

مطالعه اثرات مداخله فنل بر ارگانوژنز موش

دکتر مهدی جلالی^۱ دکتر محمد رضا نیکروش^۲

Title: The Study of Phenol Interventional Effects on Mouse Organogenesis

Authors: Mahdi Jalali¹ Mohammad Reza Nikravesht²

Abstract: Phenol with its application in the preparation of many chemical compounds, drugs and sanitating agents is used. Therefore during pregnancy contact with phenol it can absorb and produce, maternal toxicity and affect on embryonic evolution. The aim of this investigation was to study the teratogenic effects of phenol in the developing mouse. For this study 14 virgin mice balb/c were mated. The pregnant mice were divided to experimental and control group. Between 7 to 11 postmating days, 50 mg/kg phenol (merk) intraperitoneally injected daily in experimental and the same manner control group received physiological serum. At the last day of pregnancy, all of cases (experimental and control) were anesthetized, sacrificed and their fetuses collected, coded and all of malformations examined. The results show a decrease of population and high incidence of various abnormalities (such as exencephaly, limbs and skeletal defects) in experimental fetuses in comparison with control group.

Key words: Phenol, Abnormality, Pregnancy, Mouse.

۱- دانشیار آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
۲- دانشیار آناتومی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

با توجه به طیف وسیع استفاده از فنل در پزشکی، و کاربری آن در تهیه مواد بهداشتی و صنعتی، ممکن است مادران حامله ای که به نوعی در تماس با آن واقع می شوند، مسمومیت ناشی از نفوذ پذیری شدید فنل را به جنین منتقل نموده و روند تمایز و تکامل جنینی را از این طریق تحت تاثیر قرار دهند. در این پژوهش که به منظور بررسی اثرات ناهنجاری زایی فنل در طی دوران تکامل جنینی موش صورت گرفته است ۱۴ موش باکره از نژاد balb/c انتخاب و پس از آمیزش و تعیین روز صفر حاملگی به دو گروه (تجربی و کنترل) تقسیم شدند. در محدوده روزهای ۷ تا ۱۱ حاملگی مقدار ۵۰ mg/kg فنل به صورت داخل صفاقی در یک نوبت به رت های حامله (گروه تجربی) تزریق گردید. در نمونه های گروه کنترل نیز بصورت مشابه از سرم فیزیولوژی استفاده شد. سپس در آخرین روز حاملگی، ضمن بیهوشی و قطع نخاع در هر دو گروه، جنینهای بدست آمده ضمن شمارش کدگذاری گردیده و سایر خصوصیات ظاهری آنان نیز با استفاده از میکروسکوپ استریو مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهد که بدنال تجویز فنل در طی دوره های حساس حاملگی در گروه تجربی، نقایص متعددی از قبیل اگزانسفالی، نقایص اندامهای حرکتی و نقایص اسکلتی در بعضی از آنان به چشم می خورد که بروز چنین نقایص در جنین های گروه کنترل مشهود نیست. یافته های موجود بر این نکته دلالت دارند که فنل در دوران حاملگی با تاثیر گذاری بر ارگانوژنز جنینی قادر است به بروز نقایص تکاملی متفاوت و حتی مرگ جنین منجر گردد.

کل واژگان: فنل، حاملگی، ناهنجاری، موش.

مقدمه

این مسمومیت را بیش از آنچه که هست افزایش می دهند (۲). به هر حال تماس با فنل به هر صورتیکه باشد (تماس پوستی و یا جذب مخاطی)، این ماده با قابلیت بالای نفوذ پذیری که از خود نشان می دهد به سرعت وارد گردش خون می شود و به همولیز اریتروسیت ها می انجامد (۱ و ۳). در چنین شرایطی اثرات سیتوتوکسیک فنل و متابولیت های حاصل از آن بر روی اریتروسیت های جنینی نیز بی تاثیر نیست (۴). این ماده، علاوه بر این می تواند به یونیزه کردن سورفاکتانت منجر شود و اثر آن را در ارتباط با مقابله کشش سطحی آلونلهای ریوی خنثی نماید و از این طریق به ادم ریوی و نارسایی تنفسی منجر شود (۵). علاوه بر این فنل با تحریک سیستم عصبی قادر است فعالیت عضله قلب را تحت تاثیر قرار داده و به آریتمی و تاکیکاردی منجر شود

علاوه بر کاربردهای متفاوتی که برای فنل در داروسازی و صنعت در نظر گرفته شده است استفاده از آن در فیکس کردن جسد در سالنهای تشریح دانشکده های پزشکی سابقه ای طولانی دارد. در این نوع آماده سازی که فیکساسیون با بهره گیری از فنل انجام می گیرد بطور متوسط ۵ کیلوگرم فنل همراه با سایر فیکساتور ها (مثل الکل و فرمالین) باید به یک جسد تزریق شود که گاهی بسته به میزان چاقی و بزرگی جثه، مصرف فنل از این حد هم فراتر می رود. تحقیقات نشان داده است که این ماده شدیداً سمی است و مصرف بین ۸ تا ۱۵ گرم فنل می تواند چنان مسمومیتی در انسان ایجاد نماید که منجر به مرگ شود (۱) و این در شرایطی است که فنل و فرمالین (که با هم در فیکساسیون بکار برده می شوند) قدرت

مربوط به هر یک از مادران شمارش شد و برای فیکس و مطالعات بعدی در شیشه های کد گذاری شده محتوی فرمالین ۱۰٪ و بوئن قرار داده شدند. در مرحله بعد، جنینها ابتدا به صورت ماکروسکوپی و سپس با استفاده از استرئومیکروسکوپ مورد معاینه دقیق قرار گرفته و هر گونه تغییر شکل در ساختمان ظاهری آنان ثبت و بررسی شد. در این مطالعه که برای پرهیز از سوگرایی به صورت کور انجام شد، هر گونه تغییرات ماکروسکوپی غیر معمول در جنینهای متعلق به تمام مادران تجربی و کنترل ثبت گردید. سپس نتایج به دست آمده با استفاده از محاسبات آماری تجزیه و تحلیل گردیده و با یکدیگر مقایسه شدند.

نتایج

الف- تعداد: نتایج حاصل از شمارش جنینهای تجربی نسبت به کنترل کاهش معنی داری را از نظر تعداد نشان داد به گونه ای که میانگین جنینهای تجربی نسبت به کنترل متوسط ۶/۸۵ به ۱۱/۱۴ است (جدول ۱).
 ب- نقایص جنینی: در بررسی های به عمل آمده مشخص شد که علی رغم تعداد جمعیت کمتر جنینهای تجربی نسبت به کنترل، درصد بروز ناهنجاریهای مختلف (نمودار ۱) در میان آنان به شکل چشمگیری ($P < 0.05$) افزایش یافته است. یکی از ناهنجاریهایی که در جنینهای گروه تجربی به شکل وسیعی به چشم می خورد نقص در سیستم اسکلتی، خصوصاً "نقص در شکل گیری استخوانها است که خود می تواند ناهنجاریهای متعدد دیگری را بدنال داشته باشد. در میان این جنین ها نمونه های بارزی از اگزانسفالی دیده می شود که به علت نقص در تکامل استخوانهای جمجمه، استخوانهای پاریتال و صدف استخوانها اکسیپیتال و فرونتال کامل نشده و مغز و پرده های منژ اطراف آن فقط بواسطه پوست سر پوشیده شده است. علاوه بر این نمونه هایی از

(۶ و ۷). بنابراین با اثرات جانبی متعدد و متفاوتی که برای آن سراغ می رود، طبیعی است که چنانچه مادران حامله ای (چه به عنوان دایسکتور سالنهای تشریح و چه به عنوان کارگران کارخانجات تولید کننده رزینها، مواد پلیمری و شیمیایی) با این ماده تماس داشته باشند باید این خطر را بپذیرند که سلامت حاملگی آنان می تواند تهدید شود تا آنجا که عوارضی از قبیل تاخیر در رشد، عوارض موتاژنیک و کارسینوژنیک، ناهنجاری های متفاوت و سقط جنینی را بدنال داشته باشد (۸-۱۰). پژوهش حاضر که در گروه علوم تشریحی دانشکده پزشکی مشهد و با هدف مطالعه تاثیر مقادیر اندک فنل بر حاملگی با استفاده از حیوان آزمایشگاهی موش صورت گرفته است سعی گردیده تا اثرات احتمالی این ماده در رابطه با ناهنجاری زایی مورد ارزیابی قرار گیرد.

روش کار

۱۴ موش باکره از نژاد و Balb/C به سن تقریبی ۲ ماه و با وزن متوسط ۳۰ تا ۴۰ گرم با موشهای نر سالم آمیزش داده شده و روز صفر حاملگی در آنان مشخص شد. سپس به طور تصادفی به دو گروه تجربی و کنترل ($n = 7$) در شرایط استاندارد حیوانخانه (پریود ۱۲ ساعته روشنایی و تاریکی، آب و غذای کافی و حرارت 24 ± 1 درجه سانتیگراد) مورد مراقبت قرار گرفتند. موش های گروه تجربی به ترتیب در روه های ۸، ۹، ۱۰ و ۱۱ حاملگی مورد تزریق داخل صفاقی ۵۰ mg/kg (دوز پایین تر از دوز موثر توکسیک) فنل (Merk آلمان) محلول در سرم فیزیولوژی واقع شدند (۱۱). برای ایجاد استرس حاصل از تزریق، مشابه گروه تجربی فقط واحد معادل یک میلی لیتر سرم فیزیولوژی به مادران گروه کنترل تزریق گردید. موشهای هر دو گروه در آخرین روز حاملگی تحت بیهوشی با اتر، سزارین شده و ضمن باز نمودن شاخه های رحم، جنین های

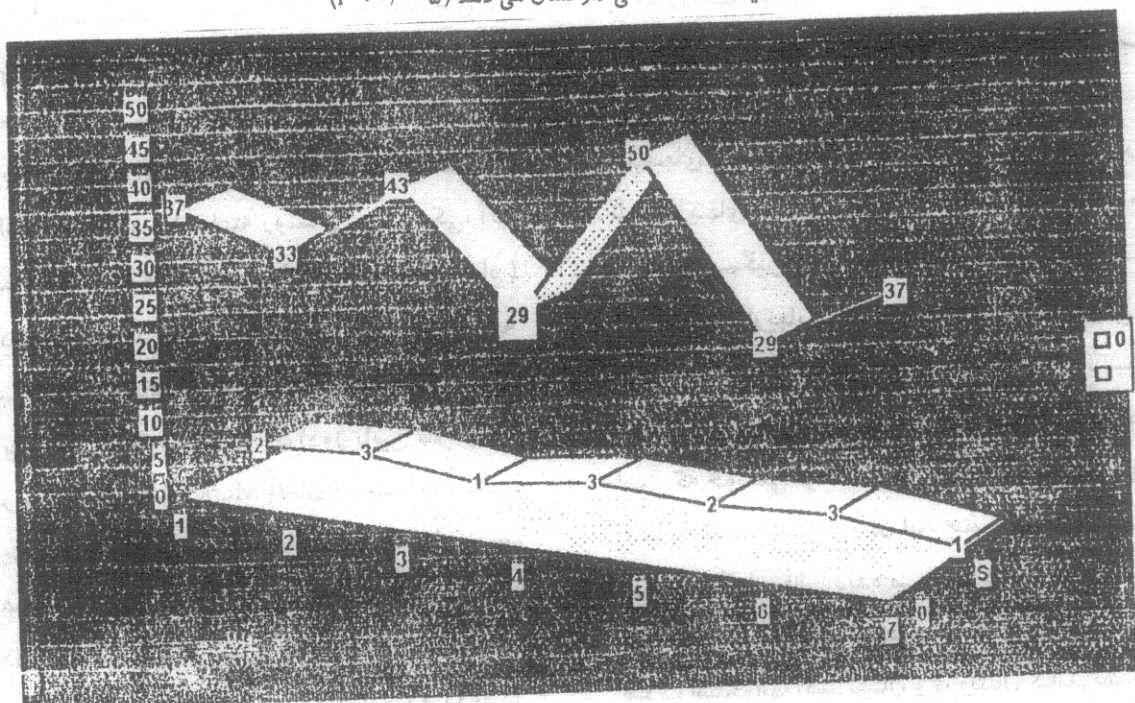
مه‌ره‌ها و خمیدگی بیش از حد آن که جنین را به حالت C شکل در آورده است نیز در بعضی از نمونه‌های تجربی دیده می‌شود. بررسی بعمل آمده نشان داد که در مجموع در جنینهای گروه کنترل نقص تکاملی قابل ملاحظه‌ای دیده نمی‌شود. در این رابطه فقط یک مورد ناهنجاری خفیف اندام حرکتی قدامی به ثبت رسیده است (جدول ۱ و نمودار ۱).

ناهنجاریهای اندام به شکل چرخش شدید و نامتقارن اندامهای حرکتی خلفی و پیچ خوردگی دم در بعضی از نمونه‌های تجربی دیده می‌شود (نمودار ۲). در بعضی دیگر از این نمونه‌ها نیز علاوه بر نقص تکاملی اندامهای حرکتی خلفی و انحراف در چرخش طبیعی آنها نقایص تکاملی مربوط به اندامهای حرکتی قدامی و عدم تمایز انگشتان قابل رویت است. نقایص اسکلتی دیگر از قبیل شکل‌گیری غیر طبیعی ستون

جدول ۱: مقایسه تعداد جنینهای تجربی و کنترل و ناهنجاریهای ثبت شده

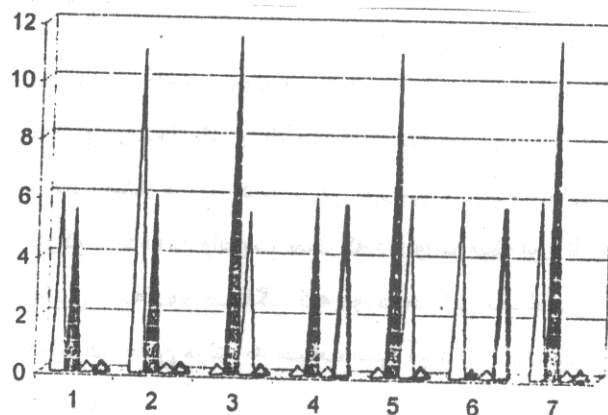
شماره موش	تعداد کل جنین‌ها		تعداد جنین‌های غیر طبیعی		اختلالات تکاملی	کنترل
	تجربی	کنترل	تجربی	کنترل		
۱	۸	۹	۲ مورد	-	اگزانسفالی (۱) و نقص اندام (۱)	-
۲	۷	۱۲	۳ مورد	-	اگزانسفالی (۱) و نقص اندام (۱)	-
۳	۶	۱۰	۳ مورد	-	پیچ خوردگی دم (۱) و اندام نامتقارن (۲)	-
۴	۷	۱۳	۲ مورد	-	نقص اندام (۱) و اسکلت C شکل (۱)	-
۵	۶	۱۰	۳ مورد	-	پیچ خوردگی دم (۱) و نقص اندام (۲)	-
۶	۷	۱۲	۲ مورد	-	اگزانسفالی (۱) و اسکلت C شکل (۱)	-
۷	۷	۱۲	۳ مورد	-	اگزانسفالی (۱) و نقص اندام (۲)	-

میانگین جنینهای گروه تجربی ($6/85 \pm 0/47$) و میانگین جنینهای گروه کنترل ($11/14 \pm 0/34$) محاسبه گردیده است که از نظر مقایسه تعداد، معنی‌دار نشان می‌دهد ($P < 0/005$)



نمودار ۱- مقایسه درصد ناهنجاری زایمی مادران گروه تجربی و کنترل ($P < 0/001$) در این نمودار محور عمودی بیانگر درصد جنینهای مالفورم تجربی (نوار خاکستری بالا) و کنترل (نوار روشن پایین) و محور افقی مشخص کننده تعداد مادران در هر یک از گروهها است.

مختلف با هم مقایسه و مورد ارزیابی قرار گیرد (۱۴). اهمیت این موضوع آنگاه مشخص می شود که توجه داشته باشیم که طیف وسیعی از مادران حامله بدون آنکه بخواهند در معرض اینگونه ترکیبات واقع می شوند زیرا امروزه ثابت شده است که فنل به عنوان یکی از مهمترین آلاینده های محیطی ناشی از احتراق سوخت های فسیلی در آلودگی هوای بسیاری از مناطق جهان سهم عمده ای را به خود اختصاص میدهد (۱۵)، که در بخشی از ناهنجاریهای پدید آمده که در این پژوهش نیز به ثبت رسید مربوط به تکامل غیر طبیعی سیستم عصبی مرکزی است که به صورت اگزانسفالی در بعضی از جنین های تجربی مورد مطالعه قرار گرفت بنابراین با توجه به اینکه دوران بحرانی ارگانوژنز موش در فاصله بین روزهای هفتم تا یازدهم حاملگی است (۱۶) بعید به نظر نمی رسد که تاثیر گذاری فنل تجویز شده به مادران حامله که در این محدوده زمانی صورت گرفته است توانسته باشد تکامل سیستم عصبی مرکزی را تحت تاثیر قرار دهد زیرا در یکی از پژوهشهایی که بوسیله Kats و همکاران (۱۹۹۵) انجام شده است در این رابطه خاطر نشان می کند که تزریق اپی دورال فنل در پریماتها می تواند منجر به تغییرات هیستوپاتولوژیک نخاع گردد (۱۷). در همین راستا مشخص شده است که تاثیر فنل می تواند تمایز نورونهای پیرامیدال و سلولهای گلیال کورتکس مغز را تحت تاثیر قرار دهد و تکامل شبکه کورویید را به تاخیر اندازد (۱۸). به هر حال اگر چه هنوز مکانیسم دقیق تاثیر گذاری این مواد بخوبی بیان نگردیده است اما آنچه که از یافته های مربوط به این پژوهش بر می آید این است که احتمالاً مقادیر اندکی از فنل که حتی پایین تر از حداقل دوز موثر محرک موجود زنده باشد (۱۰) می تواند روند طبیعی تکامل و پایداری جنین را در طی دوران حاملگی به مخاطره اندازد.



نمودار ۲- نمایش درصد بروز ناهنجاریهای مختلف در جنینهای هر یک از مادران تجربی. در این نمودار محور عمودی، بیانگر نوع و درصد ناهنجاری متعلق به جنینهای هر مادر از گروه تجربی و محور افقی بیانگر تعداد مادران این گروه است. مخروطهای این نمودار به ترتیب برای ناهنجاریهای اندام (سیاه)، اگزانسفالی (خاکستری با حاشیه روشن)، نقص اسکلتی (خاکستری با حاشیه تیره) و پیچ خوردگی دم (سفید) نشان داده شده است.

بحث

با انجام مطالعات مختلفی که در باب اثرات سیستمیک فنل صورت گرفته است کم کم این ذهنیت در بعضی از پژوهشگران مربوط به این موضوع پیش آمد که فنل یا متابولیت های حاصل از آن ممکن است بدنبال ورود این ماده به بدن مادران حامله بر روی تمایز جنینی آنان نیز اثرات نامطلوبی از خود بر جای گذارد. در رابطه با توجه به این موضوع که بیشتر در دهه اخیر صورت گرفته است Denbeston و همکاران (۱۹۹۱) به نفوذ پذیری متابولیت های بنزن (از جمله فنل) پرداخته (۱۲) و ضمن یادآوری اثرات مسمومیت زایی آن عوارض ناشی از تماس با اینگونه مواد را یادآوری نموده اند. متعاقب آن Chebator و همکاران (۱۹۹۴) به تاثیر اینگونه عوامل بر ژنوتیپ فرزندان اشاره دارند که مادرانشان در معرض این ترکیبات قرار گرفته اند (۱۳). در تحقیق مشابهی که بوسیله Guiraud و سایر همکاران (۱۹۹۵) انجام شده است تا اثرات مسمومیت زایی ترکیبات فنلیک

اثرات القایی Apical ectodermal ridge بر روی مزانشیم زیرین آن شروع به پیدایش می نماید احتمالاً مداخله فنل روند این تمایز را تحت تاثیر قرار داده و در شکل گیری طبیعی اندامها و چرخش آنها ایجاد اختلال می نماید بنابر این بررسی نتایج حاصل، بازگو کننده این واقعیت است که در اواخر نیمه اول تا اوایل نیمه دوم حاملگی که دوره بحرانی تکامل و تمایز در جنین موش به حساب می آید (۱۴). تاثیر فنل ولو به مقدار بسیار اندک ممکن است اثرات نامطلوبی بر اندام زایسی جنینی از خود باقی گذارد و احتمالاً بر اختلالات تکاملی بر اندامهای حرکتی منجر شود بنابراین با توجه به آندسته از نقایص اسکلتی و اختلالات تکاملی در اندامهای حرکتی قدامی و خلفی اعم از چرخش غیر طبیعی اندامها و یا تمایز نیافتن انگشتان می تواند دلالت بر این باشد که در شرایط بحرانی اندام زدایی جنینی، مداخله هر گونه عامل مزاحمتی (منجمله تاثیر فنل و یا متابولیت‌های آن) که بتواند بر روند القاء و میانکنش های سلولی مرتبط با این تمایزات تاثیر بگذارد احتمالاً خواهد توانست بگونه ای پدیده های منتهی به تکامل از قبیل تکثیر، تمایز، مهاجرت و مرگ از پیش برنامه ریزی شده سلولی را در جنین تحت تاثیر قرار داده و به اختلال تکاملی از قبیل آنچه که دیده شد منجر شود.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می دهد که با تجویز فنل در طی دوره های حساس حاملگی دو گروه تجربی، نقایص متعددی از قبیل اگزانسفالی، نقایص اندامهای حرکتی و نقایص اسکلتی در برخی از آنان دیده میشود. فنل در دوران حاملگی با تاثیر گذاری بر ارگانوژنز جنین قادر است به بروز نقایص تکاملی متفاوت و حتی مرگ جنین منجر گردد.

یک موضوع دیگر اینست که ممکن است تاثیر فنل و یا متابولیت‌های ناشی از آن بطور غیر مستقیم به این ناهنجاریها دامن زند زیرا یکی از پیامدهای تاثیر گذاری فنل بر زندگی جنین به عنوان تاخیر در رشد بیان شده است در این رابطه مطالعات Invitro بر روی سلولهای مزانشیمال موش و انسان نشان داده است که رشد این سلولها در محیط اینگونه متابولیت‌ها محدود میشود و از این طریق تمایز بافتهای جنینی را مورد تهدید قرار میدهد (۱۹). لذا با توجه به این نکته که بیشتر استخوانهای سر و صورت به توسط سلولهای مزانشیمی مشتق از ستیغ عصبی ساخته می شوند بعید به نظر نمیرسد که فنل یا متابولیت‌های حاصل از آن از طریق تاثیر گذاری بر روند تمایز این سلولها اثر نموده و از تبدیل آنها به استئوبلاستها جلوگیری نماید و در نهایت به نقایص اسکلتی از جمله نقص در تشکیل استخوانهای جمجمه (که در این پژوهش دیده شد) منجر شود. موضوع قابل تامل دیگری که در این رابطه باید مد نظر قرار گیرد متابولیت‌های پایدار است که از تجزیه فنل در کبد حاصل می شود زیرا با مطالعه بر روی جنین رت (در حوالی روز سیزدهم که جنین ۹ تا ۱۳ سومیت دارد) نشان داده شده است که اگر چه نیمه عمر فنل از حدود ۳ ساعت فراتر نمی رود اما با توجه به اینکه پس از شکسته شدن آن در کبد مادر متابولیت‌های پایدارتری حاصل می شود (۲۰) این مواد نیز می تواند دارای قابلیت تاثیر گذاری بر روند تکامل جنینی باشد (۲۱). یکی دیگر از نقایص عمده ای که در ارتباط با ناهنجاریهای اندامهای حرکتی در این مطالعه به چشم میخورد غیر طبیعی بودن آنها به شکل ایجاد انحراف و چرخش محوری نامتقارن است بر اساس این مطالعه و با عنایت به اینکه جوانه های اندام در موش در محدوده زمانی روزهای نهم تا دهم جنینی (۱۴) تحت تاثیر

References:

- 1- Reynold J E F; Martindale the extera pharmacopoeia. disinfectants and antiseptics, 1982, 28th Ed. Londn. P: 570-572.
- 2- Kilburn K H; Neurobehavioral impairment and seizures from formaldehyde. Arch. Environ. Health, 1994, 49 : 37-44.
- 3- Kiilunen M.T.I. Biomonitoring action levels in Finland. Int. Arch. Occup. Environ Health, 1999, 72 (4): 261-267.
- 4- Corti M, Snyder C A. Gender and age-specific cytotoxic susceptibility to benzene metabolites in vitro. Toxicol. Sci. 1998, 41 : 42-48.
- 5- Shvedova A. A., Menshichova E. V., Ritov V. B., Kagan V. E., Karol M. H., Murine pulmonary ca (2+) -transport system activated by allergic immune response retains sensitivity to oxidative stress. Exp-Lung-Res. 1995, 21(5): 743-770
- 6- Chan T Y; Critchley J A; Is chloroxilenol nephrotoxic like phenol A studuy of patients with Dettol poisoning. Vet-Hum Toxicol, 1994. 36 (3): 250-251.
- 7- Morisson J E; Phenol motor point blocks in children plasma and cardiac dysarythmias. Anesthesiology, 1991, 75 (2): 359-362.
- 8- Narotosky M G; Kavlock R J; A multidisciplinary approach to toxicological screening: II-Developmental toxicity. J. Toxicol. Environ. Health, 1995, 45 (2): 145-171
- 9- Kagan V E; Yalowich J C; Day B W; Goldman R; Gantchev T G; Stoyanovsky D A; Ascorbate is the primary reductant of the phenoxy radical of etoposide in the presence of thiols both in cell homogenates and in model system. Biochemistry, 1994, 33 (32): 9651-9660.
- 10- Zhao F; Mayura K; Hutchinson R W; Lewis RP; Burghardt R C; Phillips T D; Developmental toxicity and structure-activity relationships of chlorophenols using human embryonic palatal mesenchymal cells. Toxicollett. 1995, 78 (1) : 35-42.
- 11- Itho M; The role of brain acetylcholine in phenol induced tremor in mice. Arch Oral-Biol. 1995, 40 (5): 365-372.
- 12- Denbeston C; Browwer A; Biotransformation and toxicity of halogenated benzen. Human-Exp-Toxicol. 1994, 13 (12): 866-875.
- 13- Chebator N A; Knopsitsera I A; The role of maternal genotype in the realization L of embryotoxic activity. Gene, 1994, 28 (5): 77-80.
- 14- Guiraud P; Steiman R; Seigle M; Comparison of the toxicity of various phenolic compounds. Toxicol. 1995, 32 (1): 29-33
- 15- Katsnelson B A; Kosheleva A A; Privalova L I; Kuzmin S V; Malykh O L; Khalfin R A; Nikonov B I; Ozkainak K h; Xue J; Impact of

short-term increase in air pollution on mortality of the population. *Gig-Sanit.* 2000, 1: 15-18.

16 - Bernard F S; and Stata N; Equivalent ages in rat, mouse and chick embryos. *Teratology*, 1997, 19: 273-287.

17- Kats J A; Blisard K S; Histopatologic changes in primate spinal cord after phenol injection. *Reg-Anest.* 1995, 20 (4): 283-290.

18- Martinasevic M K; King C D; Rios G R; Tephly T R; Immunohistochemical localization of UDP-glucuronosyltransferases in rat brain during early development *Drug-Metab-Dispos.* 1998; 26 (10): 1039-1041.

19- Seaton M G; Schlosser P M; Bond JA; Medinsky M A; Benzen metabolism by human liver microsomes in relation to cytochrome P450 2E1 activity. *Carcinogenesis* 1994, 15 (9): 1799-1806.

20- Nanbo T; Developmental changes in hepatic microsomal interactions between UDP-glucuronyltransferase and phospholipid in the rat fetus. *Reprod-Toxicol*, 1998; 12 (4): 449-456.

21- Utesch D; Oesch F; Dependency of the in vitro stabilization of differentiated functions in liver parenchymal cells on the type of cell line used for co-culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1992, 27:193-198.