

بررسی اثر تجویز مزمن خوراکی ریشه بوزیدان (*Withania somnifera*) بر شدت درد موشهای صحرایی نر دیابتی

مهرداد روغنی^{۱*}، توراندخت بلوچ نژاد مجرد^{۲*}، محسن خلیلی^{۳*}، سیده فاطمه مهدوی سلیمی^{۳**}

چکیده

هدف: هیپرالژزی یکی از علائم بارز دیابت قندی در میان مدت محسوب می شود که بر کیفیت زندگی افراد مبتلا تاثیر دارد. با توجه به وجود شواهد تحقیقاتی مبنی بر اثر ضد دیابتی بوزیدان، در این بررسی اثر ضد دردی ریشه این گیاه در موشهای صحرایی دیابتی شده در مراحل حاد و مزمن آزمون فرمالین مورد ارزیابی قرار گرفت.

روش بررسی: موشها به شش گروه کنترل، کنترل تحت تیمار با بوزیدان، کنترل دریافت کننده سدیم سالیسیلات، دیابتی، دیابتی دریافت کننده سدیم سالیسیلات، و گروه دیابتی تیمار شده با بوزیدان تقسیم شدند. برای دیابتی شدن از داروی استرپتوزوتوسین به میزان ۶۰ میلی گرم بر کیلوگرم بطور داخل صفاقی استفاده گردید. دو گروه تحت تیمار با بوزیدان نیز پودر مخلوط شده این گیاه با غذای استاندارد موش (۶/۲۵ درصد) را دریافت نمودند.

یافته‌ها: نتایج نشان داد که نمرات درد در موشهای دیابتی پس از گذشت دو ماه در دو فاز حاد و مزمن بدنال تجویز کف پای فرمالین بیشتر از موشهای کنترل بوده و درمان با بوزیدان به مدت دو ماه موجب کاهش معنی دار در نمرات درد در مراحل حاد و مزمن می گردد ($p < 0/05$). ضمناً با تجویز سدیم سالیسیلات به موشهای دیابتی، کاهش معنی دار در نمره درد فقط در مرحله مزمن آزمون فرمالین مشاهده گردید ($p < 0/01$).

نتیجه گیری: از طرف دیگر کاهش معنی دار در نمرات درد در گروه کنترل تیمار شده با بوزیدان در مقایسه با گروه کنترل مشاهده نشد. بطور خلاصه نتیجه گیری می شود که تجویز خوراکی بوزیدان به مدت دو ماه موجب کاهش معنی دار میزان احساس درد در مدل تجربی دیابت قندی القا شده توسط استرپتوزوتوسین گردیده که این می تواند بعنوان یک درمان کمکی در هیپرالژزی دیابتی مطرح گردد.

کلید واژه‌گان: بوزیدان، درد، دیابت تجربی، موش صحرایی

مقدمه

بیماری دیابت قندی یکی از شایعترین بیماریهای غدد درون ریز بدن محسوب می شود که بر اساس پیش بینی بعمل آمده، شیوع آن در جامعه انسانی در آینده بیش از این افزایش خواهد یافت (۱). کمبود و یا کاهش نسبی میزان انسولین در این بیماری، با عوارض متابولیکی حاد نظیر کتواسیدوز و اغمای هیپراسمولار و با یک اختلال متابولیک مزمن و عوارض نامطلوب در درازمدت نظیر رتینوپاتی، گرفتاری عروق کلیوی، نوروپاتی، ضایعات پوستی، اختلالات دستگاه قلب و گردش خون همراه می باشد (۲).

*دانشیار گروه فیزیولوژی و مرکز تحقیقات گیاهان دارویی دانشگاه شاهد

**دانشیار گروه فیزیولوژی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

***دانشجوی پزشکی، دانشگاه شاهد

۱- نویسنده مسؤل

دریافت مقاله: ۱۳۸۴/۶/۱۹ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۸۵/۷/۲۲ اعلام قبولی: ۱۳۸۶/۱/۲۸

طرف دیگر، بوزیدان به عنوان یک دارو برای بیماران مبتلا به خستگی مفرط با منشأ عصبی، عدم توانایی در به خواب رفتن، و ناتوانیهای ناشی از استرس فیزیکی و روانی کاربرد دارد و دارای خاصیت محرک سیستم ایمنی در بیماران با کاهش شدید تعداد گلبول سفید می باشد (۱۳). لذا با توجه به اینکه قبلاً اثر هیپوگلیسمیک، دیورتیک، و هیپوکلسترولمیک تجویز خوراکی ریشه گیاه بوزیدان در افراد مبتلا به دیابت قندی نوع ۲ مورد تأیید قرار گرفته است و از نظر بالینی عارضه جانبی خاص بر اثر مصرف آن مشاهده نشده است (۱۴) و همالانا و همکاران (۲۰۰۴) اثر هیپوگلیسمیک میوه برخی گیاهان خانواده سولاناسه که بوزیدان نیز در این گروه قرار می گیرد را در مدل تجربی دیابت قندی نوع ۱ القا شده توسط استرپتوزوتوسین در موش صحرایی نشان داده اند (۱۵)، با توجه به این یافته‌ها، در تحقیق حاضر، اثر ضد دردی تجویز درازمدت و خوراکی ریشه بوزیدان در مدل تجربی دیابت قندی القا شده توسط داروی استرپتوزوتوسین در موش صحرایی نر به کمک آزمون فرمالین مورد بررسی قرار گرفت.

روش بررسی

در این تحقیق از موشهای صحرایی نر سفید نژاد Wistar ($n=54$) تهیه شده از انستیتو پاستور تهران در محدوده وزنی 35 ± 300 گرم پس از ۱ ماه قرنطینه در شروع بررسی استفاده گردید. تمام حیوانات در خانه حیوانات در دمای $22-20^\circ C$ در گروههای ۴-۳ تایی در هر قفس قرار داده شدند. ضمناً حیوانات آزادانه به آب و غذای فشرده مخصوص موش ساخت شرکت خوراک دام پارس و غذای مخلوط شده با پودر ریشه بوزیدان به نسبت ۷۲/۲۵ درصد به مدت دو ماه دسترسی داشتند (۸). روش تهیه غذای حاوی بوزیدان: پس از خریداری ریشه گیاه بوزیدان از بازار محلی و تأیید علمی توسط بخش گیاه شناسی دانشگاه شهید بهشتی (نورانی و همکاران)، پودر

درد ناشی از نوروپاتی اعصاب محیطی یکی از شکایات مهم بالینی افراد مبتلا به دیابت قندی محسوب می شود و کیفیت زندگی این افراد را تحت تاثیر قرار می دهد. بنابراین تعدیل درد در این افراد از اهمیت زیادی برخوردار است (۴، ۳). نتایج برخی تحقیقات اخیر نشان می دهد که بروز هیپرگلیسمی با اعمال اثرات توکسیک بر روی سیستم عصبی محیطی یکی از علل بروز نوروپاتی دردناک می باشد. علاوه بر این هیپر گلیسمی با تغییر دادن عملکرد بافتهای عمومی بدن موجب یکسری تغییرات خاص شیمیایی در بدن می گردد که خود می تواند موجب بروز نوروپاتی شود (۵). بر خلاف شواهد موجود، نتایج برخی تحقیقات دیگر نشان می دهد که هیپرگلیسمی تاثیری در تغییر آستانه درد ندارد (۶). با توجه به اینکه تا کنون ترکیب دارویی مناسب (نظیر سالیسیلاتها و ترکیبات ضد التهابی غیر استروئیدی) عاری از عوارض جانبی برای درمان برخی حالات درد حاد و مزمن بویژه در مورد دیابت قندی یافت نمی شود (۷)، لذا توجه محققان بسیاری به گیاهان دارویی معطوف شده است. در این ارتباط طب سنتی و گیاهان دارویی منبع مناسبی جهت یافتن داروهای ضد درد می باشند (۸). در این خصوص، بوزیدان یک گیاه با خواص دارویی مهم در طب سنتی در دنیا محسوب می گردد (۹). از نظر تاریخی، این گیاه دارای خواص تقویت کنندگی، ترمیم کبدی، و ضدالتهاب بوده و در طی سالیان اخیر کاربرد آن در درمان و یا بهبودی برانشیت، آسم، زخم، اختلالات خواب، و زوال عقل در پیری، دیس کینزی و سکنه مغزی مورد تأیید قرار گرفته است (۱۰). بعلاوه نتایج تحقیقات بالینی و آزمایشگاهی بر روی نمونه های حیوانی نشان می دهد که این گیاه در مورد اضطراب و بیماریهای شناختی و برخی اختلالات عصبی نظیر بیماری پارکینسون می تواند سودمند باشد (۱۱). همچنین جدیداً استفاده از این گیاه به عنوان یک داروی جانبی در ارتباط با شیمی درمانی و رادیوتراپی در بیماران سرطانی مطرح شده است (۱۲). از

بدست آمده از آسیاب نمودن ریشه با یک نسبت وزنی ۶/۲۵ درصد با غذای پودر شده و استاندارد موش مخلوط و مجدداً غذای فشرده تولید گردید (۸).

یافته‌ها

در این بررسی از آن دسته موشهای صحرایی استفاده شد که در شرایط طبیعی بدون برقراری حالت روزه‌داری میزان گلوکز سرم آنها پائین‌تر از حد ۲۵۰ میلی‌گرم/دسی‌لیتر بود. کنترل، کنترل دریافت کننده بوزیدان، کنترل دریافت کننده سدیم سالیسیلات، دیابتی، دیابتی دریافت کننده سدیم سالیسیلات (کنترل مثبت) و دیابتی دریافت کننده بوزیدان تقسیم شدند. دو گروه کنترل و دیابتی دریافت کننده سدیم سالیسیلات پس از گذشت دو ماه، سدیم سالیسیلات را به میزان ۲۰۰ میلی‌گرم/کیلوگرم (سیگما، آلمان) بطور داخل صفاقی یکساعت قبل از انجام بررسی دریافت نمودند (۱۵). برای دیابتی نمودن حیوانات از داروی STZ^۱ به صورت تک دوز و داخل صفاقی به میزان ۶۰ میلی‌گرم/کیلوگرم حل شده در محلول سرم فیزیولوژیک سرد استفاده گردید (۱۶). حجم تزریق محلول به حیوانات در هر گروه ۰/۵ میلی‌لیتر بود. پس از گذشت دو ماه، آزمون فرمالین بر روی تمام موشها انجام گرفت. در این ارتباط در مورد هر موش آزمون فرمالین فقط یک بار انجام پذیرفت. اندازه‌گیری میزان گلوکز سرم توسط روش آنزیمی گلوکز اکسیداز تهیه شده از شرکت زیست شیمی، تهران و با استفاده از اسپکتروفتومتر^۲ قبل از انجام کار و در هفته‌های چهارم و هشتم قبل از انجام آزمون درد انجام پذیرفت.

آزمون فرمالین: برای این آزمون از روش متداول Dubuisson and Dennis استفاده گردید (۱۶). بدین ترتیب که حیوان در یک محفظه از جنس پلکسی گلاس (۴۰ × ۴۰ × ۴۰ سانتیمتر) در 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 چپ حیوان تزریق شد و شدت درد حیوان بر اساس تقسیم بندی زیر به چهار درجه تفکیک گردید: (۰) - حیوان بدون احساس درد روی پای تزریق شده می‌ایستد و 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 می‌شد. با استفاده از این روش اعداد ۰ تا ۳ برای امتیاز درد در زمان‌های مختلف بدست می‌آید. میانگین درد در ده دقیقه اول بعد از تزریق فرمالین به عنوان مرحله اول یا حاد و در دقایق ۱۶ تا ۶۰ بعنوان مرحله دوم یا مزمن در نظر گرفته شد. محاسبه نمره درد بر اساس متد Dubuisson انجام پذیرفت (۱۶)

آنالیز آماری: تمام داده‌ها در بررسی حاضر به صورت \pm S.E.M. میانگین بیان شده است. برای آنالیز آماری درمورد نتایج وزن و گلوکز از آزمون Repeated measure ANOVA و در مورد درد از آزمون One-way ANOVA و در مورد اخیر در صورت معنی دار شدن از آزمون Tukey استفاده گردید. بعلاوه، $p < 0/05$ بعنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

بحث

در بررسی حاضر، وزن موشها در هفته قبل از القا دیابت و در هفته‌های چهارم و هشتم پس از بررسی تعیین گردید (جدول ۱). از نظر وزن حیوانات در هفته‌های پس از بررسی، در موشهای دیابتی تیمار نشده، یک کاهش

(جدول ۱). در هفته قبل از بررسی هیچگونه تفاوت معنی‌دار بین گروهها مشاهده نگردید. همچنین، در موشهای دیابتی درمان نشده، افزایش معنی‌دار سطح گلوکز در هفته‌های چهارم و هشتم ($p < 0/001$) پس از بررسی در مقایسه با هفته قبل بررسی مشاهده گردید بعلاوه تیمار گروه دیابتی با بوزیدان هیچگونه تغییر معنی‌دار در سطح گلوکز در همین هفته‌ها در مقایسه با گروه دیابتی ایجاد نمود، هر چند که میزان گلوکز در گروه دیابتی تیمار شده به میزان $10/6$ درصد و $11/2$ درصد کمتر از گروه دیابتی تیمار نشده به ترتیب در هفته‌های چهارم و هشتم بود.

معنی‌دار در وزن در هفته‌های چهارم ($p < 0/01$) و هشتم ($p < 0/005$) نسبت به هفته قبل بررسی مشاهده گردید.

1-Upjohn, France
2- Spectronic, USA

بعلاوه، موشهای دیابتی تحت تیمار با بوزیدان نیز مشابه گروه دیابتی درمان نشده کاهش وزن را در هفته‌های چهارم و هشتم در مقایسه با گروه کنترل نشان دادند ($p < 0/01$ و $p < 0/05$)، هر چند که این کاهش بطور غیر معنی‌دار کمتر از گروه دیابتی درمان نشده بود. در این بررسی، میزان گلوکز سرم نیز در هفته قبل از بررسی و در هفته‌های چهارم و هشتم پس از بررسی تعیین گردید

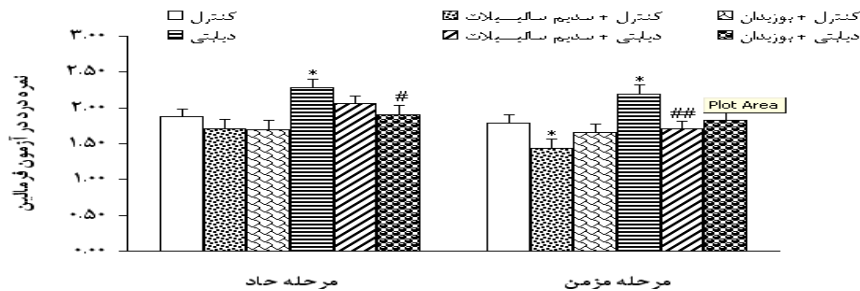
جدول ۱: اثر تجویز خوراکی ریشه بوزیدان بر میزان وزن و گلوکز سرم در موشهای صحرائی کنترل و دیابتی

میزان گلوکز سرم (میلی گرم بر دسی لیتر)			وزن بدن (گرم)			
هفته ۸	هفته ۴	هفته ۰ (قبل از بررسی)	هفته ۸	هفته ۴	هفته ۰ (قبل از بررسی)	
$122/4 \pm 9/7$	$148/5 \pm 10/6$	$139/3 \pm 9/2$	$321/6 \pm 9/1$	$309/8 \pm 8/3$	$299/2 \pm 9/6$	کنترل
$127/6 \pm 9/2$	$142/6 \pm 8/9$	$145/2 \pm 10/1$	$322/5 \pm 11/4$	$318/3 \pm 10/5$	$312/6 \pm 9/1$	کنترل + بوزیدان
$411/3 \pm 13/9^{*****}$	$423/3 \pm 18/4^{*****}$	$138/4 \pm 11/3$	$207/4 \pm 10/7^{***}$	$230/1 \pm 12/6^{**}$	$291/6 \pm 10/3$	دیابتی
$365/5 \pm 16/6^{*****}$	$378/4 \pm 15/1^{*****}$	$129/9 \pm 8/3$	$238/3 \pm 15/4^{**}$	$267/1 \pm 10/8^*$	$315/7 \pm 11/4$	دیابتی + بوزیدان

* $P < 0/05$ ، ** $p < 0/01$ ، *** $p < 0/005$ ، **** $p < 0/001$ (در مقایسه با هفته قبل بررسی)

دار بین دو گروه دیابتی دریافت کننده سدیم سالیسیلات و بوزیدان مشاهده نگردید. از طرف دیگر، تجویز خوراکی بوزیدان به مدت دو ماه به موشهای کنترل و دیابتی شده بترتیب موجب کاهش نمرات درد در دو فاز حاد و مزمن آزمون فرمالین در مقایسه با گروه کنترل و دیابتی درمان نشده به میزان $10/1$ درصد (غیر معنی دار) و $7/2$ درصد (غیر معنی دار) برای گروه کنترل تیمار شده و به میزان $16/6$ درصد ($p < 0/05$) و $16/4$ درصد ($p < 0/05$) برای گروه دیابتی تیمار شده گردید.

شکل ۱: نتایج حاصله از آزمون فرمالین را در دو فاز حاد و مزمن در گروههای مختلف نشان می دهد. تزریق کف پای فرمالین یک پاسخ بارز دو فازی را در تمام گروهها ایجاد نمود. هیپرآلژزی القا شده بر اثر فرمالین در موشهای دیابتی درمان نشده در هر دو فاز تست فرمالین بیشتر از گروه کنترل بود ($p < 0/05$). بعلاوه تجویز سدیم سالیسیلات به موشهای گروه کنترل و دیابتی به ترتیب موجب کاهش معنی‌دار نمره درد فقط در فاز دوم آزمون فرمالین در مقایسه با گروههای کنترل و دیابتی گردید ($p < 0/05$ و $p < 0/01$). بعلاوه هیچگونه تفاوت معنی



شکل ۱: اثر تجویز خوراکی بوزیدان مخلوط شده با غذای استاندارد موش (به نسبت ۱/۱۵) بر میزان احساس درد در آزمون فرمالین در موشهای دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین پس از گذشت دو ماه در دو مرحله حاد و مزمن
 * (p < ۰/۰۵) در مقایسه با گروه کنترل (p < ۰/۰۵) # (p < ۰/۰۱) ## در مقایسه با گروه دیابتی

نتیجه گیری

(۱۸). بعلاوه وجود حالت دیابت پردازش سیگنالهای درد را در ناحیه نخاع تحت تاثیر قرار می دهد (۱۷-۱۸). از طرف دیگر نتایج تحقیقات اخیر نشان می دهد که موشهای صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین را می توان بعنوان مدل درد مزمن به حساب آورد که در مورد آن نشانه های پردردی و آلودینی^۱ در کوتاه مدت (۱ الی دو ماه) بخوبی مشاهده می شود (۱۹). با توجه به اینکه در فاز مزمن تست فرمالین در موجودات نرمال و دیابتی شده مکانیسمهای محیطی و در فاز حاد آن مکانیسمهای مرکزی دخالت دارند (۲۱-۲۰)، 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 می کند که تحقیق حاضر مؤید این نظر است. نتایج بدست آمده در این بررسی نشان داد که مصرف خوراکی ریشه بوزیدان در گروه دیابتی به مدت دو ماه هر چند فاقد اثر هیپوگلیسمیک در حد معنی دار

نتایج بررسی حاضر نشان داد که تجویز خوراکی ریشه بوزیدان کاهش معنی دار در میزان گلوکز سرم در گروه دیابتی در مقایسه با گروه دیابتی تحت درمان بوجود نمی آورد در حالیکه یک اثر آنالژژیک بارز در موشهای دیابتی شده تحت تیمار در آزمون فرمالین اعمال می نماید. در این ارتباط، نتایج تحقیقات قبلی نشان داده است که موشهای صحرایی دیابتی شده توسط استرپتوزوتوسین بطور غیر منتظره یک رفتار تشدید شده مربوط به درد را در آزمون فرمالین بدنال تجویز محرکهای شیمیایی بدخل پنجه پا پس از گذشت ۳-۴ هفته نشان می دهند که خود دلالت بر وجود مکانیسمهای غیر نرمال و متعدد در پردازش سیگنالهای محیطی درد دارد (۱۷). قبلاً وجود هیپرالژزی مکانیکی بعنوان اولین نشانگان نوروپاتی دیابتیک به اثبات رسیده است 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

توسط ایزوپرنالین در موش صحرایی می باشد که از این نظر قابل مقایسه با قدرت اثر ویتامین E از نظر خاصیت آنتی اکسیدانتی و حفاظت قلبی - عروقی است (۲۲). همچنین، نتایج تحقیقات گوپتا و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که تیمار با بوزیدان به یک فرم وابسته به دوز موجب کاهش فعالیت آنزیم گلوکوتیون پراکسیداز و مهار پراکسیداسیون لیپیدی و اکسیداسیون پروتئینی القا شده توسط مس در موش کوچک آزمایشگاهی می گردد که بر این اساس در برقراری سلامت جسم و روان مؤثر خواهد بود (۱۲). بطور خلاصه، مصرف خوراکی و درازمدت ریشه بوزیدان با یک نسبت وزنی ۱/۱۵ هر چند فاقد اثر هیپوگلیسمیک بارز در موشهای صحرایی دیابتی می باشد، ولی یک اثر آنالژیک در حد ملایم تا متوسط در حیوانات دیابتی شده اعمال می نماید و این بعنوان یک درمان کمکی در هیپرآلزی دیابتی مطرح می گردد.

قدردانی

بخشی از بودجه تحقیقاتی پژوهش حاضر از محل اعتبار پژوهشی معاونت پژوهشی دانشگاه شاهد (۱۳۸۳-تهران) تأمین شده است. ضمناً نویسندگان مقاله مراتب تشکر وافر خود را از سرکار خانم فریبا انصاری کارشناس گروه فیزیولوژی دانشکده پزشکی شاهد در تهیه مواد و وسایل پژوهش و کمک به انجام آزمایشات اعلام می دارند.

بوده، ولی موجب کاهش معنی دار پاسخ درد در هر دو

1- Allodynia

فاز آزمون فرمالین در موشهای دیابتی می گردد. نتایج تحقیقات قلبی توسط Hemalatha و همکاران (۲۰۰۴) اثر هیپوگلیسمیک میوه برخی گیاهان خانواده Solanaceae که بوزیدان نیز در این گروه قرار می گیرد را در مدل تجربی دیابت قندی نوع ۱ القا شده توسط استریتوزوتوسین در موش صحرایی نشان داده اند (۱۵) که که علت تفاوت تا حدودی به استفاده از ریشه گیاه در تحقیق حاضر و تفاوت در مواد مؤثره اجزاء مختلف گیاه مربوط می باشد. بعلاوه، در بررسی حاضر اثر سودمند و آنالژیک مصرف مزمن و خوراکی ریشه بوزیدان در حیوانات دیابتی پس از دو ماه مورد تأیید قرار گرفت. در این خصوص قبلاً مشخص شده است که بروز دیابت قندی در موش کوچک آزمایشگاهی دیابتی شده توسط استریتوزوتوسین موجب افزایش استرس اکسیداتیو ناشی از تشدید تشکیل رادیکالهای فعال اکسیژن در برخی نواحی مغز می شود و درمان با عصاره بوزیدان موجب کاهش پراکسیداسیون لیپیدی و در نتیجه تخفیف دژنراسیون در مغز می گردد (۱۳-۱۲). از طرف دیگر، در بررسی انجام شده توسط موهانتی و همکاران (۲۰۰۴) مشخص شد که تجویز عصاره هیدروالکلی بوزیدان به فرم خوراکی به مدت چهار هفته دارای خاصیت محافظت کنندگی قلب در مدل تجربی نکرور میوکارد القا شده

منابع

- 1-Tripathi BK, Srivastava AK. Diabetes mellitus: complications and therapeutics. Med Sci Monit 2006;12:RA130-47
- 2-Gleckman R, Mory J. Diabetes-related foot infection. J of Contemporary Internal Med 1994; 6: 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: 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: 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: 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: 1253-9.
- 7-Nakamura-Craig M, Follenfant R L. 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, 33-7.
- 8-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.
- 9-Mishra LC, Singh BB, Dagenais S. Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): review. *Altern Med Rev* 2000; 5:334-46.
- 10-Czap K. *Withania somnifera* – monograph. *Altern Med Rev* 2004; 9:211-4.
- 11-Ahmad M, Saleem S, Ahmad AS, Ansari MA, Yousuf S, Hoda MN, Islam F. Neuroprotective effects of *Withania somnifera* on 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism in rats. *Hum Exp Toxicol* 2005; 24:137-47.
- 12-Gupta SK, Dua A, Vohra BP. *Withania somnifera* (Ashwagandha) attenuates antioxidant defense in aged spinal cord and inhibits copper induced lipid peroxidation and protein oxidative modifications. *Drug Metabol Drug Interact* 2003; 19:211-22.
- 13-Dhuley JN. Effect of ashwagandha on lipid peroxidation in stress-induced animals. *J Ethnopharmacol* 1998; 60:173-8.
- 14-Andallu B, Radhika B. Hypoglycemic, diuretic and hypocholesterolemic effect of winter cherry (*Withania somnifera*, Dunal) root. *Indian J Exp Biol* 2000; 38:607-9.
- 15-Hemalatha S, Wahi AK, Singh PN, Chansouria JP. Hypoglycemic activity of *Withania coagulans* Dunal in streptozotocin induced diabetic rats. *J Ethnopharmacol* 2004; 93:261-264.
- 16-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.
- 17-Cesena RM, Calcutt NA. Gabapentin prevents hyperalgesia during the formalin test in diabetic rats. *Neurosci Lett* 1999; 262: 101-4.
- 18-Calcutt NA. Potential mechanisms of neuropathic pain in diabetes. *Int Rev Neurobiol* 2002; 50: 205-28.
- 19-Piercy V, Banner SE, Bhattacharyya A, Parsons AA, Sanger GJ, Smith SA, Bingham S. 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: 163-9.
- 20-Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38: 347-52.
- 21-Rosland, J.H., Tjolsen, A., Maehle, B., Hole, K. The formalin test in mice-effect of formalin concentration. *Pain* 1990; 42: 235-42.
- 22-Mohanty I, Arya DS, Dinda A, Talwar KK, Joshi S, Gupta SK. Mechanisms of cardioprotective effect of *Withania somnifera* in experimentally induced myocardial infarction. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2004; 94:184-90.