اندازه گیری پارامترهای سینتیکی استیل کولین استراز مغز گاو و مهار آنزیم در مجاورت عصاره کوتکوته(Mentha pulegium L.)

مریم مهاجرانی[1*]، آرزو رسولی زاده[1]

1) گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۰

چکیده

مقدمه: عملکرد آنزیم استیل کولین استراز، تسریع فرآیند هیدرولیز استیل کولین است و حافظ هموستاز این انتقال دهنده عصبی، در سیستم اعصاب مرکزی و محیطی می باشد. با توجه به این که در بیماری هایی هم چون آلزایمر سطح انتقال دهنده عصبی، استیل کولین کاهش می یابد، بنا بر این امروزه یکی از روش های جلوگیری از پیشرفت این بیماری تجویز داروهای مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز می باشد. دستیابی به داروهایی با اثرات جانبی کمتر به خصوص با منشاء گیاهی هدف بسیاری از محققین می باشد. هدف از انجام ایـن پـژوهش بررسی تاثیر عصاره متانولی برگ گیاه کوتکوته بر میزان فعالیت آنزیم استیل کولین استراز می باشد.

مواد و روش ها: در این پژوهش آنزیم استیل کولین استراز از مغز گاو با استفاده از روش های هموژنیزاسیون، سانتریفیوژ، رسوب دهی با آمونیوم سولفات و دیالیز در دمای ۴ درجه سانتی گراد، به صورت نسبی جداسازی شد. سرعت تولید تیوکولین از استیل تیوکولین یداید به روش المن اندازه گیری شد. در ادامه عصاره متانولی برگ گیاه کوتکوته به روش خیساندن تهیه گردید. سپس اثر مهاری عصاره بر روی آنزیم استیل کولین استراز مورد سنجش قرار گرفت.

یافته های پژوهش: در این تحقیق فعالیت کل و فعالیت ویژه استیل کولین استراز جداسازی شده از مغز گاو ۱۱۴۳/۷۸ U و ۴/۱۰ U/mg تعیین شد. pH بهینه آنزیم ۷/۵ و دمای بهینه آن ۴۵ درجه سانتی گراد به دست آورده شد. مقادیر K_m و V_{max} آنزیم به ترتیب برابر ۶/۴۹ میلی مولار و ۵۹/۸۸ میلی مولار بر دقیقه به دست آورده شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی در غلظت ۲۶/۶۶ mg/ml اثرات قابل توجهی بر فعالیت این آنزیم دارد. با توجه به نتایج به دست آمده، این عصاره می تواند به صورت مهار مختلط باعث مهار AchE شود. بنا بر این برگ گیاه کوتکوته می تواند توسط محققان در زمینه مطالعه و بررسی داروها مورد توجه قرار گیرد.

واژه های کلیدی: استیل کولین استراز، مهار مختلط، عصاره متانولی، کوتکوته

* نویسنده مسئول: گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه مازندران، بابلسر، ایران

Email: m.mohajerani@umz.ac.ir

Copyright © 2019 Journal of Ilam University of Medical Science. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution international 4.0 International License (https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material, in any medium or format, provided the original work is properly cited.

مقدمه

آنزیم استیل کولین استراز(AChE, EC: 3.1.1.7) از خانواده سرین هیدرولازها، در بافت های مختلف از جمله بافت های عصبی، عضـــلانی، پلاســـما و سلول های خونی وجود دارد و وظیفه کاتالیز واکنش هیدرولیز استیل کولین را به عهده دارد. این آنزیم در انسان دارای سه جایگاه گلیگوزیلاسیون است(۱). استیل کولین در بسیاری از اعمال عصبی مانند یادگیری، یادآوری و کنترل مرحله ای از خواب که رویا در آن به وقوع می پیوندد نقش دارد. علاوه بر این برخی از محققان بر این باورند که در بیماری آلزایمر، نورون های استیل کولینرژیک مغز دچار کم کاری و مرگ تدریجی می شوند. بر این اساس استیل کولین استراز به طور گسترده در بافت های مختلفی که با این بیماری در ارتباط بوده اند بررسی شده است. این مطالعات تغییراتی را در فعالیت آنزیم کولین استراز و پلی مورفیسم آن در مغز و مایع مغزی نخاعی و خون نشان می دهند(۲).

این آنزیم یکی از بهترین آنزیم ها برای مطالعه از نقطه نظر مکانیسم عمل، طبیعت جایگاه فعال، توزیع و محل استقرار آن در بافت ها واعمال فیزیولوژیک آن حداقل در عقده ها و اتصالات عـــصبی و عضلانی می باشد. کولین استراز یک آنزیم ضروری در سیستم اعصاب است که باعث هیدرولیز سریع استیل کولین و تبدیل آن به کولین و گروه استات در سیناپس کولینرژیک می شود. بیماری آلزایمر از بیماری های رایج در افراد سالخورده است که توسط آن مسیرهای بیوشیمیایی در بیمار دچار اختلال می شود(۲). این امر به کاهش ناقل عصبی استیل کولین در قشر مغز منجر شده و باعث بروز نقایص شناختی و ادراکی و زوال عقلی می شود(۳).

مهار آنزیم استیل کولین استراز بر اساس فرضیه کولینرژیک، موجب بالا رفتن سطح استیل کولین در مغز می گـــردد که سبـــب بهبود عملکرد سیستم کولینرژیک در بیماران آلزایمری می شود. در حال حاضر بسیاری از داروهایی که برای درمان آلزایمر با چنین مکانیسمی در دسترس هستند شامل تاکرین(۴)، دونپزیل(۵)، ریواستگمین(۶) و گالانتامین(۷) می باشند که همگی به دلیل عـــوارض جانبی شان استفاده از آن ها محدود شده اند(۴). اولین بار در سال ۲۰۰۰، ریواستیگمین که مولکولی سنتزی مشابه فیزواستیگمین بود، به عنوان یک آلکالوئید طبیعی مهارکننده استیل کولین استراز به کار برده شد. بعد از آن گالانتامین برای اولین بار از گیاه گالانتوس استخراج شد و مورد تایید سازمان دارویی آمریکا قرار گرفت(۸).

متابولیت های ثانویه سنتزی در گیاهان به عنوان منابعی از مهارکننده های این آنزیم به شمار می آیند که با توجه به فرضیه کولینرژیک می توانند از طریق مهار آنزیم استیل کولین استراز و افـــزایش سطح پیام رسان عصبی استیل کولین در مغز، به بهبود بیماری آلزایمر و یا بیماری های دیگر کمک کنند. اکثر این مهارکننده ها متعلق به خانواده آلکالوئیدها شامل ایندول و ایزوکوئینولین و کوینولیزیدین و پیپریدین و آلکالوئیدهای استروئیدی هستند. از سوی دیگر چندین ترکیب غیر آلکالوئیدی و مهارکننده قوی دیگر این آنزیم از منابع طبیعی به دست آمده است که از دسته ترپنوئیدها، فلاونوئیدها و دیگر ترکـــیبات فـــنولی می - باشند(۹،۱۰).

تا کنون بر اساس تحقیقات انجام گرفته بر روی گونه های گیاهی مختلف محققین موفق به کشف مهارکننده های جدید بـــرای این آنزیم با اهمیت شده اند. تحقیق برای کشف متابولیت های گیاهی که اثر مهاری خوبی بر استیل کولین استراز داشته باشند مهم است چون می تواند به کشف مهارکننده های جدید با قدرت مهاری به مراتب بالاتر با اثرات جانبی کمتر منجر شود(۱۱).

گیاه کوتکوته یا پونه معطر(Mentha pulegium) گونه ای از گیـــاهان گلـــدار از خانواده لمیاسه (Lamiaceae) یکی از گیـــاهانی است که اثرات بیولوژیکی فراوانی از آن گزارش گردیده است. این گیاه با نام خالواش در منطقه شـــرق گیلان در ایران شناخته شده تر است و عمدتاً به دلیل خواص ضدعفونی کننده، دافع حشرات، داروی ضداسپاسم و ضدالتهاب مصرف می شود. به طور سنتی این گیاه برای درمان بیماری های رحم از جمله فیبروز و گردن رحم مورد استفاده قرار می گیرد(۱۲). تحقیقات نشان داده است که اسانس گیاه کوتکوته یک کاندیدای ضد سرطان مناسب برای سلول های انسانی می باشد. جنس Mentha شامل ۲۵ تا ۳۱

گونه ا ست که در سراسر جهان رشد می کند. شـــایع ترین گـــــونه آن Mentha pulegium است و در چای گیاهی یا به عنوان افزودنی در مخلوط ادویه های تجاری برای بسیاری از غذاها برای بهبود عطر و طعم اســـــتفاده می شود. علاوه بر این، به عنوان یک درمان سنتی برای تهوع، برونشیت، بی اشتهایی، کولیت اولسراتیو و بیماری های کبدی مورد استفاده قرار گرفته است. این گیاه سرشار از ترکیبات فنول و فلاوونوییدی است (شکل شماره ۱).

شکل شماره ۱. گیاه کوتکوته

در این تحقیق از عصاره گیاه کوتکوته استفاده شد که در بیشتر نقاط شمال ایران مصرف سنتی فراوانی به عنوان دارو داشته است. از طرف دیگر امروزه درمان و پیشگیری بیماری آلزایمر با استفاده از مهارکننده های استیل کولین استراز مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. از آن جا که بر طبق مطالعات کتابخانه ای تاکنون چنین مطالعه ای بر روی گیاه کوتکوته انجام نپذیرفته است، هدف ایـــن تحقـــیق ارائه یک مورد کاربردی به بخش تحقیقات و صنایع داروسازی کشور بوده است.

مواد و روش ها

مواد شیمیایی: استیل تیو کولین یداید(ATCI)، دی تیو بیس نیترو بنزوییک اسید(DTNB)، بافر سدیم فسفات ، گالانتامین، متانول، آمونیوم سولفات، کربنات سدیم، تارتاریک اسید، معرف فولین، سولفات مس، سرم آلبومین گاوی، بافر سیترات–فسفات، بافر تریس، بافر گلایسین، که همگی از شرکت های مرک، سیگما و فلوکا تهیه و خریداری شدند.

استخراج آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو: در کشتارگاه شهرستان آمل، مغز گاو پس از ذبح جداسازی و سریعاً در ظـــــرف حاوی یخ قرار داده شد و به آزمایشگاه بیوشیمی دانشگاه مازندران منتقل شد. بافت مغز با محلول نمکی ۰/۹ درصد برای زدودن خون و آلودگی های دیگر شستشو شد. بخش خاکستری مغز گاو به وسیله چاقوی تیز از سایر بخش های مغز جدا و به قطعات کوچک تر برش داده شد و توزین شد. سپس در بافر سدیم فسفات(۰/۰۳ مولار؛ pH=۷) به وسیله همزن مکانیکی در حمام یخ هموژنیزه گردید. مخلوط حاصل به وسیله صافی پارچه ای صاف شد. عصاره به دست آمده در دمای ۴ درجه سانتـــــی گراد با سرعت ۲۵۰۰۰ xg به مدت یک ساعت سانتریفیوژ شد و از محلول رویی به عنوان عصاره آنزیمی خام استفاده شد. به محلول رویی حاصل تا درجه سیرشدگی ۳۰ درصد به منظور رسوبدهی، نمک آمونیوم سولفات(به ازای هر لیتر از محلول صاف شده مقدار ۱۶۴ گرم سولفات آمونیوم) اضافه و به آرامی هم زده شد تا کاملاً سولفات آمونیوم حل گردد. سپس به مدت ۴ ساعت در یخچال قرار داده شد. پس از این مـــــدت مخـــــلوط با دور ۱۲۰۰۰ xg به مدت ۳۰ دقـــیقـــــه در دمای ۴–درجه سانتی گراد سانتریفیوژ گردید. محلول رویی به آرامی تخلیه و تعیین حجم شد. رسوب موجود در لوله سانتریفیوژ در کمترین حجم ممکن از بافر سدیم فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷ سوسپانسیون گردید. سپس مجدداً به ازای هر لیتر محلول رویی مرحله قبل، مقدار ۲۴۹ گرم سولفات آمونیوم به تدریج اضافه شد و به آرامی هم زده شد تا سولفات آمونیوم کاملاً حل گردد. سپس به مدت ۴ ساعت در یخچال قرار داده شد و با همان شرایط قبل سانتریفیوژ

گردید. در نهایت محلول رویی دور ریخته شد و رسوب ته نشین شده در لوله سانتریفیوژ در کمترین حجم ممکن از بافر فسفات ۳۰ میلی مولار با pH=۷ سوسپانسیون گردید. رسوب های ۳۰ و ۷۰ درصد حاوی آنزیم به کیسه های دیالیز انتقال یافتند، دو سر کیسه دیالیز گره زده شد و به مدت ۴۸ ساعت در بافر سدیم فسفات(۳۰ میلی مولار) در دمای ۴ درجه سانتی گراد دیالیز انجام شد. در طول این مدت بافر دیالیز دو بار تعویض شد و در نهایت محلول از کیسه دیالیز خارج و به چند میکروتیوپ منتقل شد و در دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد. فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در نمونه ها اندازه گیری شد(۱۳).

تعیین غلظت پروتئین: سنجش مقدار پروتیین محلول در هر مرحله از استخراج به روش لوری انجام شد. در این روش از معرف فولین به عنوان واکنشگر رنگی استفاده شد. آلبومین سرم گاوی به عنوان استاندارد استفاده شد و جذب نوری نمونه ها در ۷۵۰ نانومتر اندازه گیری و از روی منحنی استاندارد حاصل و معادله خط آن مقدار پروتئین موجود در هر مرحله محاسبه گردید(۱۴).

سنجش فعالیت آنزیم: فعالیت آنزیم طبق روش المن تخمیین زده شد بدین منظور با استفاده از بافر سدیم فسفات، معرف رنگی دی تیوبیس نیترو دی بنزوییک اسید(DTNB) و استیل تیوکولین یداید به عنوان سوبسترا، فعالیت آنزیم اندازه گیری شد. تیوکولین حاصل از هیدرولیز سوبسترا با ترکیب DTNB واکنش داده و محصول زرد رنگی تولید می کنند که در طول موج ۴۱۲ نانومتر مقدار ان با دستگاه اسپکتروفتومتر قابل اندازه گیری می باشد. بدین منظور بافر سدیم فسفات ۰/۰۳ مولار در pH برابر با ۷، استیل تیوکولین یداید ۷۵ میلی مولار(۲۰ میکرولیتر)، معرف DTNB، ۱۰ میلی مولار(۲۰ میکرولیتر) و آنزیم(۱۰ میکرولیتر) در کووت به حجم نهایی ۳ میلی لیتر و جذب نوری در ۴۱۲ نانومتر برای ۵ دقیقه خوانده شد. نمونه شاهد نیز همانند نمونه دارای آنزیم سنجش شد با این تفاوت که نمونه شاهد فاقد آنزیم بود به این ترتیب از تجزیه غیرآنزیمی سوبسترا صرف نظر شد. تمام اندازه گیری ها ۳ بار تکرار شد. برای محاسبه فعالیت کل آنزیم از معادله زیر استفاده شد(۳).

فرمول ۱ $Total\ \ Activity=\Delta A.Df/\varepsilon.\ y.1$

در فرمول ۱، ΔA تغییرات جذب نوری واکنش آنزیم در دقیقه، V حجم مورد سنجش، Df فاکتور رقت، ε ضریب خاموشی DTNB، ۰/۱۳۶ بر میلی مولار سانتی متر می باشد، y حجم آنزیم استفاده شده و L طول عبور نور(برابر یک سانتی متر) می باشد.

فرمول ۲

$$\text{Specific Activity} = \frac{Total\ Activity}{[Protein]}$$

تعیین pH بهینه: برای تعیین pH بهینه، فعالیت آنزیم در محدوده pH های ۴ تا ۱۱ اندازه گیری شد. بدین منظور در محدوده pH=۴-۶ از بافر سیترات-فسفات و در محدوده pH=۵-۸ از بافر سدیم فسفات و از تریس در محدوده pH=۹ و از گلایسین-هیدروکسید سدیم در محدوده pH=۱۰ و از بافر فسفات در محدوده pH=۱۱ استفاده شد. درصد فعالیت نسبی آنزیم طبق فرمول ۳ در pH های مختلف محاسبه و به دست آمد و با رسم نمودار تغییرات جذب نسبت به pH های مختلف، pH بهینه به دست آورده شد(۴).

فرمول ۳ $A= S/S_0\ x100$

تعیین دمای بهینه: دمای بهینه آنزیم با اندازه گیری فعالیت آنزیم در دماهای مختلف با قرار دادن نمونه آنزیمی در محدوده دمایی ۵ الی ۸۵ درجه سانتی گراد در ۳ دقیقه و سپس سنجش باقی مانده فعالیت آنزیم مورد ارزیابی قرار گرفت(۴).

تعیین K_m و V_{max}: برای تعیین مقادیر K_m و V_{max}، در شرایط استاندارد(دما و pH بهینه) فعالیت آنزیم به ازای غلظت های مختلف سوبسترا(استیل تیوکولین یداید) بررسی گردید. برای این منظور ابتدا محلولی از سوبسترا در غلظت های ۵ تا ۱۱۵ میلی مولار در بافر سدیم فسفات ۰/۰۳ مولار و pH=۷/۵ تهیه

شد. نمونه حاوی آنـــــزیم با این غلظت های سوبسترا مخلوط و سپس فعالیت آنزیم اندازه گیری شد. با رسم نمودار میکائیلیس مـــنتن، ثابت K_m و بیشینه سرعت واکنش آنزیم V_{max} به دست آورده شد. بدین منظور از طریق رسم نمودار لینویور–برگ مقادیر K_m و V_{max} محاسبه گردید.

تهیه عصاره گیاه کوتکوته: گیاه کوتکوته از منطقه شهرستان بابل جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل شد. پس از شناسایی توسط استاد گیاه شناسی دانشگاه مازندران، (شماره هرباریومی ۸۱۰۴) اندام های هوایی گیاه به طور کامل تمیز و با آب شستشو داده شد. گیاه جمع آوری شده در سایه و دمای آزمایشگاه خشک شد. سپس به قطعات کوچکی خرد شده و به وسیله آسیاب خانگی به صورت پودر نرم در آمد. مقدار ۲ گرم از پودر گیاه کوتکوته با استفاده از حلال متانول با نسبت ۱:۱۰ به مدت سه روز بر روی شیکر در دمای آزمایشگاه به روش خیساندن عصاره گیری شد. عصاره به دست آمده پس از صاف شدن به وسیله کاغذ واتمن شماره ۱ با استفاده از دستگاه روتاری در دمـــای ۴۰ درجه سانتی گراد تغلیظ شده و تا قبل از استفاده در دمای ۲۰– درجه سانتی گراد نگهداری شد.

بررسی فعالیت استیل کولین استراز در مجاورت عصاره گیاه کوتکوته: ابتدا عصاره متانولی گیاه در غلظت های ۳/۳۳، ۶/۶۶، ۱۳/۳۳ و ۲۶/۶۶ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. استیل تیو کولین یداید به عنوان سوبسترا در غلظت های ۱۱۵–۵ میلی مولار آماده گردید. در هر بار سنجـــش، در کـــــووت از بـــافر سیترات/فسفات ۰/۰۳ مولار با pH ۷/۵ و ۲۰ میکرولیتر DTNB ۱۰ میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره مـــــــتانولی و ۱۰ میکرولیتر عصاره آنزیمی استیل کولین استراز مغز گاو اضافه شده و بعد از ۱۵ دقیقه انکوبه شدن در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد ۲۰ میکرولیتر سوبسترا به محلول فوق اضافه شد تا به حجم نهایی ۳ میلی لیتر برسد. تغییرات جذب نوری در دستگاه اسپکتروفتومتر هر ۵ دقیقه با سه بار تکرار در طول موج ۴۱۲ نانومتر خوانده شد. روش سنجش نمونه شاهد نیز همانند نمونه دارای آنزیم است تنها تفاوت این که نمونه شاهد فاقد سوبسترا بوده و به جای سوبسترا از بافر استفاده شد. از گالانتامین محلول در متانول نیز به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. در نهایت منحنی بر حسب جذب در برابر غلظت های مختلف سوبسترا برای هر یک از عصاره ها و آنزیم رسم گردید و نوع مهارکنندگی عـــــصاره مشخـــص شد. هر اندازه گیری سه بار تکرار شد(۷،۱۱).

یافته های پژوهش

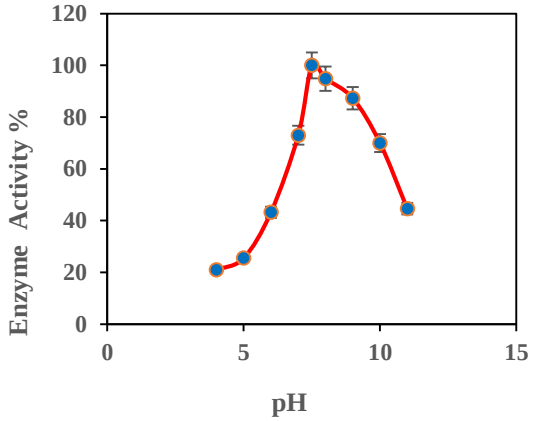
در مراحل مختلف استخراج در عصاره خام حاصل از هموژنیزاسیون مغز گاو مقدار پروتئین تام به روش لوری اندازه گیری شده و با سنجش فعالیت آنزیم مقدار فعالیت ویژه آنزیم در مراحل جداسازی محاسبه شده است. به همین ترتیب در مراحل پس از سانتریفیوژ و پس از رسوبگیری با آمونیوم سولفات با درجه اشباعیت ۳۰ و ۷۰ درصد و دیالیز آن ها مقدار پروتئین تام و فعالیت ویژه آنزیم اندازه گیری شد. به این ترتیب آنزیم در عصاره خام مـــغز با فعالیت ویژه ۱/۳۴ واحد در میلی گرم پروتئین و در فرکشن دیالیز شده ۳۰ در صد ۲/۰۹ و در فرکشن ۳۰ تا ۷۰ درصد دیالیز شده ۴/۱۰ واحد آنزیمی در میلی گرم پروتئین فعالیت بیشتری نشان داد. لذا برای اندازه گیری پارامترهای آنزیم از آخرین فرکشن آنزیمی یعنی عصاره ۷۰–۳۰ درصد استفاده شد.

جدول شماره ۱. مراحل تهیه عصاره آنزیمی

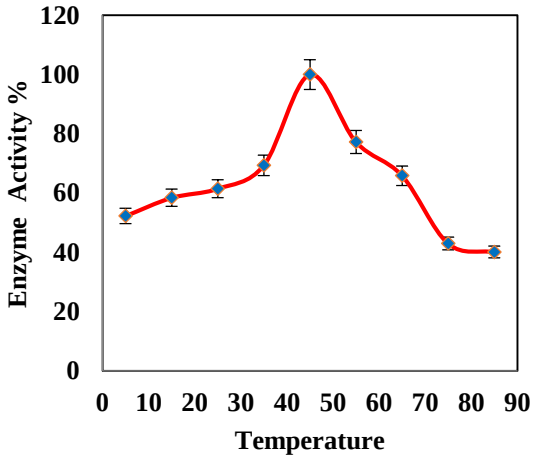
درجه خلوص	بازیابی فعالیت (%)	فعالیت ویژه [U/mg]	فعالیت [U/ml]	پروتئین تام [mg]	فعالیت تام (U)	حجم نمونه (ml)	خالص سازی نسبی
۱	۱۰۰	۱/۳۴	۱۸/۳۰	۷۰۷۸/۱۹	۹۵۲۰/۵۸	۵۲۰	عصاره خام
۳/۰۶	۱۲/۰۱	۴/۱۰	۳۸/۱۲	۲۷۸/۷	۱۱۴۳/۷۸	۳۰	رسوب ۷۰ درصد

نتایج حاصل از اندازه گیـــــری فعالیت آنزیم در pH های مختلف در شکل شماره ۲ نشان داده شده است با توجه به نتایج، پایداری این آنزیم تا حدود زیادی تابع pH می باشد و تغییرات pH در فعالیت آنزیم تاثیر می گذارد. در ابتدا فعالیت آنزیم با افزایش pH افزایش می یابد. این آنزیم در محدوده pH=۷–۸ توانایی فعالیت

بالایی دارد ولی بهترین pH برای فعالیت آن ۷/۵ =pHاندازه گیری شد. به این ترتیب با افزایش pH از pH=۸ به بعد، کاهش فعالیت آنزیم مشاهده شد. نتایج بررسی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در دماهای مختلف در شکل شماره ۳ آورده شده است. برطبق نتایج به دست آمده در این بررسی آنزیم استیل کولین استراز در محدوده دمایی ۴۰ تا۵۰ درجه سانتی گراد فعالیت بالایی را نشان می دهد. ولی بهترین دما برای بیشتـــــرین فعالیت آن ۴۵ درجه سانتی گراد به دست آورده شد.



شکل شماره ۲. تاثیر pH بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو

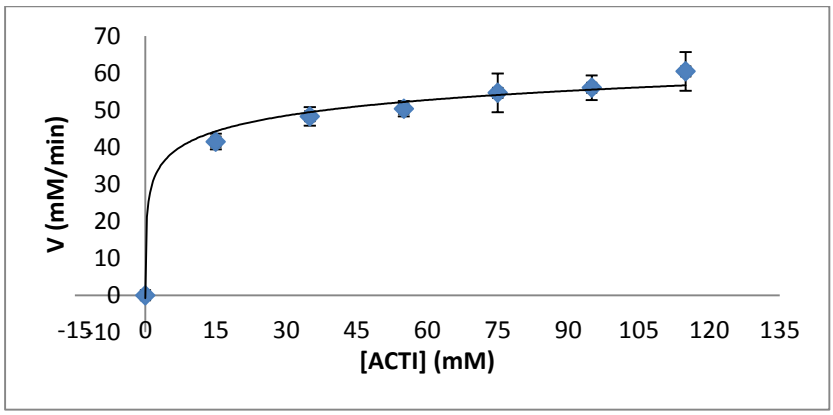


شکل شماره ۳. تاثیر دما بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو

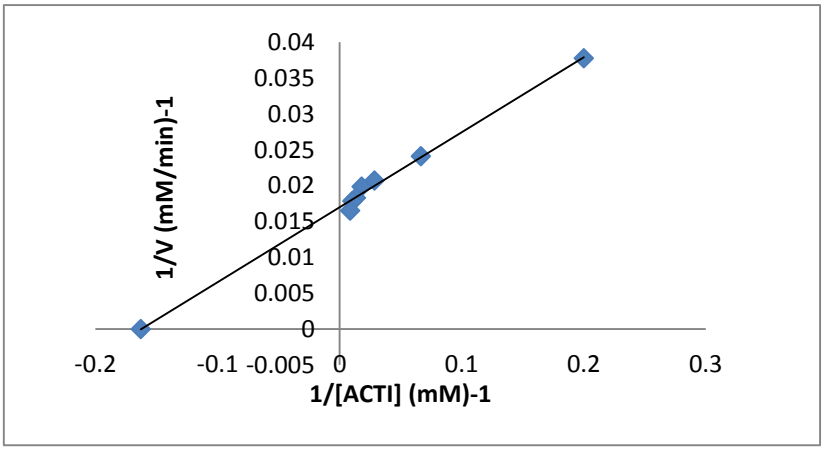
عصاره متانولی به دست آمده با راندمان ۱۳/۷۵ گرم در هر ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در یخچال نگهداری گردید. بر طبق مطالعات قبلی عصاره متانولی گیاه کوتکوته غنی از ترکیب پالئگون(۶۵/۵۲ درصد) است که دارای فعالیت دفع حشرات و ضد درد و ضد التهاب است. هم چنین این گیاه سرشار از ترکیبات فنول و فلاوونوییدی است که سبب اثر مهاری برآنزیم استیل کولـــین اســـــتراز اســـت. این عصاره در غلظت ۲۶/۶۶µg/ml، K_m و V_{max}به تـــرتیـــــب ۸/۴۷ میلی مولار و ۴۲/۵۵ میلی مولار به دست آمد.

بررسی و اندازه گیری پارامترهای سینتیکی آنزیم جداسازی شده استیل کولین استراز، در مجاورت مقادیر مختلف عصاره متانولی کوتکوته، نشان داد که ترکیبات تشکیل دهنده عصاره این گیاه آنزیم را مهار نموده و به ازای حدود ۲۶ میکروگرم بر میلی لیتر عصاره متانولی درصد مهاری ۵۵/۷۳ و از نوع مختلط می باشد(شکل

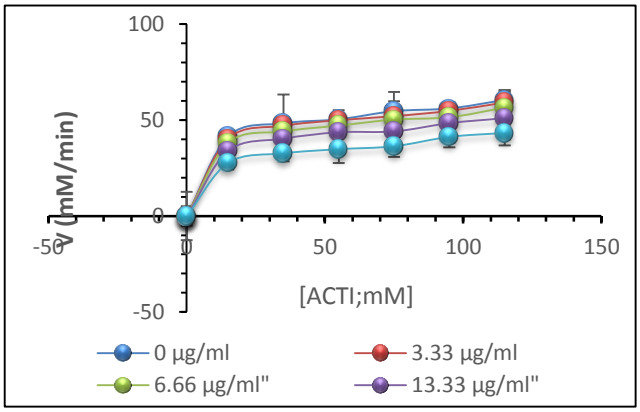
شماره ۶ و ۷). عصاره متانولی این گیاه در غلظت ۲۱ میکروگرم بر میلی لیتر، فعالیت آنزیم را به مقدار ۵۰ درصد کاهش داده است(شکل شماره ۹). مطابق مقادیر ثابت به دست آمده در شکل شماره ۸ ثابت تفکیک مهارکننده و آنزیم Ki=۳۱/۸ و ثابت تفکیک مهارکننده و کمپلکس آنزیم-سوبسترا KI=۵۳/۶ میلی مولار به دست آمده و از آن جا که KI بزرگ تر از Ki می باشد بنا بر این مهار مختلط به صورت رقابتی-غیر رقابتی است(شکل شماره ۹). به عنوان کنترل مثبت از ترکیب گالانتامین در غلظت ۰/۳ µg/ml در نظر گرفته و به صورت رقابتی سبب مهار استیل کولین استراز شد. نمودار بستگی میزان مهار آنزیم به وسیله عصاره کوتکوته در مقایسه با گالانتامین در(شکل شماره ۱۰) آورده شده است.



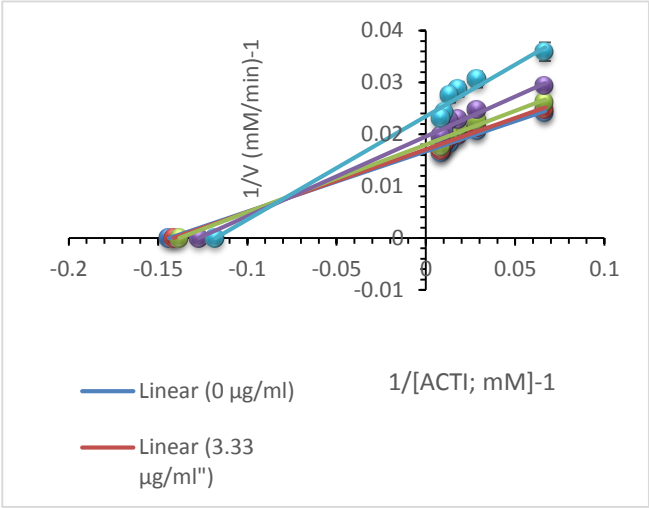
شکل شماره ۴. نمودار میکائیلیس-منتن فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو در غلظت های مختلف استیل تیوکولین یداید به عنوان سوبسترا(تمام اندازه گیری ها سه بار تکرار شد و مقادیر نشان داده شده انحراف معیار±مقدار میانگین می باشد.)



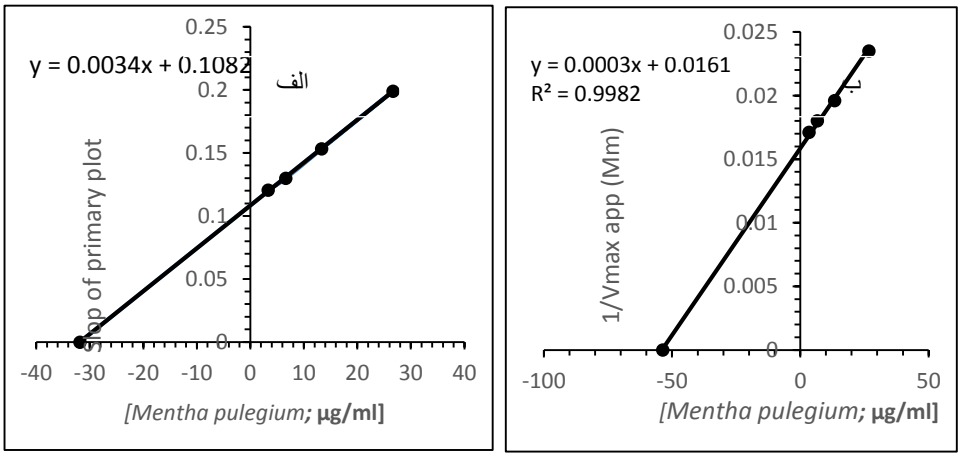
شکل شماره ۵. تغییرات معکوس سرعت واکنش استیل کولین استراز مغز گاو به معکوس غلظت های مختلف استیل تیوکولین یداید(نمودار لینویور-برگ)



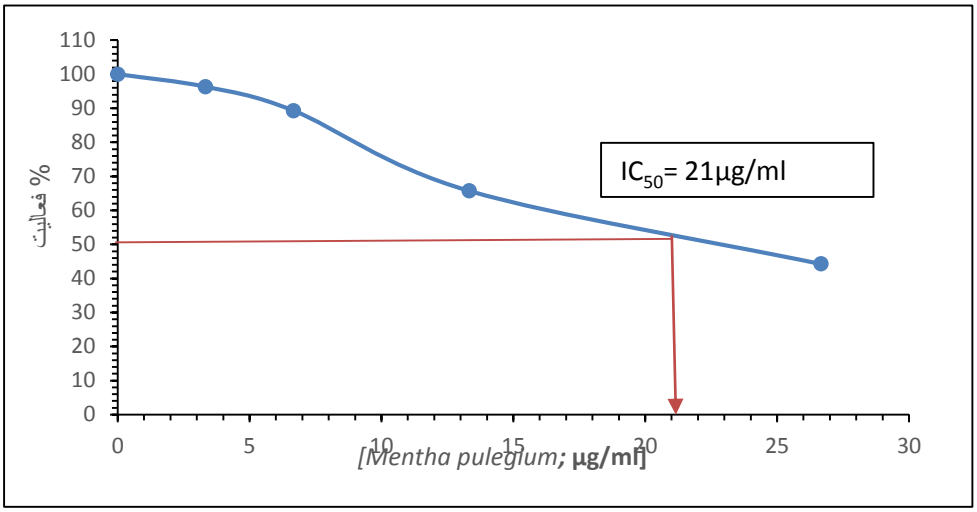
شکل شماره ۶. تغییرات سرعت واکنش کاتالیز شده با استیل کولین استراز در مجاورت غلظت های مختلف عصاره کوتکوته (نمودار میکائیلس-منتن).(تمام اندازه گیری ها سه بار تکرار شد و مقادیر نشان داده شده انحراف معیار±مقدار میانگین می باشد.)



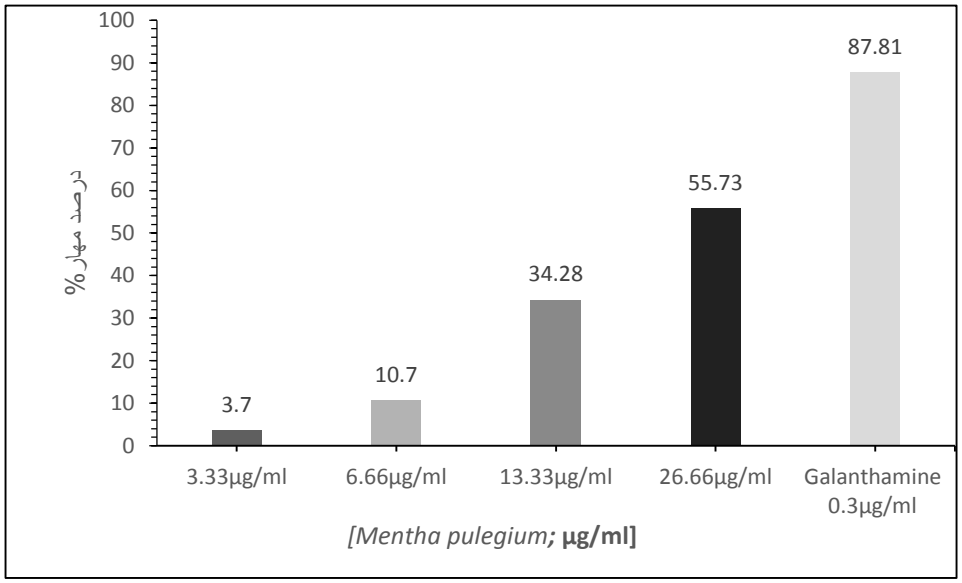
شکل شماره ۷. نمودار لینویور-برگ مهار آنزیم استیل کولین استراز در مقادیر مختلف عصاره کوتکوته



شکل شماره ۸. الف) نمودار تغییرات V_{max} ظاهری آنزیم نسبت به غلظت عصاره کوتکوته[KI]
ب) نمودار تغییرات شیب نمودار اولیه نسبت به غلظت عصاره کوتکوته[Ki]، KI>Ki



شکل شماره ۹. تغییرات باقیمانده فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو به ازای مقادیر مختلف از عصاره کوتکوته. (فلش مقدار IC_{50} را نشان می دهد)



شکل شماره ۱۰. میزان مهار آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو با مقادیر مختلف عصاره کوتکوته در مقایسه با گالانتامین به عنوان کنترل مثبت

پارامترهای سینتیکی استیل کولین استراز طبق آزمایش های انجام شده در این تحقیق در جدول شماره ۲ ارائه شده است. بر طبق مقایسه ای که در این تحقیق برای یک مهارکننده عمومی و مهم مثل ترکیب گالانتامین و عصاره متانولی برگ از گیاه کوتکوته انجام شد مشخص شد که این عصاره دارای خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز بوده و حدوداً یک چهارم قدرت مهارکنندگی گالانتامین برای آن اندازه گیری شد.

جدول شماره ۲. پارامترهای سینتیکی آنزیم استیل کولین استراز در مجاورت غلظت های مختلف عصاره کوتکوته

غلظت عصاره (µg/ml)	K_m (Mm)	K_m^{app} (mM)	V_{max} (mM/min)	V_{max}^{app} (mM/min)	درصد مهار	Ki (µg/ml)	KI (µg/ml)	IC_{50} (µg/ml)
۰	۶/۴۹	–	۵۹/۸۸	–	–	۳۱/۸		
۳/۳۳	۶/۴۹	۷/۰۹	۵۹/۸۸	۵۸/۴۷	۳/۷		۵۳/۶	۲۱
۶/۶۶	۶/۴۹	۷/۲۴	۵۹/۸۸	۵۵/۵۵	۱۰/۷			
۱۳/۳۳	۶/۴۹	۷/۸۷	۵۹/۸۸	۵۱/۰۲	۳۴/۲۸			
۲۶/۶۶	۶/۴۹	۸/۴۷	۵۹/۸۸	۴۲/۵۵	۵۵/۷۳			

بحث و نتیجه گیری

تاکنون گزارش های زیادی از محققین در سراسر دنیا ارائه شده است که در آن ها به نقش مهم پیشگیری و درمان بیماری های انسان با استفاده از عصاره های مختلف گیاهان اشاره داشته اند. در گزارش های زیادی روغن اسانس کوتکوته از نظر ترکیبات سازنده بررسی و ترکیب پولئگون که یک کتون مونوترپنوئیدی بوده و در حدود ۷۰ درصد و ترکیب کاروون با درصد کمتر عمده ترکیبات تشکیل دهنده اسانس آن می باشند. مطالعه خواص آنتی اکسیدانی عصاره های متانولی و اتانولی کوتکوته در ارتباط با محتوای فنولی، فلاونوئیدی و تانن در سال ۲۰۱۶ در الجزایر انجام شد. آن ها چند گونه از نعناعیان را مطالعه نموده و ارتباط مستقیم خواص آنتی اکسیدان آن ها با محتوای پلی فنولی را نتیجه گیری کردند(۱۵).

داروهایی که در حال حاضر برای درمان آلزایمر تایید شده اند، از طریق افزایش سطح انتقال دهنده عصبی استیل کولین در مغز عمل می کنند(۱۶). درمان اولیه و حالت متوسط آلزایمر، اکثراً بر اساس استفاده از مهارکننده های آنزیم استیل کولین استراز، از جمله دونپزیل سنتزی و گالانتامین استخراج شده از یک گیاه و موارد مشابه می باشد. با این حال این داروها دارای اشکالاتی از جمله اثرات جانبی مرکزی و محیطی شدید، مانند اختلالات دستگاه گوارشی، بی خوابی، خستگی، افسردگی، مسمومیت کبدی، اسهال و تهوع، سرگیجه، مشکلات در ارتباط با جذب داروها می باشند(۱۷). اثرات جانبی شدید داروهایی که در حال حاضر برای درمان آلزایمر به کار می روند، محققان را به یافتن مهارکننده هایی با منشاء طبیعی، که تاثیر بیشتر و اثرات جانبی کمتری داشته باشند، علاقمند ساخته است.

در تحقیقی که جهت یافتن ترکیبات غیر آلکالوییدی با منشاء گیاهی و خاصیت مهار آنزیم استیل کولین استراز انجام شد مشخص گردید که دو ترکیب کومارینی و سه مشتق دکان استری و دو ترکیب فنلی و نیز یک ترکیب پلی استیلینی جدا شده از گیاه فرولا کامپستریس اثرات ممانعت کنندگی بر این آنزیم دارند(۸).

جهت یافتن عصاره خالص تر و در نتیجه موثرتر گیاهان، پژوهش های مختلفی بر روی اندام های مختلف آن ها، از جمله برگ، ریشه، میوه، دانه و اندام های هوایی از نظر خاصیت مهارکنندگی استیل کولین استراز انجام شده است. طی تحقیقی در جهت یافتن مهارکننده های جدید استیل کولین استراز، گیاهان دارویی آفریقای جنوبی مورد بررسی قرار گرفتند، با استفاده از عصاره های متانولی و اتیل استاتی توان مهارکنندگی آن ها اندازه گیری شد و نتایج این بررسی نشان داد که عصاره متانولی ریشه گونه زانتوکسیلیوم دیوی حاوی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی فراوانی است و آزمایشات انجام شده ریشه این گیاه را با بیشترین درصد مهارکنندگی نشان داده اند(۱۸).

در سال ۲۰۱۳ کایا و همکاران، از گلبول قرمز انسان آنزیم استیل کولین استراز را جدا و خالص سازی کردند و با بررسی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز خالص شده در pH و دماهای متفاوت به این نتیجه رسیدند که pH بهینه برای فعالیت آنزیم ۷/۴ و دمای بهینه آنزیم ۳۵ درجه سانتی گراد است(۱۹).

در سال ۲۰۰۲ در مجله بیوشیمی بین المللی و زیست شناسی سلولی گزارش شده است که با استفاده از روش های کروماتوگرافی نظیر کروماتوگرافی تمایلی بر روی ستون کونکاناوالین آ و ادروفونیوم-سفاروز

می توان خالص سازی آنزیم استیل کولین استراز از مغز بلدرچین با درجه خلوص بالا انجام شده است. استیل کولین استراز خالص شده از مغز بلدرچین ژاپنی یک تترامر با وزن تقریبی ۲۴۵/۵ کیلو دالتون و منومر آن ۶۲/۵ کیلودالتون می باشد.(۲۰).

بر اساس پژوهشی که در راستای بررسی محدوده pH بهینه، برای فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در سال ۲۰۱۵ توسط ویسلر و همکاران انجام گرفت، مشخص شد که آنزیم استیل کولین استراز در pH های کمتر از ۶ دارای فعالیت ضعیفی است. در نهایت pH بهینه آنزیم استیل کولین استراز را pH بالاتر از ۷ در نظر گرفتند(۲۱).

استخراج آنزیم استیل کولین استراز با استفاده از روش رسوب گیری با آمونیوم سولفات فوق اشباع در سال ۲۰۱۵ از مغز گاو گزارش شد و با توجه به مقادیر فعالیت ویژه و خلوص آنزیم نتیجه گیری شد که مغز گاو یک منبع غنی از این آنزیم می باشد و از آن زمان این منبع آنزیمی مورد توجه بیشتر بیوشیمیدان ها قرار گرفت(۲۲،۲۳). لذا در این مقاله به استخراج و سپس بررسی این آنزیم از مغز تازه گاو پرداخته شد. پس از مشاهده فعالیت در عصاره آنزیمی استخراج شده شرایط بهینه برای فعالیت آنزیم تعیین شد.

در بررسی تغییرات pH نیز تغییرات فعالیت آنزیم از یک الگوی زنگوله ای تبعیت می کند. همان طور که در نمودار مربوطه به خوبی مشاهده می شود بعد از فعالیت بیشینه آنزیم در pH ۷/۵ نزول نمودار دلیل بر کاهش فعالیت است که احتمالاً ممکن است به دلیل تشکیل یک حالت یونی نامناسب برای آنزیم یا سوبسترا و یا به دلیل از دست رفتن حالت طبیعی آنزیم در نتیجه تغییر pH باشد.

در این پروژه در جریان بررسی دمای بهینه برای فعالیت آنزیم مشاهده شد که در دماهای بالاتر کاهش فعالیت برای آنزیم وجود دارد که می توان علت این کاهش فعالیت را در نتیجه دناتوره شدن آنزیم در نظر گرفت چون از آن جا که با دناتوره شدن آنزیم ساختمان سه بعدی آن دچار اختلال می شود آنزیم قادر به پیوند با سوبسترا نمی باشد. در مرحله بعد با تعیین سرعت اولیه واکنش آنزیمی در غلظت های مختلف سوبسترا مشاهده گردید که آنزیم استخراج شده از الگوی عمومی میکائیلس منتن تبعیت می کند لذا نمودار معکوس دوتایی لینویور برک رسم گردید تا با دقت زیاد مقادیر ثابت سرعت ماکزیمم و نیز مقدار ثابت میکائیلس تعیین گردید. با توجه به نمودار شماره ۴ در غلظت های پایین از سوبسترا، همه جایگاه های فعال آنزیم توسط سوبسترا پر نمی شود زیرا سوبسترا به اندازه کافی در اختیار آنزیم نیست و بسیاری از جایگاه های فعال آنزیم خالی مانده و در نتیجه فعالیت آنزیم پایین است. در ادامه هر چه که مقدار سوبسترا را اضافه می کنیم متقابلاً فعالیت آنزیم نیز افزایش می یابد تا جایی که کلیه جایگاه های آنزیم با سوبسترا پر شده و دیگر افزایش غلظت سوبسترا تاثیری در فعالیت آن ندارد. در قدم بعدی به بررسی تغییرات فعالیت و سرعت واکنش آنزیمی در مجاورت عوامل دیگری مثل عصاره های گیاهان مورد بررسی پرداخته شد. مطالعات جالبی قبلاً از محققان چاپ شد که تاثیرپذیری استیل کولین استراز را از مواد سازنده گیاهان به صورت عصاره های گیاهی در آن ها ارائه شد.

تالیک و همکاران در سال ۲۰۱۴ اثر مهاری عصاره برخی از گیاهان دارویی را بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مورد بررسی قرار دادند، و به این نتیجه رسیدند که عصاره متانولی گونه آرنیکا با IC_{50}=۷۵ میکروگرم بر میلی لیتر و عصاره آبی گونه ریو با IC_{50}=۵۵ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اثرات مهاری قوی بر آنزیم استیل کولین استراز هستند(۲۴). در گزارشی که در ایران توسط شکارچی و همکاران در سال ۲۰۱۳ ارائه شد ترکیبات نسبتاً غیرقطبی شامل سزکویی ترپن کومارین ها که ترکیبات شاخص در جنس فرولا می باشند به عنوان مهارکننده های موثر استیل کولین استراز معرفی شدند. آن ها عصاره های مختلفی در آب، متانول، اتیل استات، هگزان و کلروفرم از چند گونه این گیاه تهیه و در غلظت ۳۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر فعالیت آنزیم را به روش المن اندازه گیری کردند .در این گزارش فراکسیون کلروفرمی گونه فرولا پرسیکا با ۲۷/۳ درصد مهار فعال ترین مهارکننده نتیجه گیری شد. بنا بر این با توجه به خواص آنتی اکسیدانی و مهار برخی آنزیم ها به وسیله ترکیبات کومارینی آن ها

توانستند مهارکننده های استیل کولین استرازی جدیدی را معرفی کنند(۲۵). از طرفی در تحقیقی دیگر وزلاکی و همکاران در سال ۲۰۱۱ عصاره هگزانی و متانولی اندام های مختلف گونه سنبل ختایی را بر روی آنزیم های استیل کولین استراز و بوتیریل کولین استراز در غلظت های ۱۰۰ و ۴۰۰ میکروگرم در میلی لیتر اندازه گیری کردند. آن ها نتیجه گیری نمودند که ترکیبات کومارینی با اندازه بزرگتر مهارکننده های قوی برای آنزیم بوتیریل کولین استراز می باشند و مقدار IC_{50} را ۱۴/۴ و ۷/۵ میکرومولار برای دو ترکیب شاخص در عصاره ریشه و میوه این گیاه گزارش نمودند(۱۷).

نتایج این پروژه نشان داد که عصاره متانولی گیاه کوتکوته می تواند به عنوان یک محرک در سیستم اعصاب مرکزی در نظر گرفته شود در جایی که شامل مهار هیدرولیز استیل کولین یا به عبارت دیگر آنزیم استیل کولین استراز درگیر باشد. بنا بر این ترکیبات تشکیل دهنده عصاره گیاه کوتکوته به عنوان پیش ساز برای ساخت و توسعه داروهای مهارکننده استیل کولین استراز به پژوهشگران علاقه مند به این موضوع پیشنهاد می گردد.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه مازندران به خاطر حمایت های مالی در انجام این تحقیق تشکر و قدردانی می کنند.

کد اخلاق: IR.umz.rec 1397.090

References

1.Munoztorrero D. Acetylcholinesterase inhibitors as disease modifying therapies for Alzheimers disease. Curr Med Chem 2008; 15: 2433-55. doi: 10.2174/092986708785909067.

2.Askar KA, Kudi AC, Moody AJ. Purification of soluble acetyl choline esterase from sheep liver by affinity chromatography. Appl Biochem Biotech 2011; 165: 165-336. doi: 10.1007/s12010-011-9254-7.

3.Ellman GL, Courtney KD, Andres JRV, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetyl choline esterase activity. Biochem Pharmacol1961; 7: 88-95.

4.Assis CR, Castro PF, Amaral IP, Carvalho EV, Carvalho Jr LB, Bezerra RS. Characterization of acetylcholinesterase from the brain of the Amazonian tambaqui Colossoma macropomum and in vitro effect of organophosphorus and carbamate pesticides. Environ Toxicol Chem2010; 29: 2243-8.doi: 10.1002/etc.272.

5.Keane S, Ryan MF. Purification characterisation and inhibition by monoterpenes of acetylcholinesterase from the waxmoth, Galleria mellonella L. Insect Biochem Mole 1999; 29: 1097-104. doi:10.1016/s0965-1748(99)00088-0.

6. Lopez S, Bastida J, Viladomat F, Codina C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. Life Sci 2002; 11; 71: 2521-9. doi:10.1016/s0024-3205(02)02034-9.

7.Rhee IK, Van de Meent M, Ingkaninan K, Verpoorte R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. J Chromatogr 2001; 915: 217-23. doi: 10.1016/s0021-9673(01)00624-0

8.Alcoleapalafox M, Moreno P, Soriano I, Pachecocerro JL, Rincon C, Martinez D et al. Research strategies developed for the treatment of alzheimers disease. Dis Els 2014; 426-77.

9.Amessis N, Madani K, Fale PL, Serralheiro ML, Araujo ME. Antioxidant capacity and phenolic contents of some Mediterranean medicinal plants and their potential role in the inhibition of cyclooxygenase-1 and acetylcholinesterase activities. Ind Crop Prod 2014; 53: 6-15. doi; 10.1016/j.indcrop.2013.12.008.

10.Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. Curr Neuropharmacol2013; 11: 388-413. doi: 10.2174/1570159X11311040004

11. Nino J, Hernandez JA, Correa YM, Mosquera OM. In vitro inhibition of acetylcholinesterase by crude plant extracts from Colombian flora. Mem Ins Oswaldo

Cruz 2006; 101: 783-5. doi: 10.1590/S0074-02762006000700013.
12.Mahmoudvand M, Abbasipour H, Basij M, Hosseinpour MH, Rastegar F, Nasiri MB. Fumigant toxicity of some essential oils on adults of some stored product pests. Chil J Agr Res2011; 71: 83-09. doi: 10.4067/S0718-58392011000100010
13. Silman I, Sussman JL. Acetyl choline esterase how is structure related to function? Chem Biol Interact 2008; 175: 3-10. doi: 10.1016/j.cbi.2008.05.035.
14. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 1951; 193: 265-75.
15.Benabdallah A, Rahmoune C, Boumendjel M, Aissi O, Messaoud C. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild Mentha species Lamiaceaefrom northeast of Algeria. Asian Pac J Trop Biomed 2016; 6: 760-6. doi: 10.1016/j.apjtb.2016.06.016.
16.Heinrich M, Teoh HL. Galanthamine from snowdrop the development of a modern drug against Alzheimers disease from local Caucasian knowledge. J Ethnopharmacol 2004; 92: 147-62. doi: 10.1016/j.jep.2004.02.012
17. Wszelaki N, Paradowska K, Jamroz MK, Granica S, Kiss AK. Bioactivity guided fractionation for the butyrylcholinesterase inhibitory activity of furanocoumarins from Angelica archangelica L. roots and fruits. J Agric Food Chem 2011; 59: 9186-93. doi: 10.1021/jf201971s.
18. Roseiro LB, Rauter AP, Serralheiro ML. Polyphenols as acetyl cholin esterase inhibitors structural specificity and impact on human disease. Nutr Ag 2012; 1: 99-111. doi: 10.3233/NUA-2012-0006.
19.Kaya HB, Ozcan B, Şişecioglu M, Ozdemir H. Purification of acetyl choline esterase by 9-amino1 to 4 tetrahydroacridine from human erythrocytes. Appl Biochem Biotechnol 2013; 170: 198-209. Doi: 10.1007/s12010-013-0177-3
20. Son JY, Shin S, Choi KH, Park IK. Purification of soluble acetyl choline esterase from Japanese quail brain by affinity chromatography. Int J Biochem Cell Biol 2002; 34: 204-10. doi: 10.1016/s1357-2725(01)00082-6.
21.Wessler I, Michelschmidt R, Kirkpatrick CJ. PH dependent hydrolysis of acetylcholine Consequences for non-neuronal acetylcholine. Int Immunopharmacol2015; 29: 27-30. doi: 10.1016/j.intimp.2015.04.039.
22.Esmaeili S, Ara L, Hajimehdipoor H, Kolivand H, Mohammadimotamed S. Acetyl choline esterase inhibitory effects of some plants from Rosaceae. RJP 2015; 2: 33-7.
23. Sadighara P, Ashrafihelan J, Barin A, Esfahani T. Histopathology and cholinergic assessment of Pterocarya fraxinifolia on chicken embryo. Int Toxicol 2009; 2: 254-6. doi: 10.2478/v10102-009-0023-1
24.Talic S, Dragicevic I, Corajevic L, Martinovic A. Acetyl choline sterase and butyryl choline esterase inhibitory activity of extracts from medicinal plants. Bull Chem Technol Bosnia Herzegovina2014; 43: 11-4.
25.Shekarchi M, Hajimehdipoor H, Naghibi F, Ara L, Moazzenizahan H. Investigating acetyl cholinesterase inhibitory effects of some species of Ferula. J Med Plant 2013; 2: 106-112.

Evaluation of Kinetic Parameters of Acetylcholinesterase from the Bovine Brain and its Inhibition with Mentha pulegium L. Extract

Mohadjerani M[1], Rasulizadeh A[1]*

(Received: September 28, 2019 Accepted: November 11, 2019)

Abstract

Introduction: The function of acetylcholinesterase accelerates the acetylcholine hydrolysis process and protects the hemostasis of this neurotransmitter in the central nervous system and the peripheral tissues. Due to the fact that in diseases, such as Alzheimer's disease, the level of acetylcholine is reduced, the administration of acetylcholinesterase inhibitor drugs (AChEID) is one of the methods for preventing the progression of this disease. The majority of the researchers attempted to investigate drugs with lower side effects, especially from herbal sources. The aim of this study was to investigate the effect of methanol extract of Mentha pulegium leaves on the enzyme activity of AChE.

Materials & Methods: In this study the AChE enzyme was partially isolated from the bovine brain using homogenization, centrifugation, ammonium sulfate precipitation, and dialysis at 4 ºC. The rate of production of thiocholine from acetylthiocholine iodide was measured according to Ellman's method. Subsequently, the methanolic extract of Mentha pulegium leaves was prepared by the maceration method. Then the inhibitory effect of the extract on the AChE was measured. *Ethics code: IR.umz.rec 1397.090*

Findings: The total activity and specific activity of the partially purified AChE were determined as 1143.78 U and 4.10 U/mg, respectively. The optimum pH and temperature of the acetylcholinesterase were determined to be 7.5 and 45°C respectively. Moreover, the Km and Vmax of this enzyme were estimated at 6.49 mM and 59.88 mM/min.

Discussion & Conclusions: The results of this study showed that the methanolic extract with a concentration of 26.66 mg/ml had significant effect on the activity of this enzyme. According to the results, this extract can inhibit the AchE in form of mixed inhibition. Therefore, Mentha pulegium leaf could be considered by the researchers in study and investigation of pharmaceutics.

Keywords: Acetylcholinesterase, Mixed inhibition, Methanolic extract, Mentha pulegium L

1. Dept of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, University of Mazandaran, Babolsar, Iran
**Corresponding author Email:m.mohajerani@umz.ac.ir*