary of discussions and recommendations. Radiobiological equivalents of chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting. Vienna 12 - 16 December 1977, IAEA Vienna 1980.
- 99/ Muller W.U., Streffer C., Fischer C.: Combined treatment of preimplantation mouse embryos in vitro sodium nitrite and X-rays. - *Radiat. Environ. Biophys.*, 20, 187 - 194, 1982.
- 100/ Muramatsu S., Hanada H., Himeno K.: Effects of cadmium chloride and X-rays on chromosome aberration induction in bone-marrow cells and spermatogonia of mice. - Proceedings of an advisory group meeting. Vienna 12 - 16 December 1977, IAEA -AG-97/7, 61 - 69, 1980.
- 101/ Nauman C.H., Klots P.J., Schairer L.A.: Uptake of tritiated 1, 2-dibromoethane by *Tradescantia* floral tissues: Relation to induced mutation frequency in stamen hair cells. - *Environ. and Experimen. Botany*, 19, 209 - 215, 1979.
- 102/ Nauman C.H., Sparrow A.H., Schairer L.A.: Comparative effects of ionizing radiation and two gaseous chemical mutagens on somatic mutation induction in one mutable and two non-mutable clones of *Tradescantia*. - *Mutat. Res.*, 38, 53 - 70, 1976.

- 103/ Nauman C.H., Schairer L.A., Sparrow A.H.: Influence of temperature on spontaneous and radiation - induced somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs. - *Mutat. Res.*, 50, 207 - 218, 1978.
- 104/ Nauman C.H.: Influence of radiation dose rate on somatic mutation. - *Radiation Research*, 62, 79 - 96, 1975.
- 105/ Nauman C.H.: Low - dose mutation response relationship in *Tradescantia*. Principles and comparison to mutagenesis following low-dose gaseous chemical mutagen exposure. - *Eur. Symp. on Rad-Equivalence 24 - 26 May 1976 Orsey*, EUR 57 25 e, 13 - 23, 1977.
- 106/ Nauman C.H.: Problems of extrapolation from high dose to low dose in *Tradescantia* mutation studies. - *Environ. Health Perspect.* 22, 161 - 162, 1978.
- 107/ Nayar G.G., Sparrow A.H.: Radiation induced somatic mutations and loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. - *Radiation Botany*, 7, 257 - 267, 1967.
- 108/ Nikinorow M.: *Zywność. Zagrożenia ekologiczne. Położenie klasy robotniczej w Polsce. Tom 5.* - Akademia Nauk Społecznych, Warszawa 1985.
- 109/ Pacyna J.M.: *Elektrownie węglowe jako źródło skażenia środowiska metalami i radionuklidami.* - Wyd. Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1980.
- 110/ Prześniński Z. *Biologiczne skutki chemizacji środowiska,* PWN, Warszawa 1980.
- 111/ Reinert R.A., Gray T.H.: The response of radish to nitrogen dioxide, sulfur dioxide, and ozone alone and in combination. - *J. Environ. Qual.*, 10, 2, 1981.
- 112/ Savage R.K.: Radiation-induced chromosomal aberrations in the plant *Tradescantia*; Dose - response curves. - *Radiat. Bot.*, 15, 87 - 140, 1975.

- 113/ Schairer L.A., et all.: Exploratory monitoring of air pollutants to mutagenicity activity with the Tradescantia stamen hair system. - Environ. Health Perspect., 27, 15, 1978.
- 114/ Schairer L.A., et all.: Measurement of biological activity of ambient air mixtures using a mobile laboratory for in situ exposures: Preliminary results from the Tradescantia plant test system. - Symposium on Application of Short-term Bioassays in the Fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures. AM/78 - 2, 1977.
- 115/ Schairer L.A., Sautkulis R.C.: Detection of ambient levels of mutagenic atmospheric pollutants with the higher plant Tradescantia. - Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology. Ed. by E.J. Klelowski, Jr. Praeger Publ. vol. II, 153 - 194, 1982.
- 116/ Schubert J.: The chemical environment, presence and fate of chemicals outside the human body. - Ambio Special Report. Evaluation of genetic risks of environmental chemicals. Ed. by Claes Ramel Environmental Toxicology Unit Wallenberg Laboratory University of Stockholm, 9 - 11, 1973.
- 117/ Scott B.R.: Method of analysis of monotone dose-response probabilities after long - term exposure to a toxicant. - Health Physics, 42, 3, 305 - 315, 1982.
- 118/ Serres P.J. de: Genetic tests for evaluating environmental mutagens. Ambio Special Report Evaluation of genetic risks of environmental chemicals. Ed. by Claes Ramel Environmental Toxicology Unit, Wallenberg Laboratory University of Stockholm, 23 - 26, 1973.
- 119/ Spbels F.H.: A comparison of the mutagenic effects of chemicals and ionizing radiation. in: 6th Res. Cong. Tokyo, 958 - 965, 1979.
- 120/ Sparrow A.H., Sparrow R.C.: Spontaneous somatic mutation frequencies for flower color in several Tradescantia

- species and hybrids. - Environ. and Experiment. Botany, 16, 23 - 43, 1976.
- 121/ Sparrow A.H., Schairer L.A.: The effects of chemical mutagens /EMS, DBE/ and specific air pollutants /O₃, SO₂, NO₂, N₂O/ on somatic mutation rates in *Tradescantia*. - Radiation Botany, 15, 161 - 168, 1975.
- 122/ Sparrow A.H., Schairer L.A., Villalobos-Pietrini R.: Comparison of somatic mutation rates induced in *Tradescantia* by chemical and physical mutagens. - Mutat. Res., 26, 265 - 276, 1974.
- 123/ Sparrow A.H., Bottino P.J., Schairer L.A.: Report of the Secretary's Commission on Pesticides and their Relationship to Environmental Health. Mutagenicity of Pesticides /on plants/, Chapter 7, 575 - 585, 1969.
- 124/ Sparrow A.H., Underbrink A.G., Rossi H.H.: Mutations induced in *Tradescantia* by small doses of X-rays and neutrons: Analysis of dose-response curves. - Science, 176, 916 - 918, 1972.
- 125/ Sparrow A.H.: Mutational response in *Tradescantia* after accidental exposure to a chemical mutagen. - Environ. Newslett. 5, 16 - 19, 1971.
- 126/ Sterner O. et al.: Forty-eight species screened for mutagenic activity in the *Salmonella* microsome assay. - Mutat. Res., 101, 269 - 281, 1982.
- 127/ Takahashi C.S., Ichikawa S.: Variation of spontaneous mutation frequency in *Tradescantia* stamen hairs under natural and controlled environmental conditions. - Environ. and Experiment. Botany, 16, 287 - 293, 1976.
- 128/ Technical Information 192. Carcinogens and cancer suspect agents. Aldrich-Europe, A division of Janssen Pharmaceutics N.V. B-2340 Beerse Belgium, May 1981.
- 129/ Te-Hsiu Ma: *Tradescantia* cytogenetic tests /roof-tip

mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis. -
Mutation Research, 99, 293 - 302, 1982.

- 130/ Te Hsiu Ma: Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. - *Mutat. Res.*, 64, 307 - 313, 1979.
- 131/ Theille M.: Mutagenesis in mammalian cells induced by oncogenic DNA Viruses. - *Biol. Zbl.* 101, 321 - 348, 1982.
- 132/ UNSCEAR 82. United Nation Scientific Committee on the Effects of Atomic Radiation. Ionizing Radiation: Sources and Biological Effects. U.N. Publication No. E82, IX.8., 1982.
- 133/ Underbrink A.G., Scheirer L.A., Sparrow A.H.: *Tradescantia* stamen hairs: A radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. *Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection*. Ed. by A. Hollaender, vol. 3, 171 - 207, Plenum, New York 1973.
- 134/ Underbrink A.G.: Cytological factors and their predictive role in comparative radiosensitivity: A general summary. *Current Topics in Radiation Research Quarterly*, 11, 251 - 306, 1976.
- 135/ Underbrink A.G., Huczowski J., Woch B., Gędek E., Cebulska-Wasilewska A., Litwiniazyn M., Kasper E.: The relationship of different somatic mutations induced by neutrons and X-rays to loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. - Report No. 1039/B Kraków 1978.
- 136/ Underbrink A.G., Sparrow A.H., Sautkulis D., Mills R.E.: Oxygen enhancement ratios /OER/ for somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs. - *Radiation Botany*, 15, 161 - 168, 1975.
- 137/ Underbrink A.G.: Relative biological effectiveness of X-rays and 0.43 MeV, monoenergetic neutrons on somatic mutations and loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. - *Rad. Res.*, 44, 187 - 203, 1970.

- 138/ Underbrink A.G., Schairer L.A., Sparrow A.H.: The biophysical properties of $J.9$ -Ger Nitrogen Ions. Determinations of the relative biological effectiveness for somatic mutations in *Tradescantia*. - Rad. Res., 55, 437 - 446, 1973.
- 139/ Underbrink A.G.: The influence of experimental end points, dose, dose rate, neutron energy, nitrogen ions, hypoxia, chromosome volume and ploidy level on RBE in *Tradescantia* stamen hairs and pollen. - IAEA - SM - 179/31, 1974.
- 140/ Underbrink A.G.: Relations between phenotypic aberrations and loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. - Rad. Bot., 11, 473 - 481, 1971.
- 141/ Van't Hof J., Schairer L.A.: *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens. Mutat. Res., 99, 303 - 315, 1982.
- 142/ Van't Hof J.: Chemical and environmental mutagen studies utilizing the *Tradescantia* test system. - Report for Mutagenesis Division National Institute on Environmental Health Sciences Project Officer; Dr P.J. de Serre. /unpublished data/, 1977.
- 143/ Varne M.N., Bond V.P.: Empirical evaluation of cell critical volume dose vs. cell response function for pink mutation in *Tradescantia*. - Proceedings of Radiation Protection Meeting. Ed. by Booz, H.G. Ebert EUR 8395 EN 439 - 450, 1983.
- 144/ Wallace A.T.: Increasing the effectiveness of ionizing radiations in induced mutations at the vital locus controlling resistance to the fungus Helminthosporium victorise in oats. The use of induced mutations in plant Breeding. 237, Rome, 1965.
- 145/ Walewski A.: Stan i przyczyny degradacji środowiska w Polsce. Zagrożenia ekologiczne. Położenie klasy robotniczej w Polsce. Tom 5. Akademia Nauk Społecznych, Warszawa 1985.
- 146/ Wójcik P.: Zagrożenia ekologiczne. Położenie klasy robot-

niczej w Polsce. Tom. 5. Akademia Nauk Społecznych -
Instytut Badań klasy robotniczej, Warszawa 1985.

147/ Zaider A., Rossi H.H.: The synergistic effects of different
radiations. - Radiation Research 83, 732 - 739, 1980.

148/ Zoetelief J.: Dosimetry and biological effects of fast
neutrons /Ph. theses/, 1981.

Wykaz ważniejszych skrótów

**BEIR /Biological Effects of Ionizing Radiation/ Komitet do Spraw
Biologicznych Skutków Promieniowania Jonizującego**

CL₅₀ - stężenie wyjściowe mutagenu dające w skutkach 50%
przeżywalności

CT - tomografia komputerowa

DL₅₀ - dawka mutagenu powodująca 50% przeżywalności

Gy - grej - jednostka dawki pochłoniętej /1 Jkg⁻¹/

**ICRP /International Commission on Radiological Protection/
Międzynarodowa Komisja Ochrony Radiologicznej**

**LET /Linear Energy Transfer/ współczynnik liniowego przekazy-
wania energii**

**REC /Rad-equivalent/ dawka chemicznego mutagenu dająca taki
sam skutek efekt biologiczny jak promieniowanie o dawce
1 rada /0.01Gy/**

**UNSCEAR /United Nations Scientific Committee on the Effects of
Atomic Radiation/ Naukowy Komitet ONZ do Spraw Skutków
Promieniowania**