

## Original Paper

# Effect of induced gestational diabetes on TBX20 gene expression in the heart of the 11.5-day-old embryo of the C57BL/6 mouse

Zeynab Alinezhad, M.Sc in Anatomy, Faculty of Medicine, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

ORCID 0000-0002-4501-0566

Masoud Gosalipour (Ph.D), Associate Professor, Medical Cellular and Molecular Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran.

ORCID 0000-0002-3429-5519

\*Mohammad Jafar Gosalipour (Ph.D), Corresponding Author, Professor, Gorgan Congenital Malformations Research Center, Golestan University of Medical Sciences, Gorgan, Iran. E-mail: [mjgosalipour@yahoo.com](mailto:mjgosalipour@yahoo.com)

ORCID 0000-0002-0646-7096

## Abstract

**Background and Objective:** Diabetes mellitus is one of the most common metabolic and global health threats. The gene needed for the development of the TBX20 gene is the fusion of the gene, and the defect in the sequence and expression of this gene also causes heart defects. Due to significant prevalence of gestational diabetes mellitus in human population, this study was done to evaluate the effect of TBX20-induced gestational diabetes mellitus in the heart of the mice embryo at 11.5 days.

**Methods:** This experimental study was done on induced diabetic C57BL/6 female mice. Gestational diabetes induced by interaperitoneal injection of streptozotocin at GD1. On the day of pregnancy 11.5, embryonic heart samples from these mice were isolated. After extraction of RNA, cDNA synthesis of RNA was performed. The Real Time-PCR technique was used to determine the expression of TBX20 gene. Expression level of TBX20 gene in experimental and control was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method.

**Results:** Expression of TBX20 gene in diabetic specimens was twice as high as the control samples, which was statistically significant ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** It seems, increasing TBX20 gene expression in embryonic heart tissue may be one of the complications of gestational diabetes mellitus and can lead to abnormalities in the heart embryo.

**Keywords:** Gestational Diabetes, TBX20 gene, Heart, Embryonic Development

Received 20 Jun 2020

Revised 19 Sep 2020

Accepted 20 Sep 2020

Cite this article as: Alinezhad Z, Gosalipour M, Gosalipour MJ. [Effect of induced gestational diabetes on TBX20 gene expression in the heart of the 11.5-day-old embryo of the C57BL/6 mouse]. J Gorgan Univ Med Sci. 2021 Winter; 22(4): 48-53. [Article in Persian]

## اثر دیابت بارداری القا شده بر بیان ژن TBX20 در قلب رویان ۱۱/۵ روزه

### موش آزمایشگاهی نژاد C57BL/6

ORCID 0000-0002-4501-0566

زینب علی نژاد، دانش آموخته کارشناسی ارشد رشته علوم تشریحی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

ORCID 0000-0002-3429-5519

دکتر مسعود گلعلی پور، دانشیار، مرکز تحقیقات سلولی مولکولی، دانشکده علوم فناوری های نوین، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

ORCID 0000-0002-0646-7096

\* دکتر محمدجعفر گلعلی پور، استاد، مرکز تحقیقات ناهنجاری های مادرزادی گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، گرگان، ایران.

### چکیده

**زمینه و هدف:** یکی از شایع ترین اختلالات متابولیسمی و تهدید کننده سلامت جهانی دیابت است. از ژن های مورد نیاز برای تکوین قلب جنین ژن *TBX20* است که نقص در توالی و بیان این ژن نیز سبب ایجاد نقص های قلبی می گردد. با توجه به شیوع قابل توجه دیابت بارداری در جمعیت انسانی، این مطالعه به منظور تعیین اثر دیابت بارداری القا شده بر بیان ژن *TBX20* در قلب رویان ۱۱/۵ روزه موش آزمایشگاهی انجام شد.

**روش بررسی:** این مطالعه تجربی روی ۱۲ سر موش آزمایشگاهی ماده نژاد *C57BL/6* انجام شد. پس از القای دیابت به موش های باردار، در روز ۱۱/۵ بارداری، نمونه های قلب رویان های حاصل از این موش ها جدا سازی شدند. پس از استخراج *RNA* سنتز *cdNA* از *RNA* انجام گردید. برای بررسی میزان بیان ژن *TBX20* از تکنیک *Real-time-PCR* استفاده شد. اختلاف بیان ژن *TBX20* بین نمونه های کنترل و دیابتی با توجه به روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  محاسبه شد.

**یافته ها:** میزان بیان ژن *TBX20* در نمونه های دیابتی نسبت به نمونه های کنترل به میزان ۲ برابر افزایش معنی داری نشان داد ( $P < 0/05$ ).

**نتیجه گیری:** احتمالاً افزایش بیان ژن *TBX20* در بافت قلبی رویان ۱۱/۵ روزه در اثر القاء دیابت بارداری می تواند سبب ناهنجاری های قلبی در جنین ها گردد.

**کلید واژه ها:** دیابت بارداری، ژن *TBX20*، قلب، تکامل

\* نویسنده مسؤل: دکتر محمدجعفر گلعلی پور، پست الکترونیکی [mjgotalipour@yahoo.com](mailto:mjgotalipour@yahoo.com)

نشانی: گرگان، دانشگاه علوم پزشکی گلستان، مرکز آموزشی درمانی شهید صیاد شیرازی، مرکز تحقیقات ناهنجاری های مادرزادی گرگان، تلفن ۰۱۷-۲۲۲۰۲۵۶۵

وصول مقاله: ۱۳۹۹/۳/۳۱، اصلاح نهایی: ۱۳۹۹/۶/۲۹، پذیرش مقاله: ۱۳۹۹/۶/۳۰

### مقدمه

سیستم های در حال رشد عضو تاثیر گذارد. نقایص لوله عصبی و ناهنجاری های قلبی - عروقی شایع ترین و شدیدترین ناهنجاری های مادرزادی مرتبط با بارداری هستند. نقص سپتوم دهلیزی بطنی، سندرم قلبی هیپوپلاستی چپ و تاندونوس آترتریوس مداوم، جزء شایع ترین ناهنجاری های قلبی هستند که در مطالعات بالینی شناسایی شده اند (۸ و ۷). براساس یک مطالعه مروری و بررسی های انجام شده در میان این اختلالات، نقص های قلبی عمدتاً در بچه ها و سپتوم های قلب را درگیر نموده (۹) و شکست در شکل گیری *TBX20* نیز نقص های قلبی فوق الذکر را ایجاد می کند (۱۰). یکی از بیماری هایی که *TBX20* در آن نقش دارد؛ نقص دیواره دهلیزی نوع ۴ (ASD4) است. همچنین یک مطالعه نشان دهنده ارتباط جهش در ژن *TBX20* با نقایص دیواره دهلیزی و نقایص دریچه ای قلب است (۱۱). با توجه به شیوع قابل توجه دیابت بارداری در جمعیت انسانی، این مطالعه به منظور تعیین اثر دیابت بارداری القا شده بر بیان ژن *TBX20* در قلب رویان ۱۱/۵ روزه موش آزمایشگاهی انجام شد.

دیابت یکی از شایع ترین عوارض بالینی دوران بارداری است که شیوع آن از یک تا ۱۴ درصد در نقاط مختلف جهان بیان شده است شیوع این بیماری در ایران ۱/۲ تا ۸/۹ گزارش شده است (۱ و ۲).

معمولاً دیابت بارداری در نیمه دوم بارداری رخ می دهد و طی ۱۰ تا ۲۰ سال گذشته شیوع آن روند افزایشی داشته و میزان بروز آن از ۱/۷ درصد تا ۱۱/۶ درصد بر حسب سن بارداری، جنسیت، قومیت و سن مادر متفاوت است (۳). امبریوپاتی دیابتی یک چالش بالینی است. دیابت نوع یک و دو خطر تکامل غیرطبیعی جنین را افزایش می دهند (۴). دیابت بارداری با افزایش آنومالی های مادرزادی همراه نیست؛ اما ممکن است با عوارض دوران بارداری مختلفی مرتبط باشد که شامل ماکروزومی، افزایش مرگ و میر قبل از تولد و در حین زایمان شود که عامل مهمی در روند پیشرفت بارداری است (۵). ناهنجاری های مادرزادی عمده در نوزادانی که مادر دیابتیک داشته اند؛ بیش از نیمی از موارد مرگ و میرهای ناشی از حاملگی را در برمی گیرد (۶). جنین دیابتی می تواند بر تمام

## روش بررسی

این مطالعه تجربی روی موش‌های آزمایشگاهی نژاد C57BL/6 شامل ۱۲ سر موش ماده در سن ۸-۱۰ هفته و ۶ سر موش نر در مرکز تحقیقات پزشکی سلولی مولکولی وابسته به دانشگاه علوم پزشکی گلستان طی پاییز ۱۳۹۶ انجام شد.

مطالعه مورد تایید کمیته اخلاق در پژوهش دانشگاه علوم پزشکی گلستان (IR.GOUMS.RES.1395.156) قرار گرفت.

پروتکل کار بر روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید. موش‌های تهیه شده از انستیتو رازی به حیوانخانه دانشکده پزشکی منتقل شدند. حیوانات در شرایط استاندارد حیوانخانه با درجه حرارت ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد با دوره طبیعی (۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی) و دسترسی آزادانه به آب و غذا نگهداری شدند.

زمانی که موش‌ها به سن بلوغ و باروری رسیدند؛ برای جفتگیری به مدت ۲۴ ساعت در مجاورت موش‌های آزمایشگاهی نر (به نسبت ۲ ماده به یک نر) گذاشته شدند. تشخیص پلاک واژینال در موش‌های آزمایشگاهی ماده تایید کرد که جفتگیری صورت گرفته است و به‌عنوان روز صفر بارداری (E0.5) در نظر گرفته شد (۱۲). سپس موش‌های باردار به‌صورت تصادفی به دو گروه کنترل و دیابتی تقسیم شدند.

سطح گلوکز سرم موش‌های باردار با استفاده از گلوکومتر (ACCU-CHEK® Active Glucometer, Roche Diagnostics, Mann-heim, Germany) در روز اول مطالعه و ۷۲ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوسین (STZ) تعیین شد.

به موش‌های باردار در گروه دیابتی به منظور القاء دیابت در روز اول بارداری استرپتوزوسین به صورت تک دوز (۶۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم وزن بدن) به صورت داخل صفاقی تزریق شد. گروه دیابتی با سطح گلوکز خون میانگین حدود ۲۵۰ میلی‌گرم بر دسی‌لیتر، به‌عنوان (Gestational Diabetes Mellitus) GDM در نظر گرفته شدند. میزان گلوکز خون گروه کنترل نیز قبل و بعد از بارداری کنترل گردید (۱۳).

پس از گذشت ۱۱/۵ روز از بارداری، موش‌های دو گروه کنترل و دیابتی با روش در رفتگی مهره‌ای گردنی قربانی شدند. سپس رویان‌های حاصل از این موش‌ها (۳ رویان از ۳ موش مختلف برای هر دو گروه دیابتی و کنترل) با برش در ناحیه شکم (مشابه جراحی سزارین) خارج شدند. در مرحله بعد نمونه‌های قلب آنها با استفاده از ابزارهای ظریف قابل دسترس مانند سرسوزن سرنگ انسولین و تیغ بیستوری در زیر میکروسکوپ استروئو جداسازی شد. سپس نمونه‌ها بلافاصله به فریزر با دمای منفی ۸۰ درجه سانتی‌گراد منتقل شدند. نمونه‌ها با نیتروژن مایع هموژنایز شدند و RNA کل طبق

دستور پروتکل کیت مربوطه (Ambion-Invitrogene) و کیت cdDNA ایران، از شرکت سینا کلون از نمونه استخراج شد. سپس نسخه‌برداری معکوس (cdDNA) از mRNA حاصل از نمونه‌ها با استفاده از دستور پروتکل کیت مورد نظر انجام شد. در مرحله بعد نمونه‌ها در دستگاه ترموسایکلر قرار داده شدند و طبق دستورالعمل کیت برنامه اجرا شد. برای اندازه‌گیری میزان بیان mRNA ژن TBX20 از تکنیک Real Time-PCR استفاده گردید.

در نهایت برای بررسی بیان ژن هدف و کنترل داخلی، CT های مربوط به واکنش Real time PCR استخراج و ثبت شد. در نهایت اختلاف بیان ژن TBX20 بین نمونه‌های کنترل و دیابتی با توجه به فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  و بر اساس Fold change توسط نرم‌افزار Microsoft Excel محاسبه گردید.

داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار آماري SPSS-16 تجزیه و تحلیل شدند. نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون کلموگروف-اسمیرونف تعیین شد. سپس تغییرات با استفاده از t-test گزارش گردید. سطح معنی‌داری داده‌ها کمتر از ۰/۰۵ در نظر گرفته شد. مقدار بیان ژن TBX20 با دو روش محاسباتی (Livak)  $2^{-\Delta\Delta CT}$  و  $2^{-\Delta CT}$  اندازه‌گیری شد. در روش Livak بعد از محاسبه از طریق فرمول زیر میزان چند برابر شدن بیان ژن TBX20 نسبت به بیان S18 در نمونه‌های دیابتی نسبت به کنترل به دست آمد.

$$\Delta CT (TBX20) = CT (TBX20, Diabetes) - CT (S18, Diabetes)$$

$$\Delta CT (Control) = CT (TBX20, Control) - CT (S18, Control)$$

Second, normalize the  $\Delta CT$  of the test sample to the  $\Delta CT$  of the calibrator:

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (Diabetes) - \Delta CT (Control)$$

Finally, calculate the expression ratio:

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{Normalized expression ratio}$$

هر کدام از نمونه‌ها را به صورت تریپلیکیته گذاشته و میانگین داده‌ها را برای ژن هدف و کنترل داخلی وارد فرمول  $2^{-\Delta\Delta CT}$  کردیم و از نرم‌افزار EXCEL برای محاسبه فرمول استفاده و نتایج نمودار مربوطه رسم گردید.

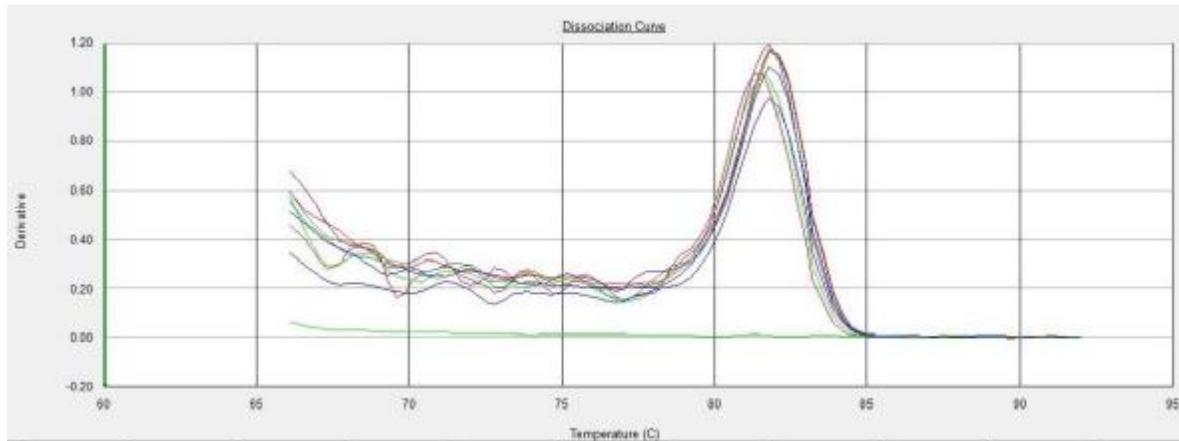
## یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی کیفیت RNA استخراج شده با روش الکتروفورز، باندهای 18S rRNA و 28S rRNA (صحت استخراج RNA و کیفیت خوب) در شکل یک آمده است.

بیک مشاهده شده در منحنی ذوب آغازگر برای هر محصول، بیانگر وجود یک محصول ویژه و تکثیر اختصاصی بود (نمودار یک).

CT های حاصل از Real Time-PCR برای سه نمونه دیابتی و سه نمونه کنترل به دست آمد. برای هر نمونه سه بار تکرار صورت گرفت (جدول یک).

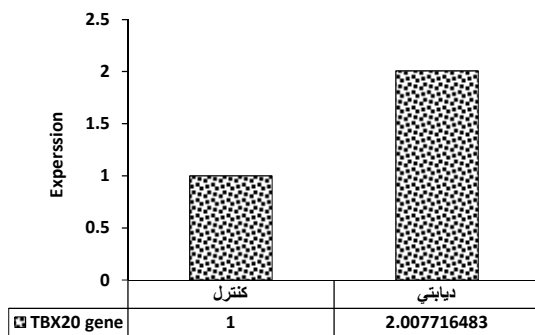
میزان بیان ژن TBX20 در نمونه‌های دیابتی نسبت به نمونه‌های



نمودار ۱: منحنی ذوب (melting Curve) مربوط به بیان ژن TBX20

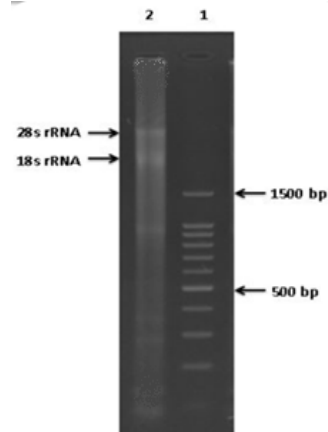
جدول ۱: CT های حاصل از Real Time-PCR برای نمونه‌های کنترل و دیابتی

گروه‌ها	ژن	نمونه اول	نمونه دوم	نمونه سوم
دیابتی	CT TBX20	۲۹/۰۱	۲۴/۰۶	۲۵/۰۷
	CT s18	۲۲/۲۱	۱۷/۲۲	۲۰/۰۷
کنترل	CT TBX20	۲۳/۳۷	۲۳/۶۱	۲۲/۹۸
	CT s18	۱۶/۱۰	۱۵/۳۰	۱۵/۰۷



نمودار ۲: میزان بیان ژن TBX20 در نمونه‌های دیابتی نسبت به نمونه‌های کنترل

شکل ۱: نتیجه الکتروفورز Total RNA بر روی ژل یک درصد و مشاهده دو باند متعلق به 28S rRNA و 18S rRNA



مطالعاتی دیابت یا دیابت بارداری را به عنوان یک عامل تراژون بر روی تکوین قلب بررسی کرده‌اند (۱۵ و ۱۲) و مطالعات محدودی در رابطه با ژن‌های گروه TBX و اهمیت آنها در قلب و بیماری‌های قلبی ناشی از دیابت انجام شده است (۱۱ و ۱۶ و ۱۷). در مطالعه Chakraborty و همکاران که روی قلب موش بزرگسال انجام شد؛ افزایش بیان TBX20 موجب تکثیر کاردیومیوسایت و در نتیجه باعث افزایش کاردیومیوسایت‌های کوچک، گرد و تک هسته‌ای گردید (۱۸).

در مطالعه حاضر افزایش بیان دو برابری ژن TBX20 در بافت قلبی نشان می‌دهد که احتمالاً دیابت در دوران بارداری با افزایش میزان بیان TBX20 در ارتباط است و می‌تواند سبب ایجاد ناهنجاری‌های گردد. TBX20 باعث فعال شدن مسیره‌های

کنترل به میزان ۲ برابر افزایش نشان داد و این تغییر از نظر آماری معنی‌دار بود ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۲).

### بحث

با توجه به نتایج این مطالعه بیان ژن TBX20 در نمونه‌های بافت قلب جنینی که مادر دیابتی داشتند؛ دو برابر بیشتر از نمونه‌های کنترل بود.

در میان تمام اختلالات مادرزادی نقایص مادرزادی قلب با شیوع ۳/۵ برابر بیشتر از جمعیت غیردیابتی رایج‌ترین نوع ناهنجاری‌ها است. در میان این اختلالات، نقص‌های قلبی عمدتاً در پیچ‌ها و سپتوم‌های قلب را درگیر می‌کند (۹). در نقص‌های قلبی اتیولوژی چندعاملی از جمله وراثت و محیط نقش دارند (۱۴)؛ اما علت دقیق این نقص‌ها هنوز نامشخص است.

احتمالی دیابت مادری قرار گرفته است و اثرات تراتوژنیک خود را به این صورت نشان داده است. همچنین مطالعه Liang و همکاران نشان داد که الگوی بیان ژن‌های TBX20، TBX5 و HAS2 در حلقه قلبی اولیه در اثر افزایش گلوکز خون در مدل آزمایشگاهی دچار تغییر می‌شود. استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت نیز می‌تواند باعث افزایش رادیکال‌های آزاد گردد و در نتیجه اثرات تراتوژنیک از خود نشان دهند (۱۹). اگرچه مطالعات دیگری نشان داده که افزایش گلوکز بیان ژن‌های کلیدی در روند اتوفازای از جمله LC3B در جنین‌های جوجه شده و اتوفازای نقش فعالی در روند ایجاد ناهنجاری‌های لوله قلبی در هیپرگلیسمی ایفا می‌کند (۲۰).

از محدودیت‌های این مطالعه می‌توان به عدم بررسی بافت‌شناسی و مورفولوژیکی سطح بافت اشاره نمود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی رشد قلب در سایر روزهای جنینی (۷/۵-۱۵/۵) نیز مورد بررسی قرار گیرد و نیز اثر دیابت بارداری بر بیان سایر ژن‌ها مطالعه گردد.

### نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که افزایش بیان ژن TBX20 در بافت قلبی جنین یکی از عوارض دیابت بارداری است که می‌تواند موجب به‌وجود آمدن ناهنجاری‌های قلبی گردد.

### تشکر و قدردانی

این مطالعه نتیجه طرح تحقیقاتی (شماره ۹۵۰۷۰۶۱۶۳) مصوب معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود و با حمایت مالی آن معاونت محترم به انجام رسید. همچنین نتیجه پایان‌نامه خانم زینب علی نژاد رکنی برای اخذ درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم تشریحی از دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی گلستان بود.

### References

- Shahdadi H, Mohammad Pour Hodki R, Rahnama M, Dindar M, Mastalizadeh H. [Study BMI and demographic variables in pregnant women with gestational diabetes]. *J Diabetes Nurs*. 2015; 3(3): 42-50. [Article in Persian]
- Tamayo T, Tamayo M, Rathmann W, Potthoff P. Prevalence of gestational diabetes and risk of complications before and after initiation of a general systematic two-step screening strategy in Germany (2012–2014). *Diabetes Res Clin Pract*. 2016 May; 115: 1-8. DOI: 10.1016/j.diabres.2016.03.001
- Ornoy A, Ratzon N, Greenbaum C, Wolf A, Dulitzky M. School-age children born to diabetic mothers and to mothers with gestational diabetes exhibit a high rate of inattention and fine and gross motor impairment. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2001; 14(Suppl 1): 681-89. DOI: 10.1515/jpem.2001.14.s1.681
- Eriksson UJ, Wentzel P. The status of diabetic embryopathy. *Ups J Med Sci*. 2016 May; 121(2): 96-112. DOI: 10.3109/03009734.2016.1165317
- Christianson A, Howson C, Modell B. March of Dimes global report on birth defects: the hidden toll of dying and disabled children. New York: The March of Dimes Birth Defects Foundation. 2006.

سیگنالینگ PI3K / AKT / GSK3 $\beta$  /  $\beta$ -catenin و BMP2 / pSmad1 / 5/8 همراه با افزایش تکثیر سلولی می‌شود. لذا بیان بیش از حد TBX20 در دوره جنینی، باعث افزایش کاردیومیوسایت‌های نابالغ و در نتیجه ناهنجاری‌های قلبی می‌شود. تغییراتی که در توالی ژن TBX20 به وجود می‌آید؛ منجر به ایجاد ناهنجاری‌های قلبی در جنین می‌گردد (۱۸). Stennard و همکاران نشان دادند که TBX20 به عنوان ژن هدف در T-BOX، نقش اصلی در تکامل عملکرد قلب دارد و از دست دادن TBX20 منجر به مرگ جنین در اواسط بارداری با مورفوزن به شدت غیرطبیعی در قلب می‌شود. جهش در ژن TBX20 با بیماری‌های گوناگون قلبی، از جمله نقص در septation، valvulogenesis و کاردیومیوپاتی مرتبط است (۱۶). مطالعه Monroy-Muñoz و همکاران نشان داد که سه جهش (M395R, Y309D, T370O) در دامنه فعال شدن رونویسی از ژن TBX20 در مبتلایان به ASD همراه بوده است (۱۷). این مطالعات اهمیت ژن TBX20 در تکوین قلب را بیان می‌کنند (۱۶ و ۱۷).

عوامل تراتوژنیک در دوران بارداری می‌توانند در ناهنجاری‌های قلبی نقش داشته باشند. دیابت نیز دارای اثرات تراتوژنیک بر روی جنین است (۱۵). نتایج مطالعه Corrigan و همکاران نشان داد که ناهنجاری‌های قلبی به دنبال هر دو نوع دیابت ۱ و ۲ در مادران اتفاق می‌افتد و با افزایش ۵ برابری در جنین‌های مادران مبتلا به دیابت همراه است. مکانیسم دقیق نشان دهنده اثرات تراتوژنیک دیابت بارداری کاملاً مشخص نشده؛ اما عوارض آن در آسیب جنین حین دوران بارداری نقش داشته‌اند. نقص قلبی جنین با سطح هموگلوبین گلیکوزیله مادر در ارتباط است (۱۵). مکانیسم دقیقی که دیابت اثرات تراتوژنیک ایجاد می‌کند و موجب نواقص در جنین می‌شود؛ نامشخص است. در مطالعه ما افزایش بیان ژن TBX20 تحت تاثیر

- Correa A, Gilboa SM, Besser LM, Botto LD, Moore CA, Hobbs CA, et al. Diabetes mellitus and birth defects. *Am J Obstet Gynecol*. 2008 Sep; 199(3): 237. e1-9. DOI: 10.1016/j.ajog.2008.06.028
- Reece EA, Homko CJ, Wu YK, Wiznitzer A. The role of free radicals and membrane lipids in diabetes-induced congenital malformations. *J Soc Gynecol Investig*. 1998 Jul-Aug; 5(4): 178-87. DOI: 10.1016/s1071-5576(98)00008-2
- Wentzel P, Eriksson UJ. Antioxidants diminish developmental damage induced by high glucose and cyclooxygenase inhibitors in rat embryos in vitro. *Diabetes*. 1998 Apr; 47(4): 677-84. DOI: 10.2337/diabetes.47.4.677
- Reller MD, Strickland MJ, Riehle-Colarusso T, Mahle WT, Correa A. Prevalence of congenital heart defects in metropolitan Atlanta, 1998-2005. *J Pediatr*. 2008 Dec; 153(6): 807-13. DOI: 10.1016/j.jpeds.2008.05.059
- Øie E, Sandberg WJ, Ahmed MS, Yndestad A, Lærum OD, Attramadal H, et al. Activation of Notch signaling in cardiomyocytes during post-infarction remodeling. *Scand Cardiovasc J*. 2010 Dec; 44(6): 359-66. DOI: 10.3109/14017431.2010.511256

11. Sakabe NJ, Aneas I, Shen T, Shokri L, Park SY, Bulyk ML, et al. Dual transcriptional activator and repressor roles of TBX20 regulate adult cardiac structure and function. *Hum Mol Genet.* 2012 May; 21(10): 2194-204. DOI: 10.1093/hmg/dds034
12. Jacobson JD, Cousins L. A population-based study of maternal and perinatal outcome in patients with gestational diabetes. *Am J Obstet Gynecol.* 1989 Oct; 161(4): 981-86. DOI: 10.1016/0002-9378(89)90767-9
13. Ornoy A, Zaken V, Kohen R. Role of reactive oxygen species (ROS) in the diabetes induced anomalies in rat embryos in vitro: Reduction in antioxidant enzymes and low molecular weight antioxidants (LMWA) may be the causative factor for increased anomalies. *Teratology.* 1999; 60(6): 376-86. DOI: 10.1002/(SICI)1096-9926(199912)60:6<376::AID-TERA10>3.0.CO;2-Q
14. Suluba E, Shuwei L, Xia Q, Mwanga A. Congenital heart diseases: genetics, non-inherited risk factors, and signaling pathways. *Egypt J Med Hum Genet.* 2020; 21: 11. DOI: 10.1186/s43042-020-0050-1
15. Corrigan N, Brazil DP, McAuliffe F. Fetal cardiac effects of maternal hyperglycemia during pregnancy. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2009 Jun; 85(6): 523-30. DOI: 10.1002/bdra.20567
16. Stennard FA, Costa MW, Lai D, Biben C, Furtado MB, Solloway MJ, et al. Murine T-box transcription factor Tbx20 acts as a repressor during heart development, and is essential for adult heart integrity, function and adaptation. *Development.* 2005 May; 132(10): 2451-62. DOI: 10.1242/dev.01799
17. Monroy-Muñoz IE, Pérez-Hernández N, Rodríguez-Pérez JM, Muñoz-Medina JE, Angeles-Martínez J, García-Trejo JJ, et al. Novel mutations in the transcriptional activator domain of the human TBX20 in patients with atrial septal defect. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 718786. DOI: 10.1155/2015/718786
18. Chakraborty S, Sengupta A, Yutzey KE. Tbx20 promotes cardiomyocyte proliferation and persistence of fetal characteristics in adult mouse hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2013; 62: 203-13. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.05.018
19. Liang J, Gui Y, Wang W, Gao S, Li J, Song H. Elevated glucose induces congenital heart defects by altering the expression of tbx5, tbx20, and has2 in developing zebrafish embryos. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.* 2010 Jun; 88(6): 480-86. DOI: 10.1002/bdra.20654
20. Wang G, Huang WQ, Cui SD, Li Sh, Wang XY, Li Y, et al. Autophagy is involved in high glucose-induced heart tube malformation. *Cell Cycle.* 2015; 14(5): 772-83. DOI: 10.1080/15384101.2014.1000170