

INSTYTUT FIZYKI JADROWEJ
INSTITUTE OF NUCLEAR PHYSICS
ИНСТИТУТ ЯДЕРНОЙ ФИЗИКИ



KRAKÓW

RAPORT No 1434/B

INP - 1434 / B

DZIAŁANIE MUTAGENNE PROMIENIOWANIA
JONIZUJĄCEGO ORAZ CZYNNIKÓW
CHEMICZNYCH I ŚRODOWISKOWYCH
U *TRADESCANTIA*

ANTONINA CEBULSKA-WASILEWSKA

KRAKÓW 1989

DZIALANIE MUTAGENNE PROMIENIOWANIA JONIZUJACEGO ORAZ
CZYNNIKOW CHEMICZNYCH I SRODOWISKOWYCH U *TRADESCANTIA*

/Ocena skutków działania na podstawie mutacji somatycznych
u *Tradescantia* /

Antonina Cebulska-Wasilewska

KRAKOW 1988

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

Kopię kserograficzną, druk i oprawę wykonano w IFJ Kraków

Wydanie I

Zam. 11/89

Nakład 100 egz.

Streszczenie

Praca prezentuje badania nad efektywnością mutagenną promieniowania jonizującego, mutagenów chemicznych oraz czynników środowiskowych. W badaniach zastosowano metodę opartą na pomiarze częstości mutacji somatycznych w komórkach włosków precyków heterozygotycznych ze względu na barwę kwiatów klonów *Tradescantia*. W badaniach uwzględniono: modyfikacje efektywności mutagennej promieniowania jonizującego przez wybrane czynniki środowiskowe, współdziałanie promieniowania z mutagenami chemicznymi, a także zastosowano *Tradescantia* klon 4430 do testowania efektywności mutagennej zanieczyszczeń powietrza.

Stwierdzono, że wstępne traktowanie roślin fluorkiem sodu lub odyfikacja podłoża przez zastosowanie domieszek dolomitowych wpływa wyraźnie na promieniowrażliwość roślin *Tradescantia*. Analiza zmian przebiegu krzywych dawka-efekt sugeruje, że zastosowane czynniki wpływają w odmienny sposób na procesy naprawy cząsteczki DNA. Badania nad współdziałaniem wykazały, że efekt synergistyczny występuje w przypadku skojarzonego działania promieniowania jonizującego i zastosowanych mutagenów chemicznych: metylosulfonianu etylu (EMS) lub 1,2 dibromoetanu. Stwierdzono, że efekt ten w zakresie dawek niskich jest proporcjonalny do wielkości dawki promieniowania oraz ekspozycji na mutagen chemiczny. Połowe zastosowania metody *Tradescantia* określiły efektywność mutagenną zanieczyszczeń powietrza w rejonie Krakowa. Stwierdzono fluktuacje częstości mutacji w różnych okresach badań i różnych rejonach Krakowa. Najwyższą częstość mutacji zmierzono po awarii w Czernobylu oraz po awarii filtrów w Zakładach Farmaceutycznych. W oparciu o wyniki dokonano oceny przydatności metody do badań.

Abstract

This paper presents studies on the mutagenic effectiveness of ionizing radiation, chemical mutagens and some environmental agents. Somatic mutations in the stamen hair cells of *Tradescantia* clones heterozygous considering the colour of flowers were used as a model system. The studies covered the following problems: an influence of some environmental agents on the mutagenic effectiveness of ionizing radiation, interaction between ionizing radiation and chemical mutagens in the induction of somatic mutations and also an application of *Tradescantia* model system for biological monitoring.

The studies showed that the pretreatment of *Tradescantia* plants with sodium fluoride or the modification of the soil composition with dolomite admixture, visibly influences plants radiosensitivity. The analysis of the changes in the dose-response curves suggested that the employed agents were influencing in different ways the repair processes of the DNA.

The studies on the interaction between agents proved that the synergistic effect occurs in case of combined action of ionizing radiation with such chemical mutagens as ethyl methansulfonate or 1,2 dibromoethane. It was also discovered that in the range of low doses the effect was proportional to radiation dose and total exposition to chemical mutagen.

The field application of *Tradescantia* method defined the mutagenicity of air pollution in the Cracow area. The highest frequencies of mutations were detected after the Chernobyl accident and after the damage to the filters in the Pharmaceutical Plant. On the basis of the research presented above the method was evaluated in respect of its usefulness for biological monitoring of environmental pollution.

SPIS TRESCI

1. WSTEP	7
2. ZAGROZENIE ŚRODOWISKA	
2.1. Fizyczne i chemiczne mutageny środowiskowe....	10
2.2. Współdziałanie różnych mutagenów.....	13
2.3. Rad-ekwiwalent jako propozycja miary efektywności mutagenozy.....	22
3. <i>TRADESCANTIA</i> JAKO UKŁAD MODELOWY DO BADAN EFEKTÓW MUTAGENNYCH CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH.....	29
3.1. uprawa rośliny i rozwój kwiatostanu.....	31
3.2. Mutacje barwy.....	33
3.3. Rozwój precyka i mierzenie zdarzeń letalnych...	38
4. CEL I ZAKRES PRACY.....	40

BADANIA WŁASNE

5. BADANIA LABORATORYJNE NAD NIEZALEZNYM I SKOJARZONYM DZIAŁANIEM PROMIENIOWANIA I MUTAGENÓW CHEMICZNYCH	
5.1. Metodyka.....	42
5.2. Badania efektywności mutagennej promieniowania - omówienie wyników	
5.2.1. Zależność dawka-efekt	49
5.2.2. Porównanie wrażliwości różnych klonów.....	58
5.2.3. Wpływ wybranych czynników na efekt promieniowania	
a) frakcjonowanie dawki promieniowania.....	60
b) traktowanie wstępne fluorkiem.....	62
c) modyfikacja podłoża domieszkami dolomitu	67

5.2.4. Wnioski.....	71
5.3. Porównanie efektywności mutagennej promieniowania i mutagenów chemicznych w działaniu niezależnym i skojarzonym - omówienie wyników	
5.3.1. Badania nad współdziałaniem pomiędzy etylosulfonianem metylu lub 1,2 dibromoetanem a promieniowaniem jonizującym.....	73
5.3.2. Porównanie wrażliwości różnych klonów na działanie DBE oraz promieniowania.....	85
5.3.3. Wpływ kolejności traktowania na wielkość efektu.....	89
5.3.4. Wnioski.....	92
6. BADANIA <i>IN SITU</i> EFEKTYWNOŚCI MUTAGENNEJ ZANIECZYSZCZEN POWIETRZA	
6.1. Metodyka.....	95
6.2. Omówienie wyników	
6.2.1. Ekspozycja po awarii filtrów w Zakładach Farmaceutycznych.....	97
6.2.2. Ekspozycja po awarii w Czernobylu.....	98
6.2.3. Równoczesna ekspozycja w kilku miejscach miasta Krakowa.....	101
6.3. Wnioski.....	106
7. OCENA PRZYDATNOŚCI TESTU DO BADANIA SKUTKÓW CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH.....	109
8. PODSUMOWANIE.....	112
PISMIENNICTWO.....	115

1. WSTEP

Rosnące zanieczyszczenie naturalnego środowiska jest poważnym problemem dla całego świata. Oszacowanie pojawiających się w jego wyniku zagrożeń dla człowieka i środowiska jest trudne i żmudne; wymaga intensywnych i rozległych badań skutków biologicznych spowodowanych zanieczyszczeniami biosfery.

Większość tych badań prowadzi się na różnorodnych układach modelowych. Opracowano wiele stosunkowo szybkich metod oceny mutagenności i własności rakotwórczych czynników potencjalnie zagrażających środowisku naturalnemu. Wyniki tych badań opisano w szeregu wydawnictw monograficznych, takich jak; *Chemical Mutagens, Principles and Methods for their Detection* (62,130), *Basic and Applied Mutagenesis* (107), *Progress in Mutation Research* (9), *Genetic Toxicology of Environmental Chemicals* (121), *In vitro Toxicity Testing of Environmental Agents* (79), *Short Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures* (158), *Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis, and Plant Biology*(78).

Wśród testów stosowanych *in vitro* oraz *in vivo* są różnorodne testy m.in. wykorzystujące zmiany DNA, transformacje nowotworowej komórki i cytogenetyczne zmiany komórek prawidłowych i nowotworowych w modyfikowanych odpowiednio hodowlach komórkowych. Do testów wykorzystuje się także, prokariotyczne i eukariotyczne mikroorganizmy, owady oraz rośliny lub komórki roślinne.

Na zorganizowanym w Williamsburgu w 1978 roku Sympozjum poświęconemu zastosowaniu monitorów skażeń środowiska (90) uznano, że dwa spośród prezentowanych tam układów zasługują na szczególne wyróżnienie. Jednym z nich jest test zaproponowany

przez B. Ames'a z Uniwersytetu w Kalifornii. W teście tym działanie mutagenne badanego czynnika oceniane jest przez pomiar częstości mutacji różnych szczepów bakterii *Salmonella typhimurium* przechodzących z formy histydyno zależnej w formę histydyno niezależną (6,7). W ostatnich kilkunastu latach opublikowano wyniki oceny tysięcy związków przebadanych tym testem (61,62,69). Światowa organizacja Zdrowia i Bezpieczeństwa (OSHA) zaproponowała zastosowanie tego testu do klasyfikacji związków rakotwórczych w miejscach pracy, natomiast Agencja Ochrony Środowiska (EPA) do oceny toksyczności ścieków (63).

Drugim jest prezentowany przez L. Schairera z Brookhaven National Laboratory test oparty na pomiarze częstości mutacji somatycznych w komórkach włosków prekwiów kwiatowych niektórych odmian *Tradescantia*. Test ten jest najczulszym spośród monitorów promieniowania jonizującego, wykorzystujących mutacje u roślin. (137,140). Zalety tego testu i ogromna rola jaką odegrał on w radiobiologii, przedstawił V. Bond na XXV Kongresie Fizyki Zdrowia w 1981 roku (14). *Tradescantia* okazała się doskonałym monitorem nie tylko promieniowania, ale również czynników chemicznych (146).

W 1974 roku w Zakładzie Radiobiologii Instytutu Fizyki Jadrowej w Krakowie wprowadzono ten test początkowo do badań skuteczności indukowania mutacji przez neutrony predkie oraz promieniowanie gamma (85,148,154), a także efektywności czynników modyfikujących te efekty (23,28,29,34,35). Wprowadzono istotną poprawkę do metody badawczej opracowanej w Brookhaven National Laboratory (25). Ze względu na wyjątkową czułość metody zarówno w badaniach mutagenności promieniowania jak też środków chemicznych, rozszerzono zastosowanie metody prowadząc badania nad mutagenami chemicznymi (27,28). Szczególny nacisk położono na

możliwość badania skutków niezależnego i skojarzonego działania promieniowania i mutagenów chemicznych (21,22,24,33,83,85,87).

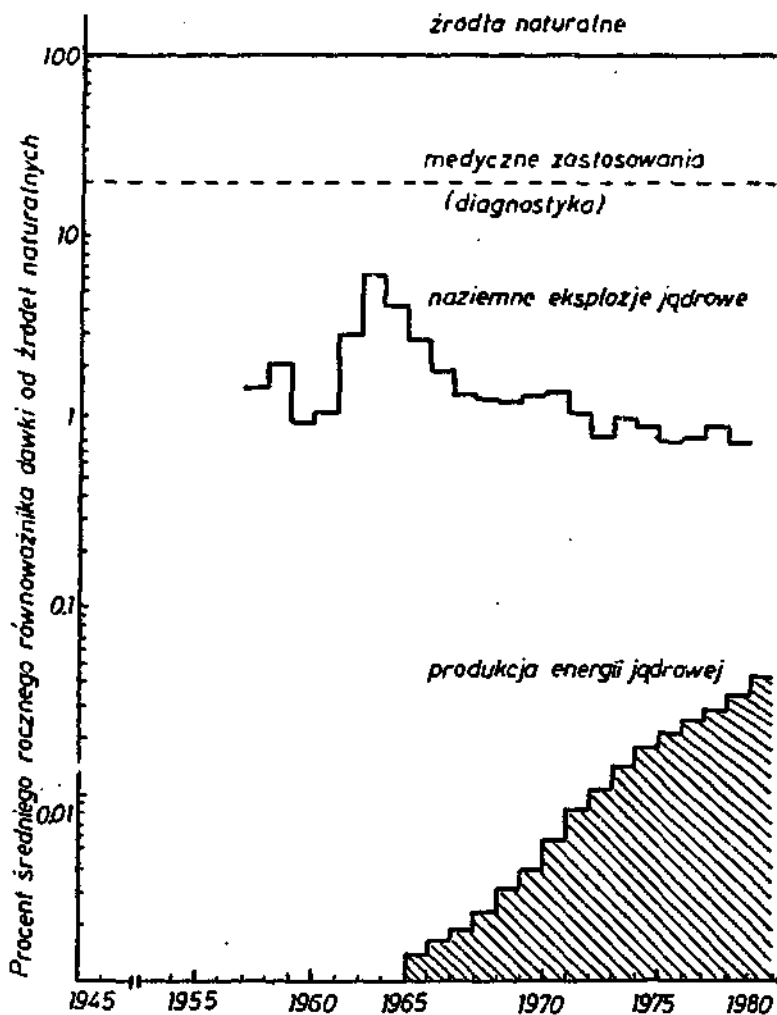
Możliwość współdziałania różnych czynników środowiskowych w indukowaniu mutacji somatycznych jest ważnym problemem dla ochrony środowiska. W przypadku współdziałania synergistycznego efekt czynników działających równocześnie przewyższa sumę efektów ich oddziaływań niezależnych. Istnienie synergizmu mutagennego w przypadku współoddziaływania różnych czynników na środowisko i to w zakresie niskich dawek, powinno zmienić system szacowania ryzyka zagrożeń środowiskowych. Istnienie takiego synergizmu wykazano badając skojarzone działanie promieniowania jonizującego i mutagenów chemicznych, 1,2 dibromoetanu oraz metylosulfonianu etylu. Zjawisko synergizmu wykazywano dotychczas w testach przeżywalności. Badania nad mutagennością *Tradescantia* wykazały istnienie synergizmu również w tym układzie. Wykorzystując wyjątkową czułość metody zastosowano wybrany klon do badań nad efektywnością mutagenną zanieczyszczeń powietrza (26,30,32).

W niniejszej pracy przedstawiono całokształt dotychczasowych badań własnych nad zastosowaniem *Tradescantia* do badań efektywności indukowania mutacji przez różne czynniki środowiskowe. Wykazano, że wyniki skojarzonego działania mutagenów chemicznych i promieniowania jonizującego można interpretować opierając się o założenia teorii działania promieniowania na komórkę, opracowanej przez Chadwick'a i Leenhouts'a (38). W oparciu o wyniki badań dokonano oceny przydatności różnych klonów do badania efektywności mutagennej różnych czynników. Dowiedziano też, że odpowiednio dobrane klony mogą znaleźć zastosowanie zarówno jako laboratoryjny jak i polowy test oceny szkodliwości zanieczyszczeń środowiskowych.

2. ZAGROŻENIE ŚRODOWISKA

2.1. Fizyczne i chemiczne mutageny środowiskowe.

W wyniku dotychczasowej działalności człowieka niemal na całej kuli ziemskiej wystąpiły ogromnie niekorzystne zmiany. Konsekwencją ekspansji chemicznej i przemysłowej jest postępujące skażenie powietrza, wody i gleby (160). Zagrożenie dla człowieka i środowiska wynikające z rosnącego zanieczyszczenia przyjęło takie rozmiary, że stało się problemem o skali światowej. Zaistniała konieczność skoordynowania wysiłków badawczych w tym zakresie. Dzięki wysiłkom i inicjatywie ONZ i WHO powstają międzynarodowe programy badawcze obejmujące kontrolę środowiska jak np. Światowy System Kontroli Środowiska /GEMS- Global Environmental Monitoring System czy Sieć Kontroli Zanieczyszczeń Powietrza /BAPMoN -Background Air Pollution Monitoring Network(120). Równocześnie powstają nowe akty prawne ograniczające degradację środowiska (41,118). Wszystkie te działania zmierzają do lepszego zrozumienia zjawisk zachodzących na skutek rosnącego zanieczyszczenia i ich harmonijnego powiązania z interesami socjalnymi i ekonomicznymi, zarówno w skali lokalnej jak i ogólnoświatowej. Zmiany klimatu, kwaśne deszcze, szybka degradacja ogromnych obszarów ziemskich są zapowiedzią trudnych do opanowania zmian ekologicznych wynikających z działalności człowieka, nie biorąc już pod uwagę sprawy zwiększającego się zagrożenia mutagennego i kancerogennego wynikającego z ogromnej liczby związków chemicznych wprowadzanych do użytku. Według J.Schuberta(128) Około $2.5 \cdot 10^7$ nowych związków wprowadza się każdego roku do użycia. Natomiast N.Loprieno twierdzi, że, w najlepszym przypadku, co najwyżej dla tysiąca z wprowadzanych na rynek związków oznaczono aktywność mutagenną



Rys.2.1.1. Rozkład równoważników dawek uzyskiwanych od różnych źródeł promieniowania (145).

(82). Tymczasem istnieje duże ryzyko, że mutacje wywoływane przez będące w użyciu związki chemiczne, akumulowane w populacji mogą oddziaływać na przyszłe pokolenia. Nie jest to jedyny aspekt zagrożenia. Wykazano, że wiele związków mutagennych ma charakter rakotwórczy (10). Prawie 85-90% związków znanych jako rakotwórcze przebadanych za pomocą testu Ames'a okazało się także mutagennymi(8,137).

Do czynników fizycznych oddziałujących istotnie na środowisko należy zaliczyć również promieniowanie, zarówno jonizujące jak i niejonizujące. W zasadzie jakiejkolwiek formy życia istniejącego na Ziemi poddane są ciągłej ekspozycji na promieniowanie t.zw. tła. Promieniowanie to może pochodzić z wielu źródeł które najogólniej można podzielić pod względem pochodzenia na zewnętrzne (promieniowanie kosmiczne) oraz ziemskie. Rysunek 2.1.1. przedstawia jak według Komitetu ONZ d/s Efektów promieniowania UNSCEAR 1982(145) kształtował się w okresie ostatnich dziesięcioleci, procentowy udział równoważników dawek uzyskiwanych od różnych źródeł promieniowania. Wyraźnie widać z przedstawionego zestawienia, że dawki związane z wszelkimi formami zastosowań promieniowania jonizującego są wyraźnie niższe od dawek pochodzących od źródeł naturalnych (tzn. ziemskich i promieniowania kosmicznego).

W miarę rozwijania się nowoczesnych technologii zwiększa się ekspozycja populacji na promieniowanie niejonizujące. Instalacje radarowe, telekomunikacyjne, linie wysokiego napięcia, UV, a nawet ultradźwięki stanowią nowe czynniki oddziałujące na środowisko. Wprawdzie dochoyczasowe badania wykazały, że tylko promieniowanie nadfioletowe może stanowić zagrożenie indukcją raka, nie należy jednak lekceważyć doniesień, że promieniowania niejonizujące mogą zwiększyć skuteczność działania innych czynników rakotwórczych (37).

Z punktu widzenia ryzyka wynikającego dla człowieka i środowiska z rosnącego zanieczyszczenia ważny jest również fakt, że obecne w środowisku czynniki mutagenne i kancerogenne nigdy nie działają niezależnie lecz współdziałają modyfikując w różny sposób ostateczny skutek biologiczny.

2.2. Współdziałanie różnych czynników .

Oddziaływanie czynników fizycznych, chemicznych i biologicznych na skutki promieniowania jonizującego rozpatrzono w raporcie UNSCEAR opublikowanym w 1982 r. Z bogatej listy czynników chemicznych obecnych w środowisku i mogących oddziaływać na skutki promieniowania szczególną uwagę poświęcono w raporcie sprawie zagrożeń zawodowych o charakterze rakotwórczym. Zalicza się do nich: kurz, włókna przemysłowe, emisje zawierające takie pierwiastki jak arsen, nikiel i chrom, a także środki chemiczne obecne w żywności.

Działanie czynnika pojedynczego może być krótkie, jednorazowe lub ciągłe i może mieć różne natężenie w zależności od dawki i jej mocy. Dla ochrony radiologicznej oraz ochrony środowiska istotne znaczenie mają długotrwałe ekspozycje związane z niskimi mocami dawek. W środowisku występuje jednak zawsze kilka czynników, a więc należy rozważać potencjalną możliwość ich współdziałania.

Jeżeli efekt końcowy nie przewyższa sumy efektów indywidualnych mówi się wtedy o addytywności działania poszczególnych czynników. Jeżeli jednak efekt współdziałania dwóch czynników przewyższa sumę efektów ich oddziaływań niezależnych, wówczas mówi się o synergizmie oddziaływań. W przypadku gdy efekt współdziałania jest mniejszy od sumy efektów oddziaływań niezależnych zjawisko określa się jako współdziałanie antagonistyczne.

Jeżeli czynnik współdziałający z promieniowaniem sam nie ma żadnego wpływu na układ wówczas wzmożenie efektu promieniowania nosi nazwę uwrażliwienia zaś obniżenie nazwę działania ochronnego. Może się również zdarzyć, że charakter współdziałania pomiędzy

różnymi czynnikami zmienia się w zależności od zakresu dawek.

Oszacowanie ryzyka wynikającego z pojawienia się w środowisku danego czynnika, a co za tym idzie ustalenie norm maksymalnie dopuszczalnych stężeń jego w środowisku, oparte jest na ocenie skutku genotoksycznego w działaniu indywidualnym danego czynnika. Tymczasem w środowisku działa on zawsze w obecności innych czynników fizycznych i chemicznych w tym prawie zawsze w obecności promieniowania jonizującego o niskich mocach dawek i dawkach. Z tego właśnie względu szczególne znaczenie dla ochrony środowiska ma możliwość występowania efektu synergistycznego. Efekt ten, stwierdzany testem przeżywalności, znany jest od dawna. Natomiast stosunkowo mało poznany jest synergizm w oddziaływaniach mutagennych i kancerogennych. W 1943 roku jako jedni z pierwszych Furth and Boon stwierdzili synergistyczne współdziałanie metylocholantrenu (MC) z promieniowaniem w indukowaniu leukemii, a w roku 1958 Kawamoto i inni stwierdzili synergizm również w indukowaniu leukemii u myszy po skojarzonym zastosowaniu uretanu i promieniowania (cytowane za Yokoro (161)).

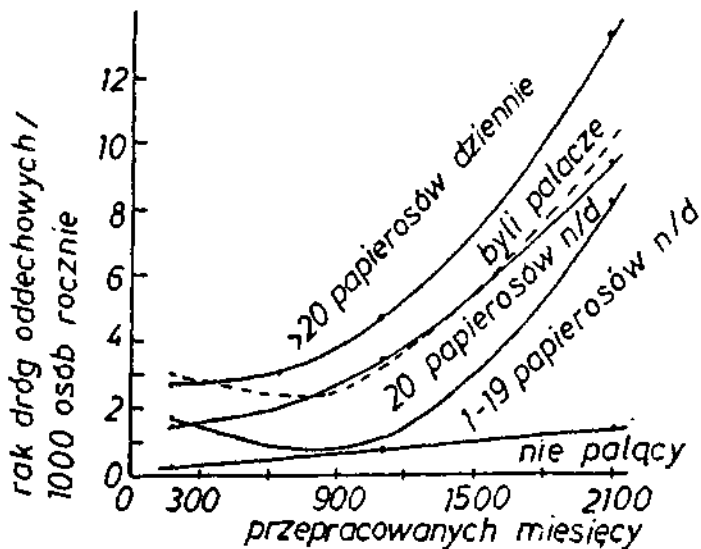
W 1965 Wallace(157) sygnalizuje występowanie synergizmu w indukowaniu mutacji u owaa działaniem EMS łącznie z promieniowaniem, podobnie, ale u jęczmienia w 1967 stwierdza Aestreit(1). W badaniach prowadzonych w latach 1981-1986, których wyniki są prezentowane w niniejszej pracy stwierdzono synergizm indukcji mutacji somatycznych u *Tradescantia* po skojarzonym działaniu promieniowania jonizującego i etylosulfonianu metylu (21,22,24,85) lub 1,2 dibromoetanu (22,83,87). W 1982 roku M.Theile stwierdza dla różnych mutagenów chemicznych oraz wirusa SV40 synergizm w indukcji mutacji w komórkach chomika(144), natomiast Yokoro et al. stwierdzili także,

w późnych latach osiemdziesiątych, synergizm w indukowaniu leukemii u myszy działaniem N-nitrozoetyloamocznika (NEU) łącznie z promieniowaniem(161). Również Michel(102) i Balla(11), Wiggenshauser(159), Cattanaach (20), Muller(94) i Moore(104) wykazują występowanie efektu synergistycznego w indukowaniu różnego rodzaju anomalii występujących po skojarzonym działaniu czynników chemicznych i promieniowania.

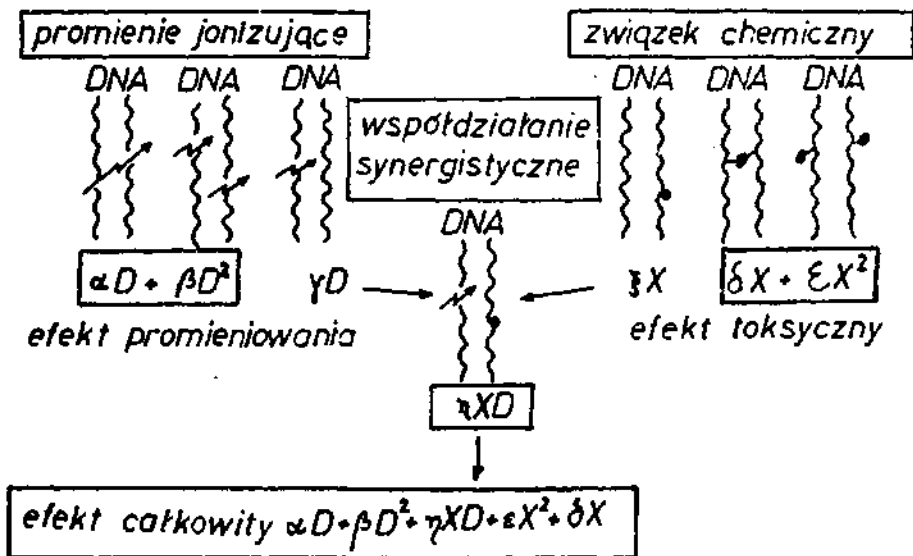
Przykładem prawdopodobnie synergistycznego współdziałania promieniowania jonizującego z nikotyna jest stwierdzone na podstawie badań zagrożeń zawodowych podwyższenie częstości występowania raka dróg oddechowych u palaczy papierosy pracowników kopalni rud uranowych (145) (Rys.2.2.1.). Linia prosta na tym rysunku, przedstawiająca zapadalność na raka pracowników niepalących, prezentuje zagrożenie indukacja raka spowodowane zawodowa ekspozycja na promieniowanie (dawka pochłonięta rośnie proporcjonalnie do przepracowanych miesięcy). Synergistyczne współdziałanie nikotyny z promieniowaniem sugerują trzy krzywe zapadalności na raka stwierdzonej u pracowników palących 1- 19 papierosów na dzień, 20 n/d oraz powyżej 20 n/d. Krzywe te wykazują bardzo szybki wzrost zapadalności w porównaniu do prostej charakteryzującej zagrożenie od samego promieniowania.

Zainteresowanie problemem współdziałania czynników środowiskowych rośnie w miarę nowych doniesień. Pojawiają się również próby teoretycznego wyjaśnienia mechanizmu zjawiska. Można je spotkać zarówno w pracach dotyczących współdziałania dwóch różnych rodzajów promieniowania (57,162), jak i promieniowania i mutagenów chemicznych (50,57,77,84,145).

Jedną z takich prób wyjaśnienia mechanizmu współdziałania synergistycznego jest opracowana przez K.H. Chadwick'a i



Rys.2.2.1. Śmiertelność u różnych grup palaczy papierosów spowodowana rakiem płuc w zależności od czasu trwania ekspozycji zawodowej na pochodne radonu(145).



Rys.2.2.2. Schemat według Chadwick'a i Leenhouts'a, oddziaływania promieniowania i mutagenu chemicznego na DNA(84)

H.P. Leenhouts'a (84) teoria współdziałania na poziomie DNA pomiędzy promieniowaniem jonizującym i jakimkolwiek innym mutagenem lub czynnikiem działającym na DNA. Jako generalne założenie swojej teorii oddziaływania promieniowania na poziomie molekularnym autorzy przyjmują, że :

- 1) integralność cząsteczki DNA, która zawiera informacje genetyczną jest sprawą fundamentalną dla normalnego rozwoju komórki ;
- 2) pęknięcie dwuniciowe DNA. powodujące całkowite rozerwanie cząsteczki, stanowi najbardziej krytyczne uszkodzenie ;
- 3) różne ostateczne skutki biologiczne mogą być bezpośrednio skorelowane z pęknięciami łańcucha cząsteczki DNA ;
- 4) ostrość obserwowanych efektów jest proporcjonalna do średniej liczby powstałych i nienaprawionych dwuniciowych pęknięć DNA przypadających na jedną komórkę ;
- 5) liczba dwuniciowych pęknięć DNA jest zależna od fizycznych, chemicznych i fizykochemicznych procesów przekazywania i przenoszenia energii, współzawodnictwa w reakcjach wolnych rodników z DNA i jego środowiskiem chemicznym w trakcie napromieniowania;
- 6) ilość wytworzonych pęknięć, które pozostają efektywne, jest zależna od biochemicznych procesów naprawy DNA , których wydajność jest kontrolowana przez warunki metaboliczne komórki w czasie i po napromieniowaniu .

Według Chadwick'a i Leenhouts'a (Rys. 2.2.2.) cząsteczka DNA może być rozerwana przez :

- 1) przejście jednej cząstki promieniowania jonizującego, która w wyniku równoczesnego przekazu energii w pobliżu DNA spowoduje pęknięcie obydwu nici spirali DNA. Liczba indukowanych przez

promieniowanie w ten sposób pęknięć dwuniciowych powinna być wprost proporcjonalna do pochłoniętej dawki promieniowania:

$$N = \alpha D$$

2) przez połączenie zbliżonych przestrzennie dwóch niezależnych aktów przekazania 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 dawki pochłoniętej:

$$N = \beta D^2 ,$$

czynnik D opisuje tę część pęknięć pojedynczej nici spirali DNA, spowodowanych przez promieniowanie, która w wyniku procesów naprawy przestaje być efektywna. Współczynniki α , β , zależne są od różnorodnych procesów, które przebiegają w następstwie pochłonięcia określonej energii w materiale komórkowym. Zawierają one w sobie parametry uwzględniające fizyczne, fizykochemiczne i chemiczne procesy prowadzące do pęknięcia spirali DNA, jak również procesy biochemiczne 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:

$$N = \delta X + \epsilon X^2 ,$$

gdzie: X jest miarą ekspozycji komórki na czynnik mutagenny, natomiast δX jest liczba uszkodzeń podwójnych nici DNA powstałych w wyniku działania na DNA jednej cząsteczki mutagenu, zaś ϵX^2 jest liczba uszkodzeń dwuniciowych DNA powstałych z kombinacji uszkodzeń pojedynczych nici DNA.

Mutagen chemiczny działający na DNA może również powodować uszkodzenia tylko jednej nici w spirali DNA. Liczbą takich

uszkodzeń obrazuje czynnik X . Uszkodzenia te, podobnie jak pęknięcia jednej nici spirali DNA wywołane działaniem promieniowania, mogą być eliminowane w procesach naprawy.

W przypadku, gdy mutagen chemiczny i promieniowanie działają łącznie, wtedy powstanie dodatkowo pewna ilość pęknięć dwuniciowych łańcucha DNA, w wyniku koincydencji uszkodzeń nici pojedynczych wywołanych przez promieniowanie i mutagen chemiczny. Liczba tych uszkodzeń powstających dodatkowo będzie zatem określona przez:

$$N = \eta XD,$$

przy czym w jest zawarte określone prawdopodobieństwo, że wywołane promieniowaniem pęknięcie jednej nici oraz wywołane mutagenem chemicznym uszkodzenie drugiej nici, dadzą w efekcie pęknięcie dwuniciowe spirali DNA. W efekcie, w przypadku skojarzonego działania dwóch mutagenów liczba uszkodzeń spirali DNA decydująca o całkowitym efekcie wynosi:

$$N = \alpha D + \beta D^2 + \eta XD + \delta X + \epsilon X^2$$

Z tej bardzo uproszczonej w tłumaczeniu formuły można ocenić, w jakim stopniu należy się spodziewać w badanym układzie efektu wzmocnienia synergistycznego. 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 cząsteczki 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).

W zakresie niskich dawek i mocy dawek przy których duża część uszkodzeń pojedynczych nici DNA ulega naprawie oraz wpływ składnika kwadratowego na krzywa dawka-efekt jest niewielki zależność dawka-efekt wykazuje charakter najbardziej zbliżony do liniowego. W tych zakresach dawek efekt synergistyczny odgrywa dominującą rolę zwiększając liczbę efektywnych uszkodzeń DNA. Jest to jedna z ważniejszych konkluzji, wynikających z przeprowadzonej przez Chadwick'a i Leenhouts'a analizy współdziałania synergistycznego. Analiza ta wykazała również, że efekt ten ma istotniejsze znaczenie w przypadku promieniowania o małej gęstości jonizacji, niż w przypadku gęsto jonizujących cząstek. Jest to wniosek bardzo ważny z punktu widzenia ochrony środowiska, gdyż zarówno niskie dawki, jak i moce dawek są charakterystyczne dla występującego w środowisku naturalnym słabo jonizującego promieniowania.

Raport UNSCEAR bardzo krytycznie ustosunkowuje się do większości 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 efekt końcowy. 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 oddziaływań synergistycznych lub

antagonistycznych między czynnikami obecnymi w środowisku może mieć dla problemu ustalenia norm dopuszczalnych skażeń lub ekspozycji, wymagania odnośnie konieczności dogłębnych badań, zależności czasowych, kontroli warunków zewnętrznych mogących zmieniać efekt, wydają się być oczywiście uzasadnione. Wszelkie efekty biologiczne: śmierć komórki, mutacje, aberracje spowodowane działaniem niskich dawek słabo jonizującego promieniowania powinny być przedmiotem szczególnego zainteresowania ochrony radiologicznej oraz ochrony środowiska.

2.3. Rad-ekwiwalent jako miara efektywności mutagenesy

środowiskowej.

Właściwe oszacowanie ryzyka wynikającego z istniejących zagrożeń stanowi dość skomplikowane zagadnienie. Odczucie opinii publicznej nie zawsze jest oparte na racjonalnych przesłankach. Jest ona przeważnie najbardziej wyczulona na zagrożenie związane z promieniowaniem jonizującym. Na przykład ryzyko, jakie jest związane z prześwietlaniem klatki piersiowej (Tabl. 2.3.1.) jest liczbowo równoważne ryzyku związanemu z przejechaniem samochodem 100 kilometrów. Natomiast historycznie uwrażliwione na promieniowanie odczucie opinii publicznej przypisuje na pewno większą wagę pierwszemu (105). Tymczasem zrozumienie efektów biologicznych promieniowania, chociaż jeszcze niekompletne, jest daleko bardziej szczegółowe niż dotyczące działania bardziej szkodliwych substancji chemicznych. Również praktyka ochrony radiologicznej jest bardziej rozwinięta i zaawansowana niż jakiegokolwiek metodyki stosowane w przypadku chemicznych zagrożeń związanych z rosnącym zanieczyszczeniem środowiska. Przyjęta jest teza o występowaniu późnych skutków nawet po najniższych dawkach promieniowania. Także podejście generalne w kwestiach oszacowania ryzyka w zakresie niskich dawek i mocy dawek /tzn. takich z ekspozycja na które należy się liczyć w naturalnym środowisku człowieka/, przyjmujące tylko modele dopuszczające przybliżenia w kierunku przeceniania ryzyka a nie odwrotnie, ustanawia jakby dodatkowe zabezpieczenie i może służyć jako wzorzec dla ochrony środowiska przed zagrożeniem chemicznym.

Dlatego właśnie założono, że w pewnym zakresie doświadczenia zebrane w dziedzinie ochrony radiologicznej mogą być pomocne w rozwijaniu i opracowywaniu norm dopuszczalnego stosowania

Tabela 2.3.1. Porównanie ryzyka związanego z różnymi formami zastosowań promieniowania w diagnostyce /105/

Promieniowanie X	Średnia ekspozycja na okąg /R/Pila/	Szacowane dawki na całe ciało /cGy/	Ryzyko śmierci z powodu raka	Równoważnik ryzyka śmierci z powodu	
				przejecha-nych km	liczba wy-palonych 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	$1/1.1 \cdot 10^6$	90.15	5

mutagenów chemicznych (44,108). Zapropozowano dziedzinę ochrony przed promieniowaniem jako model oraz tzw. Rad-ekwiwalent (REC) jako wielkość porównawczą, pozwalającą na usystematyzowanie skutków biologicznych różnych czynników w odniesieniu do efektów promieniowania

W 1973 roku Crow i Bridges (106) zasugerowali, że efektywność czynnika chemicznego, który wywołuje zmiany genetyczne, może być przyrównana do efektywności dawki promieniowania jonizującego, która ilościowo i jakościowo wywołałaby taki sam efekt.

W latach późniejszych uściślono tę propozycję definiując równoważnik dawki REC, tzn. Rad-ekwiwalent, jako iloczyn stężenia przez czas jego oddziaływania, które powodują ilościowo taki sam skutek, jaki byłby wywołany działaniem promieniowania przewlekłego o dawce 1-go rema(52,54).

Metoda porównywania skutków działania mutagenów chemicznych i promieniowania nie jest zapewne rozwiązaniem idealnym i wzbudza również pewne kontrowersje (5,18,89). Zarzutem najpoważniejszym stawianym temu rozwiązaniu jest fakt, że propozycja stanowi tylko przybliżone rozwiązanie gdyż sam sposób szacowania ryzyka w ochronie radiologicznej również zawiera pewną dawkę nieścisłości. Wynika ona z faktu, że oszacowanie prawdopodobieństwa skutków ekspozycji na promieniowanie jest obciążone niepewnością(40):

- ekstrapolacji z zakresu dawek wysokich do niskich,
- ekstrapolacji danych uzyskanych na modelach zwierzęcych i komórkowych.

Pomimo wspomnianych zastrzeżeń koncepcja ta daje jednak możliwość pewnej systematyzacji i ujednoczenia ryzyka

wynikającego z zagrożeń środowiska czynnikami chemicznymi, przy spełnieniu pewnych założeń w następujących zagadnieniach(106).

1/Warunek wzajemności

W przypadku ekspozycji na promieniowanie jonizujące dawka promieniowania D jest określana jako iloczyn zaabsorbowanego strumienia energii ($P =$ moc dawki) przez czas trwania ekspozycji -

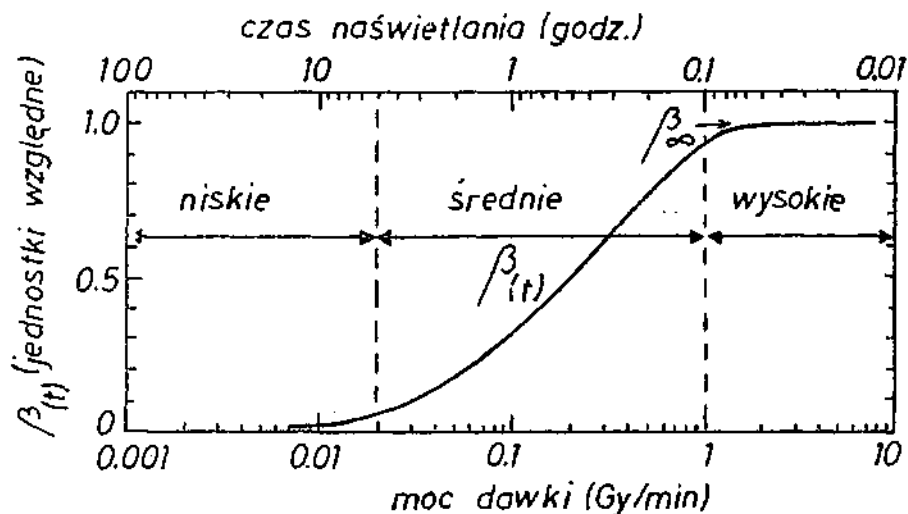
$$D = P \cdot t,$$

natomiast dawka czynnika chemicznego określona jest jako

$$D = c \cdot t,$$

gdzie c jest stężeniem.

Tak zdefiniowane dawki są zgodne z powyższym warunkiem wzajemności wtedy, gdy równocześnie zmieniające się parametry w iloczynie, dające tę samą wartość D , wiążą się z tym samym skutkiem biologicznym. Znajomość badań radiobiologicznych pozwala przewidzieć, kiedy spełniony jest ten warunek dla promieniowania jonizującego. Krytyczną rolę odgrywa zróżnicowanie odpowiedzi biologicznej od zmieniającej się mocy dawki, zwłaszcza dla różnych rodzajów promieniowania (4,38). Rozróżnia się trzy



Rys. 2.3.1. Czynniki β z równania na efekt końcowy, w funkcji mocy dawki

zakresy mocy dawek: niskich, średnich i wysokich, (Rys 2.3.1) charakteryzujące się różną zależnością efektu końcowego od dawki i mocy dawki(38).

W przypadku ekspozycji chemicznej czas jest parametrem bardzo ważnym. Od niego zależy stopień penetracji czynnika do komórki, trwałość tworzonych związków i stopień ich przemian metabolicznych. A zatem, w zasadzie w każdym przypadku konkretnego związku chemicznego powinna być zbadana wzajemność między czasem i stężeniem oraz określony poziom nasycenia dla krzywych dawka-efekt.

2. Kształt krzywych dawka-efekt

Przy porównywaniu skutków związku chemicznego i skutków działania promieniowania, musi być brany pod uwagę kształt krzywych dawka-efekt. W zasadzie, jeżeli obserwowane są zależności tego samego typu, to bezpośrednio porównywanie jest oczywiste. Krzywe dawka-efekt dla promieniowania jonizującego zostały poznane bardzo szczegółowo (4,28,58). W zasadzie dla większości skutków biologicznych wiadomo jaki kształt ma ta zależność dla różnego rodzaju promieniowań. Znacznie trudniej przedstawia się sprawa w dziedzinie dużo młodszej od radiobiologii, a mianowicie w mutagenezie chemicznej. Kształt badanych zależności jest bardziej zróżnicowany i zależy od charakteru związku chemicznego i mechanizmu jego oddziaływania na komórke (86). W większości przypadków problem ten może być uproszczony do prowadzenia badań w zakresie niskich dawek i porównanie może być dokonane z zaznaczeniem obowiązującego przedziału dawek.

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

Ze względu na bardzo ograniczoną ilość danych z obserwacji u ludzi zarówno jeśli chodzi o skutki promieniowania, jak i skutki mutagenów chemicznych, ekstrapolacja danych uzyskanych z układów modelowych musi być czyniona i jest konieczna. Według Moustachiego(106) czekanie na uzyskanie wystarczających danych dotyczących człowieka jest czekaniem na katastrofę ekologiczną, która zaowocuje ewidentnymi statystycznie danymi epidemiologicznymi. 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 najlepiej spełniają postawione zadania hodowle komórek ludzkich lub somatycznych komórek ssaków.

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, różna wrażliwość charakterystyczna dla różnych faz cyklu oraz na procesy naprawy, 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 czynników chemicznych, włączając w to możliwie ich współdziałanie z promieniowaniem jonizującym.

Zbieżność i stochastyczny charakter większości skutków biologicznych promieniowania oraz mutagenów chemicznych sugerują

możliwość porównywania tych oddziaływań i określania skutków mutagenu chemicznego za pomocą dawki promieniowania, która daje ten sam efekt biologiczny, a z drugiej strony, znając równoważniki dawki, można określić poziom mutagenu chemicznego dający taki sam efekt biologiczny jaki wywołuje promieniowanie o dawce dopuszczalnej, określonej normami międzynarodowymi. Przyjęcie takiej metodyki może rzeczywiście być bardzo użyteczne oraz pomocne w usystematyzowaniu norm obowiązujących w mutagenezie środowiskowej, względnie ich uregulowaniu lub wręcz ustaleniu (17,18). Może też w końcu służyć do oszacowania ryzyka dla zdrowia wynikającego z ekspozycji na dany mutagen. Gdy tylko przy świadomości obowiązujących restrykcji(129) i zastrzeżeń, równoważność jest uzyskana, można próbować przeniesienia reguł i praw ochrony przed promienowaniem na dziedzinę ochrony przed czynnikami chemicznymi (49).

3. *TRADESCANTIA* JAKO UKŁAD MODELOWY DO BADAN EFEKTÓW MUTAGENNYCH CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH

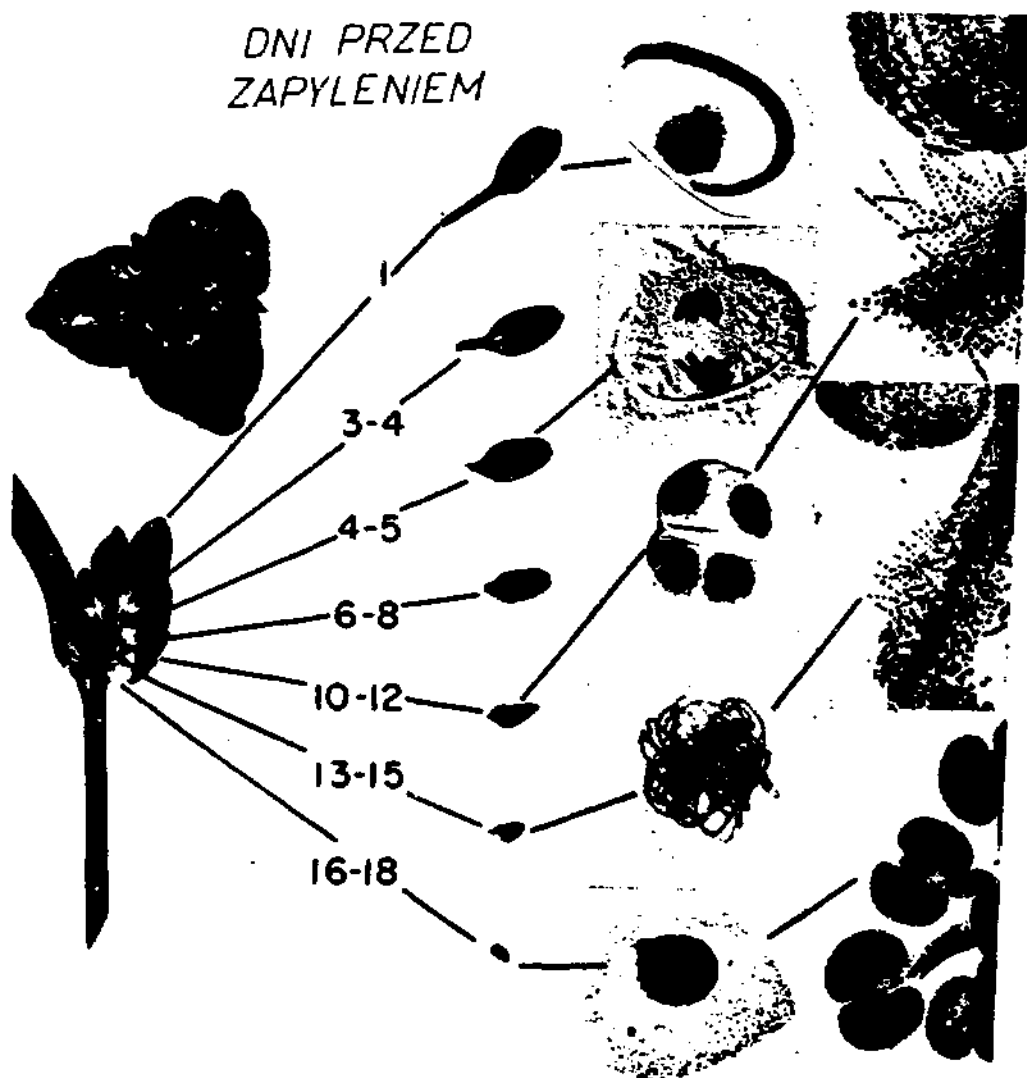
Kilka gatunków z rodziny *Commelinaceae*, do których należy *Tradescantia*, posiada cechy kwalifikujące je do prowadzenia badań nad skutkami promieniowania i mutagenów chemicznych. Skutki działania badanych czynników mogą być mierzone w formie:

- aberacji chromosomowych w mikrosporach, wierzchołkach wzrostu korzeni i we włoskach pręcików (10,124,142);
- śmiertelności pyłku (142,);
- obecności mikrojąder (142,119);
- mutacji somatycznych w płatkach kwiatów i komórkach włosków pręcików klonów heterozygotycznych ze względu na barwę kwiatów (28,42,95-101);
- skróceń włosków pręcików (45,68-71,116,146,153).

Z tych kilku typów badań najczęściej stosowana jest metoda oparta na pomiarze częstości mutacji somatycznych w komórkach włosków pręcików.

Wprowadzony do kolekcji około 1958 roku przez prof. W.V. Browna z Uniwersytetu w Austin heterozygotyczny ze względu na barwę kwiatów klon T-02 już w 1960 roku został zaproponowany przez S. Ichikawę jako biologiczny monitor promieniowania do zastosowania w otoczeniu elektrowni jądrowych (16). Użycie tej metody w badaniach radiobiologicznych okazało się niezwykle cenne i zaowocowało uzyskaniem licznych wyników. Badano np. tą metodą skuteczność biologiczną różnych rodzajów promieniowania (15,46,148-151), zbadano zależność efektu promieniowania od parametrów biologicznych takich jak: stopień ploidalności (66,69,152), zawartość DNA w komórce, czy wielkość jądra i chromosomów (147,156). Sprawdzono wpływ mocy dawki (68,113) i

DNI PRZED
ZAPYLENIEM



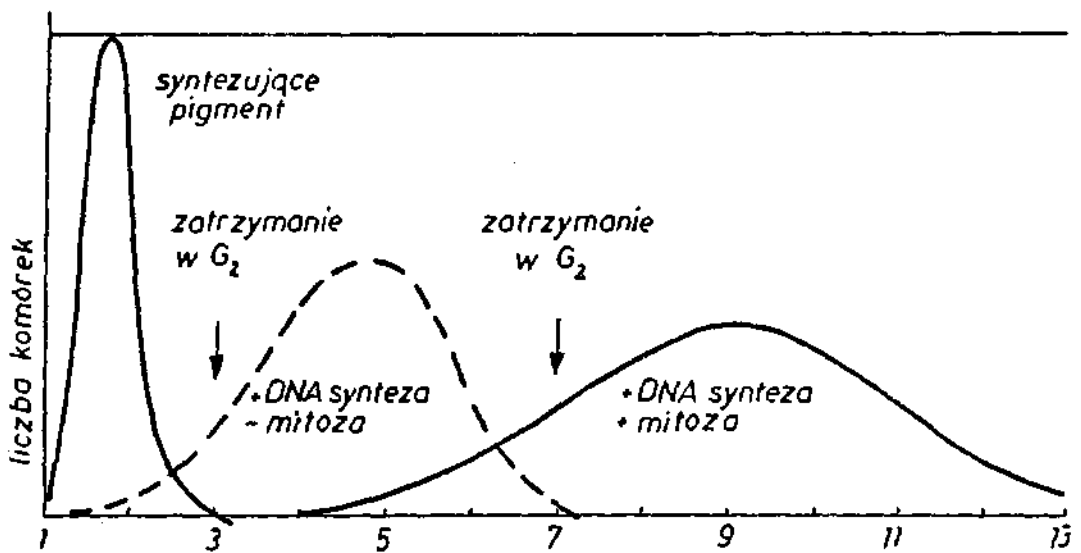
Rys. 3.1.1. Rozwój kwiatostanu ilustrujący fazy rozwoju mikrospor oraz włosków precyka w odniesieniu do lokalizacji i rozmiarów paczka (127).

frakcjonowania dawki (91,154) na wielkość efektu, zbadano także zależność dawka-efekt w zakresie niskich dawek i mocy dawek (65, 67,115,137,140). Stosując klon T-02 badano także efekt promieniowania kosmicznego (9).

Jak już wspomniano, test ten okazał się również wrażliwy na mutageny chemiczne (136,146). Niektóre z klonów znalazły zastosowanie w badaniach laboratoryjnych wielu różnych mutagenów chemicznych(73,110-112,114,133-136,155), a także w monitorowaniu środowiska (3,125-127,139).

3.1. Uprawa i rozwój rośliny.

Tradescantia jest rośliną długiego dnia i daje się łatwo prowadzić w zwykłej szklarni lub komorze wzrostowej. Chociaż jest rośliną wrażliwą na zmieniające się czynniki środowiskowe, takie jak: temperatura, wilgotność czy zanieczyszczenie powietrza (112,132), użyteczność jej do celów badawczych można łatwo zapewnić przez umieszczenie roślin na okres dwóch tygodni przed eksperymentem w warunkach kontrolowanych. Zapewnienie plantacji 18-godzinnego cyklu świetlnego prowokuje ją do ciągłego kwitnienia. Kwiatostan ukorzonej rośliny może kwitnąć przez około 5 miesięcy produkując aż 140 kwiatów (146). Ciągłe eksploatowana plantacja wymaga przesadzania 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. (Rys. 3.1.1.) Taka selekcja zapewnia bardzo długą żywotność i ujednoczenie wrażliwości. W kwiatostanie pączki są uporządkowane zgodnie z rosnącymi rozmiarami pączka, którym odpowiada określone zaawansowanie rozwoju. W najmniejszym

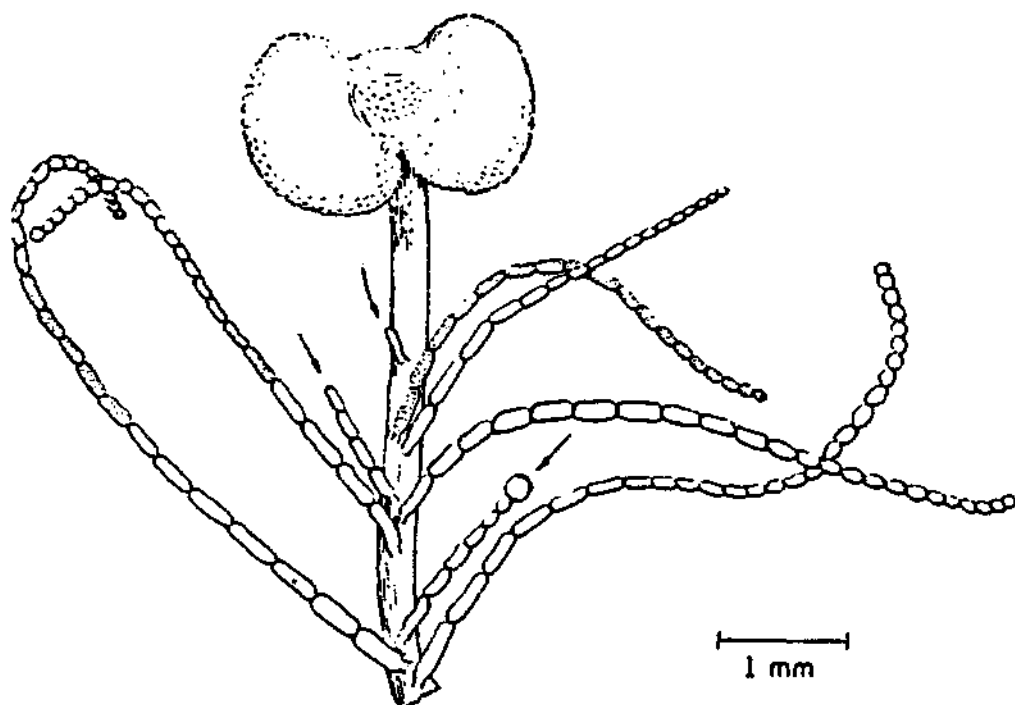


Rys. 3.1.2. Zależność pomiędzy wiekiem paczka (1 najstarszy, 13 najmłodszy) a liczba komórek w różnych fazach cyklu oraz synteza pigmentu(127).

paczku i równocześnie najmłodszym najliczniejsza jest grupa komórek w fazie G1, natomiast pozostałe są rozłożone pomiędzy fazy S, G2 i M (Rys. 3.1.2.). Liczba komórek w mitozie, a także ich proporcja do pozostałych maleje z wiekiem paczków. Podobnie liczba komórek w fazie S początkowo spada z wiekiem paczków, ale gdy mitozy zanikają, tuż przed początkiem fazy syntezy barwnika, liczba komórek w fazie S ponownie rośnie. W czasie rozwoju paczka są zatem dwa okresy syntezy DNA:

- wczesny prowadzący do mitoz,
 - późniejszy, który występuje, gdy komórki przestają się dzielić
- Ta druga faza syntezy DNA sygnalizuje masowe przejście komórek do fazy G2, w której komórki ulegają zatrzymaniu.

Cytologiczne obserwacje młodych włosków precyków wykazały, że szczytowe i podszczytowe komórki stanowią więcej niż 90% komórek dzielących się. Częstotliwość dzielenia się komórek



Rys. 3.1.3. Rysunek dojrzałego precika ze zmianami w komórkach wywołanymi działaniem mutagenu; skrócenia, komórki gigantyczne i różowe (zakropkowane) (116.)

podszczytowych jest niższa (39 - 45%) od szczytowych (55 - 61%). Poza tym wykazano, że podszczytowe komórki jeżeli dzielą się, to dzielą się tylko raz (45, 69-71, 97). Oznacza to że włoski precika będący wynikiem powtarzających się podziałów komórki szczytowej daje obraz kilku pokoleń pochodzących od jednej komórki i może być rozważany jako klasyczny układ jednokomórkowy. Daje to możliwość obserwowania skutków biologicznych badanych czynników zarówno w postaci mutacji somatycznych jak i w postaci ograniczonej przeżywalności komórek.

3.2. Mutacje barwy.

Poddane traktowaniu kwiatostany klonów *Tradescantia* heterozygotycznych ze względu na barwę kwiatów, wykazują szereg

zmian w komórkach włosków pręcika (Rys. 3.1.3.). Powstają komórki różowe, bezbarwne, karłowate, gigantyczne itp.. Wśród tych zmian mutacja komórki prowadząca do pojawienia się komórek w kolorze różowym wśród oryginalnie niebieskich jest najczęściej oznaczanym wskaźnikiem mutacji.

Badania Mericle'a prowadzone na klonie *Tradescantia* T-02 (95) wykazały, że co najmniej dwa dni przed otwarciem kwiatu formuje się barwnik antocjanowy. W oparciu o połączone badania hodowlane i spektrofotometryczne (95-101) stwierdzono, że wszystkie mutacje różowe (spontaniczne i indukowane) pojawiające się w diploidalnym klonie T-02 ($2n = 12$), traktowanym jako międzygatunkowy mieszaniec *Tradescantia occidentalis* i *Tradescantia ohimensis*, powstają w konsekwencji utraty lub mutacyjnej inaktywacji delfinidynowego czynnika *D* zlokalizowanego w tym samym chromosomie. Ponieważ nie udało się ustalić, czy klon T-02 jest homozygotyczny ze względu na *D*, czy też heterozygotyczny dla recesywnego amorficznego allela *d*, postanowiono przyjąć, że T-02 posiada gen D^- odpowiedzialny za produkcję delfinidyny, natomiast komórki różowe wykazują jego brak (D^-) i produkują cjanidynę zamiast delfinidyny.

W Brookhaven National Laboratory wyselekcjonowano szereg nowych klonów, również heterozygotycznych ze względu na barwę kwiatów. Należy do nich klon *Tradescantia* T-4430. Ten diploidalny klon ($2n = 12$) jest mieszańcem pomiędzy niebiesko kwitnącą *Tradescantia hirsutiflora* i różowo kwitnącą *Tradescantia subcaulis*. Genetyczne podstawy (113, 140) obserwowanych mutacji różowych potwierdzone zostały mendlowskim wynikiem uzyskanym z samozapylenia roślin: 3 niebieskie do 1 różowej. Barwa kwiatów *Tradescantia* jest określona parą alleli

w pojedynczym locus, gen *B* warunkujący barwę niebieską jest dominujący, gen *b* warunkujący barwę różową - recesywny. Gen *B* jest odpowiedzialny za produkcję delfinidyny. Różowy kolor charakteryzuje komórki, które utraciły zdolność syntetyzowania delfinidyny i produkują cjanidynę.

Dodatkową zaletą klonu T-4430, oprócz genetycznie wyjaśnionej istoty zmiany barwy komórek, jest niski poziom spontanicznego zamierania pyłku, stabilność mejozy, obcopolność, a przy tym wyraźny kontrast między komórkami podstawowymi niebieskimi a zmutowanymi różowymi. Z tych właśnie powodów oraz ze względu na fakt, że klon T-4430 jest wyjątkowo wrażliwy na mutageny chemiczne, klon ten stosowano w Brookhaven National Laboratory we wszystkich badaniach powietrza przemysłowego.

W 1972 roku S. Ichikawa (72) opisał klon triploidalny *Tradescantia* KU 9 ($2n = 18$), cechujący się niezwykłą żywotnością, korzystnym fenotypem i heterozygotycznością ze względu na barwę kwiatów. *Tradescantia* KU 9 jest mieszańcem pomiędzy *Tradescantia paludosa* And. et Woods. ($2n = 24$) oraz *Tradescantia ohioensis* 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).

Różnorodność klonów stosowanych w tej metodzie pozwala na wybranie klonu najodpowiedniejszego z punktu widzenia specyfiki prowadzonych badań. 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 G2 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 kwiaty kwitnące w pierwszych dniach po traktowaniu nie będą jeszcze wykazywały mutacji. Około szóstego dnia po traktowaniu pojawiają się kwiaty wykazujące pierwsze zmiany mutacyjne, liczba mutacji rośnie stopniowo do dnia jedenastego, kiedy to uzyskuje ona poziom plateau. Poziom ten utrzymuje się przeważnie aż do piętnastego dnia po traktowaniu, po czym liczba mutacji ulega stopniowo zmniejszeniu. Ta faza cyklu świadczy o tym, że kwitnące kwiaty były w momencie traktowania na etapach rozwoju pączka charakteryzujących się zmniejszającą się liczebnością grupy komórek posiadających zdolność podziału. W przypadkach jednorazowego traktowania roślin czynnikiem mutagennym mutacje obserwowane w okresie pomiędzy 11-tym a 15-tym dniem charakteryzują efektywność mutagenną badanego czynnika.

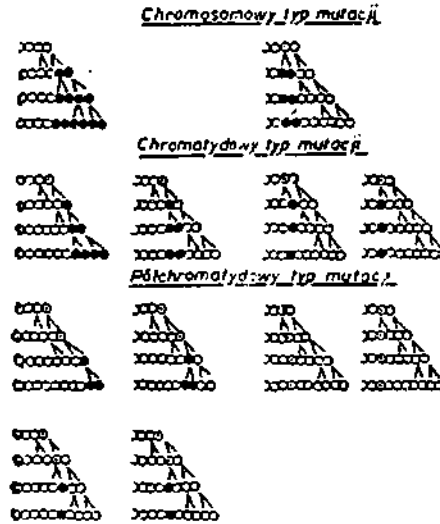
W przypadku ekspozycji ciągłej lub przy kontroli skażeń środowiskowych okres mierzenia mutacji rozciąga się na czas dłuższy, proporcjonalny do okresu działania badanego czynnika. Zakończenie okresu obserwacji w takim przypadku powinno nastąpić (w zależności od potrzeb i kondycji roślin) w 15-tym dniu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

Mutacje różowe które najczęściej wykorzystuje się do oceny efektu, pojawiają się wśród komórek oryginalnie niebieskich w postaci pojedynczych komórek różowych lub sektorów

TYP KOMORKI:

szczytowa

podszczytowa

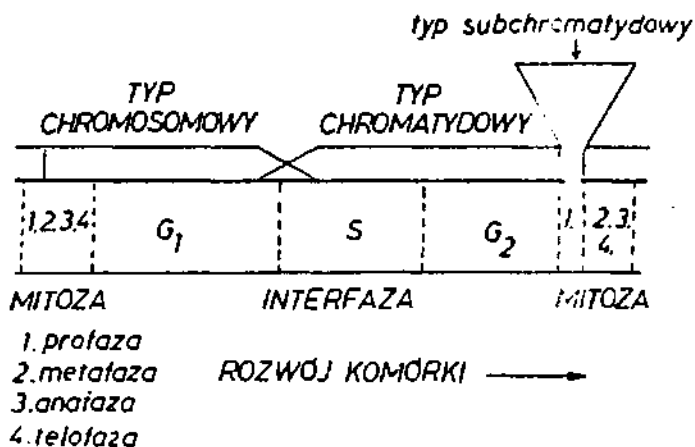


Rys. 3.2.1. Schematyczne przedstawienie indukowania mutacji(116).

Komórka punktowana oznacza komórke, w której zaszła mutacja, zmutowane komórki potomne są zaciemnione, linie wskazują podziały

kilkukomórkowych. Każda taka komórka lub sektor różowy traktowany jest jako jedno zdarzenie mutacyjne (146).

Pojedyncze komórki różowe pojawiają się zdecydowanie rzadziej od wielokomórkowych sektorów. Jeżeli przyjąć, że ekspresja mutacji w rozwijającym się włosku zachodzi zgodnie z prezentowanym przez Nayara (116) oraz Ichicawę (72), schematem przedstawionym na Rys. 3.2.1., to obserwowane pojedyncze komórki różowe powinny być wskaźnikiem tej części zmian, które powstały w późnej fazie syntezy lub w fazie G₂. Takie założenie zgodne jest również z przedstawioną na Rys. 3.2.2. zależnością powstawania różnego typu aberacji od fazy cyklu komórkowego(163). Stosunek liczby pojawiających się pojedynczych komórek różowych do wszystkich mutacji różowych daje zatem możliwość kontrolowania, czy nie



Rys. 3.2.2. Zależność pomiędzy typem aberacji indukowanej przez promieniowanie a fazą cyklu komórkowego (163)

nastąpiło zaburzenie cyklu komórkowego.

3.3. Rozwój precyka i mierzenie zdarzeń letalnych

Toksyczny efekt badanych czynników jest manifestowany we włoskach precyków *Tradescantia* w postaci "skróconych" włosków (Rys. 3.1.3.). Jeżeli nie rozwinięty w pełni włoszek jest potraktowany czynnikiem, który zahamuje podział komórki szczytowej, to pozostanie on w formie "skróconej", tzn. zawierającej mniejszą ilość komórek, gdyż żadna komórka nie przejmuje merystematycznej zdolności podziału. Procent włosków kontynuujących wzrost do normalnej długości (zbliżonej do średniej ilości komórek we włoskach, a zatem świadczącej o tym, że szczytowa komórka podzieliła się przynajmniej 5 - 6 razy) daje miarę przeżywalności.

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

Ilość komórek we włosku precyka jest dla danego klonu określona. Szczytowa partia włosków najpóźniej kończy cykl rozwojowy i posiada nieco mniej komórek, dlatego średnie ilość

komórek w górnej 1/3 precyka jest mniejsza niż dla pozostałych włosków. Jeżeli na kwiatostan działał czynnik hamujący podział komórki, lub zabijający dzielącą się komórkę, to właśnie w tej grupie włosków najwcześniej tzn. w okresie najczęstszego występowania mutacji, pojawiają się włoski o mniejszej niż normalnie liczba komórek. Pojawiające się w tej partii precyka włoski skrócone przyjęto traktować jako letalne. Są to włoski których liczba komórek jest mniejsza od liczby komórek wynikającej z charakterystycznego dla tej partii precyka rozkładu statystycznego tzn. takiej, która może wystąpić w grupie mniejszej niż 5% populacji włosków (28). W konsekwencji takiego założenia przyjęto następujące kryteria przeżywalności, dla klonu:

- *Tradescantia* - 02 więcej niż 11 komórek (150,153),
- *Tradescantia* - 4430 więcej niż 16 komórek (155),
- *Tradescantia* - KU9 więcej niż 12 komórek (72).

4. CEL I ZAKRES PRACY

Postępujące zanieczyszczenie środowiska wynika z olbrzymiej ekspansji przemysłowej i chemicznej, za którą nie nadąża niestety rozwój i zastosowanie praktyczne metod ochrony powietrza, wody i gleby. Istnieje wiele metod stosowanych do oceny skutków biologicznych zanieczyszczeń środowiska. Wśród tych metod na szczególną uwagę zasługują te, które odznaczają się czułością, a przy tym nie są bardzo kosztowne i czasochłonne(81). Należy do nich zaliczyć metodę opartą na pomiarze częstości mutacji somatycznych w komórkach włosków pręcików *Tradescantia*, klonów heterozygotycznych ze względu na barwę kwiatów.

Głównym celem niniejszej pracy było określenie, przy pomocy tej metody, skutków mutagennych promieniowania jonizującego, mutagenów chemicznych i wybranych czynników środowiskowych, oraz wykazanie współdziałania badanych czynników w indukowaniu mutacji somatycznych.

W związku z powyższym, przeprowadzono badania laboratoryjne efektywności mutagennej promieniowania jonizującego oraz wpływu wybranych czynników środowiskowych na tę efektywność.

Mając na uwadze ogromną rolę, jaką dla ochrony środowiska odgrywa problem współdziałania mutagennych czynników środowiskowych, przeprowadzono badania nad skojarzonym działaniem wybranych, znanych mutagenów chemicznych i promieniowania jonizującego.

Podjęto również próbę przedstawienia, w jakim stopniu w ocenie charakteru działania współdziałających czynników mutagennych i środowiskowych może być pomocna znajomość kształtu krzywej opisującej zależność efektu od dawki lub ekspozycji.

Aby ocenić efektywność mutagenną zanieczyszczeń powietrza w rejonie miasta Krakowa, przeprowadzono badania *in situ* z zastosowaniem *Tradescantia*.

W oparciu o uzyskane wyniki dokonano również oceny, czy stosowana metoda może stanowić w naszych warunkach test przydatny do oceny mutagennych skutków czynników środowiskowych.

B A D A N I A W L A S N E

5. BADANIA LABORATORYJNE NAD NIEZALEŻNYM I SKOJARZONYM DZIAŁANIEM PROMIENIOWANIA I MUTAGENOW CHEMICZNYCH

5.1. Metodyka

Uprawa roślin:

Uprawa plantacji różnych klonów *Tradescantia* prowadzona jest w zwykłej szklarni z zapewnieniem im 18-godzinnego cyklu światła. Przy rozsadzaniu, w doborze warunków glebowych i stosowaniu środków ochrony roślin przestrzegane są reguły podane w pracy A. Underbrink'a i współautorów (146).

W badaniach laboratoryjnych najczęściej poddawane są traktowaniu kwiatostany przycięte. Ponieważ stwierdzono w pracy A. Cebulska-Wasilewska i współautorzy (25), że obniżenie promieniowrażliwości powodowane przycięciem kwiatostanów zanika prawie całkowicie po upływie 24 godzin od przycięcia, do badań stosowano kwiatostany ukorzenione (w których efekt nie występuje) lub przycięte 24 - 48 godzin przed traktowaniem, tzn. takie dla których efekt ten można już pominąć. Po zakończeniu traktowania wszystkie rośliny kultywowane były w komorze wzrostu w pojemnikach z napowietrzaną pożywką Hoagland'a i w kontrolowanych warunkach: światła (długość dnia - 18 godzin), wilgotności (65%), temperatury (17°C noc, 21°C dzień) aż do zakończenia okresu pomiaru mutacji.

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

$$M = \frac{1}{k} \sum_{i=1}^k \frac{x_i}{n_i}$$

gdzie : x_i = liczba obserwowanych zdarzeń mutacyjnych w i -tym dniu
 n_i = liczba przeglądanych włosków w i -tym dniu

W badaniach w których mamy do czynienia ze zliczaniem poszczególnych zdarzeń, (np. czastek naładowanych przechodzących przez licznik lub mutacji u badanych organizmów), a więc również w przypadku mutacji w komórkach włosków precyka u *Tradescantia*, występuje rodzaj błędu wynikający jedynie ze skończonej liczby przeprowadzonych doświadczeń i zwany błędem statystycznym (12). Wartość oczekiwana częstości występowania danego zdarzenia równa jest prawdopodobieństwu jego pojawienia się, a odchylenie standardowe wartości oczekiwanej określone jest następująca zależnością:

$$\sigma^2 = \frac{1}{n} p_i (1-p_i)$$

gdzie $p_i = \frac{x_i}{n_i}$

x_i liczba obserwowanych zdarzeń

n_i liczebność badanej grupy

gdy p_i jest dużo mniejsze od jedności uzyskujemy :

$$\sigma^2 = p_i / n$$

Kwadrat tego błędu jest zatem w przybliżeniu odwrotnie proporcjonalny do liczby przeprowadzonych prób.

W konsekwencji przyjęto zatem że pojedynczy pomiar częstości mutacji u *Tradescantia* jest obarczony błędem :

$$\sigma^2 = \frac{x_i}{n^2}$$

natomiast średnia wartości mierzonych przez k dni :

$$\Delta = \sqrt{\frac{1}{k} \sum_{i=1}^k \frac{x_i}{n^2}}$$

W przypadkach, w których z konieczności porównywano pomiary uzyskane dla różnej liczby roślin, a co za tym idzie znacznie różnej liczby kwitnących i obserwowanych kwiatów i pręcików, do obliczeń wartości średnich wprowadzono wagę statystyczną. Uwzględniono w ten sposób problem uśrednienia wyników o różnej dokładności(138).

Napromieniowanie:

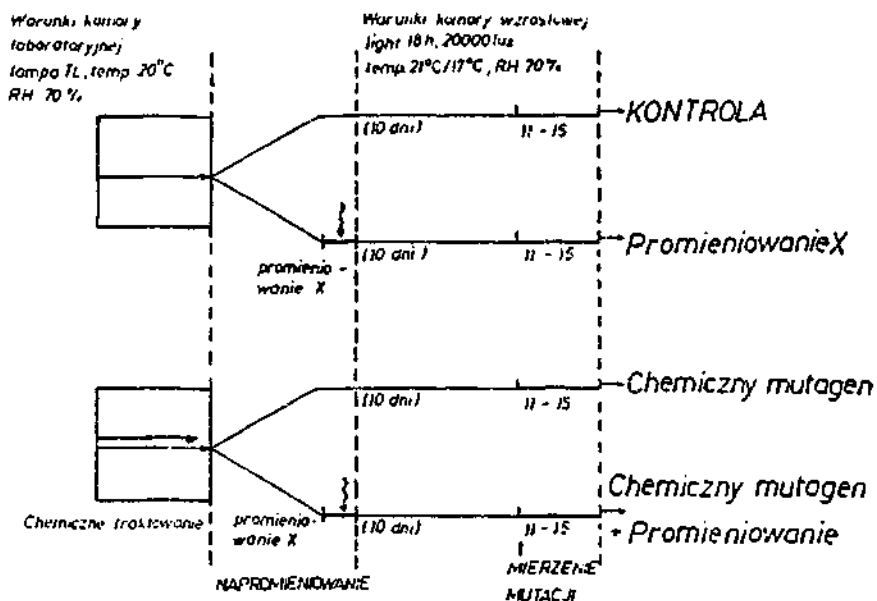
Do napromieniowania roślin promieniowaniem X stosowano aparat rentgenowski(250 kV stosując filtr (0.4 Sn + 0.25 Cu + 1.0 Al) i zachowując stałą moc dawki 1.0 Gy/min.

W badaniach z równoczesną ekspozycją na 1,2 dibromoetan i promieniowanie moc dawki promieniowania X wynosiła $2.8 \cdot 10^{-4}$ Gy/min. Aby uzyskać odpowiednio niską moc dawki stosowano dodatkowo filtr z 2mm ołowiu oraz maksymalnie osiągalną odległość próbki od tarczy. Dawki stosowane, obliczane były na podstawie pomiarów wykonywanych przy pomocy komory jonizacyjnej (Baldwin-Farmer) umieszczonej wśród kwiatostanów, oraz detektora (Philips 37498/L-213004) umieszczonego przy źródle:

Do napromieniowania roślin promieniowaniem gamma stosowano źródło ^{60}Co Gammatronu-3 Instytutu Onkologii w Krakowie (148). Moc dawki wynosiła 0.75 Gy/min. W trakcie napromieniowania rośliny były umieszczone dla utrzymania wilgotności w torebkach foliowych i przykryte płytką z pleksiglasu o grubości 0.6 mm.

Stosowane czynniki i sposób traktowania:

W badaniach przyjęto generalnie zasadą, że wszelkie porównania muszą być prowadzone w warunkach zapewniających stałość wszystkich zmiennych niezależnych mogących mieć wpływ na końcowy efekt biologiczny. Ogólny schemat eksperymentów których celem było porównanie efektywności mutgennej promieniowania



Rys.5.1.1. Schemat doświadczeń porównujących indywidualne i skojarzone działanie promieniowania i mutagenu chemicznego.

i czynnika chemicznego (działających niezależnie lub współdziałających) przedstawiono na Rys. 5.1.1. Traktowaniu poddawano kwiatostany przycięte. Dwie z czterech losowo wybranych grup roślin poddawane były traktowaniu chemicznemu, z których jedna po zakończeniu traktowania była napromieniowana określoną dawką promieniowania. We wszystkich eksperymentach pozostałe dwie grupy roślin, przeznaczone na kontrole oraz do porównania skutków promieniowania, poddawane były identycznej procedurze, ale bez obecności mutagenu chemicznego.

W badaniach stosowano trzy różnego typu związki chemiczne; fluorek sodu (NaF), metylosulfonian etylu (EMS), 1,2 dibromoetan (DBE) oraz modyfikacja podłoża domieszkami dolomitu.

W przypadku fluorku sodu zastosowano traktowanie roślin

poprzez zanurzenie łodyg kwiatostanu w roztworze badanego związku. Fluorek sodu wybrano do badań ze względu na rolę, jaką fluor odgrywa w zanieczyszczeniach środowiska. Należy on do grupy związków mających duży udział w emisjach przemysłowych. Fluorek przedstawiany jest jako inhibitor wielu reakcji enzymatycznych, natomiast są kontrowersje odnośnie jego działania mutagennego (59,60,74,80). Rośliny traktowane były w warunkach laboratoryjnych roztworem 2.4 mM fluorku sodu przez okres około 5 godzin, następnie napromieniowywane i przenoszone do komory wzrostowej(23,28,29,34).

W badaniach, których celem było sprawdzenie wpływu zmiany podłoża roślin na ich promieniowrażliwość, rośliny zostały podzielone w warunkach szklarniowych na cztery grupy w zależności od ilości oraz rodzaju zastosowanego doglebowo dolomitu:

Tabela 5.1.1.

Wielkość domieszki oraz procentowy skład dolomitów zastosowanych do badań

	x	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	CaO	MgO	m
D1 i D2	6.0	6.0	1.3	6.0	52.7	28.0	5.3-10.6
D3	46.6	0.74	0.15	0.16	30.6	21.0	5.3
D4	kontrola						0.0

x=strata prażenia, m = ilość gramów na doniczkę

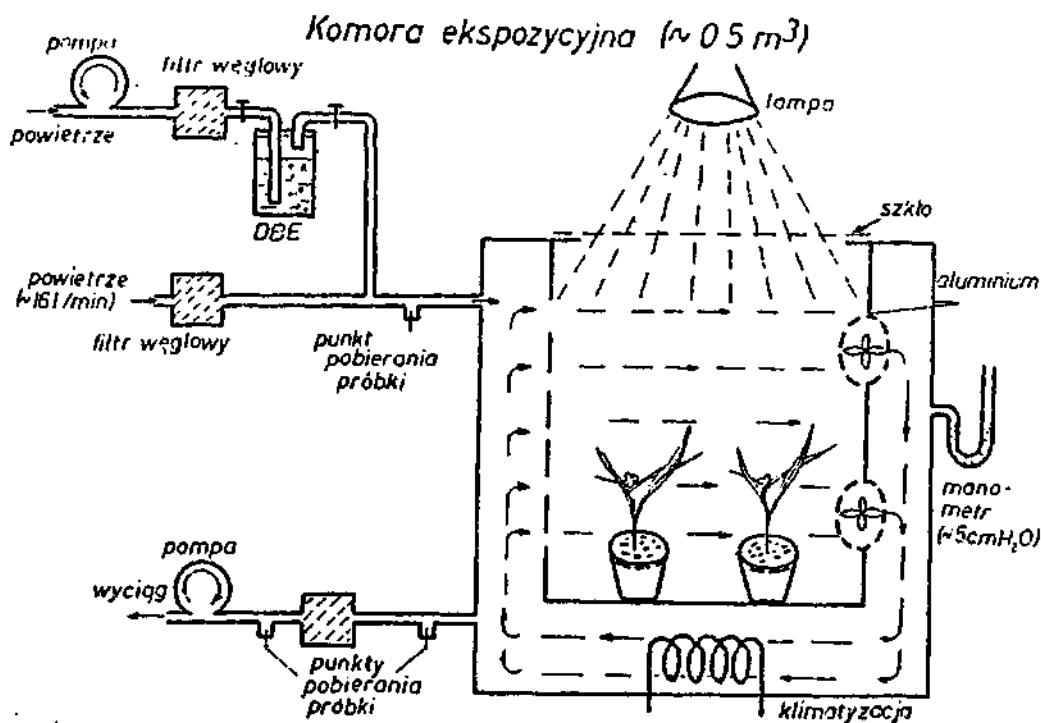
Dolomit zaproponowany został do badań jako jeden z najbardziej rozpowszechnionych w przyrodzie minerałów zawierających magnez. W czasie trwania eksperymentów rośliny były podlewane taką samą ilością wody. W okresach 4,6,8 tygodni, od momentu zastosowania doglebowo dolomitu, ścinano z każdej grupy glebowej kwiatostany i hodowano je w roztworze Hoagland'a w przeznaczonyj

do tego celu komorze wzrostowej. W drugim dniu po przycięciu napromieniowano kwiatostany określoną dawką promieniowania X.

Pierwszym z mutagenów chemicznych zastosowanych do badań nad ich współdziałaniem z promieniowaniem jonizującym był metylosulfonian etylu (EMS). EMS jest znanym i szeroko stosowanym mutagenem z grupy związków alkilujących (53). Do traktowania roślin stosowano 0.04 molowy roztwór EMS w 0.025 molowym buforze fosforanowym. Czas półtrwania EMS w 0.1 molowym buforze fosforanowym o pH 7 wynosi 9 godzin, natomiast w wodzie destylowanej 11.5 godziny (51). Roztwór EMS w rozcieńczonym roztworze buforu stosowano, aby zmniejszyć efektywność toksycznego działania kwasu metylosulfonowego - jednego z produktów hydrolizy EMS. Ze względu na nietrwałość tego związku i jego potencjalna kancerogenność do każdego traktowania sporządzano świeże roztwory, a samo traktowanie przeprowadzano stosując zalecane przez Ehrenberga środki ostrożności (51). Ekspozycje na EMS trwające od 4 do 8 godzin prowadzone były w komorze w której utrzymywano niewielkie podciśnienie, aby zapobiec wydostawaniu się lotnego EMS na zewnątrz komory. Wymagana temperatura utrzymywana była przez regulowaną termometrem kontaktowym ekspansja ciekłego azotu. Przycięte kwiatostany o równej długości łodygi zanurzano w roztworach umieszczonych w specjalnych pojemnikach ekspozycyjnych. Rośliny przeznaczone do traktowania kontrolnego zanurzane były w roztworze buforu fosforanowego.

Ostatnim badanym związkiem był gazowy 1,2-dibromoetan, również znany mutagen i szeroko stosowany dodatek do paliw, środków agrotechnicznych itp. (13,43,53,141). Rośliny traktowano gazowym DBE w szczelnej komorze przez którą przepływał stały

strumień powietrza zawierający określoną i kontrolowaną ilość DBE (22,83,87). Schemat stosowanej komory ekspozycyjnej przedstawiono na Rys.5.1.2. Cechowanie układu oraz pomiary kontrolne na wejściu i wyjściu powietrza z komory wykonano z zastosowaniem chromatografii gazowej (chromatograf Varian 1740 z kolumną szklaną, wypełnioną wypełniaczem Tenax GC). Pomiary chromatograficzne na wyjściu komory wykonywane w odstępach 20-minutowych wykazywały, że po upływie ok. 1 godziny od włączenia strumienia DBE w komorze ustalała się równowaga i poziom DBE pozostawał stały. Po godzinie od przzerwania dopływu strumienia gazowego DBE rośliny były wyjmowane z komory i transportowane do napromieniowania.



Rys.5.1.2. Schemat komory do ekspozycji na gazowy DBE(22,87).

5.2. Badania efektywności mutagennej promieniowania

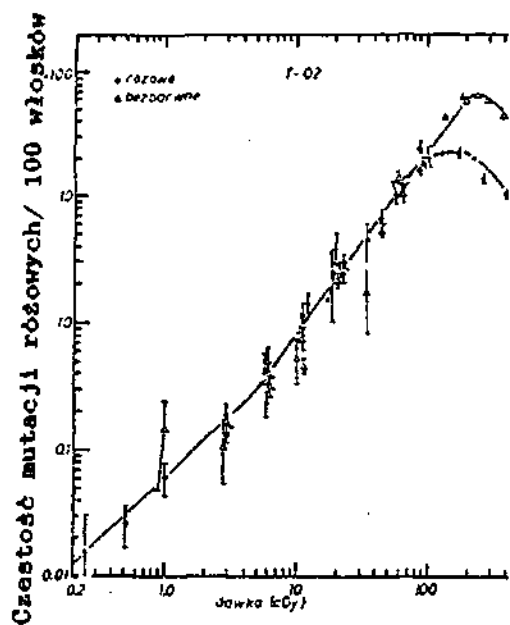
5.2.1. Zależność dawka-efekt

Mutacje barwy komórek włosków precyków u *Tradescantia* stanowią układ modelowy do badań zarówno laboratoryjnych jak i środowiskowych. W badaniach prezentowanych w niniejszej pracy zastosowano go w warunkach laboratoryjnych do określenia efektywności działania i współdziałania czynników chemicznych oraz promieniowania jonizującego,

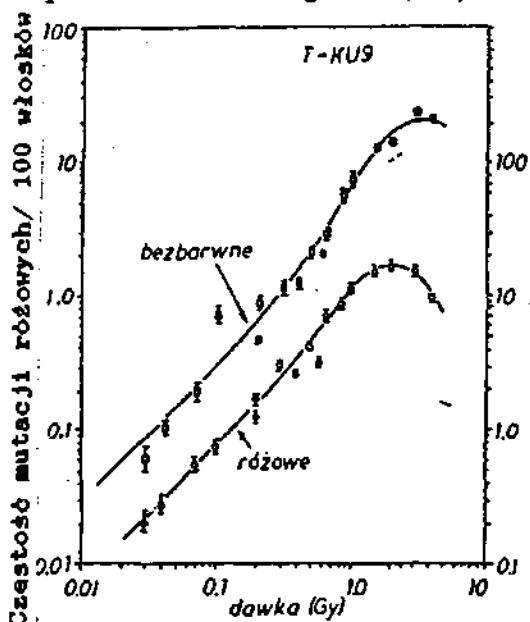
Do badań użyto trzech klonów *Tradescantia*: T-02, T-KU9, oraz T-4430 określając wpływ wielkości dawki promieniowania jonizującego na poziom indukowanych w nich mutacji somatycznych. Na Rys. 5.2.1.1 przedstawiono krzywe zależności częstości mutacji od dawki promieniowania X dla klonu T-02. Wykazują one liniowo kwadratową zależność efektu od dawki. W zakresie niskich dawek (do 0.05 Gy) krzywa dawka-efekt zarówno dla różowych, jak i bezbarwnych mutacji ma charakter bardziej zbliżony do zależności liniowej. Dla dawek większych krzywa zmienia kąt nachylenia a następnie osiąga nasycenie. Maksimum (ok. 22 mutacje/100 włosków) częstotliwości mutacji różowych występuje przy dawce 2,5 Gy.

Rys. 5.2.1.2. przedstawia zależność pojawiania się komórek bezbarwnych oraz mutacji różowych od dawki promieniowania X dla klonu T-KU-9. Krzywe dawka-efekt mają charakter liniowo-kwadratowy. Maksimum częstości w zakresie dawek nasycenia występuje dla mutacji różowych po osiągnięciu wartości ok. 18 mutacji/100 włosków przy dawce 2.0 Gy, natomiast dla komórek bezbarwnych, wartości ok. 22 mutacji/100 włosków przy dawce ok. 3.0 Gy.

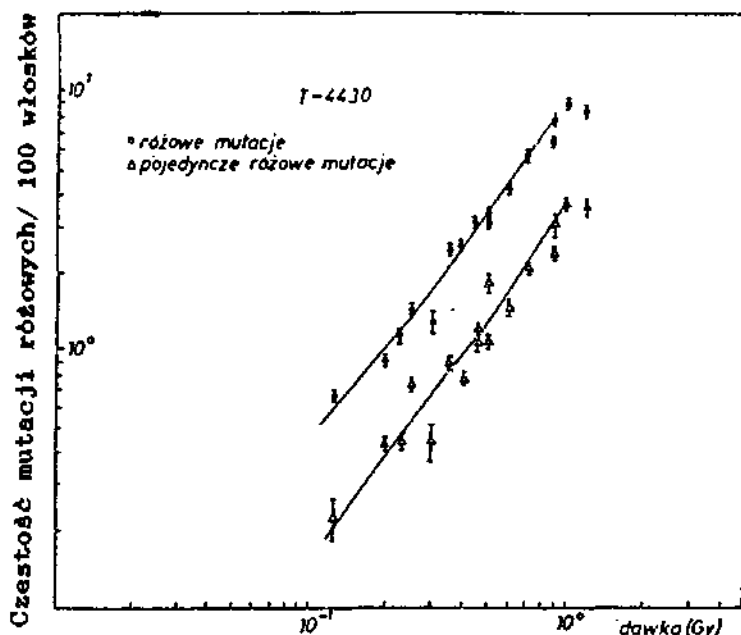
Zależność częstości różowych i pojedynczych różowych mutacji od dawki promieniowania gamma dla klonu T-4430



Rys.5.2.1.1. Zależność dawka-efekt dla mutacji różowych i bezbarwnych po napromienianiu kwiatostanów klonu T-02 promieniowaniem gamma (248)



Rys.5.2.1.2. Zależność dawka-efekt dla mutacji różowych i bezbarwnych po napromienianiu kwiatostanów klonu T-KU9 promieniowaniem X (24)



Rys.5.2.1.3. Zależność dawka-efekt dla mutacji różowych i pojedynczych różowych po napromieniowaniu kwiatostanów klonu T-4430 promieniowaniem gamma(28)

przedstawiono na Rys.5.2.1.3. Wydaje się, że w przypadku klonu T-4430 nasycenie występuje już dla wartości ~ 10 mutacji/100 włosków przy dawce 1.0 Gy. Pojedyncze mutacje różowe występują z częstością stanowiącą ok. 37% częstości mutacji różowych w zakresie dawek od 0.1 Gy - 1.0 Gy. Krzywe dla tych mutacji są przesunięte równolegle w stosunku do siebie i mają również charakter liniowo kwadratowy.

Zależność częstości indukowanych mutacji od dawki promieniowania ma we wszystkich trzech klonach badanych charakter liniowo kwadratowy. Wykazuje ona dużą zgodność z modelem przyjętym dla mutacji somatycznych(38) z supresją i występujących w populacji, której liczebność jest modyfikowana przez przeżywalność również zależną od dawki. W układach tych, dla których częstość mutacji jest liczona na liczbę komórek napromieniowanych, ostateczne prawdopodobieństwo pojawienia się

mutacji jest iloczynem następujących prawdopodobieństw czastkowych(38):

$$M = M^1 (1 - M^*) S \quad 5.2.1.1$$

gdzie:

$M^1 = 1 - \exp / -q(\alpha D + \beta D^2)$ prawdopodobieństwo, że mutacja zostanie wywołana

$1 - M^* = \exp / -s(\alpha D + \beta D^2)$ prawdopodobieństwo, że wywołana mutacja nie będzie stłumiona przez M^* tzn. mutacja konkurencyjna

$S = \exp / -p(\alpha D + \beta D^2)$ prawdopodobieństwo, że komórka przeżyje dając szansę ekspresji mutacji

po podstawieniu funkcji określających poszczególne prawdopodobieństwa, uzyskujemy równanie opisujące zależność częstości pojawiających się mutacji (M) od dawki promieniowania (D) :

$$M = \langle 1 - \exp / -q(\alpha D + \beta D^2) \rangle / \exp / -(s + p)(\alpha D + \beta D^2) / \quad 5.2.1.2$$

gdzie :

, współczynniki uwzględniające fizyczne, fizykochemiczne, chemiczne i biochemiczne procesy prowadzące do dwuniciowych pekniać spirali DNA (DNA DSB). Współczynniki te odzwierciedlają prawdopodobieństwo peknięcia spirali DNA po pojedynczym przekazaniu energii (α) i podwójnym przekazaniu energii promieniowania w dwóch sąsiadujących miejscach (β).

Natomiast, współczynniki: p, q, oraz s występujące w tym równaniu są niezależne od rodzaju promieniowania czyli fizycznych procesów przekazania energii, natomiast charakteryzują biofizyczne i biochemiczne właściwości komórki :

p - określa prawdopodobieństwo, że DNA DSB prowadzi do śmierci komórki, współczynnik ten uwzględnia proces naprawy

dwuniciowych pęknięć DNA,

q - prawdopodobieństwo, że DNA DSB prowadzi do specyficznej mutacji, również uwzględnia proces naprawy DNA DSB,

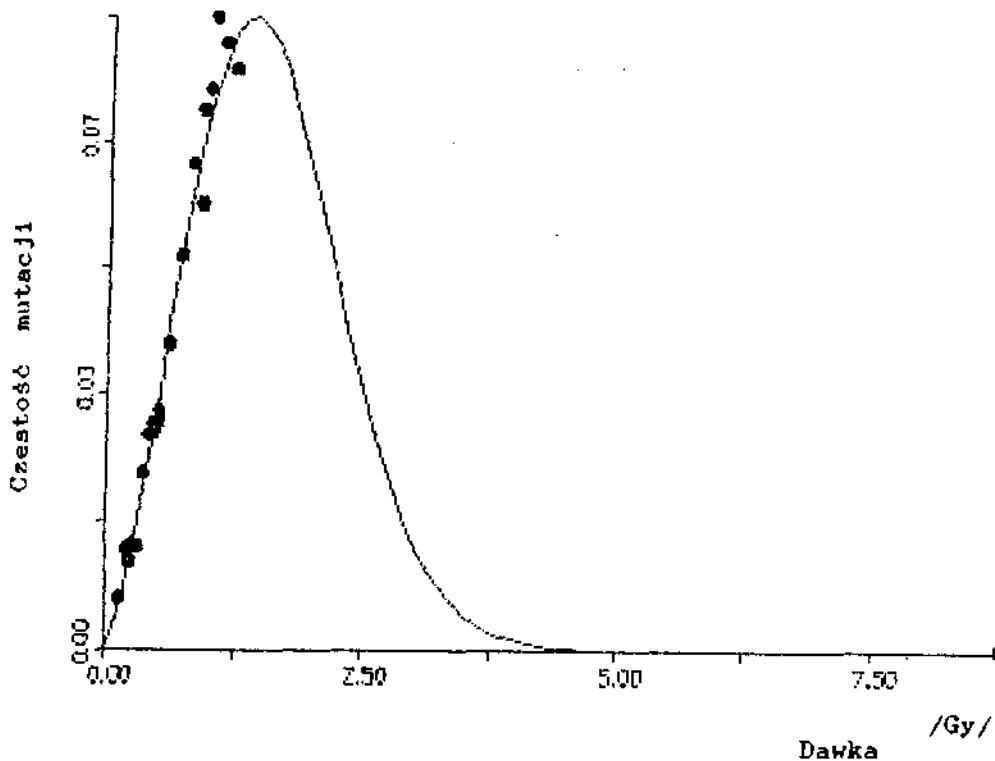
s - prawdopodobieństwo, że DNA DSB prowadzi do supresji specyficznej mutacji.

W sumie od tych wszystkich parametrów zależy liczba pojawiających się mutacji. Wykorzystując zależność matematyczna mówiąca, że pochodna równania 5.2.1.2 równa się zeru w punkcie przegięcia (czyli w szczycie mutacji) można uzyskać funkcję opisującą częstość (M_p) mutacji na poziomie nasycenia :

$$M_p = \left(1 - \frac{s+p}{q+s+p} \right) \exp \left(\frac{s+p}{q} \ln \left(\frac{s+p}{q+s+p} \right) \right) \quad 5.2.1.3$$

Z równania 5.2.1.3. wynika, że tylko parametry q, p oraz s decydują o wysokości poziomu nasycenia mutacji.

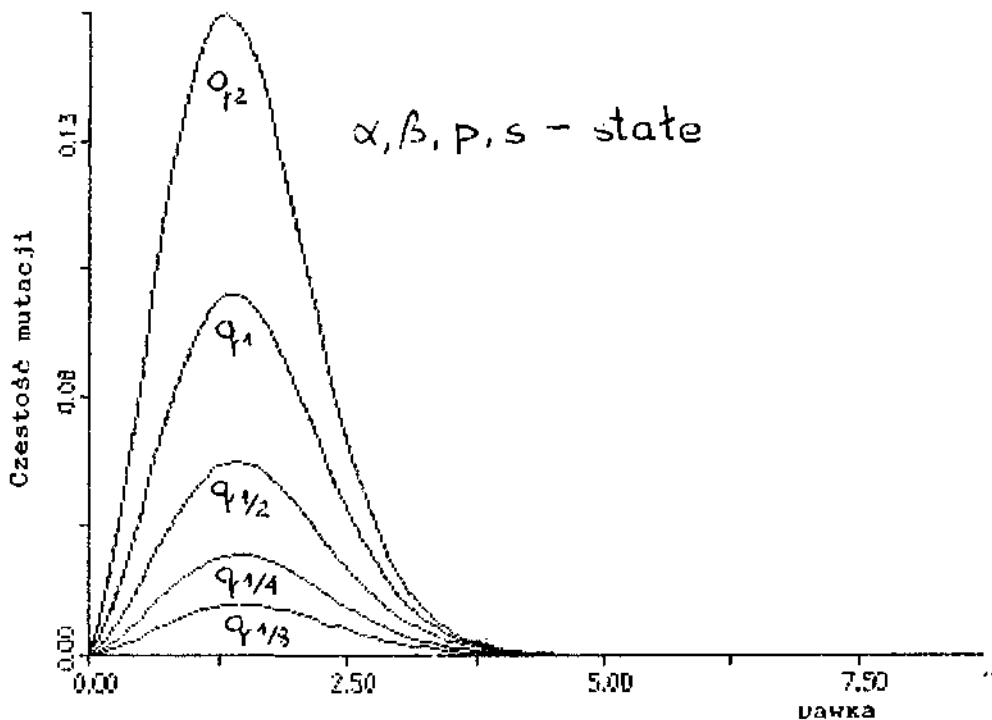
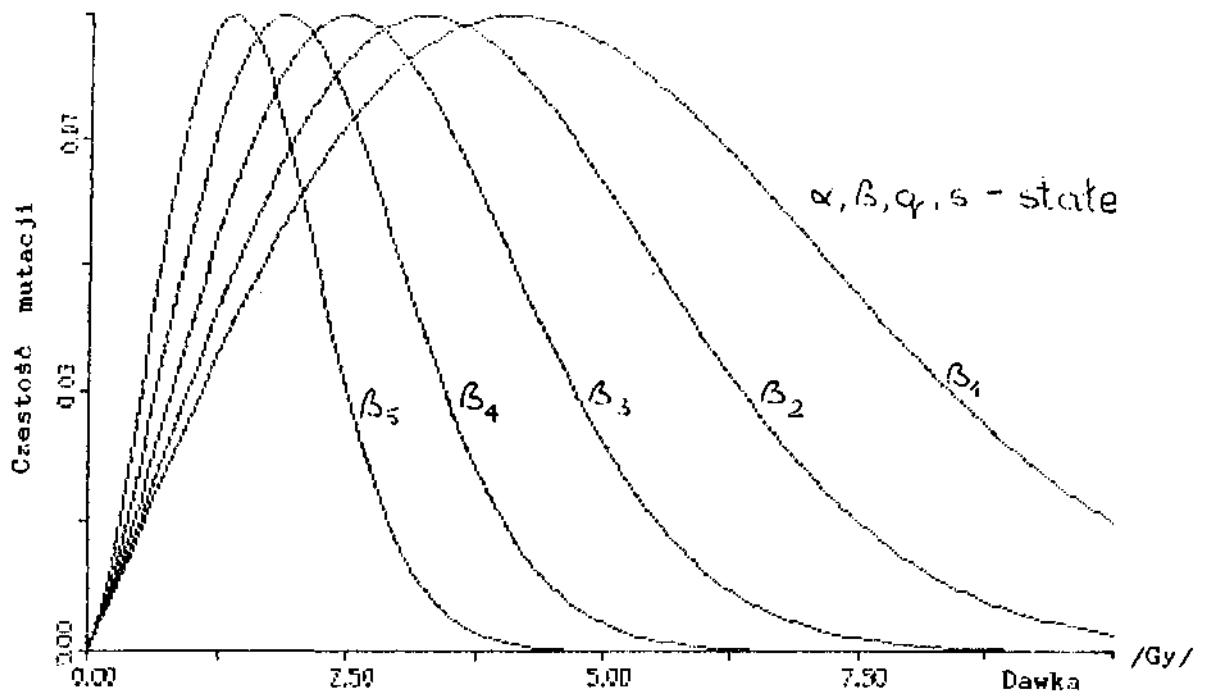
Ze znajomości funkcji opisującej w danym układzie zależność wielkości efektu od dawki lub ekspozycji wynikają więc pewne wnioski praktyczne dotyczące możliwości przewidywania wpływu różnych warunków eksperymentalnych na przebieg krzywej dawka-efekt w przypadku mutacji. Ilustrują to przykłady podane na rysunkach 5.2.1.4 - 5.2.1.7. Krzywa na rysunku 5.2.1.4. opisana jest równaniem 5.2.1.2. w którym: $q\alpha = .337 \cdot 10^{-1} \text{Gy}^{-1}$, $q\beta = .109 \text{Gy}^{-2}$, $q/(p+s) = .2878$ (36). Współczynniki te uzyskano z dopasowania równania 5.2.1.2 do wyników eksperymentalnych uzyskanych dla klonu T-4430 (zależność częstości mutacji od dawki promieniowania Rys 5.2.1.3). Zmiana mocy dawki lub zastosowanie dawki podzielonej modyfikujące proces naprawy subuszkodzeń DNA, wpływa na wartość parametru β , ale zgodnie z równaniem 5.2.1.3. nie powinno to mieć wpływu na poziom nasycenia w krzywej dawka-efekt. Sytuacje taka ilustruje Rys.5.2.1.5. Krzywe na tym



Rys. 5.2.1.4. Częstości mutacji uzyskane dla klonu T-4430 oraz krzywa opisana równaniem 5.2.1.2., w którym:

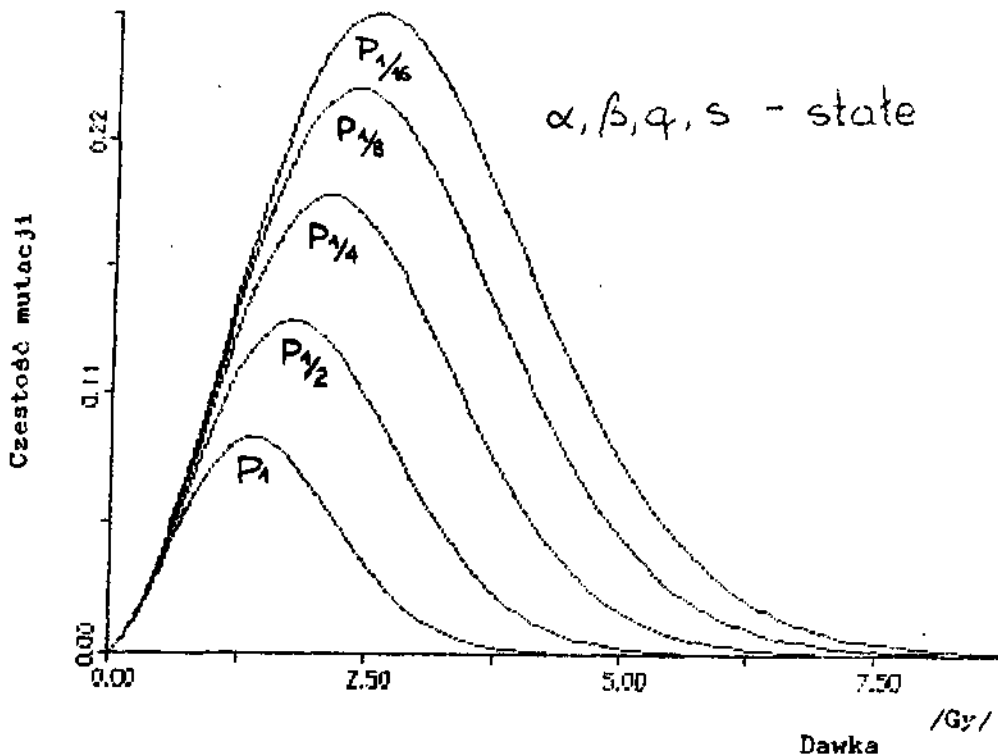
$$q\alpha = .337 \cdot 10^{-1} \text{Gy}^{-1}, q\beta = 109 \text{Gy}^{-2}, q/(p+s) = .2878(36)$$

rysunku oznaczone : $\beta_2 \div \beta_1$. są obrazem funkcji z tymi samymi współczynnikami α, p, q, s oraz malejącym parametrem β . Widać wyraźnie, że zmiana parametru β nie powoduje zmiany poziomu nasycenia mutacji. Natomiast na rysunkach 5.2.1.6. oraz 5.2.1.7. przedstawiono rodziny krzywych o tych samych co w poprzednim przypadku współczynnikach wyjściowych α, β, p, q, s , ale zmieniających się parametrach związanych z procesem naprawy pęknięć dwuniciowych DNA. W krzywych na rysunku 5.2.2.6. zmienia się współczynnik q , a pozostałe są stałe, jak widać gdy wartość q (tzn. prawdopodobieństwo, że DNA DSB prowadzi do



Rys. 5.2.1.5. Wpływ zmiany parametrów w równaniu 5.2.1.2

Rys. 5.2.1.6. (β - Rys. 5.2.1.5, q - Rys. 5.2.1.6.) na kształt krzywej dawka-efekt dla T-4430.



Rys. 5.2.1.7. Wpływ zmiany parametru p w równaniu 5.2.1.2 na kształt krzywej dawka-efekt dla T-4430.

specyficznej mutacji) rośnie, wtedy wartość szczytu mutacji wyraźnie się podwyższa. Natomiast na rysunku 5.2.2.7. zmienia się współczynnik p (tzn. prawdopodobieństwo, że DNA DSB prowadzi do śmierci komórki) wartość jego rośnie od $p_{1/16}$ do p_1 i to powoduje wyraźne przesunięcie wysokości pików w dół.

Przedstawiona analiza pomaga przewidzieć jakich zmian w przebiegu krzywej dawka-efekt można się spodziewać przy zmianie warunków eksperymentalnych, którym mogą towarzyszyć zmiany parametrów: p, q, s , również odwrotnie, jeśli zmieni się przebieg krzywej dawka-efekt, to w oparciu o taką analizę można sugerować jaki proces spowodował obserwowane zmiany. Jeżeli zatem znamy

obraz funkcji oraz biologiczna i fizyczna interpretacja współczynników w równaniu opisującym te funkcje, to właściwa interpretacja kształtu krzywych dawka-efekt może ułatwić i pogłębić zrozumienie obserwowanego zjawiska oraz stanowić podstawę dla eksperymentalnej weryfikacji hipotez odnośnie obserwowanych procesów.

W praktyce w przypadku *Tradescantia* oznacza to, że każde zaburzenie procesów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, jak również przesunięcie równowagi pomiędzy mutagenicznym i niemutagenicznym szlakiem naprawy z jednej strony, a z drugiej strony zmiana stopnia toksyczności mutagenu chemicznego (spowodowana np degradacją lub hydrolizą) musi wpłynąć na kształt krzywej efekt-dawka obserwowanej dla mutacji, a także na poziom nasycenia mutacji.

Ważny aspektem tego podejścia jest fakt, że może być ono wykorzystane również w odniesieniu do mutagenów chemicznych, gdyż podobny model, lecz uwzględniający właściwości różnych związków chemicznych i opisujący działanie cytotoksycznych związków chemicznych różnych klas, został zaproponowany również przez Chadwick'a i Leenhouts'a dla mutagenów chemicznych(86).

Należy tutaj podkreślić, że Chadwick oraz Leenhouts (38) w interpretacji rezultatów uzyskanych w badaniach efektów promieniowania jonizującego z zastosowaniem klonu *Tradescantia* 02, zdaniem autorki, niesłusznie założyli model mutacji z supresją bez uwzględnienia przeżywalności. Założenie takie nie zmienia żadnych wynikających z ich rozważań wniosków dla radiobiologii. Niemniej jednak metoda ta zakłada obserwacje mutacji we wszystkich włoskach pręcików, a zatem również w tych skróconych czyli letalnych, a to implikuje fakt, że *Tradescantia*

jest w istocie układem w którym obserwujemy mutacje z supresją i to w populacji traktowanej, a nie przeżywającej. Jest to bardzo istotna różnica w przypadku wszelkich badań w których przeżywalność jest modyfikowana przez warunki eksperymentu lub środowiska np. w badaniach z mutagenami chemicznymi. Wpływ zmiany przeżywalności na kształt krzywej dawka-efekt jak pokazano na rysunku 5.2.1.7. jest bardzo silny i powinien być uwzględniany przez wszystkich użytkowników tego modelu.

Reasumując częstość mutacji indukowanych u *Tradescantia* opisana jest równaniem 5.2.1.2., zaburzenie procesów biofizycznych prowadzi do zmiany odpowiednich współczynników w równaniu. Znajomość funkcji opisującej efekt oraz analiza krzywej dawka-efekt prowadząca do stwierdzenia, które współczynniki uległy zmianie i za jakie procesy są odpowiedzialne, powinna być pomocna wszystkim użytkownikom tego modelu, nie tylko we właściwej interpretacji uzyskiwanych rezultatów ale również w głębszym zrozumieniu procesów które się za nimi kryją.

5.2.2. Porównanie wrażliwości różnych klonów na promieniowanie.

Zastosowanie trzech różnych klonów *Tradescantia* do badań zależności efektu biologicznego od wielkości dawki pozwala na porównanie wrażliwości badanych klonów na promieniowanie.

Z przeprowadzonego porównania wynika, że klonem najbardziej wrażliwym jest klon *Tradescantia* 02. Jest to zgodne z danymi literaturowymi odnośnie wyjątkowej przydatności tego klonu w badaniach radiobiologicznych. Klon T-KU 9 ma wrażliwość zbliżoną do klonu T-02, pod względem częstości indukowania mutacji różowych, natomiast indukowanie komórek bezbarwnych przez

promieniowanie jest efektywniejsze w przypadku klonu T-02. Klon T-4430 wykazuje w naszych badaniach najniższą wrażliwość na promieniowanie w porównaniu z pozostałymi klonami. Maksymalne wartości uzyskiwane dla mutacji różowych dla dawek w zakresie nasycenia są niższe niż podawane przez autorów amerykańskich (15 mutacji/100 włosków) (134). W pracach amerykańskich dawka nasycenia dla klonu T-4430 jest bliższa 1.5 Gy, podczas gdy w naszych pracach nasycenie osiąga się już przy dawce 1.0 Gy. Wydaje się, że rozbieżności te mogą być spowodowane następującymi przyczynami:

- po pierwsze drobnymi różnicami w uprawie plantacji podstawowej. W przypadku klonu T-4430 który jest bardzo wrażliwy na czynniki chemiczne może to decydująco wpływać na stan biofizyczny i biochemiczny komórki, czyli na parametry q , p i s , które decydują o poziomie mutacji w rejonie nasycenia

- po drugie zmianą w metodyce traktowania roślin, wprowadzoną po wykazaniu występowania różnic w promieniowrażliwości roślin napromieniowywanych w różnych odstępach czasu od momentu przycięcia kwiatostanu (25). Efekt ten nie był uwzględniany w żadnych pracach amerykańskich. Jeżeli uwzględnimy takie wyjaśnienia, różnica we wrażliwości kwiatostanów T-4430, traktowanych w prezentowanych badaniach 24 - 48 godzin po przycięciu kwiatostanów wydaje się być niewielka.

5.2.3. Wpływ wybranych czynników na efekt promieniowania.

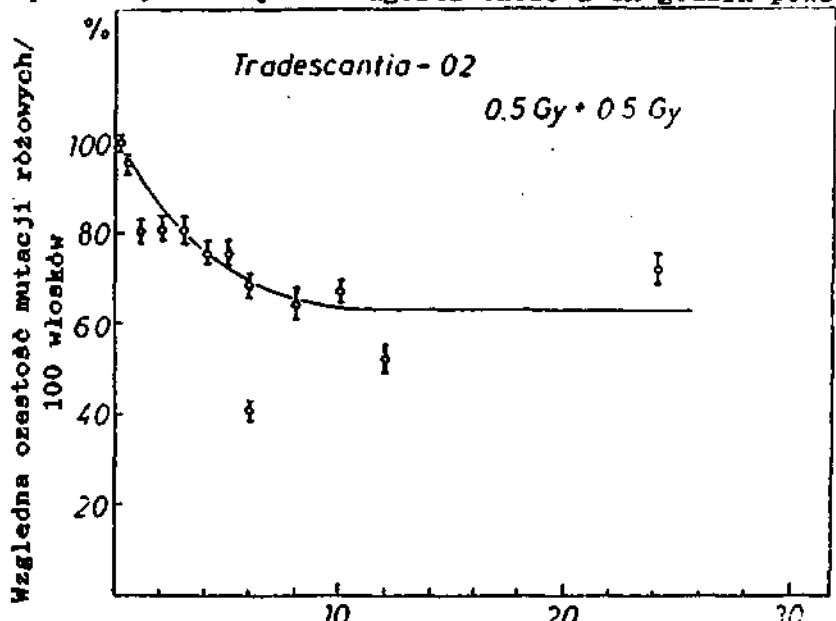
Z przebiegu zależności dawka-efekt wynika, że końcowy efekt biologiczny promieniowania zależy nie tylko od jego właściwości, lecz także od szeregu parametrów fizycznych i chemicznych układu napromieniowywanego. Dużą rolę odgrywają przy tym te czynniki,

które wpływają na procesy naprawy uszkodzeń i subuszkodzeń DNA.

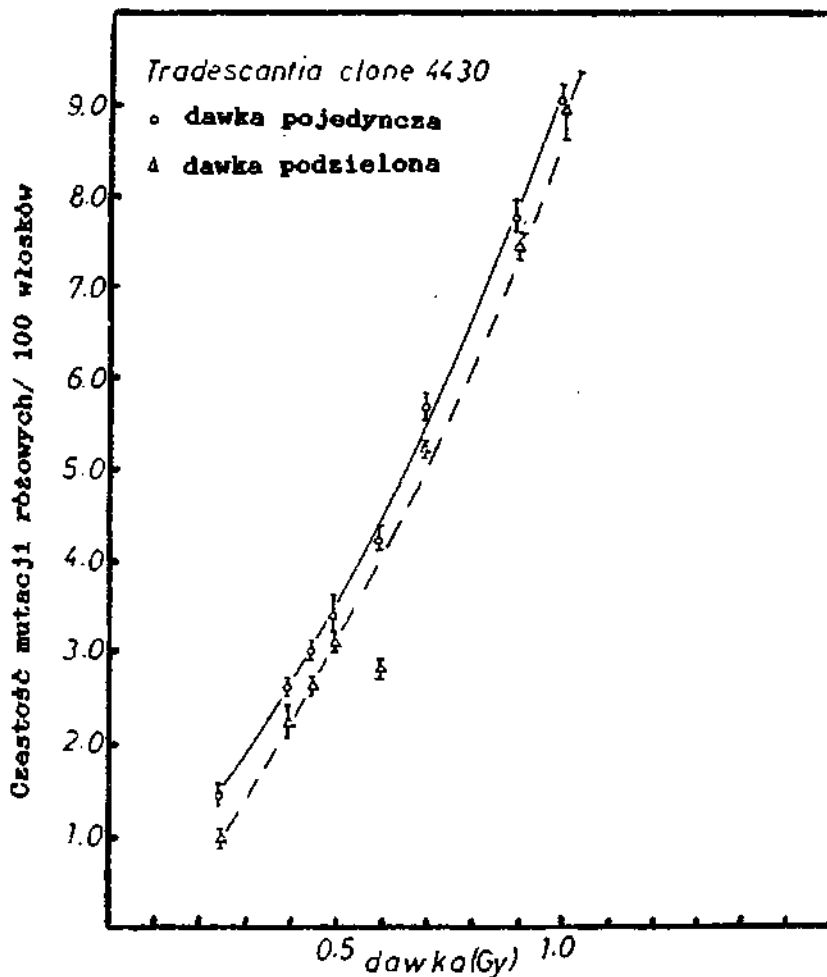
a) Frakcjonowanie:

Jak wynika z analizy funkcji opisującej zależność częstości mutacji od dawki, wartość współczynnika determinowana jest intensywnością procesów naprawy pęknięć pojedynczej nici DNA, natomiast do czynników fizycznych ewidentnie związanych z tym procesem należy zaliczyć odstęp czasu między dawkami dzielonymi.

Na rysunku 5.2.3.1 przedstawiono zależność częstości mutacji u *Tradescantia - 02* od czasu trwania przerwy pomiędzy frakcjami dawki, przy napromienianiu dawką dzieloną. Na osi y przedstawiono względną częstość mutacji jako procent częstości mutacji uzyskanej dla dawki niedzielonej. Wydłużenie czasu pomiędzy dwoma frakcjami wyraźnie obniża efektywność indukowania mutacji. Przerwa pomiędzy frakcjami długości około 2-ch godzin powoduje



Rys. 5.2.3.1. Wpływ czasu między dawkami dzielonymi na wielkość efektu wywołanego dawką całkowitą. Efekt dawki dzielonej przedstawiono w procencie dawki pojedynczej (1Gy)(22).



Rys 5.2.3.2. Zależność częstości mutacji różowych od pojedynczej i dzielonej dawki. Przerwa między dawkami dzielonymi 1 godz. (29,34).

obniżenie częstości mutacji o 20%, natomiast 6-ciu godzin o około 35%. Efekt frakcjonowania przestaje się w zasadzie zmieniać dla przerw między frakcjami, dłuższych niż 8 godzin.

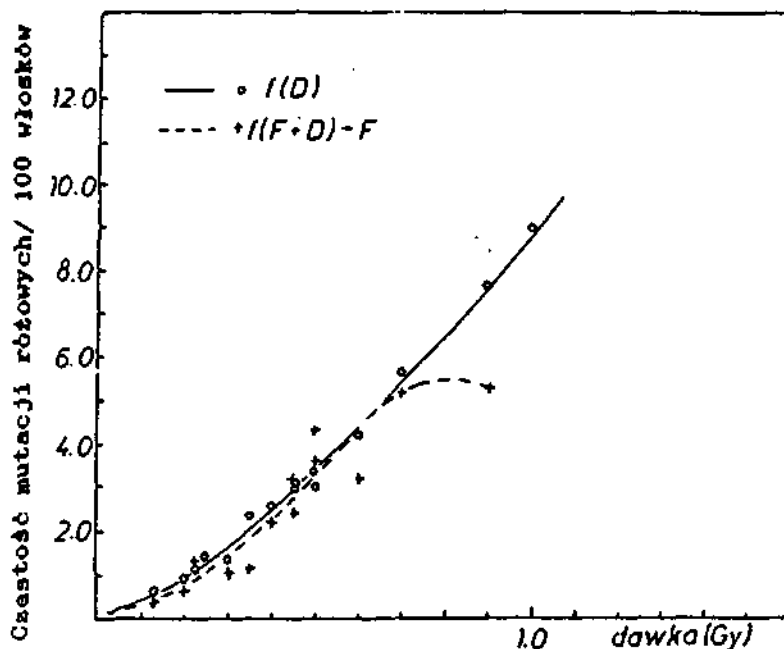
Wpływ podzielenia dawki na wielkość efektu sprawdzono również dla *Tradescantia-4430*. Na rysunku 5.2.3.2 przedstawiono zależności częstości mutacji różowych u T-4430 od dawki

promieniowania gamma. Górna krzywa przedstawia rezultaty uzyskane w eksperymentach w których rośliny napromieniowywano dawką pojedynczą natomiast dolna krzywa jest dla roślin napromienionych dawką podzieloną na dwie równe frakcje. Przerwa pomiędzy dawkami wynosiła 1 godz. Obniżenie częstości mutacji spowodowane procesami naprawy przebiegającymi w trakcie napromieniowywania roślin, dawka podzielona jest zgodne z przewidywaniami opartymi na danych zależności efektu frakcjonowania od czasu pomiędzy dawkami przedstawionych na rys. 5.2.3.1. Krzywe dla dawki pojedynczej i podzielonej przebiegają prawie równoległe i nie wykazują tendencji do zmiany wysokości poziomu nasycenia. Jak przedstawiono powyżej właśnie taki wpływ, na krzywa dawka efekt, powinna mieć zmiana fizycznych parametrów przekazu energii, w tym również parametru β .

b) Traktowanie wstępne fluorkiem :

Czynnikami wpływającymi na proces naprawy podwójnych pęknięć spirali DNA, a zatem na wielkość współczynników p oraz q w równaniu na częstość mutacji, mogą być związki chemiczne hamujące względnie zaburzające działalność enzymów naprawy, może też być zmiana warunków zewnętrznych, np temperatury, wpływających na stan komórki po wywołaniu określonego uszkodzenia.

Fluor jest często obecny w naszym środowisku a przy tym uważa się, że jest to potencjalny inhibitor procesów naprawy DNA. Wydawało się interesujące zbadanie w jakim stopniu wpływa on na zależność dawka efekt u *Tradescantia*, zwłaszcza zaś w warunkach zastosowania dawki podzielonej co również wpływa na przebieg procesów naprawy DNA. Wcześniej podano przykłady w których zastosowanie dawki podzielonej powoduje zmniejszenie efektu

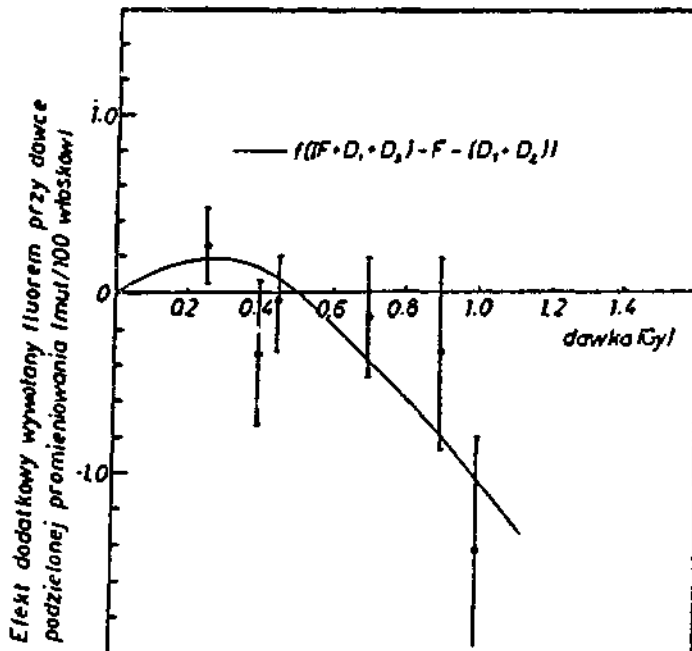


Rys.5.2.3.3. Zależność od dawki, częstości mutacji indukowanych u roślin nie traktowanych i traktowanych fluorkiem przed napromieniowaniem (29,34).

końcowego spowodowane intensywniejszym przebiegiem procesów naprawy pęknięć pojedynczych nici DNA.

Z porównania krzywych dawka-efekt (Rys.5.2.3.3.) dla dawki pojedynczej u roślin traktowanych i nie traktowanych fluorkiem wynika, że nasycenie krzywej, charakterystyczne dla mutacji z supresją, występuje dla mutacji różowych u roślin traktowanych fluorkiem już przy liczbie 5.5 mutacji/100 włosków i dawce 0.7 Gy. Jest to wyraźne obniżenie szczytu mutacji. Takie zjawisko sugeruje zaburzenie procesów naprawy dwuniciowych pęknięć spirali DNA.

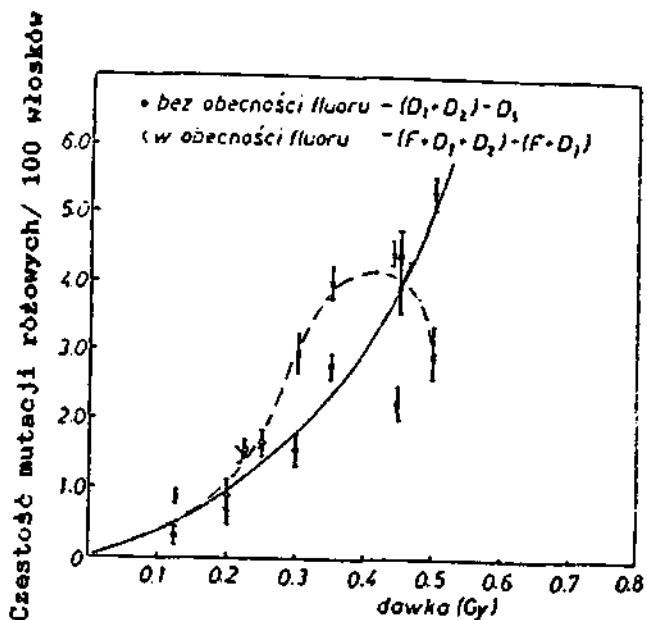
W wykonanym cyklu eksperymentów rośliny napromieniano stosując dawke jednorazowa oraz dawke podzielona z przedziałem



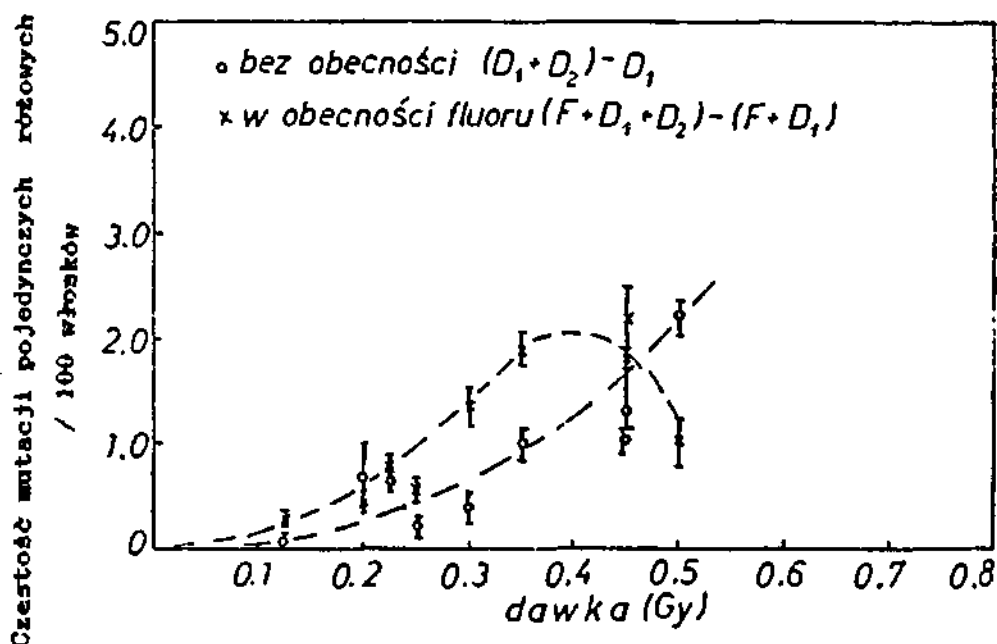
Rys. 5.2.3.4. Zmiana w funkcji dawki, efektu dodatkowego obserwowanego dla mutacji różowych i wywołanego wstępnym traktowaniem fluorkiem roślin przed napromienianiem (29,34).

czasem ok. 1 godziny. Rysunek 5.2.3.4 przedstawia efekt emergentny uzyskany dla częstości mutacji różowych w funkcji dawki całkowitej w doświadczeniach z dawka podzielona. Dla wyższych dawek przyjmuje on wartości ujemne, co mogłoby sugerować, że fluorek działa ochronnie. Na rysunku 5.2.3.5. przedstawiono efektywność jednej z dawek w eksperymentach z dawka podzielona w obecności i nieobecności fluorku. Wyniki te jeszcze wyraźniej wykazują zmianę szczytu częstości mutacji.

Zgodnie z prezentowaną wcześniej teorią Chadwick'a - Leenhouts'a (38) zmiana w procesie naprawy dwuniciowych pęknięć DNA, po napromienianiu, może wpłynąć na prawdopodobieństwo, że powstałe pęknięcie obydwu nici DNA doprowadza do mutacji specyficznej. Mutacje mogą być wynikiem zarówno wywołania



Rys. 5.2.3.5. Obliczona dla jednej z dawek, zależność dawka-efekt u roślin wstępnie traktowanych i nie traktowanych fluorkiem przed napromieniowaniem(29).



Rys. 5.2.3.6. Obliczona dla jednej z dawek, zależność dawka-efekt u roślin wstępnie traktowanych i nie traktowanych fluorkiem przed napromieniowaniem(29).

zaburzeń w DNA jak i wynikiem ich naprawy, proces naprawy DNA również może przebiegać szlakiem mutagenicznym lub nie. Są to więc oczywiście procesy bardzo skomplikowane i bardzo trudno przewidzieć ich kierunek. Można przypuszczać, że np. częstość mutacji pojawiających się w wyniku konwersji genu powinna rosnąć proporcjonalnie do efektywności procesu naprawy, natomiast częstość pojawiania się delecji powinna maleć w miarę rosnącej liczby naprawionych pęknięć dwuniciowych DNA. Dopóki jednak naprawa pęknięć dwuniciowych pozostaje niezmieniona, szczyt częstości mutacji powinien być taki sam, niezależnie od rodzaju promieniowania, mocy dawki i użytych substancji mogących zmienić wrażliwość komórek na promieniowanie.

Należy tutaj wykluczyć prawdopodobieństwo zaburzenia cyklu komórkowego na skutek działania czynnika chemicznego, gdyż nie stwierdzono żadnej istotnej zmiany w proporcji komórek różowych do pojedynczych różowych. Zahamowanie względnie przesunięcie faz cyklu musiałoby się odzwierciedlić w zaburzeniu tej proporcji zgodnie z przedstawionymi poprzednio założeniami. Wyniki dla mutacji pojedynczych różowych prezentowane na rysunku 5.2.3.6. pokazującym skutek drugiej dawki w doświadczeniach z dawką podzieloną w obecności i bez fluorku, wykazują jeszcze wyraźniej zmianę szczytu częstości mutacji.

Wydaje się więc, że traktowanie fluorkiem roślin *Tradescantia* przed napromieniowaniem sprawia, że jest on obecny i po napromieniowaniu, powodując zmianę procesów naprawy pęknięć obydwu nici DNA. Konsekwencją takiego stwierdzenia jest fakt, że zamiast efektu ochronnego, którego można się spodziewać z pobieżnie i fałszywie wyciągniętego wniosku, należy spodziewać się zmiany 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 naprawy(29).

W kontekście uzyskanych wyników byłoby niezmiernie interesujące zbadanie w podobnych warunkach między innymi spektrum mutacji oraz prześledzenie badanych efektów w kontrolowanych warunkach doświadczalnych z punktu widzenia stężenia jonów Mg. Zbadanie szczegółowe początkowej fazy krzywej zależności emergentnego efektu od dawki i wyjaśnienie czy w zakresie dawek do 0.4Gy nie występuje rzeczywiście przyrost mutacji, może również dać wyniki interesujące dla ochrony środowiska.

c) Modyfikacja podłoża domieszkami dolomitu:

Wyniki badań nad wpływem fluorku zasugerowały celowość sprawdzenia w jaki sposób zawartość magnezu, zmieniana przez wprowadzenie domieszki dolomitu do gleby, wpływa na wielkość efektu biologicznego wywołanego działaniem promieniowania jonizującego(35).

Magnez jest zaliczany do podstawowych składników pokarmowych świata roślinnego (39,117). Występuje on w chlorofilu i fakt ten w sposób naturalny podkreśla jego rolę dla roślin zielonych. Jedną z najważniejszych funkcji fizjologicznych magnezu jest jego katalityczny wpływ na wiele układów enzymatycznych. Być może te właśnie funkcje magnezu mogą mieć znaczenie w przypadku wrażliwości roślin na promieniowanie.

Pomiary zawartości magnezu w kwiatach *Tradescantia* wykonane

metoda absorpcji atomowej wykazały, że różne zawartości domieszek dolomitowych do gleby nie mają wpływu na zawartość jonu Mg w płatkach i precikach rośliny (35).

Natomiast rośliny rosnące na glebach z różnymi domieszkami dolomitów cechowała odmienna ilość kwiatostanów wyrastających z jednej doniczki (Tab.5.2.3.1). Z obserwacji intensywności kwitnienia wynika, że dogłębowe zastosowanie domieszek dolomitowych wywiera wyraźny wpływ na plonowanie roślin. Po 4-tygodniowym okresie od zastosowania podłoża z domieszkami dolomitowymi występuje nieznaczna różnica w stosunku do kontroli na korzyść grup D-1 i D-2 oraz znacznie wyraźniejsza w przypadku grupy D-3. W przypadku grupy D-3 plonowanie wyraźnie wyższe niż w grupie kontroli utrzymuje się również po upływie 10-ciu tygodni.

Związana zapewne przyczynowo z różnym plonowaniem różna "kondycja" roślin hodowanych na różnych podłożach odzwierciedla się również w reakcji roślin na promieniowanie jonizujące. Badania przeprowadzone w 4 i 6 tygodniu pozwoliły na stwierdzenie statystycznie istotnej różnicy we wrażliwości na promieniowanie roślin z grupy D-2 i D-3 w stosunku do wrażliwości roślin grupy kontrolnej (Tabele 5.2.3.2 i 5.2.3.3). Najwyraźniejsze różnice wystąpiły w przypadku roślin prowadzonych na podłożu D3, co prawdopodobnie spowodowane jest różnicą w rozpuszczalności zastosowanej w tym podłożu domieszki dolomitowej.

Po upływie 10 tygodni hodowli zbadano zależność dawka-efekt u roślin prowadzonych na standardowym podłożu i na podłożu z domieszką dolomitu D-2 (wybrany do badań ze względu na stosowanie go również w rolnictwie). Zależności te zbadano dla dawki pojedynczej oraz podzielonej jak w przypadku badań z

Tabela.5.2.3.1.

Intensywność pojawiania się kwiatostanów na różnych podłożach.

bad. grupy czas /dni/	kontrola		D-1		D-2		D-3 x	
	a	%	a	%	a	%	a	%
32	0,35	100	0,36	102	0,40	111	0,46	133
54	0,60	100	0,30	50	0,50	120	1,33	221
72	0,96	100	0,40	41	0,66	68	1,55	161

a - średnia ilość kwiatostanów przypadających na jedną doniczkę.

x - podłoże wprowadzone z dwutygodniowym opóźnieniem.

Tabela 5.2.3.2.

Częstość różowych mutacji po napromieniowaniu roślin po 4-ech tygodniach hodowli w podłożu z domieszka dolomitowa.

Nr. Grupa	Dawka (Gy)	częstość mutacji/100 włosków				Grupy porównywane	
		x + SE	x _w + SE				
1 kontrola	-	0.22	0.05	0.25	0.07		
2 kontrola	0.3	2.87	0.39	2.70	0.38	2 - 3	0.50
3 D-1	0.3	3.18	0.28	2.65	0.31	3 - 4	0.02
4 D-2	0.3	2.38	0.15	2.15	0.17	2 - 4	0.01
5 D-3	0.3	1.78	0.20	1.69	0.20	2 - 5	0.001

- poziom istotności różnic (test Studenta)

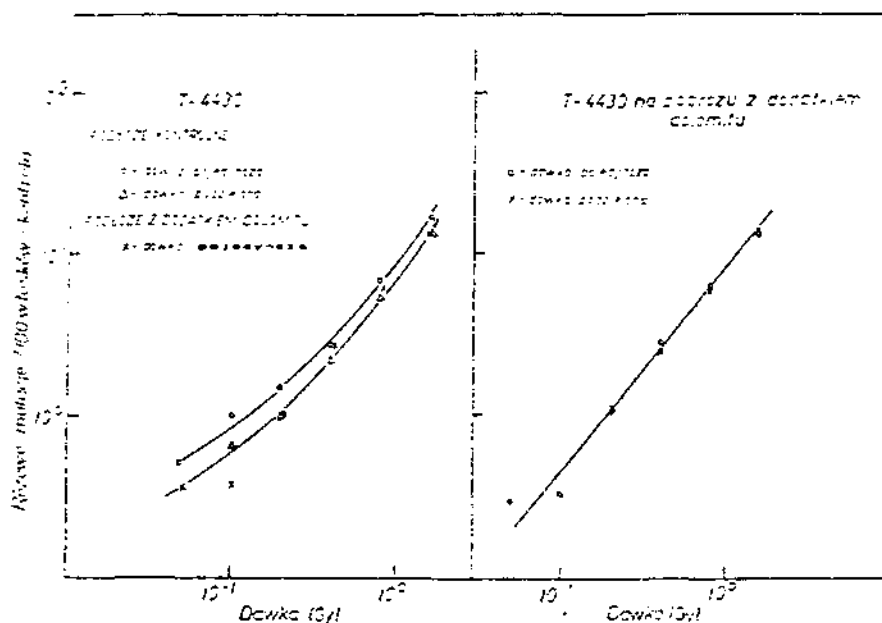
x_w - średnia ważona

Tabela 5.2.3.3.

Częstość różowych mutacji po napromieniowaniu roślin po 6-ciu tygodniach hodowli na podłożu z domieszka dolomitowa.

Nr. Grupa	Dawka (Gy)	częstość mutacji/100 włosków				Grupy porównywane	
		x + SE	x _w + SE				
1 kontrola	-	0.38	0.09	0.29	0.09		
2 kontrola	0.5	3.50	0.33	3.33	0.34	2 - 3	0.50
3 D-1	0.5	3.44	0.38	3.61	0.41	3 - 4	0.05
4 D-2	0.5	3.27	0.30	2.58	0.28	2 - 4	0.05
5 D-3	0.5	3.24	0.24	2.68	0.26	2 - 5	0.05
6 D-3	0.3	1.83	0.23	1.57	0.23		

symbole jak w Tabeli 5.2.3.2.



Rys. 5.2.3.7. Krzywe dawka-efekt dla dawki dzielonej i nie dzielonej uzyskane dla roślin rosnących na różnych podłożach (z domieszką dołomitową i bez) fluorkiem sodu. Rysunki 5.2.3.7 a i b przedstawiają rezultaty uzyskane dla mutacji różowych dla dawki pojedynczej i podzielonej dla obydwu grup roślin. W przypadku roślin rosnących na podłożu standardowym krzywe dawka-efekt dla dawki pojedynczej i podzielonej różnią się zgodnie z przewidywaniami odnośnie efektu frakcjonowania. Natomiast rośliny rosnące na podłożu z dodatkiem dołomitu nie wykazują prawie żadnej różnicy pomiędzy tymi krzywymi. Taki rezultat jest w pierwszej chwili zaskakujący, gdyż trudno sobie wyobrazić brak efektu frakcjonowania dawki dla promieniowania X. Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że krzywa

dawka-efekt dla dawki pojedynczej uzyskana dla roślin rosnących na podłożu z domieszką dolomitowa jest wyraźnie obniżona w stosunku do krzywej normalnej. Zaznaczono to na rysunku 5.2.3.7a, gdzie jak widać wyniki dla dawki nie dzielonej uzyskane dla roślin rosnących na podłożu z domieszką, pokrywają się z krzywą dla dawki podzielonej u roślin kontrolnych. Oznacza to, że wprowadzenie domieszki dolomitowej do hodowli dało taki sam skutek jak podzielenie dawki. Ponieważ kształt krzywej ani wysokość szczytu nie uległy zmianie, wskazuje to na zmianę współczynnika k w równaniu opisującym zależność częstości mutacji od dawki (Równanie 5.2.1.2). Na podstawie tych wyników można więc sugerować, że wprowadzenie domieszki dolomitowej do podłoża spowodowało podwyższenie efektywności procesów naprawy subuszkodzeń DNA indukowanych przez promieniowanie jonizujące.

5.2.4. Wnioski.

Przedstawione wyniki dotyczące wrażliwości różnych klonów *Tradescantia* na promieniowanie jonizujące oraz czynniki modyfikujące efekt promieniowania pozwalają na wyciągnięcie następujących wniosków:

- różne klony *Tradescantia* wykazują zróżnicowaną aczkolwiek porównywalną wrażliwość na promieniowanie jonizujące i wszystkie charakteryzują się liniowo kwadratową zależnością efektu od dawki,
- zależność częstości mutacji od dawki promieniowania jest dobrze opisana równaniem przedstawiającym zależność częstości mutacji od dawki, w układach, w których badane są mutacje z supresją, oraz w których badana zależność modyfikowana jest przez przeżywalność komórek,

- znajomość modelu opisującego zależność efektu od dawki pozwala na głębszą i bardziej jednoznaczna analizie wpływu czynników modyfikujących efekt promieniowania,
- modyfikacja efektu promieniowania, spowodowana wstępnym traktowaniem roślin fluorkiem sodu, jest podobna, w zmianie kształtu krzywej dawka-efekt, do wywoływanej zmianą efektywności procesów naprawy pęknięć dwuniciowych DNA w modelu teoretycznym.
- wzbogacenie podłoża hodowlanego jonami Mg przez wprowadzenie domieszki dolomitowych wpływa na promieniowrażliwość *Tradescantia*. Obserwowane obniżenie częstości mutacji jest równe ilościowo efektowi frakcjonowania dawki, który można przyrównać do skutku naprawy pęknięć pojedynczej nici spirali DNA w modelu teoretycznym,
- zastosowanie dawki dzielonej promieniowania X w przypadku roślin z podłoża z domieszką dolomitową nie daje zauważalnego i spodziewanego obniżenia efektu promieniowania, co może potwierdzać sugestię, że w wyniku modyfikacji hodowli procesy naprawy uszkodzeń DNA indukowanych przez promieniowanie przebiegają znacznie efektywniej już w czasie napromieniowania. Oznacza to zmianę współczynnika β , w równaniu 5.2.1.2, opisującym zależność efektu od dawki.

Należy też podkreślić, że mutacje somatyczne barwy komórek włosków precyków u *Tradescantia* są bardzo wrażliwym wskaźnikiem umożliwiającym w stosunkowo prosto wykonywanych testach laboratoryjnych ustalenie mutagennych właściwości czynników fizycznych i chemicznych oddziałujących na środowisko naturalne człowieka.

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

5.3.1. Badania nad współdziałaniem EMS lub DBE z promieniowaniem jonizującym.

Stwierdzono że, zależność efektu od dawki mutagenu, w przypadku EMS oraz DBE działających niezależnie, ma charakter liniowo-kwadratowy (24,87). Wyniki uzyskane w badaniach nad skojarzonym działaniem EMS i promieniowania jonizującego, zebrano częściowo w Tabeli 5.3.1.1., oraz przedstawiono na rysunkach 5.3.1.1 - 5.3.1.3. W badaniach użyto klonu T KU9, którego kwiatostany traktowano roztworem EMS i napromieniano promieniowaniem X.

Rysunki 5.3.1.1. oraz 5.3.1.2. obrazują kształtowanie się częstości mutacji różowych i letalnych w zależności od upływu czasu po ekspozycji dla trzech różnych sposobów traktowania: 0.5% roztwór EMS przez okres 4 godzin, napromieniowanie jednorazową dawką promieniowania X - 0.4 Gy, oraz skojarzone traktowanie EMS 0.5% (4godz) + dawka 0.4 Gy.

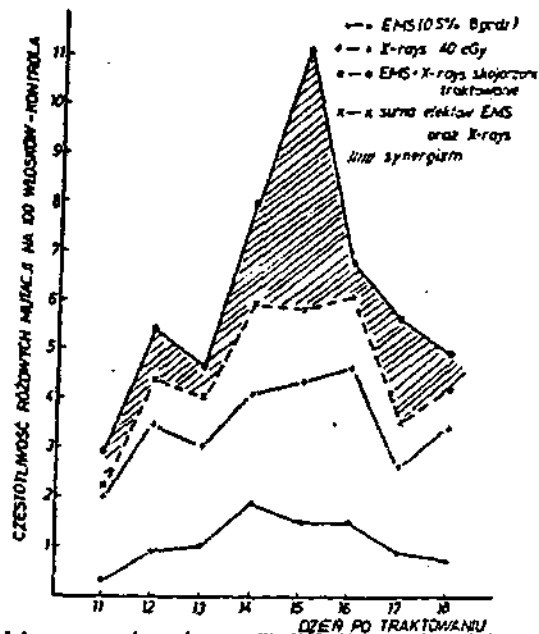
W pracach amerykańskich (133) i japońskich (73) stosowano ekspozycje gazowa, względnie zanurzenie kwiatostanów w roztworze. W niniejszej pracy zdecydowano się na traktowanie łodyg, z jednej strony, ze względu na konieczność ujednolicenia warunków ekspozycji, a z drugiej strony na możliwość dowolnego regulowania czasu traktowania. Prawdopodobnie mniej skuteczne traktowanie zastosowane u *Tradescantia* jest jedną z przyczyn różnicy w efektywności EMS uzyskanej przez Ehrenberga po traktowaniu ziarniaków jęczmienia (53). Zbadana przez niego efektywność mutagenna wynosi 40% na poziomie CL_{50} , gdy tymczasem w naszych danych efektywność mutagenna wynosi 0.93% (tzn 0.93

Tabela 5.3.1.1. Wpływ promieniowania oraz EMS na wielkość efektów biologicznych mierzonych po traktowaniu skrajnością oraz inżynierii genetycznej /202/

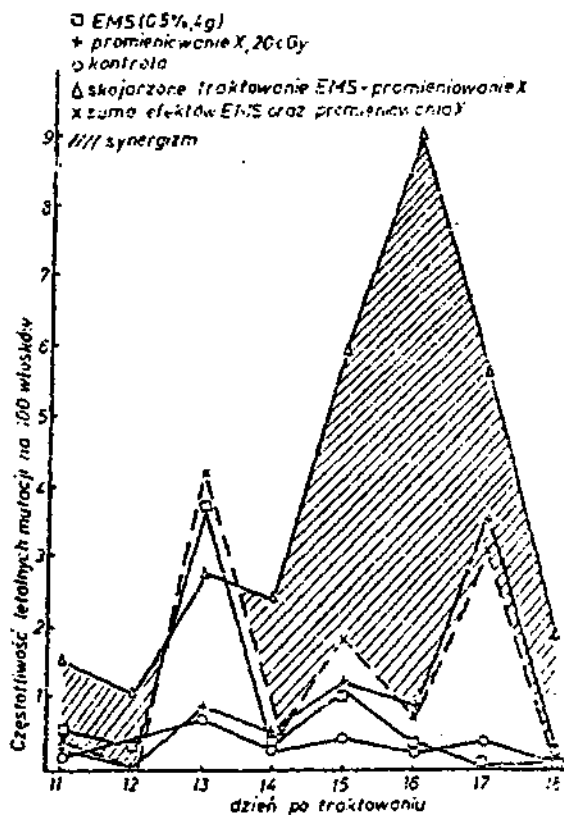
Dawka /Gy/	Traktowanie		Liczba włókien białych	Gęstość różnorodnych mutacji ± SD	Gęstość autokacji na 100 włókien		Interakcyjność autokacji	
	Stężenie /%/ 0	Czas /got./ 0			pojedynczych różnorodnych	bezbarranych		
0.2	0	0	24830	0.13±0.2	0	0.28	0.56	100
-	0.5	4	10192	1.23±0.1	0.26	0.50	0.64	114.3
0.2	0.5	4	12734	0.35±0.05	0.15	0.28	0.60	107.1
	0.5	4	8921	2.03±0.14	0.62	0.66	0.54	96.4
Synergizacja				0.68	0.21	0.16	1.45	
0.4 kontrola	0	0	10566	2.77±0.16	1.13	1.24	0.66	105.9
0.4	0.5	4	20482	0.20±0.10	0.04	0.21	0.61	100.0
-	0.5	4	8597	4.22±0.22	1.85	2.26	0.42	68.2
	0.5	4	13775	0.59±0.06	0.30	0.72	0.66	108.2
Synergizacja				1.07	0.46	0.51	1.96	
0.6 kontrola	0	0	9340	3.27±0.20	0.82	2.03	0.42	68.4
0.6	0.5	8	15686	0.15±0.20	0.01	0.11	0.62	100.0
-	0.5	8	3947	7.08±0.39	2.54	4.52	0.33	53.4
	0.5	8	9845	1.08±0.10	0.59	0.90	0.52	83.9
Synergizacja				2.88	1.14	1.70	9.58	

mut/100 włosków) na poziomie 3.91% zdarzeń letalnych. Przyjmując liniowa korelacje do oszacowania efektu na poziomie 50% przeżywalności uzyskujemy efektywność mutagenna 11.5%. Wprawdzie z uzyskanych danych wynika, że należałoby przyjąć do szacowania zależność liniowo-kwadratową(24), niemniej jednak, w zakresie dawek niskich liniowa zależność stanowi dość dobre przybliżenie i przyjęcie jej nie wprowadza zasadniczej różnicy w szacowaniu.

Porównując wrażliwość *Tradescantia* na promieniowanie oraz na EMS na poziomie indukowania różowych mutacji uzyskujemy wartości REC od $1.8 - 2.8 \cdot 10^{-2}$ M godz, w przypadku indukowania zdarzeń letalnych REC przyjmuje wartości od $3.7 - 4.7 \cdot 10^{-3}$ M godz. Wartości te są zdecydowanie wyższe od cytowanych przez Moustachiego dla konwersji genu u drożdży, dla której REC wynosi $4.2 \cdot 10^{-3}$ M godz. (106). Również wartości, które można by spróbować oszacować z danych amerykańskich wydają się być zdecydowanie niższe ($3 \cdot 10^{-3}$ M godz), ale porównanie to nie jest jednoznaczne, gdyż po pierwsze w pracach amerykańskich brak jest informacji odnośnie efektów letalnych a po drugie stosowany był w nich mutagen gazowy. 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. Wydaje się, że sposób traktowania przez lodygi wprawdzie bardzo ułatwia techniczne możliwości badań w zależności od koncentracji, ale działanie EMS-u na całą roślinę osłabia ją zwiększając w ten sposób toksyczny wpływ również na komórki włosków precyka. W konsekwencji w naszych badaniach obserwuje się bardzo wysoki poziom skróceń(prawie pięciokrotnie wyższy od częstości mutacji różowych . Analiza matematyczna



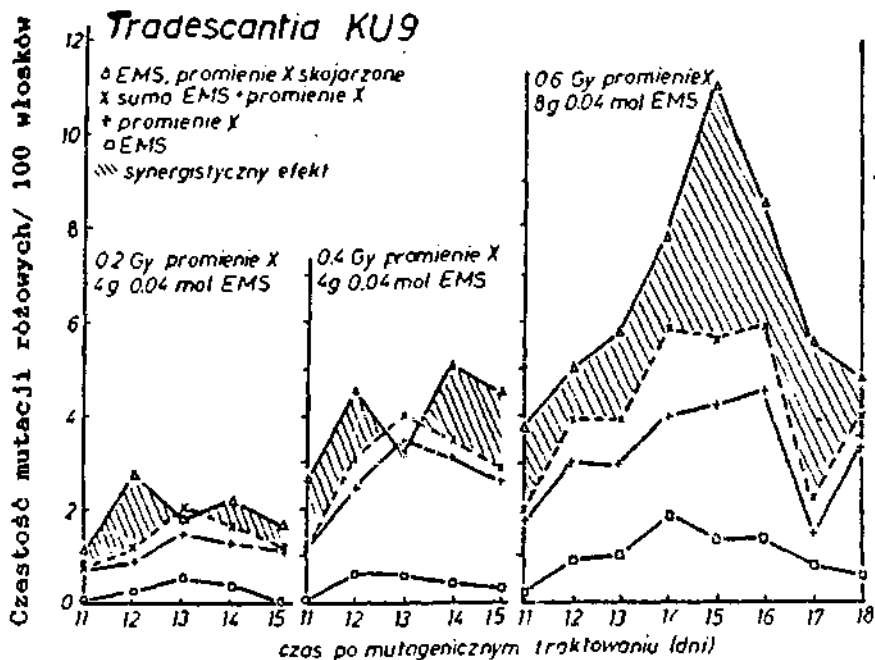
Rys. 5.3.1.1. Różowe mutacje u T KU9 po kombinacji traktowań.



Rys. 5.3.1.2. Zdarzenia letalne u T KU9 po kombinacji traktowań.

krzywych dawka-efekt w zależności od zmieniającego się współczynnika uwzględniającego wpływ zdarzeń letalnych na ekspresję mutacji (36) wykazuje, że wzrost toksyczności w sposób wyraźny modyfikuje kształt krzywej, oraz istotnie obniża poziom mutacji obserwowanych u *Tradescantia*.

Z rezultatów przedstawionych na rysunkach 5.3.1.1. oraz 5.3.1.2. wynika bardzo ważne spostrzeżenie, że EMS oraz promieniowanie X, w traktowaniu skojarzonym indukują więcej mutacji niż należałoby się spodziewać zakładając addytywny charakter współdziałania. Linia przerywana zaznaczona na rysunkach sume efektów oddziaływań niezależnych. Przestrzeń zakreskowana obrazuje zatem zakres synergistycznego współdziałania tych dwóch czynników. Dane w tabeli 5.3.1.1. przedstawiają wyniki 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 dużych różnic; wyraźniejsze obniżenie wystąpiło tylko w przypadku działania skojarzonego, co pogorszyło statystykę pomiarów. Natomiast efekt synergistyczny wyraźnie występuje w przypadku wszystkich mutacji barwy oraz zdarzeń letalnych. Wartości efektu synergistycznego sugerują zależność efektu od zastosowanej dawki i ekspozycji. Widać to wyraźnie na rysunku 5.3.1.3., na którym częstości mutacji różowych przedstawiono w zależności od rosnącej ekspozycji całkowitej, tzn. iloczynu dwaki, stężenia i czasu traktowania. Sugestia, że wartość efektu synergistycznego rośnie proporcjonalnie do całkowitej ekspozycji potwierdzają dane z rysunku 5.3.1.4. Przedstawiono na nim wartości synergizmu



Rys. 5.3.1.3. Kształtowanie się częstości mutacji różowych w czasie po traktowaniu kwiatostanów T KU9 różnymi kombinacjami dawek i ekspozycji na EMS (22,24) uzyskane dla różnych typów mutacji w funkcji iloczynu dawki promieniowania oraz stężenia i czasu traktowania mutagenem (EMS). Wartość efektu synergistycznego liczone według zależności:

$$Y = Y_{\text{skojarz}} - (Y_{\text{prom}} + Y_{\text{chem}})$$

gdzie:

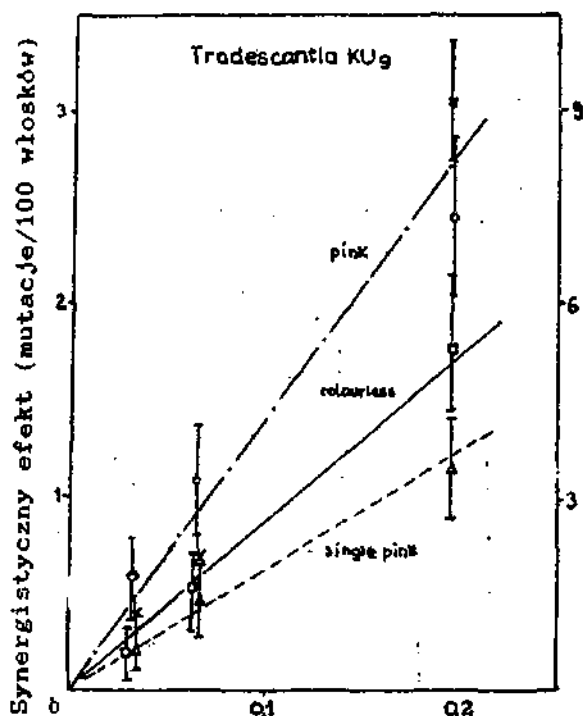
Y_{skojarz} = częstość mutacji indukowana przy skojarzonym traktowaniu mutagenem chemicznym (x moli t godz) i dawka D promieniowania X, oraz pomniejszona o wartość kontroli,

Y_{prom} = częstość mutacji indukowana przez promieniowanie o dawce D i pomniejszona o wartość kontroli,

Y_{chem} = częstość mutacji indukowana przez ekspozycje na mutagen chemiczny (x moli, t godz) i pomniejszona o wartość kontroli

Uzyskane wyniki są zgodne z zależnością:

$$N = \eta XD$$



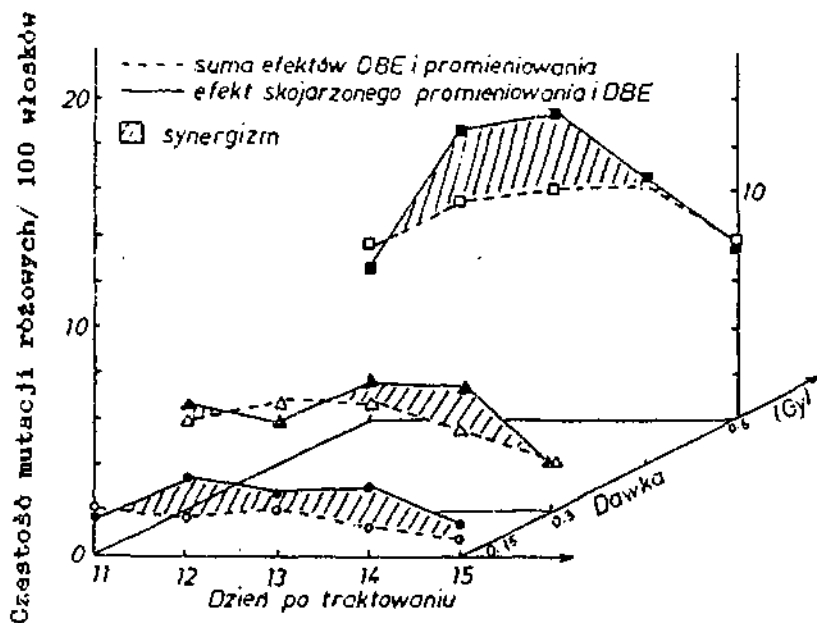
Rys. 5.3.1.4. Zależność efektu synergistycznego od ekspozycji całkowitej (24).

podana dla efektu synergistycznego wg molekularnej teorii działania promieniowania(38). Przedstawiona na rysunku 5.3.1.4. liniowa zależność najwyraźniej potwierdza przyjęta hipoteza.

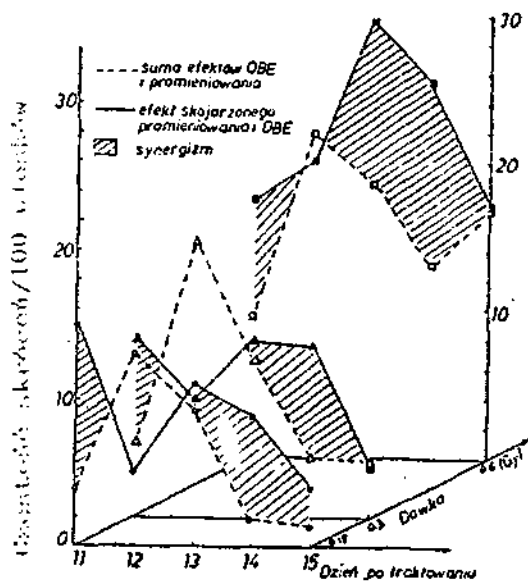
Gazowy 1,2 dibromoetan był drugim związkiem wybranym do badań nad współdziałaniem mutagenów chemicznych z promieniowaniem jonizującym. W Tabeli 5.3.1.2. podano część wyników dla różnych efektów mutagennych uzyskanych w eksperymencie z wykorzystaniem DBE i promieniowania. Na rysunku 5.3.1.5. przedstawiono wyniki uzyskane dla mutacji różowych. Przerywana linia zaznaczono sume algebraiczna efektów uzyskanych dla oddziaływań indywidualnych, natomiast linia ciągła przedstawiono wyniki uzyskane po

Tabela 5.3.1.2. Wpływ promieniowania oraz DBE na wielkość efektów biologicznych mierzonych po traktowaniu skojarzonym oraz indywidualnym /28/

Klon	Dawka /Gy/	Traktowanie chemiczne		Liczba włókóków badanych	Częstość efektów mierzonych					
		stężenie /ppm/	czas /godz/		zuteccje			synergistyczny efekt		
					różowe	poj.różowe	skrócenie	różowe	poj.różowe	skrócenie
KU-9	-	-	-	36338	0.14±0.02	0.03±0.01	1.05±0.03			
KU-9	0.15	-	-	15720	1.15±0.08	0.27±0.04	1.99±0.05			
KU-9	0.32	-	-	8467	3.40±0.20	0.99±0.11	4.56±0.10			
KU-9	0.60	-	-	8082	8.60±0.33	3.13±0.20	12.28±0.18			
KU-9	-	60	6	12714	0.70±0.09	0.70±0.04	5.84±0.10			
KU-9	0.15	60	6	13033	2.47±0.13	0.74±0.07	9.57±0.12	0.76	0.31	2.79
KU-9	0.32	60	6	9160	4.72±0.22	1.99±0.15	11.21±0.16	0.76	0.83	1.85
KU-9	0.60	60	6	7925	12.10±0.35	4.11±0.23	23.01±0.24	2.91	0.81	5.93



Rys.5.3.1.5. Kształtowanie się indukowanych u *Tradescantia*, przez trzy kombinacje traktowań, częstości mutacji różowych w zależności od dnia po traktowaniu. (



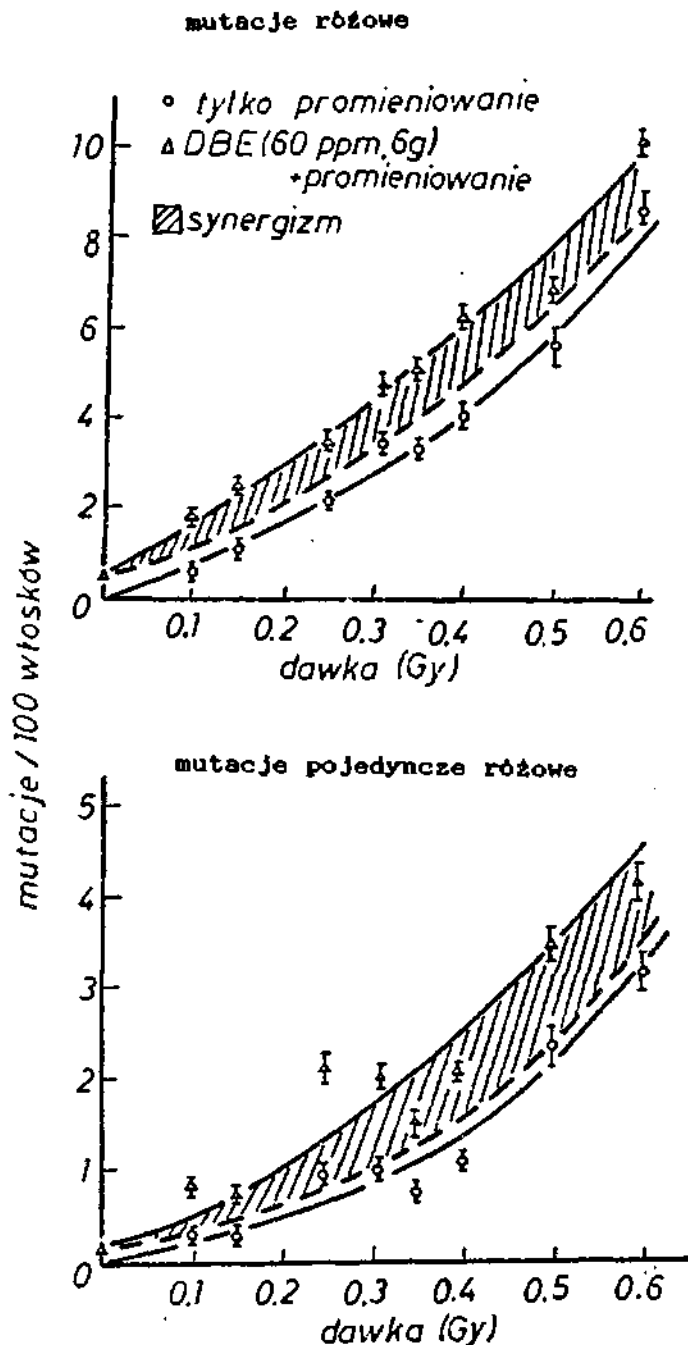
Rys.5.3.1.6. Kształtowanie się częstości skróceń u T KU9 indukowanych przez różne kombinacje traktowań. (

skojarzonym działaniu obu czynników. Powierzchnie zakreskowane obrazują więc zakres współdziałania synergistycznego, różny dla trzech różnych dawek promieniowania (oś "Z"). Rysunek 5.3.1.6. przedstawia w ten sam sposób wyniki uzyskane dla pomiarów częstości skróceń. Zarówno wartości efektów indywidualnych, jak i zakres współdziałania synergistycznego jest jeszcze wyraźniejszy niż w przypadku mutacji różowych.

Jeżeli porównamy skuteczność indukowania mutacji różowych przez DBE i promieniowanie w ich działaniach niezależnych, to w oparciu o uzyskane dane REC dla 1,2 dibromoetanu liczony z uwzględnieniem mutacji różowych wynosi 44 ppm godz. Wartość ta różni się od podawanej przez Schairera, (11 ppm godz)(117,133). Trzeba jednak uwzględnić fakt, że zarówno sposób przygotowania kwiatostanów, jak i sama ekspozycja na DBE, a także użyty klon były różne w badaniach naszych i Schairera.

Biorąc pod uwagę powyższe wartości REC, oraz wykazana możliwość współdziałania synergistycznego DBE z promieniowaniem i innymi mutagenami, wydaje się, że ustalone maksymalnie dopuszczalne stężenia DBE na poziomie = 25 ppm (43) jest za wysokie.

Zależność efektu synergistycznego od wielkości ekspozycji dla działania skojarzonego DBE oraz promieniowania jest wyraźnie widoczna na rysunku 5.3.1.7. Przedstawiono tu wyniki kolejnych kombinacji traktowań skojarzonych, w których zastosowano stałą ekspozycję na gazowy 1,2dibromoetan oraz różne dawki promieniowania (22,87). Efekt biologiczny mierzono jako średnia częstości mutacji różowych i pojedynczych różowych pojawiających się w okresie od 11 do 15 dnia po traktowaniu. Linia przerywana oznaczono sumę efektów oddziaływań indywidualnych, natomiast



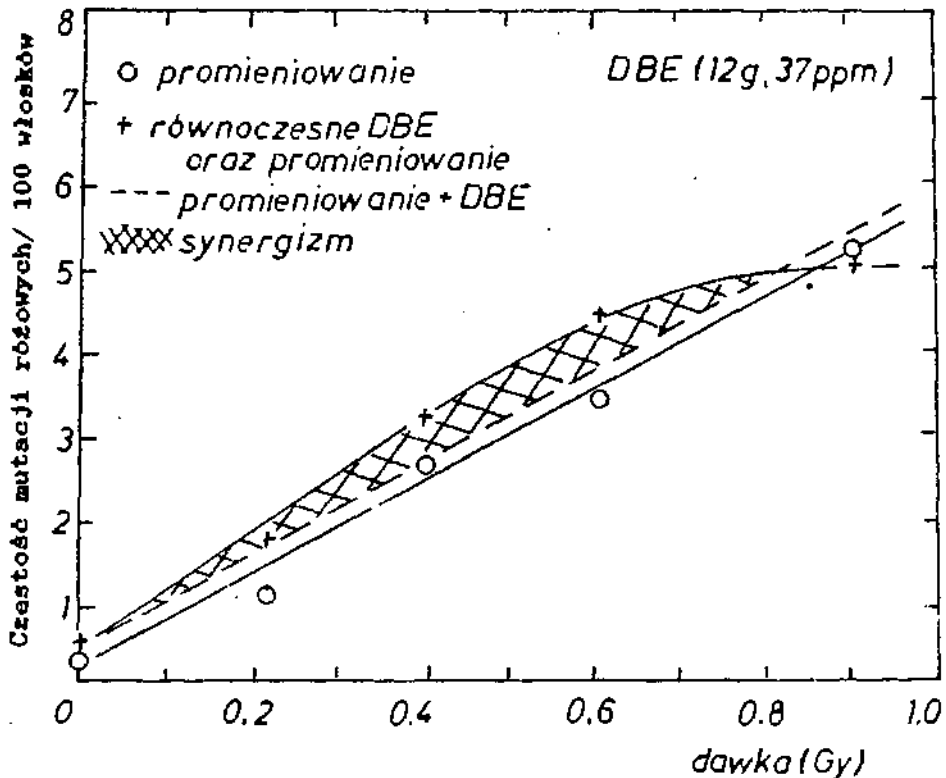
Rys. 5.3.1.7. Zależność od dawki promieniowania częstości mutacji indukowanych u *Tradescantia* KUG, przez kombinacje traktowań różnymi dawkami promieniowania i gazowym DBE(22,87)

zakreskowana przestrzeń ponownie obrazuje wielkość efektu synergistycznego, który w zakresie dawek niskich rośnie proporcjonalnie do dawki. Górna część rysunku prezentuje wyniki uzyskane dla wszystkich mutacji różowych, natomiast dolna dla mutacji pojedynczych różowych.

Znaczenie wykazanego efektu synergistycznego dla ochrony środowiska jeszcze wyraźniej podkreślają prezentowane na rysunku 5.3.1.8. wyniki eksperymentów, w których ciągła i równoczesna ekspozycja na promieniowanie i mutagen chemiczny sprawiała, że warunki doświadczalne były bardzo zbliżone do ekspozycji naturalnych. Ponownie wyraźnie jest widoczne, że w zakresie dawek niskich współdziałanie synergistyczne powoduje wzrost częstości mutacji proporcjonalny do zwiększającej się dawki.

Z przedstawionych wyników wypływa kilka istotnych wniosków. Pierwszy, to wyraźna zależność wielkości efektu synergistycznego od dawki w zakresie dawek niskich. 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.

Drugi to ten, że stosowanie jakichkolwiek metod, mających na celu ujednoczenie wartości ryzyka wynikającego z różnych zagrożeń badanych niezależnie i szacowanie całkowitego zagrożenia ma sens tylko w tym przypadku, gdy nie zachodzi zjawisko synergizmu. Jeżeli efekt synergistyczny w przypadku indukowania mutacji występuje w zakresie dawek niskich oznacza to, że konieczne są: zmiana systemu szacowania ryzyka, oraz badania nad charakterem współdziałania czynników mutagennych mogących w danym środowisku występować.

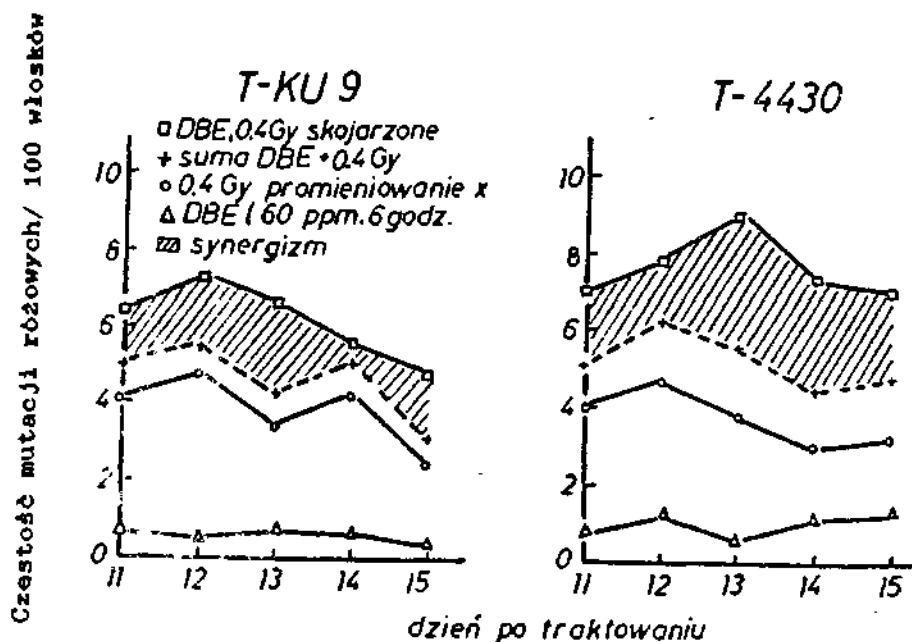


Rys. 5.3.1.8. Wpływ dawki promieniowania na częstości mutacji różowych indukowanych u *Tradescantia* KU9 przez równoczesne działanie DBE oraz promieniowania X(87)

Kolejnym, również bardzo ważnym dla ochrony środowiska wnioskiem wpływającym z przedstawionych wyników jest to, że wielkość efektu synergistycznego jest porównywalna lub większa od efektu biologicznego mutagenu chemicznego zastosowanego niezależnie.

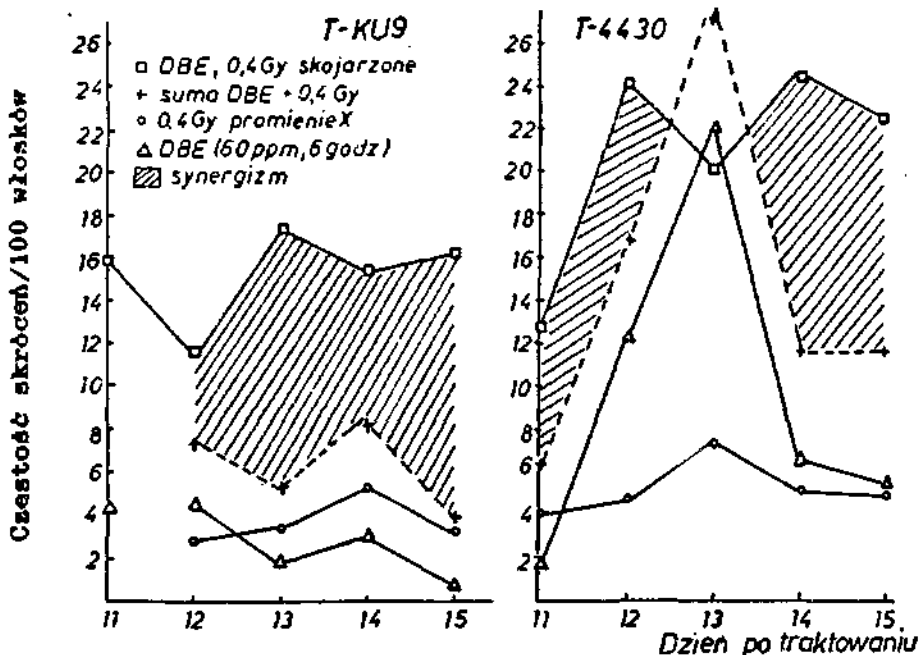
5.3.2. Porównanie wrażliwości różnych klonów na skojarzone działanie DBE oraz promieniowania

Z prac amerykańskich wynika, że T-4430 jest klonem o wyjątkowej wrażliwości na mutageny chemiczne (132,136). Dlatego postanowiono porównać wrażliwość klonu T-4430 i T-KU 9 na

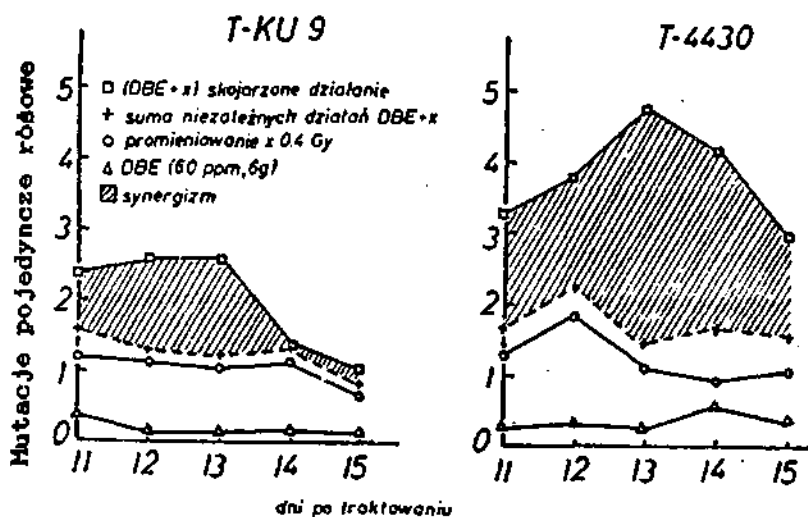


Rys. 5.3.2.1. Wpływ upływu czasu po traktowaniu na występowanie mutacji różowych u różnych klonów *Tradescantia* poddanych kombinacji traktowań(22)

działanie promieniowania i jednego z badanych mutagenów chemicznych tzn. 1,2 dibromoetanu zastosowanych w traktowaniach niezależnych i skojarzonych. Zależność częstości mutacji różowych od upływu czasu po traktowaniu kwiatostanów, przedstawiono na Rys. 5.3.2.1., mutacji pojedynczych różowych na Rys. 5.3.2.2. a zdarzeń letalnych na Rys. 5.3.2.3. Mutacje wywoływno traktując kwiatostany gazowym DBE lub dawka 0.4 Gy promieniowania X, lub dwoma tymi czynnikami łącznie. Po lewej stronie rysunków przedstawione są dane dotyczące klonu T-KU 9, natomiast po prawej stronie dotyczące klonu T-4430. Wyniki uzyskane w identycznych warunkach eksperymentalnych wykazują, że częstości mutacji w



Rys. 5.3.2.2. Wpływ upływu czasu po traktowaniu na występowanie mutacji pojedynczych różowych u różnych klonów *Tradescantia* poddanych kombinacji traktowań(



Rys. 5.3.2.3. Wpływ upływu czasu po traktowaniu na występowanie mutacji letalnych u różnych klonów *Tradescantia* poddanych kombinacji traktowań(

Tabela 5.3.2.1. Wpływ promieniowania oraz DPA na wielkość efektów biologicznych
wierzonych po traktowaniu skojarkami, oraz indywidualnym /24/

Klon	Dawka /Gy/	Traktowanie chemiczne		Liczba włosków badanych	Częstość efektów wierzonych		
		stężenie /ppm/	czas /godz/		mutacje		
					różowe	pojed.różowe	skrócenia
KU-9	-	-	-	31017	0.17±0.02	0.03±0.01	0.78±0.02
KU-9	0.4	-	-	10323	4.00±0.19	1.06±0.09	4.48±0.09
KU-9	-	60	6	26334	0.73±0.05	0.20±0.03	3.70±0.03
KU-9	0.4	60	6	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	-	-	6450	4.00±0.25	1.37±0.15	6.25±0.14
T-4430	0.4	60	6	6286	7.90±0.35	3.92±0.25	21.67±0.26
T-4430	-	60	6	5388	1.30±0.15	0.46±0.09	10.46±0.17

przypadku klonu T-4430 są nieco wyższe niż w przypadku klonu T-KU9 (Tabl. 5.3.2.1.). Różnice te jednak nie są aż tak duże jak można by było spodziewać z danych opublikowanych przez Brookhaven National Laboratory, gdzie stwierdzono, że klon T-4430 jest aż 9 razy bardziej wrażliwy na mutageny chemiczne niż klon T-02. Wyniki te uzyskano jednak mierząc częstość mutacji wywołanych mutagenami chemicznymi w okresie pomiędzy 6-ym a 11-ym dniem. Mechanizm występowania maksimum mutacji w niektórych przypadkach w okresie pomiędzy 6-ym a 11-ym dniem po traktowaniu chemicznym nie jest wyjaśniony. Wydaje się, że zwłaszcza w przypadku klonu T-4430, którego ekspresja barwy jest bardzo wrażliwa na wszelkie czynniki zewnętrzne, należy bardzo przestrzegać właściwego terminu pomiaru częstości mutacji, ponieważ w tym okresie obserwuje się włoski, w których różowa barwa komórki świadczy istotnie o mutacji, albowiem komórki traktowane przeszły od traktowania co najmniej 5-6 podziałów.

Klon T-4430 wykazał 3.3 razy większą wrażliwość na DBE od klonu T KU 9 w przypadku efektu letalnego, mierzonego częstością występowania włosków skróconych (Rys. 5.3.2.3.). W przypadku mutacji różowych i pojedynczych różowych, wrażliwość klonu T-4430 była tylko dwukrotnie większa (1.8, 2.0 odpowiednio). Wyniki te, jak również fakt, że klon T-KU 9 cechuje się wyjątkową żywotnością i łatwością uprawy, zdecydowały o wybraniu klonu T KU 9 do badań z EMS oraz DBE.

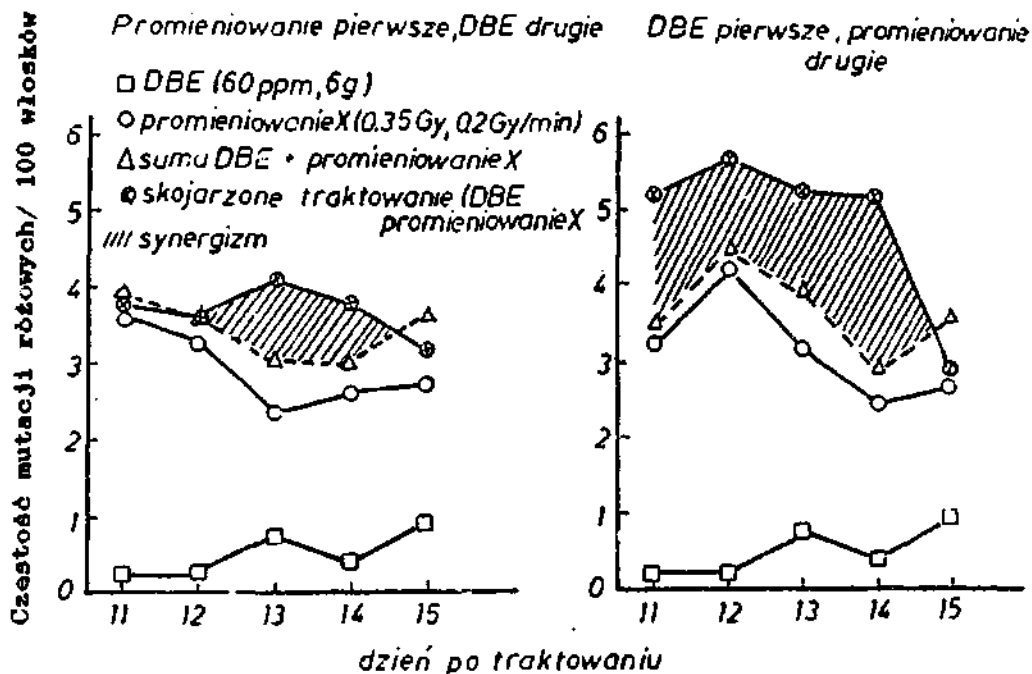
5.3.3. Wpływ kolejności traktowania na wielkość efektu

W raporcie UNSCEAR 82 specjalny nacisk położono zarówno na potrzebę jak i znaczenie prowadzenia wszelkiego rodzaju badań niezbędnych dla zrozumienia mechanizmów mutagenyzy i wynikającego z niej ryzyka genetycznego dla człowieka. Jednak zdaniem autorów

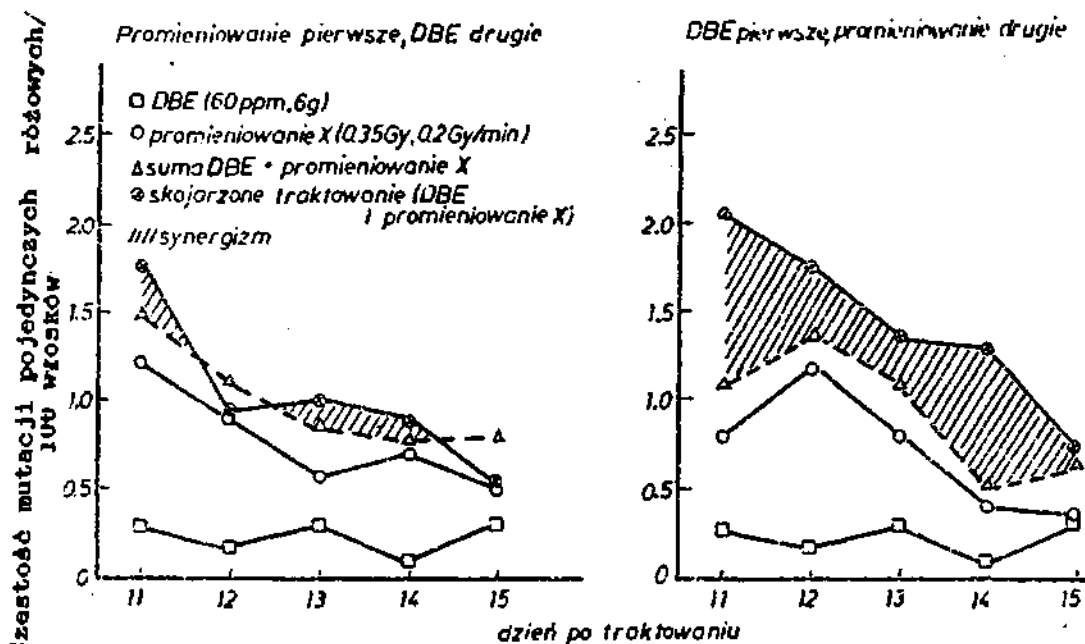
raportu jest jeszcze za wczesnie, aby Komitet w oparciu o istniejące dane był w stanie udokumentować w sposób jednoznaczny potrzebę zmiany systemu oszacowania ryzyka. Komitet stwierdza, że doniesienia w sprawie synergizmu są niekoherentne. Istotnie, istnieje pewna ilość doniesień kontrowersyjnych odnośnie synergizmu (47,55,93,103,109) i z pewnością sprawa wymaga jeszcze wyjaśnień.

W niniejszej pracy sprawdzono, w jakim stopniu sposób wykonania doświadczenia wpływa na wielkość efektu współdziałania. W badaniach zastosowano identyczne ekspozycje (ekspozycja chemiczna była wspólna dla obydwu eksperymentów), ale zmieniono kolejność traktowania.

Lewa strona rysunku 5.3.3.1. obrazuje kształtowanie się częstości mutacji indukowanych przez kombinacje traktowań: DBE, promieniowanie oraz skojarzone DBE plus promieniowanie, w przypadku, gdy napromieniowanie poprzedzało ekspozycje na mutagen chemiczny. Efekt współdziałania synergistycznego (zakreskowana powierzchnia) jest bardzo niewielki. Po prawej stronie przedstawiono częstości mutacji zmierzonych u roślin, które napromieniowane zostały taką samą dawką promieniowania, ale po ekspozycji chemicznej. W tym przypadku efekt synergistyczny jest wyraźny. W przedstawionych danych wielkość efektu synergistycznego zależna była tylko od kolejności traktowań, gdyż w badaniach nad wpływem przycięcia kwiatostanów na wrażliwość roślin(25) wykazano stabilność promieniowrażliwości niezależnie od różnych pór napromieniowania. Wpływ kolejności traktowań widac jeszcze wyraźniej w przypadku mutacji pojedynczych różowych przedstawionych na rysunku 5.3.3.2. Gdy ekspozycja chemiczna poprzedza promieniowanie (prawa strona rysunku), zakres



Rys. 5.3.3.1. Zależność efektywności mutagennej i efektu synergistycznego skojarzonego działania DBE i promieniowania X od kolejności traktowań ()23,76



Rys. 5.3.3.2. Ta sama zależność, dla mutacji pojedynczych różowych.

współdziałania synergistycznego (zakreskowana przestrzeń na rysunkach) jest wyraźnie większy.

Jeżeli przyjąć, że efekt synergistyczny jest spowodowany współdziałaniem subuszkodzeń wywołanych promieniowaniem z subuszkodzeniami pochodzącymi od mutagenu chemicznego, to w pierwszym przypadku, gdy napromienianie poprzedza ekspozycje na mutagen chemiczny, subuszkodzenia od promieniowania ulegają naprawie (w relatywnie krótkim czasie - ok. 1 godziny), prawdopodobnie zanim mutagen osiągnie komórke tarczowa. W drugim przypadku, subuszkodzenia od promieniowania powstają już w obecności subuszkodzeń od mutagenu chemicznego co prowadzi wyraźnie do synergizmu.

5.3.4. Wnioski

Wyniki badań nad efektywnością indukowania mutacji somatycznych u *Tradescantia* przez promieniowanie jonizujące i chemiczne mutageny pozwalają stwierdzić ogromną przydatność wybranego modelu do tego typu badań. Badania te pozwoliły na porównanie efektywności mutagennej badanych czynników oraz na określenie REC dla badanych związków. Możliwość wybrania najstosowniejszego klonu do odpowiednich badań stanowi dodatkowe ułatwienie i pozwala na optymalizację warunków eksperymentalnych.

Raport UNSCEAR 82 zaleca konieczność badania efektu współdziałania, i to zarówno na poziomie badań podstawowych, jak i praktycznych. Te właśnie badania powinny, gdy tylko możliwe, koncentrować się w zakresie dawek niskich i ekspozycji na różne czynniki mutagenne. Badania te powinny być skorelowane z najistotniejszymi skutkami biologicznymi takimi jak mutacje, aberacje chromosomowe, różnicowanie komórek, zaburzenia systemu

immunologicznego, rozwój organizmów i oczywiście kancerogeneza.

Układ modelowy oparty na pomiarze mutacji somatycznych w komórkach włosków precyków u *Tradescantia* spełnia doskonale te wymagania. Przedstawione w niniejszej pracy badania nad skojarzonym działaniem EMS lub DBE i promieniowania jonizującego dotyczy właśnie zakresu niskich dawek i mocy dawek. W badaniach potwierdzono istnienie efektu synergistycznego w przypadku zdarzeń letalnych przy współdziałaniu promieniowania oraz badanych mutagenów chemicznych. Wykazano istnienie tego efektu dla indukcji mutacji somatycznych przez skojarzone działanie EMS lub DBE z promieniowaniem jonizującym. Stwierdzono zależność efektu synergistycznego od kolejności traktowań oraz wykazano liniowa jego zależność od wartości ekspozycji całkowitej na promieniowanie i mutagen chemiczny. Badania nad synergizmem wykazały w ten sposób słuszność założeń modelu Chadwick'a i Leenhouts'a opisującego współdziałanie dwóch różnych mutagenów. Dla niskich dawek promieniowania wykazano dodatnia korelacje pomiędzy wielkością efektu synergistycznego a dawka promieniowania.

O znaczeniu synergizmu dla ochrony środowiska szczególnie wyraźnie świadczą dane dotyczące mutacji somatycznych, które pojawiają się przy równoczesnej ekspozycji na DBE i promieniowanie o niskiej mocy dawki.

W badaniach tych, zbliżonych warunkami eksperymentu do warunków naturalnych, stwierdzono bardzo wyraźna korelacje pomiędzy wielkością efektu synergistycznego a ekspozycja.

Również fakt, że wielkość efektu synergistycznego jest porównywalna a nawet czasem wyższa od efektu czynnika chemicznego działającego niezależnie, ma duże znaczenie dla ochrony

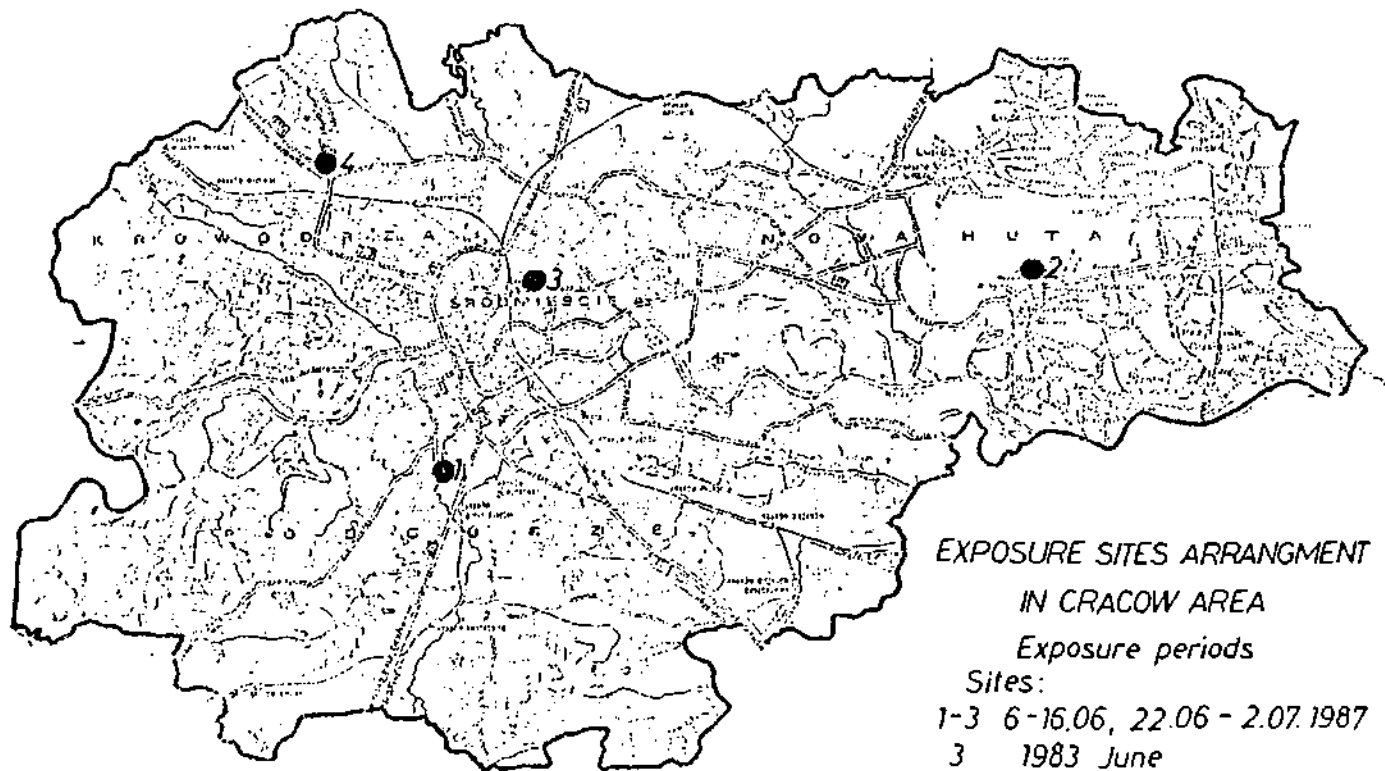
Środowiska i w opracowywaniu norm zanieczyszczeń fakt występowania efektu synergistycznego powinien być brany pod uwagę.

6. BADANIA *IN SITU* EFEKTYWNOŚCI MUTAGENNEJ ZANIECZYSZCZEN POWIETRZA

6.1. Metodyka

Mając na uwadze wyjątkową wrażliwość roślin *Tradescantia* na mutageny chemiczne oraz przykłady udanych zastosowań metody pomiaru częstości mutacji u *Tradescantia* do badań środowiskowych (125-127), podjęto próbę oceny zanieczyszczeń powietrza w rejonie Krakowa.

Trzykrotnie od roku 1983 w różnych punktach Krakowa (Rys. 6.1.1) eksponowano na powietrze rośliny *Tradescantia* klonu 4430. Badania prowadzono w czterech miejscach o potencjalnym zagrożeniu emisją substancji chemicznych z zakładów przemysłu krakowskiego. Dwa punkty wybrano w oparciu o mapę zasięgu dymów przemysłowych sporządzoną na podstawie zdjęć z satelity "LANDSAT" (122), tzn. w Osiedlu "Cegielniana" w zasięgu emisji ze Skawiny i zakładów przemysłowych Bonarka i Solway, oraz na terenie Cementowni w Nowej Hucie (32). Trzeci punkt wybrano w rejonie zagrożonym emisją z Zakładów Farmaceutycznych. Rejon ten był przedmiotem badań, prowadzonych w latach 1983 (30). Czwartym miejscem był testowany w maju 1986 roku po awarii w Czernobylu teren Instytutu Fizyki Jadrowej (26). W każdym z badanych punktów eksponowano około 30 kwiatostanów względnie doniczki z roślinami w ilości zapewniającej co najmniej 30 kwiatostanów na badany punkt. Materiał biologiczny do obserwacji mutacji somatycznych w komórkach włosków precyków, zbierano od jedenastego dnia od rozpoczęcia ekspozycji aż do siódmego dnia po zakończeniu ekspozycji. Za miarę efektu biologicznego przyjęto częstość mutacji liczoną dla każdego dnia i wyrażaną jako częstość mutacji na 100 włosków.



EXPOSURE SITES ARRANGMENT
IN CRACOW AREA

Exposure periods

Sites:

1-3 6-16.06, 22.06 - 2.07.1987

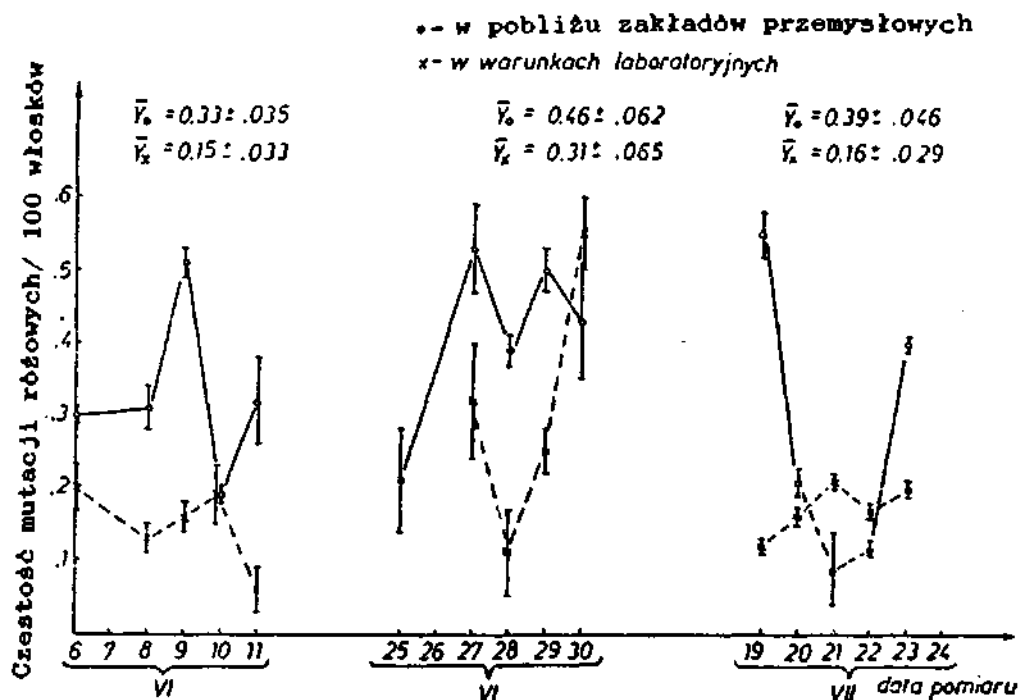
3 1983 June

4 1986 May

6.2. Omówienie wyników

6.2.1. Ekspozycja po awarii filtrów w zakładach farmaceutycznych

Kształtowanie się częstości mutacji u roślin eksponowanych w czerwcu i lipcu 1983 na powietrze w pobliżu Zakładów Farmaceutycznych przedstawiono na Rys.6.2.1.1. Z danych tych jednoznacznie wynika, że poziom mutacji indukowanych u roślin eksponowanych w otoczeniu zakładów jest wyraźnie wyższy od poziomu mutacji zaobserwowanego w tym samym okresie u roślin hodowanych w warunkach laboratoryjnych. Porównując częstości mutacji wywołane u *Tradescantia* ekspozycja na powietrze w otoczeniu Zakładów z krzywa dawka-efekt przedstawiona na rysunku 5.2.3. można stwierdzić, że Rad-ekwiwalent dla zmierzonych efektów waha się w granicach 4 - 6 cGy. Zważywszy, że badane



Rys. 6.2.1.1. Częstość mutacji indukowanych u roślin poddanych ekspozycji w pobliżu Zakładów Farmaceutycznych (30)

emisje przemysłowe mogą mieć charakter ciągły, wydaje się, że uzyskany efekt jest nadspodziewanie wysoki. Jeżeli porówna się uzyskane częstości mutacji z danymi dla tego klonu uzyskanymi przez Schairera dla warunków ekspozycji ciągłej (127), to obserwowane efekty są porównywalne ze skutkami ekspozycji przewlekłej o mocy dawki 0.32 cGy/dzień. Nawet przyjmując, że nasze badania przeprowadzono w warunkach ekstremalnych, tzn. w okresie awarii filtrów, trzeba przyznać, że są to wartości bardzo wysokie. Są one zbliżone do wartości uzyskanych w miejscowości Elizabeth (Stan Nowy Jork) w pobliżu zakładów przeróbki ropy naftowej. Przekraczają one 10-krotnie wartość efektu biologicznego, który odpowiadałby przyjętej granicy rocznego narażenia ludności na promieniowanie, tzn. 0.5 rem.

Wyniki te świadczą wyraźnie o tym, że skutki zagrożeń wynikających z zanieczyszczeń chemicznych środowiska są nieporównywalnie większe od skutków wynikających z kontaktów człowieka z promieniowaniem jonizującym.

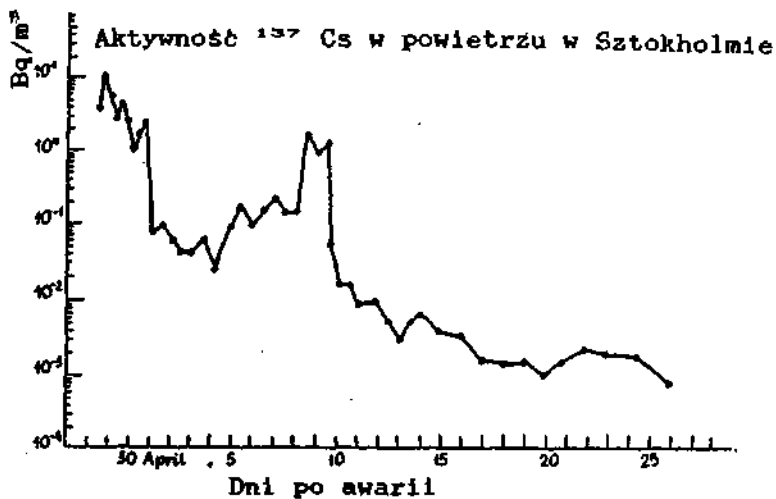
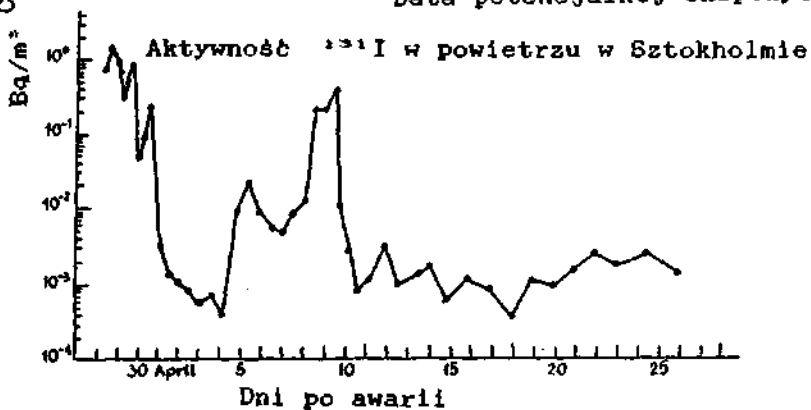
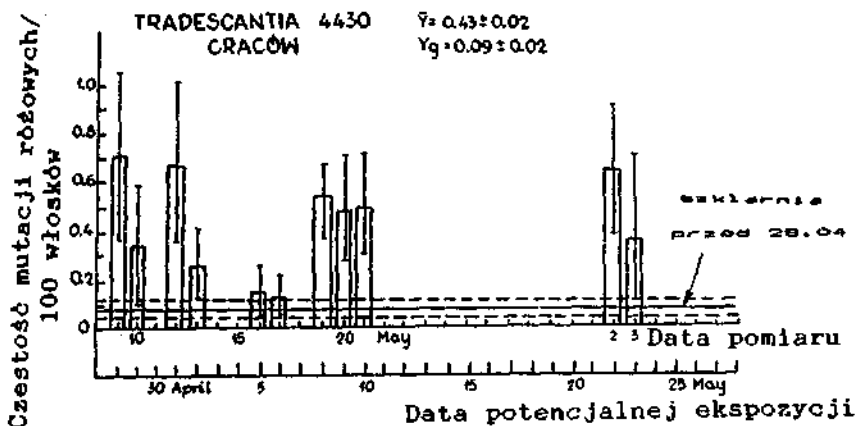
6.2.2. Ekspozycja po awarii w Czernobylu:

Na rysunku 6.2.2.1a. przedstawiono kształtowanie się częstości mutacji różowych u roślin *Tradescantia* eksponowanych na powietrze na terenie IFJ od 30 kwietnia 1986 roku tzn. po awarii w Czernobylu. Dwa czynniki zadecydowały o nienajlepszej statystyce w tych badaniach. Pierwszy to fakt, że ze względu na niespodziewaną konieczność ekspozycji liczba roślin eksponowanych w tym przypadku była ograniczona tylko do 20 kwiatostanów osiągalnych w tym momencie. Drugim czynnikiem był fakt, że rośliny zareagowały na ekspozycję bardzo intensywnym

kwitnieniem w pierwszych dniach ekspozycji dając np 20 kwiatów dziennie podczas gdy teoretycznie powinny dawać ~10 kwiatów lub praktycznie nawet mniej. W wyniku tak intensywnego kwitnienia w pierwszych dniach, kwitnienie w okresie właściwym dla obserwacji mutacji tzn. od jedenastego dnia po ekspozycji było już wyraźnie słabsze co obniżało dokładność pomiarów. Mimo to, uzyskane wyniki wykazały jednoznacznie gwałtowny wzrost poziomu mutacji spowodowany ekspozycją na opad radioaktywny z awarii w Czernobylu. Linia ciągła na rysunku przedstawia poziom mutacji rejestrowany w kwiatach kwitnących w dniach od 1-go do 4-go po rozpoczęciu ekspozycji i w związku z tym prezentujący mutagenność powietrza w warunkach szklarniowych przed awarią w Czernobylu. Można potraktować ten poziom mutacji jako kontrolny w odniesieniu do poziomu spowodowanego skażeniem powietrza.

Obserwowana częstość mutacji dość znacznie fluktuuje w badanym okresie. Najniższy poziom osiąga w dniach 16 i 17-maja co odpowiada ekspozycji 5-6 maja. Zarówno podwyższenia jak i obniżenie poziomu mutacji są dobrze skorelowane z rejestrowanymi w Szwecji(75) i w Polsce(48) poziomami aktywności ^{137}J i ^{137}Cs (Rys.6.2.2.1b i c).

Średnia częstość mutacji dla całego okresu pomiarów osiągnęła wartość nawet wyższą, niż wartość zmierzona w 1983 roku po awarii filtrów w Zakładach Farmaceutycznych w Krakowie tzn 0.43 mut/100włosek. Porównanie otrzymanej częstości mutacji z danymi Schairera(127) daje wartość mocy ekspozycji rzędu 0.6 cGy/dzień, podczas gdy dawka szacowana w oparciu o fizyczne pomiary aktywności powietrza jest rzędu 0.001cGy czy nawet uGy (64). Różnica jest bardzo duża, istnieje wszakże kilka możliwości jej wyjaśnienia:



Rys. 8.2.2.1. Częstość mutacji różowych u roślin *Tradescantia* eksponowanych na opad radioaktywny z awarii w Czernobylu

- po pierwsze mutacje obserwowane u sa skutkiem działania na rośliny *Tradescantia* całej mieszaniny zanieczyszczeń obecnych w powietrzu . W przypadku skażenia radioaktywnego obecne w powietrzu zanieczyszczenia chemiczne mogą współdziałać z promieniowaniem jonizującym. W takim przypadku możliwość wystąpienia efektu synergistycznego zmienia w radykalny sposób całe szacowanie. Tym bardziej, że jak pokazano w poprzednim rozdziale wzrost częstości mutacji powodowany synergizmem w działaniu EMS, DB¹ oraz promieniowania znacznie przewyższa poziom mutacji indukowany przez czynnik chemiczny działający niezależnie. Poziom mutacji obserwowany u *Tradescantia* po awarii należy więc traktować jako reakcja roślin na zanieczyszczenia chemiczne, silnie wzmocniona przez współdziałanie z zanieczyszczeniami radioaktywnymi.

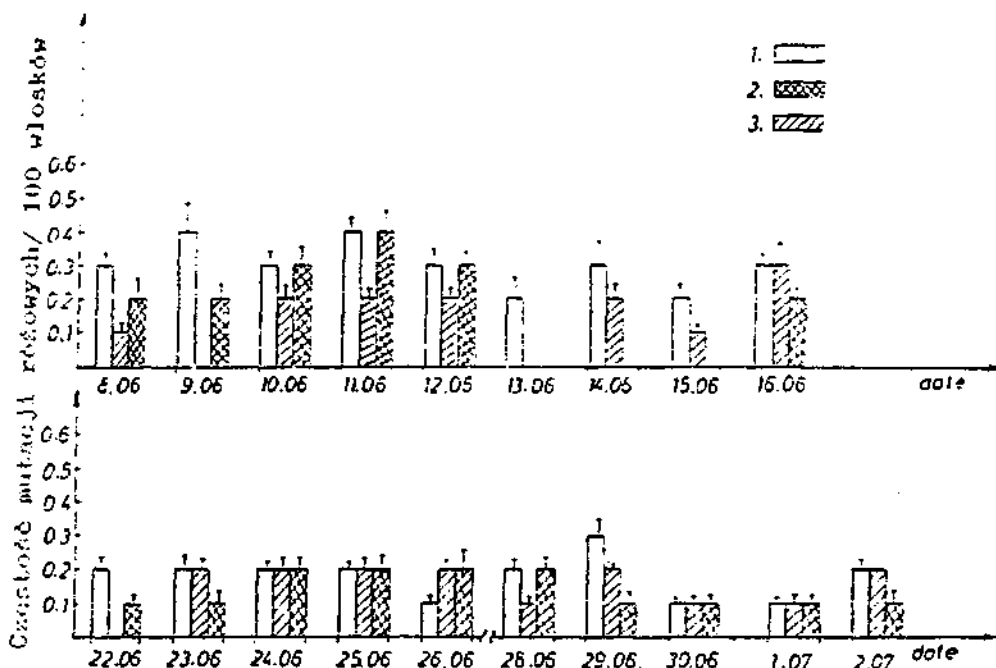
- Po drugie oszacowanie dawki w oparciu o fizyczna detekcje promieniowania nie bierze pod uwagę tak zwanych "punktów gorących" charakteryzujących się wielokrotnie wyższą aktywnością niż przeciętna a których obecność w tym okresie wykazano również w Krakowie i okolicy (19). Ich wpływ należałoby również uwzględnić w ocenie dawki rzeczywistej, co być może diametralnie zmieniałoby wartości oszacowania zagrożenia.

6.2.3. Równoczesna ekspozycja w kilku rejonach miasta Krakowa

Częstość mutacji obserwowana w czerwcu i lipcu 1987 roku w trzech stanowiskach w różnych rejonach Krakowa przedstawiono na rysunkach 6.2.3.1 a i b. W rejonie 1 ekspozycja była zlokalizowana w Osiedlu "Cegielniana" w zasięgu emisji ze Skawiny oraz zakładów przemysłowych Bonarka i Solway, w rejonie 2 rośliny aksonowane były na terenie cementowni w Nowej Hucie.

Natomiast ekspozycja w rejonie 3 miała miejsce w odległości ~1 km od zakładów farmaceutycznych "Polfa", na ulicy Brodowicza.

W tabeli 6.2.3.1 oraz 6.2.3.2. przedstawiono częstości różnego typu mutacji obserwowanych w kwiatach zbieranych w



Rys.6.2.3.1. Częstość mutacji różowych indukowanych u roślin *Tradescantia* wystawionych na działanie powietrza w różnych miejscach Krakowa(32).

różnych okresach trwającej ekspozycji. Z przedstawionych danych wynika, że w badanych rejonach tylko w pierwszym etapie prowadzonych obserwacji daje się zauważyć wyraźne zróżnicowanie pomiędzy poziomem mutacji indukowanych w rejonach 1 i 2, a poziomem mutacji indukowanych w rejonie 3. Różnica ta jest najwyraźniejsza w okresie pomiędzy 8 - 12-tym czerwca, co odpowiada skutkom biologicznym emisji atmosferycznych mniej więcej w okresie 29.05 - 2.06.1987. W następnych okresach następuje stopniowe wyrównywanie poziomów mutacji mierzonych we

Tabela 6.2.3.1.

Wartości średnich ważonych dla częstości mutacji różowych obserwowanych w różnych okresach (mut/100 włosków + SE)

okres rejon	1 2-5.06	2 8-12.06	3 13-16.06	4 22-26.06	5 29.06-2.07
1	.20 + .02	.31 + .03	.24 + .04	.17 + .02	.16 + .02
2		.27 + .04	.19 + .05	.18 + .03	.09 + .02
3	.19 + .04	.16 + .03	.19 + .04	.18 + .02	.16 + .02
1:2		< .2	< .2	< .5	< .002
2:3	α	< .005	> .5	>> .5	< .002
1:3		< .001	= .1	> .5	>> .5

α poziom istotności różnic pomiędzy porównywanymi wartościami średnich, uzyskany w oparciu o test Studenta (138).

Tabela 6.2.3.2.

Wartości średnich częstości mutacji pojedynczych różowych (SP) oraz zdarzeń letalnych (ST) indukowanych w różnych okresach i rejonach (mut/100 włosków)

okres rejon	1	2	3	4	5
1 SP		0.11	0.14	0.04	0.04
1 ST	4.1	3.20	1.75	1.12	0.62
2 SP		0.07	0.09	0.09	0.10
2 ST		3.76	2.56	1.94	4.41
3 SP	0.05	0.08	0.06	0.06	0.07
3 ST	0.84	1.09	3.10	0.68	1.48

Tabela 6.2.3.3.

Średni poziom mutacji obserwowany w powietrzu w Krakowie w różnych latach:

	mut/100 wł.	dawka równoważ. efekt	opad /mm/	ilość dni deszczowych
wiosna 1984 /Polfa-awaria/	0.39	5 cGy	32	5
wiosna 1986	0.43	6 cGy	24	5
wiosna 1987	0.17*	-	75	11

*poziom przyjęty za kontrole

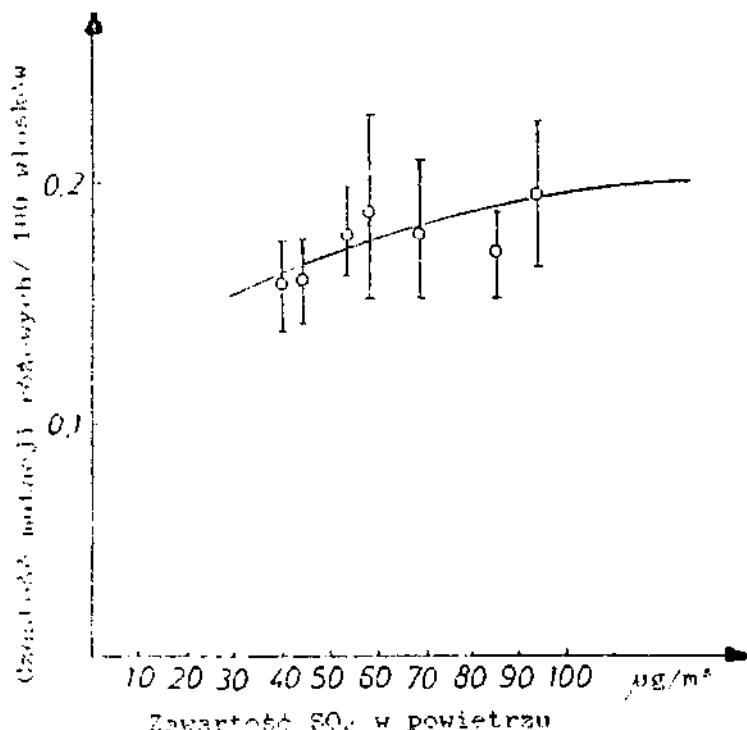
wszystkich miejscach oraz z równoczesne obniżenie średniego poziomu częstości obserwowanych mutacji. Obserwowane obniżenie poziomu mutacji może być spowodowane zarówno częstymi w tym okresie deszczami (patrz Tabela 6.2.3.3), a co za tym idzie wyplukiwaniem zanieczyszczeń z powietrza jak również faktycznym obniżeniem emisji.

Przeprowadzona analiza statystyczna potwierdza istotność różnic średnich poziomów mutacji obserwowanych w okresie drugim pomiędzy miejscami w rejonach 1 i 2 a rejonem 3, oraz w okresie piątym pomiędzy miejscami w rejonach 1 i 3, a rejonem 2. Trzeba tutaj jednak zwrócić uwagę na fakt, że wybitnie niskiemu poziomowi mutacji w rejonie 2 w okresie piątym towarzyszy wyraźnie wyższy efekt toksyczny (Tabela 6.2.3.2). Również częstości mutacji pojedynczych różowych przedstawione w tabeli 6.2.3.2. potwierdzają w zasadzie tendencję zmniejszania się poziomu mutacji w czasie ekspozycji. Wyjątek stanowi ponownie rejon 2 w którym wyraźnie rośnie w czasie ekspozycji udział mutacji pojedynczych w całkowitej liczbie mutacji różowych. Zgodnie z interpretacją mechanizmu tworzenia tego typu mutacji może to świadczyć o występowaniu czynnika zaburzającego cykl komórkowy.

Wprawdzie przeciętny dla badanego okresu poziom mutacji jest niższy niż w latach poprzednich to jednak nie można pominąć faktu, że fluktuacja wartości częstości mutacji jest znaczna. Waha się ona w zakresie od 0.09mut do 0.31mut/100włosków. Tego rzędu efekty są równoważne skutkiem biologicznym promieniowania gamma o dawce 5 cGy tj 5rad ()/3,4/. Porównanie tych efektów z efektywnością mutagenną promieniowania uwidacznia o ile chemiczne zanieczyszczenia środowiska mogą być w skutkach

biologicznych: groźniejsze od promieniowania o dawkach na jakie może być narażony człowiek.

Według informacji ze Stacji Sanitarnej Epidemiologicznej w Krakowie w okresie w którym prowadzono badania nie były przekroczone dopuszczalne stężenia SO_2 w powietrzu. Na rysunku 6.2.3.2 przedstawiono średnie częstości mutacji występujące w



Rys. 6.2.3.2. Zależność mutacji zmierzonych u eksponowanych w różnych rejonach Krakowa roślin *Tradescantia*, od stężenia SO_2 w powietrzu.

badanych miejscach w pięciu przedstawionych w tabeli 6.2.3.1 okresach w funkcji średnich zawartości dwutlenku siarki w powietrzu w okresie ekspozycji / 11 dni przed pomiarem mutacji/. Stężenia SO_2 podano wg oznaczeń Sanepidu wykonanych w miejscach zbliżonych lokalizacja do stanowisk testowanych przy pomocy

Tradescantia.

Z następujących względów nie należy się spodziewać bezpośredniej korelacji pomiędzy poziomem mutacji u *Tradescantia* a zawartością SO₂ w powietrzu:

- Stwierdzono bardzo słaby wpływ SO₂ na częstość mutacji u *Tradescantia* (123,133)
- Obserwowana częstość mutacji, jest efektem biologicznym ekspozycji na cały kompleks zanieczyszczeń powietrza, a nie tylko SO₂.
- Lokalizacja naszych punktów oraz oznaczeń SO₂ nie jest identyczna, być może stężenie SO₂ przy stanowiskach *Tradescantia* było niższe od mierzonego gdzie indziej.

Natomiast, patrząc na zależność przedstawiona na Rys.6.2.3.2 wydaje się że jednak istnieje pewna korelacja między stężeniem SO₂, a poziomem mutacji u *Tradescantia*.

6.3. Wnioski

Stosując metode pomiaru mutacji somatycznych u *Tradescantia* stwierdzono:

- w badaniach prowadzonych w 1983 roku istotny statystycznie wzrost poziomu mutacji u roślin eksponowanych na powietrze w pobliżu Zakładów Farmaceutycznych kilka dni po awarii filtrów w tych Zakładach.

- w badaniach przeprowadzonych w 1986 roku stwierdzono podwyższenie częstości mutacji u roślin eksponowanych na skażenie powietrza spowodowane awarią w Czernobylu

- w badaniach prowadzonych w roku 1987 w pierwszym etapie prowadzonych obserwacji stwierdzono statystycznie istotnie wyższy poziom mutacji indukowanych w rejonach: Osiedla

"Cegielniana" w zasięgu emisji ze Skawiny oraz zakładów przemysłowych Bonarka i Solway, oraz na terenie cementowni w Nowej Hucie w stosunku do ekspozycji w rejonie ulicy Brodowicza.

- Maksymalne różnice w obserwowanych w roku 1987 poziomach mutacji wahają się w badanym okresie w zakresie od 0.09 do 0.31mut /100włosków. Tego rzędu efekty są równoważne skutkom biologicznym promieniowania gamma o dawce 5 cGy.

- Stwierdzono istnienie korelacji pomiędzy rejestrowanymi w różnych okresach i rejonach średnimi poziomami mutacji, a wartościami średnich poziomów SO₂ mierzonymi przez Sanepid w tych okresach i bardzo zbliżonych lokalizacja punktach pomiarowych.

- Badania przeprowadzone w roku 1987 wykazały znaczny spadek poziomu mutacji w porównaniu z poziomem rejestrowanym po awarii w Czernobylu.

Należy podkreślić fakt, że obserwowany u *Tradescantia* poziom mutacji jest miarą efektu biologicznego zanieczyszczeń, a zatem miarą skutków, jakie mogą one wywoływać, a nie miarą ich stężeń bezwzględnych lub aktywności. Fakt, że zaobserwowano korelacje pomiędzy obserwowanymi poziomami mutacji i rejestrowanymi metodami fizycznymi i chemicznymi pomiarami zanieczyszczeń świadczy o dużej czułości tej metody.

Reasumując, przedstawione badania - po pierwsze - obrazują zakres skutków mutagennych, jakie występują na skutek obecnych w powietrzu, w badanym okresie, zanieczyszczeń chemicznych, po drugie - wykazują, że w naszych warunkach mutacje somatyczne u *Tradescantia* mogą skutecznie być stosowane do monitoringu biologicznego. Stosując prezentowany układ można zaobserwować różnice pojawiające się w emisjach w różnych rejonach Krakowa i należy się spodziewać, że prowadzenie analizy uzyskanych danych w

oparciu o dane meteorologiczne, może pozwolić na głębszą analizę przyczyn lub nawet źródeł zwiększania się częstości mutacji.

Bardzo ważny z punktu widzenia badań środowiskowych jest fakt, że zastosowanie układu modelowego *Tradescantia* jako testu daje możliwość obserwacji *in situ* przez cały rok, tzn. nawet wtedy, gdy inne biologiczne testy nie mogą wchodzić w rachubę.

7. OCENA PRZYDATNOŚCI TESTU DO BADANIA SKUTKÓW CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH

Zalety stosowanej w prezentowanych badaniach metody zostały już przedstawione szczegółowo we wcześniejszej pracy autorki(28). Biorąc pod uwagę fakt, że metoda ta nie jest rozpowszechniona w Polsce, warto podkreślić jeszcze raz zarówno jej szczególnie użyteczne cechy jak i słabe strony.

Prezentowane badania potwierdzają przydatność tego modelu do badań z zakresu mutagenyzy środowiskowej, zarówno w warunkach laboratoryjnych jak i też w warunkach polowych, testujących zanieczyszczenie środowiska.

Oprócz niezaprzeczalnych zalet tego systemu, do których należy zaliczyć prostotę, dostępność, ekonomiczność i szybkość, jest jeszcze kilka innych cech, które czynią ten model szczególnie cennym narzędziem badawczym:

- wiosek precyka poprzez swój rozwój może być porównywany z układem hodowli komórkowych,
- metoda daje możliwość badania dużej populacji komórek,
- w relatywnie krótkim czasie pozwala uzyskać informacje o indukowanych częstościach mutacji (przeciętnie po 2-3 tygodniach od ekspozycji)
- zależność częstości mutacji od dawki promieniowania przebiega zgodnie z dobrze opisanym modelem mutacji z supresją w populacji traktowanej
- znajomość modelu opisującego zależność efektu od dawki pozwala na głębszą i bardziej jednoznaczna analizę wpływu środowiskowych czynników modyfikujących efekt promieniowania,
- wrażliwość *Tradescantia* na promieniowanie jest bardzo wysoka, zbliżona do wrażliwości komórek ssaków (dawki rzędu 0.025 Gy

wywołują już łatwo mierzalne efekty)

- kwiatostan zawierający upakowane paczki niewielkich rozmiarów znakomicie nadaje się do napromieniowania nawet małymi wiaskami promieniowania,
- duża ilość klonów *Tradescantia* pozwala dobierać je do badań w zależności od ich cech genotypowych i specyfiki badań,
- zarówno prowadzenie plantacji, jak i metoda pomiarów nie sprawiają żadnych trudności (do mierzenia mutacji wystarczy zwykła lupa binokularna),
- rośliny rosną dobrze w zwykłej szklarni, a warunki hodowli i fizjologia rośliny są szczegółowo poznane i opisane,
- rozmnażanie wegetatywne roślin zapewnia minimalną zmienność genetyczną.
- stosowanie metody nie wymaga żadnych skomplikowanych procedur, takich jak na przykład są niezbędne w metodach opartych na sterylnych hodowlach kultur tkankowych.

Natomiast, wydaje się, że niewątpliwie do stron negatywnych przedstawionego modelu należy zaliczyć fakt, że jest on oparty na komórkach roślinnych. Współczesne tendencje niecałkowicie słusznie, ale skutecznie wypierają roślinne układy modelowe na korzyść metod opartych na komórkach zwierzęcych.

Poza tym do minusów należałoby zaliczyć cechę, która jest równocześnie najważniejszą zaletą metody, tzn. jej wyjątkowa wrażliwość. Ona właśnie powoduje, że do właściwej uprawy roślin konieczna jest specjalna uwaga i ostrożność przy stosowaniu środków ochrony roślin, zmianie podłoża itp.

Metoda pomiaru częstości mutacji u *Tradescantia*, stosunkowo niewielkim nakładem kosztów, może być również zastosowana do kontroli zanieczyszczeń środowiskowych. Bardzo

ważny z punktu widzenia badań środowiskowych nad oceną skutków zanieczyszczeń powietrza jest fakt, że zastosowanie do monitoringu układu modelowego *Tradescantia* daje możliwość obserwacji *in situ* przez cały rok. Umożliwia to zbadanie szkodliwości w sensie indukcji mutagennej przez czynniki obecne w powietrzu, glebie i wodzie pochodzące z zanieczyszczeń przemysłowych.

Wprawdzie, obserwowany u *Tradescantia* poziom mutacji nie jest miarą bezwzględnej koncentracji lub aktywności pojawiających się zanieczyszczeń, ale jest miarą efektu biologicznego, a zatem miarą skutków, jakie mogą one wywoływać. Natomiast zgodność obserwowanych poziomów mutacji z pomiarami zanieczyszczeń chemicznych, rejestrowanymi metodami fizycznymi świadczy dodatkowo o dużej czułości tej metody. Jako prosty i szybki układ wykrywający zanieczyszczenia może służyć ona do wskazywania miejsc, gdzie niezbędne będzie, droższe i bardziej czasochłonne, badanie kompleksowe.

Reasumując, prezentowane wyniki wykazały nie tylko zakres skutków biologicznych, które są konsekwencją zanieczyszczeń chemicznych obecnych w powietrzu w badanym okresie, ale dowiodły także, że w naszych warunkach mutacje somatyczne u *Tradescantia* można skutecznie zastosować do monitoringu biologicznego tych zanieczyszczeń. Stosując prezentowany układ udało się wykazać fluktuacje w intensywności emisji zanieczyszczeń w różnych rejonach Krakowa. Można się spodziewać, że wprowadzenie kompleksowej analizy uzyskanych danych z uwzględnieniem danych meteorologicznych pozwoli na głębszą analizę przyczyn lub nawet źródeł zwiększenia częstości mutacji, wywołanego wzrostem zanieczyszczeń środowiska.

8. PODSUMOWANIE:

Prezentowane w niniejszej pracy wyniki przedstawiają zakres skutków biologicznych wywołanych przez badane czynniki w postaci mutacji somatycznych u *Tradescantia*. Z przedstawionych badań nad efektywnością mutagenną promieniowania, mutagenów chemicznych oraz wybranych czynników środowiskowych wynika kilka ważnych dla ochrony środowiska wniosków.

Wstępne traktowanie roślin fluorkiem sodu lub wzbogacenie podłoża domieszkami dolomitu, modyfikuje promieniowrażliwość roślin *Tradescantia*. W oparciu o analize przebiegu krzywych dawka-efekt, oraz interpretacja według zasad molekularnej teorii działania promieniowania, parametrów funkcji opisującej ten efekt, potwierdzono hipotezę, że modyfikacja podłoża oraz wstępne traktowanie roślin fluorkiem wpływają w odmienny sposób na procesy naprawy uszkodzeń popromiennych cząsteczki DNA.

Badania nad współdziałaniem promieniowania z EMS lub NPE i w indukowaniu mutacji somatycznych wykazały istnienie synergizmu. Co najmniej trzy dziedziny pośrednio lub bezpośrednio związane z działalnością ucytkowa całowitka są w ścisły sposób uzależnione od efektywności mutagennej różnych kategorii mutagenów fizycznych i chemicznych: mutagenesa, ochrona radiologiczna i ochrona środowiska. Dla nich wszystkich bardzo istotne jest ustalenie addytywności, antagonizmu bądź synergizmu wzajemnych oddziaływań. Synergistyczne współdziałanie chemicznych mutagenów i promieniowania zostało dotychczas dowiedzione i uznane dla przeżywalności komórek. Występowanie synergizmu w przypadku mutacji, i to w zakresie dawek niskich, ma ogromne znaczenie nie tylko dla ochrony środowiska, ale i dla pozostałych dziedzin. W przeprowadzonych badaniach rezultat

synergistycznego współdziałania czynników chemicznych i promieniowania jest porównywalny z efektem biologicznym czynników chemicznych zastosowanych niezależnie, a czasem nawet go przewyższa. Silne powiązania między zdolnościami mutagennymi oraz kancerogennymi prowadzi do wniosku, że efektu synergistycznego należy spodziewać się również w przypadku pobudzenia i rozwoju komórek rakowych. Zatem w ochronie środowiska przy ustalaniu norm stężeń dopuszczalnych dla zanieczyszczeń, należy uwzględnić możliwość wystąpienia efektu synergistycznego w przypadku działających równocześnie różnych środowiskowych czynników mutagennych. Obecne normy, w świetle uzyskanych rezultatów, powinny być obniżone. Dodatkowym argumentem na rzecz tej tezy jest wynikający z przedstawionych wyników fakt, że skutki biologiczne chemicznych zanieczyszczeń środowiskowych są dużo większe niż skutki, jakich należy się spodziewać w wyniku nieuniknionego kontaktu człowieka z promieniowaniem jonizującym obecnym w środowisku. Najwyraźniej jest to widoczne w przypadku zastosowania testu do określenia efektywności mutagennej zanieczyszczeń powietrza. Częstości mutacji powodowane ekspozycją na zanieczyszczenia chemiczne obecne w powietrzu w badanych okresach były takie, jakie zostałyby zaobserwowane, gdyby rośliny zostały napromienione dawkami rzędu 5 - 6 cGy, tzn. dziesięciokrotnie przekraczającymi roczne limity dawek promieniowania jonizującego przyjęte za dopuszczalne dla populacji ogólnej.

Poza tym, przedstawione badania wykazały, że zastosowanie tak czułego testu, jakim jest *Tradescantia*, oraz przyjęcie koncepcji Rad-ekwiwalentu może stworzyć doskonały układ modelowy do badań w mutagenezie środowiskowej.

Wykaz ważniejszych skrótów

- CL₅₀ - stężenie wyjściowe mutagenu dające w skutkach 50% przeżywalności
- DL₅₀ - dawka promieniowania powodująca 50% przeżywalności
- CT - tomografia komputerowa
- Gy - jednostka dawki pochłoniętej / 1Jkg⁻¹/
- REC - /Rad-equivalent/ dawka chemicznego mutagenu wywołująca taki sam efekt biologiczny jak promieniowanie o dawce 1-go rządu /0,01Gy/

P I S M I E N N I C T W O

1. Aestreit K., Effects of Combination of Mutagens on Mutation Frequency in Barley. 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., McCann J., Yamasaki E.: Methods for Detecting Carcinogenus and Mutagens with the Salmonella/Mammalian Microsome Mutagenicity Test. - Mutation Res., 31, 347-364, 1975.
7. Ames B.N., Gold L.S., Sawyer Ch.B., Havender W.: Carcinogenic Potency. in: Environmental Mutagens and Carcinogens. Ed. by Takashi Sugimura, Sohei Kondo, Hiraku Takebe, University of Tokyo Press, 663 - 669, 1982.
8. Anderson D.: An appraisal of the current state of mutagenicity testing. - J. Soc. Cosmet. Chem., 29, 207 - 223, 1978.
9. Ashby J., De Serres F.J., et al. /Eds/ Progress in Mutation Research, Vol. 5. Elsevier Science Publishers, Amsterdam 1986.
10. Benigni R., Giullani A., Carcinogenicity, Mutagenicity, Toxicity and Chemical Structure in a Homogeneous Data Base. in: QSAR in Drug Design and Toxicology, Ed: D. Hadzi. and B. Jerman-Blatic, Elsevier Science Publ, 346-348, 1987
11. Balla I., Michel C., Fritz-Niggli H., Synergistic Interaction between Vindesine and X-Rays in the Prenatal Development of Mice, Int.J.Radiat.Biol. Vol.52, No. 3, 371-383, 1987.
12. Brandt S., Metody statystyczne i obliczeniowe analizy danych, Warszawa PWN, 42-43, 1976.
13. Bladeren P.J., Breimer D.D., Roffereveel-Smijjs 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 BNL - 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. Broda R., Gamma Spectroscopy Analysis of Hot Particles from Chernobyl Fallout, IFJ Cracow, Rep. No.1342/B,5-30,(1986).
 20. Cattanach B.M., Rasberry C., Genetic Effects of Combined Chemical-X-Ray Treatments in Male Mouse Germ Cells, Int.J. Radiat. Biol. Vol.51, No.6, 985-996, 1987.
 21. Cebulska-Wasilewska A., Leenhouts H.P., Chadwick K.H. Synergisme van EMS met straling bij mutaties in *Tradescantia*. Nederlandse Vereniging voor Stralingshygiene, 12 February 1982, Bilthoven, NVS-nieuws 7,12, 1982.
 22. Cebulska-Wasilewska A., Investigations carried out at ITAF during an IAEA fellowship in the period January 1981-1982. Rapport No 94. October 1982.
 23. Cebulska-Wasilewska A., Huczowski J., Kuternozinska W., Dutkiewicz E., Applications of *Tradescantia* Model System for Studying the Modification of Radiation Effects by Pollutants. Proc. of 18th Annual Meet. ESRB, Zurich, 1984.
 24. Cebulska-Wasilewska A., Leenhouts H.P., Chadwick K.H., : Synergism between EMS & X-rays for the induction of somatic mutations in *Tradescantia*. - INT J. Radiat. Biol., 40,2, 163-173, 1981.

25. Cebulska-Wasilewska A., Sijma 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
26. Cebulska-Wasilewska A., Detection of Ambient Air Pollutants Mutagenicity by *Tradescantia* Stamen Hairs, *Nucleonica*, in press
27. Cebulska-Wasilewska A., Badania nad mutagennym oddziaływaniem stosowanych w rolnictwie środków ochrony roślin. Materiały IHAR w druku
28. Cebulska-Wasilewska A., Mutacje somatyczne u *Tradescantia* jako układ modelowy do badania skutków czynników środowiskowych. IFJ Kraków Raport No 1335/B, 1986.
29. Cebulska-Wasilewska A., Guminska M., Huczowski J., Kuternozinska W., Wplyw skojarzonego oddziaływania promieniowania jonizujacego i fluoru sodu na czestosc mutacji somatycznych u *Tradescantia*. w: *Folia Medica Cracoviensia* 28, 139-146, 1987.
30. Cebulska-Wasilewska A., Guminska M., Zastosowanie pomiaru czestosci mutacji somatycznych u *Tradescantia* do okreslenia efektywnosci mutagennej zanieczyszczen powietrza. *Folia Medica Cracoviensia* 28, 131-138, 1987.
31. Cebulska-Wasilewska A., Olejniczak Z., Sulek Z., Influence of the Magnetic Fields on the somatic Mutation Frequency in *Tradescantia* IFJ Kraków, Raport No 1369/B, 1987
32. Cebulska-Wasilewska A., Kulczykowska K., Detection of Ambient Air Pollutants Mutagenicity with *Tradescantia* Stamen Hair System IFJ Kraków, Raport No 1369/B, 1987
33. Cebulska-Wasilewska A., Interaction of Chemical Mutagens with Radiation in the Induction of Somatic Mutations in *Tradescantia*. IFJ Kraków, Raport No 1369/B, 1987
34. Cebulska-Wasilewska A., Guminska M., Huczowski J., Kuternozinska W., Application of *Tradescantia* Model System for Studying the Modification of Radiation Effects by Pollutants. IFJ Kraków, Raport No 1369/B, 1987
35. Cebulska-Wasilewska A., Smagala J., Influence of the Soil Composition on the Radiosensitivity of *Tradescantia* Plants IFJ Kraków, Raport No 1369/B, 1987
36. Cebulska-Wasilewska A., Korzeniowski R., Influence of the experiment .. dependent factors on the dose-response curve in *Tradescantia* . to be published
37. Chadwick K.H.: A brief review of the biological effects of non-ionizing radiation. - *Annales de l'Association de Radioprotection*, 6, 1, 1981.

38. Chadwick K.H., Leenhouts H.P.: The Molecular Theory of Radiation Biology. - Springer, Berlin 1981.
39. Chodan J., W.Grzesiuk, Z.Mirowski: Zarys gleboznawstwa i chemii rolnej P.W.N. W-wa p.97-99,102-103, 1984.
40. 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.
41. Chris Rose. Acid Rain - The Ecological Imperative for Pollution Controls. Memorandum, Geneva 11-14 Nov.1986. WWF International, ISBN 2-88085-001-0.4-5,1986 1196 ,GLAND, Switzerland,
42. Christianson M.L.: Mitotic crossing - over as an important mechanism of floral sectoring in *Tradescantia*. - Mutation Research 28, 389 - 395, 1975.
43. Criteria for a recommended standard... Occupational Exposure to Ethylen 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.
44. Crow J.F.: Can we assess genetic risks? 6th Rad. Research Congr. Tokyo 70 - 78, 1979.
45. Davies DR.: Radiation - induced chromosome aberrations and loss of reproductive integrity in *Tradescantia*. - Radiation Research 20, 726 - 740, 1963.
46. 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.
47. 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.
48. Dulinski M., et al. Tracing of the Radioactive Cloud in Kraków After the Chernobyl Nuclear Accident. Preliminary Results Acta Geophysica Polonica, Vol.34 ,No.4, 405-412,(1986).
49. 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.
50. 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.
51. Ehrenberg L., Wachtmeister C.A.: Handling of mutagenic chemicals: - Experimental Safety, unpublished data.

52. 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.
53. Ehrenberg L., Osterman-Golkar S.: On the reaction kinetics and mutagenic activity of methylating and halogenoethylating gasoline additives. - Rad. Bot., 14, 185 - 194, 1974.
54. 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.
55. Favret E.A.: Genetic effects of single and combined treatment of ionizing radiation and ethyl methanesulphonate on barley seeds. - Proceedings of the First International Barley Genetics Symposium. Wageningen 26 - 31 August, 1963.
56. Fishbein L.: Industrial mutagens and potential mutagens. - Mutation Research, 32, 267 - 308, 1976.
57. Gerber G.B.: Interactions: Dose effect relationship and isoeffect curves. - Radiat. Environ. Biophys., 20, 235 - 243, 1982.
58. Goodhead D.T., Biophysical Models of Radiation Action; Introductory Review, Proc. of the 8-th Int. Con. of Radiat. Res. Edinburgh, July 1987, ED. Taylor and Francis, 306-311, 1987.
59. Gumińska M.: Biochemiczne mechanizmy działania fluoru na żywy organizm. - Folia Med. Crac., XXIII, 305 - 321, 1981.
60. Gumińska M., Skowron-Sula M.: Wpływ różnych steżeń magnezu i fluorków na glikolizę erytrocytów in vitro. - Folia Med. Crac., XXVI, 1 - 2 Pl. ISSN 0015 - 5616, 1985.
61. Holleander A.: A history attempts to quantify mutagenesis in environmental mutagens and carcinogenus. Eds.: Tokashi Sugimura et all., University of Tokyo Press, 21 - 37, Tokyo 1982.
62. Holleander A., Serres F.J., de : Chemical Mutagen Principles and Methods for their Detection. Vol. 1-8 Plenum, New York 1978.
63. Hollstein M., McCann J., : Short-term for carcinogens and mutagens. - Mutation Research, 65, 133-226, 1979.
64. Brynkiewicz A., Dawki i działanie biologiczne promieniowania jonizującego. Rap. No 1321/B IFJ, Kraków, 5-10, (1986).

65. Huczowski J., Cebulska-Wasilewska A., Lenarska B.: *Tradescantia* stamen hairs: A biological monitor of doses outside the neutron beam used in cancer therapy. - *Radiobiol. Radiother.*, 26, 1, 65-69, 1985.
66. Ichikawa S.: Polyploidy and radiosensitivity in higher plants. Mutagenesis in relation to ploidy level. *Gammafield Symposia* 9, 1 - 16, 1970.
67. Ichikawa S.: Comparison of genetic effects of scattering radiation with direct gamma rays in the stamen hairs of *Tradescantia hiensis* KU7 clone. - *Jap. J. Genetics*, 48, 1, 35 - 40, 1973.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Ichikawa S., Sparrow A.H.: Radiation - induced loss of reproductive integrity in the stamen hairs of *Tradescantia blossfeldiana* Mildbr., a twelve-ploid species. - *Radiation Botany*, 7, 333 - 345, 1967.
72. Ichikawa S.: Radiosensitivity of triploid clone of *Tradescantia* determined in its stamen hairs. - *Radiation Botny*, 12, 179 - 189, 1972.
73. Ichikawa S., Takahashi C.S.: Somatic mutations in *Tradescantia* stamen hairs exposed to ethyl methanesulphonate. - *Environ. and Experimen. Botany* 18, 19 - 24, 1978.
74. Jachimczak D., Skotarczyk B.: The effect of fluorine and lead ions of the chromosome of human leucocytes in vitro. - *Genetica Polonica*, 19, 353, 1978.
75. Jansen M., Lindhe J.Ch., IAEA Bulletin vol.28.No.3,31-33,(1986).
76. Johns T.F.: Purpose and practice of radiation monitoring. - *IEE Proc.*, 129, Pt. A, 2, March 1982.
77. Kada T., Inoue T., Yokoiyama A.: Combined genetic effects of chemicals and radiation. - 6th Rad. Research Congr., 711 - 720, Tokyo 1979.

78. Klekowsky Jr., Detection of Ambient Levels of Mutagenic Atmos-pheric Pollutants with the Higher Plant *Tradescantia*. Environmental Mutagenesis Carcinogenesis, and Plant Biology, Vol. II, 153-194, Praeger Publishers, 1982.
79. Kolber A.R., et al. In Vitro Toxicity Testing of Environmental Agents. Vol. 5A & 5B, Plenum, New York 1982.
80. 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.
81. Lave L.B., Omenn G.S., Cost-effectiveness of Short-term Tests for Carcinogenicity. *Nature* Vol. 324, 29-34, 1986.
82. Loprieno N., Use of yeast as an assay system for industrial mutagen. In: *Chemical Mutagens Principles and Methods for their Detection*, Ed, by Hollaender, Plenum NY., vol. 5. 1978.
83. Leenhouts H.P., Sisma M.J., Cebulska-Wasilewska A., Chadwick K.H.: Synergism between Dihydroethane and X-rays at low dose rates of radiation. - *Proc. of 7th Int. Rad. Res. Congress, Amsterdam, July 3 - 8, sessions E.* Martinus Nijhoff Publ. 1983.
84. Leenhouts H.P., Chadwick K.H.: Analysis of synergistic sensitization. - *Br. J. Cancer*, 37, suppl. III, 198, 1978.
85. 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.
86. Leenhouts H.P., Chadwick K.H., A quantitative analysis of the cytotoxic action of chemical mutagens. *Mut. Res.*, 129, 345-357, 1984.
87. Leenhouts H.P., Sijma M.J., Cebulska-Wasilewska 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.
88. 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.*
89. Levin D.E., Yamasaki E., Ames B.N.: A new *Salmonella* tester strain, TA97, for the detection of frameshift mutagens. - *Mutat. Res.*, 94, 315-330, 1982.
90. LRE: How hazardous are effluents from today's technologies? Reprinted from *Environmental Science and Technology*, 12, 508, May 1978.

91. 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.
92. Marimuthu K.M.: Effects of space flight (biosatellite II) and radiation of female gametophyte development in *Tradescantia*. - Reprinted from *American Journal of Botany*, 59, 4, 359 -366, April 1972.
93. Muller W.U., Streffer C., Enhancement of radiation effects by mercury in early postimplantation mouse embryos in vitro, *Radiat. Environ. Biophys.* 25, 213-217, 1987.
94. Muller W.U., Streffer C., Risk to preimplantation mouse embryos of combination heavy metals and radiation, *Int. J. Radiat. Biol.* Vol.51, No.6, 997-1006, 1987.
95. Mericle R.P., Mericle L.W.: Spectrophotometric study of somatic mutations in flowers of clone 02 *Tradescantia*. - Reprinted from: *Genetics*, 60, 203 - 204, 1968.
96. Mericle R.P., Mericle L.W.: Resolving the enigma of multiple mutant sectors in stamen hairs of *Tradescantia*. - *Genetics*, 73, 575 - 582, 1973.
97. Mericle L.W., Hazard R.M.: Stamen hair initiation and development in *Tradescantia* clone 02. - *Environ. and Experiment. Botany*, 20, 233 - 241, 1980.
98. Mericle L.W., Mericle R.P.: Diurnal temperature difference as a modifier of mutagenesis. - *EMS newsletters*, 5, 28 - 29, 1971.
99. Mericle L.W., Mericle R.P.: Genetic nature of somatic mutations for flower color in *Tradescantia* clone 02. - *Radiation Botany*, 7, 449 - 64, 1967.
100. Mericle L.W.: Induced somatic mutations for interpreting floral development and inflorescence aging. - *IAEA -AM - 121/28*, 591 - 601, 1969.
101. Mericle L.W.: Somatic mutations in clone 02 *Tradescantia*. - *J. of Heredity*, 62, 6, 1971.
102. Michel C., Cordt-Riehle J., Frits-Niggli H., Schappi K.: Combined application of misonidazole and Plotron Pions on mouse embryos. - *Radiat. Environ. Biophys.*, 21, 155 - 162, 1983.
103. Muller W.U., Streffer C., Toxicity of sodium arsenite in mouse embryos in vitro and its influence on radiation risk, *Arch. Toxicol*, 59, 172-175, 1986.
104. Moore R.C., Bender M.A., The Synergistic Effect of Aphidicolin on the Yield of X-Ray-Induced Chromosome Aberrations throughout the Cell Cycle in J058 Cells, *Radiat. Res.* 110, 385-395, 1987.

105. Mossman K.L.: Analysis of risk in computerized tomography and other diagnostic diology procedures. - Computerised Radiol., 6, 251 - 256, 1982.
106. Moustacchi E., Latarjet R.: Radiation equivalences for genetically active chemicals: Current status and limitations. in: 6th Radiation Research Congress, 721 - 728, Tokyo 1979.
107. Muhammed A., and Von Borstel R.C., /Eds./ Basic and Applied Mutagenesis, Vol. 34 , Plenum Publishing Corporation , New York, 1985 .
108. Mukherjee R.N.: Summary of discussions and recomendations. Radiobiological equivalents o chemical pollutants. - Proceedings of an advisory group meeting. Vienna 12 - 18 December 1977, IAEA Vienna 1980.
109. 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.
110. Nauman C.H., Klotz 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.
111. 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.
112. 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.
113. Nauman C.H.: Influence of radiation dose rate on somatic mutation. - Radiation Research, 62, 79 - 96, 1975.
114. Nauman C.H.: Low - dose mutation response relationship in *Tradescantia*. Principles and comparison to mutagenesis following low-dose gaseous chemical mutagen edposure. - Eur. Symp. on Rad-Equivalence 24 - 26 May 1978 Orsay, EUR 57 25 e, 13 - 23, 1977.
115. Nauman C.H.: Problems of extrapolation from high dose to low dose in *Tradescantia* mutation studies. - Environ. Health Perspect. 22, 161 - 162, 1978.
116. 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.

117. Nowotny-Mieczynska A.: Fizjologia mineralnego zywienia roslin (P.W.R.iL. W-wa 1976), p.234
118. Prabhu M.A., Canada's Proposed Legislation on Crimes Against the Environment, Environment, Vol. 28, No. 5, 14-29, 1986.
119. Plewa M.J., Plant Genetic Assays to Evaluate Complex Environmental Mixtures., From Short-Term Bioassays in the Analysis of Complex Environmental Mixtures IV., Ed. E. Waters, Plenum Pub. Corp., 45-64, 1985.
120. Poeschel R., Man and the Composition of the Atmosphere. A Contribution to the Global Environmental Monitoring System (GEMS) Report UNEP and WHO. 51-58., 1984.
121. Ramel C., Lambert B., and Magnusson J., /Eds./ Genetic toxicology of environmental chemicals, Part B.: Genetic Effects and Applied Mutagenesis, Alan R. Liss, Inc., New York, 1986.
122. Raport Rady Ochrony Srodowiska M. Krakowa "Problemy Ochrony Srodowiska w Wojewodztwie Miejskim Krakowskim. Krakow 1983.
123. Reinert R.A., Gray T.N.: The response of radish to nitrogen dioxide, sulfur dioxide, and ozone alone and in combination. - J. Environ. Qual., 10, 2, 1981.
124. Savage R.K.: Radiation-induced chromosomal aberrations in the plant *Tradescantia*; Dose - response curves. - Radiat. Bot., 15, 87 - 140, 1975.
125. Schairer L.A., et al.: 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 of Application of Short-term Bioassays in the fractionation and Analysis of Complex Environmental Mixtures. AM/78-2, 1977.
126. Schairer L.A., et al.: Exploratory monitoring of air pollutants to mutagenicity activity with the *Tradescantia* stamen hair system. - Environ. Health Perspect., 27, 15, 51-60m 1978.
127. 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. Klekowski, Jr. Praeger Publ. vol. II, 153 - 194, 1982.
128. 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.

129. Serres F.J. de: A comparison of the mutagenic effects of chemicals and ionizing radiation. in: 6th Res. Cong. Tokyo, 958 - 965, 1979.
130. Serres F.J. /Ed/ Chemical Mutagens, Vol. 10. Plenum Press New York, 1986.
131. 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.
132. 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.
133. Sparrow A.H., Schairer L.A.: The effects of chemical mutagens (EMS, DBE) and specific air pollutants (O₃, SO₂, NO_x, H₂O) on somatic mutation rates in *Tradescantia*. - Radiation Botany, 15, 161 - 188, 1975.
134. 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.
135. 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.
136. Sparrow A.H.: Mutational response in *Tradescantia* after accidental exposure to a chemical mutagen. - Environ. Newslett. 5, 16 - 19, 1971.
137. Sterner O. et al.: Forty-eight species screened for mutagenic activity in the Salmonella microsome assay. - Mutat. Res., 101, 269 - 281, 1982.
138. Szydłowski H., : Teoria pomiarów P.W.N. W-wa ,p.237,1981.
139. 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, 1978.
140. Tano S., and Yamaguchi H., Effects of Low-Dose Irradiation from 131 J on the Induction of Somatic Mutations in *Tradescantia* Radiation Research 80 , 549-555 ,1979.
141. Technical Information 192. Carcinogens and cancer suspect agents. Aldrich-Europe, A division of Janssen Pharmaceutica. N.V. B-2340 Beerse Belgium, May 1981.

142. Te-Hsiu-Ma: *Tradescantia* cytogenetic tests (roof-tip mitosis, pollen mitosis, pollen mother-cell meiosis). - Mutation Research, 99, 293 - 302, 1982.
143. Te-Hsiu-Ma: Micronuclei induced by X-rays and chemical mutagens in meiotic pollen mother cells of *Tradescantia*. - Mutat. Res., 64, 307 - 313, 1979.
144. Theile M.: Mutagenesis in mammalian cells induced by oncogenic DNA Viruses. - Biol. Zbl. 101, 321 - 348, 1982.
145. 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.
146. Underbrink A.G., Schairer L.A., Sparrow A.H.: *Tradescantia* stamen hairs: A radiobiological test system applicable to chemical mutagenesis. Chemical Mutgens: Principles and Methods for their Detection. Ed. by A. Hollaender, vol. 3, 171 - 207, Plenum, New York 1973.
147. 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.
148. Underbrink A.G., Huczowski J., Woch B., Godlek E., Cebulska-Wasilewsa A., Litwiniszyn M., Kasper E.: The relationship of different somatic mutations induced by neutrons and X-rays to loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. - Raport No. 1030/B Kraków 1978.
149. 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.
150. 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.
151. Underbrink A.G., Schairer L.A., Sparrow A.H.: The biophysical properties of ^{3.9}GeV Nitrogen Ions. Determinations of the relative biological effectiveness for somatic mutations in *Tradescantia*. - Rad. Res., 55, 437 - 446, 1973.
152. 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.

153. Underbrink A.G.: Relations between phenotypic aberrations and loss of reproductive integrity in *Tradescantia* stamen hairs. - Rad. Bot., 11, 473 - 481, 1971.
154. Van't Hof J.: Chemical L.A.: *Tradescantia* assay system for gaseous mutagens. Mutat. Res., 99, 303 - 315, 1982.
155. 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 F.J. de Serres. (unpublished data), 1977.
156. Varna 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. EORTC 8395 FN 439 - 450, 1983.
157. Wallace A.T.: Increasing the effectiveness of ionizing radiations in induced mutations at the vital locus controlling resistance to the fungus *Helminthosporium victoriae* in oats. The use of induced mutations in plant Breeding. 237, Rome, 1965.
158. Waters M.D., et al. Short-term bioassays in the analysis of complex environmental mixtures II. Environmental Science Research Vol. 22, 27, Plenum, New York 1983
159. Wigenhauser A., Schmahl W., Postnatal development and neoplastic disease pattern in NMRI mice after combined treatment with ethylnitrosourea and X-irradiation on different days of the fetal period. Int. J. Radiat. Biol. Vol. 51, No. 6, 1021-1029, 1987.
160. Wójcik P.: Zagrożenia ekologiczne. Polowanie klasy robotniczej w Polsce. Tom. 5. Akademia Nauk Społecznych Instytut Polna Klasy Robotniczej, Warszawa 1985
161. Yokoro K., et al.: Carcinogenic and co-carcinogenic effects of radiation in rat mammary carcinogenesis and mouse T-cell lymphomagenesis: review. Int. J. Radiat. Biol. Vol. 51, No. 6, 1069-1080, 1987.
162. Zaider A., Rossi H.H.: The synergistic effect of different radiation. - Radiation Research 83, 732 - 739, 1980.
163. Zoetelief J.: Dosimetry and biological effects of fast neutrons (ph. theses), 1981.