

랫드에 있어서 배양배자에 대한 Phenytoin의 최기형성 효과

김종춘 · 임광현 · 정문구* · 노정구
한국화학연구소 안전성연구센터

Teratogenic Effects of Phenytoin on Rat Embryos in Culture

Jong-Choon Kim, Kwang-Hyeon Lim, Moon-Koo Chung* and Jung-Koo Roh

Toxicology Research Center, Korea Research Institute of Chemical Technology,
Yuseong, P.O. Box 107, Daejeon 305-600, Korea

(Received July 13, 1998)

(Accepted August 16, 1998)

ABSTRACT : The teratogenic potential of the anticonvulsant drug phenytoin (PHT) has been well documented both in the human and in the experimental animals. However there are few reports on the effects of PHT on embryonic development in rats *in vitro*. The present study was performed to evaluate the teratogenic effects of PHT using whole-embryo culture system in rats. Sprague-Dawley rat embryos were explanted on gestational day (GD) 9.5 and cultured for 48 hrs in the immediately centrifuged and heat-inactivated rat serum containing 0, 25, 50, or 100 μg PHT/mL. At the end of culture period the embryos were scored for morphological development according to the procedure of Van Maele-Fabry, and their total protein contents were determined. At 100 μg /mL of culture medium, PHT caused significant reduction in developmental score and protein content of embryos and a high incidence morphological abnormalities (100%). Characteristic malformations included altered yolk sac and embryonic circulation, craniofacial hypoplasia, neural tube schisis, branchial arch defects, abnormal rotation, and limb bud hypoplasia, among others. There were no adverse effects on embryonic growth and development at concentrations of 25 and 50 μg /mL of culture medium. The results indicated that the dysmorphogenic effect of PHT on cultured embryos is due to a direct interference with embryonic development.

Key Words : Phenytoin, Teratogenic effects, Rat, Embryo, *In vitro*

I. 서 론

Phenytoin(PHT, diphenylhydantoin)은 1938년에 처음 소개된 hydantoin 항진간제(anticonvulsant agent)로서 약효가 뛰어나고 부작용이 적기 때문에 임상에서 일반적으로 많이 처방되고 있는 약제중의 하나이다. 그러나 생식독성학적 측면에서는 랫드(Harbison과 Becker, 1972; Finnell과 Dansky, 1991), 마우스(Finnell과 Chernoff, 1984), 토끼(McClain과 Langhoff, 1980), 닭(Singh과 Shah, 1989) 등의 실험동물뿐만 아니라 사람(Loughnan, 1973)에서도 최기형성이 보고된 바 있어서, 특히 임신부에게 투약시에는 세심한 주의가 필요하다. 간질병을 가진 임신부에게 투약할 경우 신생아의 선천

성 기형의 발생빈도는 자연발생적인 빈도보다 2~3배가 높다고 하는데(Speidel과 Meadow, 1972), Fetal hydantoin syndrome(FHS)로 알려진 특이한 기형소견을 나타내며 특히 두개안면부 이상(craniofacial abnormality)과 말단 지절골 형성부전(distal digital hypoplasia), 선천성 심장기형, 비노생식기와 중추신경계 이상 등이 많이 보고되어 있다(Hanson과 Smith, 1975; Hanson, 1986). 이러한 선천성 이상의 증가는 임신부의 질환인 간질병이나 또는 투약된 PHT에 의해서 유발된 것인지 아니면 이들에 의한 복합적인 원인에 기인된 것인지 명확하게 밝혀지지 않았으나(Janz, 1982) 근래에는 PHT에 의해 최기형성이 유발된다는 많은 증거가 보고되고 있다. PHT의 최기형성 기전으로서는 엽산대사 장애(Biale와 Lewenthal, 1984), 비타민 K 대사이상(Howe 등, 1995), cytochrome P-450에 의해 반응성 독성 중간체의 생활성화(Martz 등, 1977), hydantoin 핵에

*To whom correspondence should be addressed
LIST OF ABBREVIATIONS: DMSO (dimethyl sulfoxide), FHS (fetal hydantoin syndrome), GD (gestational day), HBSS (Hanks' balanced salt solution), IC (immediately centrifuged), PHT (phenytoin)

서 유리기 중간체와의 보조산화(Wells와 Vo, 1989) 등이 보고된 바 있다. 최근의 연구보고(Danielsson 등, 1992; Danielsson 등, 1997)에 의하면 PHT는 배자의 심장에 약리학적으로 작용하여 저산소증(hypoxia)을 유발하고 허혈성 손상(ischemic damage)의 결과로서 혈관파열과 출혈 및 조직괴사가 이어져 배자의 최기형성이 시작된다고 한다. 이들에 의하면 최종적으로 태자에서 기형으로 표출되는 조직괴사는 저산소증과 또는 재생산화(reoxygenation)에서 활성산소종(reactive radical oxygen species)의 생성에 따른 직접적인 결과일 것으로 추정했다.

실험동물을 이용한 PHT의 최기형성 시험에서 가장 많이 관찰되고 연구된 구개열(cleft palate)과 구순열(cleft lip)은 랫드에 비해 마우스종에서 더 잘 유발되며 마우스 계통 중에서도 A/J 마우스가 가장 감수성(susceptibility)이 높다고 한다(Harblison과 Becker, 1972; Hansen과 Hodes, 1983). Danielsson 등(1997)에 따르면 PHT 최기형성에 있어서 이러한 종과 계통간의 감수성의 차이는 배자심장에서 PHT 부작용에 대한 유전적 감수성의 차이에 기인된 것으로 설명하고 있다.

본 시험은 시험관내(*in vitro*) 시험법인 전배자배양법(whole-embryo culture method; New, 1978)을 이용하여 랫드 배자에 대한 PHT의 최기형성 효과를 평가하고자 하였다. 임신 9.5일령의 전배자를 PHT가 들어있는 배양배지에서 48시간 동안 배양한 후 배양배지의 형태, 발육 및 분화정도를 관찰하였고 배자의 총단백질량을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육환경

한국화학연구소 안전성연구부 실험동물육종실(대전광역시 유성구 장동 100)로부터 입수한 특정병원체무재(specific pathogen free) 동물인 Sprague-Dawley 랫드를 이용하였으며 암수 2 : 1로 교배시켜 질도말시 정자가 확인된 날의 오전 0시를 임신 0일로 정하였다. 본 시험에 사용한 동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수 13~18회/hr, 조명시간 12시간(08:00~20:00), 조도 200~300 Lux로 설정된 동물실에서 유지하였고, 방사선 조사(2.0 Mrad) 멸균된 실험동물용 고형사료[제일사료(주)]와 자외선 유수살균기로 소독한 상수도수를 자유섭취시켰다.

2. 배양배지의 조제

배양배지는 수컷 랫드의 전혈로부터 얻은 IC (immediately centrifuged) 혈청을 이용하였다. IC 혈청을 얻기 위해 에테르로 마취한 동물의 복대동맥에서 채혈한 혈액을 즉시 4°C 에서 2700 rpm으로 8분간 원심분리하였다. 이때 얻은 혈장층에서 섬유소 응괴(fibrin clot)를 제거하고 다시 한번 원심분리하여 얻은 상층액을 56°C 에서 40분간 열비동화(heat inactivation)한 다음 $0.22 \mu\text{m}$ 의 microfilter(Millipore, USA)로 여과 멸균을 하여 사용하였다.

3. 시험군의 구성 및 시험물질의 조제

예비시험의 결과를 기초로 하여 PHT $100 \mu\text{g/mL}$ ($400 \mu\text{M}$)을 고용량으로 정하고 공비를 2로 하여 $50 \mu\text{g/mL}$ ($200 \mu\text{M}$)의 중용량과 $25 \mu\text{g/mL}$ ($100 \mu\text{M}$)의 저용량 및 매체 대조군 등의 4개군으로 구성하였다. 시험물질인 PHT와 용매인 DMSO(dimethyl sulfoxide)는 Sigma회사(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였으며, PHT는 0.5% DMSO에 녹여서 4 mg/mL 을 만든 다음 조제물질 또는 희석물질을 각 군의 농도에 맞게 배양배지에 첨가하였고 대조군에는 동량의 매체를 첨가하였다.

4. 배자적출

임신 9.5일령의 랫드를 에테르로 마취하고 70% 에탄올로 복부를 소독한 다음 절개하여 자궁을 적출하였다. 적출된 자궁은 0.05% glucose와 0.03% sodium bicarbonate가 함유된 Hanks' balanced salt solution (HBSS; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액에 옮겨서 미세가위로 자궁벽을 절개하여 배자가 들어있는 탈락막(decidua)을 노출시켰다. 탈락막을 손상되지 않게 채취하여 새로운 HBSS용액이 담긴 용기에 옮겼다. 입체현미경(stereoscope, Nikon, Japan) 하에서 미세한 포셉을 이용하여 탈락막내에 있는 수태산물(conceptus)을 분리시킨 다음 라이케르트막(Reichert's membrane)을 제거하였다.

5. 배자배양

상기한 방법으로 얻은 수태산물중 배자의 발생상태를 관찰하여 머리주름기(head-fold stage)를 나타내는 배자를 선별하여 배양에 이용하였으며 적출중 손상되었거나 발생상태가 다른 배자는 배양에서 제외하였다. 배자는 전배자배양기(whole-embryo culture system,

Table 1. Effects of *in vitro* exposure to PHT on embryonic growth and differentiation of GD 11.5 rat embryos explanted on GD 9.5 and cultured 48 hrs

Parameters	Phenytoin concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			
	Control	25	50	100
No. of embryos examined	11	11	11	12
No. of viable embryos	11	11	11	12
Yolk sac diameter (mm): Max.	4.07 \pm 0.37	4.05 \pm 0.37	3.84 \pm 0.30	3.62 \pm 0.40**
Min.	3.74 \pm 0.42	3.72 \pm 0.30	3.52 \pm 0.22	3.32 \pm 0.34*
Crown-rump length (mm)	2.93 \pm 0.30	2.95 \pm 0.30	2.92 \pm 0.28	1.91 \pm 0.27**
Head length (mm)	1.37 \pm 0.16	1.35 \pm 0.18	1.36 \pm 0.19	0.80 \pm 0.12**
No. of somite pairs	22.91 \pm 1.38	22.73 \pm 1.42	23.00 \pm 2.00	19.16 \pm 3.74**
Morphological score (points)	55.01 \pm 2.41	55.00 \pm 1.73	54.44 \pm 1.33	38.75 \pm 0.50**
Protein concentration ($\mu\text{g}/\text{embryo}$)	254.2 \pm 28.6	247.2 \pm 34.9	245.2 \pm 34.3	115.7 \pm 21.9**

Values are mean \pm S.D. * and ** indicate significant difference at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels when compared with the control group.

Ikemoto Co., Japan)에서 48시간 동안 배양하였으며, 각 배양병당 3 mL의 배지를 넣은 다음 2~3마리씩의 배자를 배양하였다.

6. 배양조건

배양기내의 온도는 $37.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 였으며, 회전장치의 회전속도는 35 rpm으로 하였다. 배양병에는 혼합제조된 가스[대성산소(주)]를 $0.45 \mu\text{m}$ 의 microfilter (Millipore, Ireland)를 통하여 멸균한 다음 습윤하게 하여 연속공급하였다. 배양시작후 17시간은 산소 5%, 이산화탄소 5%, 질소 90%의 혼합가스를, 그 다음 7시간은 산소 20%, 이산화탄소 5%, 질소 75%의 혼합가스를, 그리고 마지막 24시간은 산소 40%, 이산화탄소 5%, 질소 55%의 혼합가스를 분당 150 mL의 비율로 공급하였다.

7. 배양배자의 관찰

배양이 끝난 배자는 난황낭직경(yolk sac diameter), 머리영덩이간 길이(crown-rump length), 머리길이(head length) 및 체절수(somite number)를 측정하였다. 배자의 형태, 발육 및 분화정도에 대해서는 Van Maele-Fabry 등(1990)의 평가기준에 따라 점수화하였고 형태학적 이상을 기록하였으며, 배자의 총단백질량은 Bradford 법(1976)에 따라 측정하였다.

8. 통계학적 분석

시험자료에 대한 통계분석은 SAS 프로그램(SAS, Version 6, Cary, NC, USA)을 이용하였다. 난황낭직경과 머리영덩이간 길이, 머리길이, 체절수, 형태학적 점수 및 배자의 총단백질량은 일원배치분산분석(ANOVA)

과 Dunnett 다중비교검정법을, 기형배자수는 Chi-square 검정을 실시하였으며 5% 수준에서 유의차 검정을 하였다.

III. 결 과

회전식 배자배양기를 이용하여 임신 9.5일령의 랫드 전배자를 PHT 0, 25, 50 및 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 이 들어 있는 배지에서 48시간 동안 배양하였다. 최초 배양시 배자의 발생상태는 뇌형성 초기단계인 머리주름기를 나타내고 있었으며 외태반원뿔(ectoplacental cone)을 포함한 수태산물의 총 길이는 $2.12 \pm 0.33 \text{ mm}$ 이었다. 48시간의 배양이 끝난 후 수태산물과 배자의 성장 및 분화상태에 대해서 관찰한 결과는 Table 1과 같다. 매체대조군의 수태산물(Fig. 1)과 배자(Fig. 2)는 모두 정상적인 결과를 나타내었으며, 25와 $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처치군에서의 배양배자도 대조군과 유사한 결과를 나타내었다. 반면 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 처치군에서는 난황낭의 직경이 매체대조군에 비해 통계학적으로 유의성있게 감소하였고, 배자의



Fig. 1. Photograph of a control conceptus, showing normal appearance. Scale bar is 1 mm.

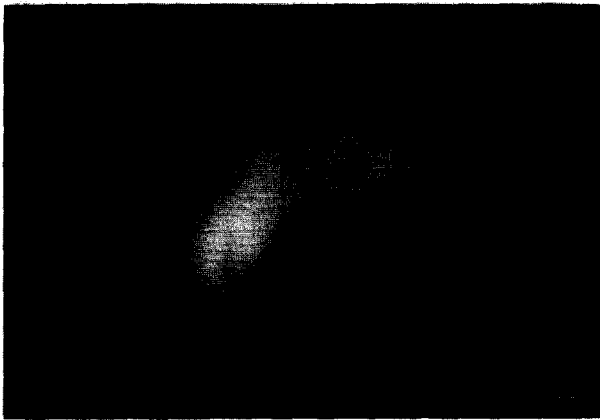


Fig. 2. Photograph of a control embryo, showing no abnormalities. Scale bar is 1 mm.

Table 2. Morphological defects induced by *in vitro* exposure to PHT in GD 11.5 rat embryos explanted on GD 9.5 and cultured 48 hrs

Parameters	Phenytoin concentration (µg/mL)			
	Control	25	50	100
No. of embryos examined	11	11	11	12
No. of embryos with anomalies	1(9.1)	1(9.1)	2(18.2)	12(100)**
Altered yolk sac and embryonic circulation	0	0	0	12
Abnormal axial rotation	1	1	2	12
Craniofacial hypoplasia	0	0	0	12
Missing optic vesicle	0	0	0	2
Branchial arch defects	0	0	0	7
Neural tube schisis	1	0	0	6
Enlarged cardiac tube and pericardium	0	0	0	3
Kinked somite	0	0	0	4
Limb bud hypoplasia	0	0	0	5
Blunted tail.	0	0	0	2

** indicates significant difference at P<0.01 level when compared with the control group.

머리엉덩이간 길이와 머리길이, 체질수, 형태학적 점수 및 배자당 총단백질량이 유의성있게 감소하였다. 배자의 형태학적 이상을 관찰한 결과는 Table 2에 나타내었다. 매체대조군에서는 1마리의 배자에서 회전 이상(abnormal rotation)과 신경관 개열(neural tube schisis)이 관찰되었고, 25 및 50 µg/mL 처치군에서는 회전 이상(Fig. 3)이 1례 및 2례 관찰되었다. 100 µg/mL 처치군에서는 배양한 12마리의 모든 배자에서 여러가지의 형태이상(Fig. 4~6)이 관찰되어 매체대조군에 비해 통계학적 유의성이 인정되었으며, 난황낭 순환과 배자혈행의 이상(altered yolk sac and embryonic circulation), 두개안면부의 저형성(craniofacial hypoplasia) 및 회전이상이 각각 12례, 아가미공의 결손(branchial arch defects)이 7례, 신경관 개열이 6례, 지아의 저형성(limb



Fig. 3. Photograph of a conceptus treated with 50 µg/mL PHT, showing abnormal rotation. Scale bar is 1 mm.



Fig. 4. Photograph of a conceptus treated with 100 µg/mL PHT, showing altered yolk sac and embryonic circulation. Scale bar is 1 mm.



Fig. 5. Photograph of an embryo treated with 100 µg/mL PHT, showing growth retardation, abnormal rotation, craniofacial hypoplasia, missing optic vesicle, enlarged cardiac tube, neural tube schisis, limb bud hypoplasia, and blunted tail. Scale bar is 1 mm.

bud hypoplasia)이 5례, 체질의 비틀림(kinked somite)이 4례, 심장관과 심낭막의 비대(enlarged cardiac tube



Fig. 6. Photograph of a embryo treated with 100 µg/mL PHT, showing growth retardation, abnormal rotation, craniofacial hypoplasia, absence of the second branchial bar, limb bud hypoplasia, enlarged cardiac tube and pericardium, and blunted tail. Scale bar is 1 mm.

and pericardium)가 3례, 안포결손(missing optic vesicle)과 꼬리의 뭉뚱함(blunted tail)이 2례씩 나타났다.

IV. 고 찰

실험동물을 이용한 생체내(*in vivo*) 시험은 시험물질이 모동물에게 투여하여 배자에서 나타나는 발생독성(developmental toxicity)을 평가하기 때문에 배자에서 유발된 발생독성이 모독성(maternal toxicity)에 의해 간접적으로 표출된 소견인지 아니면 시험물질이 배자에게 직접적으로 작용하여 나타난 소견인지 단정하기가 어렵다. 또한 모동물에게 투여된 발생독성물질이 원물질(parent compound)로서 또는 cytochrome P-450에 의해 생성된 대사산물(metabolites)로서 독성작용을 나타낸 것인지 판단하기도 어렵다. 그러나 전배자배양법은 시험물질이 들어 있는 배양액에 배자를 직접적으로 노출하기 때문에 모독성이나 간 대사효소계의 영향은 배제할 수 있으며 주요기관이 형성되는 배양기간 동안 연속적으로 관찰할 수 있기 때문에 기관형성기에 영향을 주는 독성물질의 작용기전을 규명하는데 많은 도움이 되게 된다.

PHT의 최기형성 기전은 명확하게 밝혀지지 않았으나 엽산대사 장애(Biale와 Lewenthal, 1984), 비타민 K 대사이상(Howe 등, 1995), cytochrome P-450에 의해 반응성 독성 중간체의 생활성화(Martz 등, 1977), hydantoin 핵에서 유리기 중간체와의 보조산화(Wells와 Vo, 1989) 등이 최기형성의 원인으로 보고된 바 있으며, 최근의 보고에 의하면 PHT이 배자의 심장에 작용하여 저산소증을 유발함으로써 최기형성이 시작된다고 한다(Danielsson 등, 1992; Danielsson 등, 1997).

본 시험은 생체내 시험에서 최기형성 물질로 알려져 있는 PHT의 시험관내(*in vitro*) 최기형성 효과를 평가하고자 임신 9.5일령의 랫드 전배자를 phenytoin이 들어 있는 배양액에 직접 노출시켜서 48시간 동안 배양한 다음 배양배자의 형태, 발육 및 분화정도를 관찰하였고 배자의 총단백질량을 측정하였다. 매체대조군에서 관찰된 회전 이상과 신경관 개열은 이상의 정도와 빈도로 미루어 보아 자연발생적 또는 발육지연에 기인된 것으로 판단되며, 또한 25 및 50 µg/mL 처치군에서 소수례씩 관찰된 회전 이상은 대조군과 유사한 빈도로 나타나 25 및 50 µg/mL 처치농도는 랫드 배자에 무해한 것으로 나타났다. 반면 100 µg/mL 처치군에서는 모든 배자에서 머리엉덩이간 길이와 머리길이, 체절수, 형태학적 점수 및 총단백질량이 감소하여 배자의 발육지연효과를 관찰할 수 있었다. 또한 모든 배자에서 형태학적 이상이 관찰되었으며, 난황낭 순환과 배자혈행의 이상, 두개안면부의 저형성, 회전 이상, 아가미궁의 결손, 신경관 개열, 지아의 저형성, 체절의 비틀림, 심장관과 심낭막의 비대, 안포결손 및 꼬리의 뭉뚱함 등이 높은 빈도로 나타났다. 본 시험의 랫드 배자에서 나타난 이상소견들은 사람의 Fetal hydantoin syndrome (Hanson, 1986)에서 주로 관찰되는 두개안면부 이상과 말단 지절골 형성부전, 선천성 심장기형, 비뇨생식기와 중추신경계 이상 등과 매우 유사한 형태를 나타내었다.

랫드 배자에 있어서 난황낭은 응모요막성 태반(chorioallantois placenta)이 확립되기 전의 기간에 배자에 중요한 영양공급역할을 하게 되는데 일부 화학물질들은 임신동물에게 기관형성기 동안 투여하면 난황낭의 기능장애를 유발하여 배자의 성장과 분화에 영향을 끼치게 된다고 한다(Beckman 등, 1990; Klug와 Neubert, 1993). 전배자배양에서는 난황낭이 배양배지에서 첨가된 시험물질에 직접적으로 노출되기 때문에 배양액에 첨가된 화학물질에 의해 유발된 부작용이 배자발달에 직접적 간접으로 인한 것인지 아니면 난황낭 기능의 손상을 통하여 간접적으로 유발된 것인지 추론하기는 어렵다. 그러나 난황낭의 약한 발달이나 난황낭 순환의 이상은 배자의 퇴화를 일으키는 것으로 예상된다. 100 µg/mL 처치군에서는 난황낭의 직경이 감소하였고 난황낭막의 혈관이 거의 관찰되지 않았는데 이러한 소견으로 미루어 보아 PHT의 처치에 의해 랫드 전배자의 난황낭 발달이 저해되고 기능장애가 유발된 것으로 생각된다. 그러나 본 시험조건에서는 배자에서 관찰된 발육지연과 형태이상인 난황낭의 기능장애로 나타난 것인지 아니면 배자에 직접적으로 작용하여 유발된 것인지는 확인하기가 어려웠고 추후 세밀한

연구가 필요한 것으로 판단된다.

실험동물을 이용한 시험에서 PHT의 최기형성은 랫드에 비해 마우스종에서 더 잘 유발되고 마우스 계통 중에서도 A/J 마우스가 가장 감수성이 높다고 보고 (Harbison과 Becker, 1972; Hansen과 Hodes, 1983)된 바 있는데, Danielsson 등(1997)은 PHT 최기형성에 있어서 이러한 종과 계통간의 감수성의 차이는 배자심장에서 PHT 부작용에 대한 유전적 감수성의 차이에 기인된 것으로 설명하고 있다. 사람에게 있어서 PHT의 혈중유효농도(therapeutic concentration)는 20 µg/mL (80 µM)로서 마우스 배자를 본 농도에서 배양하면 최기형성이 나타난다고 보고(Miranda 등, 1994)된 바 있으며, 랫드 배자를 이용한 본 시험에서는 25 µg/mL (100 µM) 및 50 µg/mL(200 µM) 농도에서 최기형성이 관찰되지 않았고 100 µg/mL(400 µM) 농도에서만 기형이 유발되어 랫드 배자가 마우스 배자에 비해 PHT의 최기형성 작용에 대해 감수성이 낮음을 확인할 수 있었다.

상기한 바와 같이 PHT를 랫드 전배자에 직접적으로 노출하였을 때 배자의 발육지연과 형태학적 이상이 유발되었으며, 이러한 결과는 PHT가 간 대사효소계의 영향없이 원물질 자체로서 랫드 전배자에 직접적으로 간섭하여 발생독성을 일으킨 것을 암시해 주었다.

참고문헌

- Beckman, D.A., Koszalka, T.R., Jensen, M. and Brent, R.L. (1990): Experimental manipulation of the rodent visceral yolk sac. *Teratology*, **41**, 395-404.
- Biale, Y. and Lewenthal, H. (1984): Effects of folic acid supplementation on congenital malformations due to anticonvulsive drugs. *Eur. J. Obstet. Reprod. Biol.*, **18**, 211-216.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anat. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Danielsson, B.R.G., Danielson, M., Rundqvist, E. and Reiland, S. (1992): Identical phalangeal defects induced by phenytoin and nifedipine suggest fetal hypoxia and vascular disruption behind phenytoin teratogenicity. *Teratology*, **45**, 247-258.
- Danielsson, B.R., Azarbayjani, F., Skold, A.C. and Webster, W.S. (1997): Initiation of phenytoin teratogenesis: Pharmacologically induced embryonic bradycardia and arrhythmia resulting in hypoxia and possible free radical damage at reoxygenation. *Teratology*, **56**, 271-281.
- Finnell, R.H. and Chernoff, G.F. (1984): Variable patterns of malformation in the mouse fetal hydantoin syndrome. *Am. J. Med. Genet.*, **19**, 463-471.
- Finnell, H.R. and Dansky, L.V. (1991): Parental epilepsy, anticonvulsant drugs, and reproductive outcome: Epidemiologic and experimental findings spanning three decades; 1: animal studies. *Repro. Toxicol.*, **5**, 281-299.
- Hanson, J.W. and Smith, D.W. (1975): The fetal hydantoin syndrome. *J. Pediatr.*, **87**, 285-290.
- Hanson, J.W. (1986): Teratogen update: Fetal hydantoin effects. *Teratology*, **33**, 349-353.
- Hansen, D.K. and Hodes, M.E. (1983): Comparative teratogenicity of phenytoin among several inbred strains of mice. *Teratology*, **28**, 175-179.
- Harbison, R.D. and Becker, B.A. (1972): Diphenylhydantoin teratogenicity in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **22**, 193-200.
- Howe, A.M., Lipson, A.H., Sheffield, L.J., Haan, E.A., Halliday, J.L., Jenson, F., David, D.J. and Webster, W.S. (1995): Prenatal exposure to phenytoin, facial development, and a possible role for vitamin K. *Am. J. Med. Genet.*, **58**, 238-244.
- Janz, D. (1982): Antiepileptic drugs and pregnancy: Altered utilization patterns and teratogenesis. *Epilepsia*, **23**(Suppl. 1), S53-S63.
- Klug, S. and Neubert, D. (1993): The use of whole embryo culture to elucidate teratogenic mechanism. *Toxic in Vitro*, **7**, 727-734.
- Loughnan, P.M., Gold, H. and Vance, J.C. (1973): Phenytoin teratogenicity in man. *Lancet*, **1**, 70-72.
- Martz, F., Failing, C.III. and Blake, D.A. (1977): Phenytoin teratogenicity: Correlation between embryopathic effect and covalent binding of putative arene oxide metabolite in gestational tissue. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **203**, 231-239.
- McClain, R.M. and Langhoff, C. (1980): Teratogenicity of diphenylhydantoin in New Zealand white rabbits. *Teratology*, **21**, 371-379.
- Miranda, A.F., Wiley, M.J. and Wells, P.G. (1994): Evidence for embryonic peroxidase-catalyzed bioactivation and glutathione-dependent cytoprotection in phenytoin teratogenicity: Modulation by eicosatetraenoic acid and buthionine sulfoximine in murine embryo culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **124**, 230-241.
- New, D.A.T. (1978): Whole-embryo culture and the study of mammalian embryos during organogenesis. *Biol. Rev.*, **53**, 81-122.
- SAS Institute Inc. (1990): SAS/STAT User's Guide, Version 6, Fourth Edition, SAS Institute Inc.,

Cary, NC, USA.

Singh, M. and Shah, G.L. (1989): Teratogenic effects of phenytoin chick embryos. *Teratology*, **40**, 453-458.

Speidel, B.D. and Meadow, S.R. (1972): Maternal epilepsy and abnormalities of the fetuse and newborn. *Lancet*, **2**, 839-843.

Van Maele-Fabry, G., Delhaise, F. and Picard, J.J.

(1990): Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embryos. *In vitro*, **4**, 149-156.

Wells, P.G. and Vo, H.P.N. (1989): Effects of the tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate on phenytoin-induced embryopathy in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **97**, 398-405.