

Study of Analgesic Effect of Hydroalcoholic Extract Olive Leaf (*Olea europaea*) in Mice

S. Garavand^{1*}, K. Ebrahimi², M. Zendehe³, K. Keramati⁴, M. Amozad⁵, E. Noroze⁶, F. Gravand⁷

1. Division of Physiology, Department of Basic Sciences, Payam-e-Noor University (pnu), Kohdasht, Iran, 2. Department of Botany, Payam-e-Noor University (pnu), Khoram abad, Iran, 3. Division of Physiology, Department of Basic Sciences, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran, 4. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Seamnan University, Iran, 5, 6. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Damghan Branch, Iran, 7. M. Sc. of Environmental, Habitat and Biodiversity
(Received: Dec. 10, 2013; Accepted: May. 9, 2014)

Abstract

In this study the effect of hydroalcoholic extract of olive leaf (*Olea europaea*) on visceral pain has been investigated. For this purpose, there has been used of male mice with weight (28±3g). Animals were grouped randomly into control, positive control and receivers of olive leaf hydroalcoholic extract. Control group and positive control group received normal saline 0.9% and indomethacin (5mg/kg, i.p.), respectively. Treatments groups were injected with doses, (125mg/kg, i.p.), (250mg/kg, i.p.) and (500 mg/kg, i.p.) of hydroalcoholic extract of olive leaf. Animals were injected with acetic acid 0.6% (10ml/kg) for inducing of visceral pain, 30 minutes after of each intra peritoneal administration, and analgesic effect was recorded by counting the number of writhes (elongations) immediately after injection of acetic acid during 30 minutes. The results of this study was showed that hydroalcoholic extract of olive leaf with used doses and indomethacin with dose (5 mg/kg, i.p.) induced significant reduction in response to the pain in comparison with the control group. $P < 0.05$). It can be concluded that hydroalcoholic extract of olive leaf with dose dependent manner leads to reduction in pain ($p < 0.05$).

Keywords: Olive Leaf, Pain, Writhing Test.

بررسی اثر ضد دردی عصاره هیدروالکلی برگ زیتون در موش‌های سوری (*Olea europaea*)

صدیقه گراوند^{۱*}، کاترین ابراهیمی^۲، مرتضی زنده‌دل^۳، کیوان کرامتی^۴، محدثه عموزاد خلیلی^۵، الهام نوروزی^۶، فرود گراوند^۷

۱. بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشگاه پیام نور
۲. گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور خرم‌آباد، ۳. بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشکده دامپزشکی دانشگاه تهران، ۴. بخش فیزیولوژی، گروه علوم پایه، دانشگاه سمنان، ۵، ۶. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد دامغان، ۷. کارشناس ارشد محیط زیست، زیستگاه‌ها و تنوع محیط زیست
(تاریخ دریافت: ۹۲/۹/۱۹، تاریخ تصویب: ۹۳/۲/۱۹)

چکیده

در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی برگ زیتون بر درد احشایی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور از موش‌های سوری با وزن تقریبی ۲۸±۳ گرم استفاده شد. حیوانات به طور تصادفی به گروه‌های کنترل، شاهد مثبت و دریافت‌کننده عصاره هیدروالکلی برگ زیتون تقسیم شدند. گروه کنترل و گروه شاهد مثبت به ترتیب نرمال سالین نمکی ۰/۹ درصد و ایندومتاسین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم دریافت کردند. گروه‌های درمانی نیز تحت تزریق دوزهای ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره هیدروالکلی برگ زیتون قرار گرفتند. ۳۰ دقیقه بعد از هر تجویز داخل صفاقی، حیوانات برای القای درد احشایی تحت تزریق اسید استیک ۰/۶ درصد با دوز ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم قرار گرفتند و اثرات ضد دردی با شمارش تعداد رایت‌ها (کشیدگی‌ها) بلافاصله پس از تزریق اسید استیک در طی ۳۰ دقیقه ثبت شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که عصاره هیدروالکلی برگ گیاه زیتون با دوزهای استفاده شده و ایندومتاسین با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم کاهش معنی‌داری را در پاسخ به درد در مقایسه با گروه کنترل ایجاد می‌کند. می‌توان چنین نتیجه‌گیری کرد که عصاره هیدروالکلی برگ زیتون به صورت وابسته به دوز منجر به کاهش درد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: برگ زیتون، درد، تست رایتینگ.

مقدمه

درد، احساسی نامطلوب است که در اثر آسیب وارده به بافت‌های مختلف ایجاد می‌شود. درد به عنوان عامل هشداردهنده‌ای است که وجود یا احتمال وجود خطر را در یک عضو نشان می‌دهد (Goldman & Bennett, 2000). درد احشایی یکی از دردهای رایج ناشی از بیماری است که نیاز به درمان دارویی دارد. علیرغم این باور که درد احشایی از دردهای سوماتیک است، مکانیسم عصبی و مسیره‌های انتقال آن متفاوت می‌باشد به طوری که این درد با هیپرالژی راجعه مشخص می‌شود و الزاماً با ضایعه بافتی همراه نیست (Cervero & Larid, 1999). بیماری، التهاب و آسیب به سیستم عصبی مرکزی و محیطی موجب تغییرات بارز در مسیره‌های درد مانند افزایش تحریک‌پذیری، تغییر در بیان ژن و مولکول‌های جدید نظیر نوروترانسمیترها، آنزیم‌ها و گیرنده‌های درد می‌گردد. ابتلا به بعضی دردها در دراز مدت اثرات نامطلوب روحی و روانی را بر فرد تحمیل می‌کند. به همین دلیل بشر به دنبال راه حلی برای از بین بردن و یا کاهش درد بوده است و تا کنون تلاش‌های مؤثر زیادی در زمینه شناخت مکانیسم‌های درد و درمان انواع آن صورت گرفته است (Lanni & Becker, 1985). در حال حاضر کنترل درد با استفاده از داروهای ضد التهاب غیراستروئیدی و داروهای ضد درد اپیوئیدی انجام می‌گیرد. مصرف این داروها عوارض جانبی متعددی به همراه دارد. بنابراین، تحقیق برای دستیابی به ترکیبات ضد درد با عوارض کمتر ضروری به نظر می‌رسد (Gard, 2001). در این رابطه گیاهان دارویی یک منبع مهم از مواد مؤثری هستند که به دلیل همراه بودن با ترکیبات دیگر، در بسیاری از موارد از یک حالت متعادل زیستی برخوردار بوده و لذا اثرات جانبی کمتری خواهند داشت (Blumenthal, 1998; Volak & Stodola, 2000). در این رابطه می‌توان از گیاه زیتون نام برد که در درمان التهاب پنجه پای موش مؤثر است و از جمله ترکیبات آن

هیدروکسی ترروزول را می‌توان نام برد که باعث مهار اینترلوکین یک بتا و فاکتور نکروزکننده توموری آلفا می‌شود (Dezheng et al., 2009; Xiaomei et al., 2009). با توجه به نقش این سیتوکین‌ها در درد و این که اینترلوکین یک بتا تولید پروستاگلاندین‌ها را تحریک می‌کند و در نهایت پروستاگلاندین‌ها گیرنده‌های درد را تحریک می‌کنند، این سیتوکین‌ها باعث ایجاد درد خواهند شد (Waldiceu, 2007). لذا با توجه به ترکیبات گیاه زیتون از جمله هیدروکسی ترروزول، در این مطالعه اثر عصاره هیدروالکلی برگ زیتون در درمان دردهای احشایی به روش رایتینگ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

تهیه عصاره هیدروالکلی گیاه زیتون

برای عصاره‌گیری، ابتدا برگ‌های خشک شده زیتون را پودر کرده و سپس ۳۰۰۰ میلی‌لیتر الکل اتانولیک را به ۵۰۰ گرم از پودر برگ زیتون اضافه و به مدت ۷۲ ساعت در دمای محیط قرار دادیم. با استفاده از کاغذ صافی و قیف بوختر، محلول صاف و در مرحله بعد با کمک دستگاه حذف حلال^۱ و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد، عمل تبخیر را تا یک محلول غلیظ به دست آید (۹۰ درصد) سپس عصاره را در بن‌ماری و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده تا کاملاً خشک شود و بعد از تعیین درصد رطوبت بر اساس محاسبات، وزن مورد نیاز از عصاره برداشته و با سالیین رقیق شد. برای تهیه محلول‌ها از نرمال سالیین ۰/۹ درصد استفاده شد.

روش آزمایش

در این تحقیق از موش‌های سوری نر نژاد N-MRI با وزن تقریبی 28 ± 3 گرم (تهیه شده از انستیتو پاستور ایران) استفاده شد. حیوانات به طور تصادفی گروه بندی شدند و تحت شرایط ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت

به گروه کنترل نشان داد ($p < 0.001$). همچنین عصاره هیدروالکلی برگ زیتون به صورت وابسته به دوز، منجر به کاهش تعداد رایت‌ها در هر سه دوز به کار رفته نسبت به گروه کنترل شد ($p < 0.05$) که مؤثرترین دوز ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود ($p < 0.01$) (نمودار ۱). جدول ۱ تعداد رایت‌ها و درصد کاهش پاسخ به درد در گروه ایندومتاسین و هر سه دوز به کار رفته عصاره هیدروالکلی برگ زیتون را نشان می‌دهد.

بحث و نتیجه‌گیری

مדיاتوره‌های متعددی از قبیل کینین، استیل کولین، ماده p، پپتید مرتبط با ژن کلسی‌تونین و پروستاگلاندین‌ها در ایجاد درد احشایی و انتقال آن از احشاء دخالت دارند (Cervero & Larid, 1999; Vogel, 1977). مشاهدات نشان داده که برگ زیتون باعث مهار درد به صورت وابسته به دوز می‌شود چون دارای ترکیبی به نام هیدروکسی ترورول است که قبلاً از برگ زیتون استخراج شده و در درمان التهاب پنجه پای موش مؤثر واقع شده است به طوری که باعث مهار فاکتور نکروزکننده توموری آلفا و اینترلوکین یک بتا و در نتیجه درمان التهاب پنجه پای موش می‌شود و بررسی‌ها نشان داده که این ترکیب احتمالاً اثر ضد التهابی خود را از طریق مهار سیکلواکسیژناز دو اعمال می‌کند. (Dezheng *et al.*, 2009; Xiaomei *et al.*) 2009. نقش سیتوکین‌ها در ایجاد سیگنال‌های التهابی از جمله به کارگیری سلول‌های سفید خون، آزادسازی پروتئین فاز حاد و افزایش نفوذپذیری عروق خونی توصیف شد (Bimta *et al.*, 2003; Waldiceu *et al.*, 2007). فاکتور نکروزکننده توموری آلفا مولکول کلیدی در آغاز التهاب است. این فاکتور در آغاز ایجاد درد التهابی، افزایش پیدا می‌کند و آزادسازی اینترلوکین یک بتا و کموکین‌ها را تحریک می‌کند (Waldiceu *et al.*, 2007).

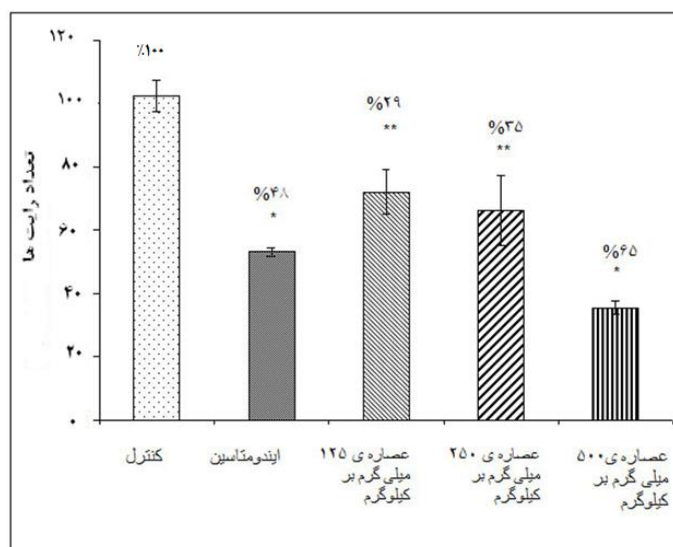
تاریکی با دمای محیط 22 ± 3 درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. طی مدت نگهداری و آزمایش، آب و غذای کافی در اختیار حیوانات قرار می‌گرفت.

جهت بررسی اثرات ضد دردی گیاه، موش‌ها به طور تصادفی به ۵ گروه آزمایشی (شامل یک گروه کنترل، یک گروه کنترل مثبت و ۳ گروه درمانی) تقسیم شدند و در هر گروه تعداد موش‌ها برابر با ۷ بود. در گروه کنترل از سالین نرمال؛ گروه کنترل مثبت از ایندومتاسین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در گروه‌های درمانی از دوزهای ۱۲۵، ۲۵۰ و ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره هیدروالکلی برگ زیتون استفاده گردید. در تمامی گروه‌ها تزریق به صورت داخل صفاقی انجام شد. جهت بررسی اثرات ضد دردی عصاره هیدروالکلی برگ زیتون از تست رایتینگ به عنوان مدل ایجاد درد احشایی استفاده گردید. برای این منظور، در هر کدام از گروه‌ها ابتدا اسید استیک ۰/۶ درصد با دوز ۱۰ میلی‌لیتر بر کیلوگرم به صورت درون صفاقی تزریق شد و بلافاصله پس از آن تعداد رایت‌ها (کشیدگی‌ها) که معرف ایجاد درد احشایی بودند در مدت زمان ۳۰ دقیقه شمارش و ثبت گردید. ضمناً یک رایت با انقباضات شکمی و کشیدن حداقل یکی از اندام‌های حرکتی خلفی مشخص می‌شود (Koste *et al.*, 1959; Vogel, 1977; Cervero & Larid, 1999).

نتایج حاصل از این تحقیق با استفاده از نرم‌افزار آماری SPSS 16 و آزمون آنالیز واریانس یک طرفه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت و برای بررسی تفاوت بین گروه‌ها از آزمون Tukey در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ استفاده شد. همه نتایج به صورت میانگین \pm انحراف استاندارد از میانگین (Mean \pm SEM) ارائه شد.

نتایج

بر اساس نتایج حاصل از این تحقیق، ایندومتاسین با دوز ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم به عنوان گروه کنترل مثبت، کاهش معنی‌داری را در تعداد رایت‌ها نسبت



نمودار ۱. میانگین و انحراف استاندارد میانگین اثرات ضد دردی عصاره هیدروآلکلی برگ زیتون و ایندومتاسین در مقایسه با گروه کنترل: $p < 0.05$ ، $p < 0.01$ و $p < 0.001$ ***

جدول ۱. تعداد رایت‌ها و درصد کاهش پاسخ به درد در گروه‌های مختلف کنترل و آزمایشی

گروه	تعداد نمونه	کمترین رایت	بیشترین رایت	میانگین رایت‌ها در ۳۰ دقیقه	درصد کاهش پاسخ به درد
کنترل	۷	۹۰	۱۱۸	۳۳.۱۰۲±۹۱.۴	-
ایندومتاسین ۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۷	۴۹	۵۶	۱۷.۵۳±۳۲.۱	۴۸.۰۳
زیتون ۱۲۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۷	۵۴	۹۲	۷۲±۰۴.۷	۲۹.۴۱
زیتون ۲۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۷	۲۹	۹۱	۱۷.۶۶±۹۸.۱۰	۳۵.۲۹
زیتون ۵۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم	۷	۳۰	۴۱	۵.۳۵±۹۷.۱	۶۵.۱۹

تورم اعمال می‌شود و عملکردهای ضدالتهابی را با تنظیم پایین سیکلو اکسیژناز دو اعمال می‌کند (Johand Haddad, 2007). بنابراین اینترلوکین یک بتا تولید پروستاگلاندین‌ها را تحریک می‌کند و در نهایت پروستاگلاندین‌ها گیرنده‌های درد را تحریک می‌کنند. در یک یافته مهم اهمیت اینترلوکین یک بتا، در ایجاد درد در حیوانات آزمایشگاهی ثابت شده است به طوری که تزریق داخل کف پای اینترلوکین یک بتا درد مکانیکی را تولید می‌کند و به تولید پروستاگلوئید وابسته است. در حالی که پیش درمان با ایندومتاسین مهارکننده سیکلو اکسیژناز دو تأثیراتش را بلوکه می‌کند (Waldiceu et al., 2007). رسپتورهای گلوتامات عصبی، به ویژه رسپتور n متیل دی آسپاراتات، نقش

اینترلوکین یک بتا بیان سیکلو اکسیژناز دو و آزادسازی متعاقب پروستاگلاندین‌ها را تحریک می‌کند که در تحریک گیرنده‌های درد نقش دارد (Fabiana et al., 2010). سیکلو اکسیژنازها آنزیم‌هایی هستند که تبدیل آراشیدونیک اسید به پروستاگلاندین‌ها را کاتالیز می‌کنند و نقش مهمی در التهاب و درد دارند (Pochazkova et al., 2009). قبلاً نیز نقش پروستاگلاندین‌ها در التهاب گزارش شده و اثری که در این مورد به خوبی ثبت شده تولید مداخله شده و سیکلو اکسیژناز دو و سنتز پروستاگلاندین توسط اینترلوکین یک بتا است به طوری که رفوکوکسیب به عنوان مهارکننده سیکلو اکسیژناز دو برای درمان درد التهابی تأیید شده و آسپرین (اسید سالیسیلیک) اغلب برای کاهش التهاب و

متانولیک برگ زیتون است. فلاونوئیدها دارای خاصیت مهارکنندگی بر روی بسیاری از آنزیم‌های مؤثر در التهاب از جمله پروتئین کیناز c، فسفولیپاز A2 و فسفودی‌استرازهاست. فلاونوئیدها با مهار و یا کاهش فعالیت این آنزیم‌ها باعث کاهش آزادسازی برخی عوامل التهابی از جمله ترکیبات پروستاگلاندینی، سیتوکینی و هیستامینی می‌شوند (Tekieh *et al.*, 2011)؛ لذا ترکیبات موجود در گیاه زیتون ممکن است از طریق مهار آنزیم سیکلو اکسیژناز (Suksamran *et al.*, 2002; Raso *et al.*, 2001)، و همچنین مهار آزادسازی پروستاگلاندین‌ها و سایر مدیاتورهای دخیل در این تست باعث کاهش درد ناشی از اسید استیک شوند (Farsam *et al.*, 1973; Ferreira *et al.*, 2004). در جمع‌بندی می‌توان گفت که احتمالاً تزریق عصاره هیدروالکی برگ زیتون در این مطالعه به دلیل وجود ترکیب هیدروکسی تروزول و فلاونوئیدها از طریق مهار اینترلوکین یک بتا و متعاقب آن مهار سیکلوکسیژناز و مهار آزادسازی پروستاگلاندین‌ها باعث کاهش درد شد.

سپاسگزاری

از گروه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد دامغان و همه همکارانی که در اجرای این تحقیق، نگارندگان را یاری داده‌اند تشکر و قدردانی می‌گردد.

مهمی را در پلاسیستی سیناپسی وابسته به فعالیت و درد پایدار ایفاء می‌کنند، و نشان دادند که اینترلوکین یک بتا از طریق سیگنال‌دهی رسپتور شماره یک اینترلوکین یک بتا منجر به فسفوریلاسیون رسپتور گلوتاماتی n متیل دی اسپاراتات در تسهیل انتقال درد می‌شود (KeRen & Richard, 2009). فسفوریلاسیون NR1 (زیرواحد اصلی رسپتور n متیل دی اسپاراتات) در تعدیل فعالیت n متیل دی اسپاراتات و تسهیل انتقال نیروهای درد در مدل‌های درد التهابی و نوروپاتیک شناخته شده است. همچنین نشان دادند که اینترلوکین یک بتا جریان میانجی شده به وسیله n متیل دی اسپاراتات و کلسیم درون سلولی را افزایش می‌دهد (Rui, 2007). علاوه بر اینها اسید استیک به کار رفته در تست رای‌تینگ با آزاد سازی اسید آراشیدونیک و افزایش بیوستنز پروستاگلاندین‌ها و سیکلوکسیژناز موجب ایجاد درد می‌شود. از طرفی نتایج حاصل از یک مطالعه نشان داد که درمان با عصاره برگ درخت زیتون باعث کاهش معنی‌دار علائم التهابی مانند ادم و درد در مدل‌های مختلف آزمایشگاهی (تست فرمالین، تست اسید استیک، تست زایلن) می‌شود. بررسی‌های قبلی، اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌دیوریتیکی برگ زیتون را نشان داده‌اند. بررسی‌های فتوشیمیایی حاکی از حضور عوامل شیمیایی متنوعی از جمله فلاونوئیدها، ساپونین، آلکالوئید و تانن در عصاره

REFERENCES

- Bimta, Sh.; Abbijit, B.; Kurmra, VP.; (2003) Cytokines-Clinical Applications in Pain Anaesthesia and Critical Care. *JanacsthClin pharmacol*, 19 (1): 3-14.
- Blumenthal, M.; (2000) Herbal medicines. *Integrative Medicine Communications*. Austin, P: 419-423.
- Cervero, F.; Larid, JM.; (1999) Visceral pain, *Lancet*, 353: 2145-2148.
- Dezheng, Gong.; Chengyan Geng.; Liping, Jiang.; Jun, Cao.; Hiroyuki, Yoshimura.; Laifu, Zhong.; (2009) Effects of Hydroxytyrosol-20 on Carrageenan-induced Acute Inflammation and Hyperalgesia in Rats. *Phyther. Res*, 23: 646-650.
- Fabiana Regina Nonato.; Tâmara Magalhães Oliveira Nogueira Taís Adelita de Almeida Barros.; Angélica Maria Lucchese.; Carlos Eduardo Cordeiro Oliveira.; Ricardo Ribeiro dos Santos.; Milena Botelho Pereira Soares.; Cristiane Flora Villarreal.; (2010) Antinociceptive and antiinflammatory activities of *Adiantum latifolium* Lam. : Evidence

- for a role of IL-1 β inhibition. *Journal of Ethnopharmacology*.
- Farsam, H.; Amanlou, M.; Radpour, MR.; Salehinia, AN.; Shafiee, A.; (2004) Composition of the essential oils of wild and cultivated *Satureja khuzistanica* Jamzad from Iran. *Flavour Frager J*, 19: 308-310.
- Ferreira, SH.; Moncada, S.; Van, JR.; (1973) Some effects of inhibiting endogenous prostaglandin formation on the responses of the cat spleen. *Br. J. Pharm*, 47: 48-58.
- Gard, P.; (2001) *Human Pharmacology*. Taylor and Francis Group, p. 40-43.
- Goldman, L.; Bennett, JC.; (2000) *Cecil textbook of medicine*. Vol 1. 21th Ed. WB SaundersCo., p: 103.
- John, Haddad.; (2007) Molecular Regulation of Inflammatory pain and Hyperalgesia-Is NF-KB Lynchpin? Focus Article and Critical Review. *EXCLI Journal*, 6: 68-92.
- KeRen, Richard Torres.; (2009) Role of interleukin-1b during pain and inflammation. *BrainResearchreviews*, 60: 57-64.
- Koster. R.; Anderson. M.; De Beer, EJ.; (1959) Acetic acid analgesic screening. *Federation Proceedings*, 18: 418-420.
- Lanni, C.; Becker, EL.; (1985) Inhibition of neutrophil phospholipase A2 by p-bromophenylacetyl bromide, nordihydroguaiaretic acid, 5, 8, 11, 14-eicosatetraenoic acid and quercetin. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 76: 214-17.
- Liang-Wu, Fu.; John, C.; Longhurst, (1999) Interleukin-1 β sensitizes abdominal visceral afferents of cats to ischaemia and histamine. *The Physiological Society*, 15. 521. pt1: 249-260.
- Pochazkova, M.; Zanvit, P.; Dolezal, T.; Prokesova, L.; Krsiak, M.; (2009) Increased gene Expression and production of spinal cyclooxygenase 1 and 2 during Experimental osteoarthritis pain, *Physiol. RES*. 58: 419-425.
- Raso, GM.; Meli, R.; Di Carlo, G.; (2001) Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A. 1. *Life Sci*, 68: 921-931.
- Rui-Xin, Zhang.; Aihui, Li.; Bing, Liu.; Linbo, Wang.; Ke, Ren.; Haiqing, Zhang.; Brian, M.; Berman, Lixing Lao.; (2007) IL-1ra alleviates inflammatory hyperalgesia through preventing phosphorylation of NMDA receptor NR-1 subunit in rats. *copyright and Disclama*. 135(3). 232-239.
- Suksamran, A.; Kumpun, S.; Kirtikara, K.; (2002) Iridoids with anti inflammatory activity from *Vitex peduncularis*. *Planta. Med*, 68: 72-73.
- Tekieh, E.; Moghadam Kia, S.; Eidi, A.; Taghizad farid, R.; Ferdosi, R.; Zaringhalam, J.; (2011) Investigation on the anti-inflammatory and analgesic effects of *olea europaea* L. Metanolic extract on male NMRI mouse. *Southern Medicine journal, the Persian Gulf Biomedical Research*, 1:13-24.
- Vogel, HG.; Vogel, WH.; (1977) *Drug discovery and evaluation, Pharmacological assays*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.
- Volak, J.; Stodola, J.; (1998) *The illustrated book of herbs*. London: Caxton edition, p: 2-3.
- Waldiceu, A.; Verri, Jr.; Thiago, M.; Cunha, Stephen poole.; Sergio, H.; Ferreira, Fernando, Q Cunh.; (2007) Cytokine inhibitors and pain control.
- Xiaomei, Zhang.; Jun, Cao.; Laifu, Zhong.; (2009) Hydroxytyrosol inhibits pro-inflammatory cytokines, INOS, and COX-2 expression in human monocytic cells. *Nauny-Schmiedeberg's*, 581-586.