

## بررسی اثرات توام ایبوپروفن و ۱ و ۸ سینئول بر برخی رفتارها، بیان ژن های اینترلوکین های ۶ و ۱β و میزان آنزیم گلوکوتایون ردوکتاز در رت های مبتلا به هایپر آمونیا

طیبه بهرامی<sup>۱</sup>، پریچهره یغمایی<sup>۲</sup>، نامدار یوسف وند<sup>۳\*</sup>، اسحق کریمی<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی دکتری، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران، ایران

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه رازی، کرمانشاه، ایران

### چکیده

هدف از این پژوهش، بررسی اثرات ایبوپروفن به تنهایی و همراه با ۱ و ۸ سینئول بر رفتار اضطرابی و استرس‌های اکسیداتیو در رت‌های نر بود. برای این منظور ابتدا ۳۶ سر رت به شش گروه مساوی شامل گروه کنترل (نرمال سالین)، گروه ایبوپروفن، گروه سینئول ۵، گروه سینئول ۱۰ و گروه سینئول - ایبوپروفن تقسیم شدند. برای القاء هایپر آمونیا آمونیوم استات به شکل درون‌صفاقی به مدت چهار هفته تزریق گردید و سپس به مدت دو هفته گروه‌ها به ترتیب سالین نرمال، ایبوپروفن به میزان ۱۵ میلی‌گرم ایبوپروفن، سینئول به میزان ۵ میلی‌گرم، سینئول به میزان ۱۰ میلی‌گرم و روزانه به میزان ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم به ترتیب سینئول و ایبوپروفن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن دریافت کردند. برای بررسی حافظه فضایی از ماز آبی موریس و برای ارزیابی اضطراب از ماز به علاوه مرتفع استفاده شد. میزان آنزیم گلوکوتایون ردوکتاز به منظور بررسی شاخص استرس‌های اکسیداتیو اندازه‌گیری شد. میزان بیان ژن‌های IL-6 و IL-1β با روش Real-time PCR در مغز ارزیابی شد. نتایج این پژوهش نشان داد در گروه ایبوپروفن نسبت به گروه هایپر آمونیا به طور معنی‌داری حافظه فضایی بهبود و رفتار اضطرابی کاهش یافت ( $P < 0/01$ )، ولی تغییر معنی‌داری در میزان آنزیم گلوکوتایون ردوکتاز دیده نشد ( $P > 0/05$ ). در گروه ایبوپروفن همراه با سینئول ۱۰ علاوه بر بهبود شاخص‌های فوق، افزایش معنی‌دار در آنزیم گلوکوتایون ردوکتاز مشاهده گردید ( $P < 0/01$ ). سطح بیان ژن IL-6 و IL-1β در گروه‌های دریافت‌کننده ایبوپروفن، سینئول ۵، سینئول ۱۰ و گروه ایبوپروفن-سینئول ۱۰ میزان بیان ژن اینترلوکین ۶ نسبت به گروه هایپر آمونیا به طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0/01$ ). این نتایج نشان می‌دهند که ترکیب ایبوپروفن همراه با سینئول علاوه بر بهبود حافظه فضایی و کاهش اضطراب، باعث کاهش استرس‌های اکسیداتیو نیز می‌گردد، لذا ممکن است استفاده توام این دو ترکیب در بهبود اختلالات شناختی و اضطراب ناشی از هایپر آمونیا مفید باشد.

واژه‌های کلیدی: هایپر آمونیا، گلوکوتایون ردوکتاز، اضطراب، ایبوپروفن، ۱ و ۸ سینئول

### مقدمه

مختل می‌شود. هایپر آمونیا و التهاب از دلایل اختلال در عملکرد نورون‌های سیستم عصبی هستند. افزایش بیش از اندازه آمونیاک و التهاب ناشی از آن، از طریق تاثیر بر پیام‌رسان‌های سیستم عصبی مرکزی موجب اختلال در چرخه خواب و بیداری، کاهش عملکردهای شناختی مانند یادگیری و حافظه و همچنین تاثیر بر فعالیت‌های حرکتی می‌گردد (۲۷). در این شرایط، آستروسیت‌های مغز به منظور محافظت از سلول‌های عصبی، آمونیاک را به

در اغلب بیماری‌های شدید کبدی مانند سیروز ممکن است افزایش میزان آمونیاک خون یا هایپر آمونیا موجب بروز انسفالوپاتی کبدی گردد (۲۵). انسفالوپاتی کبدی نوعی از اختلال در عملکرد مغز است که در نتیجه تغییر در متابولیسم نیتروژن و افزایش آمونیاک به علت بیماری‌های شدید کبدی ایجاد می‌گردد (۱۹). در اثر نارسایی شدید کبد، دفع آمونیاک به شکل اوره از بدن



ایبوپروفن التهاب در نوروں‌ها را کاهش داده و بر این اساس می‌تواند توانایی‌های یادگیری را بهبود ببخشد (۱۸). با توجه به پژوهش‌های انجام شده، هدف از این پژوهش، ارزیابی اثرات ترکیب ۱ و ۸ سینئول و ایبوپروفن بر رفتار اضطرابی و استرس‌های اکسیداتیو در رت‌های نر نژاد ویستار مبتلا به هایپراآمونیا بود.

### مواد و روش کار

برای انجام این پژوهش، از ۳۶ سر رت نر، نژاد ویستار با وزن تقریبی ۲۲۰-۲۰۰ گرم استفاده شد. حیوانات از انستیتو پاستور تهران - ایران خریداری شدند. رت‌ها در شرایط استاندارد حیوان‌خانه شامل ۱۲ ساعت روشنایی و ۱۲ ساعت تاریکی و دمای ۲۴-۲۲ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. آب و غذای استاندارد به شکل آزادانه در دسترس آن‌ها قرار گرفت. به منظور عادت کردن به محیط، حیوانات به مدت دو هفته در حیوان‌خانه نگهداری و سپس به‌طور تصادفی به ۶ گروه مساوی تقسیم شدند:

۱. گروه کنترل (C)

۲. گروه هایپراآمونیا (HA)

۳. گروه القاء هایپراآمونیا+ دریافت ایبوپروفن

(Ibu) (۱۵mg/kg)

۴. گروه القاء هایپراآمونیا+دریافت سینئول ۵ (۵mg/kg)

(Cin5)

۵. گروه القاء هایپراآمونیا+دریافت سینئول ۱۰

۶. گروه القاء هایپراآمونیا+دریافت ترکیبی (۱۵mg/kg +

(Ibu+Cin10) (۱۰mg/kg):

کلیه‌ی ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های مربوط به کار روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

هایپراآمونیا با تزریق آمونیوم استات به‌میزان ۲/۵ mmol/kg وزن بدن محلول در سالیان استریل، یک بار در روز، به‌صورت درون‌صفاقی و برای چهار هفته متوالی در حیوانات القا گردید (۱۲).

به منظور عادت کردن به محیط، حیوانات به مدت دو هفته در حیوان‌خانه نگهداری شدند (هفته ۱ تا ۲). بعد از این مدت با تزریق آمونیوم استات به‌میزان mmol/kg ۲/۵ وزن بدن محلول در سالیان استریل، یک بار در روز، به‌صورت درون‌صفاقی و برای چهار هفته متوالی مدل هایپراآمونیا در حیوانات القا گردید (هفته ۳ تا ۶). گروه

گلوتامین تبدیل می‌کنند. افزایش گلوتامین به نوبه‌ی خود موجب تغییراتی در فشار اسمزی و حجم مایع میان‌بافتی در مغز می‌شود. علاوه بر این، افزایش میزان آمونیاک در مغز باعث تحریک سلول‌های ایمنی و القای التهاب عصبی می‌گردد (۱).

استرس‌های اکسیداتیو نقش مهمی در آنسفالوپاتی کبدی دارند. افزایش آمونیاک در مغز موجب افزایش رادیکال‌های آزاد و آسیب به اجزای سلول و در نهایت اختلال در عملکرد سلول‌های عصبی می‌گردد (۲). گلوتامین ترکیب مهمی در حذف رادیکال‌های آزاد است و در کاهش استرس‌های اکسیداتیو نقش مهمی دارد. پژوهش‌ها روی مدل حیوانی بیماری آنسفالوپاتی کبدی نشان می‌دهد که در این بیماری، میزان گلوتامین در مغز کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده‌ی اثرات هایپراآمونیا در ایجاد استرس‌های اکسیداتیو است (۲۶).

پژوهش‌ها بر نقش التهاب در آنسفالوپاتی کبدی تاکید می‌کنند. التهاب ناشی از آزادسازی عوامل پیش‌التهابی و سایتوکاین‌هایی مانند TNF $\alpha$  و IL-6 و IL-1 $\beta$  است. عوامل التهابی با تغییر در سد خونی مغزی موجب ایجاد اختلال در متابولیسم نوروں‌ها، فرایندهای عصبی و مرگ سلولی می‌گردند (۵، ۲۹).

اینترلوکین ۶، یکی از سایتوکاین‌های التهابی است. پژوهش‌ها نشان می‌دهند میزان IL-6 در بیماران مبتلا به هایپراآمونیا نسبت به افراد سالم بالاتر است، لذا ممکن است IL-6 با بروز آنسفالوپاتی کبدی ارتباط داشته باشد (۲۱). از دیگر سایتوکاین‌های التهابی IL-1 $\beta$  است که بر عملکرد سیستم عصبی مرکزی تاثیر دارد. این سایتوکاین موجب اختلالات شناختی و بروز اختلال در یادگیری و حافظه فضایی می‌شود (۱۰).

او ۸ سینئول ترکیبی با منشا گیاهی و از نظر ساختمانی، نوعی اکسید ترپن است. ۱ و ۸ سینئول بر استرس‌های اکسیداتیو موثر بوده و می‌تواند رادیکال‌های آزاد را حذف کند. همچنین دارای اثرات ضدالتهاب و ضددردی است. ترکیب او ۸ سینئول محلول در چربی است، لذا می‌تواند از سد خونی مغزی عبور کند (۹).

ایبوپروفن از مهارکننده‌های آنزیم سیکلواکسیژناز است که در مهار التهاب نقش دارد. پژوهش‌ها نشان می‌دهند

درصد ورود به بازوی باز = تعداد ورود به بازوی باز تقسیم بر تعداد ورود به بازوی بسته ضرب در عدد ۱۰۰

درصد ماندن در بازوی باز = مدت ماندن در بازوی باز تقسیم بر مدت ماندن در بازوی بسته ضرب در عدد ۱۰۰

$$\text{درصد ورود به بازوی باز} = \frac{\text{تعداد ورود به بازوی باز}}{\text{تعداد ورود به بازوی بسته} + \text{تعداد ورود به بازوی باز}} \times 100$$

$$\text{درصد ماندن در بازوی باز} = \frac{\text{مدت ماندن در بازوی باز}}{\text{مدت ماندن در بازوی بسته} + \text{مدت ماندن در بازوی باز}} \times 100$$

برای ارزیابی یادگیری و حافظه فضایی از ماز آبی موریس (Morris water maze (MWM) استفاده شد. این دستگاه شامل یک حوضچه گرد و تیره رنگ به ابعاد ۱۳۶ سانتی متر قطر و ۶۰ سانتی متر ارتفاع است که از آب با درجه حرارت  $(2 \pm 20)$  درجه سانتی گراد پر می شود. این حوضچه به چهار بخش تقسیم می گردد. یک سکوی پنهان در زیر آب در یک چهارم جنوب غربی به قطر ۱۲ سانتی متر در زیر آب قرار داده می شود. در این پژوهش، آزمون به مدت ۶ روز انجام شد. در طی چهار روز اول، موش ها چهار بار در روز آموزش داده شدند. در هر بار انجام آزمایش، موش ها به شکل تصادفی و در موقعیت شروع متفاوتی (شمال، شرق، جنوب و غرب) در حوضچه رها شدند تا سکو را پیدا کنند. در روز پنجم، آزمون برای ارزیابی حافظه فضایی انجام شد. برای انجام این آزمایش، سکوی پنهان حذف شد و موش ها در حوضچه رها شدند تا به مدت ۶۰ ثانیه شنا کنند. مدت زمان صرف شده برای پیدا کردن سکوی مخفی به عنوان شاخصی از توانایی یادگیری در نظر گرفته می شود. در روز ششم، یک سکوی قابل مشاهده پوشیده شده با یک تکه از فویل آلومینیومی در موقعیت دیگری قرار داده شد تا توانایی بینایی موش ها بررسی شود (۱۸).

سطح آمونیاک خون با کیت BXC0376- AMMONIA biorexfars (Iran) و میزان گلوکوتائون ردوکتاز با کیت الیزا NOV0US, Rat Glutathione Reductase ELISA (Colorimetric) ساخت کشور آمریکا اندازه گیری

هایپرآمونیا هیچ دارویی دریافت نکرد. به رت های گروه ایبوپروفن به میزان ۱۵ میلی گرم، گروه سینثول ۵ به میزان ۵ میلی گرم، گروه سینثول ۱۰ به میزان ۱۰ میلی گرم و گروه سینثول ۱۰ همراه با ایبوپروفن به میزان ۱۰ و ۱۵ میلی گرم سینثول همراه با ایبوپروفن به مدت دو هفته، به صورت درون صفاقی تزریق گردید (هفته ۷ تا ۸). پس از آن، رفتار اضطرابی با استفاده از ماز مرتفع (EPM) و حافظه فضایی توسط ماز آبی موریس (MWM) آزمایش شدند. در پایان القای مدل هایپرآمونیا در حیوانات، به منظور اندازه گیری غلظت آمونیاک، نمونه های خون جمع آوری گردید. پس از انجام آزمون های رفتاری، موش ها با سر زدن قربانی شدند. خون گیری از قلب انجام شد. مغز رت ها به منظور بررسی بیان ژن به سرعت جدا و بلافاصله در داخل نیتروژن مایع قرار داده شد. نمونه ها تا زمان انجام آزمایش در دمای منفی ۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شدند (۱۸).

برای ارزیابی میزان اضطراب در حیوانات از دستگاه ماز به علاوه مرتفع (Elevated plus maze (EPM) استفاده شد. تست EPM به طور گسترده برای اندازه گیری رفتار اضطرابی مانند در پاسخ به یک محیط جدید و ارتفاع استفاده می شود. میزان زمان سپری شده و تعداد ورودی ها به بازوهای باز توسط حیوان به عنوان شاخص های اضطراب در نظر گرفته می شود. این شاخص ها به عنوان درصدی از کل زمان صرف شده و ورودی های کلی به هر بازو در طول جلسه آزمون (۵ دقیقه) بیان می شوند. این دستگاه شامل یک منطقه مرکزی به ابعاد ۱۰ سانتی متر در ۱۰ سانتی متر با دو بازوی بسته (۱۰ سانتی متر پهنا، ۵۰ سانتی متر عرض و دو طرف مقابل) و دو بازوی باز مخالف (۱۰ سانتی متر پهنا، ۵۰ سانتی متر) است. جنس این وسیله از پلی پروپیلن سیاه کدر است که در حدود ۵۰ سانتی متر بالاتر از سطح زمین قرار می گیرد. ابتدا رت ها به شکل انفرادی در وسط یک بازوی باز قرار داده شده و ۵ دقیقه حیوان آزادانه در آن حرکت می کرد. تعداد دفعاتی که رت ها به بازوی باز وارد می شدند، تعداد دفعاتی که به بازوی بسته وارد می شدند، مدت زمانی که حیوانات در بازوی باز می ماندند و مدت زمانی که حیوانات در بازوی بسته می ماندند، ثبت گردید (۱۸).



به‌عنوان ژن مرجع یا ژن خانه دار برای کنترل داخلی و برای بررسی بیان ژن‌ها از ABI-step 1 system, USA و نور ناشی از سایبرگرین، شرکت یکتا تجهیز آزما، ایران استفاده گردید. واکنش‌ها به ترتیب، واسرشتگی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۱۰ ثانیه، واسرشتگی ثانویه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای ۵ ثانیه و اتصال و گسترش به مدت ۳۴ ثانیه در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. واکنش سه بار تکرار گردید و ارزیابی میزان بیان ژن با روش لیواک  $2^{-\Delta\Delta CT}$  انجام شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول ۲ خلاصه شده‌اند (۱۶).

گردید. همچنین به منظور استخراج RNA از بافت مغز از کیت تجاری RNeasy mini kit شرکت QIAGEN, USA استفاده شد. پس از استخراج RNA، غلظت آن با استفاده از جذب نور در طول موج ۲۶۰ نانومتر با دستگاه NanoDrop, ThermoScientific, USA اندازه‌گیری گردید. پس از آن سنتز cDNA با کیت تجاری cDNA synthesis kit, TAKARA, USA انجام شد.

از آزمون واکنش زنجیره‌ای پلیمرز Quantitative real-time polymerase chain reaction برای ارزیابی میزان بیان ژن Interleukin 6 (IL-6) و Interleukin 1  $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) استفاده شد. با توجه به خصوصیات بافت آزمایش شده از  $\beta$  actin (Beta actin)

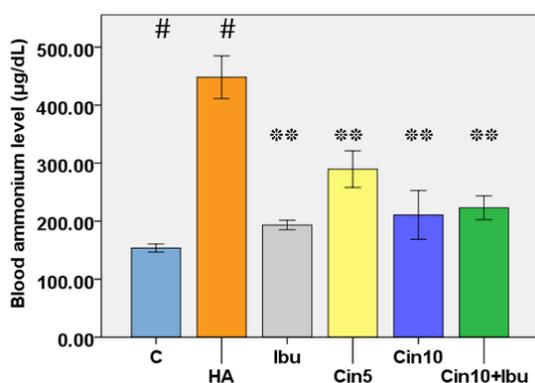
جدول ۲- توالی پرایمرهای استفاده شده در Real-time PCR

شماره دسترسی	طول نوکلئوتید (تعداد)	توالی پرایمر	نام ژن
NM_012589.2	۱۴۹	F: AGCCAGAGTCATTCAGAGCA	IL-6
NM_012589.2		R: TGGTCCTTAGCCACTCCTTC	
NM_031512.2	۱۹۲	F: GGGATGATGACGACCTGCTA	IL-1 $\beta$
NM_031512.2		R: TGTCGTTGCTTGTCTCTCCT	
		F: GCCATGGATGACGATATCGCTG	$\beta$ actin
		R: CCCATACCCACCATCACACC	

### نتایج

توزیع آمونیوم استات به مدت چهار هفته به رت‌ها باعث افزایش معنی‌داری در سطح آمونیوم سرم در گروه دریافت‌کننده آمونیوم استات (هایپراآمونیما) نسبت به گروه کنترل گردید ( $P < 0/01$ ). در گروه‌های دریافت‌کننده ایبوپروفن، سینئول ۵، سینئول ۱۰ و گروه ایبوپروفن - سینئول ۱۰ کاهش معنی‌داری در سطح آمونیوم سرم نسبت به گروه هایپراآمونیما مشاهده گردید ( $P < 0/01$ ) (نمودار ۱).

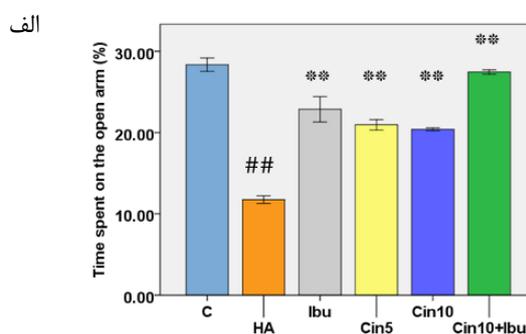
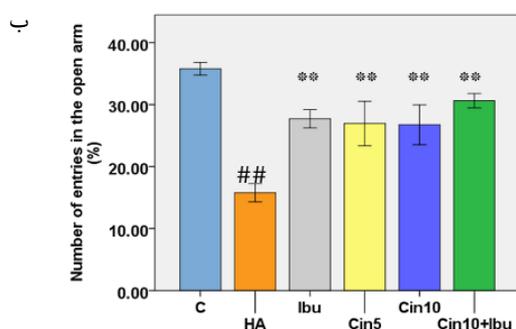
نتایج این پژوهش به صورت میانگین  $\pm$  انحراف از میانگین نشان داده شده است. به منظور تجزیه و تحلیل نتایج به دست آمده از نرم افزار SPSS ورژن ۲۴ استفاده شد و برای مقایسه بین گروه‌ها و وجود اختلاف معنی‌دار بین آن‌ها از تحلیل واریانس یک طرفه one-ANOVA way و آزمون تعقیبی Tukey's post hoc test استفاده گردید. اختلاف بین گروه‌ها در سطح ( $P < 0/05$ ) به‌عنوان سطح معنی‌دار بودن در نظر گرفته شد.



**نمودار ۱-** تزریق آمونیوم استات بر سطح آمونیوم سرم در رت‌های گروه‌های کنترل (C)، هایپرامونیا (HA)، ایبوپروفن (Ibu)، سینئول ۵ (Cin5)، سینئول ۱۰ (Cin10) و گروه ایبوپروفن - سینئول ۱۰ (Cin10+Ibu) گروه هایپرامونیا سالی ن نرمال، گروه ایبوپروفن به میزان ۱۵ میلی‌گرم ایبوپروفن، گروه سینئول ۵ به میزان ۵ میلی‌گرم سینئول، گروه سینئول ۱۰ به میزان ۱۰ میلی‌گرم سینئول و گروه سینئول - ایبوپروفن، به میزان ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم سینئول همراه با ایبوپروفن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن علاوه بر آمونیوم استات دریافت کردند. \*\* نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) با گروه هایپرامونیا است. ## نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) با گروه کنترل است.

۵، سینئول ۱۰ و گروه ایبوپروفن-سینئول ۱۰ درصد زمان صرف‌شده ( $P < 0.01$ ) و تعداد ورود به بازوهای باز در دستگاه ماز به‌علاوه مرتفع نسبت به گروه هایپرامونیا به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.01$ ) (نمودار ۲).

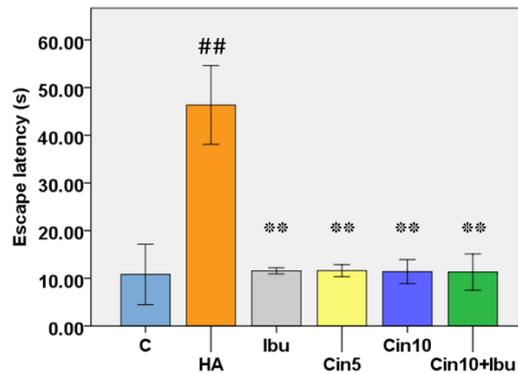
درصد زمان صرف‌شده و تعداد ورود به بازوهای باز در ماز به‌علاوه مرتفع در گروه دریافت‌کننده آمونیوم استات (هایپرامونیا) نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0.01$ ). در گروه‌های ایبوپروفن، سینئول



**نمودار ۲-** نتایج درصد زمان صرف‌شده (الف) و تعداد ورود به بازوهای باز (ب) در ماز به‌علاوه مرتفع در رت‌های گروه‌های کنترل (C)، هایپرامونیا (HA)، ایبوپروفن (Ibu)، سینئول ۵ (Cin5)، سینئول ۱۰ (Cin10) و گروه ایبوپروفن - سینئول ۱۰ (Cin10+Ibu). گروه هایپرامونیا سالی ن نرمال، گروه ایبوپروفن به میزان ۱۵ میلی‌گرم ایبوپروفن، گروه سینئول ۵ به میزان ۵ میلی‌گرم سینئول، گروه سینئول ۱۰ به میزان ۱۰ میلی‌گرم سینئول و گروه سینئول - ایبوپروفن، به میزان ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم سینئول همراه با ایبوپروفن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن علاوه بر آمونیوم استات دریافت کردند. \*\* نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) با گروه هایپرامونیا است. ## نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) با گروه کنترل است.

و گروه ایبوپروفن-سینئول ۱۰ مدت زمان صرف شده توسط رت‌ها برای پیدا کردن سکوی پنهان نسبت به گروه هایپرامونیا به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0.01$ ) (نمودار ۳).

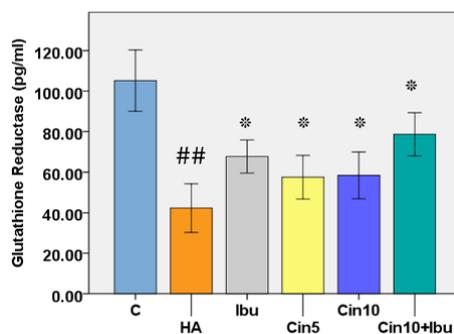
مدت زمان صرف شده برای پیدا کردن سکوی پنهان در ماز آبی موریس در گروه آمونیوم استات نسبت به کنترل به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.01$ ). در گروه‌های دریافت‌کننده ایبوپروفن، سینئول ۵، سینئول ۱۰



**نمودار ۳-** نتایج مدت زمان صرف شده برای پیدا کردن سکوی پنهان در ماز آبی موریس در رت‌های گروه‌های کنترل (C)، هایپرامونیا (HA)، ایبوپروفن (Ibu)، سینئول ۵ (Cin5)، سینئول ۱۰ (Cin10) و گروه ایبوپروفن - سینئول ۱۰ (Cin10+Ibu). گروه هایپرامونیا سالی نرمال، گروه ایبوپروفن به‌میزان ۱۵ میلی‌گرم ایبوپروفن، گروه سینئول ۵ به‌میزان ۵ میلی‌گرم سینئول، گروه سینئول ۱۰ به‌میزان ۱۰ میلی‌گرم سینئول و گروه سینئول - ایبوپروفن، به‌میزان ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم سینئول همراه با ایبوپروفن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن علاوه بر آمونیوم استات دریافت کردند. \* نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) با گروه هایپرامونیا است. ## نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار با گروه کنترل است ( $P < 0.01$ ).

سینئول ۵، سینئول ۱۰ و گروه ایبوپروفن-سینئول ۱۰ میزان آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز نسبت به گروه هایپرامونیا به‌طور معنی‌داری افزایش یافت ( $P < 0.05$ ) (نمودار ۴).

میزان آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در گروه آمونیوم استات نسبت به گروه کنترل به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ( $P < 0.01$ ). در گروه‌های دریافت‌کننده ایبوپروفن،

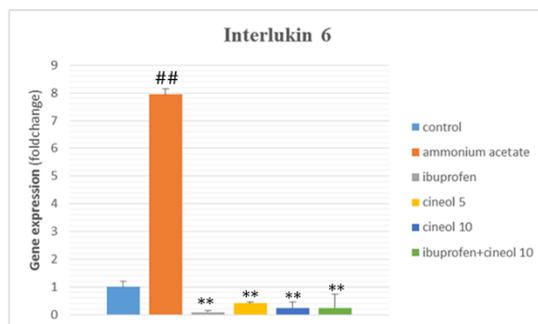


**نمودار ۴-** نتایج میزان آنزیم گلوتاتیون ردوکتاز در رت‌های گروه‌های کنترل (C)، هایپرامونیا (HA)، ایبوپروفن (Ibu)، سینئول ۵ (Cin5)، سینئول ۱۰ (Cin10) و گروه ایبوپروفن - سینئول ۱۰ (Cin10+Ibu). گروه هایپرامونیا سالی نرمال، گروه ایبوپروفن به‌میزان ۱۵ میلی‌گرم ایبوپروفن، گروه سینئول ۵ به‌میزان ۵ میلی‌گرم سینئول، گروه سینئول ۱۰ به‌میزان ۱۰ میلی‌گرم سینئول و گروه سینئول - ایبوپروفن، به‌میزان ۱۰ و ۱۵ میلی‌گرم سینئول همراه با ایبوپروفن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن علاوه بر آمونیوم استات دریافت کردند. \* نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.05$ ) با گروه هایپرامونیا است. ## نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار ( $P < 0.01$ ) با گروه کنترل است.



۵، سینئول ۱۰ و گروه ایبوپروفن-سینئول ۱۰ میزان بیان ژن اینترلوکین ۶ نسبت به گروه هایپراآمونیا به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0/01$ ) (نمودار ۵).

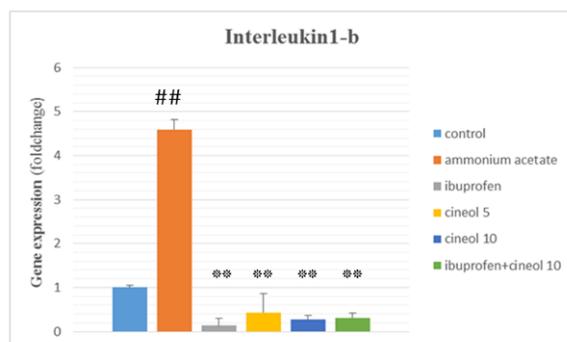
سطح بیان ژن IL-6 در بافت مغز در گروه آمونیوم استات نسبت به کنترل به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0/01$ ). در گروه های دریافت کننده ایبوپروفن، سینئول



**نمودار ۵-** نتایج سطح بیان ژن IL-6 در بافت مغز در رت های گروه های کنترل (C)، هایپراآمونیا (HA)، ایبوپروفن (Ibu)، سینئول ۵ (Cin5)، سینئول ۱۰ (Cin10) و گروه ایبوپروفن - سینئول ۱۰ (Cin10+Ibu). گروه هایپراآمونیا سالی ن نرمال، گروه ایبوپروفن به میزان ۱۵ میلی گرم ایبوپروفن، گروه سینئول ۵ به میزان ۵ میلی گرم سینئول، گروه سینئول ۱۰ به میزان ۱۰ میلی گرم سینئول و گروه سینئول - ایبوپروفن، به میزان ۱۰ و ۱۵ میلی گرم سینئول همراه با ایبوپروفن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن علاوه بر آمونیوم استات دریافت کردند. \*\* نشان دهنده ی تفاوت آماری معنی دار ( $P < 0/01$ ) با گروه هایپراآمونیا است. ## نشان دهنده ی تفاوت آماری معنی دار ( $P < 0/01$ ) با گروه کنترل است.

سینئول ۵، سینئول ۱۰ و گروه ایبوپروفن-سینئول ۱۰ میزان بیان ژن IL-1β نسبت به گروه هایپراآمونیا به طور معنی داری کاهش یافت ( $P < 0/01$ ) (نمودار ۶).

سطح بیان ژن IL-1β در بافت مغز در گروه آمونیوم استات نسبت به کنترل به طور معنی داری افزایش یافت ( $P < 0/01$ ). در گروه های دریافت کننده ایبوپروفن،



**نمودار ۶-** نتایج سطح بیان ژن IL-1β در بافت مغز در رت های گروه های کنترل (C)، هایپراآمونیا (HA)، ایبوپروفن (Ibu)، سینئول ۵ (Cin5)، سینئول ۱۰ (Cin10) و گروه ایبوپروفن - سینئول ۱۰ (Cin10+Ibu). گروه هایپراآمونیا سالی ن نرمال، گروه ایبوپروفن به میزان ۱۵ میلی گرم ایبوپروفن، گروه سینئول ۵ به میزان ۵ میلی گرم سینئول، گروه سینئول ۱۰ به میزان ۱۰ میلی گرم سینئول و گروه سینئول - ایبوپروفن، به میزان ۱۰ و ۱۵ میلی گرم سینئول همراه با ایبوپروفن به ازای هر کیلوگرم وزن بدن علاوه بر آمونیوم استات دریافت کردند. \*\* نشان دهنده ی تفاوت آماری معنی دار ( $P < 0/01$ ) با گروه هایپراآمونیا است. ## نشان دهنده ی تفاوت آماری معنی دار ( $P < 0/01$ ) با گروه کنترل است.

## بحث

پژوهش‌های گذشته نشان داده‌اند هایپراآمونیا باعث ایجاد اختلالات شناختی و رفتار اضطرابی در رت‌ها می‌شود (۱۸). هماهنگ با این پژوهش‌ها، نتایج این پژوهش نشان داد هایپراآمونیا باعث ایجاد اختلال در حافظه فضایی و بروز اضطراب همراه با استرس‌های اکسیداتیو و التهاب در رت‌ها گردید که آزمون‌های رفتاری و آزمایش‌های بیوشیمیایی نیز آن را تایید می‌کنند.

نتایج این پژوهش نشان داد اختلال عملکرد حافظه و یادگیری فضایی ناشی از هایپراآمونیا، با مصرف سینئول و ایبوپروفن بهبود می‌یابد. هایپراآمونیا موجب التهاب عصبی می‌شود. افزایش آمونیاک التهاب عصبی را در مناطقی مانند مخچه، هیپوکامپ و قشر پیش پیشانی تحریک می‌کند و باعث اختلال در توانایی یادگیری و حافظه فضایی در رت‌ها می‌شود (۱۸). پژوهش‌ها نشان می‌دهد ترکیبات با اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی اثرات نوروپروتکتیو داشته لذا با حذف رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب کاهش استرس‌های اکسیداتیو و بهبود اختلالات یادگیری و حافظه فضایی می‌شوند (۱۵). سینئول ترکیبی با اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی است و موجب کاهش استرس‌های اکسیداتیو می‌گردد (۴). التهاب از عوامل مهمی است که بر عملکرد نورون‌ها در سیستم عصبی تاثیر گذاشته و موجب اختلالات شناختی در انسفالوپاتی کبدی می‌شود. هایپراآمونیا میزان فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز در مغز را افزایش می‌دهد. ایبوپروفن دارویی با اثرات مهار بر فعالیت آنزیم سیکلواکسیژناز است که بر همین اساس موجب کاهش التهاب می‌گردد. اثرات ضدالتهابی ایبوپروفن در سلول‌های سیستم عصبی باعث بهبود اختلالات شناختی و یادگیری می‌گردد (۳). مطابق با این پژوهش‌ها و با توجه به نتایج این پژوهش، بهبود اختلال عملکرد حافظه و یادگیری فضایی ممکن است به علت اثرات آنتی‌اکسیدانی سینئول و ضدالتهابی ایبوپروفن باشد.

با توجه به یافته‌های این پژوهش، هایپراآمونیا موجب بروز اضطراب و مصرف سینئول و ایبوپروفن موجب کاهش رفتار اضطرابی در حیوانات گردید. هایپراآمونیا از عوامل ایجاد التهاب در سیستم عصبی مرکزی است. هایپراآمونیا با فعال کردن میکروگلیاها پاسخ‌های التهابی را افزایش

می‌دهد. در همین حال، هایپراآمونیا باعث تورم آستروسیت‌ها و ایجاد تغییر در فعالیت آن‌ها گردیده و با افزایش میزان سایتوکاین‌های التهابی موجب بروز اختلال در عملکرد مغز و رفتار غیرطبیعی می‌گردد (۱۲). پژوهش‌ها نشان می‌دهد سینئول ترکیبی گیاهی است که در حیوانات آزمایشگاهی موجب کاهش التهاب می‌گردد. سینئول با کاهش تولید عوامل و میانجی‌های التهابی مانند  $IL-1\beta$  بر واکنش‌های التهابی تاثیر می‌گذارد (۲۷). هایپراآمونیا بر میکروگلیاها در مغز اثر تحریکی داشته و موجب افزایش تولید عوامل التهابی مانند  $IL-1\beta$  و ایجاد التهاب می‌گردد. ایبوپروفن ترکیبی با اثرات ضدالتهابی است. ایبوپروفن با کاهش التهاب و کاهش تحریک میکروگلیاها، موجب بهبود التهاب نورونی و اختلالات شناختی می‌گردد (۲۵). هم‌راستا با این پژوهش‌ها و با توجه به نتایج به دست آمده از این پژوهش، کاهش اضطراب و بهبود رفتار اضطرابی ممکن است به علت اثرات ضدالتهابی سینئول و همچنین ایبوپروفن باشد.

بر اساس نتایج این پژوهش، کاهش میزان آنزیم گلوکوتیون ردوکتاز ناشی از هایپراآمونیا با مصرف ترکیبات سینئول و ایبوپروفن افزایش می‌یابد. پژوهش‌ها نشان می‌دهد استرس‌های اکسیداتیو در پاتوژن سمیت ناشی از هایپراآمونیا نقش مهمی دارد. هایپراآمونیا با تحریک آستروسیت‌ها در بافت سیستم عصبی موجب تورم این سلول‌ها و ایجاد رادیکال‌های آزاد اکسیژن می‌گردد (۱۱). بر اساس پژوهش‌های گذشته، استرس‌های اکسیداتیو و رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب پراکسیداسیون لیپیدی می‌گردند. ۱ و ۸ سینئول، ترکیبی گیاهی و از دسته مونوترپن‌هاست که دارای خاصیت ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی است (۱۴). سینئول از طریق اثرات آنتی‌اکسیدانی خود و با کاهش رادیکال‌های آزاد اکسیژن موجب مهار استرس‌های اکسیداتیو و کاهش التهاب می‌شود (۷). سینئول موجب افزایش آنزیم‌های آنتی‌اکسیدانی مانند گلوکوتیون ردوکتاز می‌گردد (۲۳). التهاب در نورون‌ها یکی از دلایل بروز اختلال در عملکرد آن‌ها و بروز اختلالات شناختی است که در هایپراآمونیا دیده می‌شود. ایبوپروفن ترکیبی با اثرات ضدالتهابی و از دسته داروهای غیراستروئیدی است که با کاهش التهاب اختلالات شناختی و یادگیری ناشی از هایپراآمونیا را



پروستاگلاندین‌ها شده و دارای اثرات ضدالتهابی است. ایبوپروفن می‌تواند با کاهش میزان بیان سایتوکاین‌های التهابی مانند IL-6 و IL-1 $\beta$  التهاب را کاهش دهد (۲۲). مطابق با این پژوهش‌ها و با توجه به نتایج این پژوهش، کاهش در بیان ژن IL-1 $\beta$  ممکن است به علت اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی سینئول و همچنین ایبوپروفن باشد.

یافته‌های این پژوهش نشان می‌دهد با مصرف سینئول و ایبوپروفن در رت‌های مبتلا به هایپراآمونیا، همراه با کاهش استرس‌های اکسیداتیو و میزان بیان عوامل التهابی، رفتار اضطرابی کاهش و اختلالات یادگیری و حافظه فضایی بهبود می‌یابد؛ لذا به نظر می‌رسد استرس‌های اکسیداتیو و التهاب در بروز اضطراب و اختلالات یادگیری موثر هستند. بر این اساس ممکن است مصرف هم‌زمان سینئول و ایبوپروفن در بهبود اختلالات رفتاری و اضطرابی در بیماران مبتلا به آنسفالوپاتی کبدی موثر باشد. این پژوهش در محل آزمایشگاه وابسته به دانشگاه آزاد اسلامی کرمانشاه انجام شد و کلیه ملاحظات اخلاقی و پروتکل‌های مربوط به کار روی حیوانات آزمایشگاهی رعایت گردید.

### قدردانی و تشکر

این پژوهش در مجموعه آزمایشگاه دانشگاه رازی کرمانشاه انجام گردید که بدین‌وسیله از ایشان تشکر و قدردانی می‌گردد.

### منابع

1. Aldridge DR, Tranah EJ, Shawcross DL. Pathogenesis of hepatic encephalopathy: role of ammonia and systemic inflammation. *J Clinical Exper Hepatol*. 2015;5:S7-S20.
2. Bosoi CR, Rose CF. Oxidative stress: a systemic factor implicated in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. *Met Brain Dis*. 2013;28(2):175-8.
3. Cauli O, Rodrigo R, Piedrafita B, Boix J, Felipe V. Inflammation and hepatic encephalopathy: ibuprofen restores learning ability in rats with portacaval shunts. *Hepatol*. 2007;46(2):514-9.

بهبود می‌بخشد (۲۰). براساس این پژوهش‌ها و با توجه و هم‌راستا با نتایج این پژوهش، کاهش استرس‌های اکسیداتیو در هایپراآمونیا ممکن است به دلیل اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی ترکیبات سینئول و ایبوپروفن باشد.

یافته‌های این پژوهش نشان داد هایپراآمونیا موجب افزایش میزان بیان ژن IL-6 شد ولی مصرف سینئول و ایبوپروفن باعث کاهش میزان بیان این ژن گردید. نارسایی کبد ممکن است منجر به انسفالوپاتی کبدی و افزایش فاکتورهای التهابی گردد. در هایپراآمونیا مزمن، میزان سایتوکاین التهابی IL-6 افزایش می‌یابد (۲۴). پژوهش‌ها نشان می‌دهد ۱ و ۸ سینئول دارای اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی بوده و استرس‌های اکسیداتیو و التهاب را کاهش می‌دهد. ۱ و ۸ سینئول موجب کاهش سایتوکاین‌های التهابی از جمله IL-6, IL-1 $\beta$  می‌گردد (۱۳). فعال شدن میکروگلیاها در سیستم عصبی در ایجاد التهاب نقش دارد. ایبوپروفن ترکیبی با خاصیت ضدالتهابی از دسته داروهای ضدالتهاب غیراستروئیدی است که می‌تواند در کاهش التهاب و رفتار سلول‌های عصبی از طریق کاهش عوامل التهابی و مهار میکروگلیاها موثر باشد (۶). مطابق با این پژوهش‌ها و با توجه به نتایج این پژوهش، کاهش بیان ژن‌های التهابی ممکن است به علت اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی مربوط به سینئول و ایبوپروفن باشد.

بر اساس یافته‌های این پژوهش، در اثر هایپراآمونیا میزان بیان ژن IL-1 $\beta$  افزایش یافت ولی هر دو ترکیب سینئول و ایبوپروفن باعث کاهش میزان بیان این ژن گردیدند. بر اساس پژوهش‌های گذشته، هایپراآمونیا موجب فعال شدن میکروگلیاها، التهاب در مغز و افزایش میزان بیان ژن IL-1 $\beta$  می‌گردد که در بروز اختلال در عملکرد مغز نقش دارند (۸). سینئول با توجه به اثرات ضدالتهابی و آنتی‌اکسیدانی خود بر میزان تولید سایتوکاین‌های التهابی تاثیر گذاشته و میزان بیان ژن‌های IL-6, IL-1 $\beta$  را کاهش می‌دهد (۱۷). از طرف دیگر پژوهش‌ها نشان می‌دهد سایتوکاین‌های التهابی، سنتز پروستاگلاندین‌ها را افزایش می‌دهند. ایبوپروفن از طریق مهار آنزیم سیکلواکسیژناز، موجب مهار سنتز



- lipopolysaccharide-induced endothelial injury in mice. *Eur J Pharmaceut Sci.* 2019;127:14-23.
14. Juergens LJ, Racké K, Tuleta I, Stoeber M, Juergens UR. Anti-inflammatory effects of 1, 8-cineole (eucalyptol) improve glucocorticoid effects in vitro: a novel approach of steroid-sparing add-on therapy for COPD and asthma? *Synergy.* 2017;5:1-8.
  15. Khanna A, Chakraborty S, Tripathi SJ, Acharjee A, Rao S, Trigun SK. SIRT1 activation by resveratrol reverses atrophy of apical dendrites of hippocampal CA1 pyramidal neurons and neurobehavioral impairments in moderate grade hepatic encephalopathy rats. *J Chem Neuroanatomy.* 2020;106:101797.
  16. Karkhaneh L, Yaghmaei P, Parivar K, Sadeghizadeh M, Ebrahim-Habibi A. Effect of trans-chalcone on atheroma plaque formation, liver fibrosis and adiponectin gene expression in cholesterol-fed NMRI mice. *Pharmacol Rep.* 2016;68(4):720-7.
  17. Kutlu Z, Gulaboglu M, Halıcı Z, Cınar İ, Diyarbakır B. Biochemical research of the effects of essential oil obtained from the fruit of myrtus communis L. on cell damage associated with lipopolysaccharide-induced endotoxemia in a human umbilical cord vein endothelial cells. *BiochemGenetics.* 2021;59(1):315-34.
  18. Luo J, Wang T, Liang S, Hu X, Li W, Jin F. Ingestion of Lactobacillus strain reduces anxiety and improves cognitive function in the hyperammonemia rat. *Sci China Life Sci.* 2014;57(3):327-35.
  19. Lu J, Li Y, Zhang C, Yang X, Qiang JW. Interaction of Manganese and Ammonia in the Brain of Hepatic Encephalopathy Rats. *Hepatitis Monthly.* 2020;20(8).
  20. Monfort P, Cauli O, Montoliu C, Rodrigo R, Llansola M, Piedrafita B, et al. Mechanisms of cognitive alterations in hyperammonemia and hepatic encephalopathy: therapeutical implications. *Neurochem Int.* 2009;55(1-3):106-12.
  21. Montoliu C, Piedrafita B, Serra MA, Del Olmo JA, Urios A, Rodrigo JM, et al. IL-6 and IL-18 in blood may discriminate cirrhotic patients with and without minimal hepatic encephalopathy. *J Clin gastroenterol.* 2009;43(3):272-9.
  4. Ciftci O, Ozdemir I, Tanyildizi S, Yildiz S, Oguzturk H. Antioxidative effects of curcumin,  $\beta$ -myrcene and 1, 8-cineole against 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced oxidative stress in rats liver. *Toxicol Indus Health.* 2011;27(5):447-53.
  5. Coltart I, Tranah TH, Shawcross DL. Inflammation and hepatic encephalopathy. *ArchBiochem Biophysics.* 2013;536(2):189-96.
  6. Costa T, Fernandez-Villalba E, Izura V, Lucas-Ochoa A, Menezes-Filho N, Santana R, et al. Combined 1-deoxynojirimycin and ibuprofen treatment decreases Microglial activation, phagocytosis and dopaminergic degeneration in MPTP-treated mice. *JNeuroimmune Pharmacol.* 2021;16(2):390-402.
  7. El-Hadary A. Protective effect of ginger oil against thioacetamide-induced liver cirrhosis in male rats. *JAgricul Chem Biotechnol.* 2015;6(10):393-405.
  8. Hsu S-J, Zhang C, Jeong J, Lee S-i, McConnell M, Utsumi T, et al. Enhanced meningeal lymphatic drainage ameliorates neuroinflammation and hepatic encephalopathy in cirrhotic rats. *Gastroenterol.* 2021;160(4):1315-29. e13.
  9. Farivar M, Hooshmandi Z, Setorki M, Amini S. Protective Effect of 1, 8-cineole on Learning and Memory Impairment Induced by Cerebral Hypoperfusion in Male Rats. *Qom University Med Sci J.* 2020;14(4):40-7.
  10. Gibertini M, Newton C, Friedman H, Klein TW. Spatial learning impairment in mice infected with Legionella pneumophila or administered exogenous interleukin-1- $\beta$ . *Brain BehavImmun.* 1995;9(2):113-28.
  11. Görg B, Qvartskhava N, Bidmon HJ, Palomero-Gallagher N, Kircheis G, Zilles K, et al. Oxidative stress markers in the brain of patients with cirrhosis and hepatic encephalopathy. *Hepatology.* 2010;52(1):256-65.
  12. Jayakumar AR, Rao KVR, Norenberg MD. Neuroinflammation in hepatic encephalopathy: mechanistic aspects. *J Clin Exper Hepatol.* 2015;5:S21-S8.
  13. Jiang F, Wu G, Li W, Yang J, Yan J, Wang Y, et al. Preparation and protective effects of 1, 8-cineole-loaded self-microemulsifying drug delivery system on



26. Ruskiewicz J, Fręsko I, Hilgier W, Albrecht J. Decrease of glutathione content in the prefrontal cortical mitochondria of rats with acute hepatic encephalopathy: prevention by histidine. *Met Brain Dis.* 2013;28(1):11-4.
27. Santos F, Rao V. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1, 8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oils. *Phytoth Res* 2000;14(4):240-4.
28. Vilstrup H, Amodio P, Bajaj J, Cordoba J, Ferenci P, Mullen KD, et al. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by AASLD and EASL. *Hepatol.* 2014;60(2):715-35.
29. Wang W, Lu H, Lu X, Wang D, Wang Z, Dai W, et al. Effect of tumor necrosis factor- $\alpha$  on the expression of the ammonia transporter Rhcg in the brain in mice with acute liver failure. *J Neuroinflammation.* 2018;15(1):1-14.
22. Norden DM, McCarthy DO, Bicer S, Devine RD, Reiser PJ, Godbout JP, et al. Ibuprofen ameliorates fatigue-and depressive-like behavior in tumor-bearing mice. *Life Sci.* 2015;143:65-70.
23. Porres-Martínez M, González-Burgos E, Carretero ME, Gómez-Serranillos MP. In vitro neuroprotective potential of the monoterpenes  $\alpha$ -pinene and 1, 8-cineole against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in PC12 cells. *Zeitschrift für Naturforschung C.* 2016;71(7-8):191-9.
24. Pozdeev VI, Lang E, Görg B, Bidmon HJ, Shinde PV, Kircheis G, et al. TNF $\alpha$  induced up-regulation of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, 2Cl<sup>-</sup> cotransporter NKCC1 in hepatic ammonia clearance and cerebral ammonia toxicity. *Sci Rep.* 2017;7(1):1-10.1-
25. Rodrigo R, Cauli O, Gomez-Pinedo U, Agusti A, Hernandez-Rabaza V, Garcia-Verdugo JM, et al. Hyperammonemia induces neuroinflammation that contributes to cognitive impairment in rats with hepatic encephalopathy. *Gastroenterol.* 2010;139(2):675-84.





## The effects of 1,8 Cineole and Ibuprofen on some behaviors, the expression of interleukins 6 and 1 $\beta$ genes and the level of glutathione reductase enzyme in hyperammonemia rats

Tayebeh Bahrami<sup>1</sup>; Parichehreh Yaghmaei<sup>2</sup>; Namdar Yosofvand<sup>3\*</sup>;  
Isaac Karimi<sup>3</sup>

1. PhD Candidate, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran- Iran.
2. Assistant Professor, Department of Biology, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran- Iran.
3. Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Razi University, Kermanshah- Iran.

### Summary

Investigation of ibuprofen (Ibu) alone and in combination with 1,8-cineol (Cin) effects on the anxiety behavior and oxidative stress in male rats was aimed in this study. A total of 36 rats were divided into six equal groups including the control (received normal saline), Ibu, Cin5, Cin 10 and Ibu+Cin. Intra-peritoneal injection of ammonium acetate for 4 weeks was used to induce hyperammonia. The animals were then administered with normal saline, 15 mg Ibu, 5 and 10 mg Cin and 10 mg Cin +15 mg Ibu/Kg, respectively. Morris water maze and Elevated plus maze was used respectively for evaluation of spatial memory and evaluation of anxiety. Glutathione reductase was measured for evaluation of oxidative stress. The expression levels of IL-6 and IL-1 $\beta$  were evaluated using Real-time PCR in brain tissue. The results showed a significant increase in spatial memory and a significant decrease in anxiety behavior ( $p < 0.01$ ) in Ibu group compared to the control group, but no significant change ( $p > 0.05$ ) was observed in glutathione reductase levels. In addition to significant increase in spatial memory and decrease in anxiety behavior in Ibu-Cin group, a significant increase in glutathione reductase levels was seen ( $p < 0.01$ ). The expression level of IL-6 and IL-1 $\beta$  in Ibu- Cin5 and 10, and Ibu+Cin were significantly down-regulated compared to the control group. The results showed that the combination of Ibu and Cin reduces oxidative stress in addition to spatial memory enhancement and reduction of anxiety behavior; therefore, simultaneous application of these two compounds may be beneficial in improvement of hyperammonia-induced anxiety and cognitive impairments.

**Keywords:** hyperammonia, glutathione reductase, anxiety, ibuprofen, 1,8-cineol.

\*Corresponding author: [yosofvand@razi.ac.ir](mailto:yosofvand@razi.ac.ir)

