

## بررسی تأثیر اسید فولیک تکمیلی در جلوگیری از اثرات تراتوژنیکی والپورات سدیم بر تکامل لوله عصبی جنین موش سوری

دکتر مجتبی کریمی پور<sup>۱</sup>، معصومه زیرک جوانمرد<sup>۲</sup>، دکتر زهرا یکتا<sup>۳</sup>، دکتر فخرالدین دادمهر<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۸۴/۰۹/۲۲، تاریخ پذیرش ۸۵/۰۳/۰۳

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** والپورات سدیم یکی از موثرترین داروهای ضد تشنج است و مصرف آن در مادران حامله باعث ناهنجاری‌های جنینی به ویژه در سیستم عصبی می‌شود. هدف از مطالعه حاضر بررسی تأثیرات اسید فولیک در جلوگیری از اثرات تراتوژنیکی والپورات سدیم در جنین‌های موش سوری است. مواد و روش کار: در این مطالعه از تعداد ۳۰ موش سوری در سه گروه شاهد، آزمایشی یک و آزمایشی دو استفاده گردید. گروه آزمایشی یک در روز هشتم بارداری ۲۰۰ mg/kg والپورات سدیم، گروه آزمایشی دو نیز در روز هشتم همزمان با ۲۰۰ mg/kg والپورات سدیم، ۴ mg/kg اسید فولیک را به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. گروه شاهد فقط آب مقطر دریافت می‌کرد. در روز سیزدهم جنینی، جنین‌ها از رحم خارج شد و از نظر ماکروسکوپی (طول، وزن و میزان جذب جنین‌ها) و میکروسکوپی (لوله عصبی) مورد بررسی قرار گرفتند. یافته‌ها: در بررسی‌های ماکروسکوپی، طول و وزن جنین‌ها در گروه آزمایشی یک، نسبت به گروه‌های شاهد و تجربی دو کاهش یافته بود ( $p < 0/05$ )، درصد جذب جنین‌ها در گروه آزمایشی یک نسبت به سایر گروه‌ها بیشتر بود. در مشاهدات میکروسکوپی، نظم سلولی لایه نورو اپیتلیال در لوله عصبی ناحیه نخاع در گروه تجربی یک به هم خورده بود به طوریکه تراکم سلول‌ها کاهش و فضای خارج سلولی افزایش یافته بود. نقص عمده دیگری در گروه آزمایشی یک، وجود شکاف بارز در ناحیه بسته شدن لوله عصبی می‌باشد ( $p < 0/05$ ). بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان داد اسید فولیک می‌تواند تا حد بسیار زیادی اثرات تراتوژنیکی والپورات سدیم را در جنین‌هایی که مادران آن‌ها در مصرف این داروی ضدصرعی قرار گرفته بودند، کاهش دهد.

کل واژگان: والپورات سدیم، لوله عصبی، اسید فولیک، جنین موش

مجله پزشکی ارومیه، سال هفدهم، شماره چهارم، ص ۲۸۵-۲۹۸، زمستان ۱۳۸۵

آدرس مکاتبه: ارومیه- نازلو، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی، دکتر مجتبی کریمی پور، تلفن: ۲۷۷۰۳۹۷ و ۰۹۱۴۳۴۶۴۷۳۳۲

E-mail: [mojtaba\\_karimipour@yahoo.com](mailto:mojtaba_karimipour@yahoo.com)

### مقدمه

هستند به طوری که انجمن آمریکایی کنترل سم، ۹۷۷۸ مورد را در سال ۲۰۰۱ گزارش نمود(۳). مسمومیت با والپورات سدیم می‌تواند منجر به کوما، نارسائی تنفسی و کلیوی، پانکراتیت حاد، لکونیا و غیره شود(۱). بررسی‌ها در انسان و حیوانات نشان داده است که والپورات سدیم می‌تواند باعث ایجاد ناهنجاری‌های مادرزادی از جمله نقص لوله

والپورات سدیم یک مولکول با وزن ۱۴۴ دالتون است که در درمان بیماری صرعی استفاده می‌شود. علاوه بر آن، این دارو برای درمان اختلالات روانی دو قطبی، اسکیزوفرنیا و میگرن نیز استفاده می‌شود(۲،۱). این دارو نخستین بار در سال ۱۹۷۸ برای کنترل صرع تجویز شد. بیماران مذکور در معرض مسمومیت با این دارو

<sup>۱</sup> استادیار گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی ارومیه (نویسنده مسؤل)

<sup>۲</sup> مربی گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۳</sup> استادیار گروه پزشکی اجتماعی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

<sup>۴</sup> مربی گروه علوم تشریح دانشگاه علوم پزشکی ارومیه

بررسی تأثیر اسید فولیک تکمیلی در جلوگیری از اثرات تراتوژنیک والپورات سدیم بر تکامل لوله عصبی جنین موش سوری

سنتز می‌کند. علاوه بر آن، اسید فولیک در سنتز DNA ضروری بوده و به رشد بافت‌ها و عملکرد سلول‌ها کمک می‌کند. به‌کارگیری آنتی متابولیت‌های اسید فولیک در موش‌های باردار، اثرات تراتوژنیک دارد. فراوان‌ترین نقص‌های لوله عصبی مربوط به کمبود اسید فولیک، شامل اسپینا بیفیدا و انسفال است (۱۳). محققین دیگر نشان دادند که خوردن اسید فولیک تکمیلی پیش از بارداری با کاهش معنی‌دار نقص لوله عصبی همراه است (۱۴، ۱۵). لذا با توجه به مطالب فوق بر آن شدیم تا با مطالعات ماکروسکوپی و میکروسکوپی اثرات اسید فولیک در جلوگیری از نقایص لوله عصبی ناشی از مصرف والپورات سدیم را در جنین‌های موش‌های سوری مورد مطالعه قرار دهیم.

### مواد و روش کار

در این تحقیق از تعداد ۳۰ موش سوری ماده استفاده شد. سن همه موش‌ها بالای ۹۰ روز و وزن آن‌ها بین ۲۴ تا ۳۵ گرم بود. موش‌ها در تمام مدت آزمایش در حیوان‌خانه با حرارت ۲۲-۲۰ درجه سانتیگراد و با رعایت ۱۲ ساعت در تاریکی و ۱۲ ساعت در روشنایی نگه‌داری شدند. بعد از جفت‌گیری و تشخیص پلاک واژینال، آن روز به عنوان روز صفر بارداری در نظر گرفته شد. موش‌های باردار به طور تصادفی به سه گروه ۱۰ تایی تقسیم شدند. گروه تجربی یک، گروه تجربی دو و گروه شاهد.

به گروه تجربی یک در روز هشتم حاملگی ۲۰۰mg/kg والپورات سدیم و به گروه تجربی دو نیز در روز هشتم حاملگی به همراه ۲۰۰mg/kg والپورات سدیم، ۴mg/kg اسید فولیک به صورت داخل صفاقی تزریق شد. موش‌های گروه شاهد تنها آب مقطر استریل دریافت کردند (۲۳).

در روز ۱۳ بارداری، موش‌های گروه سه گانه فوق کشته شدند و جنین‌ها به همراه رحم خارج شدند. سپس رحم به مدت ۳۰ دقیقه داخل محلول فیکساتیو بوئن نگه‌داری شد و در مرحله بعد جنین‌ها از رحم خارج و پس از خشک کردن با کاغذ صافی، وزن و طول آن‌ها (از فرق سر تا نشیمنگاهی) و همین‌طور میزان جذب آن‌ها اندازه‌گیری شد و سپس داخل محلول بوئن به مدت ۷ الی ۱۰ روز نگه‌داری شدند.

جهت بررسی تغییرات میکروسکوپی و مورفومتریکی لوله عصبی، ۲۱ جنین از هر یک از گروه‌های سه گانه به طور تصادفی انتخاب و بعد از پاساژو بلوک‌گیری، برش‌های سریال ۶ میکرونی

عصبی<sup>۱</sup> ناهنجاری‌های قلبی عروقی، بد شکل صورت، میکروسفالی و شکاف کام شود (۶، ۵، ۴).

Turnet و همکاران در سال ۱۹۹۰ با تزریق والپورات سدیم در روز هشتم بارداری متوجه بروز ۳۰ درصد نقص لوله عصبی در جنین‌های موش شدند. علاوه بر آن نوروایی تلوم ناحیه مغز قدامی نیز ناهنجاری‌های ساختمانی قابل توجهی را نشان داد به طوری‌که نظم سلولی و چسبندگی بین سلولی کاهش یافته بود و در سطح آپاندیم نیز تورم سلولی مشاهده شد (۷).

Segmiller و همکاران در سال ۱۹۹۱ عنوان کردند که اثر والپورات سدیم بر روی سلول‌های نوروایی تلیال مشخص و چشمگیر است به طوری‌که سبب ایجاد مرگ سلولی در آن‌ها می‌شود (۸). گزارش‌های متعدد دیگری نیز وجود دارد مبنی بر اینکه والپورات سدیم در جنین‌های انسانی و حیوانی که مادران آن در معرض این دارو بوده اند سبب ایجاد ناهنجاری‌های متعدد می‌گردد از جمله نقص در سیستم اسکلتی، داشتن دنده گردنی و کمری، تغییر شکل در اسکلت محوری، هیپوپلازی مندیولار و غیره (۹).

بر خلاف اطلاعات فراوان کلینیکی و آزمایشگاهی که طی سال‌های اخیر در مورد اثرات تراتوژنیک والپورات سدیم گزارش شده است، مکانیسم دقیقی که به وسیله والپورات سدیم، پاسخ تراتوژنیک را فعال می‌کند شناخته نشده است.

یکی از مکانیسم‌های تراتوژنیک والپورات سدیم دخالت در متابولیسم فولیت‌ها می‌باشد. به طوری که والپورات سدیم فعالیت آنزیم گلوتامات فرمیل ترانسفراز را متوقف می‌کند و باعث تغییرات وابسته به دوز در متابولیسم فولیت می‌شود، به علاوه از جذب اسید فولیک در لوله گوارش جلوگیری می‌کند و در بیماران مبتلا به صرع باعث کاهش سطح فولیت سرم می‌شود (۱۰).

در بررسی‌های Khera و همکاران در سال ۱۹۹۲ عنوان گردید که والپورات سدیم بر غشاهای جفتی اثرات دژنراتیو بسیاری داشته و سبب ترومبوس در لاکونای مادری، نکروز سیتوتروفوبلاست و کاهش تکثیر عروق خونی و حتی انسداد عروق بند ناف می‌گردد و به نظر می‌رسد این اثرات باعث تغییر شرایط تغذیه‌ای در تکامل جنین شده و در ایجاد ناهنجاری‌ها موثر است (۱۲).

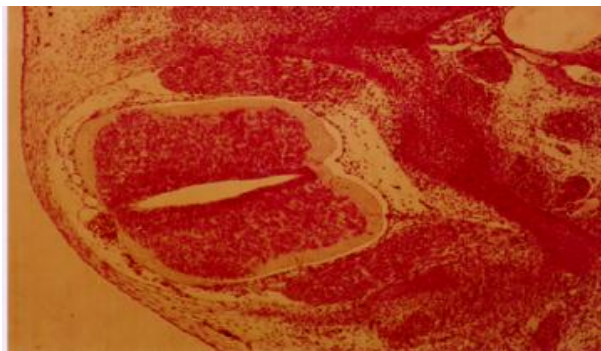
اسید فولیک یک ویتامین محلول در آب بوده که به همراه ویتامین‌های B۱۲ و C در مواقع ضروری، پروتئین‌های جدید را

<sup>۱</sup> اسپینا بیفیدا و انسفال

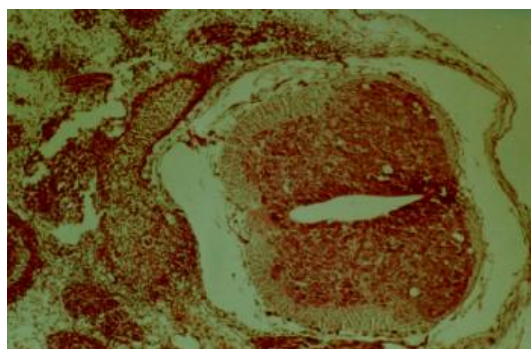
دکتر مجتبی کریمی پور، معصومه زیرک جوانمرد، دکتر زهرا یکتا، دکتر فخرالدین دادمهر

جدول: درصد نقایص لوله عصبی و میانگین و انحراف معیار ضخامت دیواره، لوله عصبی در ناحیه نخاع در گروه‌های مختلف

گروه‌ها	باز بودن بطن (درصد)	نقص نخاع (درصد)	ضخامت جدار لوله عصبی Mean ± SE
شاهد	۰ (۰)	۰ (۰)	۳۱/۴ ± ۲/۷۵
تجربی یک	۱۹ ٪۹۰/۵	۱۷ ٪۸۱	۲۲/۶ ± ۲/۳۶
تجربی دو	۵ ٪۲۳/۸	۱ ٪۴/۸	۳۰/۹ ± ۱/۸۵



تصویر شماره ۱: مقطع عرضی لوله عصبی ناحیه نخاع در گروه شاهد. بزرگنمایی اصلی ۱۰۰×



تصویر شماره ۲: مقطع عرضی لوله عصبی ناحیه نخاع در گروه تجربی یک. بزرگنمایی اصلی ۱۰۰×

از ناحیه سر تا دم جنین تهیه و با هماتوکسیلین وائوزین رنگ آمیزی شد. برای بررسی‌های مورفومتریک از قطعه چشمی مدرج<sup>۱</sup> استفاده گردید و ضخامت جدار لوله عصبی در ناحیه نخاع اندازه گیری شد. نتایج خام به دست آمده با استفاده از نرم افزار SPSS و تست‌های فیشر و ANOVA مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

## یافته‌ها

### الف) مشاهدات ماکروسکوپی

میزان جذب جنین: میزان درصد جذب جنین در گروه‌های سه گانه تجربی یک، تجربی دو و شاهد به ترتیب ۱۱/۵ و ۳۲/۸ و ۱۱/۳ درصد بود.

اندازه CRH: در گروه آزمایشی یک کاهش معناداری نسبت به گروه کنترل و تجربی دو وجود دارد ( $p < ۰/۰۰۱$ ) ولی اختلاف این شاخص در بین گروه‌های شاهد و تجربی دو معنادار نبود. وزن جنین: در گروه آزمایشی یک وزن جنین‌ها نسبت به گروه‌های کنترل و تجربی دو کاهش یافته بود ( $p < ۰/۰۵$ ).

### ب) مشاهدات میکروسکوپی

در تصاویر میکروسکوپی لوله عصبی در ناحیه نخاع در گروه شاهد، در هر سه لایه لوله عصبی، هسته‌ها به طور منظم قرار گرفته و تقسیم متبوز در لایه ونتریکولار مشاهده می‌شود. تراکم هسته‌ها نیز طبیعی است. ولی در گروه آزمایشی یک، نظم هسته‌ها به هم خورده و در جهات مختلف قرار گرفته‌اند، تراکم سلول‌ها کم شده و فضای خارج سلولی نیز افزایش یافته است و به صورت فضاهای خالی متعدد می‌باشد. در گروه آزمایشی دو نظم و آرایش سلولی هر سه لایه نوروایی تلیوم مشابه گروه شاهد است. (تصاویر شماره ۱ و ۲)

نقص عمده دیگر در گروه آزمایشی یک باز بودن لوله عصبی (در ناحیه نخاع و بطن‌های مغزی) و یا وجود شکاف بارز در ناحیه بسته شدن لوله عصبی است. (تصویر شماره ۳) که میزان آن نسبت به گروه تجربی دو بیشتر می‌باشد به طوری که این اختلاف از نظر آماری معنادار می‌باشد ( $p < ۰/۰۵$ ). (جدول)

بررسی‌های مورفومتریک حاکی از کاهش معنادار ضخامت دیواره، لوله عصبی در گروه تجربی یک نسبت به گروه‌های تجربی دو و شاهد بود ( $p < ۰/۰۵$ ). (جدول)

<sup>1</sup> Eye Piece

تلیوم است و جذب بالای والپورات سدیم توسط این سلول‌ها بیش از میزان آن در خون مادری، مایع آمنیوتیک و سایر بافت‌های جنین است (۱۸).

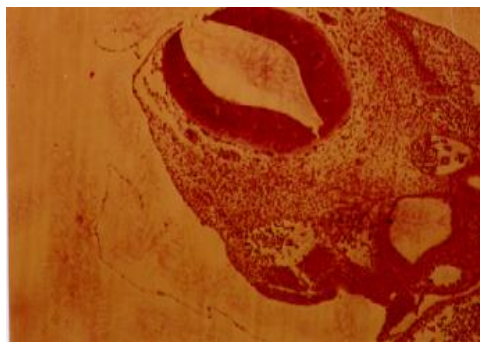
مکانیزم یا مکانیزم‌های مولکولی درگیر در تراتوژنیک بودن والپورات سدیم ناشناخته است اما یکی از فرضیاتی که در این مورد مطرح است اثرات متقابل والپورات سدیم با متابولیزم و سنتز جنینی اسید فولیک است (۱۰). کمبود اسید فولیک با افزایش سطح هموسیستئین همراه است. افزایش هموسیستئین به نوبه خود سبب افزایش بروز حملات قلبی، سکته مغزی، اترواسکلروزیس، آلزایمر و همچنین افزایش خطر ایجاد نقایص لوله عصبی در جنین می‌شود (۱۹).

مشخص شده است که اسید فولیک با کاهش هموسیستئین در جلوگیری از نقایص لوله عصبی موثر است ولی مشخص نیست که چه میزان از اسید فولیک در روز نیاز است تا سطح هموسیستئین را کاهش دهد (۱۰).

محققین دیگر عنوان کرده اند که کافی نبودن اسید فولیک باعث جهش در آنزیم *reducase Methylene terta hydrofolate* می‌شود که مهم‌ترین عامل خطر برای ایجاد نقایص لوله عصبی است (۱۳). کاهش قابل توجه نقص‌های لوله عصبی ایجاد شده توسط والپورات سدیم به واسطه تزریق اسید فولیک نیز مدرک دیگری از اثر این دارو است. والپورات سدیم توانایی ایجاد تغییر در متابولیسم فولیت را دارد، لذا افزودن آن به بدن مادر باردار و انتقال از طریق جفت به جنین بروز نقص‌های لوله عصبی را سبب می‌شود.

از مکانیزم‌های احتمالی دیگری که اخیراً در باب اثرات تراتوژنیک والپورات سدیم عنوان شده این است که والپورات سدیم سبب افزایش سطح رادیکال‌های آزاد می‌شود. Na و همکاران در سال ۲۰۰۳ عنوان کردند والپورات سدیم سبب مهار ایجاد سلول‌های قلبی از سلول‌های بنیادی (Stem cells) در محیط کشت از طریق افزایش سطح رادیکال‌های آزاد می‌شود. این‌که آیا تغییرات ایجاد شده در لوله عصبی در مطالعه حاضر ناشی از افزایش سطح رادیکال‌های آزاد است تحقیقات بیشتری را می‌طلبد (۲۱).

و بالاخره اخیراً عنوان شده که والپورات سدیم سبب مهار تشکیل عروق خونی جدید یا آنژیوژنسیس می‌شود و به همین خاطر تحقیقات جدید متعددی در خصوص اثرات ضد سرطانی آن در حال انجام است. شاید بتوان گفت که یکی از دلایل احتمالی اثرات



تصویر شماره ۳: مقطع عرضی لوله عصبی ناحیه نخاع در گروه تجربی دو که لوله عصبی بسته نشده است. بزرگنمایی اصلی ۱۰۰×

### بحث

بررسی‌های میکروسکوپی در تحقیق حاضر نشان داد که والپورات سدیم سبب کاهش طول و وزن جنین‌های موش و هم چنین افزایش میزان جذب جنین‌ها می‌شود. و این کاهش نشان از وجود توکسیسیته والپورات سدیم است که با نتایج تحقیقات دیگر در این زمینه همسوئی دارد (۱۶،۵). اما در گروهی که اسید فولیک را دریافت کرده بودند شاخص‌های فوق به گروه کنترل شبیه بود که حاکی از اثرات محافظتی اسید فولیک در مقابل اثرات تراتوژنیک والپورات سدیم است.

بررسی‌های میکروسکوپی نشان داد که در گروهی که والپورات سدیم را دریافت کرده بودند لوله عصبی جنین‌های آن‌ها به صورت باز باقی مانده بود و تغییرات پاتولوژیک فراوانی نیز در ساختمان نوروای تلیوم آن‌ها قابل مشاهده بود که مشتمل بر دژنراسیون سلولی، تغییرات جهت هسته‌ها، پراکندگی سلول‌ها، و تورم سلول‌ها می‌باشد. علاوه بر آن ضخامت دیواره لوله عصبی نیز در گروه والپورات سدیم نسبت به دو گروه دیگر (گروه اسید فولیک و کنترل) کاهش یافته بود. از دلایل احتمالی که می‌توان برای کاهش این ضخامت مطرح ساخت، دژنراسیون سلول‌ها و همچنین وجود مرگ سلولی است (۱۶). چون به دنبال وقوع مرگ سلولی در لایه و نتریکولار، تعداد نوروبلاست‌ها کم شده، پس تعداد مهاجرت نوروبلاست‌ها و در نتیجه ضخامت لوله عصبی کاهش می‌یابد و در نهایت قطر خارجی لوله کاهش می‌یابد. نتایج بررسی‌های فوق نشان داد که به‌کار بردن والپورات سدیم در زمان بحرانی نوروژنز در موش، ساختار طبیعی نوروای تلیوم را تغییر داده و باعث از بین رفتن شکل طبیعی سلول‌ها می‌گردد. به نظر می‌رسد که ارگان هدف برای عمل تراتوژنی والپورات سدیم سلول‌های نوروای

داروئی و چه از طریق تغذیه دریافت نمایند. یادآوری می شود که اسفناج و ... غنی از اسید فولیک می باشد.

### تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر، نتایج قسمتی از طرح مصوب معاونت محترم پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی ارومیه بوده، لذا نویسندگان مقاله کمال تقدیر و تشکر را از آن معاونت محترم به دلیل حمایت های مالی ابراز می دارند.

مخرب والپورات سدیم بر قسمت های مختلف جنین ناشی از اثرات آنتی آنژیوژنسیس آن باشد که نیازمند تحقیقات بیشتری است (۲۲).

با توجه به مطالب فوق، والپورات سدیم با القای مکانیزم هایی سبب اختلال در متابولیسم اسید فولیک شده و اثرات سوئی را بر لوله عصبی جنین بر جای می گذارد.

لذا پیشنهاد می شود مادران بارداری که به هر دلیل داروی والپورات سدیم را دریافت می کنند حتماً اسید فولیک لازم را چه از طریق

### References:

01. Meek MF, Broekroelofs J, Yska JP, Egbers PH. Valproic acid intoxication: Sense and non- sense of haemodialysis. *J Medicine* 2004; 62(9): 333-336.
02. Sheldon MS, McCormick BB, Mustata S. Extracorporeal management of Valproic acid overdose: A large regional experience. *J Nephrol* 2004; 17: 43-49.
03. Sztajnkrzyer MD. Valproic acid toxicity: Overview and management. *J Clin Toxicol* 2002; 40 (6): 789-801.
04. Ehlers K, Elmazar MM, Nau H. Methionine reduces the valproic acid - induced spina bifida rate in mice without altering valproic acid kinetics. *J Nutr* 1996; 126(1): 67-75.
05. Elmazar MM, Vogel R, Spicelmann H. Amniotic Fluid cholinesterase of valproate - induced exencephaly in the mouse: an animal model for prenatal diagnosis of neural tube defects . *Arch Toxicol* 1988; 61(6): 501-503.
06. Padmanabham R, Mameed MS. Exencephaly and axial skeletal malformations induced by maternal administration of sodium valproate in the MF1 mouse. *J Craniofac Genet Dev Biol* 1994; 14(3): 192-205.
07. Turnet S, Sneathon ME, Dephilip RM. Teratogenic effects of neuroepithelium of CD-y mouse embryo exposed in utero to sodium valproate. *Teratology* 1990; 41: 421-432.
08. Seegmiller RE. Morphological differences elicited by two weak acid, retinoic and valproic in rat embryos. *Teratology* 1991; 43: 133-150.
09. Rengasamy D, Padmanabham R. Experimental studies on cervical and lumbar rids in mouse embryos. *Congenit Anom* 2004; 44(3): 156-71.
10. 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* 1990; 69(5): 310-21.
11. Ehlers K, Sturje H, Merker MJ. Valproic acid - induced spina bifida: a mouse model. *Teratology* 1992; 45(2): 145-154.
12. Khera KS. Valproic acid induced placental and teratogenic effects in rats – *Teratology* 1992; 45(6): 603-610.
13. Hall J, Solehdin F. Folic acid for the prevention of congenital anomalies. *Ear J Pediatr* 1998; 157: 445-450.
14. Czeizel AE. Primary prevention of neural tube defects and some other major congenital abnormalities: recommendations for the appropriate use of folic acid during pregnancy. *Paediatr Drugs* 2000; 2(6): 437-49.
15. Honein MA, Paulozzi LJ, Mathews TJ. Impact of folic acid fortification of the US food supply on the occurrence of neural tube defects. *JAMA* 2001; 285(23): 3022-3023.
16. Bogumil B, Bogdan W, Minta M. Effect of sodium valproate on rat embryo development in vitro . *Bull Vet Inst* 2000; 44: 201-205.
17. Sadler TW. *Langman's medical embryology*. 9<sup>th</sup> Ed. Lippincott: Williams and Wilkins; 2004. P 412-413.
18. Dencker L, Nau H, Argy R. Marked accumulation of valproic acid in embryonic neuroepithelium of mouse

- during early organogenesis. *Teratology* 1990, 41: 699-700.
19. Von O, Floor VA. Folic acid and reduction homocysteine concentrations in older adults: a dose response study. *Ameri J Clini Nutri* 2003; 77: 1318-1323.
  20. Bronstrup A. Effects of folic acid and combinations of folic acid and vitamin B12 on plasma homocysteine concentrations in healthy young women. *Ameri J Clini Nutri* 1998; 68: 1104-10.
  21. Na L, Wartenbery M, Nau H. Anticonvulsant valproic acid inhibits cardromyocyte differentiation of embryonic stem cells by increasing intracellular levels of reaction oxygen species. *Birth Defects Res A Clin Mol Terato* 2003; 67(3): 178-80.
  22. Michaelis M, Michaelis U, Fleming I, suban T. Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in viro. *Mol Pharmacol* 2004; 65: 520-521.
  23. Alonso - Aperte E, Ubeda N, Achen M, Prez – Miguelsanz J, Varela Moreiras G. Impaired methionine synthesis and hypomethylation in rats exposed to valproate during gestation. *Neurology* 1999; 52(4): 750-756.