

اثر تره کوهی بر شدت درد در موش‌های دیابتی با استرپتوزتوسین

چکیده

زمینه و هدف: هیپرالژزی یکی از علائم بارز دیابت قندی در میان مدت محسوب می‌شود. با توجه به وجود شواهد تحقیقاتی مبنی بر اثر ضد دیابتی تره کوهی، در این بررسی اثر تجویز خوراکی این گیاه در موش‌های صحرایی دیابتی شده به وسیله استرپتوزتوسین در مراحل حاد و مزمن آزمون فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: در این مطالعه تجربی ۴۵ سر موش صحرایی نر سفید نژاد ویستار به طور تصادفی به پنج گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با تره کوهی، دیابتی دریافت کننده سدیم سالیسیلات، دیابتی و گروه دیابتی تیمار شده با تره کوهی تقسیم شدند. برای دیابتی شدن از داروی استرپتوزتوسین به صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ mg/kg استفاده گردید. دو گروه تحت تیمار با تره کوهی نیز پودر مخلوط شده این گیاه با غذای استاندارد موش (۶/۲۵ درصد) را دریافت نمودند. پس از گذشت یک ماه بعد از اندازه‌گیری قند خون آزمون فرمالین در هر موش انجام شد. داده‌ها با استفاده از آزمون‌های *student's paired t-test* و *ANOVA* مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: نمرات درد در موش‌های دیابتی پس از گذشت یک ماه در دو فاز حاد و مزمن به دنبال تجویز کف پایی فرمالین بیشتر از موش‌های کنترل بود و درمان با تره کوهی به مدت چهار هفته موجب کاهش معنی‌دار در نمرات درد در مقایسه با گروه دیابتی در مراحل حاد و مزمن گردید ($P < 0/05$). ضمناً با تجویز سدیم سالیسیلات به موش‌های دیابتی، کاهش معنی‌دار در نمره درد فقط در مرحله مزمن آزمون فرمالین مشاهده گردید ($P < 0/05$). همچنین تجویز گیاه تغییر معنی‌داری در نمرات درد دو فاز آزمون فرمالین در گروه کنترل تحت تیمار در مقایسه با گروه کنترل ایجاد نمود.

نتیجه‌گیری: تجویز خوراکی تره کوهی به مدت یک ماه موجب کاهش معنی‌دار میزان احساس درد در مدل تجربی دیابت قندی القا شده به وسیله استرپتوزتوسین می‌شود.

کلید واژه‌ها: تره کوهی، دیابت قندی، درد، آزمون فرمالین، موش صحرایی

دکتر مهرداد روغنی

دانشیار گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد تهران
مرکز تحقیقات گیاهان دارویی

محبوبه آقایی

دانشجوی پزشکی دانشگاه شاهد تهران

نویسنده مسؤول: دکتر مهرداد روغنی

پست الکترونیکی: mehjour@yahoo.com

نشانی: تهران، بلوار کشاورز، خیابان شهید عبدالله زاده
(دهکده)، پلاک ۲۹، دانشکده پزشکی شاهد، گروه فیزیولوژی

صندوق پستی: ۱۴۱۵۵-۷۴۳۵

تلفن: ۸۸۹۶۴۷۹۲-۰۲۱ داخلی ۲۳۳

نمبر: ۸۸۹۶۳۱۰

وصول مقاله: ۸۵/۹/۱۲

اصلاح نهایی: ۸۶/۶/۲۷

پذیرش مقاله: ۸۶/۷/۷

مقدمه

۴تایی در هر قفس قرار داده شدند. ضمناً حیوانات آزادانه به آب لوله کشی و غذای فشرده مخصوص موش (شرکت خوراک دام پارس) و یا غذای مخلوط شده با پودر تره کوهی به نسبت ۶/۲۵ درصد به مدت یک ماه دسترسی داشتند.

روش تهیه غذای حاوی تره کوهی

پس از تهیه تره کوهی و اطمینان از سلامت ظاهری و تأیید علمی به وسیله بخش گیاه شناسی دانشکده علوم دانشگاه شهید بهشتی (نورانی) با شماره شناسایی هر بار یوم ۱۳۲-۲۰۰۵ و پس از آسیاب نمون کل گیاه شامل بخش هوایی و غده‌ای، پودر به دست آمده با یک نسبت وزنی ۱/۱۵ با غذای پودر شده و استاندارد موش مخلوط و مجدداً غذای Pelleted تولید گردید (۱۴).

در این مطالعه از آن دسته موش‌های صحرایی استفاده شد که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری میزان گلوکز سرم آنها پائین تر از حد ۲۵۰ mg/dl بود. موش‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه یکسان شامل کنترل، کنترل دریافت کننده تره کوهی، دیابتی، دیابتی دریافت کننده سدیم سالیسیلات (کنترل مثبت) و دیابتی دریافت کننده تره کوهی تقسیم شدند. دو گروه کنترل و دیابتی دریافت کننده سدیم سالیسیلات پس از گذشت یک ماه، سدیم سالیسیلات را به میزان ۲۰۰ mg/kg به طور داخل صفاقی یک ساعت قبل از انجام بررسی دریافت نمودند. برای دیابتی نمودن حیوانات از داروی استرپتوزوتوسین (STZ) به صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ mg/kg حل شده در محلول سالین فیزیولوژیک سرد (USA, Upjohn and Pharmacia) استفاده گردید. حجم تزریق محلول به حیوانات در هر گروه ۰/۵ میلی لیتر بود. پس از گذشت یک ماه، آزمون فرمالین به روش استاندارد روی تمام موش‌ها انجام گرفت. در این ارتباط در مورد هر موش آزمون فرمالین فقط یک بار انجام پذیرفت. برای خونگیری (هر دفعه یک میلی لیتر خون) موش‌ها به وسیله اتر به طور سبک بیهوش می شدند. اندازه گیری میزان گلوکز سرم به وسیله روش آنزیمی گلوکز اکسیداز (شرکت زیست شیمی، تهران) و با استفاده از اسپکتروفتومتر قبل از انجام کار و در هفته های دوم و چهارم پس از شروع کار به انجام رسید.

دیابت قندی با عوارض نامطلوب در درازمدت نظیر رتینوپاتی و نوروپاتی همراه می باشد (۱ و ۲). درد ناشی از نوروپاتی اعصاب محیطی یکی از شکایات مهم بالینی افراد مبتلا به دیابت قندی محسوب می شود (۳ و ۴). بروز هیپرگلیسمی با اعمال اثرات سمی روی سیستم عصبی محیطی یکی از علل بروز نوروپاتی دردناک است (۵ و ۶). با توجه به این که تا کنون ترکیب دارویی مناسب (نظیر سالیسیلات‌ها و ترکیبات ضدالتهابی غیراستروئیدی) عاری از عوارض جانبی برای درمان برخی حالات درد حاد و مزمن به ویژه در حالت دیابت قندی یافت نمی شود (۷)، لذا توجه محققان به گیاهان دارویی معطوف شده است. در این خصوص تره کوهی یک گیاه با ساقه گل ده، بلند و با قوام با برگ‌های نسبتاً پهن و یک قسمت غده‌ای چندقسمتی می باشد و از نظر شیمیائی برخی خواص سیر را نشان می دهد (۸). از نظر خواص مشخص شده که برخی مواد موجود در تره کوهی دارای خاصیت محافظت کنندگی در برابر آسیب پوستی القا شده بر اثر عوامل آسیب‌رسان، ضدانگل، ضدآسم، پائین آورنده کلسترول سرم، ضدسپتیک، ضداسپاسم، افزایش دهنده جریان صفرا، افزایش دهنده دفع عرق، دیورتیک، خلط آور، تب‌بر، مؤثر بر اعمال ترشحات معده، برقرار نمودن حالت پایه در مورد برخی اعمال بدن و گشاد کننده عروقی می باشد (۸ و ۹). با توجه به این که گیاه دارای مقدار زیادی از سولفو کسیدهای سیستمی بوده که خود این مواد دارای خاصیت ضد دیابتی و آنتی اکسیدانتی می باشند (۱۳-۱۰)، لذا در این تحقیق اثر ضد درد تجویز خوراکی و درازمدت تره کوهی در مدل تجربی دیابت قندی القا شده به وسیله داروی استرپتوزوتوسین در موش صحرایی نر به کمک آزمون فرمالین به روش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

این مطالعه تجربی در دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد تهران طی سال ۱۳۸۴، روی موش‌های صحرایی نر سفید نژاد Wistar (انستیتو پاستور، تهران) در محدوده وزنی ۲۸۰-۳۲۰ گرم (۱۸-۱۴ هفته) انجام شد. تمام حیوانات در آزمایشگاه حیوانات در دمای ۲۲-۲۰ درجه سانتی گراد در گروه‌های ۳ تا

جدول ۱: اثر تجویز خوراکی تره کوهی بر میزان وزن و گلوکز سرم در موش‌های صحرایی کنترل و دیابتی

میزان گلوکز سرم (میلی‌گرم بر دسی‌لیتر)			وزن بدن (گرم)			
هفته ۴	هفته ۲	هفته صفر (قبل بررسی)	هفته ۴	هفته ۲	هفته صفر (قبل بررسی)	
۱۰۵/۷ ± ۶/۵	۱۴۴/۳ ± ۹/۴	۱۳۵/۲ ± ۷/۶	۳۱۱/۹ ± ۴/۹	۳۰۷/۳ ± ۷/۸	۳۰۵/۳ ± ۵/۶	کنترل
۱۰۵/۴ ± ۷/۸	۱۲۷/۳ ± ۶/۶	۱۳۱/۴ ± ۶/۹	۲۹۱/۳ ± ۷/۳	۲۹۵/۶ ± ۶/۳	۲۹۸/۲ ± ۵/۹	کنترل + تره کوهی
۴۰۷/۶ ± ۱۴/۱*	۴۱۴/۳ ± ۱۵/۱*	۱۱۸/۱ ± ۸/۳	۲۲۵/۴ ± ۶/۵*	۲۶۳/۷ ± ۷/۶*	۲۹۴/۳ ± ۷/۵	دیابتی
۳۱۶/۵ ± ۱۲/۷*	۳۲۷/۵ ± ۱۴/۶*	۱۰۹/۴ ± ۶/۳	۲۳۷/۴ ± ۷/۶*	۲۵۸/۹ ± ۷/۳*	۳۰۷/۶ ± ۵/۱	دیابتی + تره کوهی

* $P < 0/05$ در مقایسه با گروه کنترل در همان هفته

آزمون فرمالین

از نظر زمانی این آزمون در پی‌رود زمانی ۱۶-۱۳ انجام پذیرفت. برای انجام آن از روش متداول Dubuissou & Dennis استفاده شد (۱۵). بدین ترتیب که حیوان در یک محفظه از جنس پلکسی گلاس (۴۰ × ۴۰ × ۴۰ سانتی‌متر) تحت شرایط آرام قرار گرفته و پس از گذشت یک ساعت، ۵۰ میکرولیتر از محلول فرمالین ۲/۵ درصد به صورت زیر جلدی به کف پای حیوان تزریق می‌شود و شدت درد حیوان براساس تقسیم‌بندی زیر به چهار درجه تفکیک گردید:

صفر) حیوان بدون توجه به پای تزریق شده می‌نشیند و یا راه می‌رود. (۱) پای حیوان با محفظه تماس داشته ولی حیوان وزن بدن خود را بیشتر روی پای سالم خود می‌اندازد. (۲) حیوان پنجه دردناک را کاملاً از سطح محفظه بلند می‌نماید. (۳) حیوان پنجه تزریق شده را از شدت درد می‌لیسد، گاز می‌گیرد یا به شدت تکان می‌دهد.

ثبت پاسخ‌های رفتاری بلافاصله پس از تزریق فرمالین آغاز و تا دقیقه ۶۰ ادامه می‌یافت. در این ارتباط پاسخ در هر ۱۵ ثانیه ثبت و به عنوان شاخصی از میزان درد در آزمون فرمالین در نظر گرفته می‌شود. با استفاده از این روش اعداد صفر تا ۳ برای امتیاز درد در زمان‌های مختلف به دست می‌آید. میانگین درد در ده دقیقه اول بعد از تزریق فرمالین به عنوان مرحله اول یا حاد و در دقایق ۱۶ تا ۶۰ به عنوان مرحله دوم یا مزمن در نظر گرفته شد.

تمام داده‌ها به صورت انحراف معیار ± میانگین بیان شده است. برای آنالیز آماری در مورد نتایج گلوکز از آزمون‌های student's paired t-test (مقایسه نتایج هفته‌های ۲ یا ۴ با هفته

قبل بررسی) و One-way ANOVA (repeated measure) برای تمام هفته‌ها و در صورت معنی‌دار شدن از آزمون Tukey استفاده گردید. در مورد نتایج درد نیز در پایان کار از آزمون one-way ANOVA استفاده شد. به علاوه ارزش P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

در بررسی حاضر وزن موش‌ها در هفته قبل از بررسی و در هفته‌های دوم و چهارم پس از بررسی تعیین گردید (جدول ۱). ۲-۳ روز قبل از شروع آزمایشات (هفته قبل از بررسی) هیچ‌گونه تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها یافت نشد. به علاوه، در موش‌های دیابتی تیمار نشده، کاهش معنی‌داری در وزن در هفته چهارم ($P < 0/05$) نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید. موش‌های دیابتی تحت تیمار با تره کوهی نیز مشابه گروه دیابتی درمان نشده کاهش وزن را در هفته چهارم در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($P < 0/05$)، هر چند که این کاهش کمتر از گروه دیابتی درمان نشده بود. در این بررسی، میزان گلوکز سرم نیز در هفته قبل از بررسی و در هفته‌های دوم و چهارم پس از بررسی تعیین گردید (جدول ۱).

افزایش معنی‌داری در میزان گلوکز سرم در گروه دیابتی در هفته چهارم در مقایسه با هفته قبل از آزمایش ($P < 0/05$) دیده شد و میزان گلوکز سرم در گروه دیابتی تحت درمان با تره کوهی کاهش معنی‌داری را در مقایسه با گروه دیابتی نشان داد ($P < 0/05$). به علاوه تجویز این گیاه به موش‌های گروه کنترل تغییر معنی‌داری در میزان گلوکز سرم ایجاد نکرد.

تزریق کف پای فرمالین یک پاسخ بارز دو فازی را در تمام گروه‌ها ایجاد نمود (جدول ۲). هیپرآلژزی القا شده بر اثر

حالت دیابت پردازش سیگنال‌های درد را در ناحیه نخاع تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۶). از طرف دیگر نتایج تحقیقات اخیر نشان می‌دهد که موش‌های صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین را می‌توان به عنوان مدل درد مزمن به حساب آورد که در مورد آن نشانه‌های هیپرآلژزی (Hyperalgesia) و آلودینی (Allodynia) در کوتاه مدت (یک الی دو ماه) به خوبی مشاهده می‌شود (۱۷ و ۱۸). با توجه به این که در فاز مزمن آزمون فرمالین در موجودات طبیعی و دیابتی شده مکانیسم‌های محیطی و در فاز حاد آن مکانیسم‌های مرکزی دخالت دارند (۱۹ و ۲۰)، و تزریق داخل صفاقی سدیم سالیسیلات به موش‌های گروه کنترل و دیابتی موجب کاهش میزان احساس درد فقط در فاز دوم آزمون گردید، لذا این ماده از طریق یک مکانیسم محیطی اثرات خود را اعمال می‌کند که نتایج تحقیق حاضر مؤید این نظر است.

مطالعه حاضر نشان داد که مصرف خوراکی تره کوهی در گروه دیابتی به مدت یک ماه موجب کاهش معنی‌دار پاسخ درد در هر دو فاز آزمون فرمالین در موش‌های دیابتی گردید. در این خصوص قبلاً مشخص شده که بروز دیابت قندی در موش کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین موجب افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از تشدید تشکیل رادیکال‌های فعال اکسیژن در برخی نواحی مغز می‌شود (۳) و درمان با عوامل آنتی‌اکسیدانت نظیر تره کوهی با مقدار بالا از ترکیبات سولفو کسیدهای سیستمی می‌تواند از این نظر مؤثر باشد (۱۳-۱۰). به علاوه مشخص شده که اثر آنتی‌اکسیدانتی این گروه از مواد از طریق افزایش سطح آنزیم‌های مربوط به سیستم آنتی‌اکسیدانت شامل سوپراکسید دیس‌موتاز و کاتالاز به انجام می‌رسد. از طرف دیگر این مواد قادر به کاهش تولید محصولات نهائی پراکسیداسیون لیپیدی نظیر مالون‌دی‌آلدئید و هیدروپراکسید می‌باشند (۱۰ و ۱۱). همچنین گیاهان این خانواده دارای مقدار زیادی ساپونین می‌باشند (۹) که بخشی از اثر ضددردی مشاهده شده در بررسی حاضر را می‌توان به این گروه از مواد نسبت داد. بخشی دیگر از اثرات سودمند تره کوهی بر درد در این تحقیق را می‌توان به اثرات پائین‌آورندگی گلوکز آن نسبت داد که موجب کاهش تغییرات در اعصاب محیطی و التهاب ناشی از

فرمالین در موش‌های دیابتی درمان نشده در هر دو فاز آزمون فرمالین بیشتر از گروه کنترل بود ($P < 0.05$). به علاوه تجویز سدیم سالیسیلات به موش‌های گروه دیابتی موجب کاهش معنی‌دار نمره درد فقط در فاز دوم آزمون فرمالین در مقایسه با گروه‌های دیابتی تیمار نشده گردید ($P < 0.05$). همچنین هیچ‌گونه تفاوت معنی‌دار بین دو گروه دیابتی دریافت‌کننده سدیم سالیسیلات و تره کوهی مشاهده نگردید. از طرف دیگر، درمان با تره کوهی به مدت یک ماه موجب کاهش معنی‌دار در نمرات درد در مقایسه با گروه دیابتی در مراحل حاد و مزمن گردید ($P < 0.05$).

جدول ۲: اثر تجویز خوراکی تره کوهی بر میزان احساس درد در آزمون فرمالین

نمره درد در آزمون فرمالین		
مرحله مزمن	مرحله حاد	
1.88 ± 0.1	1.79 ± 0.11	کنترل
1.69 ± 0.13	1.66 ± 0.14	کنترل + تره کوهی
$2.28 \pm 0.13^*$	$2.19 \pm 0.11^*$	دیابتی
2.06 ± 0.12	$1.7 \pm 0.13^{**}$	دیابتی + سدیم سالیسیلات
$1.83 \pm 0.1^{**}$	$1.77 \pm 0.1^{**}$	دیابتی + تره کوهی

* $P < 0.05$ در مقایسه با گروه کنترل در همان مرحله

** $P < 0.05$ در مقایسه با گروه دیابتی در همان مرحله

بحث

نتایج بررسی حاضر نشان داد که تجویز خوراکی تره کوهی به مدت یک‌ماه اثری آنالژزیک بارز در موش‌های دیابتی شده تحت تیمار در آزمون فرمالین اعمال می‌نماید. نتایج تحقیقات قبلی نشان داده که موش‌های صحرایی دیابتی شده به وسیله استرپتوزوتوسین به طور غیرمنتظره رفتاری تشدید شده مربوط به درد را در آزمون فرمالین به دنبال تجویز محرک‌های شیمیایی به داخل پنجه پا پس از گذشت ۳-۴ هفته نشان می‌دهند که خود دلالت بر وجود مکانیسم‌های غیرطبیعی و متعدد در پردازش سیگنال‌های محیطی درد دارد (۱۶). قبلاً وجود هیپرآلژزی مکانیکی به عنوان اولین نشانگان نوروپاتی دیابتیک به اثبات رسیده که علت آن تا حدودی به اثرات توکسیک مقادیر بالای گلوکز بر سیستم عصبی محیطی و فعال شدن مسیرهای بیوشیمیایی آلدوز ردوکتاز و الکل‌های با چند گروه هیدروکسیل نسبت داده شده است (۱۷). به علاوه وجود

آن می‌گردد.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که تجویز خوراکی تره کوهی کاهش معنی‌داری در میزان گلوکز سرم در گروه دیابتی تحت درمان در مقایسه با گروه دیابتی ایجاد نموده و یک اثر ضد درد در موش‌های گروه دیابتی تحت تیمار در آزمون

فرمالین اعمال می‌نماید.

تشکر و قدردانی

نویسندگان مراتب تشکر وافر خود را از خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد در کمک به انجام آزمایشات اعلام می‌دارند.

References

- 1) Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. *Medical Science Monitor*. 2006; 12(7), RA 130-47.
- 2) Gleckman R, Mory J. Diabetes-related foot infection. *Contemporary Internal Medicine*. 1994;6(2): 57-62.
- 3) Galer BS, Gianas A, Jensen MP. Painful diabetic polyneuropathy: epidemiology, pain description, and quality of life. *Diabetes Res Clin Pract*. 2000;47(2):123-8.
- 4) Dobretsov M, Hastings SL, Romanovsky D, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rat models of systemic and local hyperglycemia. *Brain Res*. 2003;960(1-2):174-83.
- 5) Dobretsov M, Hastings SL, Stimers JR, Zhang JM. Mechanical hyperalgesia in rats with chronic perfusion of lumbar dorsal root ganglion with hyperglycemic solution. *J Neurosci Methods*. 2001;110(1-2):9-15.
- 6) Raz I, Hasdai D, Seltzer Z, Melmed RN. Effect of hyperglycemia on pain perception and on efficacy of morphine analgesia in rats. *Diabetes*. 1988;37(9):1253-9.
- 7) Nakamura-Craig M, Follenfant RL. Effect of lamotrigine in the acute and chronic hyperalgesia induced by PGE2 and in the chronic hyperalgesia in rats with streptozotocin-induced diabetes. *Pain*. 1995;63(1):33-7.
- 8) Nguansangiam S, Angsubhakorn S, Bhamarapravati S, Suksamrarn A. Effects of elephant garlic volatile oil (*Allium ampeloprasum*) and T-2 toxin on murine skin. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 2003;34(4):899-905.
- 9) Morita T, Ushiroguchi T, Hayashi N, Matsuura H, Itakura Y, Fuwa T. Steroidal saponins from elephant garlic, bulbs of *Allium ampeloprasum* L. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1988;36(9):3480-6.
- 10) Kumari K, Augusti KT. Antidiabetic and antioxidant effects of S-methyl cysteine sulfoxide isolated from onions (*Allium cepa* Linn) as compared to standard drugs in alloxan diabetic rats. *Indian J Exp Biol*. 2002;40(9):1005-9.
- 11) Fritsch RM, Keusgen M. Occurrence and taxonomic significance of cysteine sulphoxides in the genus *Allium* L. (Alliaceae). *Phytochemistry*. 2006;67(11):1127-35.
- 12) Sheela CG, Kumud K, Augusti KT. Anti-diabetic effects of onion and garlic sulfoxide amino acids in rats. *Planta Med*. 1995; 61(4):356-7.
- 13) Kumari K, Augusti KT. Antidiabetic effects of S-methylcysteine sulphoxide on alloxan diabetes. *Planta Med*. 1995; 61(1):72-4.
- 14) Swanston-Flatt SK, Day C, Bailey CJ, Flatt PR. Evaluation of traditional plant treatments for diabetes: studies in streptozotocin diabetic mice. *Acta Diabetol Lat*. 1989;26(1):51-5.
- 15) 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(2):161-74.
- 16) Ceseña RM, Calcutt NA. Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. *Neurosci Lett*. 1999; 262(2):101-4.
- 17) Calcutt NA. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int Rev Neurobiol*. 2002;50:205-28.
- 18) Piercy V, Banner SE, Bhattacharyya A, Parsons AA, Sanger GJ, Smith SA, et al. Thermal, but not mechanical, nociceptive behavior is altered in the Zucker Diabetic Fatty rat and is independent of glycemic status. *J Diabetes Complications*. 1999; 13(3):163-9.
- 19) Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*. 1989; 38(3):347-52.
- 20) Rosland JH, Tjølsen A, Maehle B, Hole K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*. 1990;42(2):235-42.