

Effect of regular exercise and vitamin C on pain threshold in diabetic rats

Bigdeli Y(M.Sc)¹, Heidarianpour A(PhD)^{1*}

1- Department of Sport Sciences, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran

Received: 8 Jul 2011, Accepted: 29 Nov 2011

Abstract

Background: Peripheral neuropathy is a common complication associated with diabetes mellitus. It has been shown that oxidative stress is an important etiological factor in neuropathy which contributes to its development; however, the exact pathophysiology underlying this complication is not fully understood. This study was designed to examine the effect of regular exercise and vitamin C administration on pain threshold in rats.

Materials and Methods: In this experimental study, 36 male Wistar rats (220±10 g) were allocated to control and diabetic (control, vitamin C, exercise, and exercise+ vitamin C) groups. Diabetes was induced by the subcutaneous administration of streptozotocin (60 mg/kg). A week after the induction of diabetes, the rats were subjected to swimming training and vitamin C treatment for 8 weeks. At the end of weeks 3, 5, and 8, Tail-Flick test was done on the rats to assess pain threshold. Data were analyzed using SPSS software.

Results: Diabetes significantly decreased pain threshold in the rats. Diabetes-induced hyperalgesia was significantly decreased by training and vitamin C. Concurrent effects of training and vitamin C on thermal pain threshold were significantly higher than each of them alone.

Conclusion: Regular exercise together with vitamin C administration can be a proper method for preventing thermal hyperalgesia associated with diabetes. Therefore, they can be effective in the treatment and management of pain.

Keywords: Diabetes, Diabetic neuropathy, Pain threshold, Regular exercise, Vitamin C

*Corresponding author:

Address: Department of Sport Sciences, Bu Ali Sina University, Hamedan, Iran
Email: Heidarian317@gmail.com

بررسی اثرات تمرینات ورزشی منظم و ویتامین C بر آستانه درد موش‌های دیابتی

یحیی بیگدلی¹، علی حیدریان پور^{2*}

- 1- کارشناس ارشد فیزیولوژی ورزش، گروه علوم ورزش، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران
2- استادیار، دکترای تخصصی فیزیولوژی، گروه علوم ورزش، دانشگاه بوعلی سینا، همدان، ایران

تاریخ دریافت: 90/4/18 تاریخ پذیرش: 90/9/9

چکیده

زمینه و هدف: نوروپاتی محیطی یکی از عوارض شایع دیابت ملیتوس می‌باشد. از طرفی نشان داده شده است که استرس اکسیداتیو، یکی از عوامل مهم در ایجاد و پیشرفت نوروپاتی در دیابت می‌باشد با این حال پاتوفیزیولوژی دقیق آن مشخص نشده است. در این مطالعه اثرات تمرینات ورزشی منظم و مصرف ویتامین C روی آستانه درد موش‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه تجربی موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار به تعداد 36 سر در محدوده وزنی 220 ± 10 گرم به گروه‌های کنترل و دیابتی (کنترل، با مصرف ویتامین C، ورزشیده و با مصرف ویتامین C توام با انجام ورزش) تقسیم شدند. گروه دیابتی با تزریق زیر جلدی داروی استرپتوزوتوسین (60 میلی‌گرم/کیلوگرم) دیابتی شدند. یک هفته بعد از القای دیابت، حیوانات تحت تمرینات منظم ورزشی شنا و مصرف ویتامین C به مدت 8 هفته قرار گرفتند. در پایان هفته سوم، پنجم و هشتم از حیوانات تست تیلک فلیک جهت اندازه‌گیری آستانه درد به عمل آمد. داده‌های جمع‌آوری شده نیز با استفاده از نرم افزار SPSS تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: دیابت به طور معنی‌داری آستانه درد موش‌ها را کاهش داد. تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین C، هیپرالژزی ناشی از دیابت را به طور معنی‌داری کاهش دادند و اثرات توام تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین C در کاهش آستانه درد بیشتر از اثر هر یک از آنها به تنهایی می‌باشد.

نتیجه‌گیری: تجویز تمرینات منظم ورزشی و ویتامین C در دیابت می‌تواند روش مناسبی برای پیش‌گیری هیپرالژزی ناشی از آن باشد در نتیجه برای درمان و کنترل درد مفید می‌باشند.

واژگان کلیدی: دیابت، نوروپاتی دیابتی، آستانه درد، ورزش منظم، ویتامین C

*نویسنده مسئول: همدان، دانشگاه بوعلی سینا، گروه تربیت بدنی و علوم ورزشی

مقدمه

امروزه دیابت به سبب پیامدهای فراوان و ایجاد معلولیت‌های مختلف به عنوان یک بیماری ناتوان کننده شناخته شده است (1). دیابت موجب استرس اکسیداتیو و تبعات ناشی از آن می‌شود (2). یکی از بارزترین پیامدهای استرس اکسیداتیو القا شده توسط دیابت، نوروپاتی دیابتی است (3). استرس اکسیداتیو حاصل از دیابت موجب آسیب به سلول‌های عصبی شده و موجب نوروپاتی و درد می‌شود (4). از طرف دیگر مطالعات نشان دادند که گلوکز از طریق اتصال غیر آنزیمی با گروه آمینی پروتئین، ترکیبات پایدار ماکرو مولکولی در داخل و خارج سلول تولید می‌کند که این ترکیبات موجب ادامه عوارض دیابتی از جمله نوروپاتی می‌گردد (5). در صورتی که بتوان از اتصال گلوکز به پروتئین جلوگیری کرد امید آن می‌رود که از بروز عوارض دیابتی کاسته شود. به نظر می‌رسد ویتامین C از طریق رقابت با گلوکز در اتصال با گروه آمینی پروتئین‌ها دارای چنین نقشی باشد (6). برخی مطالعات تاثیر مثبت ویتامین C را در کاهش گلبول قرمز گلیکوزیله یا میزان سوربیتول گلبول قرمز نشان داده‌اند (7). اما تعدادی از مطالعات نیز این شواهد را تایید نکردند (8) هم چنین مشخص شده است که ورزش منظم با شدت متوسط از طریق افزایش دفاع آنتی اکسیداتیو منجر به کاهش استرس اکسیداتیو و کاهش عوارض دیابت خواهد شد (9). علاوه بر این مشخص شده است که در اثر ورزش فعالیت سیستم ایمنی، رشد و کورتیکوتروپین افزایش می‌یابد که عامل تخفیف درد در پی ورزش شناخته شده‌اند. با این وجود در ورزش‌های شدید و حاد تولید رادیکال‌های آزاد افزایش یافته و دفاع آنتی اکسیداتیو کاهش می‌یابد (10). با توجه به مطالب فوق گمان می‌رود در کنار ورزش با شدت ملایم و متوسط در بعضی از موقعیت‌ها به ویژه در شرایط دیابتی که با افزایش استرس اکسیداتیو همراه است، ایمن تر خواهد بود که از یک ماده آنتی اکسیدانی استفاده گردد. با توجه به این که ویتامین C یک آنتی اکسیدان مهم بوده، بازایی و احیاء دیگر آنتی اکسیدان‌ها را نیز بر عهده دارد و همین طور برای

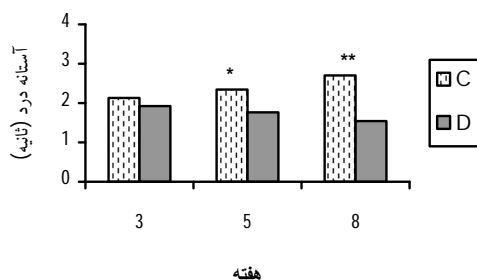
واکنش گلیکوزیلاسیون یک روند رقابتی با گلوکز دارد، می‌تواند پیشنهاد مناسبی برای تکمیل اثر ورزش باشد. بنابراین اثرات تمرینات ورزشی منظم و مصرف ویتامین C روی آستانه درد موش‌های دیابتی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی از موش‌های صحرایی نر نژاد ویستار در محدوده وزنی 220 ± 10 گرم استفاده گردید. حیوانات در شرایط استاندارد از نظر نور (12 ساعت روشنایی و 12 ساعت تاریکی)، دسترسی آزاد به آب و غذا و حرارت 25-20 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. تعداد هر گروه حداقل 6 سر می‌باشد. موش‌های مورد استفاده به 5 گروه: سالم کنترل (Sedentary control-SC)، دیابتی کنترل (Sedentary diabetic-SD)، دیابتی ورزشی (VitC-Diabetic)، دیابتی با انجام TD) و دیابتی با مصرف ویتامین C توأم با انجام ورزش (VitC-TD) تقسیم شدند.

به منظور ایجاد دیابت تجربی، از داروی استرپتوزوسین (60 میلی‌گرم بر کیلوگرم خریداری شده از شرکت سیگما) به صورت تک دوز استفاده شد. به این ترتیب که به ازای 1 گرم استرپتوزوسین، 9/5 میلی‌لیتر بافر سیترات با $pH = 4/5$ استریل به آن اضافه شد که پس از حل شدن محلول زرد رنگی به وجود آمد. برای تعیین دوز استرپتوزوسین تزریقی، حیوانات در ابتدا توزین شده سپس با اتر بی‌هوش گشته و قبل از تزریق استرپتوزوسین، با روش قطع دم از حیوان یک قطره خون گرفته و با استفاده از نواری قند خون و دستگاه گلوکز سنج قند خون ناشتا را اندازه گرفته و پس از آن استرپتوزوسین به صورت زیر جلدی در ناحیه پشت دو گوش تزریق می‌شد (11). سه روز پس از تزریق استرپتوزوسین، از حیوانات خون گرفته و با روش ذکر شده در بالا میزان قند خون حیوانات مشخص گردید. حیواناتی که قند خون آنها بیشتر از 300 میلی‌گرم بر دسی‌لیتر بود به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند (11).

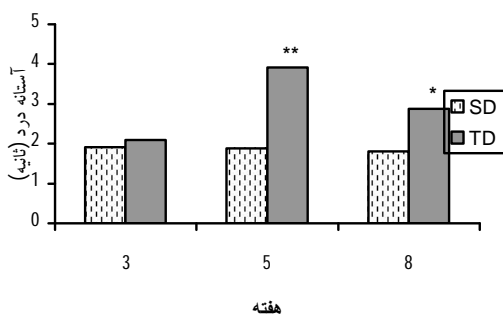
اندازه‌گیری‌ها نشان داد دیابت القاء شده توسط استرپتوزوتوسین موجب کاهش معنی‌دار آستانه درد در موش‌های دیابتی (SD) در مقایسه با موش‌های سالم (SC) در پایان 5 هفته ($p < 0/05$) و 8 هفته ($p < 0/01$) پس از القای دیابت شد در حالی که در پایان 3 هفته اثر معنی‌داری روی آستانه درد نداشت (نمودار 1).



نمودار 1. مقایسه آستانه درد در انتهای هفته سوم، پنجم و هشتم از برنامه تمرین ورزشی شنا

اثر ورزش بر روی آستانه درد در موش‌های دیابتی

ورزش هوازی (شنا) باعث افزایش در آستانه درد در موش‌های تمرین کرده دیابتی (TD) در مقایسه با موش‌های دیابتی کنترل (SD) شد. اندازه‌گیری‌ها در پایان 5 هفته ($p < 0/01$) و 8 هفته ($p < 0/05$) نشان‌گر افزایش معنی‌دار آستانه درد در موش‌های تمرین کرده دیابتی در مقایسه با موش‌های دیابتی کنترل بود. در پایان 3 هفته اگر چه تفاوت وجود داشت ولی معنی‌دار نبود (نمودار 2).



نمودار 2. مقایسه آستانه درد در انتهای هفته سوم، پنجم و هشتم از برنامه تمرین ورزشی شنا. $p < 0/01$ ، $p < 0/05$ *

جهت انجام تمرینات بدنی و ورزش در حیوانات، ابتدا سه روز به مدت 15 دقیقه در درون آب 32 درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند تا با شرایط ورزشی آشنا شوند. پس از آن پروتکل منظم ورزش که به مدت 8 هفته، 5 روز در هفته بود شروع شد. در سه هفته اول حیوانات مورد نظر 60 دقیقه سپس در دو هفته دوم 90 دقیقه و نهایتاً در سه هفته آخر به مدت 120 دقیقه درون آب قرار گرفته و شنا کردند (12). 48 ساعت در پایان هر دوره به حیوانات استراحت داده شد و سپس از گروه‌های آزمایشی مختلف تست سنجش آستانه درد با استفاده از دستگاه تیلک فلیک به عمل آمد.

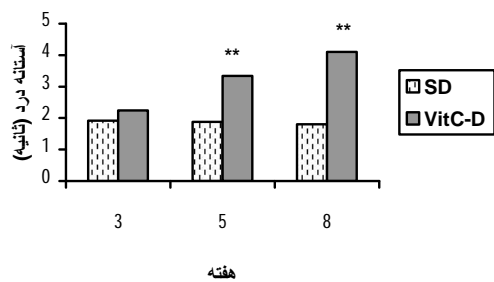
10 گرم ویتامین C در یک لیتر آب محلول شده و به طور مستمر در دسترس حیوانات قرار گرفت.

برای اندازه‌گیری تغییر آستانه درد حرارتی از آزمون تیلک فلیک استفاده گردید. این آزمون بر اساس روش D, Amour و Smith استفاده شد (13). شدت نور دستگاه طوری تنظیم شد که زمان متوسط پاسخ دهی پایه بین 4 تا 5 ثانیه باشد و زمان 12 ثانیه به عنوان زمان قطع تابش نور به ثلث میانی دم حیوان (cut of time) در نظر گرفته شد. زمان تاخیر پاسخ دهی (Tail-Flick Latency) یا آستانه درد در گروه‌های مختلف بر حسب ثانیه اندازه‌گیری شد. پروتکل این تحقیق بر اساس قوانین بین المللی در مورد حیوانات آزمایشگاهی و کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی دانشگاه بوعلی سینا همدان با شماره 32-145 انجام گردید.

جهت تجزیه و تحلیل آماری بین دو گروه از آزمون تی مستقل غیر جفت و بین گروه‌ها از آنالیز واریانس با اندازه‌گیری‌های مکرر دو طرفه جهت مقایسه داده‌های گروه‌ها استفاده شد. کلیه عملیات آماری نیز با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه 15 انجام شد و سطح معنی‌داری داده‌ها کمتر از 0/05 در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

اثر دیابت بر روی آستانه درد



نمودار 4. مقایسه آستانه درد در انتهای هفته سوم، پنجم و هشتم از برنامه تمرین ورزشی شنا. $p < 0/01$ **

بحث

نتایج این تحقیق نیز نشان داد که احساس درد در حیوانات دیابتی افزایش یافته و هم‌چنین تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین C هیپرالژزی ناشی از دیابت را به طور معنی‌داری کاهش داده و اثرات توأم تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین C در کاهش آستانه درد بیشتر از اثر هر یک آنها به تنهایی می‌باشد. تغییر در احساس درد در مدل‌های مختلف دیابت تجربی مشاهده شده است (14). آستانه درد موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه کنترل سالم به شکل معنی‌داری پایین‌تر از آستانه درد موش‌های سالم کنترل بود. اگر چه مطالعاتی نیز وجود دارد که نشان دهنده افزایش یا عدم تغییر آستانه درد در دیابت است (16-14). این نتایج احتمالاً به علت استفاده از وسایل سنجش حس درد متفاوت و یا تفاوت در زمان سنجش پس از القای دیابت بوده است.

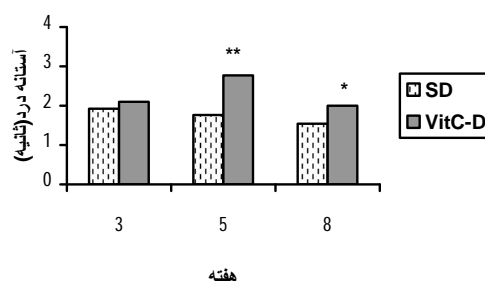
اگر چه علت کاهش آستانه درد در طی دیابت به وضوح روشن نیست مکانیزم‌هایی از جمله:

1: بیش تولید سوریتول درون سلولی ناشی از دیابت، فشار اسمزی درون سلولی را افزایش داده موجب برهم خوردن تنظیم هدایت یون‌های متعدد و در نتیجه دیپلاریزاسیون غشائی سلول‌های عصبی شده و موجب افزایش حس درد می‌شود (7، 17).

2: کاهش ترشح هیپوفیزی و هیپوتالاموسی پپتیدهای اپیوئیدی به ویژه بتا اندروفین در موش‌های دیابتی شده با استریتوزوتوسین. به علاوه پژوهش‌ها نشان داده‌اند

اثر مصرف ویتامین C بر روی آستانه درد در موش‌های دیابتی

مصرف ویتامین C باعث افزایش در آستانه درد در موش‌های دیابتی شد. مصرف 10 گرم بر لیتر ویتامین C محلول در آب آشامیدنی، آستانه درد موش‌های دیابتی را افزایش داد. آستانه درد در موش‌های دیابتی در پایان 5 هفته ($p < 0/01$) و 8 هفته ($p < 0/05$) از آغاز مصرف ویتامین C افزایش معنی‌داری در مقایسه با موش‌های دیابتی کنترل داشت در حالی که در پایان 3 هفته اثر معنی‌داری روی آستانه درد نداشت (نمودار 3).



نمودار 3. مقایسه آستانه درد در انتهای هفته سوم، پنجم و هشتم از برنامه تمرین ورزشی شنا. $p < 0/01$ **، $p < 0/05$ *

اثر توأم ورزش و ویتامین C بر روی آستانه درد در موش‌های دیابتی

ورزش هوازی (شنا) توأم با مصرف ویتامین C، باعث افزایش در آستانه درد در موش‌های تمرین کرده دیابتی توأم با مصرف ویتامین C (VitC-TD) در مقایسه با موش‌های دیابتی کنترل (SD) شد. آستانه درد در موش‌های تمرین کرده هم‌زمان با مصرف ویتامین C در پایان 5 هفته ($p < 0/01$) و 8 هفته ($p < 0/01$) به شکل معنی‌داری در مقایسه با موش‌های دیابتی کنترل افزایش داشته است (نمودار 4).

که تعداد یا تمایل و حساسیت گیرنده‌های سروتونین، استیل کولین و کاتکول آمین‌ها و اپیویدها نیز در حالت دیابت کاهش می‌یابند (18).

3: استرس اکسیداتیو ناشی از دیابت موجب پراکسیداسیون لیپیدها، پروتئین‌ها و DNA شده و منجر به کاهش جریان خون و در نهایت آسیب به سلول‌های عصبی شده، عارضه نوروپاتی را به وجود می‌آورد (17).

مطالعات نشان داده است که انجام ورزش منظم شنا از تغییرات اکسیداتیو ایجاد شده به وسیله استریتوزوتوسین جلوگیری می‌نماید و دارای خاصیت محافظت نورونی بوده و از استرس اکسیداتیو جلوگیری می‌نماید (19). در گزارش دیگری مشخص شده است که متعاقب ورزش با تردمیل استرس اکسیداتیو که در بیماران دیابتی مبتلا به نوروپاتی از عوامل القاگر آسیب سلولی می‌باشند، کاهش می‌یابند (20).

به نظر می‌رسد در این تحقیق نیز به علت شدت متوسط فعالیت بدنی و زمان طولانی آن منجر به کاهش استرس اکسیداتیو شده و یا اثر دفاعی بدن را در مقابل استرس اکسیداتیو افزایش داده که در مجموع منجر به اثر مفید ورزش بر روی افزایش آستانه درد می‌شود. نتایج به دست آمده در مطالعه حاضر موافق با گزارشات ارایه شده توسط بایونس و همکاران (16)، راشر و همکاران (21) و اشمیشل و همکاران (22) می‌باشد که نتایج تحقیقات فوق نیز موید بر القاء استرس اکسیداتیو توسط دیابت می‌باشد.

از طرفی در مطالعه دیگری مشخص است که به دنبال تجویز 2 گرم ویتامین C به بیمار ان مبتلا به دیابت نوع 2 به مدت 3 ماه، سطح هموگلوبین گلیکوزیله کاهش معنی‌داری داشته است (13). هم‌چنین در مطالعات روسل و همکاران، سطح پلاسمایی و ترشح ادراری ویتامین C در بیماران دیابتی با سطح هموگلوبین گلیکوزیله نسبت عکس داشته است. کاهش هموگلوبین گلیکوزیله می‌تواند بیان‌گر کاهش کلی گلیکوزیله شدن پروتئین‌ها و کاهش عوارض ناشی از آنها در سیستم‌های مختلف بدن در اثر ویتامین C باشد (23، 24). از طرفی در مطالعه دمتیا و همکاران که مدت

4 ماه به 50 بیمار دیابتی، 500 میلی‌گرم ویتامین C و پلاسبو تجویز نمودند، اختلاف معنی‌داری در غلظت هموگلوبین گلیکوزیله در دو گروه مشاهده نشد (25). در تحقیق دیگری استفاده از 1 گرم در روز ویتامین C در بیماران دیابتی نوع 2 در بزرگسالان، رادیکال‌های آزاد پلاسما را کاهش و سطح سلولی هورمون رشد افزایش داده است (26). با توجه به این که سطوح رادیکال‌های آزاد و هورمون رشد در ایجاد عوارض دیابتی و تخفیف درد موثر می‌باشد (27) و با توجه به این که در تحقیق ما نیز از دوز بالای ویتامین C استفاده شد به نظر می‌رسد افزایش آستانه درد در گروه مصرف مکمل ویتامین C در مقایسه با حیوانات دیابتی کنترل، به علت کاهش سطوح رادیکال‌های آزاد و افزایش سطح هورمون رشد در اثر مصرف ویتامین C بوده است. نتایج این تحقیق نشان داد که اثرات توأم تمرینات منظم ورزشی و مصرف ویتامین C در کاهش آستانه درد بیشتر از اثر هر یک آنها به تنهایی می‌باشد و این اثر به ویژه در پایان هشت هفته بعد از القاء دیابت مهم به نظر می‌رسد چراکه با طولانی شدن زمان دیابتی شدن، اثرات مخرب آن چشم‌گیر می‌باشد و در این زمان هر کدام از عوامل ویتامین C و ورزش منظم به تنهایی نتوانستند آستانه درد را به حد طبیعی برگرداند و عمده اثرات آنها در پایان پنج هفته بوده است که موید افزایش استرس اکسیداتیو دیابت با گذشت زمان می‌باشد. از طرفی ممکن است به دلیل دفع بیشتر ویتامین C با طولانی شدن دیابت و یا غلبه اثرات مضر دیابت بر تعادل استرس اکسیداتیو/آنتی اکسیداتیو بر اثرات مفید ویتامین C و ورزش منظم به تنهایی بر تعادل استرس اکسیداتیو/آنتی اکسیداتیو باشد از طرفی ممکن است با طولانی شدن دیابت، ورزش منظم با شدت متوسط اثرات مضر هم بر تعادل استرس اکسیداتیو/آنتی اکسیداتیو داشته باشد که با مصرف ویتامین C برطرف می‌گردد.

نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که تجویز تمرینات منظم ورزشی هوازی با شدت ملایم تا متوسط و ویتامین C

blood oxidative stress after eccentric exercise. *Medicine & Science in Sports & Exercise*. 2005; 37(2):234-9.

9. Gomez-Cabrera MC, Domenech E, Viña J. Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine*. 2008; 44(2): 126-31.

10. Geisser ME, Wang W, Smuck M, Koch LG, Britton SL, Lydic R. Nociception before and after exercise in rats bred for high and low aerobic capacity. *Neuroscience letters*. 2008; 443(1): 37-40.

11. Schröder H, Navarro E, Tramullas A, Mora J, Galiano D. Nutrition antioxidant status and oxidative stress in professional basketball players: effects of a three compound antioxidative supplement. *International journal of sports medicine*. 2000;21(2):146-50.

12. Radák Z, Kaneko T, Tahara S, Nakamoto H, Pucsek J, Sasvári M, et al. Regular exercise improves cognitive function and decreases oxidative damage in rat brain. *Neurochemistry international*. 2001;38(1):17-23.

13. Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*. 2001; 414(6865):813-20.

14. Coudray C, Roussel AM, Arnaud J, Favier A. Selenium and antioxidant vitamin and lipid peroxidation levels in preaging French population. *Biological trace element research*. 1997; 57(2):183-90.

15. Mullarkey CJ, Edelstein D, Brownlee M. Free radical generation by early glycation products: a mechanism for accelerated atherogenesis in diabetes. *Biochemical and biophysical research communications*. 1990; 173(3): 932-9.

16. Baynes JW. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 1991;40(4):405-12.

17. Forman L, Estilow S, Lewis M, Vasilenko P. Streptozotocin diabetes alters immunoreactive beta-endorphin levels and pain perception after 8 wk in female rats. *Diabetes*. 1986; 35(12): 1309-13.

18. Vincent AM, Russell JW, Low P, Feldman EL. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy. *Endocrine reviews*. 2004; 25(4): 612-28.

در دیابت می تواند روش مناسبی برای پیش گیری، کنترل و درمان هیپرآلژزی ناشی از آن باشند.

تشکر و قدردانی

از معاونت پژوهشی دانشگاه بوعلی سینا به دلیل حمایت مالی از مطالعه، سپاس گذاری می شود. این مقاله مستخرج از پایان نامه کارشناسی ارشد فیزیولوژی ورزش آقای یحیی بیگدلی می باشد.

منابع

1. Watada H, Kajimoto Y, Umayahara Y, Matsuoka T, Kaneto H, Fujitani Y, et al. The human glucokinase gene beta-cell-type promoter: an essential role of insulin promoter factor 1/PDX-1 in its activation in HIT-T15 cells. *Diabetes*. 1996;45(11):1478-88.
2. Gavin JR, Alberti K, Davidson MB, DeFronzo RA, Drash A, Gabbe S, et al. Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care*. 1997;20(7):1183-97.
3. Espino J, Pariente JA, Rodríguez AB. Role of melatonin on diabetes-related metabolic disorders. *World journal of diabetes*. 2011; 2(6): 82-91.
4. Maritim A, Sanders R, Watkins JB. Effects of α -lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2003; 14(5): 288-94.
5. Waczulikova I, Krahulec B, Sikurova L, Carsky J, Orszaghova Z, Durackova Z. Effect of vitamin C and E on nonenzymatic glycation and physico-chemical properties of isolated erythrocyte membranes in diabetic patients. *Bratislavské lekárske listy*. 2000;101(3):152-6.
6. Golbidi S, Alireza Ebadi S, Laher I. Antioxidants in the treatment of diabetes. *Current Diabetes Reviews*. 2011;7(2):106-25.
7. Cunningham J, Mearkle P, Brown R. Vitamin C: an aldose reductase inhibitor that normalizes erythrocyte sorbitol in insulin-dependent diabetes mellitus. *Journal of the American College of Nutrition*. 1994;13(4):344-50.
8. Goldfarb AH, Bloomer RJ, McKenzie MJ. Combined antioxidant treatment effects on

19. Yorek MA. The role of oxidative stress in diabetic vascular and neural disease. Free radical research. 2003;37(5):471-80.
20. Thornalley PJ. Glycation in diabetic neuropathy: characteristics, consequences, causes, and therapeutic options. International review of neurobiology. 2002;50:37-57.
21. Rauscher FM, Sanders RA, Watkins III JB. Effects of new antioxidant compounds PNU-104067F and PNU-74389G on antioxidant defense in normal and diabetic rats. Journal of biochemical and molecular toxicology. 2000; 14(4): 189-94.
22. Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. Diabetes. 2003;52(1):165-71.
23. Russell JW, Sullivan KA, Windebank AJ, Herrmann DN, Feldman EL. Neurons undergo apoptosis in animal and cell culture models of diabetes. Neurobiology of disease. 1999; 6(5): 347-63.
24. Ulrich P, Cerami A. Protein glycation, diabetes, and aging. Recent progress in hormone research. 2001;56(1):1-22.
25. De Mattia G, Laurenti O, Fava D. Diabetic endothelial dysfunction: effect of free radical scavenging in Type 2 diabetic patients. Journal of diabetes and its complications. 2003;17(2): 30-5.
26. Feldman EL. Oxidative stress and diabetic neuropathy: a new understanding of an old problem. Journal of Clinical Investigation. 2003; 111(4):431-3.
27. Rudich A, Tirosh A, Potashnik R, Hemi R, Kanety H, Bashan N. Prolonged oxidative stress impairs insulin-induced GLUT4 translocation in 3T3-L1 adipocytes. Diabetes. 1998;47(10): 1562-9.