

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

مریم مهاجرانی^{۱*}، آرزو رسولی زاده^۱

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

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۸/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۷/۶

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 این پژوهش 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 پداید به روش المن اندازه گیری شد. در ادامه عصاره متانولی برگ گیاه کوتکوته به روش خیساندن تهیه گردید. سپس اثر مهارتی 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 1143.78 U و 4.10 U/mg تعیین شد. pH بهینه آنزیم 7.5 و دمای بهینه آن 45 درجه سانتی گراد به دست آورده شد. مقادیر K_m و V_{max} آنزیم به ترتیب برابر 6.49 میلی مولار و 59.88 میلی مولار بر دقیقه به دست آورده شد.

بحث و نتیجه گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره متانولی در غلظت 26.66 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، عضلانی، پلاسما 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 و اعمال فیزیولوژیک آن حداقل در عقده ها و اتصالات عصبی 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 گردد که سبب 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)، دونپیزیل (۵)، ریواستگمین (۶) و گالانتامین (۷) می باشند که همگی به دلیل عوارض جانبی شان استفاده از آن ها محدود شده اند (۴). اولین بار در سال ۲۰۰۰،

ریواستگمین 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 افزایش 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 کونولیزیدین و پیریدین 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 ترکیبات فنولی می - باشند (۹،۱۰).

تا کنون بر اساس تحقیقات انجام گرفته بر روی گونه های گیاهی مختلف محققین موفق به کشف مهارکننده های جدید برای 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 کوتکوتِه یا پونه معطر (*Mentha pulegium*) گونه ای از گیاهان گلدار از خانواده لمیاسه (*Lamiaceae*) یکی از گیاهانی است که اثرات بیولوژیکی فراوانی از آن گزارش گردیده است. این گیاه با نام خالواش در منطقه شرق گیلان در ایران شناخته شده تر است و عمدتاً به دلیل خواص ضد عفونی کننده، دافع حشرات، داروی ضد اسپاسم و ضد التهاب 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 کوتکوتِه یک کاندیدای ضد سرطان مناسب برای سلول های انسانی می باشد. جنس *Mentha* شامل ۲۵ تا ۳۱

سنتی برای تهوع، برونشیت، بی اشتها، کولیت اولسراتیو و بیماری های کبدی مورد استفاده قرار گرفته است. این گیاه سرشار از ترکیبات فنول و فلاونوئیدی است (شکل شماره ۱).



شکل شماره ۱. گیاه کوتکوته

گونه است که در سراسر جهان رشد می کند. شایع ترین گونه 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 استفاده می شود. علاوه بر این، به عنوان یک درمان

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 سانتی 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 مدت مخلوط با دور ۱۲۰۰۰ xg به مدت ۳۰ دقیقه 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

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 پذیرفته است، هدف این تحقیق 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 بنزوئیک اسید (DTNB)، بافر سدیم فسفات، گالاتامین، متانول، آمونیوم سولفات، کربنات سدیم، تارتاریک اسید، معرف فولین، سولفات مس، سرم آلبومین گاوی، بافر سترات-فسفات، بافر تریس، بافر گلايسين، 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 ظرف 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

۳ بار تکرار شد. برای محاسبه فعالیت کل آنزیم از معادله زیر استفاده شد (۳).

$$\text{فرمول ۱. } Total Activity = \Delta A \cdot Df / \epsilon \cdot y$$

در فرمول ۱، ΔA تغییرات جذب نوری واکنش آنزیم در دقیقه، V حجم مورد سنجش، Df فاکتور رقت، ϵ ضریب خاموشی DTNB، 0.136 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

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

تعیین pH بهینه: برای تعیین pH بهینه، فعالیت آنزیم در محدوده pH های ۴ تا ۱۱ اندازه گیری شد. بدین منظور در محدوده $pH=4-6$ از بافر سیترات-فسفات و در محدوده $pH=5-8$ از بافر سدیم فسفات و از تریس در محدوده $pH=9$ و از گلايسين-هیدروکسید سدیم در محدوده $pH=10$ و از بافر فسفات در محدوده $pH=11$ 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).

$$\text{فرمول ۳ } A = S/S_0 \times 100$$

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 0.03 مولار و $pH=7.5$ تهیه

گردید. در نهایت محلول رویی دور ریخته شد و رسوب ته نشین شده در لوله سانتریفیوژ در کمترین حجم ممکن از بافر فسفات 30 میلی مولار با $pH=7$ سوسپانسیون گردید. رسوب های 30 و 70 درصد حاوی آنزیم به کیسه های دیالیز انتقال یافتند، دو سر کیسه دیالیز گره زده شد و به مدت 48 ساعت در بافر سدیم فسفات (30 میلی مولار) در دمای 4 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 -80 درجه سانتی گراد نگهداری شد. فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در نمونه ها اندازه گیری شد (۱۳).

تعیین غلظت پروتئین: سنجش مقدار پروتئین 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 750 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 تخمین زده شد بدین منظور با استفاده از بافر سدیم فسفات، معرف رنگی دی تیویس نیترو دی بنزویک 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 412 نانومتر مقدار آن با دستگاه اسپکتروفوتومتر قابل اندازه گیری می باشد. بدین منظور بافر سدیم فسفات 0.03 مولار در pH برابر با 7 ، استیل تیوکولین یداید 75 میلی مولار (20 میکرولیتر)، معرف DTNB، 10 میلی مولار (20 میکرولیتر) و آنزیم (10 میکرولیتر) در کووت به حجم نهایی 3 میلی لیتر و جذب نوری در 412 نانومتر برای 5 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 غیر آنزیمی سوبسترا صرف نظر شد. تمام اندازه گیری ها

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

تهیه عصاره گیاه کوتکوتنه: گیاه کوتکوتنه 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 کوتکوتنه 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 دمای ۴۰ درجه سانتی گراد تغلیظ شده و تا قبل از استفاده در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

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 مغز با فعالیت ویژه ۱/۳۴ واحد در میلی گرم پروتئین 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 ۳۰-۷۰ درصد استفاده شد.

بررسی فعالیت استیل کولین استراز در مجاورت عصاره گیاه کوتکوتنه: ابتدا عصاره متانولی گیاه در غلظت های ۳/۳۳، ۶/۶۶ و ۱۳/۳۳ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. استیل تیو کولین یداید به عنوان سوبسترا در غلظت های ۵-۱۱۵ میلی مولار آماده گردید. در هر بار سنجش، در کووت از بافر سیترات/فسفات ۰/۰۳ مولار با pH ۷/۵ و ۲۰ میکرولیتر DTNB ۱۰ میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره متانولی و ۱۰

بررسی فعالیت استیل کولین استراز در مجاورت عصاره گیاه کوتکوتنه: ابتدا عصاره متانولی گیاه در غلظت های ۳/۳۳، ۶/۶۶ و ۱۳/۳۳ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شد. استیل تیو کولین یداید به عنوان سوبسترا در غلظت های ۵-۱۱۵ میلی مولار آماده گردید. در هر بار سنجش، در کووت از بافر سیترات/فسفات ۰/۰۳ مولار با pH ۷/۵ و ۲۰ میکرولیتر DTNB ۱۰ میلی مولار و ۲۰ میکرولیتر عصاره متانولی و ۱۰

جدول شماره ۱. مراحل تهیه عصاره آنزیمی

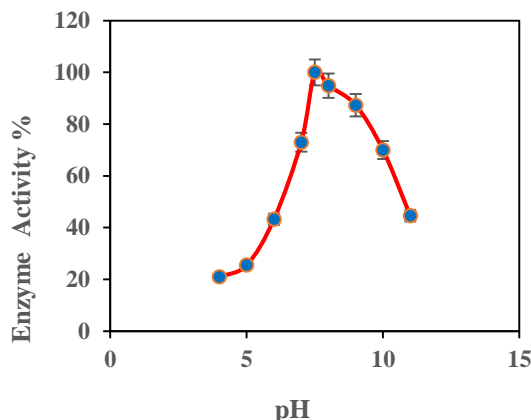
درجه خلوص	بازیابی فعالیت (%)	فعالیت ویژه [U/mg]	فعالیت [U/ml]	پروتئین تام [mg]	فعالیت تام (U)	حجم نمونه (ml)	خالص سازی نسبی
۱	۱۰۰	۱/۳۴	۱۸/۳۰	۷۰۷۸/۱۹	۹۵۲۰/۵۸	۵۲۰	عصاره خام
۳/۰۶	۱۲/۰۱	۴/۱۰	۳۸/۱۲	۲۷۸/۷	۱۱۴۳/۷۸	۳۰	رسوب ۷۰ درصد

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

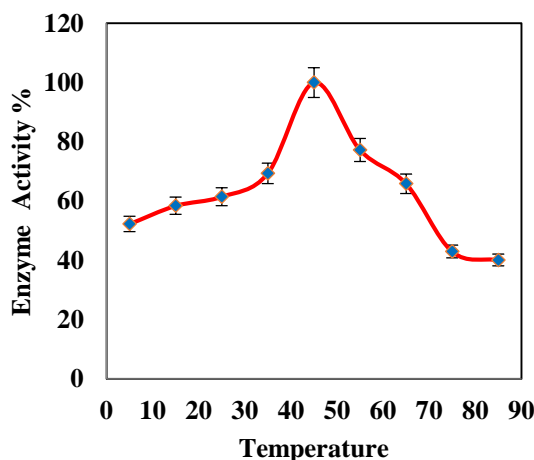
نتایج حاصل از اندازه گیری فعالیت آنزیم در pH های مختلف در شکل شماره ۲ نشان داده شده است با توجه به نتایج، پایداری این آنزیم تا حدود زیادی

به دست آمده در این بررسی آنزیم استیل کولین استراز در محدوده دمایی ۴۰ تا ۵۰ درجه سانتی گراد فعالیت بالایی را نشان می دهد. ولی بهترین دما برای بیشترین فعالیت آن ۴۵ درجه سانتی گراد به دست آورده شد.

بالایی دارد ولی بهترین pH برای فعالیت آن ۷/۵ است. 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



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

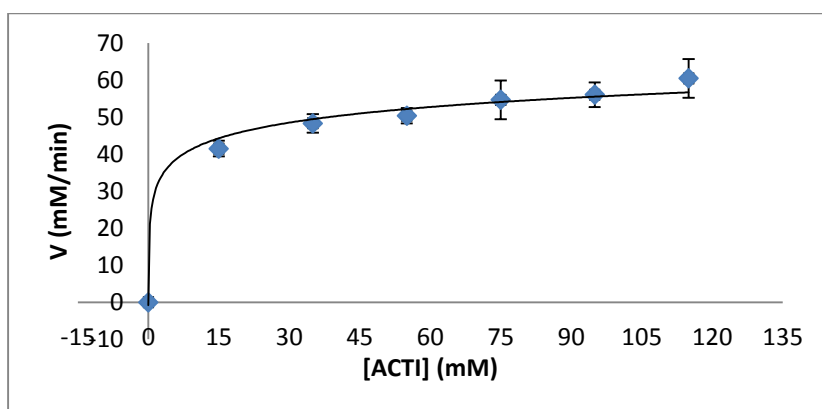
V_{max} به ترتیب ۸/۴۷ میلی مولار و ۴۲/۵۵ میلی مولار به دست آمد.

بررسی و اندازه گیری پارامترهای سینتیکی آنزیم جداسازی شده استیل کولین استراز، در مجاورت مقادیر مختلف عصاره متانولی کوتکوتنه، 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

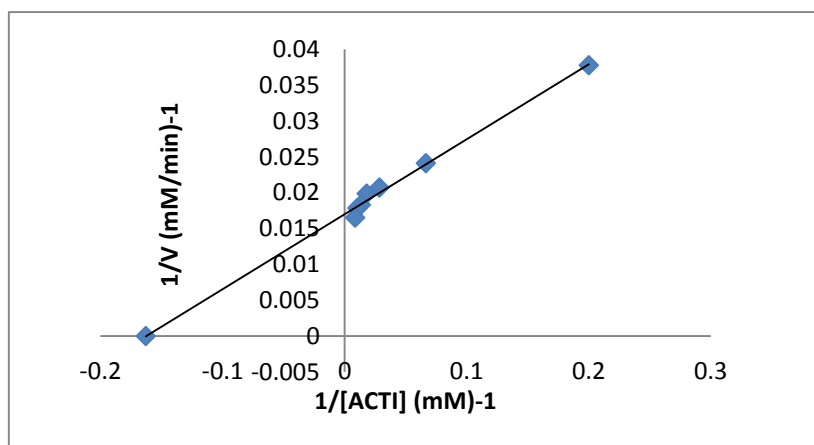
عصاره متانولی به دست آمده با راندمان ۱۳/۷۵ گرم در هر ۱۰۰ گرم از پودر گیاه در یخچال نگهداری گردید. بر طبق مطالعات قبلی عصاره متانولی گیاه کوتکوتنه غنی از ترکیب پالئگون(۶۵/۵۲ درصد) است که دارای فعالیت دفع حشرات و ضد درد و ضد التهاب است. هم چنین این گیاه سرشار از ترکیبات فنول و فلاوونوئیدی است که سبب اثر مهاری بر آنزیم استیل کولین استراز است. این عصاره در غلظت K_m ، ۲۶/۶۶ $\mu\text{g/ml}$ و

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 $K_i=31/8$ و ثابت تفکیک مهارکننده و کمپلکس آنزیم-سوبسترا $KI=53/6$ میلی مولار به دست آمده و از آن جا که KI بزرگ تر از K_i می باشد بنا بر این مهار مختلط به صورت رقابتی-غیر رقابتی است (شکل شماره ۹). به عنوان کنترل مثبت از ترکیب گالاتامین در غلظت $0/3 \mu\text{g/ml}$ 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 گالاتامین در (شکل شماره ۱۰) آورده شده است.

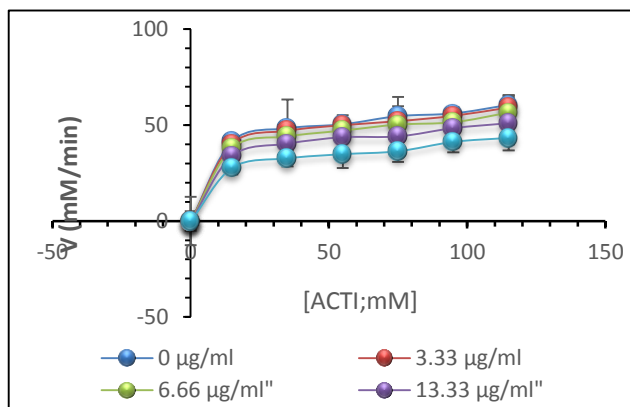
شماره ۴. نمودار میکانیلیس-متن فعالیت آنزیم استیل کولین استراز مغز گاو در غلظت های مختلف استیل تیوکولین یداید به عنوان سوبسترا (تمام اندازه گیری ها سه بار تکرار شد و مقادیر نشان داده شده انحراف معیار \pm مقدار میانگین می باشد).



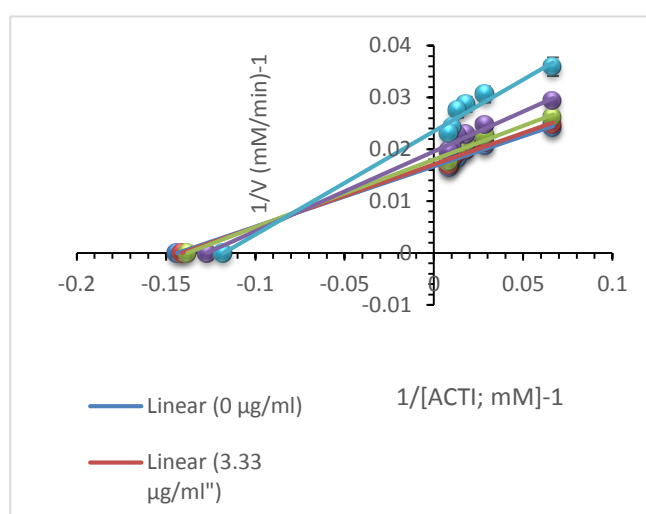
شکل شماره ۵. تغییرات معکوس سرعت واکنش استیل کولین استراز مغز گاو به معکوس غلظت های مختلف استیل تیوکولین یداید (نمودار لاینیور-برگ)



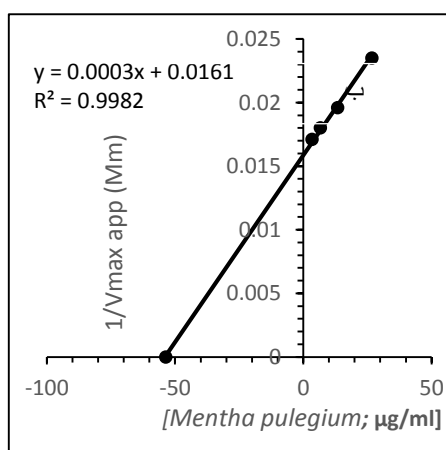
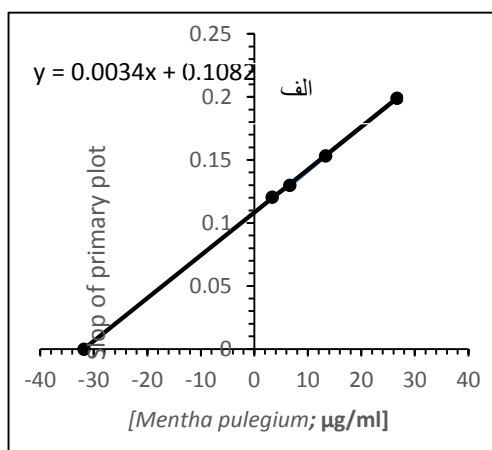
شکل شماره ۵. تغییرات معکوس سرعت واکنش استیل کولین استراز مغز گاو به معکوس غلظت های مختلف استیل تیوکولین یداید (نمودار لاینیور-برگ)



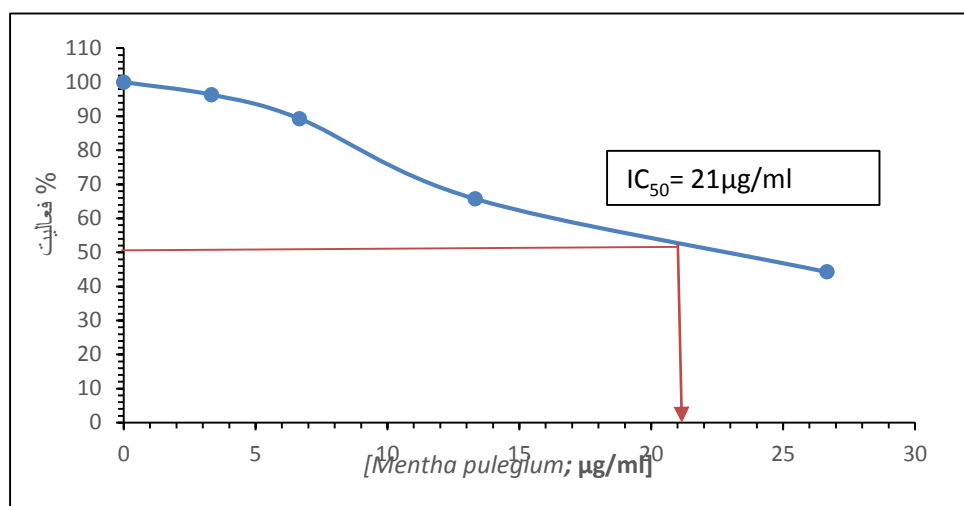
شکل شماره ۶. تغییرات سرعت واکنش کاتالیز شده با استیل کولین استراز در مجاورت غلظت های مختلف عصاره کوتکوته (نمودار میکائلیس-منتن). (تمام اندازه گیری ها سه بار تکرار شد و مقادیر نشان داده شده انحراف معیار \pm مقدار میانگین می باشد).



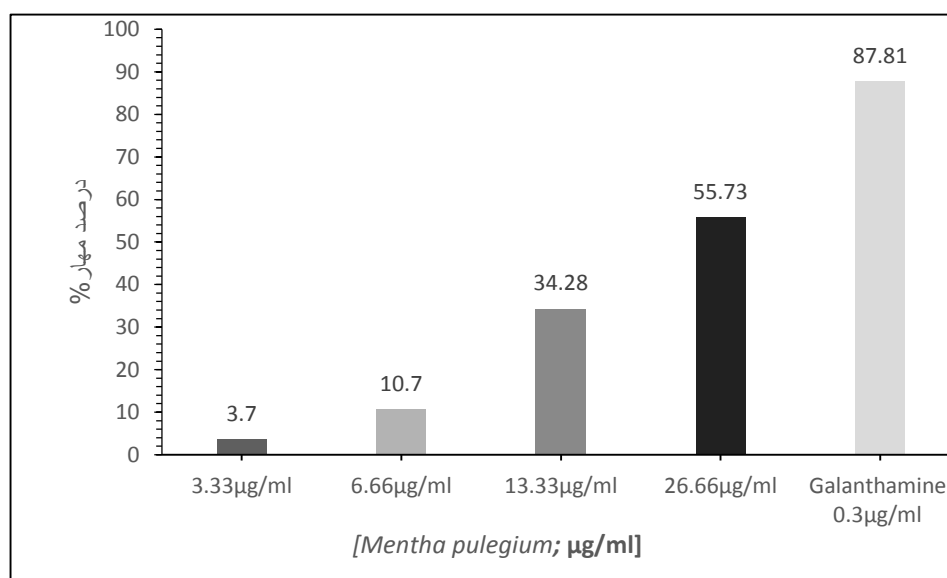
شکل شماره ۷. نمودار لینویر-برگ مهار آنزیم استیل کولین استراز در مقادیر مختلف عصاره کوتکوته



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 کونکوتیه. (فلش مقدار IC₅₀ را نشان می دهد)



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

انجام شد مشخص شد که این عصاره دارای خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز بوده و حدوداً یک چهارم قدرت مهارکنندگی گالاتامین برای آن اندازه گیری شد.

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 گالاتامین و عصاره متانولی برگ از گیاه کونکوتیه

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

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

بحث و نتیجه گیری

در تحقیقی که جهت یافتن ترکیبات غیر الکلوییدی 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 ادروفونوم-سفراروز

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 اسانسوی کوتکوتنه از نظر ترکیبات سازنده بررسی و ترکیب پولنگون 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 کوتکوتنه در ارتباط با محتوای فنولی، فلاونوئیدی و تانن در سال ۲۰۱۶ در الجزایر انجام شد. آن ها چند گونه از نواعیان 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.

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 دناتورده شدن آنزیم در نظر گرفت چون از آن جا که با دناتورده 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 میکائیلوس منتن تبعیت می کند لذا نمودار معکوس دوتایی لینیور برک رسم گردید تا با دقت زیاد مقادیر ثابت سرعت ماکزیمم و نیز مقدار ثابت میکائیلوس 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 مهاره 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 $IC_{50}=75$ میکروگرم بر میلی لیتر و عصاره آبی گونه ریو با $IC_{50}=55$ میکروگرم بر میلی لیتر دارای اثرات مهاره 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 سزکوییترین 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

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 کوتکوتنه 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

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 کوتکوتنه می تواند به عنوان یک محرک در سیستم

References

- Munoztorrero D. Acetylcholinesterase inhibitors as disease modifying therapies for Alzheimers disease. *Curr Med Chem* 2008; 15: 2433-55. doi: 10.2174/092986708785909067.
- 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.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres JRV, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetyl choline esterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961; 7: 88-95.
- 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 Chem* 2010; 29: 2243-8. doi: 10.1002/etc.272.
- 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.
- 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.
- 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
- 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.
- 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.
- Murray AP, Faraoni MB, Castro MJ, Alza NP, Cavallaro V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. *Curr Neuropharmacol* 2013; 11: 388-413. doi: 10.2174/1570159X11311040004
- 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 Res* 2011; 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 Lamiaceae from 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-amino 1 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 Immunopharmacol* 2015; 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 Herzegovina* 2014; 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 A¹

(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 °C. 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 pharmaceuticals.

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