

Original Paper

The protective role of folic acid on teratogenic effect of Carbamazepine in Balb/c mice

Afshar M (PhD)¹, Moallem SA (PhD)*², Baharara J (PhD)³, Takjoo T (MSc)⁴

¹Associate Professor, Department of Anatomy, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran.

²Associate Professor, Pharmaceutical Research Center, Medical Toxicology Research Center, Department of Pharmacodynamics & Toxicology, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

³Assistant Professor, Department of Biology, Mashhad Azad University, Mashhad, Iran.

⁴Developmental Biologist, Department of Biology, Mashhad Azad University, Mashhad, Iran.

Abstract

Background and Objective: Carbamazepine (CBZ) is an antiepileptic drug that causes significant malformations such as neural tube defects (NTDs), cardiac, skeletal and craniofacial defects if it is consumed during pregnancy. The aim of this study was to evaluate the protective effect of folic acid on prevention of birth defect due to Carbamazepine in Balb/c mice.

Materials and Methods: In this experimental study, Sixty Balb/c timed-pregnant mice were divided into 4 experimental and 2 control groups. Two experimental groups received daily intraperitoneal injections of 30 mg/kg (group I) and 60 mg/kg/body weight (group II) of CBZ on gestational days (GD) 6 to 15. Two other experimental groups (group III and IV) received similar doses of CBZ with folic acid supplement (3 mg/kg/day) by gavage route for 10 days before pregnancy and 15 days after GD0 (gestational day 0). Two control groups received normal saline or Tween 20 (polysorbate 20). Dams underwent cesarean section on GD18 and embryos were collected. External examination was done and data concerning malformations, weight and crown-rump of fetuses were collected and analyzed by using SPSS-11.5 software and ANOVA and chi-square tests.

Results: The mean weight and crown-rump of the fetuses in both experimental groups I and II were significantly reduced. Also in both experimental groups I and II various malformations were detected such as open eyes, limb defects, scoliosis, facial deformity and NTDs. The mean weight and crown-rump of fetuses in the folic acid treated groups did not show any meaningful differences in comparison with fetuses in experimental groups I and II. Also, meaningful reductions in eye, vertebral, limb and facial defects were seen in fetuses of group III. In experimental group IV, reduction of vertebral and limb defects were observed.

Conclusion: This study showed that consumption of folic acid (3 mg/kg/body weight) before and during pregnancy can reduce birth defects due to CBZ in Balb/c mice fetus.

Keywords: Carbamazepine, Birth defects, Folic acid, Mice

* Corresponding Author: Moallem SA (PhD), E-mail: moallem@mums.ac.ir

Received 3 Feb 2010

Revised 28 Jun 2010

Accepted 1 Aug 2010

تحقیقی

اثر حفاظتی اسیدفولیک بر ناهنجاری‌های ناشی از کاربامازپین در جنین موش

دکتر محمد افشار^۱، دکتر سید عادل معلم^{۲*}، دکتر جواد بهارآرا^۱، تکتیم تکجو^۴

۱- دانشیار گروه علوم تشریحی، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند. ۲- دانشیار مرکز تحقیقات علوم دارویی، مرکز تحقیقات سم‌شناسی پزشکی، گروه فارماکودینامی و سم‌شناسی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد. ۳- استادیار گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد. ۴- کارشناس ارشد زیست‌شناسی سلولی تکوینی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد مشهد.

چکیده

زمینه و هدف: کاربامازپین یکی از داروهای ضدصرع است که مصرف آن در طی بارداری باعث ایجاد ناهنجاری‌هایی نظیر نقایص لوله عصبی و قلبی، ناهنجاری‌های اسکلتی و نقایص جمجمه‌ای - صورتی می‌شود. این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی اسیدفولیک بر ناهنجاری‌های ناشی از کاربامازپین در جنین موش انجام گردید.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۶۰ سر موش ماده نژاد *Balb/c* به چهار گروه تجربی و دو گروه کنترل تقسیم شدند. گروه‌های تجربی ۱ و ۲ داروی کاربامازپین را به ترتیب به میزان ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز و به صورت تزریق درون صفاقی، گروه‌های تجربی ۳ و ۴ همین دوز از دارو را به صورت داخل صفاقی به همراه ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن اسیدفولیک در روز به صورت گاوژ و گروه‌های کنترل ۱ و ۲ نرمال سالی و توپین ۲۰ در نرمال سالی را به صورت تزریق درون صفاقی دریافت کردند. همه تزریق‌ها از روز ششم لغایت روز پانزدهم دوره بارداری و گاوژ ویتامین از ده روز قبل از جفت‌گیری آغاز و پس از آن از روز صفر لغایت روز پانزدهم بارداری صورت گرفت. در روز هجدهم بارداری جنین‌ها از رحم خارج شدند و پس از توزین و اندازه‌گیری مورد مشاهده ماکروسکوپی قرار گرفت. داده‌های جمع‌آوری شده توسط نرم‌افزار آماری *SPSS-11.5* و آزمون‌های کای اسکوتر و *ANOVA* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ مصرف کننده کاربامازپین علاوه بر کاهش وزن و قد ناهنجاری چشمی، اختلال در اندام‌ها، کوچکی فک پایین و باز بودن دهان، اختلال درستون مهره‌ها عمدتاً به صورت اسکولیوزیس و نقایص لوله عصبی به شکل اگزئسفالی مشاهده شد. مصرف اسیدفولیک باعث کاهش ناهنجاری‌های چشمی، صورتی، اندام و ستون مهره‌ها در گروه تجربی ۳ و کاهش ناهنجاری‌های ستون مهره‌ها و اندام در گروه تجربی ۴ گردید. این کاهش از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$). مصرف اسیدفولیک در گروه‌های تجربی ۳ و ۴ تأثیری بر میانگین وزن بدن و طول سری دمی جنین‌ها نداشت.

نتیجه‌گیری: این مطالعه نشان داد که مصرف اسید فولیک به میزان ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن، باعث کاهش ناهنجاری‌های جنینی ناشی از کاربامازپین در جنین‌های موش نژاد *Balb/c* می‌گردد.

کلید واژه‌ها: کاربامازپین، ناهنجاری‌های جنینی، اسید فولیک، موش

* نویسنده مسئول: دکتر سید عادل معلم، پست الکترونیکی: moallem@mums.ac.ir

نشانی: مشهد، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی، صندوق پستی ۹۱۷۷۵-۱۳۶۵، تلفن: ۸۸۲۳۲۵۵ (۰۵۱۱)، نمابر: ۸۸۲۳۲۵۱

وصول مقاله: ۸۸/۱۱/۱۴، اصلاح نهایی: ۸۹/۴/۷، پذیرش مقاله: ۸۹/۵/۱۰

مقدمه

کاربامازپین دارویی است که در درمان صرع‌های عمومی تونیک-کلونیک، صرع‌های جزئی ساده و چندگانه، دردهای عصبی (عصب سه قلو) و اختلالات روانی مثل بیماری دوقطبی و شیزوفرنی استفاده می‌شود (۱ و ۲). کاربامازپین ترکیبی سه‌حلقه‌ای، خنثی و محلول در چربی است که به آسانی از جفت عبور می‌کند و در مغز در حال تکوین جنین به تعادل می‌رسد. این دارو معمولاً به خوبی تحمل می‌شود. بنابراین برای ممانعت از هاپوکسی ایجاد شده توسط صرع و یا صرع پایدار مورد استفاده زنان باردار مبتلا به صرع قرار می‌گیرد (۳-۵).

درمان با داروهای ضدصرع از جمله کاربامازپین در طی بارداری با افزایش ۲ تا ۳ برابر احتمال بروز ناهنجاری‌های مادرزادی همراه بوده و این موضوع در مطالعات مختلف تأیید شده است (۵-۷). ناهنجاری‌های حاصل از مصرف کاربامازپین در طی بارداری شامل نقایص لوله عصبی (NTDs)، بیماری‌های قلبی مادرزادی (۶)، ناهنجاری‌های دستگاه ادراری (۸ و ۹)، هاپوپلازی ناخن، کاهش رشد، تأخیر تکوینی (۹) و مجموعه‌ای از نقایص جمجمه‌ای - صورتی شامل میکروسفالی، چین‌های اپیکانتیک، شکاف‌های پلکی روبه‌بالا (upslanting palpebral fissures)، هاپوپلازی ماندیل، بینی کوتاه، فیلتروم طویل، لب بالای نازک، شکاف لب و کام می‌باشد (۱۰ و ۱۱). همچنین عوارض چشمی مثل آنوفتالمیا، میکروفتالمیا و کولوبوما عصب بینایی و اگر و فتالمی در مصرف کاربامازپین گزارش شده است (۱۲ و ۱۳). علاوه بر این ایجاد انواعی از ناهنجاری‌های اسکلتی مثل بدشکلی جمجمه و مهره‌ها، کوچکی انگشتان در جنین موش‌ها در اثر مصرف کاربامازپین گزارش شده است (۱۴).

تحقیقات اخیر روی داروهای ضدصرع نشان می‌دهند که مصرف این داروها از جمله کاربامازپین منجر به افزایش غلظت هموسیستئین در پلاسما می‌شود (۱۴). هاپیرهموسیستئینمیا در زمان بارداری باعث بروز عوارضی مثل سقط‌های مکرر، تأخیر رشد داخل رحمی، نقایص لوله عصبی، ناهنجاری‌های اسکلتی و قلبی و یا حتی مرگ جنین می‌شود (۱۵ و ۱۶). همچنین مصرف هموسیستئین توسط موش‌های ماده

میزان لانه‌گزینی را کاهش می‌دهد (۱۷). به طور طبیعی هموسیستئین بعد از تولید تجزیه می‌شود و در مسیر تجزیه نیازمند اسیدفولیک به عنوان کوفاکتور است (۱۶). میزان هموسیستئین در برخی شرایط مثل کمبود ویتامین‌ها، نقایص ژنتیکی آنزیم‌های مسیر متابولیسم متیونین، برخی بیماری‌ها مثل نارسایی کلیوی و مصرف برخی از داروها مثل کاربامازپین افزایش می‌یابد (۲۰-۱۸). تحقیقات نشان داده است که کاربامازپین با تداخل در متابولیسم اسید فولیک و در نتیجه کاهش آن باعث افزایش میزان هموسیستئین و ناهنجاری‌های حاصل از آن می‌شود (۲۰ و ۲۱). نقش اسیدفولیک در کاهش برخی ناهنجاری‌های مادرزادی نظیر نقایص لوله عصبی، ناهنجاری‌های قلبی عروقی، شکاف لب و کام و تأخیر رشد داخل رحمی (۲۵-۲۲) تا حدودی اثبات شده است. با توجه به مطالب ذکر شده این احتمال وجود دارد که افزایش اسیدفولیک بتواند با کاهش سطح سرمی هموسیستئین میزان ناهنجاری‌های ایجاد شده توسط مصرف داروی کاربامازپین را در جنین موش‌های کوچک آزمایشگاهی کاهش دهد. لذا این مطالعه به منظور تعیین اثر حفاظتی اسیدفولیک در کاهش اثرات تراتوژنیک حاصل از مصرف داروی کاربامازپین روی جنین موش‌های Balb/c انجام شد.

روش بررسی

این مطالعه تجربی روی ۶۰ سر موش ماده بالغ نژاد Balb/c با وزن ۲۵-۳۰ گرم و سن تقریبی دو ماهه صورت گرفت. کلیه موش‌ها از مؤسسه سرم سازی رازی مشهد تهیه و به اتاق حیوانات پژوهشکده بوعلی مشهد منتقل شدند. قبل از شروع کار موش‌ها به مدت دو هفته در شرایط آزمایشگاهی تحت کنترل، دمای 22 ± 2 درجه سانتی‌گراد و چرخه روشنایی و تاریکی ۱۲ ساعته با رطوبت نسبی ۵۰ تا ۵۵ درصد، تهویه مناسب و تغذیه با غذای خشک استاندارد و آب شرب شهری نگهداری شدند. برای انجام جفت‌گیری تعداد دو سر موش ماده به همراه یک سر موش نر به مدت یک شب در داخل قفس‌های مخصوص از جنس PVC قرار داده شد. صبح روز بعد موش‌ها جهت مشاهده پلاک واژنی رویت شدند. هر یک از موش‌های دارای پلاک واژنی به عنوان موفقیت در جفت‌گیری جدا شدند و زمان صفر بارداری (GD0) برای آنها

موش‌های باردار در روز هجدهم بارداری (GD18) با کلروفرم بیهوش شدند و عمل سزارین انجام و جنین‌ها از داخل شاخ‌های رحمی خارج شدند. جنین‌ها پس از قطع بندناف به صورت جداگانه توسط ترازوی دیجیتالی (Sartorius PT210, Switzerland) وزن شدند. جنین‌ها از نظر زنده یا مرده بودن و نیز جذب جنینی مورد بررسی قرار گرفتند. طول سری - دمی هر جنین با استفاده از کولیس دیجیتالی (Mitutoyo 500-196) اندازه‌گیری شد. سپس جنین‌ها مورد مشاهده میکروسکوپی قرار گرفتند و ناهنجاری‌های خارجی ظاهری و محدودیت رشد آنها توسط استریومیکروسکوپ تحقیقاتی (Olympus SZX, Japan) بررسی شد.

داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS-11.5 و آزمون‌های آماری کای اسکوتر، توکی و ANOVA تجزیه و تحلیل شدند. سطح معنی‌داری کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

وزن بدن و تغذیه در موش‌های باردار

همه موش‌های باردار تا پایان روز هجدهم بارداری زنده بودند و هیچ موش مرده‌ای در ارتباط با تزریقات در بین آنها دیده نشد. تفاوت معنی‌داری در ارتباط با وزن خالص بدن موش‌های مادر در هیچ‌یک از گروه‌های تجربی و کنترل در طول تحقیق مشاهده نشد.

متغیرهای تولید مثلی

یافته‌های تحقیق براساس برش سزارینی در روز هجدهم بارداری در جدول یک نشان داده شده است. در گروه تجربی ۱ (۶۷/۷۷ درصد) و در گروه تجربی ۲ (۸۷/۸۷ درصد) تزریق کاربامازپین سبب بروز بازجذب جنینی شد و این موضوع به لحاظ آماری نسبت به گروه‌های کنترل که فاقد جذب جنینی بودند؛ معنی‌دار بود ($P < 0/001$). از طرفی میزان جذب جنینی در گروه‌های تجربی ۳ (۴۵/۵۵ درصد) و گروه تجربی ۴ (۷۳/۳ درصد) که کاربامازپین و اسیدفولیک را هم‌زمان مصرف نموده بودند؛ در مقایسه با گروه‌های تجربی ۱ و ۲ تفاوت معنی‌دار آماری نداشت.

میانگین وزن بدن جنین‌ها در گروه تجربی ۱

در نظر گرفته شد.

تعداد ۶۰ سر موش باردار به صورت تصادفی به شش گروه ده‌تایی (۴ گروه تجربی و ۲ گروه کنترل) به شرح زیر تقسیم شدند:

گروه تجربی ۱ (CBZ 30): دریافت‌کننده داروی کاربامازپین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز. گروه تجربی ۲ (CBZ 60): دریافت‌کننده داروی کاربامازپین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز. گروه تجربی ۳ (CBZ 30+F): دریافت‌کننده داروی کاربامازپین با دوز ۳۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز و اسیدفولیک با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز. گروه تجربی ۴ (CBZ60+F): دریافت‌کننده داروی کاربامازپین با دوز ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز و اسیدفولیک با دوز ۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز. گروه کنترل ۱: دریافت‌کننده نرمال سالین گروه کنترل حامل (منفی): دریافت‌کننده محلول ۱ درصد توین ۲۰ در نرمال سالین.

دوزهای انتخاب شده برای داروی کاربامازپین و اسیدفولیک مشابه با دوزهای تجویزی به صورت بالینی بود (۲۶). تزریق دارو به صورت درون صفاقی در ساعت ۱۰ صبح و از روز ششم (GD6) لغایت روز پانزدهم (GD15) دوره بارداری صورت گرفت. مصرف اسیدفولیک به صورت گاواژ از ۱۰ روز قبل از جفت‌گیری آغاز شد و پس از آن از روز صفر (GD0) لغایت پانزدهم (GD15) بارداری ادامه یافت. در همه مراحل پژوهش از جمله نگهداری حیوان، انجام تیمار و کشتن حیوان، مجریان به رعایت اصول اخلاقی متعهد بودند. پودر خالص داروی کاربامازپین از شرکت داروسازی مهردارو (تهران/ایران) تهیه شد و توین ۲۰ (Merck آلمان) به عنوان حلال مورد استفاده قرار گرفت که دلیل استفاده از آن پایین بودن درصد الکل و کاهش شدید اثرات تراتوژنیک متأثر از الکل در نمونه‌های تجربی بود؛ ولی با این حال گروهی به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شدند که تنها توین دریافت می‌کردند. پودر اسیدفولیک از شرکت داروسازی روزدارو (تهران/ایران) تهیه و از آب مقطر به عنوان حلال ویتامین استفاده شد.

جدول ۱: یافته‌های تحقیق براساس برش سزارینی در روز هجدهم بارداری

گروه‌های تجربی				گروه‌های کنترل		متغیر	
CBZ 60+F	CBZ 30+F	CBZ 60	CBZ 30	توپین ۲۰	نرمال سالین		
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	تعداد	موش‌های باردار
۱۰۵	۱۱۱	۱۲۴	۱۱۸	۱۱۵	۱۲۱	تعداد	کل جنین‌ها
(۹۱/۴۳) ۹۶	(۹۵/۵۰) ۱۰۶	(۹۱/۱۳) ۱۱۳	(۹۳/۲۲) ۱۱۰	(۱۰۰) ۱۱۵	(۱۰۰) ۱۲۱	تعداد (درصد)	جنین‌های زنده
(۵/۲۰) ۹*	(۴/۵۵) ۵*	(۸/۸۷) ۱۱*	(۶/۷۷) ۸*	(۰) ۰	(۰) ۰	تعداد (درصد)	باز جذب
۰/۶۴±۰/۲۸*	۰/۶۵±۰/۱*	۰/۷۱±۰/۱۸*	۰/۶۸±۰/۲۱*	۱/۱۲±۰/۱۹	۱/۱۹±۰/۱۵	انحراف معیار± میانگین	وزن جنین
۱۷/۹۶±۲/۱۷*	۱۷/۳۶±۱/۲۲*	۱۸/۵۲±۱/۸۵*	۱۷/۷۶±۲/۱۴*	۲۲/۹۷±۱/۷۸	۲۳/۶۳±۱/۹۹	انحراف معیار± میانگین	اندازه سری دمی

* $P < 0.05$ اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل

جدول ۲: انواع ناهنجاری‌های مشاهده شده و درصد فراوانی آنها در جنین

گروه‌های تجربی				گروه‌های کنترل		متغیر	
CBZ 60+F	CBZ 30+F	CBZ 60	CBZ 30	توپین ۲۰	نرمال سالین		
۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	تعداد	موش‌های باردار
۹۶	۱۰۶	۱۱۳	۱۱۰	۱۱۵	۱۲۱	تعداد	جنین‌های بررسی شده
(۵/۲۰) ۵	(۰) ۰**	(۶/۱۹) ۷*	(۷/۲۷) ۸*	(۰) ۰	(۰) ۰	تعداد (درصد)	باز بودن چشم
(۵/۲۰) ۵	(۰/۹۴) ۱**	(۱۰/۶۱) ۱۲*	(۱۰/۹۰) ۱۲*	(۰) ۰	(۰) ۰	تعداد (درصد)	کوچکی ماندپیول
(۱/۰۴) ۱**	(۰) ۰**	(۷/۹۶) ۹*	(۶/۳۶) ۷*	(۰) ۰	(۰) ۰	تعداد (درصد)	ناهنجاری در ستون مهره‌ها
(۰) ۰**	(۰/۹۴) ۱**	(۱۲/۳۸) ۱۴*	(۱۳/۶۳) ۱۵*	(۰) ۰	(۰) ۰	تعداد (درصد)	ناهنجاری در اندام
(۲/۰۸) ۲	(۰) ۰	(۲/۶۵) ۳*	(۰) ۰	(۰) ۰	(۰) ۰	تعداد (درصد)	نقایص لوله عصبی
(۲/۰۸) ۲	(۳/۷۷) ۴	(۶/۱۹) ۷*	(۴/۵۴) ۵*	(۰) ۰	(۰) ۰	تعداد (درصد)	ناهنجاری شدید

** $P < 0.05$ اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه تجربی

* $P < 0.05$ اختلاف معنی‌دار در مقایسه با گروه کنترل

ایجاد ناهنجاری‌های متنوعی در جنین‌های موش Balb/c گردید (جدول ۲).

باز بودن چشم‌ها که گاهی حتی به صورت اگزاftالمی بروز کرده بود؛ یکی از ناهنجاری‌های شایعی بود که در هر دو گروه تجربی ۱ (۷/۲۷ درصد) و ۲ (۶/۱۹ درصد) دیده شد و این تفاوت در مقایسه با گروه‌های کنترل که فاقد این ناهنجاری بودند؛ از نظر آماری ($P < 0.01$) معنی‌دار بود. اختلاف معنی‌داری از نظر بروز این ناهنجاری در گروه تجربی ۳ نسبت به گروه تجربی ۱ دیده شد ($P < 0.01$)؛ ولی در گروه تجربی ۴ میزان این ناهنجاری اختلاف معنی‌داری از نظر آماری در مقایسه با گروه تجربی ۲ نداشت.

ناهنجاری در اندام‌ها که به طور عمده به صورت کوتاهی انگشتان دیده شد؛ در هر دو گروه تجربی ۱ (۱۳/۶۳ درصد) و گروه تجربی ۲ (۱۲/۳۸ درصد) در مقایسه با گروه‌های کنترل که فاقد این ناهنجاری بودند؛ با اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0.01$) دیده شد. کاهش معنی‌داری از نظر بروز این ناهنجاری در گروه تجربی ۳ نسبت به گروه تجربی ۱ و نیز در گروه تجربی ۴ در مقایسه با گروه تجربی ۲ دیده شد ($P < 0.01$).

اختلال در صورت به طور عمده به صورت کوچکی فک

(۰/۶۸±۰/۲۱ گرم) و گروه تجربی ۲ (۰/۷۱±۰/۱۸ گرم) به صورت معنی‌داری ($P < 0.05$) در مقایسه با گروه‌های کنترل معمولی (۰/۱۹±۰/۱۵ گرم) و کنترل منفی (۰/۱۲±۰/۱۹ گرم) دارای کاهش بود. از طرفی بین میانگین وزن بدن جنین‌ها در گروه تجربی ۳ و گروه تجربی ۴ در مقایسه با گروه‌های تجربی ۱ و ۲ تفاوت آماری معنی‌داری وجود نداشت (جدول یک).

میانگین طول سری دمی جنین‌های زنده در گروه تجربی ۱ (۱۷/۷۶±۲/۱۴ میلی‌متر) و گروه تجربی ۲ (۱۸/۵۲±۱/۸۵ میلی‌متر) نسبت به میانگین طول سری دمی جنین‌های کنترل معمولی (۲۳/۶۳±۱/۹۹ میلی‌متر) و کنترل منفی (۲۲/۹۷±۱/۷۸ میلی‌متر) کاهش معنی‌داری داشت ($P < 0.05$)؛ ولی بین میانگین طول سری دمی جنین‌های زنده در گروه‌های تجربی ۳ (۱۷/۹۶±۲/۱۷ میلی‌متر) و گروه تجربی ۴ (۱۷/۳۶±۱/۲۲ میلی‌متر) نسبت به میانگین طول سری دمی جنین‌های گروه‌های تجربی ۱ و ۲ اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (جدول یک).

ناهنجاری‌های جنینی

تزریق کاربامازپین در دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز در گروه‌های تجربی ۱ و ۲ باعث

بحث

شاخص‌های رشد جنین و جذب جنینی

این مطالعه نشان داد که مصرف داروی کاربامازپین در دوران بارداری سبب القای ناهنجاری‌های جنینی می‌گردد و از طرفی مصرف اسیدفولیک قبل و در حین بارداری تا حدودی از ناهنجاری‌های ایجاد شده توسط کاربامازپین جلوگیری می‌نماید.

در این تحقیق مشخص گردید که مصرف کاربامازپین با دوزهای ۳۰ و ۶۰ میلی گرم در روز در دوران ارگانوژنز باعث کاهش معنی‌دار قد و وزن جنین و افزایش جذب جنینی در مقایسه با گروه کنترل می‌گردد (جدول یک). اکثر مطالعات انجام شده نیز این مسأله را تأیید می‌نمایند. Diav-Citrin کاهش وزن جنین به میزان ۲۵۰ گرم در مادرانی که طی بارداری کاربامازپین مصرف کرده بودند را به عنوان آثار تراژونیک این دارو معرفی کرد (۲۷). پژوهشگران دیگری نیز به این مسأله اشاره داشتند که مصرف کاربامازپین در دوران بارداری اثرات منفی بر شاخص‌های رشدی نوزادان ایجاد می‌نماید (۲۸و ۲۹). از طرفی براساس برخی مطالعات مصرف کاربامازپین در دوران بارداری باعث افزایش جذب جنینی می‌گردد (۳۰). در مطالعه ما مشخص گردید که مصرف اسیدفولیک در قبل و حین بارداری در موش‌های گروه‌های تجربی ۳ و ۴ نتوانسته است؛ اثری بر بهبود شاخص‌های رشدی جنین و همچنین کاهش جذب جنینی داشته باشد.

این نکته که مصرف اسیدفولیک به عنوان یک ویتامین مکمل تا حدود زیادی از اختلالاتی مثل تأخیر تکوینی و تأخیر رشدی در مادران باردار سالم جلوگیری می‌کند؛ مورد قبول بسیاری از محققین می‌باشد (۲۵و ۳۰و ۳۱). از طرفی مطالعاتی وجود دارد که نشان می‌دهد؛ سطح سرمی اسیدفولیک در مادران باردار دچار صرع نسبت به افراد سالم پایین‌تر از حد معمول است (۲۱). تا آنجا که ما می‌دانیم؛ مطالعه مستقیمی مبنی بر این که مصرف اسیدفولیک در زمان بارداری می‌تواند از اختلالات تأخیر تکوینی و تأخیر رشدی ناشی از مصرف کاربامازپین در زنان باردار جلوگیری نماید؛ وجود ندارد؛ لذا در این زمینه مطالعات دقیق‌تری بایستی

پایین و باز بودن دهان دیده شد. اختلاف بین میزان بروز این ناهنجاری در هر دو گروه تجربی ۱ (۱۰/۹ درصد) و گروه تجربی ۲ (۱۰/۶۱ درصد) در مقایسه با گروه‌های کنترل که فاقد این ناهنجاری بودند؛ با اختلاف معنی‌دار آماری ($P < 0/001$) دیده شد. میزان بروز این ناهنجاری در گروه تجربی ۳ (۰/۹۴ درصد) نسبت به گروه تجربی ۱ (۱۰/۹۰ درصد) معنی‌دار بود ($P < 0/001$)؛ ولی در گروه تجربی ۴ در مقایسه با گروه تجربی ۲ این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود.

ناهنجاری درستون مهره‌ها به طور عمده به صورت اسکولیوزیس و انحنای بیش از اندازه ستون مهره‌ها دیده شد و از ناهنجاری‌هایی بود که در هر دو گروه تجربی ۱ (۶/۳۶ درصد) و گروه تجربی ۲ (۷/۹۶ درصد) در مقایسه با گروه‌های کنترل که فاقد این ناهنجاری بودند؛ از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$). در میزان بروز این ناهنجاری در گروه تجربی ۳ (صفر درصد) نسبت به گروه تجربی ۱ (۳/۳۶ درصد) و همچنین در گروه تجربی ۴ (۱/۰۴ درصد) نسبت به گروه تجربی ۲ (۷/۹۶ درصد) کاهش معنی‌داری دیده شد ($P < 0/01$).

نقایص لوله عصبی (NTDs) به میزان کمتری در گروه‌های تجربی دیده شد. در گروه‌های تجربی ۱ و ۳ هیچ‌گونه ناهنجاری نقایص لوله عصبی دیده نشد. در گروه تجربی ۲ (۲/۶۵ درصد) از جنین‌ها دارای نقایص عصبی به صورت اگراسفالی بودند و در گروه تجربی ۴، ۲/۰۸ درصد از جنین‌ها دچار اگراسفالی بودند و این اختلاف از نظر آماری معنی‌دار نبود.

در تعدادی از جنین‌ها ناهنجاری‌های شدیدی در گروه‌های تجربی دیده شد که تشخیص ظاهر طبیعی آنها را بسیار سخت می‌کرد. اختلاف بین میزان بروز این ناهنجاری در هر دو گروه تجربی ۱ (۴/۵۴ درصد) و گروه تجربی ۲ (۶/۱۹ درصد) در مقایسه با گروه‌های کنترل که فاقد این ناهنجاری بودند؛ از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0/001$). میزان بروز این ناهنجاری در گروه تجربی ۳ نسبت به گروه تجربی ۱ و همچنین در گروه تجربی ۴ در مقایسه با گروه تجربی ۲ اختلاف آماری معنی‌داری را نشان نداد.

صورت پذیرد.

ناهنجاری‌های چشمی

در مورد ارتباط بین مصرف کاربامازپین در طی بارداری و ناهنجاری‌های چشمی در فرزندان، اطلاعات متفاوت و متناقضی در دست است. Sutcliffe در سال ۱۹۹۸ چهار مورد از ناهنجاری‌های مادرزادی چشمی را در فرزندان مادرانی که داروی کاربامازپین را به صورت مونوتراپی و حداقل در طی دو ماه اول بارداری مصرف کرده بودند؛ مشاهده کرد. این ناهنجاری‌ها شامل یک مورد آنوفتالمیای دو طرفه، دو مورد میکروفتالمیای دو طرفه و یک مورد کولوبومای یک طرفه عصب بینایی بود (۱۲). در همین زمینه به تحقیقات پراکنده‌ای بر می‌خوریم که در آنها به ارتباط بین مصرف داروی کاربامازپین و ناهنجاری‌های چشمی اشاره شده است. از جمله می‌توان به تغییر شکل وزیکول بینایی در جنین‌های رت (۳۲)، گزارش یک مورد نقص میکروفتالمی چشم با مصرف کاربامازپین در سال ۲۰۰۶ (۳۳) و بروز ناهنجاری‌های چشمی مثل اگزوفتالمی به دنبال مصرف کاربامازپین در جنین موش‌ها در تحقیق Afshar سال ۲۰۱۰ (۱۳) اشاره کرد. برخلاف مطالعات قبلی، Kroes با بررسی نوزادانی که در رحم مادر در معرض کاربامازپین قرار داشتند؛ انواع مختلفی از ناهنجاری‌ها را مشاهده کرد؛ اما در هیچ‌یک از نوزادان ناهنجاری‌های چشمی مشاهده نشد (۳۴).

کمبرود اسیدفولیک به عنوان عامل ایجاد بسیاری از ناهنجاری‌های جنینی مثل ناهنجاری‌های چشمی شناخته شده است و نقش اسیدفولیک در برخی تجربیات حیوانی به اثبات رسیده است. نقش کمبود اسیدفولیک در رژیم غذایی رت و تأثیر آن بر ایجاد انواعی از ناهنجاری‌های چشمی در جنین مطرح شده است (۳۱). همچنین کمبود اسیدفولیک در موش‌هایی که از نظر ژنتیکی نقص در رسپتور اسیدفولیک دارند؛ منجر به ایجاد نقایص چشمی نظیر آنوفتالمیا و میکروفتالمیا در جنین شده است (۳۵)؛ ولی Show در سال ۲۰۰۷ در مطالعات انسانی خود عنوان کرد که استفاده از مکمل‌های ویتامینی مثل اسیدفولیک توسط مادران احتمال بروز ناهنجاری‌های چشمی نظیر آنوفتالمیا و میکروفتالمیا در فرزندان را کاهش نمی‌دهد (۳۶).

نتایج این پژوهش، ایجاد ناهنجاری‌های چشمی با مصرف کاربامازپین را در هر دو دوز مورد بررسی نشان داد که تأییدی بر ارتباط بین مصرف این دارو و بروز ناهنجاری‌های چشمی است که در برخی از مطالعات مطرح شده است. در بخش دوم یعنی تعیین اثرات مصرف اسیدفولیک بر ناهنجاری‌های چشمی، نتایج مطالعه ما با توجه به دوز دارو متفاوت بود و اسیدفولیک در دوز کمتر دارو به طور کلی جلوی بروز ناهنجاری چشمی را گرفت؛ اما در دوز بالاتر داروی کاربامازپین، مصرف اسیدفولیک تأثیری در کاهش این ناهنجاری نگذاشت.

مطالعه Mudd نشان داد که یکی از عوارض افزایش میزان هموسیستین خون بروز برخی از ناهنجاری‌های چشمی است. نتایج این پژوهش نشان داد که مصرف اسیدفولیک در بیماران مبتلا به صرع مصرف کننده کاربامازپین، حداقل در دوزهای بالاتر دارو، سطح هموسیستین خون را طبیعی نمی‌کند؛ در نتیجه هموسیستین اثرات مخرب خود را بر چشم اعمال می‌کند (۱۵).

نقایص لوله عصبی

ارتباط بین مصرف داروی کاربامازپین و بروز ناهنجاری‌های لوله عصبی مثل اسپینایفیدا در انسان و برخی مدل‌های آزمایشگاهی مطرح شده است (۲۸و۲۹و۳۷). از طرف دیگر تأثیر اسیدفولیک در کاهش نقایص لوله عصبی هدف پژوهش بسیاری از محققین قرار گرفته و تقریباً همه مطالعات جدید استفاده از اسیدفولیک را در کاهش ناهنجاری‌های لوله عصبی موثر دانسته‌اند. Biale و Lewenthal در سال ۱۹۸۴ تداخل داروهای ضدصرع با متابولیسم اسیدفولیک را به عنوان عامل ایجاد برخی ناهنجاری‌ها مثل نقایص لوله عصبی معرفی کردند و مصرف اسیدفولیک را در کاهش این نوع از ناهنجاری موثر دانستند (۹). به دنبال آن در تحقیقات مختلف نقش اسیدفولیک در کاهش نقایص لوله عصبی در بیماران مبتلا به صرع مورد تأیید قرار گرفت (۲۲و۴۱-۳۸).

در مطالعه ما مواردی از ناهنجاری‌های مربوط به لوله عصبی نظیر اگزوسفالی فقط در دوز ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز کاربامازپین مشاهده شد و مصرف اسیدفولیک

اندام در انسان و سایر مدل‌های حیوانی از جمله موش مطرح شده است (۴۸). همچنین هیپوپلازی انگشتان به عنوان یکی از ناهنجاری‌های اندام در نوزادانی که مادرانشان طی بارداری کاربامازپین مصرف می‌کردند؛ مشاهده شده است (۲۸ و ۲۹ و ۴۹).

نقش اسیدفولیک در رابطه با ناهنجاری‌های اندام نیز مورد بررسی قرار گرفته است. Show کاهش نقایص اندام به میزان ۳۵ درصد را در نوزادانی که مادرانشان مکمل‌های مولتی‌ویتامینی شامل اسیدفولیک را قبل از بارداری و در ادامه پس از آغاز بارداری مصرف می‌کردند را گزارش داد (۵۰). همچنین با انجام تحقیقات در جمعیت‌های انسانی، کاهش میزان نقایص اندام در گروه‌های تحت درمان با اسیدفولیک نسبت به گروه کنترل مشاهده شده است (۵۱).

در تحقیق ما نیز مواردی از ناهنجاری‌های اندام در جنین‌هایی که در معرض کاربامازپین قرار داشتند؛ مشاهده گردید. همچنین اختلال در اندام که به طور عمده به صورت کوتاهی انگشتان بروز کرده بود؛ در هر دو گروه تجربی که اسیدفولیک را به همراه کاربامازپین مصرف کرده بودند؛ کاهش معنی‌داری یافته بود.

نتیجه‌گیری

این مطالعه نشان داد که مصرف کاربامازپین در دوران بارداری باعث ایجاد یک‌سری از ناهنجاری‌های جنینی می‌گردد و مصرف اسیدفولیک در قبل و حین بارداری از برخی ناهنجاری‌های جنینی ناشی از مصرف کاربامازپین جلوگیری می‌نماید؛ ولی این ماده را نمی‌توان به عنوان یک عامل قطعی حفاظتی تلقی نمود و باید به دنبال عوامل حفاظتی دیگری نیز بود.

تشکر و قدردانی

این مطالعه کار پژوهشی مشترک بین دو دانشگاه علوم پزشکی مشهد و دانشگاه علوم پزشکی بیرجند بود. بدین وسیله از زحمات خانم تکتم حسینی تکنیسین آزمایشگاه تراتولوژی و آقای عصایی کارمند محترم آزمایشگاه حیوانات که در انجام این پژوهش ما را یاری نمودند؛ تشکر می‌نمایم.

هیچ تأثیری در کاهش این ناهنجاری نداشت. یافته‌های تحقیق ما در این زمینه مخالف با نتایج به دست آمده از سایر تحقیقات است که نقش اسیدفولیک را در کاهش نقایص لوله عصبی مثبت ارزیابی کرده‌اند. نتایج این بخش از تحقیق نیز تأیید کننده این مطلب است که افزایش اسیدفولیک در بیماران مصرف کننده کاربامازپین، قادر به کاهش سطح هموسیستئین خون نیست و تحت این شرایط نقایص لوله عصبی که از عوارض افزایش هموسیستئین است؛ بروز می‌کند.

ناهنجاری‌های مجموعه‌ای صورتی

برخی از منابع علمی موجود ارتباط بین مصرف داروی کاربامازپین و ناهنجاری‌های مجموعه‌ای صورتی را در انسان و مدل‌های آزمایشگاهی مثل موش مطرح کرده‌اند. Haddad در سال ۱۹۹۹ گزارشی از یک مورد چسبندگی بین فک بالایی و پایینی در نوزادی که در تمام طول بارداری در معرض کاربامازپین بود؛ منتشر کرد (۴۲). همچنین مطالعات مختلفی ناهنجاری‌های مجموعه‌ای صورتی را از جمله عوارض ناشی از مصرف کاربامازپین معرفی کردند (۲۹ و ۴۳ و ۴۴).

مطالعات بسیاری مصرف مکمل‌های ویتامینی دارای اسیدفولیک را دلیل کاهش خطر ناهنجاری‌های دهانی صورتی عنوان کردند (۲۳ و ۴۷-۴۴). Spiegelstein در سال ۲۰۰۴ مشاهده کرد؛ آن دسته از موش‌هایی که به دلیل نقایص ژنتیکی رستور فولات دچار کمبود اسیدفولیک می‌شوند؛ با مواردی از ناهنجاری‌های ماندیبول مثل هایپوپلازی فک پایین و یا فقدان فک پایین و نیز شکاف‌های لب و کام مواجه می‌شوند (۳۵).

ما در تحقیق خود، هایپوپلازی فک پایین را در تعداد قابل توجهی از جنین‌هایی که در معرض کاربامازپین بودند؛ مشاهده کردیم. نتایج تحقیق ما نشان داد که اسید فولیک در دوز کمتر کاربامازپین یعنی دوز ۳۰ میلی گرم بر کیلوگرم وزن بدن در روز باعث کاهش ناهنجاری‌های فک تحتانی شد؛ اما در دوز بالاتر مصرف اسیدفولیک کاهش معنی‌داری در بروز این ناهنجاری ایجاد نکرد.

ناهنجاری‌های اندام

ارتباط بین مصرف داروی کاربامازپین و ایجاد ناهنجاری

References

- Hiremath GK, Kotagal P, Bingaman W, Hovinga C, Wyllie E, Morris H, Nelson D. Risk factors for carbamazepine elevation and toxicity following epilepsy surgery. *Seizure*. 2005 Jul;14(5):312-7.
- Omoy A. Neuroteratogens in man: an overview with special emphasis on the teratogenicity of antiepileptic drugs in pregnancy. *Reprod Toxicol*. 2006 Aug;22(2):214-26.
- Christensen HD, Rayburn WF, Parker KM, Gonzalez CL, Gold KP. Chronic prenatal exposure to carbamazepine and perinatal outcomes of C3H/He mice. *Am J Obstet Gynecol*. 2004 Jan;190(1):259-63.
- Pérez Martínez JM, Fernández Freire P, Labradora V, Hazen MJ. Carbamazepine induces mitotic arrest in mammalian. Vero cells Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2008 Jan; 637(Issues1-2):124-33.
- Matalon S, Schechtman S, Goldzweig G, Omoy A. The teratogenic effect of carbamazepine: a meta-analysis of 1255 exposures. *Reprod Toxicol*. 2002 Jan-Feb;16(1):9-17.
- Tomson T, Battino D. Teratogenic effects of antiepileptic drugs. *Seizure*. 2008 Mar;17(2):166-71.
- Lindhout D, Höppener RJ, Meinardi H. Teratogenicity of antiepileptic drug combinations with special emphasis on epoxidation (of carbamazepine). *Epilepsia*. 1984 Feb;25(1):77-83.
- Artama M, Ritvanen A, Gissler M, Isojärvi J, Auvinen A. Congenital structural anomalies in offspring of women with epilepsy--a population-based cohort study in Finland. *Int J Epidemiol*. 2006 Apr;35(2):280-7.
- Biale Y, Lewenthal H. Effect of folic acid supplementation on congenital malformations due to anticonvulsive drugs. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1984 Nov;18(4):211-6.
- Glover SJ, Quinn AG, Barter P, Hart J, Moore SJ, Dean JC, et al. Ophthalmic findings in fetal anticonvulsant syndrome(s). *Ophthalmology*. 2002 May;109(5):942-7.
- Moore SJ, Turnpenny P, Quinn A, Glover S, Lloyd DJ, Montgomery T, et al. A clinical study of 57 children with fetal anticonvulsant syndromes. *J Med Genet*. 2000 Jul;37(7):489-97.
- Sutcliffe AG, Jones RB, Woodruff G. Eye malformations associated with treatment with carbamazepine during pregnancy. *Ophthalmic Genet*. 1998 Jun;19(2):59-62.
- Afshar M, Moallem SA, Mohamadpoor AH, Shiravi A, Jalalian SM, Gholipour MJ. Teratogenic effects of carbamazepine on embryonic eye development in pregnant mice. *Cutaneous and Ocular Toxicology*. 2010;29(1):10-15.
- Sener U, Zorlu Y, Karaguzel O, Ozdamar O, Coker I, Topbas M. Effects of common anti-epileptic drug monotherapy on serum levels of homocysteine, vitamin B12, folic acid and vitamin B6. *Seizure*. 2006 Mar;15(2):79-85.
- Mudd SH, Skovby F, Levy HL, Pettigrew KD, Wilcken B, Pyeritz RE, et al. The natural history of homocystinuria due to cystathionine β -synthase deficiency. *Am J Hum Genet*. 1985; 37(1): 1-31
- Aubard Y, Darodes N, Cantaloube M. Hyperhomocysteinemia and pregnancy--review of our present understanding and therapeutic implications. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2000 Dec;93(2):157-65.
- Watanabe M, Osada J, Aratani Y, Kluckman K, Reddick R, Malinow MR, et al. Mice deficient in cystathionine beta-synthase: animal models for mild and severe homocyst(e)inemia. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995 Feb 28;92(5):1585-9.
- Herrmann W, Herrmann M, Obeid R. Hyperhomocysteinemia: a critical review of old and new aspects. *Curr Drug Metab*. 2007 Jan;8(1):17-31.
- Liang R, Yu WD, Du JB, Yang LJ, Yang JJ, Xu J, et al. Cystathionine β synthase participates in murine oocyte maturation mediated by homocysteine. *Reproductive Toxicology*. 2007 Jul; 24(Issue 1): 89-96.
- Levasseur R. Bone tissue and hyperhomocysteinemia. *Joint Bone Spine*. 2009 May;76(3):234-40.
- Attilakos A, Papakonstantinou E, Schulpis K, Voudris K, Katsarou E, Mastroyianni S, et al. Early effect of sodium valproate and carbamazepine monotherapy on homocysteine metabolism in children with epilepsy. *Epilepsy Res*. 2006 Oct;71(2-3):229-32.
- Molloy AM. The role of folic acid in the prevention of neural tube defects. *Trends in Food Science and Technology*. 2005 Jun-Jul; 16(6-7): 241-5.
- Cipollone D, Carsetti R, Tagliani A, Rosado MM, Borgiani P, Novelli G, et al. Folic acid and methionine in the prevention of teratogen-induced congenital defects in mice. *Cardiovasc Pathol*. 2009 Mar-Apr;18(2):100-9.
- Schubert J, Schmidt R, Syska E. B group vitamins and cleft lip and cleft palate. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. 2002; 31(4): 410-13.
- Sram RJ, Binkova B, Lnenickova Z, Solansky I, Dejmek J. The impact of plasma folate levels of mothers and newborns on intrauterine growth retardation and birth weight. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2005; 591(1-2): 302-10.
- Morrell MJ. Folic acid and epilepsy. *Epilepsy Curr*. 2002 March;2(2):31-4.
- Vorhees CV, Acuff KD, Weisenburger WP, Minck DR. Teratogenicity of carbamazepine in rats. *Teratology*. 1990 Mar; 41(3):111-17.
- Jones KL, Lacro RV, Johnson KA, Adams J. Pattern of malformations in the children of women treated with carbamazepine during pregnancy. *N Engl J Med*. 1989 Jun 22;320(25):1661-6.
- Azarbayjani F, Danielsson BR. Pharmacologically induced embryonic dysrhythmia and episodes of hypoxia followed by reoxygenation: a common teratogenic mechanism for antiepileptic drugs? *Teratology*. 1998 Mar;57(3):117-26.
- Diav-Citrin O, Shechtman S, Arnon J, Omoy A. Is carbamazepine teratogenic? A prospective controlled study of 210 pregnancies. *Neurology*. 2001 Jul 24;57(2):321-4.

31. Armstrong RC, Monie IW. Congenital eye defects on rats following maternal folic-acid deficiency during pregnancy. *J Embryol Exp Morphol*. 1966 Dec;16(3):531-42.
32. Piersma AH, Verhoef A, Opperhuizen A, Klaassen R, van Eijkeren J, Olling M. Embryotoxicity of carbamazepine in rat postimplantation embryo culture after in vitro exposure via three different routes. *Reprod Toxicol*. 1998 Mar-Apr;12(2):161-8.
33. Williams CP, Marsh CS, Hodgkins PR. Persistent fetal vasculature associated with orbital lymphangioma. *J AAPOS*. 2006 Jun;10(3):285-6.
34. Kroes HY, Reefhuis J, Cornel MC. Is there an association between maternal carbamazepine use during pregnancy and eye malformations in the child? *Epilepsia*. 2002 Aug;43(8):929-31.
35. Spiegelstein O, Mitchell LE, Merriweather MY, Wicker NJ, Zhang Q, Lammer EJ, et al. Embryonic development of folate binding protein-1 (Folbp1) knockout mice: Effects of the chemical form, dose, and timing of maternal folate supplementation. *Dev Dyn*. 2004 Sep;231(1):221-31.
36. Shaw GM, Carmichael SL, Laurent C, Louik C, Finnell RH, Lammer EJ. National Birth Defects Prevention Study. Nutrient intakes in women and risks of anophthalmia and microphthalmia in their offspring. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*. 2007 Oct;79(10):708-13.
37. Holmes LB. The teratogenicity of anticonvulsant drugs: a progress report. *J Med Genet*. 2002 Apr;39(4):245-7.
38. Czeizel AE. Periconceptional folic acid containing multivitamin supplementation. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998 Jun;78(2):151-61.
39. Kalter H. Folic acid and human malformations: a summary and evaluation. *Reprod Toxicol*. 2000 Sep-Oct;14(5):463-76.
41. Moore JL. The significance of folic acid for epilepsy patients. *Epilepsy Behav*. 2005 Sep;7(2):172-81.
42. Haddad IK, Shamo'on H, Salah S. Congenital unilateral fusion of the maxilla and mandible. *J Oral Pathol Med*. 1999 May;28(5):238-40.
43. Wide K, Winbladh B, Källén B. Major malformations in infants exposed to antiepileptic drugs in utero, with emphasis on carbamazepine and valproic acid: a nation-wide, population-based register study. *Acta Paediatr*. 2004 Feb;93(2):174-6.
44. Hall J, Solehdin F. Folic acid for the prevention of congenital anomalies. *Eur J Pediatr*. 1998 Jun;157(6):445-50.
45. Wong WY, Eskes TK, Kuijpers-Jagtman AM, Spauwen PH, Steegers EA, Thomas CM, et al. Nonsyndromic orofacial clefts: association with maternal hyperhomocysteinemia. *Teratology*. 1999 Nov;60(5):253-7.
46. Itikala PR, Watkins ML, Mulinare J, Moore CA, Liu Y. Maternal multivitamin use and orofacial clefts in offspring. *Teratology*. 2001 Feb;63(2):79-86.
47. Weingärtner J, Maile S, Proff P, Reicheneder C, Bienengraber V, Fanghänel J, et al. Secondary palatal closure in rats in association with relative maternofetal levels of folic acid, vitamin B12, and homocysteine. *Ann Anat*. 2007;189(3):229-33.
48. Fritz H, Müller D, Hess R. Comparative study of the teratogenicity of phenobarbitone, diphenylhydantoin and carbamazepine in mice. *Toxicology*. 1976 Nov-Dec;6(3):323-30.
49. Ornoy A, Cohen E. Outcome of children born to epileptic mothers treated with carbamazepine during pregnancy. *Arch Dis Child* 1996;75:517-520.
50. Shaw GM, O'Malley CD, Wasserman CR, Tolarova MM, Lammer EJ. Maternal periconceptional use of multivitamins and reduced risk for conotruncal heart defects and limb deficiencies among offspring. *Am J Med Genet*. 1995 Dec 4;59(4):536-45.
51. Czeizel AE. Reduction of urinary tract and cardiovascular defects by periconceptional multivitamin supplementation. *Am J Med Genet*. 1996 Mar 15;62(2):179-83.