

تأثیر کمی و کیفی بیماری دیابت موش باردار بر جنین ها در مرحله قبل از لانه گزینی

دکتر فاطمه جوادنیا^۱، دکتر محمود هاشمی تبار^۲، مسعود حمادی^۲

یافته / سال پنجم / شماره ۱۹

چکیده

مقدمه: نوزادان مادران دیابتی در مقایسه با نوزادان مادران سالم نقص های مادرزادی، سقط های جنینی و تأخیر رشد داخل رحمی را به طور معنی داری بالاتر نشان می دهند. بیشتر تحقیقات در گذشته در مرحله ارگانوژنز صورت گرفته است. در تحقیق حاضر عوارض سوء ناشی از افزایش قند خون و یا اختلالات متابولیکی دیابت در مرحله قبل از لانه گزینی بر روی جنین ها بررسی شد.

مواد و روشها: در این مطالعه موش های صحرایی ماده به دو گروه مساوی ($n=60$) آزمایش و کنترل تقسیم شدند. در گروه آزمایش داروی استروپتوزوسین به میزان 30 gr/kg به صورت داخل صفاقی به مدت سه روز متوالی تزریق و وضعیت دیابتی ایجاد شد. حیوانات هر دو گروه با موش های نر هم نژاد هم قفس شدند. در صورت مشاهده پلاک واژینال، صبح روز بعد به عنوان روز اول حاملگی در نظر گرفته شد. موش های باردار در روز دوم، سوم و چهارم بارداری به روش قطع نخاعی کشته شدند و با محیط کشت M2 فلاشینگ لوله و شاخ رحم انجام شد. جنین ها به قطرات $25 \mu\text{l}$ محیط M16 منتقل شدند و سرعت تقسیمات کلیواژی و تعداد جنین ها با استفاده از آزمون Anova و کیفیت بلاستومر های جنین با آزمون Chi-square بررسی شد.

یافته ها: تعداد تقسیمات کلیواژی در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($P<0.001$) کاهش یافت. به طوری که در روز دوم فقط 63% جنین های دیابتی در مقایسه با $94/8\%$ جنین های گروه کنترل به مرحله سلولی رسیدند. در روز سوم $38/1\%$ جنین های گروه دیابتی در مقایسه با $52/2\%$ گروه کنترل به مرحله ۴ سلولی و در روز چهارم $8/5\%$ جنین های گروه دیابتی در مقایسه با $78/2\%$ گروه کنترل به مرحله مورولایی رسیدند. تعداد جنین ها با کیفیت مطلوب در گروه دیابتی بطور معنی داری ($P<0.001$) کاهش یافت؛ به طوری که در صد فراوانی کیفیت مطلوب (A) در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل، در روز دوم ($74/43\%$ به $95/5\%$)، سوم ($47/5\%$ به $94/1\%$) و چهارم ($8/5\%$ به $88/9\%$) کاهش داشته است.

نتیجه گیری: به طور کلی دیابت موش های حامله سبب افزایش معنی داری در کیفیت نا مطلوب جنین ها به صورت افزایش تخریب سلولی و کاهش تعداد جنین ها در مقایسه با جنین های گروه کنترل بسته به منظور در روز دوم، سوم و چهارم در مراحل قبل از لانه گزینی شده است.

واژه های کلیدی: دیابت، جنین، مرحله قبل از لانه گزینی، موش صحرایی

۱- استادیار دانشکده علوم پزشکی اهواز گروه تشریح و جنین شناسی

۲- کارشناس ارشد علوم تشریحی

مقدمه

اثر گلوکز بر رشد و تکامل جنین در مراحل قبل از لانه‌گزینی از مباحث اختلاف بر انگیز است. اکثر محققین بر این باورند که جنین موش در تقسیم اول تا سوم به دلیل فقدان استفاده از مسیرهای گلیکولیز نیاز کمتری به گلوکز دارد و در محیط *Invitro* بیشتر نیازمند پیرووات است (۱،۲). در عین حال عده ای نیز بر این باورند که افزایش گلوکز در محیط *Invitro* همیشه باعث مهار تقسیمات کلیواژی نمی شود (۳). بیشتر تحقیقات اثر دیابت بر روی جنین نیز مربوط به دوره بعد از لانه‌گزینی است. شیوع نقص های مادرزادی مانند ناهنجاری های قلبی، لوله عصبی، سقط های جنینی و تأخیر رشد داخل رحمی به طور معنی داری در نوزادان مادران دیابتی وابسته به انسولین در مقایسه با نوزادان سالم بالا است (۴،۵،۶). اگرچه عوارض آن را با تجویز انسولین می توان کاهش داد؛ اما با وجود درمان هنوز هم عوارض ناشی از افزایش قند خون ۳ تا ۴ برابر بیشتر از گروه کنترل است (۷). جنین های پستانداران در مرحله قبل از لانه‌گزینی در صورتی که در محیط *Invitro* در معرض عوامل مخرب ناشی از افزایش قند خون قرار گیرند، آسیب های جبران ناپذیری به آنان وارد می گردد (۸،۹).

نتایج مطالعات گذشته نشان می دهد که تنها ۲۰٪ از جنین های حاصل از موش های دیابتی در ۹۶ ساعت بعد از لقاح به مرحله بلاستوسیستی رسیده اند؛ در صورتیکه در گروه کنترل ۹۰٪ جنین ها به این مرحله رسیده اند. همچنین مقایسه بلاستوسیست های حاصل از موش دیابتی نسبت به بلاستوسیست های گروه کنترل نشان داد که تعداد سلول های جنین در مرحله لاستوسیست ها کمتر است. با استفاده از رنگ آمیزی افتراقی بلاستوسیست ها و تونل^۱ مشخص گردید که اپوپتوزیس^۲ و فراگمنتیشن^۳ بیشتر در توده سلولی داخلی است (۱۰). وجود این یافته ها نشان می دهد که افزایش متابولیت های مخرب ناشی از افزایش قند خون در مادران دیابتی در محیط *Invivo*

ممکن است باعث ایجاد سیر قهقرایی در رشد و تکامل اولیه جنین ها شود که این امر بعدها در طی حاملگی به صورت سقط جنین، تأخیر رشد داخل رحمی و سایر عارضه های ناهنجار مرتبط به دیابت در مرحله ارگانوژنز نمایان می گردد (۱۱،۱۲،۱۳)؛ اما هنوز مشخص نشده است که افزایش قند خون تا چه اندازه در سرعت تقسیمات کلیواژی^۴، تخریب سلولی و کیفیت جنینی تا مرحله مورولا^۵ تأثیر دارد. لذا هدف تحقیق حاضر بررسی کمی و کیفی بلاستومرهای جنین در مرحله قبل از لانه‌گزینی تا مرحله مورولا در دو گروه دیابتی و کنترل است.

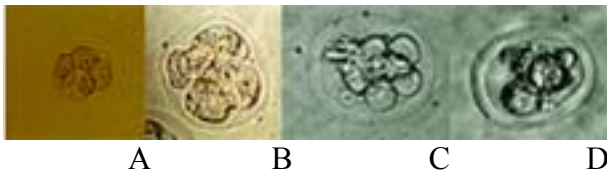
مواد و روشها

تعداد ۱۲۰ سر موش صحرایی از نژاد Westar (محدوده وزنی 125 ± 5 gr/kg و سن ۸ تا ۱۲ هفته) تحت شرایط متعارف انتخاب و پس از اندازه گیری قند خون، حیوانات به دو گروه آزمایش و کنترل تقسیم شدند.

– ایجاد حالت تجربی دیابت: در گروه آزمایش برای ایجاد مدل دیابت استروپتوزوسین به مقدار 30 mg/kg به مدت سه روز و در گروه شاهد، نرمال سالین به روش داخل صفاقی تزریق شد (۱۴).

– جمع آوری و ارزیابی جنین: حیوانات هر دو گروه با موش های نر هم نژاد هم قفس شدند و صبح روز بعد در صورت مشاهده پلاک واژینال^۶ به عنوان روز اول حاملگی مجزا و در قفسهای جداگانه نگهداری شدند. موش ها در هر یک از گروه های دیابتی و کنترل به ترتیب به سه گروه ۲۰ عددی بر اساس زمان جنین گیری در روز دوم، سوم و چهارم بارداری به روش قطع نخاعی کشته شدند و با محیط M2 فلاشینگ لوله رحم انجام شد. در روز چهارم علاوه بر لوله رحم، شاخ رحم نیز فلاش شد. پس از شمارش، جنین ها به قطرات 25 μ l محیط M16 پوشیده شده با پارافین سبک منتقل شدند و مطالعه کیفی جنین ها مطابق مقیاس بولتو^۷ انجام شد (۱۵). کیفیت مطلوب (A) برای

- | | |
|------------------|-------------------|
| 1. Tunel | 5. Morula |
| 2. Apoptosis | 6. Plaque vaginal |
| 3. Fragmentation | 7. Bolto |
| 4. Cleavage | |



شکل ۱: برای بررسی کیفی جنین طبق درجه بندی bolto جنین های حاصل از هر دو گروه شاهد و آزمایش را به چهار دسته کیفی تقسیم گردید.

جدول ۱ مقایسه کیفی ۵۱۹ جنین موش های سالم را نسبت به ۴۰۸ جنین موش های دیابتی در روز های مختلف نشان داده است. بررسی های آماری نشان می دهد که در گروه آزمایش، کیفیت مطلوب A نسبت به گروه کنترل در روزهای دوم، سوم و چهارم به طور معنی داری ($P < 0.001$) کاهش یافته است. به طوری که درصد فراوانی کیفیت مطلوب (A) در گروه آزمایش نسبت به گروه کنترل، در روز دوم (۷۴/۴۳٪ به ۹۵/۵٪)، سوم (۴۷/۵٪ به ۹۴/۱٪) و چهارم (۸/۵٪ به ۸۸/۹٪) کاهش داشته است.

بلاستومرهای با اندازه برابر و بدون فراگمتیث، کیفیت نامطلوب (B) برای بلاستومرهای برابر و تا حدی فراگمتیث، کیفیت نامطلوب (C) برای بلاستومرهای نابرابر و تا حدی فراگمتیث و کیفیت نامطلوب (D) برای بلاستومرهای با بیش از ۵۰٪ فراگمتیث در نظر گرفته شد. برای بررسی سرعت تقسیمات کلیواژی جنین به تفکیک در روز دوم، سوم و چهارم در گروه آزمایش و کنترل تعداد بلاستومرهای آنها شمارش و در گروه های ۸،۴،۳،۲،۱ سلولی و مورولا قرار داده شدند. روش های آماری: مقایسه سرعت تقسیمات کلیواژی و تعداد جنین ها با استفاده از آزمون Anova و کیفیت جنین ها با آزمون Chi-square به وسیله نرم افزار SPSS تحلیل گردید. رسم نمودار ها با نرم افزار EXCEL انجام شد.

یافته ها

تعیین کیفیت جنین ها مطابق مقیاس بولتو با اندکی اصلاح صورت پذیرفت (شکل ۱).

بدین ترتیب که اندیکس فراگمتیث و نابرابری اندازه

جدول شماره ۱: کیفیت جنین های حاصل از موش های گروه کنترل و گروه دیابتی مرحله قبل از لانه گزینی

موش ها	تعداد جنین ها		کیفیت جنین ها (تعداد و درصد فراوانی)			
	A	B	C	D	درصد	تعداد
نرمال	روز دوم	۱۳۴	۹۵/۵	۶	۴/۵	۱۲۸
	روز سوم	۲۰۵	۹۴/۱	۸	۳/۹	۱۹۳
	روز چهارم	۱۸۰	۸۸/۹	۱۳	۷/۲	۱۶۰
دیابتی	روز دوم	۱۰۷	۷۴/۲	۳۱	۲۹	۷۴
	روز سوم	۱۶۰	۴۷/۵	۳۳	۲۰/۶	۷۶
	روز چهارم	۱۴۰	۸/۵	۴۶	۳۲/۶	۱۲

روز دوم کیفیت A در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($p < 0.001$) کاهش و کیفیت B افزایش نشان می دهد.

در روز سوم کیفیت A در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($p < 0.001$) و کیفیت (C, B) و D افزایش نشان می دهد.

در روز چهارم کیفیت A در گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($p < 0.001$) کاهش و کیفیت (C, B) و D افزایش نشان می دهد.

دیابتی نسبت به جنین های موش های سالم به طور معنی داری کاهش یافته است ($P < 0.001$). به طوری که در روز دوم فقط ۶۳٪ جنین های دیابتی در مقایسه با ۹۴/۱٪ جنین های گروه کنترل به مرحله ۲ سلولی رسیده اند

در جدول ۲ مقایسه کمی ۵۱۹ جنین حاصل از موش های سالم نسبت به ۴۰۸ جنین موش های دیابتی در روز های مختلف نشان داده است. بررسی آماری نشان می دهد که تعداد تقسیمات کلیواژی در روز دوم، سوم و چهارم در جنین های حاصل از موش های

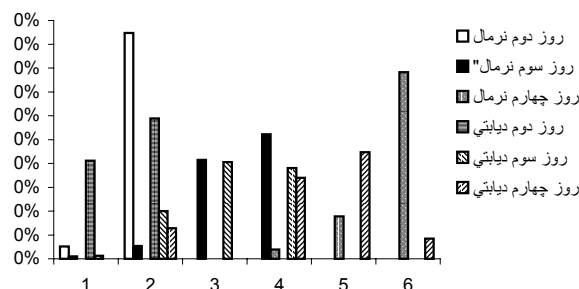
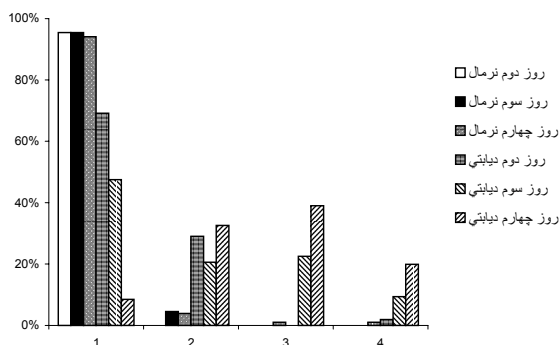
در روز سوم ۳۸/۱٪ جنین های گروه دیابتی در مقایسه با ۵۲/۲٪ گروه نرمال به مرحله ۴ سلولی رسیدند و در روز چهارم ۸/۵٪ جنین های گروه دیابتی در مقایسه با ۷۸/۲٪ گروه نرمال به مرحله مورولایی رسیدند. نمودار شماره ۱ و ۲ مقایسه کیفیت و کمیت جنین ها را در دو گروه نرمال و دیابتی نشان می دهد.

جدول شماره ۲- بررسی کمی تقسیمات کلیواژی در جنین های حاصل از دو گروه نرمال و دیابتی

موش ها	تعداد نمونه ها	سلول ۱		سلول ۲		سلول ۳		سلول ۴		سلول ۸		مورولا	
		تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد	تعداد	درصد
نرمال	روز دوم	۱۳۴	۷	۵/۲	۱۲۷	۹۴/۸	-	-	-	-	-	-	-
روز سوم	۲۰۵	۲	۱	۵/۴	۱۱	۵/۴	۸۵	۴۱/۵	۱۰۷	۵۲/۵	-	-	-
روز چهارم	۱۸۰	-	-	-	-	-	-	-	۷	۲/۹	۲۲	۱۷/۸	۱۴۱
دیابتی	روز دوم	۱۰۷	۴۴	۴۱/۱	۶۳	۵۸/۹	-	-	-	-	-	-	-
روز سوم	۱۶۰	۲	۱/۳	۲۰	۳۲	۲۰	۶۵	۴۰/۶	۶۱	۳۸/۱	-	-	-
روز چهارم	۱۴۰	-	-	-	۱۸	۱۲/۸	-	-	۴۸	۳۴	۶۳	۴۴/۷	۱۲

روز دوم تعداد جنین های گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($P < 0.001$) در مرحله ۱ سلولی افزایش و در مرحله ۲ سلولی کاهش نشان می دهد. روز سوم تعداد جنین های گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($P < 0.001$) در مرحله ۱ سلولی و ۲ سلولی افزایش و در مرحله ۳ سلولی و ۴ سلولی کاهش نشان می دهد.

روز چهارم تعداد جنین های گروه دیابتی نسبت به گروه کنترل به طور معنی داری ($P < 0.001$) در مرحله ۴ سلولی و ۸ سلولی افزایش و در مورولا کاهش نشان می دهد.



نمودار ۲- مقایسه کیفی جنین های حاصل از موش های سالم و دیابتی در روزهای دوم و سوم و چهارم مرحله قبل از لانه گزینی

نمودار ۱- مقایسه کمی جنین های حاصل از موش های سالم و دیابتی در روزهای دوم و سوم و چهارم مرحله قبل از لانه گزینی

بحث

تصور می شود تنظیم آن از تعادل دقیق میان سیگنال های حیاتی داخل و خارج سلولی پیروی می کند؛ اما این که چه عواملی باعث ایجاد این فرایند حذف سلولی در بلاستوسیست ها می شود نشان داده شد که سلول های بلاستوسیستی که به سیگنال های حیاتی داخل و خارج سلولی پاسخ نمی دهند، به طور خودبخود با مکانیسم مرگ به دلیل نقص^۲ از بین می روند. از طرف دیگر این امکان وجود دارد که تحت شرایط آسیب شناختی نظیر بیماری دیابت هم بین عوامل داخل و خارج سلولی تعادل از بین برود که منجر به حذف نامناسب سلول ها

نتایج حاصل از این تحقیق بیانگر این است که در روز دوم، سوم و چهارم زندگی داخل رحمی کیفیت نامطلوب بلاستومر های حاصل از جنین های مادران دیابتی در مقایسه با گروه کنترل بالاتر بوده است. این نتایج با یافته های پامپفر^۱ در مرحله بلاستوسیستی تطابق دارد و به نظر می رسد که کیفیت بلاستومرها در تعیین سرنوشت جنین بی تأثیر نیست. به طور طبیعی در طی تکامل بلاستوسیست فرایند های مرفوژنتیک ناشی از مرگ سلولی به صورت مرحله گذرا اتفاق می افتد که

با همین مکانیسم می گردد (۱۰). با توجه به این موضوع به نظر می رسد که در صورت حذف نامناسب سلول های موجود در توده سلولی داخلی^۳ که در مرحله ارگانوژنز^۴ باعث تشکیل تمامی ارگان های بدن جنین می شود، ممکن است عواقب ناخوشایندی در مراحل بعدی تکامل به وجود آید. مطالعات گذشته وجود این عارضه را انکار نمی کنند و نشان می دهند که تعداد سلولهای بلاستوسیست حاصل از موش های بارداری دیابتی نسبت به بلاستوسیست گروه کنترل به طور معنی داری کمتر شده است (۱۶). علاوه بر آن ادامه حیات بلاستوسیست های گروه آزمایش نیز نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است. تحقیق حاضر نیز تعداد جنین های دو سلولی تا مورولای حاصل از موش دیابتی را نسبت به گروه کنترل با درصد پایین تری کمتر نشان داد؛ به نظر می رسد با گذشت زمان میزان جذب جنین افزایش می یابد.

به طور کلی مطالعات در بعد مولکولی نشان داده است که گلوکز به وسیله یکی از چهار عامل انتقال گلوکز به نام های GLUT1، GLUT2، GLUT3 و GLUT4 از مادر به سلول های جنین راه می یابد که GLUT3، GLUT2، GLUT4 در مرحله بعد از لانه گزینی و GLUT1 از روز سوم مرحله قبل از لانه گزینی دخیل هستند. بنابراین کنترل متابولیکی انتقال گلوکز خون در چند سطح صورت می گیرد که شامل فعالیت انتقال دهنده های داخل سلولی رسپتور ها، کمپلکس پروتئینی لیگاندها، ترانس کریپشنال فاکتور ها و تنظیم قبل و بعد از ترانس کریپشنال است (۱۷، ۱۸، ۱۹).

محققین با کشت سلول های مختلف در محیط های با غلظت بالای قند خون حضور میزان بالای گلوکز را عامل ایجاد خلل در تسهیل انتقال گلوکز عنوان نموده اند. بر عکس این مسئله نیز صادق است و در صورت پایین بودن سطح گلوکز افزایش سریعی در تولید mRNA و عوامل نسخه بر داری رخ می دهد و باعث افزایش ناگهانی در میزان انتقال گلوکز به داخل سلول می شود (۲۰). در مطالعات داخل رحمی نیز نشان

داده است که در موش های بارداری دیابتی، میزان گلوکز در داخل سلول جنین های آنها در مرحله قبل از لانه گزینی کاهش می یابد به خصوص در ۴۸ و ۹۸ ساعت بعد از انجام عمل لقاح که این کاهش در واقع نتیجه کاستی در میزان انتقال گلوکز به داخل سلول است نه به دلیل افزایش فعالیت هگزوکیناز. هم چنین این کاهش در انتقال، بازگوکننده ایجاد خلل در تسهیل انتقال گلوکز در هر دو سطح mRNA و عوامل پروتئینی نسخه برداری سلول های جنینی است (۸). مطالعه انجام شده در مرحله بلاستوسیستی نشان داد که افزایش میزان گلوکز مادران بارداری باعث کاهش تنظیم GLUT2-4 در سطح mRNA و عوامل پروتئینی و آغاز وقایع مرگ سلولی به وسیله عوامل تحریک کننده نظیر PAX, P53, Caspases می شود. این افزایش آپوپتیزس باعث افزایش جذب جنینی و ناهنجاریهای گوناگونی می گردد و این درست برعکس مطالعات اولیه در مورد سقط جنین و دیابت است که عنوان شده بود. این دو هیچ ارتباطی با همدیگر ندارند (۲۱). باید گفت در مراحل قبل از بلاستوسیست، در پاسخ به میزان بالای قند خون مادر تنظیم بیان GLUT1 کاهش می یابد که ممکن است بازگوکننده کاهش یک سری وقایع تنظیم کننده fh عامل نسخه برداری باشد که ناحیه Upstream زنجیره DNA از ژن GLUT1 را تنظیم می کند (۱۷). مطالعه در محیط Invitro فوق و مطالعه Invivo تحقیق حاضر و تحقیقات (۱۰، ۱۱) نشان می دهد که افزایش میزان قند خون موش های دیابتی در روز دوم، سوم و چهارم منجر به افزایش کیفیت نامطلوب در جنین های آنها می گردد. تحقیق حاضر هم چنین نشان داد که علاوه بر تأثیر کیفی، تعداد تقسیمات بلاستومری نیز در طی روند مرحله قبل از لانه گزینی در جنین های حاصل از مادران دیابتی در مقایسه با گروه کنترل کم است که با توجه به مکانیسم انتقال گلوکز و تنظیم مولکولی و ژنی که در پاسخ به افزایش میزان قند خون مادر اتفاق می افتد نتایج به دست آمده،

References

1. Maggie MY, Chi Amade H and Kelle HM. Metabolic changes in the glucose – induced apoptotic in blastocyst suggest alteration in mitochondrial physiology. *AMJ physiol Endocrinol, Metab*, 2002; 283: 226-231
2. Tenneille E, Ludwig ML and Barry DB. Differential effect of hexoses on Hamster embryo Development in culture. *Biology of Reproduction*, 2001; 64: 1366-1374
3. John D, and McGinnis LK. Evidence that glucose is not always an inhibitor of mouse preimplantation Development in vitro. *Human Reproduction*, 2001; 16(1):153-163
4. William LJ Human Embryology, Churchill livingstone, Hong kong, 1997
5. Sutherland HW & Pritchard CW. Increased incidence of spontaneous abortion in pregnancies complicated by maternal diabetes mellitus. *AM, J Obstet Gynecol*, 1987; 156: 135-138
6. Mills JL. Incidence of spontaneous abortion among normal women and insulin-dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21 days of conception. *N, Engl J Med*, 1988; 319: 1617-1623
7. Lis JL Simpson 74, D.G.Driscoll, and Peterson. Incidence of spontaneous DG, abortion among normal women and insulin –dependent diabetic women whose pregnancies were identified within 21days of conception *N. Engl J. Med*, 1988; 319: 1617-1623
8. Kelle HM, Maggie M. ehiy, and Mike M. Maternal hyperglycemia alters glucose transport and utilization in mouse preimplantation embryos. *AM J physiol Endocrinol Metab*, 1998; 275: 38-47
9. Greene Mf. Preimplantation and diagnosis of congenital anomalies in diabetic pregnancies. *Clin perinatol*, 1993; 20:533-547
- 10-Pampfer SR, DeHertogh I. Vanderheyden MB and Vercheval M. Decreased inner cell mass proportion in blastocysts from diabetic rats. *Diabetes*, 1990; 39: 471-476
11. Lea RG, McCracken JE, McIntyre SS, Smith W, and Baird JD. Disturbed development of the preimplantation embryo in the insulin-dependent diabetic BB/E rat. *Diabetes*, 1996; 45: 1463-1470
12. Martin KL and Leese HJ. Role of glucose in mouse preimplantation embryo development. *Mol Reprod Dev*, 1995; 40: 436-443
13. Korgun EK, Demir R, Hammer A, Dohr G, Desoye G, Skofitsch G, and HahnGlucose T. Transporter Expression in Rat Embryo and Uterus During Decidualization, Implantation, and Early ostimplantation *Biology of Reproduction*, 2001; 65: 1364-1370
14. Diamond MP, Moley Pellicer A, Vaughn WK, and DeCherney AH, and et al. Effects of streptozotocin- and alloxan-induced diabetes mellitus on mouse follicular and early embryo development. *J Reprod Fertil*, 1989; 86:1-10

پذیرفتنی و مورد انتظار بوده است؛ اما این که چه راه های درمانی برای جلوگیری از تأثیر تخریبی هیپرگلیسمی ناشی از down Regulation ژن های انتقال دهنده گلوکز وجود دارد، جای بحث و تحقیق فراوان دارد به نظر می رسد ژن درمانی در ۳ روز اول حاملگی برای افزایش بیان ژنی GLUT1 اهمیت بسزایی دارد.

15. Bolto VN, Hawas SM, Taylor CT, and Paraons JH. Development of spare human pre implantation embryos iv vitro: an analysis of the correlations among gross morphology, on in vitro cleavage rates and development to the blastocyst. *J In vitro. Fertile, Embryo Transfer*, 6, 30, 1989
16. Weile MJ, Acobson MD, Coles HS; Darics TJ, Gardner RL, Raff KD, and Raff MC. Constitutive expression of the machinery for programmed cell death. *J Cell Biol*, 1996; 133:1053-1059
17. Ott RM, Robertson M, Muckersie E, and Forrester JV. Regulation of glucose transporters (GLUT-1 and GLUT-3) in human retinal endothelial cells. *Biochem, J*, 1996; 318:313-317
18. Rown JG, and Whittingham DG. The roles of pyruvate, lactate and glucose during preimplantation development of embryos from F1 hybrid mice in vitro. *Development*, 1991; 112: 99-105
19. Pantaleon MB, Harvey WS, Pascoe DE, James E, and Kaye PL. Glucose transporter GLUT3: Ontogeny, targeting, and role in the mouse blastocyst. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Developmental Biology*, 1997; Vol. 94, 3795-3800
20. Ridge MV, Tan AS, McCoy KD, Kansara M, and Rudert F. CD95 (Fas/Apo-1)-induced apoptosis results in loss of glucose transporter function. *J Immunol*, 1996; 156: 4092-4099
21. Moley MM, Chi JK, Manchester DB McDougal and OH owry. Alterations of intraembryonic metabolites in preimplantation mouse embryos exposed to elevated concentrations of glucose: a metabolic explanation for the developmental retardation seen in preimplantation embryos from diabetic animals. *Biology of Reproduction*, 1996; Vol 54, 1209-1216