

Etanol'ün erken organ gelişimi döneminde memeli embriyosu gelişimi ve morfolojik yapısı üzerine etkileri ve serbest radikallerin bu etkideki rolü

İsmihan İlknur UYSAL¹, Ahmet Kağan KARABULUT¹, Muzaffer ŞEKER¹, Mehmet GÜRBİLEK²

¹ Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı,
² Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, KONYA

ÖZET

Amaç: Gebe kadınların aşırı alkol almaları Fötal Alkol Sendromu adı verilen ve etanolün prenatal dönemde embriyo-toksik etkileri sonucu ortaya çıkan bir patolojiye neden olmaktadır. Etanol'ün bu dönemde hücrel ve moleküler düzeydeki etki mekanizmaları ise tam olarak bilinmemektedir. Bu çalışmada etanolün embriyonik büyüme ve gelişme ile morfolojik yapı üzerine olan etkileri ve serbest radikallerin bu etkilerdeki rolünün araştırılması amaçlandı. **Yöntem:** Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi hayvan laboratuvarından elde edilen Wistar ratlardan gebeliklerinin 9.5 uncu gününde dike edilerek çıkartılan embriyoların rat serumu içerisinde 48 saat süreyle kültürü yapıldı. Kültür ortamı olarak; kontrol grubu için normal rat serumu kullanılırken, deney grupları için rat serumuna değişen konsantrasyonlarda etanol (250-500 mg%) ilave edildi. Ayrıca etanol'ün toksik etkisinin tüm parametreleri etkilediği dozu ile birlikte antioksidan superoksit dismutaz (SOD) kültür ortamına ilave edildi. Her bir konsantrasyon için 10 rat embriyosu kullanıldı. Etanol'ün rat embriyolarının gelişim parametreleri (total morfolojik skor, yolk salk çapı, tepe-kıç mesafesi, somit sayısı, embriyo ve yolk salk protein içerikleri) üzerine doz bağımlı etkileri, morfolojik ve biyokimyasal yöntemlerle karşılaştırıldı. Embriyolar malformasyon varlığı açısından da değerlendirildi. **Bulgular:** Kontrol embriyoları ile karşılaştırıldığında etanol'ün doz bağımlı olarak bütün gelişimsel parametreleri geriletmişti ($P<0.05$) ve genel morfolojide bozukluklara sebep olduğu gözlemlendi. Özellikle nöral tüp olmak üzere değişik bölgelerde hematomlar gözlemlendi. Kültür ortamına etanol ile birlikte SOD eklendiğinde büyüme ve gelişme parametrelerinde artış ($P<0.05$) ve malformasyon sıklığında azalma ($P<0.05$) tespit edildi. **Sonuç:** Etanol'ün organogenez dönemindeki rat embriyoları üzerine doz bağımlı gelişimsel toksisiteye sebep olduğu ve bu etkilerde serbest oksijen radikallerinin rol oynayabileceği belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Etanol, serbest radikal, Embriyo kültürü

Selçuk Tıp Derg 2004; 20:55-59.

SUMMARY

The effects of ethanol on development and morphogenesis of the mammalian embryos at the stage of early organogenesis, and the role of free radicals in this effect.

Aim: The excessive maternal alcohol drinking results in Fetal Alcohol Syndrome which is a pathology caused by the embryotoxic effects of ethanol in prenatal period. The mechanisms of ethanol action at the cellular or molecular levels are scarce. In this study it was aimed to investigate the effects of ethanol on growth and development of mammalian embryos as well as the morphological structure, and the role of free radicals on these effects. **Methods:** Wistar rats were obtained from the Selçuk University Experimental Medicine Research Center, and their 9.5 days embryos were explanted and cultured for 48 hours in rat serum. Whole rat serum was used as a culture medium for the control group while different concentrations of ethanol (250-500 mg%) were added to rat serum for the experimental groups. Also, the lowest effective concentration of ethanol for all parameters was added to the culture media in the presence of an antioxidant superoxide dismutase (SOD). Ten embryos were used for each experimental condition. Dose-dependent effects of ethanol on embryonic developmental parameters such as; total morphological score, yolk sac diameter, crown-rump length, somite number, embryo and yolk sac protein contents were compared using morphological and biochemical methods. Each embryo was evaluated for the presence of any malformations. **Results:** Compared to the control embryos, ethanol significantly decreased all developmental parameters dose-dependently ($p<0.05$) with an increase in overall dismorphology. The haematoma in different regions, especially in the neural tube was most frequently observed. When the SOD was added to the culture media in the presence of ethanol, growth and developmental parameters were improved ($p<0.05$) and there was a decrease in the incidence of malformations ($p<0.05$). **Conclusion:** A dose dependant developmental toxicity of ethanol on rat embryos during organogenesis was determined, these effects might involve free oxygen radicals.

Key Words: Ethanol, free radical, Embryo culture

Haberleşme Adresi: Dr. İsmihan İlknur UYSAL, Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Anatomi Anabilim Dalı, KONYA

Geliş Tarihi : 17.12.2003 Yayına Kabul Tarihi : 12.02.2003 e-mail: iuysaal@yahoo.co.uk

Konjenital anomalilerin % 7-10'u ilaçlar, iyonize radyasyon, X-Ray, bazı endüstriyel kimyasallar ve toksik ajanlar gibi çevresel faktörlere maruz kalma sonucu oluşmaktadır (1). Teratojen ajanlar veya potansiyel teratojenlerin etkilerini araştırmak ve doğumsal malformasyonların etiolojilerinin aydınlatılabilmesi amacı ile in vivo ve in vitro çalışmalar eş zamanlı yürütülmektedir (2).

Bu amaçla kullanılan in vitro tekniklerden birisi de embriyoların in vitro ortamda uterus içinde olduğu kadar çabuk büyümesini sağlayan ve büyüyen embriyodaki değişikliklerin sürekli gözlenmesine imkan veren rat embriyosu kültürü tekniğidir (2-4).

Etanol, endüstride ve laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan ve kolaylıkla havaya karışarak toksik etkilere sebep olabildiği gösterilmiş olan bir ajandır (5-8). Ayrıca alkolik olan annelerde gebelik sırasında aşırı etanol alımına bağlı oluşan büyüme geriliği, mental yetersizlik, çok sayıda kraniyofasiyal ve nöronal anomali ile seyreden bir embriyopati olan fetal alkol sendromu'ndan daha önce yapılan çalışmalarda bahsedilmiştir (9-11). Etanolün prenatal dönemde embriyotoksik etkileri sonucu ortaya çıkan bu patolojide etanolün hücrel ve moleküler düzeydeki etki mekanizmaları ise tam olarak bilinmemektedir. Yine bazı in vivo ve in vitro çalışmalarda etanolün nöral sistem hücreleri üzerinde sitotoksik etkileri gösterilmiş ve özellikle kraniyofasiyal deformitelerin bu etkiler sonucu ortaya çıktığı saptanmıştır (7, 12-18).

Terano ve ark. (19), ratlarda etanolün sebep olduğu mide mukozası hasarında süperoksit ve hidroksil serbest radikallerinin rolü olduğunu göstermiştir. Benzer şekilde Oldfield ve ark (20), etanolün hidroksietil serbest radikallerini doz bağımlı olarak artırdığını göstermiş ve etanolün nörotoksik etkisinden bu serbest radikallerin sorumlu olabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Bu çalışmada etanolün gelişmekte olan rat embriyosu üzerine etkilerinin in vitro embriyo kültür sistemi kullanılarak araştırılması ve bu ajanın etkileri tespit edildikten sonra serbest oksijen radikallerinin bu etkilerin mekanizmasındaki rolünün incelenmesi amaçlanmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi hayvan laboratu-

varından elde edilen, ağırlığı 150-200 gr arasında değişen Wistar ratlar (*Rattus Norvegicus*) kullanıldı. Serum elde etmek için erkek veya dişi Wistar ratlar dietileter ile anestezi edildi ve karın ön duvarı V şeklinde kaldırıldı. Abdominal aorta'dan steril bir enjektör ile maksimum düzeyde (8-10 ml) kan alındı ve tüpe aktarıldıktan sonra 5 dakika santrifüj edilerek (3000 devir/dakika) serum ayrıldı. Serum, protein inaktivasyonu için 57°C lik su banyosunda 30 dakika bekletildi. Gelişebilecek olası enfeksiyonları önlemek amacıyla kültür sıvısına penisilin G (100 IU/ml) ve streptomisin (100µg/ml) eklendi.

Rat embriyolarını elde etmek için bir erkek ve bir dişi rat bir gece bir arada bırakıldı. Ertesi sabah kafesin altındaki tepside vajinal plak gözlenmişse çiftleşmenin gece yarısı civarında olduğu düşünülüp, o günün öğle saati dışının 0.5 günlük gebe olduğu varsayılarak dişiler ayrı bir kafese alındı ve 9 gün burada optimum şartlarda tutuldu.

Gebeliklerinin 9.5 uncu gününde anestezi altında dişi ratların karın ön duvarı açılıp kanları serum hazırlamada kullanılmak üzere alındı. Daha sonra sayıları 8-15 arasında değişen keselerin oluşturduğu uterus diseke edildi ve steril 37°C Hank dengeli tuz solüsyonu içeren petri kaplarına alındı. Uterus kas tabakası ve desidua çıkarıldı. Desiduanın bir yüzünde yerleşmiş olan embriyo disseke edildi. Kemirgenlere has bir yapı olan ve uterus içerisinde antijenlere karşı bariyer özelliği taşıyan Reichart zarı da ayrılarak embriyo kültüre hazır hale getirildi. Bu aşamada rezorbe olmuş, gelişimi geri ya da anormal görünümlü embriyolar çalışmaya dahil edilmedi. Uteruslar çıkarıldıktan sonraki işlemler lamin-air flow kabin içerisinde ve mikroskop altında gerçekleştirildi (3).

Kültür ortamı olarak; kontrol grubunda normal rat serumu kullanılırken, deney grupları için rat serumuna değişen konsantrasyonlarda etanol (250-500mg%) ilave edildi. Sonraki aşamada etanolün tüm parametrelerde büyüme ve gelişmeyi etkilediği tespit edilen toksik konsantrasyonu (500mg%) ile birlikte antioksidan süperoksit dismutaz (SOD) enzimi (30 U/ml) kültür ortamına ilave edildi. Kontrol grubu ve her bir konsantrasyon için 10 rat embriyosu kullanıldı.

Eksplantasyonu takiben embriyolar 50 ml lik steril cam şişelere 1 embriyo/1 ml serum koyularak 37°C sabit kabin ısısına sahip inkübatöre yerleştirmeden hemen önce %5 O₂, %5 CO₂,

%90 N₂ içeren gaz karışımı 1 dakika süre ile verildi. 24 saat sonra embriyolara %20 O₂, %5 CO₂, %75 N₂ içeren gaz karışımı, embriyoların morfolojik değerlendirmelerinin yapılacağı son gün ise (44. saatte) %40 O₂, %5 CO₂, %55 N₂ bulunan gaz karışımı 1 dakika süreyle verildi.

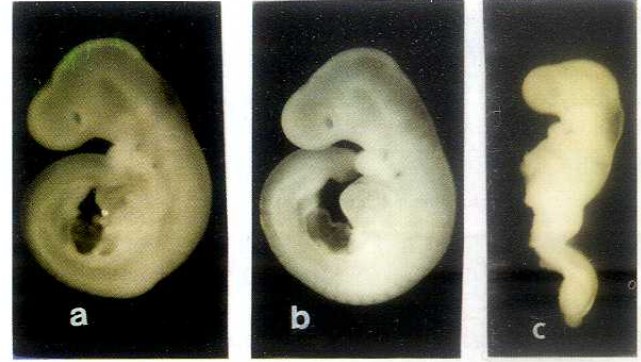
48 saat kültür sonrasında (11.5 günlük gebelik dönemi) embriyolar Hank dengeli tuz solüsyonu içeren petri kabına alınarak morfolojik açıdan 17 parametre (yolk sak damarlanması, allantois gelişimi, embriyonun fleksiyonu, kalp gelişimi, nöral tüp kuyruk kısmının gelişimi, ön, orta ve arka beyin gelişimi, göz, kulak, burun ve yutak kaviserinin gelişimi, maxilla ve mandibula gelişimi, ön ve arka ekstremitte tomurcuklarının gelişimi, somit sayısı, yolk sak çapı ve tepe-kıç mesafesi ölçümü) ile mikroskop altında değerlendirildi (21). Daha sonra embriyo ve yolk sakların protein içerikleri 750 nm dalga boyunda spektrofotometre ile ölçüldü (22).

Morfolojik skor ve normal dağılım göstermeyen somit sayısı non parametrik Kruskal Wallis ve tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. Verilerde önemli bir fark bulunduğu, farkın nerede olduğunu göstermek için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Yolk Sak çapı, Tepe Kıç mesafesi, Embriyo ve Yolk Sakın protein içeriği gibi diğer büyüme değişkenleri tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan's test ile değerlendirildi. Deney ve kontrol grupları arasındaki malformasyon insidansı Fisher's Exact test ile karşılaştırıldı. P<0.05, P<0.01 ve P<0.001 değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

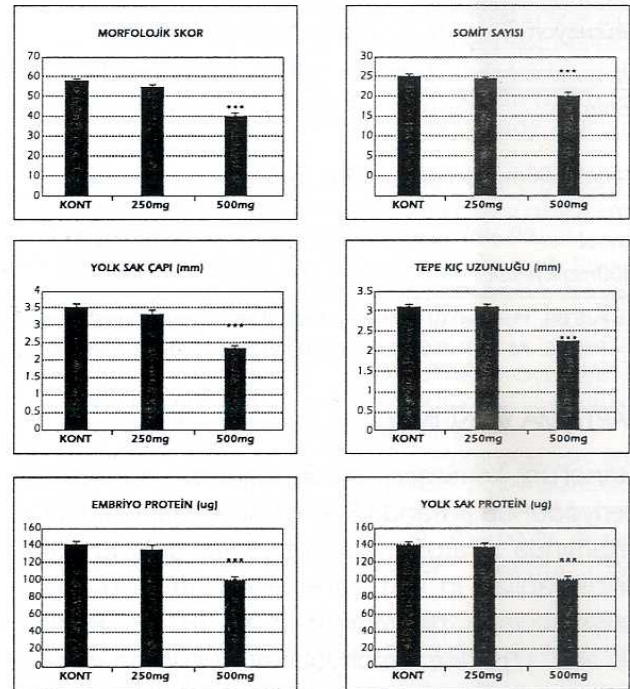
BULGULAR

Kontrol grubundaki bütün embriyolar normal gelişim gösterdiler. Etanol kontrol grubu ile kıyaslandığında 250 mg% dozunda herhangi bir gelişimsel geriliğe sebep olmadığı görülürken, doz arttırıldığında (500 mg%) tüm gelişimsel parametrelerde (morfolojik skor, somit sayısı, yolk sak çapı, tepe kıç uzunluğu, embriyo ve yolk sak proteinleri) fark bulundu (P<0.001). Etanol'ün oluşturduğu doz bağımlı gelişimsel deformite ve gelişme gerilikleri Şekil 1 ve Şekil 2'de gösterildi.

Morfolojik açıdan değerlendirildiğinde etanolün 500 mg% konsantrasyonda P<0.01 oranında nöral tüp açıklığı, yüz yapılarında morfolojik bozukluklar ve fleksiyon anomalilerine rastlandı (Tablo 1).



Şekil 1. Rat serumuna eklenmiş artan konsantrasyonlardaki etanol varlığında 11.5 günlük rat embriyolarının sol yan bakıdan görüntüsü. a) Normal rat serumu (Kontrol), b) 250 mg% Etanol, c) 500 mg% Etanol ilavesinde büyüyen embriyolar. X25 büyütme.



***=P<0.01

Şekil 2. Rat serumuna değişen konsantrasyonlarda (250-500 mg%) etanol eklenmesinin embriyo büyüme ve gelişmesi üzerine etkileri (ortalama ± standart hata).

Etanol'ün etki mekanizmasında serbest radikallerin rol oynayıp oynamadığını belirlemek amacıyla etanolün minimum efektif konsantrasyonu (500 mg%) ile birlikte kültür ortamına SOD (30 U/ml) enzimi ilavesiyle etanol varlığında gözlenen büyüme ve gelişimdeki gerilemenin kısmen de olsa istatistiksel olarak anlamlı derecede geri döndüğü, azaldığı (Tablo 2) ve yine malformasyon sıklıklarında azalmaya sebep olduğu saptandı (Tablo 1).

Tablo 1. Etanol varlığında kültürü yapılan 11.5 günlük rat embriyolarında görülen anomaliler ve sıklıkları ile, etanolün en küçük efektif dozu (500 mg%) ile birlikte SOD verildiğinde gözlenen etkiler.

İnkübasyon	Anormal embriyo sayısı	Kulak deformitesi	Hematom	Nöral tüp defekti	Anormal fleksiyon	Göz deformitesi	Yüz deformitesi
Kontrol	0 /10 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)
Etanol (mg%)	(250)	1/10(%10)	0(%0)	0(%0)	1(%10)	0(%0)	1(%10)
	(500)	5/10(%50)**	0(%0)	0(%0)	7(%70)***	0(%0)	7(%70)***
Etanol (500)+SOD	2/10(%20)##	0(%0)	0(%0)	2(%20)##	2(%20)##	0(%0)	1(%20)##

* = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001 (Kontrol grubundan anlamlı farklılık gösterir)

= P<0.05, ## = P<0.01 (Etanol 500 mg% ilave edilmiş olan gruptan anlamlı farklılık gösterir)

Tablo 2. Etanol (500 mg%)'ün en küçük efektif dozu varlığında kültürü yapılan 11.5 günlük rat embriyolarında görülen büyüme ve gelişme ile bu dozlarla birlikte SOD verildiğinde gözlenen etkiler (ortalama ± standart hata).

İnkübasyon	N	Total Morfolojik Skor	Yolk Sak Çapı (mm)	Tepe-Kıç uzunluğu (mm)	Somit Sayısı	Embriyo Protein(ug/ml)	Yolk Sak Protein(ug/ml)
Kontrol	10	55.1±1.6	3.33±0.05	3.02±0.05	24.9±0.45	142.7±3.75	122.4±6.24
Etanol (500mg%)	10	40± 2.15***	2.3±0.05***	2.27±0.07***	20.2±0.79***	96±5.15***	98±7.7***
Etanol (500mg%)+SOD	10	50.5±1.6*, ##	2.87±0.06**, ##	2.80±0.05**, ##	22.8±0.7*, ##	118±5.4**, ##	112±6.2*, #

* = P<0.05, ** = P<0.01, *** = P<0.001 (Kontrol grubundan anlamlı farklılık gösterir)

= P<0.05, ## = P<0.01 (Etanol 500 mg% ilave edilmiş olan gruptan anlamlı farklılık gösterir)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Etanolün kemirgen embriyolarında nöralasyon periyodunda (insanda 3-4. gebelik haftaları) kültür ortamında teratojen etkilere sebep olduğu daha önce yapılan in vitro fare ve rat embriyo kültür çalışmalarında bildirilmiştir (5,14,23,24). Hunter ve ark. (7), fare embriyolarını kültür ortamında değişen dozlarda etanole maruz bırakmış ve etanolün etkisinin doza ve embriyonun maruz kaldığı süreye bağımlı olduğunu göstermişlerdir. Bunun yanı sıra etanolün sinir sistemi üzerindeki etkisinin sadece gelişme geriliğine bağlı olmayıp spesifik teratojen bir etki olduğunu saptamışlardır. Etanolün sinir sistemi gelişimi üzerine teratojen etkisinin somit gelişimi öncesi dönemde daha fazla olduğu ve bu dönemde maruziyetin kraniofasial deformitelere daha çok neden olduğu yine tavuk embriyolarında yapılan bir çalışmada gösterilmiştir (16). Fötal gelişimin bu döneminde özellikle gebelik ésnasında aşırı etanole maruz kalma sonucunda nöral tüp defektleri olan ve yüz yapılarında anomaliler gözlenen fetuslar bildirilmiştir (9-11). Hayvan modellerinde ve in vitro sinir hücresi kültürlerinde yapılan çalışmalarda etanolün teratojen etkisinin

sebebi olduğu patolojinin özellikle sinir sistemini oluşturacak kök hücrelerde aşırı hücre ölümü olduğu (8,12,18) saptanmıştır. Bizim çalışmamızda etanolün doz bağımlı olarak rat embriyolarında in vitro kültür ortamında gelişimsel geriliğe ve özellikle yüz yapılarında olmak üzere malformasyonlara, fleksiyon anomalilerine ve nöral tüp kapanma defektlerine sebep olduğu saptandı. Bu sonuçlar etanol ile ilgili daha önce yapılan çalışmaların sonuçları ile uyumlu bulundu.

Bu çalışmada ilave olarak etanolün etkisinin serbest oksijen radikalleri üzerinden olup olmadığı araştırıldı. Ortama SOD ilavesinin etanole maruz kalma sonucunda ortaya çıkan gelişme geriliğini ve malformasyonların sıklığını istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı gözlemlendi. Davis ve ark. (13), civciv nöral tüp hücreleri kültüründe etanolün neden olduğu hücre ölümünün ortama SOD ilavesi ile azaldığını saptamıştır. Yine Kotch ve ark (25), fare embriyosu kültüründe etanolün sebep olduğu teratojen etkilerin ortama SOD etkisi ile kısmen geri dönebildiğini göstermişlerdir. Daha yakın zamanda Chen ve Sulik (26), fare nöral hücre kültürlerinde etanolün teratojenik etkilerinin

serbest radikalleri azaltıcı enzimler olan SOD, katalaz ve alfa-tokoferol ile azaltılabileceğini ortaya koymuşlardır. Bizim çalışmamızın sonuçları daha önce farklı türlerde yapılan bu çalışmaların sonuçları ile uyumlu olup, böylece üç farklı türde in vitro kültür tekniği ile etanolün teratojenik etk-

isinde serbest radikal hasarının rolü olduğu belirlenmiş olmaktadır.

Teşekkür: Çalışmamız sırasında bize yardımcı olan Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Merkezi yönetici ve çalışanlarına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Moore KL, Persoud T.V.N. Human birth defects. In: The developing human: Clinically oriented embryology. USA: WB Saunders Company;1993;73.
2. New DAT, Coppola PT, Cockroft DL. Comparison of growth in vitro and in vivo of post-implantation rat embriyos. J Embriyol Exp Morphol 1976;36(1):133-44.
3. New DAT. Whole embriyo culture and the study of mammalian embriyos during organogenesis. Biol Review 1978;53:81-122.
4. Karabulut AK. İn vitro rat embriyo kültürü ve uygulama alanları. SÜ Tıp Fak Derg 2001; 17:59-67.
5. Clode AM., Pratten MK., Beck F. The effect of ethanol on the growth of rat embriyos: the role of stage dependency and hyperosmolarity. Arch Toxicol Suppl 1987;11:163-7.
6. Webster WS. Alcohol as a teratogen: A teratological perspective of the fetal alcohol syndrome. In: Human metabolism of Alcohol. Crow KE. and Batt RD. eds. CRC Press, Boca Raton, FL, 1989; p.134-55.
7. Hunter ES, Tugman JA, Sulik KK, Sadler TW. Effects of short-term exposure to ethanol on mouse embriyos in vitro. Toxicol In Vitro 1994;8:413-21.
8. Kotch LE, Sulik KK. Experimental fetal alcohol syndrome: proposed pathogenic basis for a variety of associated craniofacial and brain anomalies. Am J Med Gen 1992;44:168-76.
9. Clarren SK, Smith DW. The fetal alcohol syndrome. N. Eng. J. Med 1978;298:106-7.
10. Clarren SK. Neural tube defects and fetal alcohol syndrome. J. Pediatr 1979;94:328.
11. Sulik KK, Johnston MC, Daft PA, Russell WE, Dehart DB. Fetal alcohol syndrome and DiGeorge anomaly:critical ethanol exposure periods for craniofacial malformations as illustrated in an animal model. Am. J. Med. Genet 1986;2:97-112.
12. Hassler JA, Moran DJ. Effects of ethanol on the cytoskeleton of migrating and differentiating neural crest cells: possible role in teratogenesis. J Craniofac Genet Dev Biol Suppl 1986;2:129-36.
13. Davis WL, Crawford LA, Cooper OJ, Farmer GR, Thomas D, Freeman BL. Ethanol induces the generation of reactive free radicals by neural crest cells in vitro. J. Craniofac. Genet. Dev. Biol 1990;10:277-93.
14. Fadel RA, Persaud TV. Effects of alcohol and caffeine on cultured whole rat embriyos. Acta Anat (Basel) 1992;144(2):114-9.
15. Elmazar MM, Nau H. Ethanol potantiates valproic acid induced neural tube defects (NTDs) in mice due to toxicokinetic interactions. Reprod Toxicol 1995;9(5):427-33.
16. Cartwright MM, Smith SM. Stage-dependent effects of ethanol on cranial neural crest cell development: partial basis for the phenotypic variations observed in fetal alcohol syndrome. Alcohol Clin Exp Res 1995;19(6):1454-62.
17. Chen SY, Yang B, Jacobson K, Sulik KK. The membrane disordering effect of ethanol on neural crest cells in vitro and the protective role of GM1 ganglioside. Alcohol 1996;13(6):5895.
18. Rovasio RA, Battiato NL. Ethanol induces morphological and dynamic changes on in vivo and in vitro neural crest cells. Alcohol Clin Exp Res 2002;26(8):1286-98.
19. Terano A, Hiraishi H, Ota S, Shiga J, Sugimoto T. Role of superoxide and hydroxyl radicals in gastric mucosal injury induced by ethanol. Gastroenterol Jpn 1989;24(5):488-93.
20. Oldfield FF, Cowan DL, Sun AY. The involvement of ethanol in the free radical reaction of 6-hydroxydopamine. Neurochem Res 1991;16(1):83-7.
21. Maele GV, Delhaise FF, Picard JJ. Morphogenesis and quantification of the development of post-implantation mouse embriyos. Toxicol In Vitro 1990;4(2):149-56.
22. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 1951;193:265-75.
23. Brown NA, Goulding EH, Fabro S. Ethanol embryotoxicity: direct effects on mammalian embriyos in vitro. Science 1979;206:573-5.
24. Priscott PK. The effects of ethanol on rat embriyos developing in vitro. Biochem Pharmacol 1982;15(3):3641-3.
25. Kotch LE, Chen SY, Sulik KK. Ethanol-induced teratogenesis: free radical damage as a possible mechanism. Teratology 1995;52(3):128-36.
26. Chen SY, Sulik KK. Free radicals and ethanol-induced cytotoxicity in neural crest cells. Alcohol Clin Exp Res 1996;20(6):1071-6.