

تأثیر ملاتونین بر درد نوروپاتی محیطی در موش صحرایی مبتلا به دیابت

فرین بابائی بالدرلو، مینو ایلخانی‌پور، رضا حیدری، صمد زارع، ایرج برنوسی

گروه زیست‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پایه، دانشگاه ارومیه؛ نشانی مکاتبه‌ی نویسندگی مسئول: ارومیه، بلوار دانشگاه،

دانشگاه ارومیه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، فرین بابائی e-mail: st_f.babaei@urmia.ac.ir

چکیده

مقدمه: دیابت قندی اغلب با درد نوروپاتیک مزمن همراه است. مطالعه‌ها نشان داده‌اند که استرس اکسیداتیو نقش مهمی در پیدایش بسیاری از تغییرات نورولوژیک و رفتاری در بیماری دیابت ایفا می‌کند. بنابراین بررسی تأثیر آنتی‌اکسیدان‌ها در تسکین درد نوروپاتیک دیابتی حایز اهمیت است. در این مطالعه اثر ضددردی ملاتونین در موش‌های صحرایی دیابتی بررسی شد. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه از ۳۲ رأس موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده‌ی وزنی 20 ± 200 گرم استفاده شد. حیوانات به چهار گروه هشت‌تایی: شاهد، ملاتونین، دیابتی و دیابتی تیمارشونده با ملاتونین تقسیم شدند. القای دیابت با تزریق داخل صفاقی ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین (STZ) انجام شد. ملاتونین ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت داخل صفاقی، ۲۱ روز بعد از القای دیابت و به مدت دو هفته تزریق شد. در پایان دوره‌ی تیمار، رفتار دی‌فازیک درد در حیوانات، به کمک آزمون فرمالین ۵٪ و بر مبنای دو پاسخ خودبه‌خودی **flinching** و **licking** طی ۶۰ دقیقه ارزیابی شد. در این پژوهش، شاخص پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم‌های گلوکوتایون پراکسیداز و کاتالاز در عقده‌های ریشه‌ی خلفی **L4-S3** نخاع نیز اندازه‌گیری شد. **یافته‌ها:** تزریق فرمالین به پنجه‌ی پای موش‌های دیابتی منجر به افزایش تعداد دفعه‌های **flinch** در واحد زمان در هر دو مرحله‌ی حاد و مزمن درد در مقایسه با موش‌های شاهد شد. تیمار موش‌های دیابتی با ملاتونین این شاخص را تا حد موش‌های غیردیابتی کاهش داد. مدت زمان کل **licking** ناشی از درد فرمالین در هر دو مرحله‌ی حاد و مزمن درد در موش‌های دیابتی به طور معنی‌دار بیشتر از موش‌های شاهد بود ($p < 0.05$). تزریق ملاتونین به موش‌های دیابتی، این مدت زمان را در هر دو فاز آزمون فرمالین به طور معنی‌دار ($p < 0.05$) در مقایسه با گروه دیابتی کاهش داد. اختلاف معنی‌داری در شاخص‌های مذکور بین گروه ملاتونین و شاهد وجود نداشت. آزمایش هموژنای عقده‌های خلفی نشان‌دهنده‌ی افزایش سطح پراکسیداسیون لیپیدها و کاهش فعالیت گلوکوتایون پراکسیداز و کاتالاز در موش‌های دیابتی در مقایسه با گروه شاهد بود. تجویز ملاتونین به موش‌های دیابتی، میزان این شاخص‌ها را تعدیل نمود. **نتیجه‌گیری:** این یافته‌ها بیانگر مداخله استرس اکسیداتیو در بروز درد در بیماری دیابت است و ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، قادر به کاهش درد در هر دو مرحله‌ی حاد و مزمن در حیوانات مبتلا به دیابت است.

واژگان کلیدی: دیابت، ملاتونین، درد، نوروپاتی محیطی، استرس اکسیداتیو

دریافت مقاله: ۸۷/۶/۳۰ - دریافت اصلاحیه: ۸۷/۹/۱۱ - پذیرش مقاله: ۸۷/۹/۱۷

مقدمه

دیابت قندی مشتمل بر مجموعه‌ای از بیماری‌های مزمن است که با افزایش قند خون (هیپرگلیسمی) همراه است.^۱ هیپرگلیسمی مزمن باعث فعال شدن پروتئین کیناز-C، افزایش

گلیکاسیون پروتئین‌ها و لیپیدها و در نتیجه تغییر در فعالیت آنزیم‌های سلول می‌شود.^{۲،۳} از طرفی، اتواکسیداسیون گلوکز، تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) را افزایش می‌دهد و باعث القای استرس اکسیداتیو در مبتلایان به دیابت می‌شود. مجموعه‌ی این فرایندها اثرهای توکسیک بر ساختار و

ملاتونین به طور گسترده در مدل‌های درد التهابی مورد بررسی قرار گرفته است.^{۱۴-۱۷} علاوه بر این، شواهدی مبنی بر تأثیرگذاری ملاتونین بر درد نوروپاتیک وجود دارد.^{۱۹،۱۸} اما تاکنون تأثیر ضد درد ملاتونین در رابطه با ماهیت آنتی‌اکسیدانی این هورمون مورد ارزیابی قرار نگرفته است. در بررسی حاضر فرض بر این بود که ملاتونین می‌تواند با کاهش استرس اکسیداتیو به عنوان منشأ اصلی پیدایش درد نوروپاتی در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت، میزان احساس درد ناشی از تزریق فرمالین را در این موش‌ها کاهش دهد. هدف از این مطالعه، آزمایش اثر احتمالی ضد درد ملاتونین در موش‌های دیابتی بود.

مواد و روش‌ها

این مطالعه در ۳۲ رأس موش صحرایی نر نژاد ویستار با محدوده‌ی وزن 20 ± 20 گرم، خریداری شده از مؤسسه‌ی پاستور انجام شد. حیوانات در طول دوره‌ی تیمار به استثنای زمان انجام آزمون فرمالین، در شرایط استاندارد و ثابت فیزیکی یعنی دمای $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ، رطوبت محیطی $2 \pm 28\%$ ، شدت نور در مرکز اتاق ۳۰۰ لوکس و دوره‌های ۱۲ ساعته‌ی متوالی نور و تاریکی، در گروه‌های ۴ تایی در قفس‌های استاندارد پلی‌کربنات نگهداری شدند. آب و غذای مناسب (کنسانتره) به استثنای زمان انجام آزمون، به اندازه‌ی کافی در دسترس حیوانات قرار داشت. ملاتونین، استرپتوزوتوسین و مواد مورد نیاز برای سنجش‌های بیوشیمیایی از شرکت سیگما، و فرمالین از شرکت مرک تهیه شد. دستگاه آزمون فرمالین توسط پژوهشگران طراحی و ساخته شد.^{۲۰} غلظت مؤثر فرمالین برای القای درد بر مبنای مقاله‌های موجود و آزمایش‌های پایلوت در آزمایشگاه انتخاب شد.^{۲۱،۲۲}

موش‌های صحرایی به چهار گروه هشت‌تایی: شاهد، دریافت‌کننده‌ی ملاتونین، دیابتی و دیابتی دریافت‌کننده‌ی ملاتونین تقسیم شدند.

القای دیابت با تزریق داخل صفاقی ۵۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن استرپتوزوتوسین (STZ)، حل شده در بافر سیترات 0.5 M با $\text{pH } 4.5$ انجام شد. سنجش قند خون برای تشخیص القای دیابت، ۷۲ ساعت بعد از تزریق استرپتوزوتوسین و با استفاده از خون سیاهرگ دمی، به

عملکرد اندام‌های مختلف دارد و منجر به بروز رتینوپاتی، نفروپاتی، عوارض قلبی - عروقی و نوروپاتی می‌شود.^{۱۳،۴} در بیش از ۶۰٪ افراد مبتلا به دیابت، آسیب نوروپاتی محیطی ناشی از استرس اکسیداتیو (نوروپاتی محیطی) قابل تشخیص است.^۵ نوروپاتی محیطی در مراحل اولیه‌ی پیدایش، اغلب با افزایش فعالیت فیبرهای عصبی همراه است و باعث برهم‌خوردن تعادل بین سازوکارهای تحریکی و مهارتی در راستای افزایش قابلیت تحریک نخاع می‌شود. به طور کلی، حساسیت سیستم عصبی به محرک‌های دردزا افزایش می‌یابد و هیپرالژزی دیابتی بروز می‌کند.^۶ هیپرالژزی ناشی از نوروپاتی محیطی یکی از شکایت‌های مهم بالینی افراد مبتلا به دیابت قندی محسوب می‌شود و کیفیت زندگی این افراد را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بنابراین، تعدیل درد در این افراد از اهمیت زیادی برخوردار است. درمان درد در این بیماران با داروهای معمول چندان رضایت‌بخش نیست. از طرفی این داروها تأثیرگذاری محدودی دارد و ممکن است به عوارض جانبی غیرقابل تحمل منجر شود.^۷ بر این اساس بررسی گزینه‌های درمانی جدید که با تقلیل شرایط استرس اکسیداتیو منجر به کاهش روند پیشرفت آسیب‌های نوروپاتی شود ضروری به نظر می‌رسد.

ملاتونین یا N-استیل ۵-متوکسی تریپتامین از اسید آمینه‌ی تریپتوفان در غده پینه‌آل مهره‌داران سنتز و به مایع مغزی - نخاعی ترشح می‌شود. مهم‌ترین عملکرد این هورمون در بدن مهره‌داران تنظیم ریتم سیرکادین می‌باشد. همچنین، ملاتونین به عنوان القاکننده‌ی خواب و آنالژزی و حذف‌کننده‌ی وسیع‌الطیف رادیکال‌های آزاد در بدن عمل می‌کند.^{۸،۹} بر اساس مطالعه‌های پیشین ملاتونین به عنوان یک آنتی‌اکسیدان توانا، به طور مستقیم با رادیکال‌های آزاد، ترکیب و به صورت یک محصول نهایی متابولیزه می‌شود.^{۱۰} همچنین، این هورمون پس از عبور از غشاهای زیستی، بیان ژن‌های آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان را تحریک و توان آنتی‌اکسیدانی سلول‌ها را بیشتر می‌کند.^{۱۱}

نشان داده شده است که عمل پینه‌آل اکثومی یا دنرواسیون سمپاتیک دوطرفه، منجر به بروز اختلال‌های متابولیک پارادایم می‌شود که ضمن تیمار با ملاتونین، این اختلال‌ها به طور جزیی یا کامل برطرف می‌شود.^{۱۲} همچنین ملاتونین عوارض متعدد ناشی از شرایط استرس اکسیداتیو از جمله آسیب‌های کبدی، کلیوی، قلبی - عروقی و پانکراس را در حیوانات مبتلا به دیابت کاهش می‌دهد.^{۱۳}

ب- محاسبه‌ی کل زمانی که حیوان در فاصله‌ی زمانی ۱۰-۰ و ۶۰-۱۵ دقیقه مشغول لیسیدن یا گاز گرفتن (licking/biting) پنجه‌ی مورد تزریق است.^{۲۰}

داده‌های مربوط به دقایق ۱۰-۰ و ۶۰-۱۵ پس از تزریق فرمالین، به ترتیب به عنوان معیار اندازه‌گیری درد حاد و مزمن در نظر گرفته شد. فاصله‌ی زمانی بین دقایق ۱۵-۱۰ دوره‌ی خاموشی کوتاه مدت محسوب می‌شد که پاسخ ناشی از درد در پنجه‌ی پای تزریق شده، مشاهده نشد.

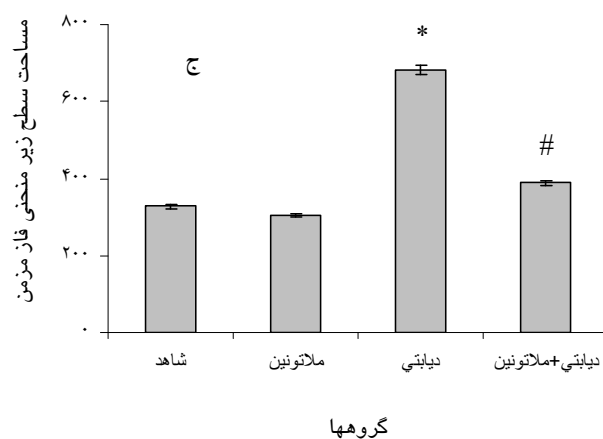
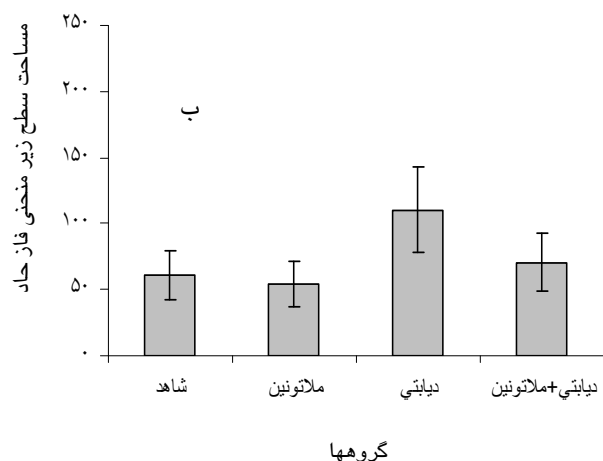
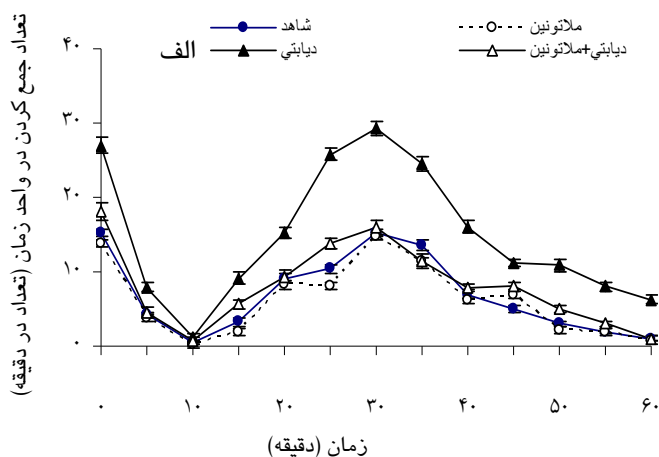
هر حیوان فقط یک بار و برای این آزمون، آزمایش و بلافاصله پس از پایان آزمون با استفاده از مخلوط کتامین / زایلازین بیهوش شد. برای بررسی متغیرهای بیوشیمیایی، گانگلیون‌های چپ و راست ریشه‌ی خلفی نخاع از سطح L4 تا S3 استخراج و در دمای 20°C فریز شد. سطح پراکسیداسیون لیپیدها با استفاده از روش چیزمن و استربوئر (ضریب تغییرات درون سنجش و برون سنجش به ترتیب کمتر از ۴/۲٪ و کمتر از ۵/۹٪) اندازه‌گیری شد.^{۲۵} درجه‌ی پراکسیداسیون لیپیدها بر مبنای میزان تشکیل مالون‌دی‌آلدهید (MDA) تعیین شد. مالون‌دی‌آلدهید محصول نهایی پراکسیداسیون اسیدهای چرب است و با تیوباربیتوریک اسید (TBA) وارد واکنش می‌شود و تولید کمپلکس رنگی می‌نماید. اساس روش، اندازه‌گیری اسپکتروفوتومتریک رنگ ایجاد شده بر اثر واکنش TBA با MDA می‌باشد. به این منظور، ۳۰۰ میکرولیتر تری‌کلرواستیک اسید ۱۰٪ به ۱۵۰ میکرولیتر از نمونه‌ی اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه با دور $1000 \times \text{g}$ در دمای 4°C سانتریفوژ شد. ۳۰۰ میکرولیتر از محلول رویی به لوله‌ی آزمایش منتقل و با ۳۰۰ میکرولیتر از تیوباربیتوریک اسید ۶۷٪ در دمای 100°C برای ۲۵ دقیقه انکوبه شد. ۵ دقیقه پس از خنک شدن محلول، رنگ صورتی ناشی از واکنش MDA-TBA ظاهر و به کمک اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۳۵ نانومتر ارزیابی شد. غلظت MDA به کمک ضریب جذبی کمپلکس MDA-TBA ($\epsilon_{535}=1/56 \times 10^5$) محاسبه و به صورت نانومول به ازای هر گرم از بافت خیس بیان شد. فعالیت آنزیم گلوتاتیون پراکسیداز مطابق روش بورک و لارنس (ضریب تغییرات درون سنجش و برون سنجش به ترتیب ۵/۲٪ و ۶/۸٪) تعیین شد.^{۲۶} واکنش آنزیمی در لوله‌ی محتوی NADPH، سدیم‌آزید، گلوتاتیون احیا و گلوتاتیون

کمک کیت گلوکومتر (ACON Laboratories, Inc. USA) انجام شد. حیوانات با قند خون بیش از ۲۲۰ میلی‌گرم در دسی‌لیتر به عنوان دیابتی در نظر گرفته شدند. همزمان با تزریق محلول STZ، موش‌های گروه شاهد و دریافت‌کننده‌ی ملاتونین، بافر سیترات 0.5 M با $\text{pH } 4.5$ به صورت داخل صفاقی دریافت کردند. هیپرگلیسمی مزمن منجر به القای وضعیت نوروپاتی در موش‌های صحرایی مبتلا به دیابت می‌شود؛^{۲۳} لذا تیمار با ملاتونین (۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، داخل صفاقی) به صورت حل شده در سالین حاوی اتانول، ۲۱ روز پس از شروع هیپرگلیسمی آغاز شد و به مدت ۲ هفته به ۸ رأس از حیوانات مبتلا به دیابت و ۸ رأس از موش‌های غیردیابتی (گروه دریافت‌کننده‌ی ملاتونین) تزریق شد. حیوانات گروه شاهد و دیابتی در طی این مدت، حامل (سالین حاوی اتانول) دریافت کردند. همچنین، مقادیر قند خون ابتدای آزمایش پیش از تزریق محلول STZ و نیز ۲۴ ساعت قبل از آزمون فرمالین، به روش مذکور اندازه‌گیری شد.

در پایان دوره‌ی تیمار، رفتار دی‌فازیک درد در حیوانات با استفاده از آزمون فرمالین ۵/۰٪ بررسی شد. به منظور انطباق با محیط آزمایش، هر یک از موش‌ها به طور جداگانه، به مدت ۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین، در محفظه‌ی پلکسی‌گلاس ($25 \times 25 \times 30$ سانتی‌متر) که روی سطح شیشه‌ای دستگاه آزمایش فرمالین قرار داشت، گذاشته شد. پس از این مدت حیوان را برداشته و مقدار ۵۰ میکرولیتر محلول فرمالین ۵/۰٪ (رقیق شده در محلول استریل ۹/۰٪ کلرید سدیم) به صورت زیر جلدی، به سطح پشتی پنجه‌ی پای عقب و راست موش با میکروسرنج ۳۰ gauge تزریق و بلافاصله به محفظه مزبور برگردانده می‌شد. آینه‌ای با زاویه 45° زیر سطح شیشه‌ای قرار دارد تا بتوان پنجه‌ی پای حیوان را به طور دقیق مشاهده کرد. تزریق فرمالین به پنجه‌ی پای جوندگان باعث بروز دو پاسخ خودبه‌خودی ناشی از درد می‌شود: جمع کردن / تکان دادن و لیسیدن / گاز گرفتن پنجه پای تزریق شده.

بر این اساس رفتار دی‌فازیک درد (حاد و مزمن)، بر مبنای دو روش تکمیلی طی ۶۰ دقیقه ارزیابی شد:

الف- محاسبه‌ی تعداد دفعه‌های جمع کردن / تکان دادن (flinching/shaking) پنجه‌ی پای تزریق شده طی دوره‌های ۱ دقیقه‌ای در هر ۵ دقیقه، به مدت ۶۰ دقیقه پس از تزریق فرمالین.^{۲۴}



نمودار ۱- میزان احساس درد ناشی از تزریق فرمالین در واحد زمان بر مبنای پاسخ جمع کردن پنجه‌ی پای دیابتی؛ هر نقطه نشان‌دهنده‌ی میانگین $\pm$ انحراف معیار در ۸ رأس موش است (الف). مقدار کل درد احساس شده در بازه‌ی زمانی ۱۰-۶۰ دقیقه (فاز حاد) و (ب) ۶۰-۱۵ دقیقه (فاز مزمن) (ج). داده‌های نمودارهای ب و ج از محاسبه‌ی مساحت سطح زیر منحنی نمودار الف به دست آمده است. * تفاوت معنی‌دار با گروه کنترل غیردیابتی و # تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد دیابتی در سطح ۵٪ که با استفاده از پس آزمون توکی تعیین شده است.

ردوکتاز با اضافه نمودن هیدروپراکسیدکومن (CuOOH) به مخلوط واکنش، آغاز شد و تغییرات با استفاده از اسپکتروفتومتر در طیف جذبی ۳۴۰ نانومتر ارزیابی شد. فعالیت کاتالاز بر اساس توانایی آن در تجزیه H_2O_2 ، در طیف جذبی ۲۴۰ نانومتر به روش Aebi (ضریب تغییرات درون سنجش و برون سنجش به ترتیب ۱/۷٪ و ۳/۸٪) تعیین شد.^{۲۷} برای سنجش پروتئین از روش لوری و همکاران استفاده شد.^{۲۸}

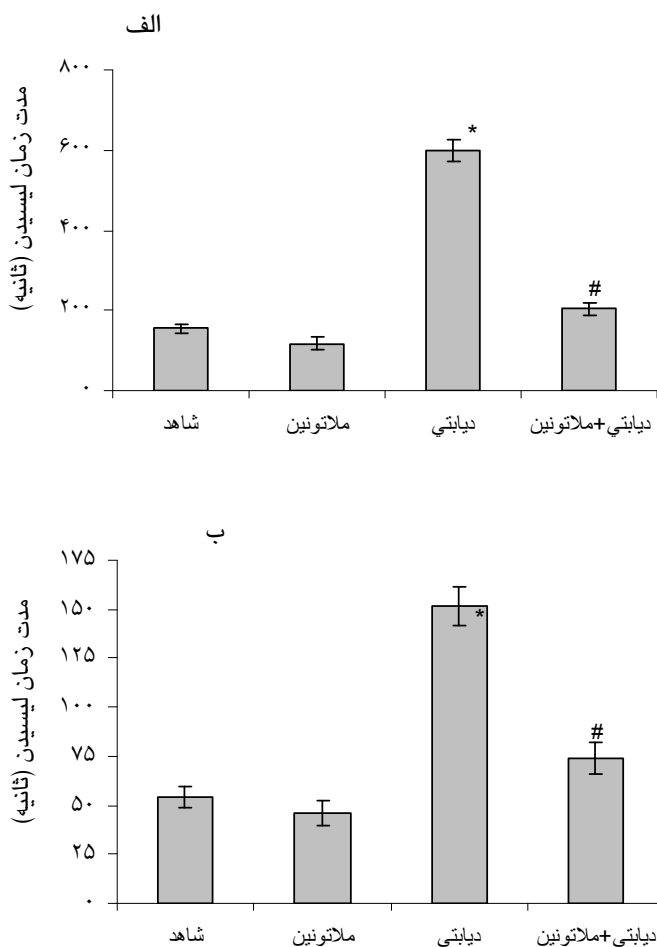
داده‌های حاصل به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار بیان شد. میانگین تعداد دفعه‌های جمع کردن پنجه‌ی پا در واحد زمان به صورت نمودار خطی رسم و سپس مساحت ناحیه‌ی زیر منحنی (AUC) برای هر دو فاز حاد و مزمن مطابق با قانون ذورنقه‌ای (Trapezoidal) محاسبه شد. مقایسه‌ی گروه‌های آزمایشی با آنالیز واریانس یک‌طرفه و متعاقب آن پس آزمون توکی با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه‌ی ۱۵ انجام شد. اختلاف با احتمال کمتر از ۰/۰۵ بین گروه‌های آزمایشی از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

یافته‌ها

تأثیر ملاتونین بر درد حاد: تمام حیوانات مورد مطالعه در آزمون فرمالین ۵/۰٪، الگوی دی‌فازیک درد را از خود نشان دادند. تعداد دفعه‌های flinch در واحد زمان در بازه زمانی ۱۰-۶۰ دقیقه (فاز حاد) در موش‌های دیابتی در مقایسه با موش‌های شاهد افزایش یافته است. تزریق روزانه ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ملاتونین به موش‌های دیابتی و غیردیابتی این شاخص را به ترتیب در مقایسه با گروه‌های دیابتی و شاهد کاهش داد (نمودار ۱-الف). به منظور تعیین مقدار کل درد در مراحل حاد و مزمن، مساحت ناحیه‌ی زیر منحنی جمع کردن پنجه‌ی پای دیابتی در واحد زمان (AUC) محاسبه شد. مقدار AUC در فاصله‌ی زمانی ۱۰-۶۰ دقیقه (نمودار ۱-ب) در گروه دیابتی $32/18 \pm 11/02$ و در گروه شاهد $60/62 \pm 18/44$ بود که اختلاف معنی‌داری بین این دو گروه مشاهده نشد. مقدار AUC در مرحله‌ی حاد، در موش‌های دیابتی تیمار شده با ملاتونین $70/35 \pm 21/72$ بود که اختلاف معنی‌داری با گروه دیابتی نداشت (نمودار ۱-ب).

تیمار موش‌های دیابتی با ملاتونین، مدت زمان پاسخ لیسیدن را در مرحله‌ی مزمن ($20.4/13 \pm 16/33$ ثانیه) به طور معنی‌دار ($p < 0.05$) در مقایسه با موش‌های گروه دیابتی کاهش داد (نمودار ۲-ب).

تیمار موش‌های غیردیابتی با ملاتونین کاهش معنی‌داری را در تعداد دفعه‌های جمع کردن در واحد زمان (نمودار ۱-الف) و میزان AUC در فاز مزمن ($30.5/12 \pm 5/18$) (نمودار ۱-ج) و همچنین مدت زمان پاسخ لیسیدن به درد ناشی از تزریق فرمالین در بازه‌ی زمانی ۶۰-۱۵ دقیقه ($118/13 \pm 14/24$) ثانیه (نمودار ۲-ب) در مقایسه با گروه شاهد نشان نداد.



نمودار ۲- میزان احساس درد ناشی از تزریق فرمالین بر مبنای پاسخ لیسیدن پنجه‌ی پای دیابتی؛ داده‌ها از محاسبه‌ی میانگین کل مدت زمان لیسیدن در بازه‌ی (الف) زمانی ۱۰-۰ دقیقه (فاز حاد) و (ب) ۶۰-۱۵ دقیقه (فاز مزمن) برای ۸ رأس موش صحرایی به دست آمده است. * تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد غیردیابتی و $^\#$ تفاوت معنی‌دار با گروه شاهد دیابتی در سطح ۵٪ می‌باشد که با استفاده از پس آزمون توکی تعیین شده است.

تأثیر ملاتونین بر میزان قند خون و متغیرهای بیوشیمیایی در بافت‌های عصبی محیطی: در ابتدای این مطالعه مقادیر قند

بررسی داده‌های حاصل از مطالعه رفتار «لیسیدن» در بازه‌ی زمانی ۱۰-۰ دقیقه نشان‌دهنده‌ی افزایش معنی‌دار ($p < 0.05$) مدت زمان پاسخ «لیسیدن» به درد ناشی از تزریق فرمالین در حیوانات دیابتی ($151/63 \pm 10/24$ ثانیه) در مقایسه با حیوانات شاهد ($54/13 \pm 5/51$ ثانیه) است. تزریق روزانه‌ی ۱۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن ملاتونین به موش‌های دیابتی این شاخص را در مرحله‌ی حاد به $73/88 \pm 7/95$ ثانیه رساند که اختلاف معنی‌داری را با گروه دیابتی نشان داد (نمودار ۲-الف).

با مقایسه‌ی گروه مصرف‌کننده‌ی ملاتونین و شاهد، اختلاف معنی‌داری در تعداد دفعه‌های جمع کردن پنجه‌ی پا در واحد زمان (نمودار ۱-الف) و میزان AUC در فاز حاد ($54/4 \pm 17/07$) (نمودار ۱-ب) و همچنین مدت زمان پاسخ «لیسیدن پنجه‌ی پا» به درد ناشی از تزریق فرمالین در بازه‌ی زمانی ۱۰-۰ دقیقه ($45/63 \pm 6/23$) ثانیه (نمودار ۲-الف) بین این دو گروه مشاهده نشد.

تأثیر ملاتونین بر درد مزمن: بررسی دو رفتار جمع کردن و لیسیدن پنجه‌ی پای تزریق شده در مرحله‌ی مزمن درد ناشی از تزریق فرمالین و آنالیز داده‌های حاصل، نشان داد که میزان پاسخ به درد در موش‌های دیابتی بیش از سایر گروه‌ها است. تعداد دفعه‌های جمع کردن در واحد زمان در بازه‌ی زمانی ۶۰-۱۵ دقیقه (مرحله مزمن) در موش‌های دیابتی در مقایسه با موش‌های غیردیابتی افزایش یافت. این شاخص در گروه‌های دریافت‌کننده‌ی ملاتونین کاهش یافت (نمودار ۱-الف). همچنین آنالیز مقدار مساحت ناحیه‌ی زیر منحنی جمع کردن پنجه‌ی پا در واحد زمان (AUC) در فاصله‌ی زمانی ۶۰-۱۵ دقیقه (فاز مزمن)، نشان داد که مقدار AUC در این مرحله در گروه دیابتی $682/86 \pm 12/54$ بود که به طور معنی‌دار ($p < 0.05$) از گروه شاهد ($326/93 \pm 6/5$) بیشتر بود (نمودار ۱-ج). تیمار موش‌های دیابتی با ملاتونین، مقدار AUC را در مرحله‌ی مزمن ($388/57 \pm 7/07$) به طور معنی‌دار ($p < 0.05$) در مقایسه با موش‌های دیابتی کاهش داد (نمودار ۱-ج).

بررسی رفتار لیسیدن در محدوده زمانی ۶۰-۱۵ دقیقه، نشان داد که مدت زمان پاسخ لیسیدن به درد ناشی از تزریق فرمالین در مرحله‌ی مزمن در موش‌های گروه دیابتی ($596/75 \pm 26/78$ ثانیه) بود که به طور معنی‌دار ($p < 0.05$) بیشتر از مدت زمان محاسبه شده در موش‌های گروه شاهد در مرحله‌ی مزمن ($155/13 \pm 12/3$ ثانیه) بود (نمودار ۲-ب).

خون در تمام حیوانات یکسان بود (جدول ۱). تزریق استرپتوزوتوسین منجر به افزایش معنی‌دار میزان قند خون شد (یافته‌ها نشان داده نشده است). سنجش مجدد قند خون در پایان دوره‌ی تیمار نشان داد که ملاتونین تأثیر کاهشی معنی‌داری بر مقادیر افزایش یافته‌ی قند خون در حیوانات دیابتی نداشته است (جدول ۱).

جدول ۱- مقادیر قند خون در ابتدا و انتهای مطالعه

گروه‌های تیماری	قند خون (میلی‌گرم در دسی‌لیتر)	
	ابتدای مطالعه	انتهای مطالعه
شاهد	۱۰۰±۳/۱	۱۰۶±۲/۹
ملاتونین	۱۰۳±۳/۲	۱۰۷±۳/۱
دیابتی	۹۹±۳/۰	۳۵۲±۱۲/۱*
دیابتی+ملاتونین	۱۰۱±۳/۱	۳۳۷±۱۱/۸*

* P کمتر از ۰/۰۵ در مقایسه با ابتدای مطالعه

جدول ۲- مقایسه‌ی متغیرهای بیوشیمیایی در گروه‌های آزمایشی

متغیر	شاهد	ملاتونین	دیابتی	دیابتی تیمار شده با ملاتونین
مالون‌دی‌آلدهید (نانومول به ازای هر گرم بافت خیس)	۲۰/۰±۲/۰*	۱۸/۳±۲/۱	۳۶/۷±۱/۷†	۲۳/۴±۲/۲‡
گلوتاتیون پراکسیداز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۰/۰۳۲±۰/۰۰۲	۰/۰۳۴±۰/۰۰۵	۰/۰۲۳±۰/۰۰۲†	۰/۰۳۵±۰/۰۰۳‡
کاتالاز (واحد بر میلی‌گرم پروتئین)	۰/۱۴±۰/۰۱	۰/۱۴±۰/۰۲	۰/۰۹±۰/۰۰*	۰/۱۳±۰/۰۰‡

* داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف معیار است. † و ‡ و P کمتر از ۰/۰۵ به ترتیب در مقایسه با گروه‌های شاهد و دیابتی

بحث

در این مطالعه اثر آنتی‌اکسیدانی ملاتونین بر نوروپاتی ناشی از استرس اکسیداتیو در موش‌های صحرایی دیابتی بررسی شد. یافته‌های این مطالعه نشان داد که تزریق داخل صفاقی ملاتونین به حیوانات مبتلا به دیابت، با کاهش سطوح پراکسیداسیون لیپیدها و افزایش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی در بافت‌های عصبی محیطی از پیشرفت آسیب‌های اکسیداتیو در این بافت‌ها جلوگیری می‌کند. در این بررسی مطابق با مطالعه‌های پیشین، ملاتونین تأثیر معنی‌داری بر میزان قند خون حیوانات دیابتی نداشت. بررسی اثر ملاتونین بر درد ناشی از نوروپاتی محیطی به کمک آزمون فرمالین انجام شد. ملاتونین با کاهش آسیب

همچنین، در این مطالعه میزان تولید محصولات پراکسیداسیون لیپیدها و فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی گلوتاتیون پراکسیداز و کاتالاز در عقده‌های ریشه‌ی خلفی نخاع کمری - خاجی اندازه‌گیری شد. سطح پراکسیداسیون لیپیدها در موش‌های صحرایی دیابتی به طور معنی‌دار در مقایسه با سایر گروه‌ها افزایش یافت و تیمار حیوانات دیابتی با ملاتونین، میزان این شاخص‌ها را به محدوده‌ی طبیعی (شاهد) بازگرداند. مقایسه‌ی داده‌های حاصل در گروه‌های مختلف آزمایشی در جدول ۲ آورده شده است.

نورون‌های محیطی در موش‌های دیابتی منجر به کاهش پاسخ به درد ناشی از تزریق فرمالین در هر دو مرحله‌ی حاد و مزمن شد. این یافته‌ها در موش‌های غیردیابتی که با ملاتونین تیمار شدند، مشاهده نشد.

وولف و دین برای اولین بار در سال ۱۹۸۷ نشان دادند که اتواکسیداسیون گلوکز به دنبال هیپرگلیسمی، باعث تولید رادیکال‌های فعال اکسیژن (ROS) مانند رادیکال سوپراکسید (O_2^*)، هیدروژن پراکسید و رادیکال هیدروکسیل (OH^*) و در نتیجه القای استرس اکسیداتیو مزمن در موش‌های صحرایی دیابتی می‌شود.^۲ طی مطالعه‌هایی به اثبات رسیده است که ROS از مهم‌ترین عوامل بروز آسیب‌های نورونی و دردهای نوروپاتی است.^{۲۹} بنابراین، مواد آنتی‌اکسیدانی مانند ملاتونین، می‌توانند با کاهش سطح ROS در محیط داخلی، از

پیشرفت دژنراسیون نورونی و حساس شدن سیستم عصبی جلوگیری کنند. در مطالعه‌ی حاضر، اثر ضد درد ملاتونین در موش‌های دیابتی، در رابطه با خصوصیت آنتی‌اکسیدانی این هورمون مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور اثر آنتی‌اکسیدانی ملاتونین در تعدادی از عقده‌های ریشه‌ی خلفی نخاع بررسی شد. عقده‌های ریشه خلفی ناحیه‌ی کمری - خاجی نخاع متشکل از نورون‌های حسی اندام‌های حرکتی تحتانی هستند و ساختارهای مناسبی برای بررسی بافت‌های عصبی محیطی به شمار می‌روند.

در بررسی حاضر، القای دیابت باعث افزایش سطح مالون‌دی‌آلدهید در عقده‌های ریشه خلفی L4-S3 شد. یکی از دلایل افزایش سطوح پراکسیداسیون لیپیدها در بافت، کاهش فعالیت آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان مانند کاتالاز (CAT) و گلوکاتایون پراکسیداز (GSH-Px) در سلول‌ها است. یافته‌های حاضر نشان داد که فعالیت این آنزیم‌ها در عقده‌های خلفی حیوانات دیابتی کاهش یافته است. کیشی و همکاران پیش از این نشان دادند که فعالیت آنزیم GSH-Px و CAT در عقده‌های ریشه‌ی خلفی L4,5 در موش‌های صحرایی دیابتی دست‌خوش تغییر می‌شود. این تغییرات به شرایط متابولیک به‌هم‌ریخته‌ی ناشی از استرس اکسیداتیو در بیماری دیابت نسبت داده شده است. در این مطالعه تغییری در بیان ژن‌های این آنزیم‌ها در عقده‌های ریشه‌ی خلفی موش‌های صحرایی دیابتی مشاهده نشد.^{۲۰}

در بررسی حاضر نشان داده شد که ملاتونین سطوح پراکسیداسیون لیپیدها را در عقده‌های ریشه‌ی خلفی نخاع به طور چشمگیری کاهش داد. علاوه بر این ملاتونین توانست سطوح کاهش یافته‌ی فعالیت آنزیم‌های GSH-Px و CAT را در عقده‌های خلفی به وضعیت طبیعی (شاهد) برگرداند. پژوهشگران اثرهای حفاظتی چشمگیر ملاتونین علیه استرس اکسیداتیو را در بسیاری از بافت‌های حیوانات دیابتی نشان داده‌اند.^{۱۳،۲۱،۲۲} اما در مورد تأثیر ملاتونین بر عقده‌های ریشه‌ی خلفی نخاع یافته‌ای موجود نیست. با این وجود گزارش‌های متعددی در خصوص آثار سودمند آنتی‌اکسیدان‌ها بر عملکرد و ساختار بافت‌های عصبی محیطی ارائه شده است. پودراتز و همکاران نشان دادند که حضور آنتی‌اکسیدان‌ها برای میلینه شدن آکسون نورون‌های ریشه‌ی خلفی نخاع، ضروری است.^{۲۳} طی مطالعه‌ای نشان داده شد که حذف ویتامین E آندوژن در موش‌های دیابتی، اختلال‌های عملکردی نورون‌های محیطی را افزایش داد.^{۲۴}

همچنین، نشان داده شده است که تیمار حیوانات مبتلا به دیابت با آلفا - لیپوئیک اسید از پراکسیداسیون لیپیدها و پیشرفت آسیب نورون‌های محیطی جلوگیری می‌کند.^{۲۵} حالات و همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که استفاده از رژیم غذایی حاوی α -لیپوئیک اسید و سایر آنتی‌اکسیدان‌ها، بدون آنکه در کاهش قند خون مؤثر باشد از پیشرفت نوروپاتی دیابتی جلوگیری می‌کند.^{۲۶} باید توجه داشت که نورون‌های محیطی فقط حاوی ۱۰٪ از کل محتوای آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی سلول‌های مغز هستند؛ بنابراین بیشتر در معرض آسیب‌های اکسیداتیو قرار دارند.

در این مطالعه، به منظور بررسی رفتار دی‌فازیک درد ناشی از آسیب نورون‌های محیطی، از آزمون فرمالین استفاده شد. گزارش‌های فراوانی در خصوص بررسی درد نوروپاتیک با استفاده از آزمون فرمالین وجود دارد.^{۲۷} ویسرز وجود همبستگی بین آزمون فرمالین و درد نوروپاتی را در گونه‌های مختلف حیوانات آزمایشگاهی به اثبات رساند.^{۲۸} نوروپاتی دیابتی در مراحل اولیه‌ی پیدایش، منجر به افزایش حساسیت نورون‌های حسی و سیستم عصب مرکزی به محرک‌های محیطی دردزا می‌شود. افزایش پاسخ به درد در بیماری دیابت در بسیاری از مطالعه‌های پیشین گزارش شده است.^{۲۹} در مطالعه‌ی حاضر افزایش پاسخ به درد در هر دو مرحله‌ی حاد و مزمن آزمون فرمالین در موش‌های صحرایی دیابتی مشاهده شد که پس از تیمار با ملاتونین، میزان پاسخ به درد در هر دو مرحله کاهش یافت. با توجه به همبستگی بین یافته‌های حاصل از آزمون فرمالین و درد نوروپاتی، می‌توان اظهار نمود که ملاتونین توانسته است از میزان درد نوروپاتی دیابتی بکاهد.

پیش از این، مطالعه‌ای در رابطه با اثرهای آنتی‌اکسیدانی ملاتونین بر کاهش درد نوروپاتی دیابتی انجام نشده است. با این وجود، گزارش‌های متعددی در خصوص اثرهای ضد درد برخی آنتی‌اکسیدان‌ها در بیماری دیابت ارائه شده است. سید در مطالعه خود نشان داد که تجویز U83836E به عنوان یک آنتی‌اکسیدان، از هیپرالژزی دیابتی می‌کاهد.^{۳۰} در مطالعه‌ی زیگلر تزریق داخل عروقی α -لیپوئیک اسید به بیماران دیابتی به مدت ۳ هفته، باعث کاهش علایم نوروپاتی محیطی دیابتی شد.^{۴۰} کیم و همکاران، اثرهای آنالژزیک ویتامین E را در موش‌های دچار درد نوروپاتیک نشان دادند. در این بررسی ویتامین E حساسیت سیستم عصبی مرکزی ناشی از آسیب نورون‌های محیطی را کاهش داد.^{۴۱}

حیوانات دیابتی، از دژنراسیون نورون‌ها جلوگیری می‌کند. ملاتونین با کاهش آسیب‌های نورونی از افزایش دردهای نوروپاتی در مبتلایان به دیابت جلوگیری می‌نماید و منجر به کاهش هیپرالژزی دیابتیک می‌شود؛ در نتیجه پاسخ به محرک‌های دردزا مانند فرمالین در حیوانات دیابتی کاهش می‌یابد. این نوروهورمون دارای اثرهای ضددرد مناسب در موش‌های دیابتی است.

سپاسگزاری: نویسندگان مقاله از سرکار خانم سحرناز بابائی به خاطر همکاری صمیمانه در انجام آزمایش‌ها تشکر و قدردانی می‌نمایند.

همچنین، در این آزمایش مطابق با بسیاری از مطالعه‌های پیشین، تزریق ملاتونین به حیوانات سالم، تغییر معنی‌داری را در هیچ‌یک از شاخص‌های مورد مطالعه ایجاد نکرد. احتمالاً ملاتونین با تعدیل شرایط فیزیولوژیک به‌هم‌ریخته در موش‌های دیابتی اثرهای ضد درد خود را در حیوانات دیابتی اعمال می‌کند، اما تأثیر چشمگیری بر شرایط فیزیولوژیک طبیعی در موش‌های غیردیابتی ندارد.

به طور خلاصه می‌توان گفت که ملاتونین با افزایش معنی‌دار آنزیم‌های آنتی‌اکسیدان و کاهش سطوح پراکسیداسیون لیپیدها در بافت‌های عصبی محیطی در

References

1. Baynes JW, Thorpe R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. *Diabetes* 1999; 48: 1-9.
2. Robertson R, Zhou H, Zhang T, Harmon JS.. Chronic oxidative stress: a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cell in diabetes. *Cell Biochem Biophys* 2007; 48: 139-46.
3. Wolff SP, Dean RT. Glucose auto-oxidation and protein modification. The potential role of antioxidative glycosylation in diabetes. *Biochem J* 1987; 245: 243-50.
4. Malaisse WJ. Alloxan toxicity to the pancreatic B-cell. A new hypothesis. *Biochem Pharmacol*. 1982; 31: 3527-34.
5. Galer BS, Ganas A, Jensen MP. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract* 2000; 47: 123-8.
6. Serpell M. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesth Intensive Care Med* 2005; 6: 7-10.
7. Sindrup SH, Jensen TS. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. *Pain* 1999; 83: 389-400.
8. Morgan PJ, Barrett P, Howell HE, Helliwell R. Melatonin receptors: localization, molecular pharmacology and physiological significance. *Neurochem Int* 1994; 24: 101-146.
9. Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: a nerve-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J Pineal Res* 2007; 42: 28-42.
10. Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J Pineal Res* 2003; 34: 1-10.
11. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: A significant role for melatonin. *J Pineal Res* 2004; 36: 1-9.
12. Peschke E. Melatonin, endocrine pancreas and diabetes. *J Pineal Res* 2008; 44: 26-40.
13. Sudnikovich EJ, Maksimchik YZ, Zabrodskaia SV, Kubyshev VL, Lapshina EA, Bryszewska M, et al. Melatonin attenuates metabolic disorders due to streptozotocin-induced diabetes in rats. *Eur J Pharmacol* 2007; 569: 180-7.
14. EL-Shenawy SM, Abdel-Salam OM, Baiuomy AR, EL-Batran S, Arbid MS. Studies on the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of melatonin in the rat. *Pharmacol Res* 2002; 46: 235-43.
15. Ray M, Mediratta PK, Mahajan P, Sharma KK. Evaluation of the role of melatonin in formalin-induced pain response in mice. *Indian J Med Sci* 2004; 58: 122-30.
16. Wang T, Li SR, Dai X, Peng YL, Chen Q, Wang R. Effects of melatonin on orphanin FQ/nociceptin-induced hyperalgesia in mice. *Brain Res* 2006; 1085: 43-8.
17. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilad E, Hake P, Salzman AL, Szabo C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation: relationship to its inhibitory effect on nitric oxide production and its peroxynitrite scavenging activity. *J Pineal Res* 1997; 23: 106-16.
18. Ulugol A, Dokmeci D, Guray G, Sapolyo N, Ozyigit F, Tamer M. Anti-hyperalgesic, but not anti-allodynic, effect of melatonin in nerve-injured neuropathic mice: possible involvements of the L-arginine-NO pathway and opioid system. *Life Sci* 2006; 78: 1592-7.
19. Ambroz-Tututi M, Granados-Soto V. Oral and spinal melatonin reduces tactile allodynia in rats via activation of MT2 and opioid receptors. *Pain* 2007; 5; 132: 273-80.
20. Dubuisson D, Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain* 1977; 4: 161-74.
21. Araiza-Saldana CI, Reyes-Garcia G, Bermudez-Ocana DY, Perez-Severino F, Granados-Soto V. Effect of diabetes on the mechanisms of interathecal antinociception of sildenafil in rats. *Eur J Pharmacol* 2005; 527: 60-70.
22. Juarez-Rojop IE, Granados-Soto V, Diaz-Zagoya JC, Flores-Murrieta FJ, Torres-Lopez JE. Involvement of cholecystokinin peripheral nociceptive sensitization during diabetes in rats as revealed by the formalin response. *Pain* 2006; 122: 118-125.

23. Malone JI, Lowitt S, Korthals JK, Salem A, Miranda C. The effect of hyperglycemia on nerve conduction and structure is age dependent. *Diabetes* 1996; 45: 209-215.
24. Wheeler-Aceto H, Cowan A. Standardization of the rat paw formalin test for the evaluation of analgesics. *Psychopharmacology* 1991; 104: 35-44.
25. Esterbauer H, Cheeseman KH. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods Enzymol* 1990; 186: 407-21.
26. Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 1976; 71: 952-958.
27. Aebi H. Catalase in vitro. *Method Enzymol* 1984; 105: 121-6.
28. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RJ. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
29. Kim HK, Park SK, Zhou JL, Taglialatela G, Cheng K, Coggeshall RE, et al. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 2004; 111: 116-24.
30. Kishi Y, Nickander KK, Schmelzer JD, Low PA. Gene expression of antioxidant enzymes in experimental diabetic neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 2000; 5: 11-8.
31. Klepac N, Rudes Z, Klepac R. Effect of melatonin on plasma oxidative stress in rats with streptozotocin induced diabetes. *Biomed Pharmacother* 2006; 60: 32-5.
32. Anwar MM, Meki AR. Oxidative stress in Streptozotocin- induced diabetic rats: effects of garlic oil and melatonin. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2003; 135: 539-47.
33. Podratz JL, Rodriguez E, Windebank AJ. Antioxidants are necessary for myelination of dorsal root ganglion neurons, in vitro. *Glia* 2004; 45: 54-8.
34. van Dam PS, van Asbeck BS, Bravenboer B, van Oirschot JF, Gispen WH, Marx JJ. Nerve Function and Oxidative Stress in Diabetic and Vitamin E-Deficient Rats. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 18-26.
35. Low PA, Nickander KK, Tritschler HJ. The roles of oxidative stress and antioxidant treatment in experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 1997; 46: 38-42.
36. Halat KM, Dennehy CE. Botanicals and Dietary Supplements in Diabetic Peripheral Neuropathy. *J Am Board Fam Pract* 2003; 16: 47-57.
37. Sawynok J, Reid AR, Esser MJ. Peripheral antinociceptive action of amitriptyline in the rat formalin test: involvement of adenosine. *Pain* 1999; 80: 45-55.
38. Vissers KG, Geenen F, Biermans R, Meert TF. Pharmacological correlation between the formalin test and the neuropathic pain behavior in different species with chronic constriction injury. *Pharmacol Biochem Behav* 2006; 84: 479-86.
39. Sayyed SG, Kumar A, Sharma SS. Effects of U83836E on nerve functions, hyperalgesia and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy. *Life Sci* 2006; 79: 777-83.
40. Ziegler D, Gries FA. α -Lipoic acid in the treatment of diabetic peripheral and cardiac autonomic neuropathy. *Diabetes* 1997; 46: 62-66.
41. Kim HK, Kim JH, Gao X, Zhou JL, Lee I, Chung K, et al. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. *Pain* 2006; 122: 53-62.

Original Article

Effect of Melatonin on Peripheral Neuropathic Pain in Diabetic Rat

Babaei-Balderlou F, Ilkhanipour M, Heidari R, Zare S, Bernousi I.
Department of Biology, Faculty of Sciences, Urmia University
e-mail: st_f.babaei@urmia.ac.ir

Abstract

Introduction: Diabetes mellitus is often accompanied by chronic neuropathic pain. Studies indicate that oxidative stress has an important role in the appearance of neurological and behavioral changes in diabetes. Necessitating researching therefore the antioxidants effects in alleviation of diabetic neuropathic pain. **Materials and Methods:** In this study, 32 male Wistar rats weighing 200 ± 20 g were used, and were divided into four groups: Control(C), melatonin(M), diabetic(D) and melatonin-treated diabetic(MD). Experimental diabetes was induced by intraperitoneal injection of 50 mg/kg streptozotocin (STZ). Melatonin was injected (10 mg/kg/day, i.p.) for 2 weeks, after 21 days of diabetes induction. At the end of administration period, nociceptive biphasic behavior in rats was assessed using the 0.5% formalin test, and then observed for up to 60 min, according to spontaneous flinching and licking responses. In this study, lipid peroxidation levels, glutathione-peroxidase and catalase activities were measured in spinal L4-S3 dorsal root ganglia. Experimental data were then statistically analyzed. **Results:** Formalin-evoked flinching increased in both acute and chronic phases of pain in diabetic rats as compared to non-diabetic ones, whereas administration of melatonin reduced flinching frequency in both phases in MD rats. Total time of licking in diabetic rats was significantly ($p < 0.05$) more than the control rats in both acute and chronic phases of pain; melatonins injection significantly reduced this time in both phases of pain in the MD as compared D group, whereas was no significant difference between M and C rats in the indices mentioned. Assessment of dorsal root ganglia homogenates indicated an increase in Lipid peroxidation levels and a decrease in GSH-Px and CAT activities in the D group as compared to the controls (C). While melatonin administration ameliorated these in diabetic rats. **Conclusion:** Results suggest that oxidative stress contributes to appearance of pain in diabetes and melatonin, as an antioxidant, is effective in reducing the acute and chronic pain in diabetic rats.

Keywords: Diabetes, Melatonin, Pain, Peripheral neuropathy, Oxidative stress