بررسی فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استرازی روغن ثابت و روغن فرار میوۀ گیاه برگ بو

علی‌محمد رنجبر[الف*]، ناهید حاجی‌محمدی[ب]، علیرضا مرادی[ج]، حمید ندری[د]، وحید رمضانی[هـ]، احمد مصدق[و]، مینو برومند[ز]

[الف] استادیار، گروه فارماکوگنوزی دانشکدۀ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران. مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

[ب] دکترای عمومی داروسازی، گروه فارماکوگنوزی دانشکدۀ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

[ج] استادیار، گروه شیمی دارویی دانشکدۀ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

[د] دانشیار، گروه شیمی دارویی دانشکدۀ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

[هـ] استادیار، گروه فارماسیوتیکس دانشکدۀ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

[و] مربی، گروه میکروبیولوژی دانشکدۀ پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

[ز] دکترای عمومی داروسازی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران

چکیده

سابقه و هدف: بیماری آلزایمر از مهم‌ترین انواع دمانس مغزی در بین افراد مسن است که در آن قدرت شناخت و حافظه فرد تحت تأثیر قرار می‌گیرد. تاکنون درمان‌های متنوعی برای بهبود و کند کردن روند بیماری آلزایمر پیشنهاد شده است که بیشتر بر مبنای مهار آنزیم استیل کولین استراز در مغز بوده‌اند. مطابق منابع طب سنتی، گیاه برگ بو دارای یک نقش مهم در تقویت ذهن و حافظه است. هدف مطالعۀ کنونی، تعیین فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استرازی روغن ثابت و روغن فرار میوۀ گیاه برگ بو است.

مواد و روش‌ها: تحقیق به روش تجربی انجام شده است. به این روش که میوه‌های گیاه برگ بو بعد از جمع‌آوری، خشک شده و با روش سوکسله و با استفاده از حلال n- هگزان عصاره‌گیری شدند. در نهایت به کمک روش Ellman فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استراز روغن ثابت و فرار میوه گیاه برگ بو مورد بررسی قرار گرفت و درصد مهار مورد مقایسه و تحلیل قرار گرفت.

یافته‌ها: روغن ثابت با غلظت ۱/۳۵ mg.mL-1 آنزیم استیل کولین استراز را ۲/۴ ± ۳۴/۳۳ درصد مهار و روغن فرار با غلظت ۱/۸ µg.mL-1 آنزیم را به میزان ۵۰ درصد مهار کرد.

بحث و نتیجه‌گیری: باتوجه به نتایج حاصل از این تحقیق، یکی از شیوه‌های احتمالی تأثیر میوۀ گیاه برگ بو در تقویت ذهن و حافظه می‌تواند به علت فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استرازی اسانس و روغن ثابت میوۀ گیاه باشد.

کلیدواژه‌ها: آلزایمر، استیل کولین استراز، برگ بو.

تاریخ دریافت: اسفند ۹۶
تاریخ پذیرش: فروردین ۹۷

مقدمه:

بیماری آلزایمر یک اختلال عصبی مزمن و پیش‌رونده است که در ۹۵ درصد موارد غیر ژنتیکی است (۱). این بیماری قدرت شناخت و رفتار فرد را تحت تأثیر قرار می‌دهد و به‌عنوان یک اختلال شناختی یا حافظه مطرح است (۲). ایجاد این بیماری را به عامل‌های گوناگون از جمله تجمع پلاک‌های بتا آمیلوئید، از بین رفتن نورون‌های کولینرژیک، التهاب، فعال‌سازی میکروگلیا و پاتولوژی پروتئین Tau نسبت می‌دهند (۱). از مهم‌ترین انواع دمانس مغزی در بین افراد مسن بیماری آلزایمر است که این بیماری ۷۰-۶۰ درصد کل بیماری‌های زوال عقل را شامل می‌شود. طبق آمار سازمان جهانی بهداشت، مشکلات شناختی و حافظه در بین افراد مسن به‌سرعت در

* فرد مسئول مکاتبات: amranjbar@alumnus.tums.ac.ir

حال پیشرفت است، به طوری که تعداد کل افرادی که در جهان دچار فراموشی هستند در سال ۲۰۱۰ حدود ۳۵/۶ میلیون نفر تخمین زده شده و هر ۲۰ سال دو برابر می‌شود؛ تا سال ۲۰۳۰، ۶۵/۷ میلیون و در سال ۲۰۵۰، ۱۱۵/۴ میلیون نفر به این بیماری مبتلا خواهند شد. تعداد کل افراد جدیدی که هر سال به این بیماری مبتلا می‌شوند معادل ۷/۷ میلیون نفر است، به عبارت دیگر هر ۴ ثانیه یک نفر به این بیماری مبتلا می‌شود. هزینهٔ کلی این بیماری در سال ۲۰۱۰، ۶۰۴ بیلیون دلار آمریکا، تخمین زده شده است (۳). بنابراین باتوجه به شیوع بالا و هزینه‌های زیاد این بیماری پیدا کردن راهی برای کاهش سرعت روند پیشرفت آن که به تنهایی و یا به‌صورت کمکی بتواند باعث بهبود بیماران و عوارض ناشی از بیماری شود بسیار حائز اهمیت خواهد بود. تاکنون درمان‌های متنوعی برای بهبود و کند کردن روند بیماری آلزایمر پیشنهاد شده است که بیشتر بر مبنای مهار آنزیم استیل کولین استراز در مغز بوده‌اند. این ترکیبات با مهار استیل کولین استراز میزان دسترسی به استیل کولین را در رسپتورهای مغز، افزایش می‌دهند، در نتیجه انتقال بین سیناپسی راحت‌تر انجام می‌شود و به‌تبع آن عملکرد شناختی فرد بهبود می‌یابد. دونپزیل و تاکرین، ۲ نمونه از داروهای سنتتیک هستند که می‌توانند استیل کولین استراز را مهار کرده و در کند کردن روند بیماری آلزایمر مؤثر واقع شوند. گالانتامین وهوپرزین، نمونه‌هایی از آلکالوئیدهای گیاهی هستند که در فارماکولوژی مورد استفاده قرار می‌گیرند (۴). آنتاگونیست‌های رسپتور N- متیل دی آسپارتات (NMDA) نیز از جملهٔ داروهایی هستند که در بیماری آلزایمر مورد تأیید هستند (۵). پژوهشگران همواره در تلاش‌اند تا به درمان‌های جدید، با عوارض کمتر برای بیماری آلزایمر دست یابند؛ در راستای این هدف گیاهان از جمله منابعی هستند که اواخر مورد توجه زیادی قرار گرفته‌اند. گیاهانی از جمله Sage Ginko, balmLemon (۶), Cinnamon (۷) , Curcumin (۸) از گیاهان دارویی هستند که اثرات آن‌ها در درمان بیماری آلزایمر تأیید شده است.

گیاه برگ بو متعلق به خانوادهٔ لوراسه یا برگ بو است. گیاهان این تیره به صورت‌های مختلف درخت، درختچه و به ندرت علفی وجود دارند و مخصوص نواحی گرمسیری کرهٔ زمین هستند. برگ بو بومی مدیترانهٔ جنوبی و اروپای جنوبی است و در نواحی شمالی ایران نیز کشت می‌شود. در گذشته برگ گیاه برگ بو به‌عنوان معرق و رفع نزله مورد استفاده بوده است و امروزه به‌عنوان چاشنی غذا و جهت معطر ساختن کنسروها به‌کار می‌رود. همچنین برگ‌ها اثرات بادشکن، قی‌آور، مدر، ضد تشنج و قاعده‌آور دارند. میوهٔ گیاه به‌صورت خشک‌شده برای رفع کم‌اشتهایی و ضعف معده مورد مصرف است. اسانس گیاه در پیچ‌خوردگی مفاصل، بواسیر و رفع دردهای روماتیسمی مصرف دارد (۹). تاکنون پژوهش‌های زیادی بر روی بخش‌های مختلف در زمینهٔ بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و آنتی پرولیفراتیو اسانس دانه و برگ (۱۰)، اثرات آنتی‌باکتریال اسانس، روغن ثابت و عصارهٔ کلروفرمی دانه (۱۱)، اثر محافظت‌کنندگی از دستگاه گوارش دانه (۱۲)، فعالیت سایتوتوکسیسیتی اسانس برگ و میوه (۱۳)، اثرات ضد التهابی و ضد دردی اسانس برگ (۱۴) و فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استراز عصارهٔ برگ (۱۵) این صورت گرفته است. مطابق با منابع طب سنتی، مدارکی وجود دارد که نشان می‌دهد گیاه برگ بو دارای یک نقش مهم در تقویت ذهن و حافظه است و همچنین در درمان بیماری‌های بلغمی مغز و بافت‌های عصبی به‌کار می‌رود. باتوجه به این اثرات، به‌عنوان یک کاندیدای‌احتمالی‌در درمان بیماری آلزایمر مطرح می‌شود (۱۶).

هدف مطالعهٔ کنونی، بررسی فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استرازی روغن ثابت و روغن فرار میوهٔ گیاه برگ بو است.

مواد و روش‌ها:

نموهٔ میوهٔ رسیدهٔ گیاه برگ بو در ماه مهر سال ۱۳۹۳ از درختان موجود در شهر اصفهان جمع‌آوری شد. برای جلوگیری از فساد نمونه، نمونه‌ها در شرایط آزمایشگاهی خشک شدند. دو نمونه از سرشاخه‌های گیاه حاوی میوه به هرباریوم دانشکدهٔ داروسازی شهید صدوقی یزد منتقل و نام علمی و اصالت آن تعیین شد و کد هرباریومی گرفت.

تهیهٔ روغن ثابت و روغن فرار:

قبل از استخراج روغن ثابت و روغن فرار، میوه‌های گیاه توسط هاون نیم‌کوب شدند. مقدار ۱۰۰ گرم از نمونهٔ نیم‌کوب شده با روش سوکسله و با استفاده از حلال n- هگزان به مدت ۸ ساعت عصاره‌گیری شد. حلال به‌وسیلهٔ دستگاه تقطیر در خلأ پرانده شد و در نهایت درصد روغن به‌دست آمده محاسبه شد. برای تهیهٔ روغن فرار، مقدار ۵۰ گرم از پودر نمونه به‌مدت ۶ ساعت با استفاده از دستگاه اسانس‌گیری مدل BP (Clevenger) اسانس‌گیری شد و برای حذف آب اضافی همراه اسانس مقدار کمی سدیم سولفات به آن افزوده شد که تمام آب اسانس را به خود جذب کرد و اسانس خالص به‌دست آمد. اسانس به‌دست آمده توزین و درصد اسانس گیاه محاسبه شد. اسانس و روغن ثابت تهیه شده درون ویال درپوش‌دار قرار گرفتند و برای محافظت در برابر نور به دور ویال فویل آلومینیومی پیچیده شد و در نهایت تا شروع انجام تست آنزیمی در یخچال نگهداری شدند.

روش Ellman به‌منظور بررسی فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استراز:

اساس این روش به این صورت است که در اثر واکنش آنزیم استیل کولین استراز با سوبسترای خود (استیل تیو کولین) تیوکولین تولید می‌شود، این ماده به محض تولید با ۵- دی تیو بیس- ۲- نیتروبنزوئیک اسید واکنش می‌دهد و یک آنیون زرد رنگ به اسم ۵- تیو- ۲ – نیتروبنزوات تولید می‌کند. با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۴۱۲ نانومتر، سرعت تولید رنگ اندازه‌گیری می‌شود (۱۷).

در ابتدا، از روغن ثابت استوک با غلظت mg.mL-1 ۹۰ و از روغن فرار استوک با غلظت mg.mL-1 ۴۴، ساخته شد. از استوک رقت‌های متعدد تهیه شد و تست مهار آنزیم بر روی آن‌ها صورت گرفت؛ به‌طوری که درصد مهار بین ۲۰ تا ۸۰ درصد به‌دست آید. بر روی هر غلظت ۳ بار آزمایش انجام شد و سپس میانگین درصد مهار برای هر غلظت محاسبه و با استفاده از منحنی Dose/Response، IC50 محاسبه شد.

قبل از شروع انجام آزمایش، آنزیم از فریزر خارج و در دمای اتاق ذوب شد و سپس تمامی محلول‌های مورد نیاز به‌وسیلهٔ حمام آب به دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد رسیدند.

۳۰۰۰ میکرولیتر بافر فسفات (۰/۱ مولار، PH= ۸)، ۱۰۰ میکرولیتر محلول DTNB (۰/۰۱ مولار)، ۷۰ میکرولیتر محلول آنزیم با غلظت ۲/۵ واحد در میلی لیتر و ۵۰ میکرولیتر محلول جسم به لولهٔ آزمایش منتقل شد و در دمای ۲۵ درجهٔ سانتی‌گراد و در ۴۱۰ دور در دقیقه، به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. سپس ۱۰ میکرولیتر محلول استیل تیوکولین یدید (۰/۰۷۵ مولار) به لولهٔ آزمایش افزوده شد و به مدت ۵ ثانیه هم زده شد و در نهایت میزان جذب در طول موج ۴۱۲ نانومتر به مدت ۶ دقیقه اندازه‌گیری و سرعت به‌دست آمده توسط دستگاه خوانده و درصد مهار آنزیم محاسبه شد.

یافته‌ها:

میزان رطوبت، درصد اسانس و درصد روغن ثابت میوهٔ گیاه

برگ بو بـه ترتیـب ۷/۲۲ درصـد، (mL/g) ۰/۶۹۲ درصـد و (g/g)۱۴/۴ درصد به‌دست آمد. آزمـایش مهـار آنـزیم اسـتیل کولین استراز بر روی روغن ثابت و روغن فرار میوهٔ گیاه بـرگ بو انجام شد. روغن ثابت اثر مهـاری اسـتیل کـولین اسـتراز در غلظت mg.mL-1 ۱/۳۵ برابر با ۲/۴ ± ۳۴/۳۳ درصد داشت، در حالی که روغن فرار با غلظت μg.mL-1 ۱/۸ آنـزیم را بـه میزان ۵۰ درصد مهـار کـرد (IC50=۱/۸ ± ۰/۴ μg.mL-1). تسـت مهـار آنـزیم اسـتیل کـولین اسـتراز بـر روی غلظـت ۱μg.mL روغن ثابت و روغن فرار انجام شد. روغن ثابت در این غلظت آنزیم استیل کـولین اسـتراز را ۲۷ درصـد و همـین غلظت از روغن فرار آنزیم را ۴۲ درصد مهار کرد.

بحث و نتیجه‌گیری:

تحقیق حاضر نشان داد که روغن ثابـت اسـتخراج شـده از میوهٔ گیاه در غلظت mg.mL-1 ۱/۳۵ بـه میـزان کـم فعالیـت مهارکنندگی استیل کولین اسـتراز را از خـود نشـان داد (۳۴/۳۳ درصـد)، امکـان انجـام آزمـایش بـا غلظـت‌هـای بـالاتر و محاسبهٔIC50، به علـت تشـکیل رسـوب وجـود نداشـت، در حالی که اثر مهارکنندگی استیل کـولین اسـتراز روغـن فـرار آن قوی‌تر بود (IC50.=۱/۸ ± ۰/۴ μg.mL-1)

ترکیبات آلفا پینن، بتـا پیـنن، ۱و۸ سـینئول، متیـل اوژنـول، کامفن، بتا کوبنن و لینالول فعالیت مهارکننـدگی اسـتیل کـولین استراز دارند (۲۱)، مطابق با مطالعات قبـل اسـانس میـوه گیـاه برگ بو دارای ترکیبـات ذکـر شـده اسـت (۲۲). بنـابراین ایـن فعالیت مهارکنندگی می‌تواند به‌علت حضور ترکیبات ذکر شـده در گیاه برگ بو باشد.

در این مطالعه، روغن ثابت گیاه با روش سوکسله استخراج شد که ممکن است حرارت به‌کار رفته در این روش منجـر بـه تخریب روغن شده باشد و اگر روغـن بـا روش دیگـری مثـل cold press استخراج شود این امکـان وجـود دارد کـه نتیجـهٔ بهتری حاصل شود. از طرفی احتمال اینکه مقداری از اثر روغن ثابت مربوط به روغن فرار استخراج شده بـه همـراه آن باشـد، وجود دارد. فرکشن‌هـای دیگـر میـوهٔ گیـاه نیـز ممکـن اسـت اثرمهارکنندگی استیل کـولین اسـترازی داشـته باشـند. فعالیـت مهارکنندگی استیل کولین استرازی برگ گیـاه بـرگ بـو قبـل از ایـن بررسـی شـده اسـت؛ A. Ferreira و همکـاران، در مطالعه‌ای به بررسی فعالیت مهارکنندگی استیل کولین اسـترازی چندین گونهٔ گیاهی پرداختند که گیاه برگ بو نیـز از جملـه آن گیاهان بود. در این مطالعه، اسانس و عصارهٔ اتانولی برگ گیـاه برگ بو مورد ارزیابی قرار گرفـت کـه هـر دو عصـاره فعالیـت مهارکنندگی خوبی از خود نشان دادنـد (متوسـط رو بـه بـالا). اسانس با غلظت mg.mL-1 ۰/۵ آنزیم را ۱/۷± ۵۱/۳ درصـد و عصارهٔ اتانولی با غلظت‌هـای mg.mL-1 ۰/۵ و ۱ آنـزیم را به ترتیب ۶/۹ ± ۴۸/۴ درصد و ۹ ± ۶۴/۳ درصد مهار کردنـد. در این مطالعه برگ بو اثر آنتی‌اکسیدانی و مهارکننـدگی اسـتیل کولین استراز خوبی از خود نشان داد و پیشنهاد شد که می‌تواند در جلوگیری از بیماری آلزایمر و یا بهبود علائم آن مؤثر باشـد (۱۵). در مقایسه با مطالعهٔ کنونی روغن ثابـت و اسـانس میـوه نسبت به اسانس و عصاره متانولی برگ گیاه برگ بـو، فعالیـت مهارکنندگی بسیار قوی‌تری داشتند، بنابراین در درمـان آلزایمـر از اهمیت بیشتری برخوردار هستند. طبـق بررسـی‌هـای انجـام شده مطالعهٔ دیگری در خصـوص مهارکننـدگی اسـتیل کـولین استرازی بر روی ایـن گیـاه صـورت نگرفتـه اسـت کـه نتـایج به‌دست آمده نیاز به بررسی‌های بیشتر در این زمینـه را تقویـت می‌کند.

مکانیسم دیگری که تأثیر گیاه برگ بو را در تقویت ذهـن و حافظه توجیه می‌کند خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه است. باتوجـه به این کـه اسـترس اکسـیداتیو، یـک فـاکتور مهـم در پـاتوژنز بیماری آلزایمر است و یک نقش مرکزی در تشکیل پروتئین بتا

آمیلوئید و آپوپتوز عصبی دارد، بنابراین گیاهان دارویی که اثر آنتی‌اکسیدانی دارند می‌توانند در بهبود بیماری آلزایمر مؤثر باشند (۲). در مطالعه‌ای Pacifico S و همکاران فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصارهٔ الکلی برگ گیاه برگ بو را مورد ارزیابی قرار دادند (۲۳)، همچنین چندین مطالعهٔ دیگر نیز وجود دارد که در آن‌ها اثر آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های مختلف برگ و میوهٔ برگ بو اثبات شده است (۲۴، ۲۵). از آنجا که التهاب نیز در روند ایجاد بیماری آلزایمر نقش پاتوژنز دارد (۱) و گیاه برگ بو به‌علت داشتن ترکیبات Costunolide و Dehydrocostuslactone دارای اثرات ضد التهابی نیز هست (۲۶)، اثر ضدالتهابی گیاه برگ بو در چندین مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفته است (۱۴، ۲۷). در نتیجه ممکن است نقش گیاه برگ بو در تقویت ذهن و حافظه به‌علت اثرات آنتی‌اکسیدانی و یا ضد التهابی آن نیز باشد. برای به‌دست آوردن نتایج قابل استناد، به مطالعات بیشتری در این زمینه نیاز هست.

باتوجه به شیوع بالا و هزینه‌های زیاد مربوط به بیماری آلزایمر (۳)، و نقش مهارکنندگان آنزیم استیل کولین استراز در کند کردن روند پیشرفت این بیماری (۴)، یافتن داروهای جدید با فعالیت مهارکنندگی این آنزیم جهت درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری آلزایمر اهمیت ویژه‌ای دارد. امروزه ترکیبات گیاهی به علت کمتر بودن عوارض جانبی، تداخلات دارویی و سهولت دسترسی، مورد توجه بسیاری از پژوهشگران قرار گرفته‌اند. گیاه برگ بو از جمله گیاهان دارویی مورد مصرف در طب سنتی است که اثرات درمانی مختلف آن مورد بررسی قرار گرفته است. مطابق با منابع طب سنتی این گیاه در تقویت ذهن و حافظه نقش بسزایی دارد بنابراین به‌عنوان کاندیدای احتمالی جهت درمان بیماری آلزایمر مطرح است (۱۶). در این تحقیق اثر مهارکنندگی استیل‌کولین استرازی روغن ثابت و روغن فرار میوهٔ گیاه برگ بو، با استفاده از روش Ellman بررسی شده است که روشی دارای اعتبار و در دسترس است (۱۷) و در مطالعات زیادی جهت بررسی فعالیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸-۲۰).

باتوجه به نتایج حاصل از این تحقیق، روغن فرار و روغن ثابت میوهٔ گیاه برگ بو فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استرازی خوبی از خود نشان دادند. باتوجه به نقش آنزیم استیل کولین استرازدر روند ایجاد بیماری آلزایمر(۲۸) می‌توان تأثیر گیاه برگ بو در تقویت ذهن و حافظه را به علت فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استرازی اسانس و روغن ثابت میوهٔ گیاه نسبت داد. اثبات اینکه این اثرات مشاهده شده دقیقاً مربوط به کدام ترکیب اسانس و روغن ثابت است نیاز به جداسازی اجزای تشکیل دهندهٔ عصاره‌ها و بررسی فعالیت مهارکنندگی استیل کولین استرازی آن‌ها دارد.

References:

1. Humpel C. Chronic mild cerebrovascular dysfunction as a cause for Alzheimer's disease?. Experimental Gerontology. 2011 Apr 1;46(4):225-32.
2. Yankner BA. Mechanisms of neuronal degeneration in Alzheimer's disease. Neuron. 1996 May 1;16(5):921-32.
3. Available from: https://www.who.int/mental_health/publications/appendix_dementia_report.pdf. Accessed March 10,2013
4. Pohanka M. Inhibitors of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase meet immunity. International Journal of Molecular Sciences. 2014 Jun;15(6):9809-25.
5. Joshi YB, Praticò D. The 5-lipoxygenase pathway: oxidative and inflammatory contributions to the Alzheimer's disease phenotype. Frontiers in Cellular Neuroscience. 2015 Jan 14;8:436.
6. Santos-Neto LL, de Vilhena Toledo MA, Medeiros-Souza P, de Souza GA. The use of herbal medicine in Alzheimer's disease—a systematic review. Evidence-Based Complementary and Alternative Edicine. 2006;3(4):441-5.
7. Shaltiel-Karyo R, Davidi D, Frenkel-Pinter M, Ovadia M, Segal D, Gazit E. Differential inhibition of α-synuclein oligomeric and fibrillar assembly in parkinson's disease model by cinnamon extract. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 2012 Oct 1;1820(10):1628-35.
8. Pandey N, Strider J, Nolan WC, Yan SX, Galvin JE. Curcumin inhibits aggregation of α-synuclein. Acta Neuropathologica. 2008 Apr 1;115(4):479-89
9. Zargari A. Medicinal Plants. 7th ed. Tehran:University of Tehran Press; 1810/4. vol. 4. p:240-3.
10. Saab AM, Tundis R, Loizzo MR, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R, Menichini F, Esseily F, Menichini F. Antioxidant and antiproliferative activity of Laurus nobilis L.(Lauraceae) leaves and seeds essential oils against K562 human chronic myelogenous leukaemia cells. Natural Product Research. 2012 Sep 1;26(18):1741-5.
11. Ozcan B, Esen M, Sangun MK, Coleri A, Caliskan M. Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of Laurus nobilis seed oil. Journal of Environmental Biology. 2010 Sep 1;31(5):637-41.
12. Afifi FU, Khalil E, Tamimi SO, Disi A. Evaluation of the gastroprotective effect of Laurus nobilis seeds on ethanol induced gastric ulcer in rats. Journal of Ethnopharmacology. 1997 Sep 1;58(1):9-14.
13. Loizzo MR, Tundis R, Menichini F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Cytotoxic activity of essential oils from Labiatae and Lauraceae families against in vitro human tumor models. Anticancer Research. 2007 Sep 1;27(5A):3293-9.
14. Sayyah M, Saroukhani G, Peirovi A, Kamalinejad M. Analgesic and anti-inflammatory activity of the leaf essential oil of Laurus nobilis Linn. Phytotherapy Research. 2003 Aug;17(7):733-6.
15. Ferreira A, Proença C, Serralheiro ML, Araujo ME. The in vitro screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Portugal. Journal of Ethnopharmacology. 2006 Nov 3;108(1):31-7.
16. Aghili Khorasani MH. *makhzan al-Advieh*. ed by: MR shams ardekani, R rahimi, F farjadmand. Tehran: Tehran Univercity of Medical Sciences; 1389. p:178-80.
17. Ellman GL, Courtney KD, Andres Jr V, Featherstone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology. 1961 Jul 1;7(2):88-95.
18. Adewusi EA, Moodley N, Steenkamp V. Medicinal plants with cholinesterase inhibitory activity: a review. African Journal of Biotechnology. 2010;9(49):8257-76.
19. Szwajgier D, Borowiec K. Screening for cholinesterase inhibitors in selected fruits and vegetables. Ejpau. 2012 Jun 25;15(2):06.

20. Nadri H, Pirali-Hamedani M, Moradi A, Sakhteman A, Vahidi A, Sheibani V, Asadipour A, Hosseinzadeh N, Abdollahi M, Shafiee A, Foroumadi A. 5, 6-Dimethoxybenzofuran-3-one derivatives: a novel series of dual Acetylcholinesterase/Butyrylcholinesterase inhibitors bearing benzyl pyridinium moiety. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences. 2013 Dec;21(1):15
21. Kang JS, Kim E, Lee SH, Park IK. Inhibition of acetylcholinesterases of the pinewood nematode, Bursaphelenchus xylophilus, by phytochemicals from plant essential oils. Pesticide Biochemistry and physiology. 2013 Jan 1;105(1):50-6.
22. Marzouki H, Piras A, Marongiu B, Rosa A, Dessi M. Extraction and separation of volatile and fixed oils from berries of Laurus nobilis L. by supercritical CO2. Molecules. 2008;13(8):1702-11.
23. Pacifico S, Gallicchio M, Lorenz P, Duckstein SM, Potenza N, Galasso S, Marciano S, Fiorentino A, Stintzing FC, Monaco P. Neuroprotective potential of Laurus nobilis antioxidant polyphenol-enriched leaf extracts. Chemical Research in Toxicology. 2014 Feb 27;27(4):611-26.
24. Ouchikh O, Chahed T, Ksouri R, Taarit MB, Faleh H, Abdelly C, Kchouk ME, Marzouk B. The effects of extraction method on the measured tocopherol level and antioxidant activity of L. nobilis vegetative organs. Journal of Food Composition and Analysis. 2011 Feb 1;24(1):103-10.
25. Simić M, Kundaković T, Kovačević N. Preliminary assay on the antioxidative activity of Laurus nobilis extracts. Fitoterapia. 2003 Sep 1;74(6):613-6.
26. Lin X, Peng Z, Su C. Potential anti-cancer activities and mechanisms of costunolide and dehydrocostuslactone. International Journal of Molecular Sciences. 2015 May;16(5):10888-906.
27. Kaileh M, Berghe WV, Boone E, Essawi T, Haegeman G. Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity. Journal of Ethnopharmacology. 2007 Sep 25;113(3):510-6.
28. Giacobini E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. Neurochemical Research. 2003 Apr 1;28(3-4):515-22.