

## ICR마우스에서 phenytoin의 최기형성 및 dimethyl sulfoxide의 항최기형 효과

이재권 · 이창업 · 이문한 · 류판동 · 조명행\* · 성하정 · 박진봉

서울대학교 수의과대학  
(1994년 8월 22일 접수)

### Teratogenicity of phenytoin in ICR mouse and antiteratogenic effect of dimethyl sulfoxide

Jae-kwon Lee, Chang-eop Lee, Mun-han Lee, Pan-dong Ryu

Myung-haing Cho\*, Ha-jung Sung, Jin-bong Park

College of Veterinary Medicine, Seoul National University

(Received Aug 22, 1994)

**Abstract :** Phenytoin(PHT), a commonly prescribed anticonvulsant, has been known as a teratogen in experimental animals and human. However, PHT has strain-specific teratogenic effects for mice and human. Dimethyl sulfoxids(DMSO) has been known to antagonize the teratogenic effects of secalonid acid D, a toxic mold metabolite that has similar teratogenic effects to PHT. Therefore, this study was performed to examine the embryopathic effects of PHT in terms of treatment period and the antiteratogenic effect of DMSO in ICR mice. PHT(75mg/kg, BW) was administered intraperitoneally on day 10, 10-11 and 10-12 of gestation with or without DMSO(2ml/kg, BW), and the fetal malformation was observed on day 18. Major malformation of fetuses treated with PHT on day 10, 10-11 and 10-12 of gestation was cleft palate, and the percentages of fetus with cleft palate were 14.5%, 31.7% and 51.7%, respectively. Also, there was a significant decrease of cleft palate from 51.7% in PHT alone group to 30.8% in PHT plus DMSO group. Our findings suggest that cleft palate is one of major malformation by PHT treatment in ICR mouse and DMSO has strong antiteratogenic effect.

**Key words :** phenytoin, cleft palate, dimethyl sulfoxide, antiteratogenicity

## 서 론

항경련제인 phenytoin(PHT; diphenylhydantoin; dilantin)은 비교적 독성이 적고 효과가 우수하기 때문에 일반적으로 처방되고 있으나 실험동물 및 사람에서 임신 특정 시기에 모체에 투여시 태아에 기형을 유발하는

것으로 알려져 있다<sup>1,6</sup>. 실험동물 모델인 마우스에서는 주된 기형이 구개열(cleft palate)과 구순열(cleft lip)로 표적부위가 구개안면부이고<sup>5,7</sup>, 계통에 따라 구개열 유발의 민감도에 많은 차이를 보이는데 A/J 마우스는 매우 감수성이 높고 C57BL/6J 계통의 마우스는 저항성이 있는 것으로 알려져 있다<sup>8,11</sup>.

\* Address all correspondence to Dr Myung Haing Cho, College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Suwon, 441-744, Korea

PHT의 구개열 유발 기전은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으나 PHT에 의하여 마우스에서 나타나는 주된 기형인 구개열은 실험적으로 구개열을 유발하기 위하여 흔히 쓰이고 있는 glucocorticoid에 의한 것과 여러 측면에서 동일성이 있어 두 물질이 유사한 기전으로 구개부의 정상적인 발생 및 형성을 방해하는 것으로 추측되어지고 있다<sup>12,14</sup>. Hansen et al<sup>15</sup>은 기형을 유발하는 용량의 PHT를 기형 유발에 민감한 A/J 마우스에 투여하면 모체 혈장 corticosterone 농도가 48 시간 정도 지속적으로 증가하나 낮은 용량을 투여하였을 때 저항성이 있는 계통인 C57BL/6J 마우스에 동일 용량을 투여하는 경우에는 corticosterone의 증가 정도와 지속 기간이 짧음을 관찰하여 이를 바탕으로 기형 유발은 모체에서 증가되는 corticosterone과 관련이 있을 것으로 사료된다고 보고하였다.

한편 Eldeib와 Reddy<sup>16,17</sup>는 PHT와 마찬가지로 임신 특정 시기에 투여할 때 모체에서 corticosterone을 증가시키며 아울러 태아에 구개열을 일으키는 물질의 하나인 secalonic acid(SAD)의 독성실험 중 용매로 사용한 dimethyl sulfoxide(DMSO)가 SAD의 기형 유발을 감소시키는 효과가 있음을 확인하였으며, 이 때 DMSO는 SAD에 의하여 모체에서 증가된 corticosterone 농도를 저하시키는 작용이 있는 것으로 보아 SAD에 의한 기형이 모체의 corticosteron에 의하여 매개될 수 있다고 보고 하였다.

따라서 본 연구에서는 독성실험에 흔히 쓰이고 있으나 아직까지 PHT에 의한 기형 유발에서 계통별 민감도가 명확하게 알려져 있지 않은 ICR 마우스를 대상으로 PHT의 투여 기간에 따른 기형을 조사하여 PHT에 의한 기형 유발에서 ICR 마우스의 계통별 민감도를 밝히고, 투여 기간이 주된 기형에 미치는 영향을 확인하였다. 그리고 PHT의 기형유발에 대해 DMSO가 항최 기형효과가 있는지의 여부를 확인하였다.

## 재료 및 방법

**실험 동물 :** 생후 6 주령 된 ICR 마우스를 서울대학교 실험동물사육장에서 분양받아 8-12 주령까지 사육실 조건에 적응시키면서 성숙시켜 실험에 사용하였다. 사육 및 실험 기간 동안의 환경은 온도 20±3℃, 습도 65±10% 범위였고 명암 주기는 12 시간으로(점등: 오전 7시, 소등: 오후 7시) 자연 조명과 인공 조명을 함께 사용하였으며, 사료(실험동물용, 삼양사) 및 음수(수도물)는 자유 급식시켰다. 사육 상자에는 일반적인 깔집

을 사용하였다. 수컷 1 마리와 암컷 2 마리를 오후 7시에 합사시킨 후 다음 날 아침 질전(vaginal plug)이 확인되는 개체를 임신 0일로 하였다.

**실험 동물군의 구성 :** 실험 동물은 용매 대조군, PHT의 투여 기간에 따른 기형 유발 정도를 보기 위하여 PHT를 1일(임신 10일), 2일(임신 10-11일), 3일(임신 10-12일)동안 투여한 군 및 PHT의 기형 유발에 대한 DMSO의 영향을 보기 위하여 DMSO(Yakuri사, Japan)와 PHT를 임신 10-12일에 동시 투여한 군 등 모두 5개군으로 나누었다. 마우스는 평균 체중에 가까운 개체들이 적절하게 분산되도록 무작위법으로 군 분리를 하였다.

**실험 물질의 투여 :** PHT(Sigma)은 증류수에 현탁시킨 후 1N NaOH 용액으로 pH를 11로 조정하면서 완전 용해시켜 가장 민감한 계통의 마우스에서 거의 100%의 태자에 기형을 유발하는 용량인 체중 kg당 75mg(10ml)을 매일 오전 9시에 복강내로 주사하였으며, 용매 투여군에 대하여는 pH를 11로 조정한 증류수를 같은 용량 비율로 주사하였다. PHT와 DMSO를 동시 투여하는 실험군에 대하여는 증류수로 20%(v/v) DMSO용액을 만든 후 PHT를 현탁시켜 1N NaOH 용액으로 pH를 11로 조정하여 완전 용해시킨 후 복강내로 주사하였다. 이 때 DMSO의 용량은 체중 Kg당 2ml였다.

**기형 검사 :** 임신 18일에 pentobarbital로 모체를 마취시키고 제왕절개하여 착상, 흡수, 사산, 생존 태자의 수를 확인한 후 태자의 무게를 측정하였으며, 모든 생존 태자에 대하여 육안적으로 외부 검사를 하였다. 생존 태자 중 3/4을 Bouin's solution에 2 주간 고정하고 Barrow와 Willson 방법의 병용법<sup>18</sup>에 준하여 연조직 검사를 그리고 나머지 1/4의 태자에 대하여는 일반적인 Double-staining<sup>19</sup>을 이용하여 골격 이상 유무를 관찰하였다.

**통계 처리 :** Chi-square test의 컴퓨터 프로그램(PHARM/PCS)을 이용하여 P<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

**태아의 생존 및 체중에 대한 영향 :** PHT 투여에 의한 태아의 흡수 비율은 임신 10일, 10-11일 및 10-12일 투여군에서 각각 17.07%, 12.11% 및 7.74%로 모두 용매 대조군의 0.70%에 비하여 유의성 있게 증가되었으나(P<0.05) 투여 기간에 따른 영향은 관찰되지 않았다. DMSO

(2ml/kg, BW)를 동시에 투여한 실험군에서는 4.69%로 태아 흡수의 억제 효과를 관찰할 수 있었다(Table 1).

사산 태아의 비율은 임신 10-11일 투여군에서 4.21%로 용매 대조군의 0%와 비교할 때 유의성 있게 증가하였으나(P<0.05) 투여 기간에 따른 영향은 관찰되지 않았으며, DMSO의 동시 투여군에서는 유의성 있는 영향이 나타나지 않았다(Table 1).

태아의 무게를 측정된 결과 임신 10-11일 및 10-12일 투여군에서 각각 1.20±0.01g, 1.25±0.01g으로 용매 대조군과 비교하여 유의성 있게 감소하였고 (P<0.05), DMSO 동시 투여에 의하여 체중 감소가 약간 완화 되기는 하였으나 유의성은 인정되지 않았다(Table 1).

외부 기형 : 외부 기형은 주로 전지 굴곡(Fig 6), 후지 내전(Fig 7), 후지 외전(Fig 8)으로써 전·후지에 나타났으며 그 밖에 임신 10-11일 투여군에서 피하출혈, DMSO 동시 투여군에서 개안(Fig 5)이 관찰되었다(Table 2). 전지 굴곡의 경우 PHT의 투여 기간에 따라 증가하는 경향을 보여 임신 10-12일 투여군의 경우 태자의 4.58%에서 관찰되어 용매 대조군과 비교하여 유의성 있게 증가 하였으며(P<0.05), DMSO의 동시 투여군에서는 한 마리의 태자에서도 관찰되지 않아 유의성 있게 감소하였다(P<0.05). 후지 내전과 외전은 10-12일 투여군에서 각각 3.27%의 태자에서 관찰되었으며 투여 기간에 따라 증가하는 경향을 보였으나 용매

Table 1. Statuses of fetuses from the dams treated with PHT (75mg/kg, BW), with or without DMSO (2ml/kg, BW) on day 10, 10-11 and 10-12 of gestation

	Vehicle control	PHT 75mg/kg in gestation day			PHT 75mg/kg+ DMSO 2ml/kg in gestation day
		10	10-11	10-12	10-12
No of litters	12	11	17	14	13
No of implantation	142	123	190	168	128
No of resorptions	1(0.70)	21*(17.07)	23*(12.11)	13*(7.74)	6*(4.69)
No of dead fetuses(%)	0	0	8*(4.21)	2(1.19)	4(3.13)
No of living fetuses	141	102	159	153	118
Fetal weight (Mean±SE)	1.29 ±0.01	1.28 ±0.02	1.20* ±0.01	1.25* ±0.01	1.23 ±0.02

\* Significantly different from vehicle control (p<0.05).

\*\* Significantly different from PHT (75mg/kg, BW) in gestation day 10-12 (p<0.05).

Table 2. External abnormalities of fetuses from dams treated with PHT (75mg/kg, BW), with or without DMSO (2ml/kg, BW) on day 10, 10-11 and 10-12 of gestation

	Vehicle control	PHT 75mg/kg in gestation day			PHT 75mg/kg+ DMSO 2ml/kg in gestation day
		10	10-11	10-12	10-12
No of fetuses examined	141	102	159	153	118
Open eye(%)	0	0	0	0	1(0.85)
Flexure of forelimb(%)	0	1(0.98)	2(1.26)	7*(4.58)	0**
Hindlimb adduction(%)	0	0	0	5(3.27)	1(0.85)
Subcutaneous hemorrhage(%)	0	0	1(0.63)	5(3.27)	0
	0	0	2(1.26)	0	0

\* Significantly different from vehicle control (p<0.05).

\*\* Significantly different from PHT (75mg/kg, BW) in gestation day 10-12 (p<0.05).

대조군과 유의성있는 차이를 나타내지 않았다. DMSO의 동시 투여에 의해 후지 내전의 경우 0.85%로 후지 외전의 경우 2%로 감소하였다.

연조직의 기형 : 연조직 기형으로는 구개열(Fig 1b, 2b), 구순열(Fig 1c, 4), 무안구증, 수두증, 횡경막 허니아, 수신증, 자궁의 위치이상 등이 관찰되었다(Table 3). 구개열은 임신 10일, 10-11일, 10-12일, 투여군에서 각각 14.47%, 31.67%, 51.69%의 태아에서 나타나 주된 기형으로 관찰되었고 투여 기간에 따라 증가하였으며, DMSO의 동시 투여에 의해 대조군인 10-12일 투여군의 51.69%에서 30.77%로 유의성있게 감소되었다( $p<0.05$ ). 구순열의 경우 임신 10일 투여군에서 7.39%를 나타내었으며 구개열을 동반하고 있었다. 무안

구증은 임신 10일 투여군에서 11.84%, DMSO 동시 투여군에서 12.09%가 나타나 DMSO 투여가 무안구증을 증가시키는 경향이 있었다. 횡경막의 허니아로 인하여 복강 장기인 위장이 흉강내에 형성된 것이 DMSO 동시 투여군에서 4.40%가 관찰되었으며, 수신증은 임신 10일 투여군에서 6.58%의 태자에 관찰되어 용매 대조군과 비교하여 유의성 있는 증가를 보였으나( $p<0.05$ ) 투여 기간에 따른 영향은 없었다.

골격 기형 : 골격 기형으로는 14 늑골, 두개골 골화 지연, 지골의 골화지연 등이 관찰되었으나 2.56%-8.57% 정도로 모두 대조군과 비교하여 유의성은 인정되지 않았다(Table 4).

Table 3. Soft tissue abnormalities of fetuses from dams treated with PHT (75mg/kg, BW), with or without DMSO (2ml/kg, BW) on day 10, 10-11 and 10-12 of gestation

	Vehicle control	PHT 75mg/kg in gestation day			PHT 75mg/kg+ DMSO 2ml/kg in gestation day
		10	10-11	10-12	10-12
No of fetuses examined	105	76	120	118	91
Cleft palate(%)	0	11*(14.47)	38*(31.67)	61*(51.69)	28***(30.77)
Cleft lip(%)	0	6*(7.39)	3(2.50)	4(3.39)	1(1.10)
Anophthalmia(%)	0	9*(11.84)	2(1.67)	3(2.54)	11***(12.09)
Hydrocephalus(%)	0	1(1.32)	1(0.83)	2(1.69)	0
Diaphragmatic hernia(%)	0	1(1.32)	0	0	4***(4.40)
Hydronephrosis(%)	0	5*(6.58)	1(0.83)	0	2(2.20)
Abnormal position of uterus(%)	0	0	1(0.83)	0	0

\* Significantly different from vehicle control ( $p<0.05$ ).

\*\* Significantly different from PHT (75mg/kg, BW) in gestation day 10-12 ( $p<0.05$ ).

Table 4. Skeletal abnormalities of fetuses from dams treated with PHT (75mg/kg, BW), with or without DMSO (2ml/kg, BW) on day 10, 10-11 and 10-12 of gestation

	Vehicle control	PHT 75mg/kg in gestation day			PHT 75mg/kg+ DMSO 2ml/kg in gestation day
		10	10-11	10-12	10-12
No of fetus examined	36	26	39	35	27
14th rib (%)	2(5.56)	0	1(2.56)	3(8.57)	1(3.70)
Delayed ossification of skull (%)	0	0	1(2.56)	0	1(3.70)
Delayed ossification of phalanges (%)	0	0	0	0	1(3.70)

## 고 찰

PHT는 일반적으로 처방되고 있는 항경련제로 Kelly<sup>1</sup>에 의하면 미국에서 전체 태아의 0.33%가 임신 기간에 생명 및 임신 유지를 위하여 항경련제를 복용하는 간질환자로부터 출생되며, 정상 모체에서 출생하는 태아와 비교하여 높은 비율이 사람의 태아에서 가장 흔하게 관찰되는 기형의 하나인 구개열<sup>20</sup>을 포함한 선천적 기형을 유발시킨다고 한다. 따라서 PHT를 비롯한 다양한 물질과 환경 요인을 실험 동물에 적용하여 구개열 발생을 확인하고 그 기전을 밝히기 위한 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

마우스는 실험 동물 중 PHT와 glucocorticoid에 의한 구개열 유발에 가장 민감한 종이며 계통별로 그 차이가 알려져 있어 PHT의 기형 유발 기전 연구에 흔히 사용되고 있다. Harbison과 Becker<sup>5,21</sup> 그리고 Finnel et al<sup>7</sup>은 마우스에서 PHT에 의한 주된 기형이 구개안면부에 나타난다고 하였으며 Ha sen et al<sup>15</sup>은 임신 10일에 PHT (75mg/kg, BW)을 A/J 마우스의 복강 내에 주사했을 때 96%의 태아에서 구개안면부 이상(구개열, 구순열)이 유발되었다고 보고하였고, Hansen과 Hodes<sup>8</sup>는 B6 마우스에서 임신 10-12일에 같은 용량과 방법으로 투여했을 때 0.7%의 태아에 구개안면부 이상이 나타난다고 보고하였다. 본 실험에서는 계통별 민감도가 알려져 있지 않은 ICR 마우스를 대상으로 체중 kg당 75mg의 PHT를 임신 10일, 10-11일, 10-12일에 매일 복강내로 투여하였을 때 각각 14.47%, 31.67%, 51.69%의 태아에서 구개열이 나타나 가장 민감도가 높은 것으로 알려진 A/J 마우스 보다는 낮고 B6 계통 보다는 높은 빈도를 보였다. 구개열은 각각의 투여 기간에 따라 나타난 모든 연조직 기형의 33.3%, 82.6%, 87.1%로써 주된 기형으로 확인되었으며, 투여 기간에 따라 그 발생율이 증가하는 경향을 보임으로써 투여 용량 뿐 아니라 투여 기간도 구개열 유발에 중요한 변수임을 알 수 있었다. 또한 구개열 이외의 기형은 투여 기간에 의존하여 증가되지 않아 PHT는 전형적인 구개열 유발 물질임을 확인할 수 있었다.

구개열의 발생 기전에 관하여는 Walker와 Fraser<sup>22</sup>에 의하여 처음으로 cortisone을 이용한 연구가 시작된 이래 대부분이 glucocorticoid 호르몬을 대상으로 수행되었으며, 구개열 유발에서 glucocorticoids와 유사성 및 연관성을 가진 PHT에 대한 연구가 활발하게 진행되어 왔다.

태아에서 구개열을 유발하는 물질 및 외부 인자 중 몇몇은 모체에서 혈중 corticosteroid 수준을 높이는 작용이 알려져 있는데 이와 같은 것들에는 본 실험에서

사용된 PHT<sup>15</sup>을 포함하여 caffeine<sup>23</sup>, diazepam<sup>24</sup>, orciprenaline sulfate<sup>25</sup>, SAD<sup>17</sup>등의 물질과 절수, 절식, 운동제한 등의 각종 스트레스<sup>24</sup>가 있다. SAD는 곰팡이 독소의 하나로 임신 특정 기간에 모체에 노출되면 혈장 corticosterone의 농도가 증가하며<sup>17</sup>, 아울러 태아에서 구개열이 나타나지만<sup>27</sup> DMSO를 투여 용매로 사용하면 구개열 유발이 감소되는 것으로 보고된 바 있다<sup>16</sup>. 그 후 모체의 corticosterone 증가와의 연관성을 조사한 실험에서 DMSO를 용매로 사용했을 때 SAD에 의해 증가된 corticosterone 수준이 낮아지는 것을 확인하여 SAD에 의한 구개열 유발이 모체에서 증가된 corticosterone에 의하여 일으켜진다고 제안되었다<sup>17</sup>. 본 실험에서는 SAD와 유사하게 구개열을 일으키고 모체에서 corticosterone을 증가시키는 PHT를 DMSO와 함께 투여한 후 태아의 구개열 유발 정도를 PHT 단독 투여시와 비교하였다. 체중 kg당 75mg의 PHT를 단독으로 임신 10-12일에 ICR 마우스의 복강내로 주사하였을 때 51.7%의 태아에서 구개열이 나타났으나 체중 kg당 2ml의 DMSO를 함께 투여했을 때는 30.8%로 감소되어 DMSO는 PHT에 의한 구개열 유발을 억제함을 확인할 수 있었다(Table 3).

PHT 투여에 의하여 유발된 태아의 구개열에 대한 DMSO의 억제 작용 기전은 다음의 몇 가지로 추정할 수 있다. 우선 DMSO는 구개부 형성에 대하여 직접적으로 작용할 수 있다. 구개의 형성 과정 중 구개관이 수직 방향에서 수평방향으로 재정위 되는 시기에 구개관을 구성하는 세포내 3', 5'-cyclic adenosine mononucleotide (cAMP)의 일시적 증가가 일어나는데<sup>28,29</sup>, 구개열을 일으키는 물질인 glucocorticoid, caffeine, SAD 등이 cAMP 농도를 변화시키며<sup>30,33</sup>, 이것이 기형 유발과 관련되어 있음이 보고되어 있다. PHT이 cAMP 농도에 변화를 주는지 여부는 아직 밝혀져 있지 않으나 PHT에 의하여 모체에서 증가된 corticosterone이 cAMP 농도를 변화시킬 수 있으며, DMSO는 phosphodiesterase의 활성을 억제시키는 작용이 있어<sup>34</sup> cAMP의 농도를 증가시킴으로써 PHT에 의한 기형을 감소시킬 수 있을 것으로 추정된다. 또한 DMSO는 *in vitro*에서 구개관의 재정위를 촉진시키는 것이 관찰되어<sup>35</sup> PHT에 의한 구개관의 재정위 지연이 DMSO에 의하여 직접적으로 영향을 받을 수 있다.

DMSO는 이와 같은 구개부에 대한 직접 작용 이외에 PHT의 기형 유발 기전으로 추정되고 있는 모체의 corticosterone 증가와 연관성을 가지고 있다. 즉 DMSO는 스테로이드의 기질인 콜레스테롤의 합성을 억제시키는 작용<sup>36,37</sup>과 콜레스테롤의 조직 uptake를 감소시키는 작용<sup>38</sup>이 있으므로 부신피질에서의 corticos-

terone의 생합성을 감소시킬 수 있다. 또한 calmodulin-stimulated phosphodiesterase를 억압하는 것으로 보고 되어 있어<sup>40,42</sup> 부신에서 부신피질자극 호르몬이나 cAMP에 의한 corticosterone 합성을 억제시킬 수 있을 것으로 추정된다. Pfiffner와 North<sup>43</sup>는 소의 부신으로부터 호르몬을 추출하는 과정에서 DMSO의 생체내 대사 산물인 dimethyl sulfone이 발견되었다고 보고한 바 있으며, 이 물질의 생체내에서의 역할은 아직 밝혀져 있지 않으나 외부에서 투여된 DMSO가 대사되어<sup>44</sup> 부신에서 dimethyl sulfone의 농도를 증가시킴으로써 이것이 corticosterone 합성에 어떤 영향을 줄 수 있을 것으로 추측된다.

DMSO가 PHT에 의해 태아 구개열 유발에 억제효과를 나타낸 바 저자등은 그 구체적인 기전규명을 위해서 PHT 단독투여시와 DMSO 병용시의 모체내 Corticosterone 변동유무를 보고한 바 있다<sup>45</sup>. 그리고 DMSO는 많은 화학물질의 흡수와 막투과성을 증가시키는 작용<sup>46</sup>과 생체내에서 화학물질의 분포를 변화할 수 있음이<sup>47</sup> 보고되어 있으며, PHT가 태반을 통과하며 태아로 이동한다는 것이 알려져 있으므로<sup>48,49</sup> 이를 바탕으로 DMSO의 항최기형효과 및 PHT의 기형유발기전을 더욱 심도있게 밝히는 후속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

ICR 마우스에서 항경련제인 PHT의 투여 기간에 따른 기형 유발성과 DMSO의 항최기형 작용을 조사하기 위해 PHT(75mg/kg, BW)을 1회(임신 10일), 2회(임신 10-11일) 및 3회(임신 10-12일) 복강내로 투여하여 주된 기형을 조사하고, 항최기형 작용이 있을 것으로 추측되어지는 DMSO(2ml/kg, BW)를 PHT와 동시 투여(임신 10-12일)한 후 PHT 단독 투여시와 기형 유발 정도를 비교하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PHT 투여에 의한 주된 기형은 구개열은 1회(임신 10일), 2회(임신 10-11일) 및 3회(임신 10-12일) 투여군에서 각각 14.47%, 31.67%, 51.69%의 태아에서 관찰되었으며, 투여 기간에 따라 증가하는 경향을 보였다.

2. DMSO를 PHT와 동시 투여했을 때의 구개열 발생 비율은 대조군인 PHT 단독 투여군의 51.69%에서 30.77%로 유의성 있게 낮아져( $p < 0.05$ ) DMSO가 PHT의 구개열 유발에 항최기형 효과를 나타냈다.

이상에 나타난 바와 같이 ICR 마우스에서 PHT에 의한 주된 기형은 구개열이었으며, DMSO 동시 투여에 의하여 감소되었다. DMSO의 항최기형 기전이 추가적으로 연구된다면 PHT의 기형 유발 기전을 밝히는 유용한 자료가 될 것이며, 약물을 저독성으로 사용할 방법을 모색할 수 있을 것으로 사료된다.

### Legends for figures

Fig 1. Ventral surface of the palatal region with the tongue and mandible removed in a 18-day ICR mouse fetus.

- a. Normal palatal region.
- b. Cleft palate of the fetus obtained from a pregnant ICR mouse treated with 75mg/kg PHT on day 10-12 of gestation.
- c. Cleft lip with cleft palate of the fetus obtained from a pregnant ICR mouse treated with 75mg/kg PHT on day 10-12 of gestation.

Fig 2. Vertical section of the palatal region with the tongue and mandible removed in a 18-day ICR mouse fetus.

- a. Normal palatal region.
- b. Cleft palate of the fetus obtained from a pregnant ICR mouse treated with 75mg/kg PHT on day 10-12 of gestation.

Fig 3. External feature of ICR mouse fetuses obtained on day 18 of gestation.

Fig 4. Cleft lip of the fetuses obtained from a pregnant ICR mouse treated with 75mg/kg PHT on day 10-12 of gestation.

Fig 5. Open eye of the fetus obtained from a pregnant ICR mouse treated with 75mg/kg PHT with 2ml/kg DMSO on day 10-12 of gestation.

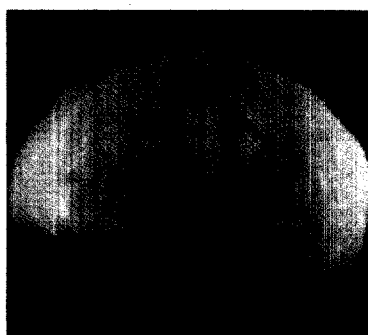
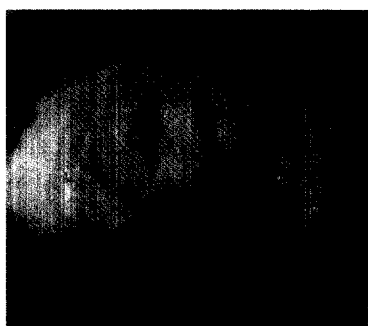
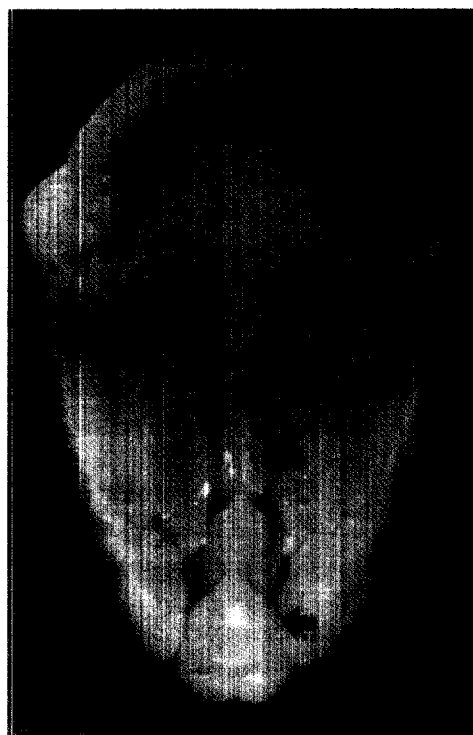
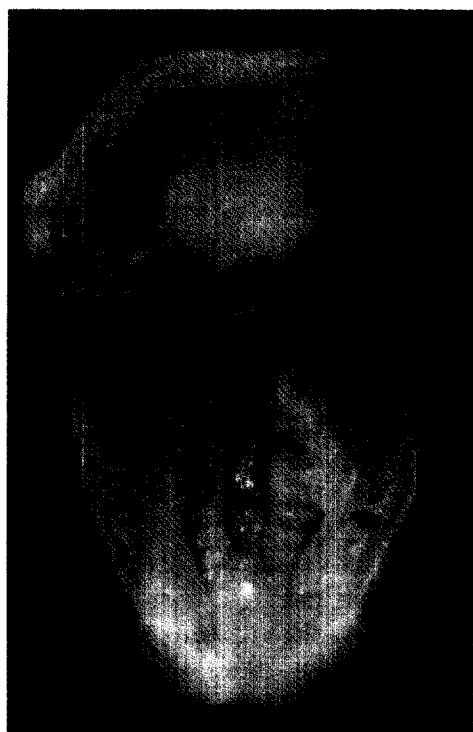
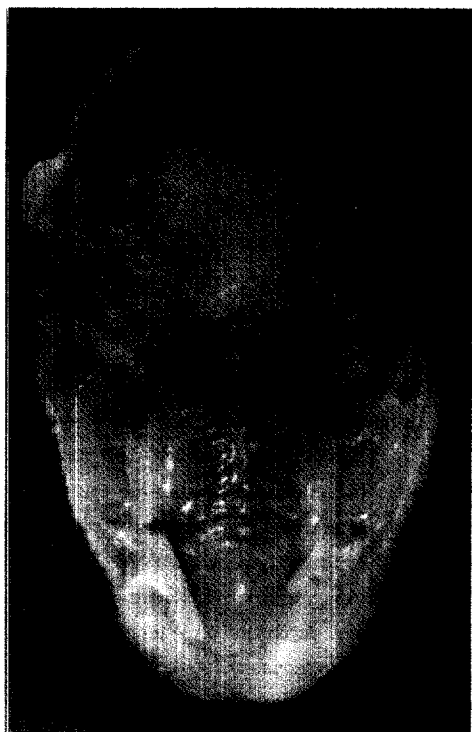
Fig 6. Flexure of forelimp of the fetus obtained from a pregnant ICR mouse treated with 75mg/kg PHT with 2ml/kg DMSO on day 10-12 of gestation.

Fig 7. Hindlimb adduction of the fetus obtained from a pregnant ICR mouse treated with 75mg/kg PHT on day 10-12 of gestation.

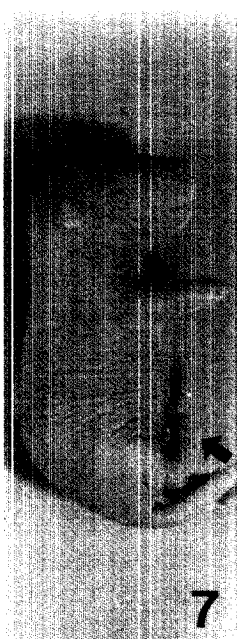
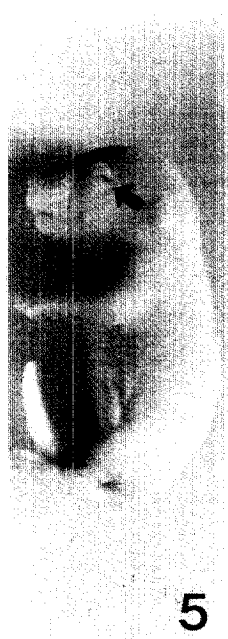
Fig 8. Hindlimb abduction of the fetus obtained from a pregnant ICR mouse treated with 75mg/kg PHT on day 10-12 of gestation.

## 참 고 문 헌

1. Kelly TE. Teratogenicity of anticonvulsant drugs. I: Review of the literature. *Am J Med Genet* 1984; 19: 413-434.
2. Hanson JW. Fetal hydantoin syndrome. *Teratology* 1976; 13: 185-188.
3. Monson RR, Rosenberg L, Hartz SC, et al. Diphenylhydantoin and selected congenital malformations. *N Engl J Med* 1973; 289:1049-1052.
4. McClain RM, Langhoff L. Teratogenicity of diphenylhydantoin in the New Zealand white rabbit. *Teratology* 1981;21: 371-379.
5. Harbison RD, Beckerr BA. Diphenylhydantoin teratogenicity in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* 1974; 22:193-200.
6. Massey KM. Teratogenic effects of diphenylhydantoin sodium. *J Oral Ther Pharmacol* 1966; 2: 380-385.
7. Finnell RH. Phenytoin-induced teratogenesis: A mouse model. *Science* 1980; 211: 483-484.
8. Hansen DK, Hodes ME. Comparative teratogenicity of phenytoin among several inbred strains of mice. *Teratology* 1983; 28: 175-179.
9. Hansen DK, Hodes ME. Teratogenic potential of phenytoin in different strains of mice. *Proc Ind Acad Sci* 1981; 156-160.
10. Goldman AS. Biochemical mechanism of glucocorticoid- and phenytoin-induced cleft palate. *Curr Top Dev Biol* 1984; 19: 217-239.
11. Biddle FG, Fraser FC. Cortisone-induced cleft palate in the mouse. A search for the genetic control of the embryonic response trait. *Genetics* 1977; 85: 289-302.
12. McDevitt JM, Gaqutieri RE, Hann DE. Comparative teratogenicity of cortisone and phenytoin in mice. *J Pharm Sci* 1981; 90: 156-160.
13. Fritz H. The effect of cortisone on the teratogenic action of acetylsalicylic acid and diphenylhydantoin in the mouse. *Experientia* 1976; 32: 721-722.
14. Goldman AS, Shapiro BH, Katsumata M. Human fetal corticoid receptors and teratogens for cleft palated. *Nature(London)* 1978; 272: 464-466.
15. Hansen DK, Holson RR, Sullivan PA, et al. Alterations in maternal plasma corticosterone levels following treatment with phenytoin. *Toxicol Appl Pharmacol* 1988; 96: 24-32.
16. Eldeib MMR, Reddy CS. A mechanism of dimethylsulfoxide protection against the teratogenicity of secalonic acid D in mice. *Teratology* 1988; 38: 419-425.
17. Eldeib MMR, Reddy CS. Role of maternal plasma corticosterone elevation in the teratogenicity of secalonic acid D in mice. *Teratology* 1990; 41: 137-146.
18. Halmut S. Routine examination of rat and rabbit fetuses for malformation of internal organ combination of Barror's and Wilson's methods. In: Berlin, ed. *Method in prenatal toxicology*. Stuttgart: Georg Thieme Publishers, 1977; 113-115.
19. Paul WJP. Double staining of fetal skeletons for cartilage and bone. In: Berlin, ed. *Method in prenatal toxicology*. Stuttgart: Georg Thieme Publishers, 1977; 153-154.
20. Greene RM, Kochhar DM. Some aspects of corticosteroid-induced cleft palate; A review. *Teratology* 1975; 11: 47-56.
21. Harbison RD, Becker BA. Relation of dosage and







- time of administration of diphenylhydantoin to its teratogenic effect in mice. *Teratology* 1969; 2: 305-312.
22. Walker BE, Fraser FC. The embryology of cortisone induced cleft palate. *J Embryol Exp Morphol* 1975; 5: 201.
  23. Elmazar MMA, McElhatton PR, Sullivan FM. Acute studies to investigate the mechanism of action of caffeine a teratogen in mice. *Hum Toxicol* 1981; 1: 52-631.
  24. Barlow SM, Morrison PJ, Sullivan FM. Plasma corticosterone levels during pregnancy in the mouse: The relative contributions of the adrenal glands and foeto-placental units. *J Endocr* 1974; 60: 473-483.
  25. Iida H, Kast A, Tsunenari Y, et al. Corticosterone induction of cleft palate in mice dosed with oriprenaline sulfate. *Teratology* 1988; 38: 15-27.
  26. Barlow SM, McElhatton PR, Sullivan FM. The relation between maternal restraint and food deprivation, plasma corticosterone, and induction of cleft palate in the offspring of mice. *Teratology* 1974; 12: 97-104.
  27. Reddy CS, Reddy RV, Hayes AW. Teratogenicity of secalonic acid D in mice. *J Toxicol Environ Health* 1981; 7: 445-455.
  28. Greene RM, Pratt RM. Correlation between cyclic-AMP levels and cytochemical localization of adenylate cyclase during development of secondary palates. *J Histochem Cytochem* 1979; 27: 924-931.
  29. Greene RM, Garbarino MP. Role of cyclic AMP, prostalands, and catecholamines during normal palate development. In: Moscona AA, Monroy A, ed. *Current Topics in Developmental Biology* Vol 19. New York: Academic, 1984; 65-79.
  30. Greene RM, Goldman AS, Lloyd M, et al. Glucocorticoid inhibition of cAMP in the developing secondary palate. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1981; 1: 31-42.
  31. Pratt RM, Martin GR. Epithelial cell death and cyclic AMP increase during palatal development. *Proc Natl Acad Sci* 1980; 72: 874-877.
  32. Schreiner CS, Zimmerman EF, Wee EL, et al. Caffeine effects on cyclic AMP levels in the mouse embryonic limb and palate in vitro. *Teratology* 1986; 34: 21-27.
  33. Eldeib MMR, Reddy CS. Secalonic acid D-induced change in palatal cyclic AMP and cyclic GMP in developing mice. *Teratology* 1988; 37: 343-352.
  34. Nakagawa M, Willner JH. Adenylate cyclase in sarcoplasmic reticulum of skeletal muscle. Distribution, orientation, and regulation. *J Cyclic Nucleotide and Protein Phosphor Res* 1986; 11: 237-251.
  35. Wee EL, Phillips NJ, Bakiarz BS, et al. Palatal morphogenesis: V. Effects of cholinergic agonists and antagonists on rotation in embryo culture. *J Embryol Exp Morphol* 1980; 55: 177-193.
  36. Yachnin S, Toub DB, Mannickarottie V. Divergence in cholesterol biosynthetic rate and 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase activity as a consequence of granulocyte versus monocytes differentiation in HL-60 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984; 81: 894-897.
  37. Cooper RA, Ip SH, Cassileth PA, et al. Inhibition of sterol and phospholipid synthesis in LH-60 promyelolytic leukemia cells by inducers of myeloid differentiation. *Cancer Res* 1981; 41: 1847-1852.
  38. Herzmann E. Studies of the effect of dimethyl sulfoxide on experimental hypercholesteremia in young cocks. *Acta Biol Ger* 1968; 20: 483-487.
  39. Carsia RV, Moyle WR, Wolff DJ, et al. Acute inhibition of corticosterone by inhibitors of calmodulin action. *Endocrinology* 1982; 111: 1456-1461.
  40. Wieser PB, Zeiger MA, Fain JN. Effects of dimethyl sulfoxide on cyclic AMP accumulation, lipolysis and glucose metabolism of fat cells. *Biochem Pharmacol* 1977; 26: 775-778.
  41. Weiss B, Levin RM. Mechanism for selectively inhibiting the activation of cyclic nucleotide phosphodiesterase and adenylate cyclase by antipsychotic agents. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1978; 9: 285-303.
  42. Weiss B, Prozialeck W, Cimino M. Pharmacological regulation of calmodulin. *Ann N Y Acad Sci* 1980; 356: 319-345.
  43. Pffiffer JJ, North HB. Dimethyl sulfoxide; A constituent of the adrenal gland. *J Biol Chem* 1940; 134: 781-782.
  44. Williams KIH, Whittemore KS, Mellin TN, et al. Oxidation of dimethyl sulfoxide to dimethyl sulfoxide.

- fone in the rabbit. *Science* 1965; 149: 203-204.
45. Lee JW, Lee CE, Lee MH, et al. Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide on phenytoin-induced fetal cleft palate and maternal corticosterone level. *Korean J Toxicol*, 1992; 8: 273-284.
46. Jacob SW. Pharmacology of DMSO. In: Jacob SW, Rosenbaum EE, Woods DC, ed. *Dimethyl sulfoxide*. Vol. 1. New York: Marcel Dekker, 1971; 99-112.
47. Levine WG. Effect of dimethylsulfoxide on the hepatic disposition of chemical carcinogens. *Ann N Y Acad Sci* 1987; 243: 185-193.
48. Mirkin BL. Diphenylhydantoin: Placental transport, fetal localization, neonatal metabolism, and possible teratogenic effects. *J Pediatr* 1971; 78: 329-337.
49. Weddell WJ, Mirkin BL. Distribution and metabolism of diphenylhydantoin-<sup>14</sup>C in fetal and maternal tissue of the pregnant mouse. *Biochem Pharmacol* 1972; 21: 547-552.
-