

اثرات تراتوژنیک گاباپنتین بر تکامل لوله عصبی واسکلتی جنین‌های موش سوری

محمد افشار* (Ph.D.) محمدجعفر گلعلی پور** (Ph.D.) محمد حسن پور*** (M.D.)

چکیده

سابقه و هدف: گاباپنتین یک داروی ضد صرع از نسل جدید است که جهت درمان صرع‌های ناقص و عمومی ثانویه معرفی گردید. از این دارو جهت تسکین دردهای عصبی کانسر و دیابت و پیشگیری از میگرن نیز استفاده می‌گردد. در مورد نقش این دارو در ایجاد نقایص جسمی در تکامل جنین (اثرات تراتوژنیک)، اطلاعات زیادی در دست نیست و تنها گزارش‌هایی دال بر اختلالاتی مثل تاخیر در استخوان‌سازی و تجمع ادرار در کلیه و حالب (هیدرونفروز و هیدرواورتر) در حیوانات آزمایشگاهی وجود دارد. این مطالعه به منظور تعیین ناهنجاری‌های ماکروسکوپی ایجاد شده توسط داروی گاباپنتین در صورت استفاده مستمر آن در زمان لانه‌گزینی و اندام‌سازی جنین طراحی گردید.

مواد و روش‌ها: از ۳۰ سرموش سفید کوچک آزمایشگاهی با نژاد Balb/c که در سنین ۲/۵ ماهه و دارای وزن تقریبی 30 ± 2 گرم بودند، استفاده شد. شرایط نگهداری و تغذیه حیوانات استاندارد بود. جهت جفت‌گیری از تعداد ۳ سرموش ماده به همراه یک سرموش نر به مدت یک شب در داخل قفس استفاده شد. رویت پلاک واژنی در صبح روز بعد، به عنوان زمان صفر حاملگی (GD₀) تلقی شد. موش‌ها در سه گروه ۱۰ تایی، شامل دو گروه تجربی (I، II) و یک گروه شاهد دسته‌بندی شدند. دو گروه تجربی به ترتیب مقادیر 1400 mg/day (20 mg/Kg/day) و 26 mg/Kg/day (26 mg/day) را به مدت ۱۰ روز پی در پی، به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. در گروه شاهد، از سرم فیزیولوژی به همان حجم داروهای تزریق شده استفاده گردید. موش‌ها در روز ۱۸ حاملگی تشریح شده و جنین‌هایشان توسط میکروسکوپ استریو مورد بررسی قرار گرفت. اندازه‌گیری وزن توسط ترازوی حساس دیریتال با دقت ۰/۰۱ انجام شد. اطلاعات با استفاده از آزمون‌های آماری Anova و X^2 ، Tukey به کمک نرم افزار Spss آنالیز گردید.

یافته‌ها: در هر دو گروه تجربی I و II اختلالات مشابهی به صورت ناهنجاری‌هایی در سیستم اسکلتی و لوله عصبی بروز نمود. میزان اختلالات اسکلتی بیش از نقایص لوله عصبی بود و عمدتاً به صورت اختلال شکل و جابجایی در اندام‌ها بود و از نظر آماری در مقایسه با گروه شاهد معنی‌دار بود ($P < 0.05$). نقایص لوله عصبی عمدتاً به صورت اسپینابی‌فیدا سیستمیکا بود. در گروه تجربی II میزان بروز، شدت ناهنجاری‌ها و جذب جنینی نسبت به گروه تجربی I افزایش داشت.

استنتاج: این مطالعه نشان داد اگر از داروی گاباپنتین به صورت مداوم در طی مراحل لانه‌گزینی و اندام‌سازی استفاده شود می‌تواند سبب ناهنجاری‌های مادرزادی به مراتب شدیدتری از اختلالات گزارش شده قبلی گردد.

واژه‌های کلیدی: گاباپنتین، تراتوژن، ناهنجاری‌های اسکلتی، نقایص لوله عصبی.

* استادیار بافت و جنین‌شناسی، فوق‌دکترای در زمینه تکنیک‌های هیستوشیمیایی و میکروسکوپ الکترونی - گروه علوم تشریحی - دانشگاه علوم پزشکی بیرجند * بیرجند: خیابان معلم - دانشگاه پزشکی

** دانشیار گروه علوم تشریحی - دانشگاه علوم پزشکی گرگان *** مربی گروه فارماکولوژی دانشگاه علوم پزشکی بیرجند

تاریخ تصویب: ۸۳/۹/۲۵

تاریخ انجام اصلاحات: ۸۳/۸/۱۳

E تاریخ دریافت: ۸۳/۶/۱۰

Email: APSHAR_md@yahoo.com

مقدمه

گاباپنتین (Gabapentin) به فرمول ($C_9H_{17}NO_2$) با نام تجاری neurontin یکی از داروهای ضد صرع نسل جدید است که در سال ۱۹۹۴ توسط شرکت Park-Davis به عنوان یک داروی کمکی جهت درمان صرع های ناقص و عمومی ثانویه معرفی گردید (۱). بعدها از این دارو به صورت تک درمانی در درمان صرع (۳،۲) و همینطور جهت تسکین بسیاری از دردهای عصبی (۵،۴) و میگرن (۶) نیز استفاده گردید. عدم متابولیزه شدن این دارو در بدن، دفع کلیوی سریع، فقدان تداخلات دارویی و تحمل پذیری خوب آن، باعث کاربرد وسیع تر گاباپنتین گردید (۷).

در رابطه با اثرات تراتوژنیک مصرف این دارو در زمان بارداری به روی جنین نیز اطلاعات زیادی در دست نیست. وزن مولکولی کم این دارو و عدم توانایی اتصال آن با پروتئین های پلاسما، احتمال عبور این دارو را از سد جنینی قوت می بخشد (۸). اگر چه اولین مطالعات بررسی حیوانات آزمایشگاهی هیچ گونه اثرات تراتوژنیک را گزارش نکرده است (۱۰)، پاره ای از مطالعات انجام شده به روی حیوانات آزمایشگاهی که از مقادیر ۱۰۰۰-۳۰۰۰ mg/kg/day به صورت خوراکی در زمان اندام سازی استفاده کرده بودند، تنها تاخیر در استخوان سازی جمجمه، ستون مهره ها و اندام های فوقانی و تحتانی را گزارش نموده اند (۱۰). مطالعاتی نیز وجود دارد که نشان می دهد مصرف این دارو در زمان بارداری می تواند باعث ایجاد هیدرونفروز و هیدرواورتر در جنین موش گردد (۱۰). علی رغم بروز ناهنجاری های فوق، در هنگام مقایسه با گروه شاهد، مصرف داروی گا با پنتین در زمان اندام سازی فقط از نظر افزایش ناهنجاری های هیدرواورتر و هیدرونفروز معنی دار بود. با توجه به وجود گزارش های محدود در مورد ایجاد شکاف در مغز قدامی (Holoprosencephaly) نوزادان

مادرانی که از این دارو در حین بارداری خود مصرف کرده بودند (۱۱)، به نظر می رسد که می بایست مطالعات تکمیلی دیگری با زمان و مقادیر مختلف در رابطه با این دارو صورت پذیرد. لذا این مطالعه با استفاده از مقادیر درمانی رایج در انسان ۷۰ کیلو گرمی 1400 mg /day و 1800 mg /day، در دوره طولانی تر لانه گزینی و اندام سازی به روی موش های Balb/c صورت گرفت.

مواد و روش ها

در این مطالعه تجربی، از ۳۰ سرموش سفید کوچک آزمایشگاهی با نژاد Balb/c که در سنین ۲/۵ ماهه و دارای وزن تقریبی 20 ± 30 گرم بودند، استفاده شد. شرایط نگهداری حیوانات در دمای ۲۳ تا ۲۵ درجه، رطوبت ۵۰ درصد و سیکل نوری ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و تغذیه با غذای استاندارد بود. جهت جفت گیری از تعداد ۳ سرموش ماده به همراه یک موش نر به مدت یک شب در داخل قفس استفاده شد. رویت پلاک واژنی در صبح روز بعد به عنوان زمان صفر حاملگی (GD_0) تلقی گردید. موش های ماده با پلاک واژنی در سه گروه ۱۰ تایی، شامل گروه تجربی I، گروه II و یک گروه شاهد دسته بندی شدند. گروه تجربی I و II به ترتیب مقادیر 20mg/kg/day (1400 mg و 26mg/kg/day (1800 /day را به مدت ۱۰ روز پی در پی، به صورت داخل صفاقی دریافت نمودند. مقادیر این مطالعه براساس گزارش موردی (۱۰) و مطالعات مقدماتی تعیین گردید که مقادیر ۱۴۰۰mg و ۱۸۰۰mg را برای یک فرد بالغ ۷۰ کیلو گرمی به صورت روزانه پیشنهاد می نماید. داروی استفاده شده پودر کپسول ۱۰۰ میلی گرمی ساخت کارخانه Pharma Science INC مونترال کانادا بود. رقیق سازی با استفاده از سرم فیزیولوژی صورت گرفت. در گروه شاهد، به جای

یافته‌ها

تعداد جنین‌های زنده، جذب جنینی، جنین‌های زنده و وزن جنین‌ها در گروه تجربی I، گروه تجربی II و گروه شاهد در جدول شماره ۱ ارائه شده است. تفاوت معنی‌داری در میانگین تعداد جنین‌های زنده در بین گروه‌های مورد مطالعه وجود نداشت، ولی افزایش معنی‌داری در جذب جنینی بین گروه‌های تجربی I و II با گروه کنترل وجود داشت ($P < 0.05$). اختلاف معنی‌داری بین میانگین وزن جنین‌های سالم گروه‌های تجربی I و II نسبت به گروه شاهد وجود داشت ($P < 0.05$) ولی اختلاف میانگین وزنی در بین گروه‌های تجربی I و II از نقطه نظر آماری معنی‌دار نبود.

دارو از سرم فیزیولوژی به همان حجم داروهای تزریق شده استفاده گردید. موش‌ها در روز ۱۸ حاملگی تشریح شده، جنین‌ها پس از پاره کردن کیسه آمنیون آزاد و با سرم فیزیولوژی شست و شو داده شده و مورد بررسی ماکروسکوپی توسط میکروسکوپ تحقیقاتی استریو مدل OLYMPUS SZX JAPAN قرار گرفت، اندازه‌گیری وزن جنین‌ها توسط ترازوی حساس دیجیتال مدل Sartorius PT 210 German با دقت ۰/۰۱ انجام شد.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماری Spss مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای مقایسه تعداد جنین‌های زنده و میانگین وزن جنین‌های سالم گروه‌های مورد آزمایش از آزمون Tukey ANOVA استفاده شد.

جدول شماره ۱: اثرات تزریق دو مقدار مختلف گاباپنتین بروی تعداد و وزن جنین موش‌های Balb/C در مقایسه با گروه شاهد

گروه‌ها	مقدار تزریقی (mg/kg/day)	تعداد حیوان	میانگین جنین‌های زنده $\pm$ انحراف معیار	میانگین جنین‌های جذبی $\pm$ انحراف معیار	میانگین وزن (g) جنین‌ها $\pm$ انحراف معیار
تجربی I	۱۴۰۰	۱۰	۱۳±۲/۱۶	۰/۴±۰/۶۹ *	۰/۷۷۳±۰/۰۶ **
تجربی II	۱۸۰۰	۱۰	۱۱±۲۳/۶۱	۱/۲±۱/۵۴ *	۰/۷۷۹±۰/۰۸ **
کنترل	۰	۱۰	۱۳/۳±۲	۰	۰/۸۲۴±۰/۱۱

*، ** اختلاف موجود در مقایسه با گروه شاهد از نظر آماری معنی‌دار بود ($P < 0.05$).

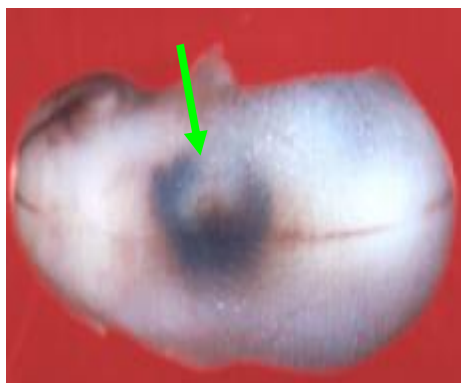
ناهنجاری‌های اسکلتی و عصبی مشاهده شده در گروه تجربی II از تعداد کل ۱۳۰ جنین مربوط به گروه تجربی اول ۸ جنین (۶/۱۵ درصد) دارای ناهنجاری‌های مختلف اسکلتی و نقایص لوله عصبی (NTDs) بودند (جدول شماره ۲). ناهنجاری‌های اسکلتی (۴/۶۱ درصد) نسبت به نقایص لوله عصبی (۱/۵۴ درصد) شیوع بیش‌تری داشت. این ناهنجاری‌ها به صورت آزمون کای دو استفاده شد. ضریب اطمینان مطالعه ($P < 0.05$) تعیین گردید.

جدول شماره ۲: بروز ناهنجاری‌های اسکلتی و نقایص لوله عصبی ایجاد شده در جنین موش‌های Balb/C تحت تاثیر داروی گاباپنتین درصد (%) بروز ناهنجاری‌ها در هر گروه آزمایش

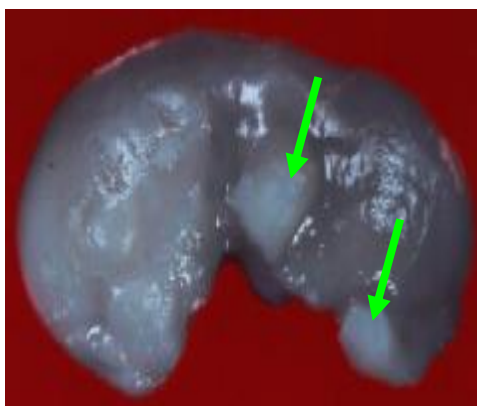
متغیر	گروه تجربی I	گروه تجربی II	کنترل - آب مقطر
جنین‌های ناهنجار	*۶/۱۵	**۱۰/۹	۰
ناهنجاری‌های اسکلتی	*۴/۶۱	**۸/۱۸	۰

*, **, * ** اختلاف موجود در مقایسه با گروه شاهد از نظر آماری معنی دار بود ($p < 0.05$).

تصویر شماره ۱: جنین تجربی ۱ (مقدار ۱۴۰۰ mg/kg/day گاباپنتین) که دارای اختلال در شکل و محل اندام های فوقانی (فلش آبی) و تحتانی (فلش سبز) می باشد.



تصویر شماره ۲: جنین تجربی ۱ (دوز ۱۴۰۰ mg/kg/day گاباپنتین) که دارای اسپینا بیفیدا سیستیکادر ناحیه مهره های توراسیک (فلش) می باشد.



تصویر شماره ۳: جنین تجربی II (مقدار ۱۸۰۰ mg/kg/day گاباپنتین) که دارای اختلال در شکل و محل اندام ها (فلش ها) می باشد.

اختلال شکل و جابجایی در اندام های فوقانی و تحتانی بود (تصویر شماره ۱). جنین های فوق از نظر اندازه بسیار کوچک تر و سفید تر از جنین های سالم بودند. نقایص لوله عصبی به صورت اسپینا بیفیدا سیستیکا در ناحیه سینه ای ستون مهره ها دیده شد (تصویر شماره ۲).

ناهنجاری های اسکلتی و عصبی مشاهده شده در گروه تجربی II

از تعداد کل ۱۱۰ جنین گروه تجربی دوم، ۱۲ جنین (۱۰/۹ درصد) دارای ناهنجاری های اسکلتی و نقایص لوله عصبی بودند (جدول شماره ۲). در این گروه میزان ناهنجاری های اسکلتی (۸/۱۸ درصد) از میزان نقایص لوله عصبی (۲/۷۲ درصد) بیش تر بود. ناهنجاری های اسکلتی با این مقدار، شدید تر از گروه تجربی اول بود؛ به طوری که علاوه بر جابجایی اندام، جنین های با تغییرات اسکلتی و تکاملی شدید در این گروه دیده می شد (تصویر شماره ۳). جنین های فوق از نظر اندازه بسیار کوچک تر و سفید تر از جنین های سالم بودند. نقایص لوله عصبی در این گروه نیز، به صورت اسپینا بیفیدا سیستیکا در ناحیه سینه ای ستون مهره ها دیده شد. در ۱۲۸ جنین مربوط به گروه شاهد هیچ گونه از ناهنجاری های فوق دیده نشد. از نقطه نظر آماری تنها اختلاف موجود در بین ناهنجاری های اسکلتی ایجاد شده در بین دو گروه تجربی I و II با گروه شاهد از نقطه نظر آماری معنی دار بود ($P < 0.05$), اما نقایص لوله عصبی ایجاد شده در بین گروه های تجربی و شاهد از نقطه نظر آماری معنی دار نبود.



بحث

مطالعه فوق نشان داد که مصرف داروی گاباپنتین به طور مستمر در طی مراحل لانه گزینی و اوایل اندام سازی سبب ناهنجاری های شدید اسکلتی و نقایص لوله عصبی در جنین موش سوری شد.

نتایج این مطالعه با مطالعه انجام شده قبلی توسط Petrere (۱۹۹۴) بر روی حیوانات آزمایشگاهی که دلالت بر بی خطر بودن این دارو دارد، متفاوت است (۹).

مطالعه دیگر در سال ۱۹۹۵ بر روی حیوانات آزمایشگاهی، به صورت خوراکی در زمان اندام سازی، اثرات تراژونیک به صورت تاخیر در استخوان سازی و تحتانی را در جنین های در معرض دارو قرار گرفته، گزارش نموده اند (۱۰). همین تحقیق هیدرونفروز و هیدرو اورتر را نیز به عنوان یکی دیگر از آثار تراژونیک این دارو در زمان اندام سازی بیان نمود.

بروز ناهنجاری در جنین ها، رامی توان به دو گروه عمده ناهنجاری های اسکلتی و نقایص لوله عصبی تقسیم نمود. در جنین های گروه تجربی I اختلالات مشاهده شده عمدتاً شامل عدم چرخش اندام ها، کوتاهی اندام فوقانی و تحتانی، عدم تشکیل انگشتان دست ها و پاها بود (تصویر شماره ۱). به علاوه جنین های فوق از نظر جثه نسبت به جنین های هم شکم خود کوچک تر، سفید رنگ تر و کم وزن تر بودند. مشابه همین ناهنجاری ها در گروه تجربی دوم دیده شد، اما شدت این ناهنجاری ها بسیار شدیدتر از گروه اول بود؛ به طوری که گاهی حتی تشخیص بخش های مختلف جنین را غیر ممکن می نمود. این مسأله نشان می دهد که داروی گاباپنتین اگر در زمان طولانی تری (لانه گزینی و اوایل اندام سازی) مصرف گردد، می تواند سبب اختلالات بسیار شدیدتری از تاخیر در استخوان سازی گزارش شده (۴) در مطالعات قبلی گردد. طیف دوم ناهنجاری ها شامل نقایص لوله عصبی

بود که عمدتاً به صورت اسپینایفیدا در ناحیه مهره های سینه ای در هر دو گروه تجربی اول و بروز نمود. ظهور نقایص عصبی در هر دو گروه تجربی اول و دوم این نکته را مطرح می نماید که داروی گاباپنتین نیز مانند تعدادی دیگر از داروهای نسل قدیم مثل والپروئیک اسید و کاربامازپین (۱۴-۱۲) توانایی تولید نقایص لوله عصبی را دارد، هر چند که میزان این ناهنجاری ها نسبت به سایر داروهای نسل قدیم کم تر بود و در مقایسه با گروه شاهد معنی دار نبود.

مکانیزم و یا مکانیزم های احتمالی اثرات تراژونیک گاباپنتین چندان مشخص نمی باشد. ولی با توجه به این که اکثر داروهای ضد صرع نسل قدیم (والپروئیک اسید، فنی توئین، فنوباریتال) از طریق مکانیزم های احتمالی زیر اثرات تراژونیک خود را اعمال می نمایند، نظریه های زیر را می توان در رابطه با داروی گاباپنتین مطرح نمود:

۱ - تغییر در متابولیسم اسید فولیک و کاهش سطح اسید فولیک (۱۵).

۲ - تغییر در غلظت رتینول و مشتقات آن، مخصوصاً ۱۳ سیس رتینوئیک اسید، که ترکیبات بسیار مهمی در جهت و تکامل ساختار بخش های مختلف بدن (مورفوژنز) هستند (۱۶).

۳ - ایجاد آپوپتوزیس، مخصوصاً در بن سلول های لوله عصبی (۱۷).

۴ - تولید رادیکال های آزاد از قبیل Epoxide در طی مراحل متابولیزه شدن دارو.

۵ - تغییر در غلظت نوروترانسمیتر گاما آمینو بوتیریک اسید (GABA) (۱۹).

با توجه به این که ساختمان گاباپنتین شباهت زیادی به نوروترانسمیتر GABA دارد و در واقع گاباپنتین یک آنالوگ گابا می باشد، محتمل تر به نظر می رسد که گاباپنتین از طریق تغییر در غلظت و یا دخالت در متابولیسم GABA اثرات تراژونیک خود را مخصوصاً در زمینه ایجاد نقایص لوله عصبی اعمال نماید. پاره ای از تحقیقات نیز نشان می دهند که

انجام گردد.

سپاسگزاری

از زحمات سرکار خانم لطفی که در این پژوهش هماهنگی‌های لازم در جهت استفاده از لوازم مورد نیاز و حیوانات آزمایشگاهی را به عمل آوردند، تقدیر و تشکر می‌شود.

والپروئیک اسید نیز که از داروهای ضدصرع نسل قدیم می‌باشد، می‌تواند از طریق افزایش سطح غلظتی GABA و یا از طریق افزایش فعالیت گیرنده‌های GABA موجب ایجاد نقایص لوله عصبی گردد (۲۰). با توجه به نتایج مطالعه اخیر پیشنهاد می‌گردد مطالعات وسیع‌تری با روش‌های مختلف استفاده از داروی گاباپنتین، جهت تعیین اثرات و مکانیزم‌های این دارو در هنگام لانه‌گزینی و اندام‌سازی

فهرست منابع

1. The US Gabapentin Study Group No.5. Gabapentin as add-on therapy in refractory partial epilepsy: a double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Neurology*. 1993; 43:2292-2298.
2. Bergey GK, Morris HH, Rosenfeld W, Gabapentin monotherapy, I: an 8-day, double-blind, dose-controlled, multicenter study in hospitalized patients with refractory complex partial or secondarily generalized seizures. *Neurology*. 1997; 49:739-745.
3. Beydun A, Fischer J, Labar DR., Gabapentin monotherapy, II: a 26-week, double-blind, dose-controlled, multicenter study of conversion from polytherapy in outpatients with refractory complex partial or secondarily generalized seizures. *Neurology*. 1997; 49:746-752.
4. Backonja M, Beydoun A, Edwards KR, Gabapentin for the symptomatic treatment of painful neuropathy in patients with diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *JAMA*. 1998; 280: 1831-183.
5. Michael Rowbotham, Norman Harden, Brett Stacey, Paula Bernstein, Leslie Magnus-Miller, and for the Gabapentin Postherpetic Neuralgia Study Group. Gabapentin for the Treatment of Postherpetic Neuralgia: A Randomized Controlled Trial. *JAMA*. 1998; 280: 1837-1842.
6. Spira and Beran. Gabapentin in the prophylaxis of chronic daily headache: A randomized, placebo-controlled study *Neurology* 2003; 61:1753-1759.
7. William O. Tatum, Rupert Galvez, Selim Benbadis, Enrique Carrazana. New Antiepileptic Drugs. *Arch Fam Med*. 00;9:1135-1141.
8. Gerald G. Briggs, Rogerk Freeman, sumner J. Yaffi. *Drug in Pragnancy and Lactation*: A reference guide to fetal and neonatal risk. 5th Ed. USA. Lippincott Williams & Wilkins. 1998; 477-478.
9. Petrere JA, Anderson JA, Developmental toxicity studies in mice, rats and rabbits

- with anticonvulsant gabapentin. *Fundam APPL.Toxical*. 1994; (4): 585-9.
10. Davis p. Product information. *Neurontin*. <http://hom.tampabay.rr.com/lymecfs/list4.htm>. 1977; 1-19.
 11. Rosa F. Holoprosencephaly and antiepileptic exposures. *Teratology*. 1995; 51:230.
 12. Nau H, Hauck RS, Ehlers K. Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacol Toxicol*. 1991; Nov 69(5):310-21.
 13. Jones kl, Larco RV, Johnson KA, Adams J. Pattern of malformations in the children of women treated with carbamazepine during pregnancy. *N Engl J Med*. 1989; 320(25):1661-66.
 14. Matalon S, Schechtman S, Goldzweig G, Ornoy A. The teratogenic effects of carbamazepine: a meta- analysis of 1255 exposures. *Reproductive toxicology*. 2002; 16:9-17.
 15. Dansky Lv, Rosenblatt Ds, Anderson E. " Mechanisms of Teratogenesis: folic acid and antiepileptic therapy". *Neurology*. 1992; Apr 42(4 suppl 3): 32-42.
 16. Nau H, Tzimas G, Modry M. "Antiepileptic Drugs Alter Endogenous Retinoid Concentration: A Possible Mechanism of Teratogenesis of anticonvulsant Therapy". *Life Science*. 1995; 57(1):53-60.
 17. Nau H, Tzimas G, Modry M. etal. "Antiepileptic Drugs Alter Endogenous Retinoid Concentration: A Possible Mechanism of Teratogenesis of anticonvulsant Therapy". *Life Science*. 1995; 57(1):53-60.
 18. pippenger CE. Pharmacology of neural tube defects. *Epilepsia*. 2003; 44 suppl 3: 24-32.
 19. Wayne Briner. The effect of GABA receptor ligands in experimental spina bifida occulta. *BMC Pharmacology*. 2001; 1:2.
 20. Laegreid L, Kyllerman M, Hedner T, Hagberg B, Viggedahl G: Benzodiazepine amplification of valproate teratogenic effects in children of mothers with absence epilepsy. *Neuropediatric* 1993;24:88-92.