

Valproic Acid-induced Skeletal Defects and Spina Bifida in Rat Fetuses

Nikravesht M.R., Ph.D.*; Jalali M., Ph.D.

** Anatomy Department, Medical Faculty, Mashhad Medical Sciences university, Mashhad , Iran*

Abstract

Purpose: Among antiepileptic drugs, valproic acid (VA) is a well known teratogenic agent. We previously reported that maternal administration of VA during critical periods of rat pregnancy can produce very rare CNS defect, syringomyelia. The purpose of the present study was whether VA can affect other organs, based on this finding, we studied the teratogenic effects of it on rat developing skeletal system.

Materials and Methods: Based on this experimental study 3 experimental groups of pregnant wistar rats were received single dose of 800 mg/kg VA on gestational days 9 -11 respectively. 3 Control groups were received the same volume of physiological serum at the same periods. On day 18th of gestation all pregnant rats were anesthetized and their fetuses were examined and, histochemical study around their vertebral region were carried out.

Results: Our finding indicated different kinds of malformations in experimental groups which was consist of growth retardation, embryonic absorption as well as skeletal system defect by special regard in vertebral column. These data revealed that the rate of spina bifida and vertebral abnormal flexions in experimental group 1 increased significantly in comparison experimental groups 2 and 3.

Conclusion: These findings suggest that, day 9th of rat pregnancy is critical period for vertebral column development and during this period of time VA or its metabolites may be interfere with developmental phenomena which can produce vertebral defects such as spina bifida.

Key words: Valproic acid, Malformation, Skeletal defects, Spina bifida, Rat

تأثیر اسید والپروئیک در پیدایش نقایص سیستم اسکلتی و اسپینا بیفیدا در جنین رت

محمد رضا نیکروش،* Ph.D، مهدی جلالی* Ph.D

* گروه آناتومی دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ وصول: اردیبهشت ماه ۸۶، تاریخ پذیرش: تیرماه ۸۶

چکیده

هدف: با فرض بر این که تجویز اسید والپروئیک (والپرات سدیم) به عنوان داروی ضد صرع ممکن است بر تکامل سایر ارگان‌ها نیز تأثیر بگذارد در این مطالعه سعی شد تا آثار تراژونیک آن بر تکامل سیستم اسکلتی بررسی شود.

مواد و روشها: این بررسی یک تحقیق تجربی است. در این مطالعه از سه گروه تجربی و سه گروه کنترل رت بارداری نژاد ویستار استفاده شد. گروههای تجربی به ترتیب در یکی از روزهای ۹، ۱۰ و ۱۱ بارداری مورد تجویز ۸۰۰ mg/kg اسید والپروئیک قرار گرفتند و مشابه این عمل در گروههای کنترل با سرم فیزیولوژی انجام پذیرفت. برای بررسی ناهنجاریهای یاد شده در روز ۱۸ بارداری، همه رتها تحت بیهوشی سزارین شده و جنینهای آنان معاینه شدند. علاوه بر این، به منظور بررسی میکروسکوپی ناحیه ستون مهره ها اقدام به آماده سازی بافتی شده و مورد رنگ آمیزی قرار گرفت.

یافته‌ها: نتایج مربوط به این مطالعه نشان داد که ناهنجاریهای مختلفی در گروههای تجربی دیده می شود که از آن جمله می توان به تاخیر رشد، جذبه‌های جنینی و نقایص سیستم اسکلتی خصوصا در ناحیه ستون مهره ها اشاره نمود. این یافته ها بیانگر این موضوع است که میزان اسپینا بیفیدا و خمیدگی های غیر طبیعی ستون مهره ها در گروه تجربی ۱ در مقایسه با گروههای تجربی ۲ و ۳ به شکل معنی داری افزایش یافته است.

نتیجه گیری: چنین به نظر می رسد روز نهم بارداری رت زمان بحرانی تکامل ستون مهره ها محسوب می شود و در این مرحله اسید والپروئیک یا متابولیت‌های آن احتمالا به گونه ای بر روند تکامل تأثیر می گذارد که به نقایص اسکلتی و از جمله اسپینا بیفیدا منجر می شود.

کلید واژه‌ها: اسید والپروئیک، ناهنجاری، نقایص اسکلتی، اسپینا بیفیدا، رت

مقدمه

جدی دقت نظر داشت. مطالعات قبلی نشان داده است که این دارو در اوایل دوران بارداری می تواند با گذشتن از سد شواهد جفتی وارد گردش خون جنین شود و بسته به مقدار تجویز و زمان تأثیر گذاری آن، آثار نامطلوبی بر شکل گیری ساختمانهای جنینی بر جای گذارد [۱-۳]. در این رابطه

تجربه نشان داده است که در استفاده از اسید والپروئیک به عنوان یک داروی ضد صرع در دوران بارداری باید به طور

مدرس مکاتبه: مشهد، بلوار وکیل آباد، مقابل پارک ملت، دانشکده پزشکی، گروه آناتومی
E-mail: Nikravesht@hotmail.com

انتخابی می‌تواند ناحیه خاصی از سیستم اسکلتی مثل تکامل ستون مهره‌ها را تحت تاثیر قرار دهد و اگر چنین است نقایص یاد شده بیشتر به کدامیک از روزهای این محدوده زمانی خاص مربوط می‌شود.

مواد و روشها

برای این منظور از ۳۶ رت باکره نژاد ویستار استفاده شد که پس از آمیزش و تعیین روز صفر بارداری به طور مساوی به ۳ گروه تجربی و ۳ گروه کنترل تقسیم شدند و تحت شرایط استاندارد خانه حیوانات (آب و غذای کافی و نور و حرارت مناسب) مراقبت شدند. نمونه‌های مربوط به هریک از گروههای تجربی به ترتیب در ساعت ۸ صبح یکی از روزهای ۹، ۱۰ و ۱۱ بارداری مورد تجویز ۸۰۰ mg/kg اسید والپروئیک (ساخت شرکت داروسازی Labaz فرانسه) قرار گرفتند که با استفاده از Animal feeding صورت گرفت [۱۰] و مشابه این تجویز در گروههای کنترل با استفاده از سرم فیزیولوژی انجام پذیرفت. سپس با هدف بررسی ناهنجاریهای پدید آمده در روز ۱۸ بارداری، همه رتهای باردار در گروههای تجربی و کنترل تحت بیهوشی عمیق سزارین شده و پس از شکافتن شاخه‌های رحم، جنینهای متعلق به هر مادر با ترازوی دیجیتال به سرعت توزین شده و برای معاینات بعدی به شیشه‌های محتوی فیکساتور (فرمالین ۱۰ درصد) منتقل شدند. علاوه بر این، جنینهای مرده و بقایای جنینی در حال جذب در هر یک از موارد مورد شمارش و ثبت قرار گرفت. پس از مرحله تثبیت، جنینهای ناهنجار متعلق به هر یک از مادران از جنینهای با ظاهر سالم جدا شده و بر اساس نوع ناهنجاریهای مشاهده شده، نقایص پدید آمده مورد دسته بندی قرار گرفت. در مرحله بعد، از جنینهایی که دارای ناهنجاریهای ستون مهره ای تشخیص داده شده بودند اقدام به آماده سازی بافتی و تهیه بلوکهای پارافینی شد. سپس از این نمونه‌ها برشهای

بالینی موجود باز گو کننده این واقعیت است که هرگاه مادران باردار در اوایل دوران بارداری در معرض دریافت این دارو قرار گرفته اند در فرزندان آنان آثاری از نقایص تکاملی مختلف از جمله نقص در سیستم اسکلتی، سیستم عصبی مرکزی، دستگاه قلبی عروقی و دستگاه ادراری تناسلی وجود داشته است [۶-۴]. از سوی دیگر اگرچه در رابطه با تاثیر گذاری این دارو در ارتباط با بروز نقایص جنینی شواهد انکار ناپذیری وجود دارد اما هنوز برخی از جنبه‌های تاثیر گذاری آن ناشناخته مانده است [۷ و ۸]. در این رابطه می‌توان به تاثیر آن بر تکامل لوله عصبی و بروز نقایصی از جمله اسپینا بیفیدا و منگوسل اشاره کرد. پژوهش قبلی در این زمینه نشان داد که تجویز ۶۰۰ mg/kg اسید والپروئیک در دو نوبت و به فاصله ۱۲ ساعت در روز ۹ بارداری رت می‌تواند به پیدایش نقص نادر سیستم عصبی تحت عنوان Syringomyelia منجر شده و به از دست رفتن بخشهای وسیعی از ماده سفید و خاکستری نخاع منتهی شود [۹]. علاوه بر این در پژوهش جداگانه ای مشخص شد که تجویز یک نوبت اسید والپروئیک به مقدار ۸۰۰ mg/kg در روز دهم بارداری رت می‌تواند میزان ناهنجاریهای تکاملی سر و صورت را به شکل معنی داری افزایش دهد [۱۰].

به اعتبار این مطالعات و سایر مطالعات انجام شده می‌توان چنین نتیجه گیری نمود که تجویز این دارو در مقاطع زمانی خاصی از بارداری ممکن است بروز ناهنجاریهای متفاوتی را در پی داشته باشد که بروز ناهنجاریهای سیستم عصبی [۶]، نقایص سیستم اسکلتی [۲] و ناهنجاریهای قلبی عروقی از آن جمله است [۱۱]. بنابراین با توجه به اینکه دوره بحرانی ارگانوژنز در جنین رت بین روزهای ۹ تا ۱۱ بارداری [معادل هفته‌های سوم و چهارم زندگی جنینی انسان] قلمداد شده است [۱۲]، در این پژوهش سعی شده تا مشخص شود که آیا تجویز اسید والپروئیک بر مبنای آنچه که گفته شد، به صورت

اسکلتی بیشتر به صورت نقایص ستون مهره ای (شکل ۲) و عدم تشکیل قوس خلفی مهره ها (اسپینابیفیدا) در ناحیه پشت بود که به طور عمده در بین جنینهای مربوط به گروه تجربی ۱ مورد مشاهده قرار گرفت (شکل ۱). تکامل غیر طبیعی اندامهای حرکتی نیز با دامنه ای متفاوت در گروههای تجربی ۲ و ۳، نمونه های دیگری از ناهنجاری بود که در جنینهای متعلق به این گروهها مشاهده شد. ناهنجاریهای سر و صورت که بخشی از نقایص جنینی مربوط به جنینهای گروه تجربی ۲ را به خود اختصاص داده بود، به صورت میکروفتالمیا، عدم تقارن صورت و هیپوپلازی ماندیبول مشاهده شد. علاوه بر این، تاخیر رشد معنی داری نیز در گروههای تجربی نسبت به کنترل وجود داشت (نتایج جدول ۱) که نمونه ای از آن در شکل ۳ نیز نشان داده شده است.

میکروسکوپی با ضخامت ۱۰ میکرون در جهت افقی تهیه شده و با استفاده از همتاکسیلین و اتوزین مورد رنگ آمیزی قرار گرفت تا در مطالعه میکروسکوپی هر گونه تغییر احتمالی در شکل گیری عناصر تشکیل دهنده ناحیه مهره ها بهتر مشخص شود. سپس نتایج مربوط به وزن جنینها و نقایص تکاملی ثبت شده گروههای مختلف با استفاده از ANOVA مورد آنالیز آماری قرار گرفت و از برشهای مربوط به نمونه های ناهنجار نیز پس از مطالعه میکروسکوپی، عکسبرداری شد.

یافته‌ها

نقایص پدید آمده در گروههای تجربی سه گانه دارای تنوع و تغییر در تعداد این ناهنجاریها و بسته به روز تجویز دارو تفاوت نشان داد (جدولهای ۱ و ۲). در این میان ناهنجاریهای

جدول ۱. نتایج جنینی حاصل از هریک از گروههای تجربی و کنترل (SEM $\pm$)

گروه	جنینهای هر گروه	جنینهای ناهنجار	تعداد جذبه‌های جنینی اولیه	تعداد مرگهای داخل رحمی	میانگین وزن جنینی به گرم
تجربی ۱	۳۸ $\pm$ ۲/۱	۱۱ $\pm$ ۳/۱/۵	۹ $\pm$ ۱/۷/۳	۷ $\pm$ ۱/۳/۴	۰/۸۷ $\pm$ ۰/۱۴
کنترل ۱	۶۵ $\pm$ ۱/۸	-	-	-	۱/۰۹ $\pm$ ۰/۰۵۷
تجربی ۲	۴۹ $\pm$ ۱/۶	۱۰ $\pm$ ۲/۰/۴	۵ $\pm$ ۸/۶	۴ $\pm$ ۶/۸	۰/۹۲ $\pm$ ۰/۰۸
کنترل ۲	۶۳ $\pm$ ۱	-	-	-	۱/۱۲ $\pm$ ۰/۱۴
تجربی ۳	۵۳ $\pm$ ۱	۵ $\pm$ ۹/۴	۲ $\pm$ ۳/۴	۳ $\pm$ ۵/۱	۰/۹۷ $\pm$ ۰/۱۱
کنترل ۳	۶۸ $\pm$ ۱/۵	-	-	-	۱/۱۴ $\pm$ ۰/۴۲

* مقایسه میانگین تعداد جنینهای هر یک از گروههای تجربی، نسبت به گروههای کنترل مشابه و همچنین نسبت به همدیگر معنی دار بود ($p < 0.0001$).
 ** نسبت جنینهای ناهنجار در گروه تجربی ۱ نسبت به تجربی ۲ دارای اختلاف معنی داری نیست در حالی که نسبت این گروهها در مقایسه با گروه تجربی ۳ معنی دار است ($p < 0.005$).
 *** درصد جذبه‌های جنینی و مرگ های داخل رحمی نسبت به میانگین کل جنینهای هر گروه (اعم از زنده، جذبی و مرده) محاسبه شده است.
 **** مقایسه میانگین وزن جنینهای تجربی نسبت به همدیگر معنی دار نبود در حالی که این نسبت در هر یک از گروههای تجربی نسبت به کنترل مشابه معنی دار بود ($p < 0.05$).



شکل ۲. تصویر سمت راست نمای طرفی یک جنین ۱۸ روزه از گروه کنترل و سمت چپ مربوط به یک جنین مشابه از گروه تجربی ۱ را نشان می دهد.

همان گونه که در تصویر به چشم می خورد خمیدگی ستون مهره ها در نمونه تجربی بیش از حد انتظار است و آن را به صورت C شکل در آورده است. بزرگنمایی: $\times 100$



شکل ۳. مقایسه رشد یک جنین ۱۸ روزه از گروه کنترل (تصویر سمت

راست) و یک جنین از گروه تجربی ۱ (تصویر سمت چپ). تاخیر رشد قابل ملاحظه ای در جنین تجربی مشاهده می شود. اختلاف میانگین وزن در جدول ۱ قید شده است. بزرگنمایی: $\times 100$

بحث

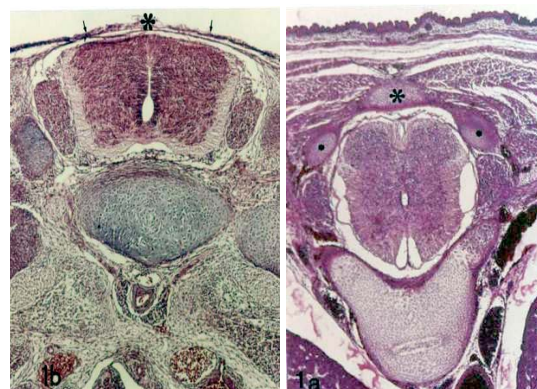
در بررسی تکامل طبیعی نخاع مشخص شده است که تشکیل لوله عصبی و تمایز آن به مغز و نخاع، یکی از موارد بسیار پیچیده دوران تکامل جنینی است. تحقیقات مختلف نشان داده است که در جریان این فرایند ها، القای لوله عصبی و روند تمایزات آن توسط بافت های مجاور انجام می پذیرد [۱۵-۱۳] و

جدول ۲. نوع و درصد ناهنجاری های اسکلتی ایجاد شده نسبت به تعداد جنین های ناهنجر هر یک از گروه های تجربی و کنترل

گروه	نقص اندام حرکتی	ناهنجاری ستون مهره ها
تجربی ۱	۳ (۲۷/۲۸٪)	۶ (۵۴/۴۷٪)
کنترل ۱	-	-
تجربی ۲	۱ (۹/۰۹٪)	۲ (۱۸/۱۸٪)
کنترل ۲	-	-
تجربی ۳	۴ (۶۶/۶۶٪)	-
کنترل ۳	-	-

- نسبت ناهنجاری های ستون مهره ها در گروه تجربی ۱ افزایش معنی داری یافته است ($p < 0.05$).

- نسبت نقایص اندام های حرکتی در گروه تجربی ۳ افزایشی معنی داری یافته است ($p < 0.005$).



شکل ۱. سمت راست (تصویر 1a) مقطع عرضی از ناحیه پشتی یک جنین گروه کنترل و اجزای تشکیل دهنده مهره را در اطراف نخاع نشان می دهد

در این تصویر زوایا عرضی با ستاره های کوچک و زایده شوکی با ستاره بزرگتر و لامینا های مهره در بین آنها مشخص است و قوس مهره کامل شده است.

سمت چپ (تصویر 1b) متعلق به یک جنین تجربی گروه ۱ مبتلی به اسپینا بیفیدا است که زایده شوکی و لامینا های مهره تشکیل نگردیده و ماده عصبی نخاع فقط به وسیله لایه نازکی از پوست (ستاره و پیکان های نشانه) پوشیده شده است. رنگ آمیزی: همتوکسیلین اتوزین و بزرگنمایی: $\times 100$.

و نخاع منجر می‌شود و نقایصی از قبیل آنچه که گفته شد در سیستم عصبی مرکزی بروز می‌نماید. در این رابطه گزارش شده است که ناهنجاریهای لوله عصبی در نوزادانی که مادران آنها در اوایل بارداری اسید والپروئیک دریافت نموده اند نسبت به افراد معمولی ۲۰ برابر بیشتر است [۳۱]. اثرهای تجویز اسید والپروئیک به عنوان یک تراژون مؤثر بر حیوانات نیز چه به صورت *In vivo* و چه به شکل *In vitro* نیز در ارتباط با پیدایش نقایص سیستم عصبی به اثبات رسیده است [۳۲-۳۴]. علاوه بر این مشخص شده است که این دارو می‌تواند به نقایصی از قبیل میکروسفالی و باز ماندن لوله عصبی در ناحیه سر یا در طول کانال نخاعی منجر شود [۳۵-۳۷].

گزارشهای بالینی در انسان نیز بروز چنین نقایصی را تایید می‌کند [۳۸-۴۰]. بنابراین با توجه به زمان بحرانی ارگانوژنز در جنین رت، هدف از این پژوهش پاسخ به این سؤال است که در کدامیک از روزهای یاد شده تاثیر این دارو ممکن است به ایجاد نقایص تکاملی لوله عصبی در ناحیه نخاع یا سیستم اسکلتی مجاور با آن منجر شده و پیدایش اسپینا بیفیدا را به دنبال داشته باشد. با توجه به اینکه سطح سرمی اسید والپروئیک با گذشت حدود ۳۰ دقیقه پس از تجویز به بالاترین حد رسیده و حدود ۳ ساعت ثابت می‌ماند [۴۱]، طبیعی به نظر می‌رسد که تاثیر این دارو در هر یک از روزهای یاد شده و حتی در برهه زمانی خاص متعلق به هر روز بتواند در ارتباط با ناهنجاری زایی آثار متفاوت و متغیری بر جای گذارد. از سوی دیگر باید در نظر داشت که بروز بعضی از ناهنجاریها از قبیل نقایص ستون مهره ها در ارتباط با تجویز اسید والپروئیک، نقایص وابسته به دوز محسوب می‌شود [۲] و [۴۲].

نتایج حاصل از این مطالعه نیز بیانگر این موضوع است که بروز تکامل غیر طبیعی ارگانهای مختلف که تحت تاثیر اسید والپروئیک به وقوع می‌پیوندد، در هر یک از روزهای یاد شده

خود نیز متقابلاً بر این بافتها آثار تکاملی مؤثر و تعیین کننده‌ای دارد [۱۶ و ۱۷]. از جمله این بافتها می‌توان از مزانشیم تشکیل دهنده اسکروتوم و زایده نوتوکورد نام برد که هریک از آنان طی مراحل اولیه دوران جنینی (Embryonic period) با لوله عصبی در حال تکامل میان کنشهای متفاوتی دارند [۲۰-۱۸].

با وجود همه پژوهشهای انجام شده، در رابطه با شکل گیری و مورفوزن لوله عصبی هنوز دامنه مطالعات در این زمینه اندک است و بسیاری از پرسشها در ارتباط با تکامل غیر طبیعی لوله عصبی و بسته نشدن بخشهایی از آن که به اسپینا بیفیدا منجر می‌شود بی پاسخ مانده است. در عین حال بعضی از محققین کوشیده اند تا با استفاده از بعضی از پستانداران کوچک موتاسیون یافته از قبیل موش Loop-tail (که ناهنجاری های شدیدی را در تکامل نخاع از خود نشان می‌دهد) روند تکامل طبیعی و غیر طبیعی لوله عصبی را مقایسه نمایند [۲۱]. با تعمیم چنین یافته هایی به اثر گذاری بعضی از تراژون ها بر تکامل لوله عصبی، شاید بتوان تا حدودی مکانیسم اثر گذاری ترکیباتی از قبیل اسید والپروئیک را که ژنوم موجود زنده در حال شکل گیری را تهدید می‌کنند و مورفوزن لوله عصبی را به مخاطره می‌اندازند مورد بحث و تفسیر قرار داد [۱۵]. در این رابطه مواد شیمیایی مختلف و بسیاری از داروها از این قاعده مستثنی نیستند. از میان این ترکیبات به اثرات ناهنجاری زایی اسید والپروئیک اشاره گردیده و بر اساس گزارشات موجود اثرات تراژونیک آن در انسان نیز به اثبات رسیده است [۲۴-۲۲]. گزارشهای بالینی بر این موضوع دلالت دارد که تجویز این دارو در اوایل بارداری می‌تواند به ایجاد نقایص اسکلتی، تکامل غیر طبیعی لوله عصبی و در نتیجه بروز اسپینا بیفیدا منجر شود [۳۰-۲۵]. در چنین شرایطی بسته نشدن لوله عصبی در بخش میانی یا نواحی نوروپور قدامی یا خلفی به بروز پدیده های تکامل غیر طبیعی در مغز

[۹ تا ۱۱] بارداری رت تفاوت پیدا می‌کند. در این رابطه مشخص شد که بخش عمده ای (۳۱/۵ درصد) از ناهنجاریها، متعلق به روز نهم بارداری است که در این مرحله در صد قابل ملاحظه ای (۵۴/۴ درصد) از این تعداد را، ناهنجاریهای ستون مهره ها تشکیل می‌دهد. بر اساس این یافته ها تعداد جذبه‌های جنینی و مرگهای داخل رحمی نیز نسبت به سایر گروهها افزایش نشان می‌دهد. بنابراین چنین به نظر می‌رسد که تاثیر این دارو در روز نهم بارداری علاوه بر ایجاد ناهنجاری نقایص مهره ای و اسپینا بیفیدا، در سطح گسترده ای به مرگ جنینی نیز منجر می‌شود. بر اساس این یافته ها اگر چه از آثار امبریوتوکسیک این دارو در روز دهم نیز کاسته نشده است اما در مقایسه با سایر روزها به نظر می‌رسد که نقایص سر و صورت بالاترین رتبه (۶۳/۶ درصد) و پس از آن به ترتیب نقایص ستون مهره ها (۱۸ درصد) و نقایص اندامهای حرکتی (۹ درصد) در رتبه های بعدی اهمیت قرار گرفته اند. در روز یازدهم نیز اگرچه به شکل قابل ملاحظه ای از دامنه ناهنجاریها کاسته شده است اما هنوز شواهدی از نقایص پدید آمده به چشم می‌خورد که بیشتر به تمایز نهایی اندامهای حرکتی محدود می‌شود. مقایسه تعداد جنینها نیز بر این موضوع دلالت دارد که اختلاف در تعداد آنها در هر یک از این روزها نسبت به گروههای کنترل و نیز در گروههای تجربی نسبت به همدیگر معنی دار به نظر می‌رسند. این موضوع ثابت می‌کند که علاوه بر اینکه اسید والپروئیک از راه تاثیر گذاری بر مراحل رشد و تکامل جنینی مانع از ارگانوژنز طبیعی می‌شود، با اختلال در روند تمایز، فرایند تکثیر سلولی را نیز در بافتهای جنینی با مشکل مواجه می‌نماید که کاهش وزن معنی دار جنینهای تجربی نسبت به کنترل دلیل دیگری بر این موضوع محسوب می‌شود. به هر حال پیدایش ناهنجاریهای متفاوت در روزهای ۹ تا ۱۱ بارداری رت نشان داد که نقایص تکاملی گوناگونی طی این برهه از زندگی

جنینی بروز می‌نماید که میزان آن بسته به روز تجویز دارو تغییر می‌کند. در عین حال آنچه که به عنوان هدف اصلی در این مطالعه مد نظر قرار گرفت، پیدایش و میزان ناهنجاریهای لوله عصبی و نقایص تکاملی ستون مهره ها بود که به تشکیل اسپینا بیفیدا منجر می‌شود. در گزارشهای مربوط به چگونگی شکل گیری نخاع از سوی بسیاری از محققین به این موضوع اشاره شده است که چگونه در اوایل دوران مورفوژنز و تشکیل لوله عصبی، نوتوکورد در تماس نزدیک با نوروایی تلوم عمل می‌کند [۱۹، ۴۳ و ۴۴]. در پژوهشهای قبلی که در زمینه تکامل طبیعی لوله عصبی و نقش میانکنش های مربوط به این جنبه از تکامل جنینی صورت گرفت به این موضوع اشاره شد که ارتباط مولکولی نوتوکورد و نوروایی تلوم پیش ساز نخاع به چه شکلی آشکار می‌شود و از چه مکانیسمهایی تبعیت می‌کند [۴۷-۴۵]. این ارتباط که در مرحله القای اولیه اکتودرم و القای نوروایی تلوم برای تمایزات بعدی صورت می‌پذیرد توسط بسیاری از پژوهشگران دیگر نیز مورد تأیید قرار گرفته است [۱۷، ۴۸ و ۴۹]. امروزه این موضوع به عنوان یک اصل، پذیرفته شده است که لوله عصبی نیز به سهم خود بر روی سلولهای مزودرمی اثر متقابل می‌گذارد و این تأثیر در زمینه شکل گیری مزانشیم اسکروتوم از سومایت و مهاجرت آنها به سوی نوتوکورد صورت می‌گیرد [۱۶، ۵۰ و ۵۱]. به اعتبار نتایج حاصل از این پژوهش که نقص موضعی نخاع توانسته است روند تمایز نوتوکورد را نیز در این سطوح تحت تاثیر قرار دهد، قبول این نکته منطقی به نظر می‌رسد که اسید والپروئیک به عنوان یک تراژون مؤثر می‌تواند بر نوروایی تلوم جنینی که منشاء تمایزات نورونی لوله عصبی محسوب می‌شود تاثیر بگذارد [۲۵] و از این راه صدمات جبران ناپذیری بر تکامل نخاع وارد نماید که ناهنجاریهایی از قبیل اسپینا بیفیدا می‌تواند بخشی از پیامدهای آن باشد. به علاوه این تاثیر گذاری که احتمالاً از طریق ایجاد

مه‌ره‌ها با اشکال مواجه نمایند تا آنجا که نقص در تشکیل اجزای ساختمانی مه‌ره‌ها و ناهنجاریهای اسکلت محوری را نیز به دنبال داشته باشد.

اختلال در سیگنالهای تکاملی، مهاجرت سلولهای مزانشیمی و نحوه تراکم آنها در اطراف نوتوکورد به وقوع می‌پیوندد ممکن است تمایزات بعدی را نیز در جهت شکل‌گیری پیش‌ساز

References

1. Meador KJ, Baker GA, Finnell RH, Kalayjian LA, Liporace JD, Loring DW, Mawer G, Pennell PB, Smith JC, Wolff MC. NEAD Study Group. In utero antiepileptic drug exposure: fetal death and malformations. *Neurology* 2006; 67(3): 407-12.
2. Vajda FJ, Eadie MJ. Maternal valproate dosage and foetal malformations. *Acta Neurol Scand*. 2005; 112(3):137-43.
3. Spiegelstein O, Chatterjee N, Alexander G, Finnell RH. Teratogenicity of valproate conjugates with anticonvulsant activity in mice. *Epilepsy Res* 2003; 57(2-3):145-52.
4. Rengasamy P, Padmanabhan RR. Experimental studies on cervical and lumbar ribs in mouse embryos. *Congenit Anom* 2004; 44(3): 156-71.
5. Okada A, Fujiwara M. Molecular approaches to developmental malformations using analogous forms of valproic acid. *Congenit Anom* 2006; 46(2): 68-75.
6. Sodhi P, Poddar B, Parmar V. Fatal cardiac malformation in fetal valproate syndrome. *Indian J Pediatr*, 2001; 68(10): 989-90.
7. Kostrouchová M, Kostrouch Z, Kostrouchová M. Valproic acid, a molecular lead to multiple regulatory pathways. *Folia Biol* 2007; 53(2): 37-49.
8. Walmod PS, Foley A, Berezin A, Ellerbeck UH, Nau E, Bock V. Cell motility is inhibited by the antiepileptic compound, valproic acid and its teratogenic analogues. *Cell Motil Cytoskeleton* 1998; 40: 220-37.
9. Nikravesh MR, Jalali M. Valproic Acid-induced Syringomyelia in Rat Fetuses. *J Hamadan Univ Med Sci* 2005; 4: 5-12.
10. Nikravesh MR, Jalali Mehdi. Valproic Acid-induced Time Dependent Craniofacial Defects in Wistar Rat Fetuses, *Iran J Anat Sci* 2005, 2(4): 67-74.
11. Daniels T, Gallagher M, Tremblay G. Effects of valproic acid on cardiac metabolism. *Can J Physiol Pharmacol* 2004; 82(10): 927-33.
12. O'Rahilly S. Early human development and the chief source of information on staged human embryos. *Eur J Obstet Gynec Reprod Biol* 1979; 9:273.
13. Verrotti A, Manco R, Matricardi S, Franzoni E, Chiarelli F. Antiepileptic drugs and visual function. *Pediatr Neurol* 2007; 36(6): 353-60.
14. Padmanabhan R, Shafiullah M, Benedict S, Nagelkerke N. Effect of maternal exposure to homocystine on sodium valproate-induced neural tube defects in the mouse embryos. *Eur J Nutr* 2006; 45(6): 311-9.
15. Massa V, Cabrera RM, Menegola E, Giavini E, Finnell RH. Valproic acid-induced skeletal malformations: associated gene expression cascades. *Pharmacogenet Genomics* 2005; 15(11): 787-800.
16. Bumcrist D, McMahon A. Somite differentiation: Sonic signals somites. *Curr Biol* 1995; 5(6): 612-4.
17. Charrier J, Lapointe F, Douarin N, Tallet M. Anti-apoptotic role of sonic hedgehog protein at the early stages of neural system organogenesis. *Development* 2001; 128(20): 4011-20.
18. Pons S, Marti E. Sonic hedgehog synergizes with the extracellular matrix protein vitronectin to induce spinal motor neuron differentiation.

- Development 2000; 127(2): 333-42.
19. **Marti E.** Expression of chick BMP-1/Tolloid during patterning of the neural tube and somites. *Mech Dev* 2000; 91(1-2): 415-9.
20. **Hayes A, Benamine M, Ralphs J.** Extracellular matrix in development of the intervertebral disc. *Matrix Biol* 2001; 20(2): 107-21.
21. **Shum, AW, Copp AJ.** Regional differences in morphogenesis of the neuroepithelium suggest multiple mechanisms of spinal neurulation in the mouse. *Anat Embryol* 1996; 194: 65-73.
22. **Turner S, Sucheston ME, Philipp RM, Paulson RB.** Teratogenic effects on the neuroepithelium of the CD-1 mouse embryo exposed in utero to sodium valproate. *Teratology* 1990, 41: 421-442.
23. **Lindhout D, Omtzigt JG, Cornel MC.** Spectrum of neural tube defects in 34 infants prenatally exposed to antiepileptic drugs. *Neurology* 1992; 42: 111-8.
24. **Briner W, Lieske R.** Arnold-Chiari-like malformation associated with a valproate model of spina bifida in the rat. *Teratology* 1995; 52: 306-11.
25. **Defoort EN, Kim PM, Winn LM.** Valproic acid increases conservative homologous recombination frequency and reactive oxygen species formation: a potential mechanism for valproic acid-induced neural tube defects. *Mol Pharmacol*. 2006; 69(4):1304-10.
26. **Lindhout D, Schmidt D.** In utero exposure to valproate and neural tube defects. *Lancet* 1986; 1: 1392-3.
27. **Hrubec TC, Yan M, Ye K, Salafia CM, Holladay SD.** Valproic acid-induced fetal malformations are reduced by maternal immune stimulation with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interferon-gamma. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol* 2006; 288(12): 1303-9.
28. **Okada A, Onishi Y, Aoki Y, Yagen B, Sobol E, Bialer M, Fujiwara M.** Teratology study of derivatives of tetramethylcyclopropyl amide analogues of valproic acid in mice. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol* 2006; 77(3): 227-33.
29. **Omtzigt JG, Los FJ, Grobde DE, Pijpers L, Jahoda MG.** The risk of spina bifida aperta after first trimester exposure to valproate in a prenatal cohort. *Neurology* 1992; 42: 119-25.
30. **Omtzigt JG, Nau H, Los F J, Pijpers L, Lindhout D.** The disposition of valproate and its metabolites in the late first trimester and early second trimester of pregnancy in maternal serum, urine, and amniotic fluid: effect of dose comedication and the presence of spina bifida. *Eur J Clin Pharmacol* 1992; 43: 381-8.
31. **Bjerkedal T, Czeizel AA, Goujard J, Kallen B.** Valproic acid and spina bifida. *Lancet* 1982; 2: 1096.
32. **Bruckner A, Lee YJ, O'Shea KS, Henneberry RC.** Teratogenic effects of valproic acid and diphenylhydantoin on mouse embryos in culture, *Teratology* 1983, 27: 29-42.
33. **Copp AJ, Brook, Estibeiro P.** Cockroft, The embryonic development of mammalian neural tube defects. *Prog Neurobiol* 1990; 35: 363-403.
34. **Genton P, Semah F, Trinka E.** Valproic acid in epilepsy : pregnancy-related issues. *Drug Saf* 2006; 29(1): 1-21.
35. **Koren G, Nava-Ocampo AA, Moretti ME, Sussman R, Nulman I.** Major malformations with valproic acid. *Can Fam Physician* 2006; 52: 441-2.
36. **Verrotti A, Tana M, Pelliccia P, Chiarelli F, Latini G.** Recent advances on neural tube defects with special reference to Valproic Acid. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006; 6(1): 25-31.
37. **Oberemm A, Kirschbaum F.** Valproic acid induced abnormal development of the central nervous system of three species of amphibians: Implications for neural tube defects and alternative experimental systems. *Teratog Carcinog Mutagen* 1992; 2: 251- 62.
38. **Omtzigt JG, Los FJ, Grobde DE, Pijpers L, Jahoda MG.** The risk of spina bifida aperta after first trimester exposure to valproate in a prenatal

- cohort. *Neurology* 1992; 42: 119-25.
39. **Maekawa M, Ohta K, Katagiri R, Ueta E, Naruse I.** Exencephaly induction by valproic acid in the genetic polydactyly/arhinencephaly mouse, Pdn/Pdn. *Congenit Anom* 2005; 45(4): 132-6.
 40. **Verrotti A, Tana M, Pelliccia P, Chiarelli F, Latini G.** Recent advances on neural tube defects with special reference to Valproic Acid. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006; 6 (1): 25-31.
 41. **Dencker L, Nau H, D'Argy R.** Marked accumulation of valproic acid in embryonic neuroepithelium of the mouse during early organogenesis. *Teratology* 1990; 41: 699-706.
 42. **Artama M, Auvinen A, Raudaskoski T, Isojarvi I, Isojarvi J.** Antiepileptic drug use of women with epilepsy and congenital malformations in offspring. *Neurology*. 2005; 64(11): 1874-8.
 43. **Kessler D, Melton D.** Vertebrate embryonic induction: mesodermal and neuronal patterning. *Science* 1994; 266: 596-604.
 44. **Placzek M, Dodd J, Jessell T.** The case for floor plate induction by the notochord. *Current opinion in neurobiology* 2000; 10: 15-22.
 45. **Nikraves MR, Jalali M, Fazel A.** Unique Carbohydrate Appearance of the Floor Plate During Early Neurolation. *Iran Biomed J* 2003; 7(3): 133-7.
 46. **Nikraves MR, Jalali M, Fazel A.** Developmental Changes of Glycoconjugates in Early Mouse Embryonic Neuroepithelium, Notochordal and Surrounding Mesenchymal Interactions. *Yakhteh (Persian)* 2002; 15: 157-63.
 47. **Nikraves M R, Fazel A, Jalali M.** From mesenchyme to cartilage: Lectin histochemical studies of ventro-medial mesenchyme to the developing neural tube during embryonic period. *Iran J Basic Med Sci (Persian)* 2002; 5(2): 100-7.
 48. **Fam C, Tessier-Lavigne M.** Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by hedgehog homolog. *Cell* 1994; 79(7): 1185-6.
 49. **Bronner-fraser M, Fraser S.** Differentiation of the vertebrate neural tube. *Curr Cell Biol* 1997; 9: 885-91.
 50. **Bagnall K, Sanders E.** The binding pattern of peanut lectin associated with sclerotome migration and the formation of the vertebral axis in the chick embryo. *Anat Embryol* 1989; 180(5): 505-13.
 51. **Gotz W, Qundamatteo F.** Glycoconjugate distribution in early human notochord and axial mesenchyme. *Acta Histochem* 2001; 103(1): 21-35.