

Badania Toksykologiczne FRC001 (Eliksiru China No.1 Tian Xian) Poniższe materiały stanowią wyniki badań prowadzonych przez Centrum Badań Medycznych oraz Biologii Wolnych Rodników w Taipei na Tajwanie.

Przedmiot • Podstawa • Materiały i Metody • Wyniki i Omówienia • Bibliografia

Badania toksyczności FRC001 (Eliksiru China No.1 Tian Xian)

Robert W. Bradford D. Sc.a, Kexiang Ding
1. Bradford Research Institute , CA, USA
Professor of Capital University, Washington DC
2. FRC Free Radical Biology & Medical Research Center

PRZEDMIOT

Zgodnie z wskaźnikiem porównawczym, treścią i metodą badań toksykologicznych, przeprowadziliśmy na FR001 test ostrej toksyczności, test toksyczności skumulowanej, mikrojądrowy test erytrocytów polichromatycznych myszy, test aberracji spermy oraz test Ames. W wyniku badań, w przypadku FRC001 test ostrej toksyczności, test toksyczności skumulowanej i test Ames wykazały normalne wyniki, podczas gdy wskaźnik mikrojądrowy erytrocytów polichromatycznych i wskaźnik aberracji spermy były znacznie wyższe niż w grupie kontrolnej. Otrzymane rezultaty odzwierciedlają wartość bezpiecznego poziomu Edfrnn i dostarczają danych dotyczących dawkowania i sposobu podawania FRC001.

Słowa Kluczowe:FRC001;LD50;mutagenność;współczynnik aberracji; współczynnik mikrojądrowy.

powrót [w GÓRE](#)

PODSTAWA

Toksykologia głównie bada relacje pomiędzy toksycznością leków oraz ich składników, a ich fizykochemicznymi właściwościami, sposobem absorpcji, dystrybucji, przemiany oraz stopniem kumulacji i wydalania. Istnieją dwa rodzaje badań toksykologicznych: testy in vitro oraz testy in vivo. Ten pierwszy obejmuje test ostrej toksyczności, test toksyczności skumulowanej, test aberracji oraz test mutageniczności na żywych zwierzętach, drugi rodzaj badań obejmuje test mutageniczności na mikroorganizmach. By właściwie ocenić toksyczność FRC001 w aplikacjach klinicznych, dokładnie przebadaliśmy go pod względem toksykologicznym.

powrót [w GÓRE](#)

MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

1.1 Przedmiot : FRC001.

1.2 Zwierzęta eksperymentalne :

1.2.1 Mysz , gatunek kunowate, zdrowa, wiek 2~3 miesiące, płeć męska lub żeńska

1.2.2 Szczur, gatunek świstakowate, zdrowy, wiek 3~4 miesiące, 180~220g, płeć męska lub żeńska. Myszy i szczury dostarczone zostały przez Experimental Animal Center of Tongji University of Medical Science.

1.3 Obciążenie Eksperymentalne: Histidynowa dystrofia bakterią *Salmonella typhimurium*, TA98, TA100 oraz TA102 dostarczonymi przez Ames Laboratory of California.

2. Metody:

2.1 Test ostrej toksyczności: Zgodnie z metodą Horna 50 myszy podzielono losowo na pięć grup : jedną grupę kontrolną oraz cztery grupy aplikacyjne (21.5, 10.0, 4.64 oraz 2.15g/kg. wagi ciała). Każda grupa zawierała również po 10 szczurów - połowę płci męskiej i połowę żeńskiej. FRC001 rozcieńczono za pomocą wody destylowanej. Szczury jeden raz dziennie endogastrycznie karmiono lekiem przez kolejne dwa tygodnie.

2.2 Metoda zwiększanej dawki : Trzydzieści dwa szczury podzielono losowo na dwie grupy : kontrolną i eksperymentalną. Każda z grup liczyła po 16 szczurów - połowę płci męskiej a połowę żeńskiej. Szczury z grupy eksperymentalnej były karmione endogastrycznie dawkami FRC001 (3.0g/kg. wagi ciała), następnie zwiększono dzienną dawkę do 5.26 LD50 przez kolejne 30 dni. Grupie kontrolnej podawano w tym samym czasie normalny roztwór soli fizjologicznej w taki sam sposób jak grupie eksperymentalnej.

2.3 Test Mikrojądrowy : 50 myszy podzielono losowo na pięć grup : jedną negatywną grupę kontrolną, jedną grupę pozytywną i trzy grupy aplikacyjne (4.3, 10.8, 21.5g/kg. wagi ciała). Każda z grup liczyła po 10 myszy - połowę płci męskiej, połowę żeńskiej. Mysiom grupy negatywnej podawano endogastrycznie wodę destylowaną (5g/kg. wagi ciała), podczas gdy grupie pozytywnej wstrzykiwano śródtrzewnowo cyklofosfamidynę (cyclophosphamide)- 100mg/kg. wagi ciała, co zbijało je średnio po około 30 godzinach. Innym grupom podawano leki endogastrycznie raz dziennie przez kolejne cztery dni i zabijano je w piątym dniu eksperymentu. Następnie separowano ich mostek i zgniatano, w celu przygotowania z pozyskanego w ten sposób z szpiku kostnego wymazu erytrocytów polichromatycznych. Następnie przeliczono starannie wyseparowaną, jednostkową ilość erytrocytów polichromatycznych oraz jąder mikrokomórkowych.

Test aberracji spermy : Czterdzieści myszy płci męskiej podzielono losowo na pięć grup : grupę negatywną, grupę pozytywną oraz trzy grupy lecznicze (4.3 , 10.8, 21.5 g/kg. wagi ciała). Każda z grup liczyła po osiem myszy. Mysiom

grupy negatywnej podawano wodę destylowaną (21.5g/kg. wagi ciała I.G.), myszom w grupie pozytywnej podawano cyklofosfamidynę (cyclophosphamide)- 21.5g/kg. wagi ciała, a myszy w grupach leczniczych były karmione FRC001. Wszystkie z nich były karmione intragastrycznie jeden raz dziennie przez kolejne pięć dni, a następnie zabijane po 30 dniach normalnego karmienia. W dalszym toku eksperymentu, separowano ich najądrza i wkładano do 5 ml roztworu soli fizjologicznej, cięto na kawałki i przemywano przez 15 minut w wodzie o temperaturze 36.5 °C. Następnie starannie przeliczono całkowitą ilość plemników, oraz ilość plemników aktywnych w 200 sztukowej grupie. Na podstawie wykonanego wymazu obliczono współczynnik aberracji spermy.

2.5 Test Ames : FRC001 rozcieńczono w DMSO w pięciu różnych stężeniach: 1:50, 1:200, 1:500, 1:2000 and 1:5000. DMSO stanowiło kontrolny obiekt negatywny, podczas gdy Dexon i 2,7-diaminofluorene stanowiły pozytywne obiekty kontrolne. Dexon został użyty jako mutagen, a 2,7-diaminofluorene jako mutagen pośredni. Opis szczegółów można znaleźć w pozycji nr [4] załączonej bibliografii.

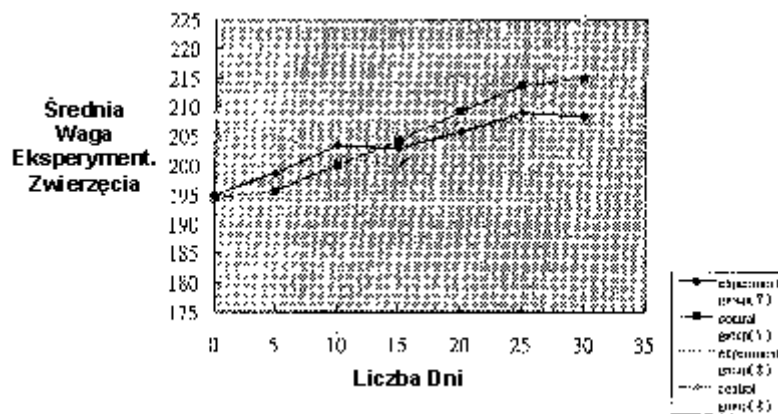
powrót [w GÓRE](#)

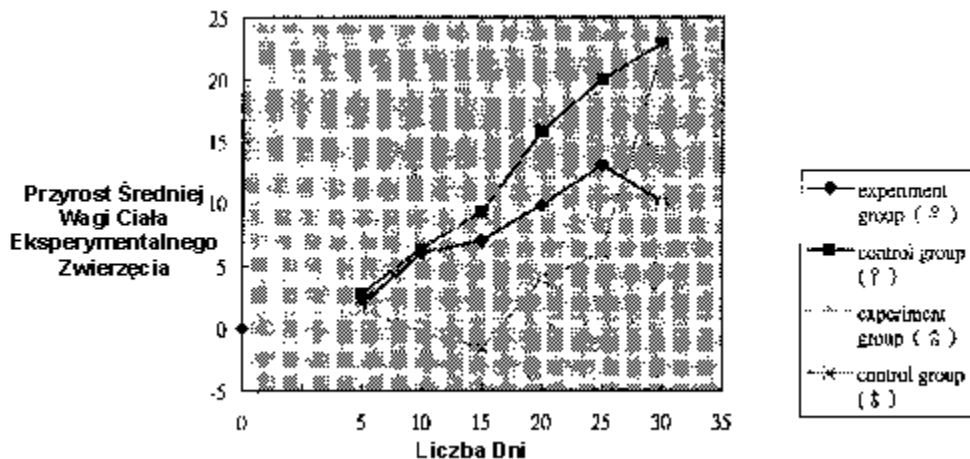
OMÓWIENIE UZYSKANYCH REZULTATÓW

1. Test ostrej toksyczności FRC001:

Test wykonano zgodnie z metodą ostrej toksyczności, Po dwóch tygodniach obserwacji , wszystkie zwierzęta karmione FRC001 nie wykazywały żadnych nienormalnych objawów. W normalny sposób przyjmowały pożywienie i napoje. Ich ciężar ciała nie wykazywał większych zmian. Żadne ze zwierząt nie padło w czasie trwania eksperymentu. Ilość LD50 z FRC001 w doustnym podaniu wynosiła 21.5g/kg.wagi ciała.

2.Test toksyczności skumulowanej Edfrnn





2.2 Wpływ na współczynniki głównych organów szczura (Tabela 1)

Numer Grupy	Współczynniki Organów (X ± SD)					
	Serce	Wątroba	Śledziona	Płuca	Nerki	
Kontrolna Eksperymentalna	16	0.45a0.04	3.96a0.60	0.38a0.07	0.96a0.30	0.85a0.08
6	0.44a0.05	4.14a0.39	0.38a0.07	1.03a0.26	0.88a0.06	

Tabela 1. Wpływ FRC001 na Współczynniki Głównych Organów Szczura

Różnica pomiędzy obiema grupami nie była znacząca, $P > 0.05$

Zgodnie z Tabelą 1. i wykresem 1,2, FRC001 nie powodował znaczącego wpływu na wagę ciała oraz przyrost średniej wagi ciała w ciągu kolejnych 30 dni intragastrycznej jego aplikacji. Przyjmowanie przez zwierzęta jedzenia oraz ich aktywność była zupełnie normalna. Nie stwierdzono żadnych reakcji toksycznych. Po badaniach patologicznych stwierdzono, że wszystkie organy wewnętrzne nie wykazywały żadnych odchyśleń od normy. Różnica pomiędzy grupą kontrolną, a grupą eksperymentalną była naprawdę nieznaczna ($P > 0.05$). Dawka skumulowana sięgała do 5.26 LD50 w ciągu 30 dni a żadne zwierze nie padło. Rezultaty te dowodzą, że FRC001 nie wykazuje żadnej skumulowanej toksyczności.

3. Wpływ FRC001 na jądra komórek szpiku kostnego myszy (wykres 3, 4)

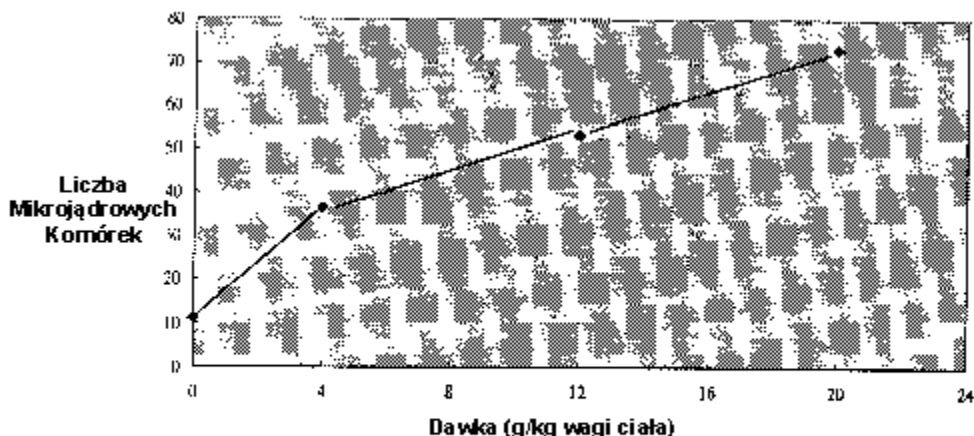


Tabela 3. Relacje pomiędzy Dawką FRC001 a Liczbą Mikrojądrowych Komórek

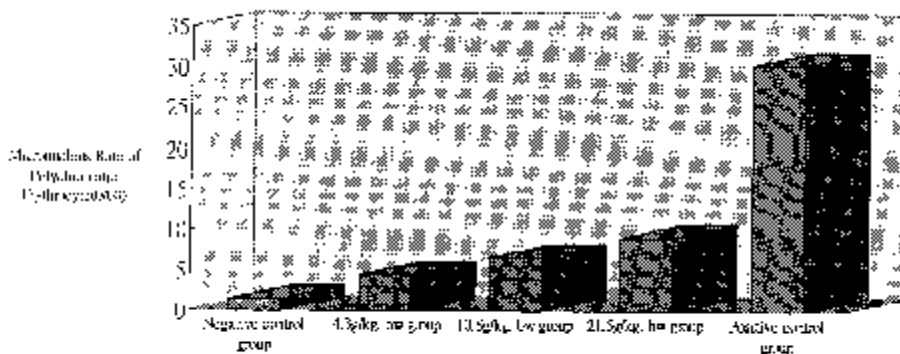


Tabela 4. Współczynniki Mikrojądrowe Wszystkich Grup

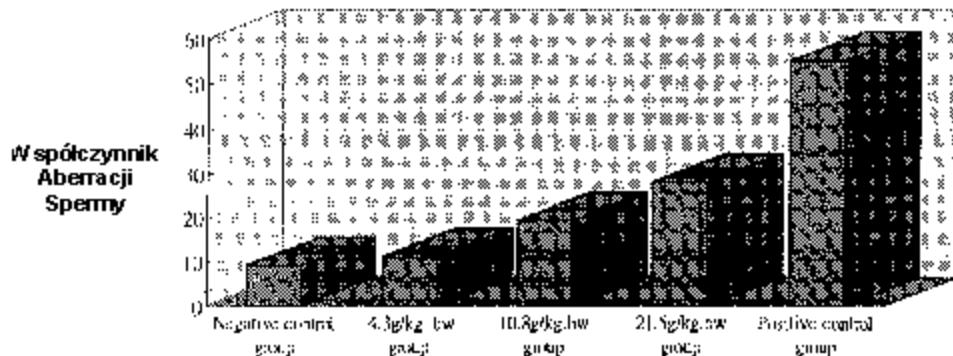
Generalnie w teście mikrojądrowym, mikrojądrowy współczynnik cyklofosforamidowy (w pozytywnej grupie kontrolnej) wyniósł 0~3%, ten sam współczynnik w negatywnej grupie kontrolnej był mniejszy od 3%. Zgodnie z wykresem 3 i 4, mikrojądrowe współczynniki w pozytywnej oraz negatywnej grupie kontrolnej wynosiły odpowiednio 30.3% i 1.4%. Otrzymane rezultaty wykazują niezawodność tego testu. Mikrojądrowy współczynnik w przypadku niskich, średnich oraz wysokich dawek FRC001 wyniósł odpowiednio 4.5%, 6.6%, 9.0%. Różnica pomiędzy grupami Edfrnn, a negatywną grupą kontrolną była bardzo znacząca. Udowadnia to, że FRC001 wykazuje mutageniczne oddziaływanie.

4. Wpływ FRC001 na aberrację spermy myszy (Wykres 5. i Tabela 2.)

Tabela 2. Wpływ FRC001 na Aberrację Spermy Myszy

Grupy	Ilość	Ilość Plemników	Ilość Aktywnych Plemników	Współczynnik Aberracji
Negatywna	8	237.1	158.9	9.3

4.3g/kg.m.c.	8	156.3	109.7	11.3
m.c.	8	253.0	177.5	19.4
21.5g/kg.	8	212.0	139.2	27.9
Pozytywna	8	378.9	263.1	55.1



Wykres 5. Wpływ FRC001 na Współczynnik Aberracji Sperm u Myszy

Zgodnie z Tabelą 2., współczynnik aberracji sperm u myszy, w przypadku trzech dawek FRC001 był w pozytywnej grupie kontrolnej wyższy, niż w grupie negatywnej. Ogólnie rzecz biorąc, współczynnik ten był podwójnie większy w grupie pozytywnej niż w negatywnej grupie kontrolnej. Pod koniec testu współczynnik aberracji sperm w grupie pozytywnej był już 6 razy większy niż. w grupie negatywnej, podczas gdy niskie, średnie i wysokie dawki FRC001 były 1,2 oraz 2,1 i 3 razy większe od tych w negatywnej grupie kontrolnej. Różnica była więc bardzo znacząca ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Doświadczenie to wykazało, że FRC001 wykazuje pewne szkodliwe i toksyczne działanie na dziedziczność zarażonych komórek.

5. Test Ames FRC001 (Tabela 3.)

Stężenie FRC001(ug)	MR (Rt/Rc)							
	TA97		TA98		TA100		TA102	
+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	+S-9	-S-9	
1/50	1.02	0.80	0.78	1.26	0.96	1.04	0.94	0.90
1/200	1.18	0.85	1.00	1.24	0.91	1.14	1.16	1.00
1/500	1.02	0.86	1.12	1.04	1.00	1.09	1.12	0.86
1/2000	1.08	1.02	1.25	1.13	1.02	1.13	1.29	1.26
1/5000	1.11	1.03	1.06	1.10	1.07	1.08	1.18	1.13
Dexon(50ug/)	-	11.30	-	15.70	-	4.33	-	3.55
2-AF	3.35	-	5.32	-	5.07	-	2.10	-
DMSO	-	1.14	-	0.74	-	0.96	-	0.84

Tabela 3. Wyniki testu Amesa FRC001

Zgodnie z Tabelą 3., używając łącznej metody wykonania testu Amesa dla FRC001, współczynnik (MR) kolonii mutagenicznych (Rt) oraz spontaniczna odwrotność zmutowanej kolonii (Rc) były niższe niż dwa. Rezultaty udowodniły, że FRC001 nie wskazywał żadnej stwierdzonej mutagenicności. MR w przypadku Dexonu i 2,7-diaminofluoronu były wyższe niż dwa i wskazywały na pozytywny wynik testu Amesa i ich mutageniczne działanie. MR z DMSO niższy niż dwa, wskazywał, że nie ma on mutagenicznego oddziaływania. Otrzymane rezultaty wskazują również na niezawodność wykonanego testu.

Konkludując, w badaniach toksykologicznych FRC001, zarówno test ostrej toksyczności, toksyczności skumulowanej i test Amesa wykazały, że otrzymane wyniki mieszczą się w granicach normy, podczas gdy test mikrojądrowy oraz test aberracji spermy wykazały ponadnormatywne wyniki. Ogólnie uważa się, że występowanie interfazy mikrojądra jest spowodowane działaniem mutagenu, np. gdy jądro składa się z kawałków chromosomów wskutek efektu działania mutagenu. Współczynnik mikrojądrowy jest zawsze ściśle powiązany z chromosomową aberracją. FRC001 powoduje wzrost współczynnika aberracji spermy u myszy, pokazując, że ma on potencjalnie szkodliwe działanie na dziedziczenie zarażonych męskich komórek. Zgodnie z procedurą oceny i toksykologiczną metodologią badania żywności i leków określoną przez odpowiednie agendy rządowe, przedmiot badań nie może otrzymać dopuszczającej na rynek, pozytywnej oceny, gdy otrzyma on dwa pozytywne wyniki w teście dziedziczenia toksyczności lub wykazuje oczywistą toksyczność w teście skróconego odżywiania. Jeżeli test skróconego odżywiania wykazuje podejrzenie pozytywnego wyniku, dopuszczenie zależy od ważności i zakresu potencjalnego spożycia przedmiotu badań. W przypadku FRC001, pozytywne wyniki testu mikrojądrowego oraz testu aberracji spermy mogą być związane z jego składnikami, interakcją poszczególnych składników oraz / lub tworzeniem się nowych produktów podczas przetwarzania FRC001. Sugerujemy Działowi Aplikacji zastanowienie się nad mutagenezą FRC001, w przypadku prowadzenia prób klinicznych. Należałoby przeprowadzić w przyszłości badania, które wykażą, czy toksyczność FRC001 może być jeszcze bardziej zmniejszona poprzez ścisłą kontrolę dawkowania i częstszą administrację mniejszych dawek tego środka.

powrót [w GÓRE](#)

BIBLIOGRAFIA

[1] Qian Jiaqing, Song Ruikun, The Materia Medica and Toxicology Basis. 1st Edition , The People's Medical Publishing House, Beijing, 1986,258

[2] Ding Kexiang, Song Ruikun, The Acute Toxicity Test of SOD Atomic Energy Press , Beijing, 1991:84

- [3] Ding Kexiang, Yao Shuren, Song Ruikun, The Cumulative Toxicity Test of SOD Complex Enzyme and Its Preparation, Application Study on SOD, Atomic Energy Press, Beijing, 1991,94
- [4] Qian Jiaqing, Song Ruikun, Pharmacology and Toxicology Basis, The People's Medical Publishing House, Beijing, 1986,225
- [5] Yu Shouyang, Liu Yugu, Animal Experiment in the Food Toxicologic study, The People's Medical Publishing House, Beijing,1981:379~383
- [6] Cai Hong Dao, Wan Jialing, Enviromental Microorganism, Tongji University of Medical Science Press, Wuhan, 1987:269~275
- [7] Ding Kexiang, Ames test of SOD Complex Enzyme and its Preparation, Application Study on SOD, Atomic Energy Press, Beijing, 109~113
- [8] Zhu Honghong, Huang Xingshu, PCD Method and Its Application in the study of the Influence of Exogenous Hormone on PCD of Testicular Cells. Canceration, Aberration Mutation 1997,9(1):23
- [9] Yang Enpu, Yang Cangzhen, The Aberration Effects of Lead and X-ray on rats. Canceration Aberration Mutation 1996,8(6): 18
- [10] Zhang Chen, Yao Hua, Ling Bing, et al. The Effects of Arsenic on Reproduction and Filial Generation Development of Rats. Canceration. Aberratin Mutation, 1997,9(1):32
- [11] He Qingyu, Yin Muquan, Lu Dun, et al. Study of the Aberration of on Rats Canceration Aberration Mutation, 1997,9(1)38
- [12] Liu Yugu, Health Toxicology Basis, The People's Medical Publishing House, Beijing, 1996; 56
- [13] Maron D. M. et al. Revised methods for the Salmonella Mutgenicity Test. Mutation Res, 1983;113:173-190
- [14] Blakey BR. Et al. The Effect of Methylmerury Tetrathyl lead and sodium arsente on the humoral immune respone in mice. Toxicol Appl Pharmacol. 1980,52(2):245
- [15] Koller LD. Chemical induced immunomodulation. J Am Vet Med Assoc. 1982, 181(10): 1102
- [16] The Health Ministry of China, The Estimation Procedure and Method of Toxicology and Safety of Food, 1994,8:10
- [17] Eudak E. Jacobs PA, Yangangimachi R, et al. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. Nature, 1978; 274:911

- [18] Martin RH, Hildebrand K, Yamamoto J, et al An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. *Mutat res*,1986; 14:219
- [19] Brandriff B, Gordon LA, Sharlip I, et al. Sperm chromosomal analysis in a survivor of seminoma and associated radiotherapy. *Environ Mol Mutagen*, 1987;9(Suppl 8):19
- [20] Jenderny J, Rohrborn G. Chromosome analysis of human sperm. 1. First results with a modified method, *Hum Genet*, 1987;76:385
- [21] Genesca A, Miro R, Caballin MR, et al. Sperm chromosome studies in individuals treated for testicular cancer. *Ilum Reprod*, 1990;5(3):286
- [22] Kamiguchi Y, Tateno H, Shimada M, et al. X-ray induced chromosome aberrations in human spermatozoa. In: Mohri H, ed. *New Horizons in Sperm Cell Research*. New York: Japan Sci Soc Press, Tokyo/Gordon and Breach Sci Publ, 1987:117-123
- [23] Kamiguchi Y, Tateno H, Mikamo K. Dose-response relationship for the induction of structural chromosome aberrations in human spermatozoa after in vitro exposure to tritium β -rays. *Mutat Res*. 1990;228:125
- [24] Brandriff BF, Gordon LA, Ashworth LK, et al. Chromosomal aberrations induced by vitro irradiations: Comparison between human sperm and lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 1988;12(2)167
- [25] Kamiguchi Y, Tateno H, Mikamo K. Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X-irradiated in vitro. *Mutat Res*, 1990;228:133
- [26] Yanagimachi R, Katayose H, Matauda J, et al. Stability of mammalian sperm nuclei. In: Spera G et al, eds. *Molecular and cellular biology of reproduction* New York: Raven Press, 1992:157-168
- [27] Lauria A, Gandolfi F. Recent advance in sperm cell mediated gene transfer. *Molecular Reproduction and Development*, 1993;36:255
- [28] Kaufman MH, Analysis of the first cleavage division to determine the sex-ratio and incidence of chromosome anomalies at conception in the mouse, *J Reprod Fertil*, 1973;35:67-72
- [29] Martin-Deleon PA, et al. Spontaneous heteroploidy in one-cell mouse embryos. *Cytogenet Cell Genet*, 1983;35:57-63

- [30] Akira Nishio. Sister - chromatid exchange and chromosomal aberrations by DHAQ and related anthraquinone derivatives in Chinese hamster ovary cells. *Mutat Res*,1982;101:77
- [31] Kaufman MH. Analysis of the first cleavage division to determine the sex-ratio and incidence of chromosome anomalies at conception in the mouse. *J Eprod Fertil*, 1973;35:67
- [32] Martin-Deleon PA, et al. Spontaneous heteroploidy in one-cell mouse embryos. *Cytogenet cell Genet*, 1983;35:57
- [33] Dunkel VC, et al. Comparative neoplastic transformation responses of Balb/3T3 cell, syrian hamster embryo cells and Rauscher Murine leukemin Virus-infected Fisher 344 rat embryo cells to chemical compounds. *INCI*, 1981;67:1303
- [34] Tates AD, Dietrich AJJ, de Voger N, et al. Micronucleus method for detection of meiosis micronuclei in male germ cells of mammals. *Mutat Res*, 1983;221:131-138
- [35] Lahdetie J, Parvinen M. Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat. *Mutat Res*, 1981;81:103-115
- [36] Oakberg EF. Duration of spermatogenesis in the mouse. *Nature* (London), 1957; 180:1137-1138
- [37] Maron BM, et al. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 1983;113(3):173
- [38] Matsuoka A, et al. Chromosomal aberrations tests on 29 chemicals combined with S9 mix in vitro. *Mutat test*, 1979:66(3):277
- [39] Jones PD, et al. Efficiency of fluconazole in cryptococcal meningitis. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 1989:12(4Suppl)235s
- [40] Lee JW, et al. Safety and pharmacokinetics of fluconazole in children with neoplastic diseases, *Pediatr*.1992:120(6):987
- [41] Vicki L, et al. Review of the mutagenicity of ethylene oxide. *Environmental and molecular mutagenesis*, 1990:16:85-103
- [42] Ehrenberg L and Bowman Ko. Tables for determining the statistical significance of mutation. *Mutat Res*,1970:9:527-549
- [43] Kastenbaum MA and Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation. *Mutat Res*. 1970:9:527-549

- [44] Riberio LR, et al. Cytogenetic effects of inhaled ethylene oxide in somatic and germ cells of mice. *Arch. Toxicol* 1987;59:332-335
- [45] Tates AD, et al. Biological and chemical monitoring of occupational exposure to ethylene oxide. *Mutat Res*,1991,250:493-497
- [46] Hogstedt B, et al. Chromosome aberrations and micronuclei in bone marrow cells and peripheral blood lymphocytes in humans exposed to ethylene oxide. *Heredites*, 1983;98:105-113
- [47] Symons JM et al. National organics reconnaissance survey for halogenated organics. *Water works Assoc.*, 1975:67(11):634
- [48] Puck TT, et al. Clone growth of mammalian cells in vitro growth characteristics of colonies from single hela cells with and without "Feeder" layer. *J Exptl Med*, 1956:103:273
- [49] Dipaolo JA, et al. Transformation of hamster cells in vitro by polycyclic hydrocarbons without cytotoxicity. *Proc Nat Acad Sci U.S.A.* 1971:68(12):2958
- [50] Bruce cc. Et al. Enhancement of adenovirus transformation by pretreatment of hamster cells with carcinogenic polycyclic hydrocabons. *Cancer Res*, 1973:33:819
- [51] Dipaolo JA, et al. Quantitative studies of in vitro transformation by chemical carcinogens. *J Nat Cancer Inst*, 1965:35:867
- [52] Geoge EM, et al neoplastic transformation of human epithelial cells in vitro after exposure to chemical carcinogens. *Cancer Res*. 1981:41:5096
- [53] Dipaoli JA, et al. In vitro transformation of syrian hamster embryo cells by diverse chemical carcinogens. *Nature*, 1972:235:278
- [54] Maron DM, BN Ames. Revised methods for the Salmonella Mutagenicity test. *Mutat Res*, 1983:113:173
- [55] Quillardet P. Hofnung. M, The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial asay for genotoxins procedures. *Mutat Res*, 1985:147:65
- [56] Memahon RE, Cline JC, Thmopson, CZ. Assay of 855 test chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Cancer Res*. 1979:39(3):682
- [57] Rudak E, Jacobs PA, Yanagimachi R, et al. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. *Nature*, 1978:274:911

- [58] Martin RH, Hildebrand K, Yamamoto J, et al. An increased frequency of human sperm chromosomal abnormalities after radiotherapy. *Mutat Res*. 1986;174:219
- [59] Brandriff B, Gordon LA, Sharlip I, et al. Sperm chromosomal analysis in a survivor of seminoma and associated radiotherapy. *Environ Mol Mutagen*, 1987;9(Suppl 8):19
- [60] Jenderny J, Rohrborn G. chromosome analysis of human sperm. I. First results with a modified method. *Hm Genet*, 1987;76:385
- [61] Genesca A, Miro R, Caballin MR, et al. Sperm chromosome studies in individuals treated for testicular cancer. *Ilum Reprod*, 1990;5(3):286
- [62] Kamiguchi Y, Tateno H, Shimada M, et al. X-ray induced chromosome aberrations in human spermatozoa. In: Mohri H, ed. *New Horizons in Sperm Cell Research* New York :Japan Sci Soc Press. Tokyo/Gordon and Breach Sci Publ. 1987:117-123
- [63] Brandriff BF, Gordon LA, Ashworth LK, et al. Chromosomal aberrations induced by vitro irradiation: L comparison between human sperm and lymphocytes. *Environ Mol Mutagen*, 1988;12(2):167
- [64] Kamiguchi Y, Tateno H, Mikamo K. Types of structural chromosome aberrations and their incidences in human spermatozoa X-irradiated in vitro. *Mutat Res*, 1990;228:133
- [65] Kamiguchi Y, Tateno H, Mikamo K. Micronucleus test in 2-cell embryos as a simple assay system for human sperm chromosome aberrations. *Mutat Res*, 1991;252:297
- [66] Yanagimachi R, Katayose H, Matsuda J. et al. Stability of mammalian sperm nuclei. In: Spera G et al. eds. *Molecular and cellular biology of reproduction*. New York; Raven Press, 1992:157-168