بررسی اثرات هیپرگلیسمی مادری بر سازمانبندی نورونی در سیستم عصبی در حال تکامل در جنین رت

مرتضی بهنام رسولی* ناصر مهدوی شهری* موسی الرضا حاج زاده** علی اصغر پشت چمن*
*مشهد-گروه زیست شناسی دانشگاه فردوسی **گروه فیزیولوژی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

در حال حاضر این موضوع که مادران دیابتیک به احتمال زیاد فرزندانی به دنیا می آورند که دارای نقائص سیستم عصبی مرکزی ازجمله اسپینابیفیدا و آنانسفالی می باشند کاملاً مورد قبول قرار گرفته است.

در این پژوهش اثرات هیپرگلیسمی مادری بر پدیده‌های تکثیر و مهاجرت نورونی در اثنای دورهٔ تکامل جنینی مورد بررسی قرار گرفته است. سلولهای بتای جزائر لانگرهانس ۱۰ رت باکره به طور شیمیایی و به وسیلهٔ یک نوبت تزریق زیر جلدی آلوکسان (۱۶۰mg به ازای هر کیلوگرم وزن) منهدم گردیدند. اندازه گیری قند خون نشان داد که ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از تزریق آلوکسان میزان قند خون حدوداً ۸ تا ۹ برابر مقدار طبیعی افزایش می‌یابد. رتهای هیپرگلیسمیک سپس آمیزش یافته و در شرایط استاندارد خانهٔ حیوانات نگهداری شدند. در روز سیزدهم حاملگی و تحت بیهوشی با اتر رتهای حامله قطع نخاع گردیده و جنینهای متعلق به آنها جمع آوری و در محلول فرمالین ۱۰٪ فیکس گردیدند. پس از آن جنینهای گروه آزمایش و گروه کنترل به کمک استریومیکروسکوپ و میکروسکوپ معمولی و نیز روشهای هیستولوژیک مورد بررسی قرار گرفتند.

نتایج حاصل از این تحقیق نشان می دهند، در مقایسهٔ با جنینهای گروه کنترل در جنینهای گروه آزمایشی (۱) دانسیتهٔ نورونی در لایهٔ مانتل (در اطراف بطن سوم و نیز در نخاع) کم و علاوه‌براین نورونها دچار بی‌نظمی و آشفتگی گردیده‌اند. (۲) توسعهٔ لایهٔ کوروئید در درون بطنها کاهش یافته و عمق شیارهای هیپوتالاموسی و اپی‌تالاموسی کمتر است. (۳) میزان بروز ناهنجاریهای جنینی بطور چشمگیری افزایش یافته است ($p<0/001$). (۴) اندازه‌گیری طول سر- دم (crown-rump) جنینها نشان می دهد که جنینهای گروه تجربی دارای درجاتی از تأخیر در رشد می‌باشند ($p<0/001$).

براساس نتایج فوق می توان گفت که هیپرگلیسمی مادری احتمالاً پدیده‌های تکثیر نورونی و مسیرهای مهاجرتهای نورونی و بالنتیجه مورفوژنز سیستم عصبی مرکزی را در اثنای دورهٔ تکامل جنینی تحت تأثیر قرار می دهد.

کلمات کلیدی: آلوکسان، هیپرگلیسمی، دیابت، جنین، سیستم عصبی مرکزی، رت

Abstract

It has been well established that diabetic mothers are more likely to give birth to infants with CNS malformations including spina bifida and anencephaly. In this research the effects of maternal hyperglicaemia on the neuronal organization of CNS during embryonic development was investigated. The beta cells of Langerhance ilets of 10 virgin albino rats were chemically destroyed by an injection of 160 mg/kg (body weight) alloxan. After 48-72 hours the high blood sugar indicated the incidence of hyperglicemia. The hyperglicaemic rats were then mated. At 13th day of gestation and under ether aneasthesia the pregnant rats were sacrificed and the embryoses were collected and fixed in 10% formalin solution and then examined by using the stereomicroscope and microscope, as well as by using histological techniques. In comparison with the control group, meaningful results were obtained from the experimental group as follow.

(1) The density of neurons in mantle layer is less, the neurons are disrupted and the routes of the neuronal migration are disordered. (2) The extension of the choroid layers in the ventricles are decreased and the hypothalamic and epithalamic sulcuses less deepend. (3) The rate of the malformed embryos is high ($p<0.001$). (4) The measurments of crown-rump length show the growth rate of embryos are significantly decreased ($p<0.001$).

These results indicating that the CNS neuronal proliferation and the routes of neuronal migration and therefore the organogenesis of CNS might be affected by the maternal hyperglicaemia.

Keywords: Alloxan, hyperglicaemia, diabet, embryos, CNS, rat.

مقدمه

در حال حاضر این موضوع به خوبی پذیرفته شده است که احتمال تولد نوزادان با ناهنجاریهای مادرزادی مختلف از مادران دیابتی بسیار بیشتر از مادرانی است که در مقابل گلوکز دارای مقاومت طبیعی و نرمال می‌باشند. منابع موجود نشان می‌دهند که در زنان دیابتیک علاوه‌بر این که کاهش دورهٔ بارداری و زایمان زودرس امری شایع است میزان تولد نوزادان مرده و بی‌تحرک نیز بالاست (۱۳).

در سالهای اخیر اگرچه با روش انسولین درمانی و مراقبت از مادران دیابتیک، در طی دوران بارداری، سعی می‌گردد تا از میزان بروز عوارض و ناهنجاری در نوزادان آنان کاسته گردد ولی به نظر نمی‌رسد که میزان بروز ناهنجاریهای مادرزادی به میزان قابل توجهی کم شده باشد. ناهنجاریهای مادرزادی قابل مشاهده در بین فرزندان متولد شده از مادران دیابتیک دارای طیف وسیعی است. این ناهنجاریها عمدتاً در ارتباط با سیستم قلبی- عروقی، استخوانها و سیستم عصبی می‌باشند.

گزارشات موجود نشان می‌دهند که دیابت مادری موجب اختلال در بروز فرآیندهای فیزیولوژیک در مراحل بعدی رشد و نمو جنینی می‌گردد (۱۱). این اختلالات ممکنست ناشی از کاهش سنتز پروتئین و یا افزایش کاتابولیسم پروتئینهای موجود باشد. در این رابطه نشان داده شده است که در موشهایی که به طور تجربی و توسط استرپتوزوتوسین دچار دیابت گردیده‌اند علاوه بر آنکه میزان تخریب پروتئینهای عضلهٔ اسکلتی افزایش می‌یابد (۱۲ و ۲) در مرفولوژی هستهٔ هپاتوسیتها نیز تغییراتی بوجود می‌آید (۴). از آنجاکه بین ساختمان و عمل هر بافت ارتباط مستقیمی وجود دارد می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که اختلال در پدیده‌های فیزیولوژیک ناشی از اختلال در ساختمان سیستم عصبی جنین است. بدیهی است وجود عوامل تراتوژن در طی دورهٔ بحرانی رشد و نمو جنین به ویژه دورهٔ بحرانی تکامل CNS می‌تواند منشأ بروز بسیاری از ناهنجاریهای ساختمانی و اختلالات عملی باشد. این احتمال وجود دارد که افزایش سطح گلوکز خون و یا متابولیتهای ناشی از هیپرگلیسمی خود به عنوان عوامل تراتوژن بالقوه جنین را تحت تأثیر قرار دهند. در رت اگرچه دورهٔ بحرانی تکامل CNS دورهٔ نوزادی و پس از تولد است ولی دورهٔ تکثیر و مهاجرت سلولی به اواسط دورهٔ حاملگی مربوط می‌گردد و چون در این مرحله جنین قادر به سنتز انسولین نیست نمی‌تواند از عوارض ناشی از شرایط هیپرگلیسمیک در امان باشد. در جنین رت سلولهای بتای جزایر لانگرهانس تا روز ۱۲ حاملگی قادر به سنتز انسولین نیستند (۵). هدف از اجرای این پژوهش بررسی اثرات هیپرگلیسمی مادری بر تغییرات ساختاری میکروسکوپی جنین بویژه بررسی این تغییرات در CNS جنین در حال تکامل رت بوده است.

روش کار

در این پژوهش از رتهای آلبینوی نژاد Wistar با سن حدود سه ماه که در شرایط استاندارد خانهٔ حیوانات تکثیر و پرورش یافته بودند استفاده گردید. به منظور ایجاد هیپرگلیسمی، سلولهای بتای جزائر لانگرهانس ۱۰ رت باکره به طور شیمیایی و به وسیله یک نوبت تزریق زیر جلدی آلوکسان (۱۶۰mg به ازای هر کیلوگرم وزن) منهدم گردیدند. اندازه‌گیری قند خون نشان داد که ۴۸ تا ۷۲ ساعت پس از تزریق آلوکسان میزان قند خون حدوداً ۸ تا ۹ برابر مقدار طبیعی (گروه کنترل) افزایش می‌یابد. رتهای هیپرگلیسمیک سپس در شامگاه (ساعت ۷ بعدازظهر) با رتهای نر در قفس مخصوص آمیزش جفت گردیدند (در هر قفس مخصوص آمیزش یک رت ماده و یک رت نر). مشاهدهٔ لکه‌های جفت‌گیری در صبح روز بعد حاکی از آمیزش موفقیت‌آمیز بود و آن روز به عنوان روز صفر حاملگی در نظر گرفته شد. رتهای آمیزش یافته سپس وزن و در قفسهای جداگانه قرار داده شدند. گروه کنترل نیز مشتمل بر ۶ رت باکره بود. در شرایط مشابه، به رتهای کنترل به جای آلوکسان، حجم برابری از آب مقطر

تزریق گردید و همانند گروه آزمایش آمیزش یافتند. به دلیل احتمال مرگ رتهای گروه آزمایشی تعداد بیشتری از آنها مورد استفاده قرار گرفتند.

در روز سیزدهم بارداری ابتدا رتها وزن و پس از بیهوشی با اتر و نمونه‌برداری یک میلی‌لیتر خون از سیاهرگ زیر دمی آنها (برای اندازه‌گیری میزان قند خون) قطع نخاع گردیدند. پس از باز کردن شکم رتها، جنینها همراه با رحم از حفرهٔ شکم خارج و در سرم فیزیولوژی قرار داده شدند. سپس به کمک استریومیکروسکوپ و پنسهای نوک سوزنی پرده‌های جنینی باز و جنینها همراه با جفت در داخل فیکساتور (محلول فرمالین ۱۰٪) قرار داده شدند.

از آنجایی که میزان تشکیل ادرار در رتهای دیابتی زیاد است تقریباً مثانهٔ همهٔ رتهای دیابتی در هنگام باز کردن شکم پر از ادرار بود. ادرار موجود در مثانه (برای اندازه‌گیری میزان قند ادرار) به وسیله سرنگ انسولین جمع آوری گردید. به طریق مشابه از رتهای کنترل نیز نمونه‌برداری ادرار به عمل آمد.

اندازه‌گیری میزان قند خون و ادرار

پس از جدا کردن سرد خون نمونه‌برداری شده اندازه‌گیری قند خون به روش نلسون انجام شد. برای اندازه‌گیری میزان قند ادرار از نوارهای Rapignost Total-Screen که به مدت یک دقیقه در داخل ادرار قرار داده می‌شد استفاده گردید.

بررسی خصوصیات ظاهری جنینها

پس از فیکس شدن جنینها (به مدت ۷۲ ساعت در محلول فرمالین) و به کمک استرئومیکروسکوپ خصوصیات ظاهری و مورفولوژی جنینهای دیابتی و کنترل مورد بررسی قرار گرفتند. علاوه‌براین با استفادهٔ از کولیس طول سر-دم (crown-rump length) جنینهای گروه کنترل و گروه آزمایش اندازه‌گیری شدند.

تهیهٔ مقاطع میکروسکوپی

جهت تهیهٔ مقاطع میکروسکوپی از بین جنینهای فیکسه شدهٔ متعلق به هر رت گروه آزمایش و گروه کنترل ۲ جنین (آنهایی که فاقد آنومالیهای آشکاری بودند) به صورت تصادفی انتخاب شدند. پس از پاساژ جنینها در پارافین، برشهای عرضی سریال با قطر ۷ میکرون تهیه و با سپس با هماتوکسیلین و ائوزین رنگ‌آمیزی شدند.

نتایج

نتایج حاصل از بررسی ماکروسکوپیک جنینها

نتایج حاصل از شمارش تعداد جنینهای متعلق به هر یک از رتهای گروه آزمایش و گروه کنترل به همراه تعداد جنینهای غیرطبیعی و انواع ناهنجاریهای عمده قابل تشخیص و نیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول سر - دم جنینها در جدولهای ۱ و ۲ ارائه گردیده‌اند. این نتایج نشان می‌دهند که تعداد جنینهای متعلق به هر یک از رتهای دیابتی ۸ و یا کمتر از ۸ عدد می‌باشد در حالیکه در رتهای گروه کنترل تعداد جنینها بین ۱۱ تا ۱۳ عدد است. همچنین علاوه بر اختلالات جنینی ماکروسکوپی که به ناهنجاریهای بزرگ معروف هستند (جدول ۱)

جدول ۱: میانگین تعداد کل جنینها، جنینهای غیرطبیعی و اختلالات جنینی موجود

گروه	تعداد کل جنینها	تعداد جنینهای غیرطبیعی	اختلالات جنینی موجود
کنترل	۱۱/۷۵ ± ۰/۹۷	۰	
آزمایشی	۱۶/۲۹ ± ۳/۰۶	۰/۸۵۷	آنانسفالی، نقص در چرخش موروپور قدام جنین، دهان و ناحیهٔ گردن جنین

تقریباً تمامی جنینهای گروه آزمایش دارای درجاتی از تأخیر در رشد می‌باشند (نتایج حاصل از اندازه‌گیری طول سر - دم، جدول ۲).

جدول ۲ میانگین طول سرم - دم (crown-rump length) برحسب میلی‌متر در جنینهای گروه کنترل و گروه تجربی

گروه	میانگین طول سرم - دم
گروه آزمایشی	۸/۸۳۵(±۰/۸۶۸)
گروه کنترل	۱۰/۵۴(±۰/۳۲۳)

بررسی جنینها به کمک استریومیکروسکوپ نشان می‌دهد که در ارتباط با اندامهای بینایی و شنوایی و نیز اندامهای حرکتی خلفی تأخیر در رشد شدید و کاملاً مشهود است. در جدول شماره ۳ نیز نتایج حاصل از اندازه‌گیری قند خون و قند ادرار در رتهای گروه آزمایش و گروه کنترل نشان داده شده است.

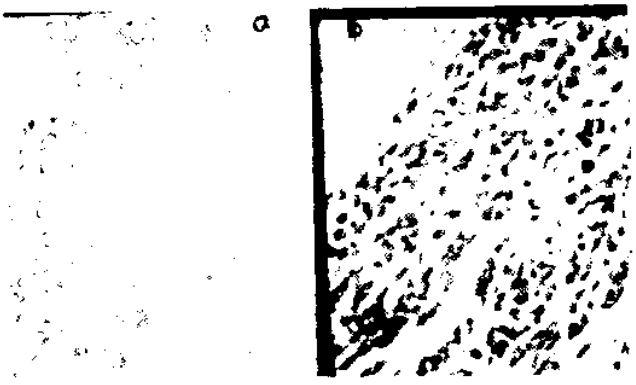
جدول ۳: میزان قند خون و قند ادرار در رتهای گروه کنترل و گروه تجربی (mg/dl)

گروه آزمایش	گروه آزمایشی	گروه کنترل
اندازه‌گیری قند خون	۴۸/۷ ± ۷۲۴/۳۵	۸۳/۷۵ ± ۴/۷۹
اندازه‌گیری قند ادرار	بیشتر از ۱۰۰۰	صفر و یا غیرقابل سنجش

نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپی جنینها

نتایج حاصل از بررسی میکروسکوپیک مقاطع تهیه شده از مناطق مشابه مغز و نیز قطعات نخاعی مشابه جنینها و مقایسهٔ آنها نشان می‌دهند که: (۱) در مقایسهٔ با گروه کنترل در سازمانبندی بافت مغزی موجود در اطراف بطنهای مغز و نیز در نخاع جنینهای متعلق به گروه آزمایش بی‌نظمی وجود دارد. (۲) در مغز جنینهای گروه تجربی ناحیهٔ متانسفال تقریباً رشد نیافته است .(۳) عمق شیارهای اپی‌تالاموسی و هیپوتالاموسی در گروه آزمایش کمتر از گروه کنترل است (تصویر شمارهٔ ۱). (۳) در عقدهٔ شوکی نخاع گروه آزمایش آشفتگی مشاهده می‌شود (تصویر شمارهٔ ۲).

تصویر ۱: برش عرضی از ناحیهٔ شیار هیپوتالاموسی مغز جنین ۱۴ روزهٔ رت متعلق به گروه کنترل (a) و گروه آزمایشی (b) (x۸۰). همچنانکه مشاهده می‌شود عمق شیار هیپوتالاموسی در a بیشتر از b است.



تصویر ۲: تصویری از عقدهٔ شوکی نخاع جنین ۱۴ روزهٔ رت متعلق به گروه کنترل (a) و گروه آزمایشی (b) (x۱۶۰). همچنان که مشاهده می‌شود. نسبت به b، نورونهای گانگلیونی در a منظم‌تر و دارای درجهٔ تکامل بالاتری می‌باشند

بحث

۱ـ اثر هیپرگلیسمی مادری بر رشد و نمو جنین و بروز ناهنجاریهای جنینی:

در انسان هیپرگلیسمی مادری موجب تأخیر در رشد

در مراحل اولیهٔ رشد و نمو جنین می‌گردد. اندازه‌گیری فاصلهٔ سر ـ دم جنینهای انسان متعلق به مادران هیپرگلیسمیک در طی سه ماههٔ اوّل حاملگی تأخیر در رشد را مورد تأیید قرار می‌دهد (۳). نتایج حاصل از این تحقیق و مقایسهٔ آماری فاصلهٔ سر ـ دم در جنینهای گروه آزمایش و کنترل نیز حاکی از کاهش کاملاً چشمگیر ($p<0/0011$) فاصلهٔ سر ـ دم در جنینهای گروه آزمایش می‌باشد. علاوه‌براین اثرات هیپرگلیسمی مادری تنها به تأخیر در رشد محدود نمی‌شود بلکه موجب بروز ناهنجاریهای شدیدی از قبیل اگزانسفالی، باز بودن نوروپور قدامی و نقص در ناحیهٔ قفسهٔ سینهٔ (گردن) جنین می‌شود به طوریکه درصد بروز ناهنجاریهای جنینی در بین جنینهای گروه تجربی ۱۴٪ است (۶ جنین از ۴۴ جنین دارای ناهنجاری بودند) که در توافق با یافته‌های قبلی می‌باشد (۶). اگرچه محققین دیگر برای میزان بروز ناهنجاری درصدهای متفاوتی اعلام کرده‌اند ولی باید گفت که علت تفاوت در نتایج احتمالاً ناشی از اختلاف در سنّ جنینها، زمان تزریق دارو، نوع دارو و نوع حیوان می‌باشد. در این رابطه نشان داده شده است در رت دورهٔ تراتوژنیک هیپرگلیسمی بعد از روز هشتم حاملگی است (۹). سنّ جنین در میزان بروز ناهنجاری جنینی و تأخیر در رشد دارای اهمیّت زیادی است. با کاهش سنّ جنینهای مورد مطالعه درصد ناهنجاری و میزان تأخیر در رشد جنینها افزایش می‌یابد. در عین حال این احتمال وجود دارد که تعدادی از جنینهای با ناهنجاری شدید در مراحل بعدی سقط و یا جذب شوند. علاوه‌براین این امکان نیز وجود دارد که بعضی از جنبه‌های تأخیر در رشد که در مراحل اوّلیه به وجود می‌آیند در مراحل بعدی اصلاح گردند. در همین رابطه گزارش شده است که تعداد جنینهای غیرطبیعی در رتهایی که با استرپتوزوتوسین دیابتی شده‌اند از ۱۵٪ در روز ۱۳ه بارداری به ۳/۳٪ در روز ۲۰ بارداری تقلیل می‌یابد (۳).

از آن جایی که گلوکز آزادانه از جفت عبور کرده و به جنین می‌رسد این احتمال وجود دارد که ناهنجاریهای جنینی به وجود آمده ناشی از قرار گرفتن جنینها در معرض غلظت بالای گلوکز باشد. در این رابطه گزارش شده است که برای ایجاد تغییر در مورفوژنز جنینها، غلظت گلوکز باید ۸ تا ۹ برابر مقدار موجود در گروه کنترل باشد (۹). در پژوهش حاضر اندازه‌گیری غلظت گلوکز خون در رتهای گروه آزمایش نشان داد که غلظت گلوکز ۸ تا ۹ برابر گروه کنترل می‌باشد (جدول ۳). از این رو این احتمال وجود دارد که غلظت بالای گلوکز و یا سایر متابولیتهای احتمالی ناشی از هیپرگلیسمی موجب بروز ناهنجاریهای جنینی گردیده باشند.

۲- اثرات هیپرگلیسمی مادری بر ساختار میکروسکوپی سیستم عصبی مرکزی جنین:

یکی از نواحی جنینی که به شدّت تحت تأثیر هیپرگلیسمی مادری قرار می‌گیرد لولهٔ عصبی است. نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهند که هیپرگلیسمی و یا متابولیتهای ثانویهٔ ناشی از آن می‌توانند موجب بروز تأخیر در پدیده‌های تکثیر و مهاجرتهای سلولی و ایجاد اختلال و بی‌نظمی در این پدیده‌ها و در نتیجه مورفوژنز CNS گردند (اگزانسفالی و باز بودن نوروپور قدامی). در ارتباط با علّت باز باقی ماندن لولهٔ عصبی و اختلال در به هم چسبیدن سلولها می‌توان گفت که احتمالاً نقص و یا تأخیر در حرکتهای شکل‌ساز سلولی می‌تواند عامل بروز این اختلال باشد (۷).

بررسی مقاطع میکروسکوپی تهیه شده از جنینهای گروه آزمایش حاکی از وجود اختلال و بی‌نظمی در در نورونهای نواحی ونتریکولار و مارژینال می‌باشد. بروز اختلال و بی‌نظمی در سازمانبندی نورونی احتمالاً ناشی از بروز اختلال در روند مهاجرت نورونی است. علاوه‌براین مقایسه جنینهای گروه آزمایش با جنینهای گروه کنترل حاکی از وجود تأخیری چشمگیر در رشد و نمو مغز می‌باشد. در رابطه با دلیل و یا دلایل بروز این اختلالات گزارشهای موجود نشان می‌دهند که کاهش روی (Zn) در سلولهای لایهٔ مارژینال و سلولهای لایهٔ ونتریکولار مغز احتمالاً می‌تواند با جلوگیری از مهاجرت سلولها و

نیز کاهش در سنتز DNA (بر اثر کاهش روی در ناحیهٔ سری جنینها) باعث بروز نقص در تشکیل لولهٔ عصبی گردد (۱ و ۳). علاوه‌براین در حضور غلظتهای بالای اسید بتا- هیدروکسی‌بوتیریک، نه تنها رشد و نمو CNS با تأخیر و به صورت غیرطبیعی انجام می‌شود بلکه باعث بروز ناهنجاری در وزیکولهای بینایی و شنوایی نیز می‌گردد (۸). اسید هیدروکسی بوتیریک یکی از اجسام ستنی با اثرات تراتوژنیک بالقوه می‌باشد (۱۰).

تقدیر و تشکر

به این وسیله از حمایتهای مالی حوزهٔ معاونت پژوهشی دانشگاه فردوسی مشهد که با اختصاص بودجه لازم انجام این تحقیق را میسر ساختند، از سرکار خانم ایران جهانسوز، سرپرست محترم آزمایشگاه بیوشیمی دانشکدهٔ علوم مشهد، که در امر اندازه‌گیری قند خون همکاری لازم را مبذول فرمودند تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1- Aubrey Milunsky 1992, Maternal zinc can fetal neural tube defects. J.Teratology 46: 341-345.

2- Bailey J. L., Price S. R., England B. K., Jurkovitz C., Wang X., Ding X. and Mitch W. E., 1997 Signals regulating accelerated muscle protein catabolism in uremia. Mineral and Electrolyte Metabolism 23: 198-200.

3- Cohen A. M., and Rosenmann E. 1990, The Cohen Diabetic Rat. Karger, London.

4- Doi, Kunio, Junyamanouchi, Eisuko Kume and Akira Yasoshima 1997, Morphologic changes in hepatocyte nuclei of streptozotocin (SZ)-induced diabetic mice. Experimental and Toxicologic Pathology 49: 295-299.

5- Erikson U. J., 1983, Diabetes in pregnancy. Diabetes 32: 1141-1145.

6- Erikson U. J., and Hacanborg L. A., 1993, Diabet and embryonic malformation. Diabetes 42: 411-419.

7- Granham E. A., Beck F. 1983, Effects of glucose on rat embroys in culture. J. Diabetologia 25: 291-295.

8- Horton W. E., and Sadler T. W., 1983, Effects of maternal diabets on early embryogenesis. Diabetes 32: 610-615.

9- Hunter E. S., and Sadler T. 1992, The role of the viceral yolc sac in the hyperglycemia-induced embroypathies in mouse embroys in-vitro. Teratology 45: 195-203.

10- Moore D. C. P., 1987. Effects on rat embroys in-vitro culture in sera from human diabetic patients. Diabets Res. 5: 139-143.

11- Mulder E. J. H., and Risser G. H. A., 1992, Empact of early growth delay on subsequent fetal growth and functional development on diabetic pregnancy. Early Human Development 31: 91-95.

12- Pepato M. T., Migliorini R. H., Goldberg A. L. and Kettelhut I. C., 1996, Role of different proteolytic pathways in degredation of muscle protein from streptozotoci -diabetic rats. Am.J. of Physiology 271: E340-E347.

13- Salder L. S., 1995, Diabetic Possible pathogenesis. Am. J.embryopathy: Med. Genet. 55: 363-6