

اثر داروهای ضد صرع فنی توئین و فنوباریتال بر روی شاخص استخوان سازی در استخوان فمور و تیبیا و اثرات آنتی تراوتوژنیک فولیک اسید بر روی کاهش اثرات این داروها

دکتر طاهره طلایی خوزانی^{1*}، منوچهر عدالت جو²، دکتر صفرا بهمن پور³، دکتر الهام علی آبادی⁴

چکیده

مقدمه: مبتلایان به بیماری صرع ناچار به استفاده از دارو برای جلوگیری از عوارض ناشی از آن هستند. بیماری صرع به تنهایی و داروهای آن به عنوان عامل تراوتوژن پیشنهاد شده است، هر چند ابعاد ناهنجاری های ایجاد شده در اثر این داروها هنوز شناخته نشده است لذا هدف از این تحقیق بررسی اثرات دو داروی ضد صرع متداول در ایران بر روی روند استخوان سازی است. اسید فولیک نیز به عنوان عامل آنتی تراوتوژن مورد بررسی مؤلفین زیادی است. در این تحقیق از اسید فولیک جهت کاهش اثرات تراوتوژنیک استفاده شده است.

روش بررسی: این مطالعه از نوع کارآزمایی بالینی (Clinical trial) است که بر روی 81 سر موش ماده حامله از نژاد BALB/c در حدود سه ماه سن انجام شده است، در ابتدا موش ها به 6 گروه تقسیم شدند. به هر یک از گروه های آزمایشی به ترتیب فنی توئین (45 mg/kg)، فنوباریتال (30 mg/kg)، اسید فولیک (30 µg) و فنی توئین و فنوباریتال توأمأ با اسید فولیک و اسید فولیک به تنهایی تجویز گردید. به گروه کنترل آب مقطر تجویز شد. جنین موشها به روش آلسین آبی/الیزارین قرمز رنگ شد و طول کل استخوان فمور و تیبیا، طول بخش استخوانی و شاخص استخوانی آنها اندازه گیری شد. داده ها با کمک تست ANOVA و LSD و Duncan تجزیه و تحلیل آماری شد.

نتایج: شاخص استخوان سازی در گروه دریافت کننده فنوباریتال در فمور، کاهش معنی داری را نشان داد $p < 0.05$. مصرف اسید فولیک شاخص استخوان سازی را بهبود می بخشد به طوری که این شاخص را به سطح گروه کنترل رسانیده بود. هر دو دارو شاخص استخوان سازی را در تیبیا به طور معنی داری کاهش دادند. این داروها استخوان سازی را در تیبیا بیش از فمور تحت تأثیر قرار دادند.

نتیجه گیری: به نظر میرسد که فنی توئین، طول کل فمور و طول بخش استخوانی شده آن را می کاهشد بنابراین بر روی نسبت این دو (شاخص استخوان سازی) اثر ندارد. فنی توئین تنها بر روی طول بخش استخوانی اثر دارد و بر طول کل فمور بی اثر است بنابراین می توانست شاخص استخوانی را تغییر دهد. تفاوت مشاهده شده میان اثر این دو دارو در تیبیا و فمور را می توان به اختلاف در زمان پیدایش و استخوانی شده اندام بالایی و اندام پایینی در جنین نسبت داد.

واژه های کلیدی: صرع، فنوباریتال، فنی توئین، تراوتوژن، اسید فولیک

1- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم تشریحی

تلفن: 0711 2304372، 0711 2304372، نامبر: 0711 2304372، Email: talaeit@sums.ac.ir

دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز

2- کارشناس ارشد علوم تشریحی

3- دانشیار گروه علوم تشریحی

4- استادیار گروه علوم تشریحی

1394، 102- دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی شیراز

تاریخ دریافت: 83/6/6 تاریخ پذیرش: 84/7/7

مقدمه

تراوتولوژی که به بررسی علل ایجاد اختلالات و ناهنجاریهای مادرزادی می پردازد، از حدود 60 سال پیش با مطالعه اثرات چند فاکتور فیزیکی و شیمیایی بر روی تکامل ماهیها، دوزیستان و پرندگان شروع شد. پس از آن نیز با

می شوند. اسید فولیک یکی از ترکیبات آنتی تراوتونیک محسوب می شود که مصرف آن در زمان بارداری برای پیشگیری از ناهنجاریهای لوله عصبی توصیه می شود^(14,15). این احتمال نیز وجود دارد که با مصرف اسید فولیک میزان ناهنجاریهای اسکلتی نیز کاهش یابد. لذا در این تحقیق سعی شده است با استفاده از روش شفاف سازی و رنگ آمیزی توسط آلزارین قرمز/ آلسین آبی به بررسی میزان استخوان سازی در دو استخوان تیبیا و فمور تحت تأثیر داروهای ضد صرع همراه و یا بدون استفاده از اسید فولیک پرداخته شود.

روش بررسی

این تحقیق از نوع کارآزمایی بالینی و از 81 سر موش ماده از نژاد BALB/c به وزن 25-30 گرم که در حدود سه ماه سن داشته اند، استفاده شده است. موشها به مدت یک شب با نر معجور شدند. صبح روز بعد با رؤیت پلاگ واژنی، روز صفر حاملگی مشخص گردید. موشهای حامله تحت شرایط استاندارد (سیکل تاریکی و روشنایی، درجه حرارت و رطوبت) نگهداری شدند. سپس موشهای حامله به 6 گروه تقسیم گردیدند. هر گروه از ساعت 8 تا 10 صبح در روزهای 6 الی 13 حاملگی داروهای ضد صرع فنی توئین (45mg/kg تزریق داخل صفاقی)، فنوباریتال (30mg/kg تزریق داخل صفاقی)⁽⁹⁾ و اسید فولیک (15µg با کمک گاوآژ) تجویز شد. گروه های مورد مطالعه به ترتیب زیر بود:

گروه کنترل (گروه 1) که معادل دارو آب دریافت نمود. گروه فنی توئین (گروه 2)، گروه فنوباریتال (گروه 3)، گروه فنی توئین و اسید فولیک (گروه 4)، گروه فنوباریتال و اسید فولیک (گروه 5) و گروه اسید فولیک (گروه 6) بودند. موشهای حامله در روز 19 حاملگی تحت بیهوشی عمیق منجر به مرگ تشریح شدند و جنین آنها خارج گردید. از هر موش 3 جنین بطور تصادفی انتخاب شد و پس از پوست کندن و خارج نمودن احشاء در الکل 95% فیکس شدند. سپس نمونه ها به روش آلزارین قرمز/ آلسین آبی رنگ شدند⁽¹⁶⁾ در این روش ابتدا جنینها با اتانول 96% فیکس شده و پوست آنها گرفته می شد.

مطالعات دقیق بر روی جنین آنان ادامه یافت. این علم در ابتدا بر روی ناهنجاریهای ظاهری متمرکز بود، اما به مرور زمان مبانی آن به حوزه ژنتیک، بیوشیمی، بیولوژی مولکولی، فیزیولوژی و تولید مثل و اپیدمیولوژی نیز گسترش یافت⁽¹⁾. عوامل ایجاد کننده اختلالات و ناهنجاریهای مادر زادی در جنین را تراوتون می نامند. عواملی نظیر ترکیبات شیمیایی (داروها، هورمونها، مواد مخدر، فلزات سنگین و ...)، عفونتها، هیپرترمی و غیره به عنوان تراوتون محسوب می گردند⁽²⁾.

از جمله ترکیبات شیمیایی تراوتون که تحقیقات زیادی پیرامون آن به عمل آمده است، داروهای ضد صرع می باشند^(۳,۴,۵,۶). صرع یک بیماری مزمن عصبی است که میلیونها نفر در سراسر جهان به آن مبتلا هستند. این افراد مجبور به استفاده از حداقل یکی از داروهای ضد صرع می باشند. بیشترین داروی مورد استفاده توسط این بیماران در ایران فنی توئین و فنوباریتال است که مصرف آن در زمان بارداری عامل ایجاد کننده ناهنجاریهای مادرزادی است⁽⁷⁾. داروهای ضد صرع می توانند بیان ژنی را در جنین موش تغییر دهند⁽⁸⁾ به طوری که تکامل طبیعی جنین را تحت تأثیر قرار می دهد. داروهای ضد صرع ناهنجاریهایی نظیر کام شکری، عقب ماندگی ذهنی و رشدی، هیپوتلورسم، عدم نزول بیضه و غیره ایجاد می کند^(۷,۹). یکی از انواع ناهنجاریهای مادرزادی ایجاد شده تحت تأثیر داروهای ضد صرع ناهنجاریهای اسکلتی است. مخروطی شدن بند انگشتان و هیپوپلازی آن⁽¹⁰⁾، ناهنجاریهای عمده نظیر تأخیر رشد جنینی و هیپوپلازی صورت⁽¹¹⁾، چهره غیرطبیعی، ناهنجاریهای اسکلتی⁽¹²⁾، میکروسفالی⁽⁵⁾، آنومالی استخوان جناغ سینه⁽⁸⁾ و عدم تشکیل کالواریا⁽¹³⁾ از جمله ناهنجاریهایی اسکلتی است که توسط محققین قبلی گزارش شده است.

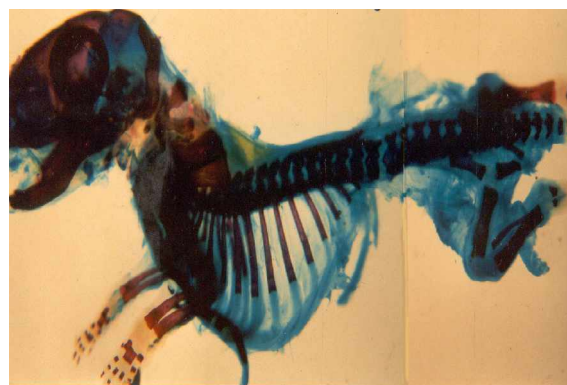
مشخص شده است، که مصرف داروهای ضد صرع عامل ایجاد ناهنجاریهای اسکلتی است اما اثر این داروها بر روی میزان استخوانسازی و بافت استخوانی موضوعی است که تا کنون به آن پرداخته نشده است. از طرف دیگر گروهی از مواد شیمیایی وجود دارند، که به علت مکانیسم عملشان دارای خواص هستند که باعث پیشگیری و یا کاهش رشد ناهنجاریها در جنین

وضعیت سیستم اسکلتی جنین با میکروسکوپ استریو که به یک قطعه چشمی مدرج (میکرومتر) مجهز است بررسی شدند و طول کل تیبا و فمور و بخش استخوانی شده آن اندازه گیری شد و سپس شاخص استخوانی از تقسیم طول بخش استخوانی بر کل طول استخوان به دست آمد*. داده ها با تست ANOVA آنالیز آماری شدند. آنالیز بیشتر با کمک تستهای LSD و Duncan انجام شد.

نتایج

با مقایسه طول استخوانی شده به طول کل استخوان فمور و تیبا (شاخص استخوانی شدن) مشخص شد که مقدار این نسبت در گروه کنترل بیشتر از گروههای تجربی است. اما تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که تنها تفاوت میانگین شاخص استخوان سازی در استخوان فمور بین گروه فنوباریتال با گروه کنترل معنی دار بود ($P < 0.05$). در حالی که در سایر گروههای تجربی این تفاوت معنی دار نبود. همچنین شاخص استخوان سازی در گروه فنوباریتال + اسید فولیک نیز معنی دار بود (منحنی 1، جدول 1).

سپس با کمک استن چربی بافتها زدوده می شد. نمونه ها در محلول آلزارین قرمز S (تهیه شده از شرکت Merck) و آلسین بلو (تهیه شده از شرکت Micromer) به مدت 3 روز و 37 درجه سانتی گراد قرار داده می شدند. سپس به منظور شفاف نمودن نمونه ها در محلول KOH و گلسیرین قرار داده می شدند (شکل 1).



شکل 1: جنین رنگ آمیزی شده با آلزارین قرمز S و آلسین بلو. بخشهایی از استخوان که قرمز رنگ گرفته اند، نشاتگر بخش استخوانی شده و دارای املاح کلسیم است و بخشهایی که آبی رنگ گرفته است نشاتگر بخش غضروفی می باشد.

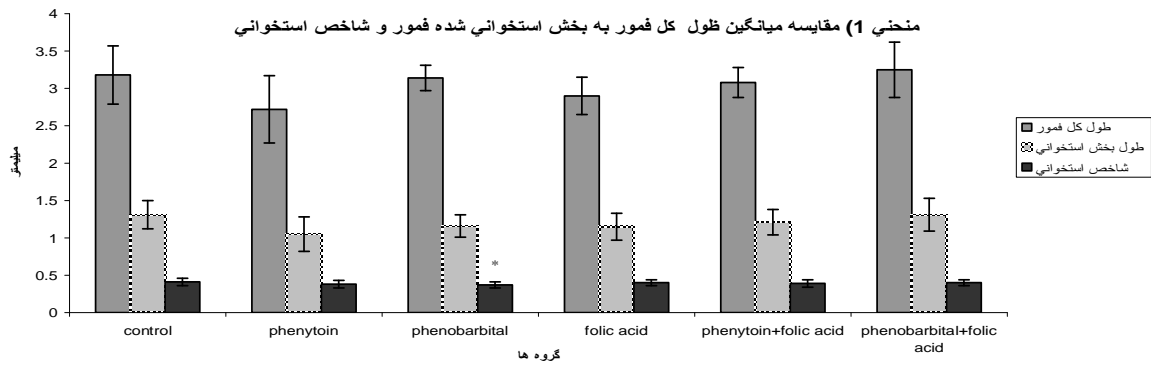
جدول 1: مقایسه میانگین طول بخش استخوانی شده طول کل فمور و نسبت بین آن دو و نیز مقایسه میانگین طول بخش استخوانی شده، طول کل تیبا و نسبت بین آن دو در گروههای مختلف تجربی.

گروه	میانگین طول کل فمور ± انحراف معیار	میانگین طول بخش استخوانی شده فمور ± انحراف معیار	میانگین طول کل تیبا ± انحراف معیار	میانگین شاخص استخوانسازی فمور ± انحراف معیار	میانگین بخش استخوانی شده فمور ± انحراف معیار	میانگین شاخص استخوانسازی در تیبا ± انحراف معیار
کنترل	0/39±3/18	0/19±1/31	0/27±3/35	0/05±0/41	0/27±1/56	0/05±0/46
فنیوتوئین	0/45±2/72	0/23±1/05	0/45±3/15	0/05±0/38	0/1±1/23	* 0/07±0/39
فنوباریتال	0/17±3/14	0/15±1/16	0/17±3/36	*0/04±0/37	0/17±1/32	*0/04±0/39
اسید فولیک	0/25±2/9	0/18±1/15	0/26±3/2	0/04±0/4	0/2±1/48	0/04±0/46
فنیوتوئین+اسید فولیک	0/2±3/08	0/17±1/21	0/21±3/33	0/05±0/39	0/23±1/4	0/05±0/42
فنوباریتال+اسید فولیک	0/37±3/25	0/22±1/31	0/38±3/45	0/04±0/4	0/28±1/54	0/05±0/44

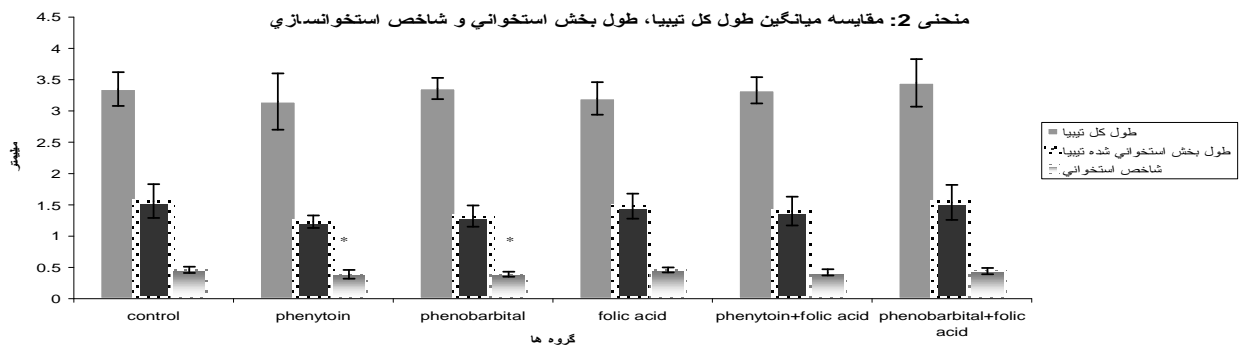
واحد طول بر حسب میلیمتر محاسبه شده است.

شاخص استخوان سازی: تقسیم طول بخش استخوانی شده به طول کل استخوان.

* اختلاف معنی دار با گروه کنترل و گروه دریافت کننده دارو + فولیک اسید ($P < 0.05$).



نمودار 1: مقایسه میانگین طول کل فمور به بخش استخوانی شده فمور و شاخص استخوانی * بین گروه فنوباریتال با گروه کنترل و گروه دریافت کننده فنوباریتال + اسید فولیک اختلاف معنی دار دیده می شود ($P < 0.05$).



نمودار 2: مقایسه میانگین طول کل تیبا، طول بخش استخوانی و شاخص استخوان سازی * بین گروه دریافت کننده فنیوئین و فنوباریتال با گروه کنترل و گروه فنیوئین و فنوباریتال + اسید فولیک اختلاف معنی دار وجود دارد ($p < 0.05$).

تیبا 7% و در استخوان فمور به ترتیب 4% و 3% بود.

بحث

فنوباریتال و فنیوئین با عبور از فضای بین پرزی به سادگی از پرده جفت عبور نموده وارد گردش خون جنین می شوند (17,18). قسمت اعظم این داروها در کل مایعات بدن پخش می شود. از طرفی چون ماتریکس خارج سلولی و اجزای ماتریکس نقش بسیار مهمی در تکامل جنین دارد، ممکن است این داروها با حضور در آن بر روند تکامل جنین تأثیر گذاشته و القاء سلول، مهاجرت، تکثیر، تمایز و مرگ برنامه ریزی شده را تغییر دهد. داده های این مطالعه نشان داد که طول بخش استخوانی شده فمور و تیبا در جنین پس از تجویز فنیوئین و فنوباریتال کاهش یافت. برخی تحقیقات ارتباط این دو دارو را با کاهش چگالی مواد معدنی در استخوان بالغین نشان

تفاوت شاخص استخوان سازی در استخوان تیبا با فمور متفاوت بود. به طوری که تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که شاخص استخوان سازی در گروه کنترل و اسید فولیک با هم مساوی هستند. این شاخص در گروه دریافت کننده فنیوئین و فنوباریتال از همه گروه های دیگر کمتر بود. گروه کنترل و گروه دریافت کننده اسید فولیک نسبت به گروه فنیوئین، فنوباریتال و فنیوئین + اسید فولیک معنی دار بود $p < 0.05$. شاخص استخوان سازی تیبا در گروه فنوباریتال + اسید فولیک مانند فمور بود و این اختلاف با $p < 0.05$ معنی دار بود (منحنی 2، جدول 1). با مقایسه میزان استخوان سازی در استخوان تیبا نسبت به استخوان فمور، نشان داده شد که شاخص استخوان سازی در تیبا در تمام گروه ها از فمور بیشتر بود. به طوری که کاهش درصد استخوانی شدن در گروه دریافت کننده فنوباریتال و فنیوئین نسبت به گروه کنترل در استخوان

نتایج حاصله از فمور و تیبا باشد.

کاهش میانگین طول استخوانهای فمور و تیبای موشهایی که در زمان جنینی فنوباریتال و فنیوتوئین دریافت نموده بودند، را می توان به نقش این دو دارو در متابولیسم کلسیم و ویتامین D و فسفاتاز قلیایی نسبت داد (20,23,24,25,26). ویتامین D در جذب کلسیم و دفع فسفات نقش دارد و کمبود آن منجر به کاهش رسوب املاح کلسیم در حین استخوان سازی خواهد شد.

نتایج این تحقیق نشان داد که میانگین استخوان سازی در هر دوی فمور و تیبا با اضافه شدن فولیک اسید به رژیم غذایی موشهایی که فنوباریتال دریافت نموده بودند، به نحو چشمگیری افزایش نشان داد، در حالی که تجویز اسید فولیک همراه با فنیوتوئین استخوان سازی را تغییر نداد. مشخص شده است که این داروها با خاصیت آنتی فولاتی که دارند می توانند ناهنجاری هایی نظیر اگزانسفالی، اسپینایفیدا و شکاف کام را ایجاد کنند (27). همانطور که نتایج این تحقیق نیز نشان داد مصرف فولیک اسید باعث بهبود وضعیت استخوان سازی می شود. لذا ممکن است که تأثیر این دارو از طریق اثرات آنتی فولات آنها نیز باشد.

نتیجه گیری: می توان عنوان نمود که فنوباریتال باعث کاهش شاخص استخوان سازی می شود و فنیوتوئین طول بخش استخوانی را کاهش می دهد اما به دلیل کاستن از طول فمور بر روی شاخص استخوانی اثر ندارد. مصرف اسیدفولیک در هر دو گروه شاخص استخوان سازی را می افزاید.

سپاسگزاری

مؤلفین این مقاله بر خود لازم می دانند که از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز جهت تامین بودجه این طرح و از خانم پیرسلامی و پرسنل خانه حیوانات تشکر نمایند.

References:

1. Klipstein FA. *Subnormal serum folate and macrocytosis associated with anticonvulsant drug therapy*. Blood. 1964; 23: 68-83.
2. Sadler TW. Langman's medical embryology. 9th edition, Lippincott Williams & Wilkins,

می دهند (19,20). همچنین این که آیا مصرف داروهای ضد صرع با استوئونی و استوئوپورز ارتباط دارد نیز مورد بحث است (19). با وجودی که این تحقیقات بر روی بالغین انجام شده است اما با توجه به نتایج این تحقیق می توان عنوان نمود که داروهای ضدصرع در جنین نیز میزان بافت معدنی را می کاهش دهد. هر چند تحقیقات دیگری نیز بر روی انسان بالغ انجام شده است که نتایج عکس را در بر داشت و نشان می دادند که بافت استخوانی افرادی که به طور مزمن از داروهای ضد صرع استفاده نموده بودند، نرمال بود (21). اختلاف مشاهده شده در این تحقیقات ممکن است مربوط به طول مدت درمان باشد. Ahn و Chang (1994) با بررسی تأثیر داروهای فنیوتوئین و فنوباریتال دریافتند که مدت زمان تجویز دارو در تأثیر آن بر روی چگالی مواد معدنی اهمیت دارد به طوری که تنها در کودکان که برای مدت طولانی دارو دریافت نموده بودند چگالی مواد معدنی در استخوان بطور معنی داری تغییر نموده بود (22).

همچنین آنها نشان دادند که فنوباریتال تنها چگالی مواد معدنی را تنها در دنده ها و مهره ها به طور معنی داری کم می کرد اما فنی توئین در همه استخوانها باعث کاهش مواد معدنی می شد (22). تحقیق حاضر نیز نشان داد که تأثیر این دو دارو در جنین نیز مشابه است به طوری که فنوباریتال تنها شاخص استخوان سازی را در فمور کم می نمود اما فنیوتوئین این شاخص را در هر دوی فمور و تیبا تحت تأثیر قرار می داد. تفاوتی مشاهده شده بین میزان استخوان سازی در گروههای مختلف در فمور و تیبا را می توان به تفاوت رشد و زمان تمایز سلولها در بافتهای مختلف نسبت داد. در اینجا استخوان تیبا سریعتر از فمور استخوانی می شود و استخوان سازی را زودتر آغاز می کند. لذا در اینجا فاکتور زمان و سرعت می تواند توجیه کننده تفاوت بین

2004; NY, 149, 154.

3. Delgado-Escueta AV, Jans D. *Pregnancy and teratogenesis in the epilepsy*. Neurology. 1992; 42(supplement5): 7.

4. Gally E, Granstrom ML, Hiilesmaa V, Bardy

- A. *Minor anomalies in offspring of epileptic mothers*. J pediatric. 1988; 112: 520-529.
5. Holmes LB, Harvey EA, Brown KS, Hayes AM, Khoshbin S. *Anticonvulsant teratogenesis: I. A study design for newborn infants*. Teratology. 1994; 49: 202-207.
 6. Loughnan PM, Gold H, Vance JC. *Phenytoin teratogenicity in man*. Lancet. 1973; 1: 70-72.
 7. Hanson JW, Smith DW. *The fetal hydantoin syndrome*. J Pediatric. 1975; 87(2): 285-290.
 8. Rengasamy P, Padmanabhan RR. *Experimental studies on cervical and lumbar ribs in mouse embryos*. Congenit Anom (Kyoto). 2004; 44(3):156-71.
 9. Sullivan FM, Melhatton PR. *A comparison of the teratogenic activity of the antiepileptic drugs carbamazepine, clonazepam, Ethosuximide, Phenobarbital, phenytoin and primidone in mice*. Toxicol Appl Pharmacol. 1977; 40: 365-378
 10. Bokhari A, Connolly S, Coull BA, Harvey EA, Holmes LB. *Effects on toes from prenatal exposure to anticonvulsant drugs*. Teratology. 2002; 66(3): 122-6.
 11. Holmes LB, Harvey EA, Coull BA, Huntington KB, Khoshbin S, Hayes AM, et al. *The teratology of anticonvulsant drugs*. N Engl J Med. 2001; 344(15): 1132-8.
 12. Mallow DW, Herrick, MK, Gathman G. *Fetal exposure to anticonvulsant drugs*. Arch Pathol Lab Med. 1980; 104: 215-18.
 13. Schardein JL, Dresner AJ, Hentz DL, Petrere A, Fitzgerald JE. *The modifying effect in folic acid and the diphenylhydantoin induced teratogenicity in mice*. Toxicol Appl Pharmacol. 1973; 24: 150-158.
 14. Kondo A, Kimura K, Isobe Y, Kamihira O, Matsuura O, Gotoh M, et al. *Folic acid reduces risks of having fetus affected with neural tube defects: dietary folate and plasma folate concentration*. Nioopn Hinyokikai Gakkai Zasshi. 2003; 94(5): 551-9.
 15. Reynold JEF. Editor Martindale. *The extrapharmacopia. 31st edition, Royal pharmaceutical Society*. 1996; 335-366.
 16. Mcleod MJ. *Differential staining of cartilage and bone in whole mouse fetuses by alcian blue and alizarin red S*. Teratology. 1950; 22: 299-301.
 17. Ishizaki T, Yokochi K, Chiba K, Tabuchi T, Wagatsuma T. *Placental transfer of anticonvulsants (phenobarbital, phenytoin, valproic acid) and the elimination from neonates*. Pediatr Pharmacol (New York). 1981; 1(4): 291-303.
 18. Mirkin BL, *Diphenylhydantoin: Placental transport, fetal localization, neonatal metabolism and possible teratogenic effects*. J Pediatr. 1971; 78: 329-337.
 19. Pack AM, Morrell Mj. *Epilepsy and bone health in adults*. *Epilepsy Behav*. 2004;5 Suppl 2:S24-9.
 20. Farhat G, Yamout B, Mikati MA, Demirjian S, Sawaya R, El-Hajj Fuleihan G. *Effect of antiepileptic drugs on bone density in ambulatory patients*. Neurology. 2002; 14;58(9):1348-53.
 21. Filardi S, Guerreiro CA, Magna LA, Marques Neto JF. *Bone mineral density, vitamin D and anticonvulsant therapy*. Arq Neuropsiquiatr. 2000;58(3A):616-20.
 22. Chung S, Ahn C. *Effects of anti-epileptic drug therapy on bone mineral density in ambulatory epileptic children*. Brain Dev. 1994 Sep-Oct;16(5):382-5.
 23. Schmitt BP, Nordlund DJ, Rodgers LA. *Prevalence of hypocalcemia and elevated serum alkaline phosphatase in patients receiving chronic anticonvulsant therapy*. J Fam Pract. 1984;18(6):873-7.
 24. Marchesoni C, De Marco P, Ronconi GF, Miottello PG. *Anomalies of phospho-calcium*

- metabolism during antiepileptic treatment.* *Pediatr Med Chir.* 1983 ;5(6):571-3.
25. Lindout D. *Pharmacogenetic and drug interaction: role in antiepileptic drug induced teratogenesis.* *Neurology.* 42 (suppl 5): 43-47.
26. Voudris K, Moustaki M, Zeis PM, Dimou S Vagiakou E, Tsagris B, et al. *Alkaline phosphatase and its isoenzyme activity for the evaluation of bone metabolism in children receiving anticonvulsant monotherapy.* *Seizure.* 2002;11(6):377-80.
27. Moor KL. *The developing human: Clinically oriented embryology.* 6th edition; Philadelphia: WB Sadler Company: 1998: 164-169.