

## مقایسه اثرات مهارکنندگی دو داروی فیزوستیگمین و پروکائین بر روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز

نویسندگان: غلامعلی نادری<sup>۱\*</sup>، الیاس امیرمحسنی<sup>۲</sup>، اشکان سنایی راد<sup>۳</sup>، الهام زاهدی<sup>۳</sup>

۱. دانشیار گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران.
۲. دانش آموخته پزشکی، دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۳. دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده پزشکی دانشگاه شاهد، تهران، ایران.

E-mail: naderi@shahed.ac.ir

\* نویسنده مسئول: غلامعلی نادری

### چکیده

مقدمه و هدف: آنزیم استیل کولین استراز (AChE) آنزیمی است که هیدرولیز سوبسترای استیل کولین را بر عهده دارد و از نظر ساختمانی به صورت واحدهای مونومر، دی و تترامر دیده می شود. هدف، بررسی و مقایسه اثر مهارتی دو داروی فیزوستیگمین و پروکائین هیدروکلراید در *in vitro* بود.

مواد و روش ها: در این تحقیق، میزان مهارکنندگی این آنزیم توسط دو داروی فیزوستیگمین و پروکائین هیدروکلراید در *in vitro* بررسی و مورد مقایسه قرار گرفت. میزان فعالیت آنزیم، طبق روش المن در حضور و عدم حضور غلظت های مختلف داروها اندازه گرفته شد و درصد مهارکنندگی داروها به دست آمد.

نتایج: مقادیر  $K_m$  و  $V_{max}$  آنزیم با سوبسترای استیل تیوکولین، به ترتیب برابر  $0/11$  و  $52/63 \mu M/ml/mg$  میلی مولار به دست آمد.  $Ic_{50}$  برای داروهای پروکائین فیزوستیگمین به ترتیب برابر  $0/0004$  و  $0/175$  میلی مولار تعیین شد که نشان دهنده قدرت بالای مهارکنندگی داروی فیزوستیگمین نسبت به پروکائین می باشد. همچنین پارامترهای کینتیکی آنزیم شامل  $K_m$  در حضور پروکائین و فیزوستیگمین به ترتیب برابر  $0/62$  و  $2/22$  میلی مولار به دست آمد.  $V_{max}$  آنزیم نیز در حضور داروها و در عدم حضور داروها یکسان بود.

نتیجه گیری: نتایج، نشان دهنده قدرت بالای مهارکنندگی داروی فیزوستیگمین نسبت به پروکائین می باشد. همچنین این دو دارو به عنوان مهارکننده های رقابتی آنزیم استیل کولین استراز معرفی می شوند.

واژگان کلیدی: استیل کولین استراز، مهارکنندگی، فیزوستیگمین، پروکائین

دوماهنامه علمی-پژوهشی  
دانشگاه شاهد  
سال بیست و سوم-شماره ۱۲۲  
اردیبهشت ۱۳۹۵

دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۰۴  
آخرین اصلاح ها: ۱۳۹۵/۰۱/۱۸  
پذیرش: ۱۳۹۵/۰۱/۲۵

## مقدمه

کولینرژیک همراه است و دارو باید دارای خصوصیت کوتاه‌اثر بودن باشد تا بیمار دچار اختلالات ناشی از تحریک بیش از حد سیستم کولینرژیک نگردد (۱۱،۱۰). اغلب این داروها برای درمان بیماری‌هایی مانند گلوکوم و احتباس ادرار پس از جراحی به کار می‌روند (۱۲). انواع آنتی کولین استراژهای برگشت‌پذیر با اثر کوتاه مثل ادروفونیوم (با نام تجاری Tensilon) و متوسط‌الاثرا مانند فیزیوتیگمین می‌باشند (۱۳). فیزیوتیگمین (اسرین) یک مونومیتیل کاربامات است که اولین بار به‌عنوان داروی درمان گلوکوم توسط لاکور به کار برده شد؛ زیرا که این دارو عامل تنگ‌کننده مردمک چشم یا میوتیک چشم می‌باشد. فیزیوتیگمین یک آمین سه‌تایی است که به‌آسانی از دستگاه گوارشی، غشاهای مخاطی و زیر جلد جذب شده و از سد خونی مغزی عبور می‌کند. پروکائین نیز به‌عنوان داروی ضد آریتمی بطنی و نیز یک بی‌حس‌کننده موضعی محسوب می‌شود. باتوجه‌به دانستن اثرات مهارتی این دو ترکیب دارویی بر روی آنزیم استیل کولین استراز و مقایسه این اثرات، یک پزشک متخصص در هنگام درمان بیماری‌های مورد اشاره مانند گلوکوم و احتباس ادرار پس از جراحی و درمان مصدومین شیمیایی در کنترل عوارض جانبی درمان بیماران، می‌تواند از اطلاعات به‌دست‌آمده این تحقیق نیز در کنار سایر اطلاعات استفاده نماید. از طرف دیگر، مهارکننده‌های این آنزیم نیز در درمان و پیشگیری بیماری آلزایمر بسیار مهم می‌باشند که هر دوی این موارد کاربردی به‌عنوان کار جدید درمانی محسوب می‌شوند.

## مواد و روش‌ها

اندازه‌گیری فعالیت آنزیم AchE (روش المن) ابتدا محلولی با حجم ۰/۲ ml از آنزیم با فعالیت ویژه ۷۰ Cμ/min/mg و ۵۲/۶ از بافر فسفات سدیم ۷۰ میلی‌مولار (pH=۷/۰، ۴/۸) تهیه نموده و به آن ۰/۱ ml از معرف DTNB با غلظت ۲ میلی‌مولار اضافه می‌کنیم،

آنزیم استیل کولین استراز (EC 3.1.1.7) (AChE). اولین بار توسط David nachmanson در سال ۱۹۵۴ کشف شد (۱). استیل کولین استراز یک آنزیم ضروری در سیستم عصبی می‌باشد که باعث هیدرولیز سریع میانجی عصبی استیل کولین (Ach) می‌شود. این آنزیم در مغز پستانداران وجود دارد و بیش از ۸۰ درصد آن به‌صورت محلول پاک‌کننده می‌باشد. استیل کولین استراز در بافت‌های عصبی و عضلانی از تعدادی آنزیم‌های هم‌خانواده تشکیل یافته است که به‌صورت‌های مونومر، دایمر و تترامر و کمپلکس‌های غیرمتقارن می‌باشد که شبیه مولکول‌های کلاژن، کمپلکسی با ساختمان‌های مختلف را تشکیل می‌دهد (۲). اغلب اطلاعات به‌دست‌آمده در مورد این آنزیم، شامل استیل کولین استراژهای تخلیص‌شده از ماراهای الکتریکی، موش، خرگوش و مرغ می‌باشند (۳). عمل استیل کولین استراز در مواضع سیناپسی توسط داروهای آنتی‌کولینرژیک مهار می‌شوند. شناسایی اثر مهارشوندگی استیل کولین استراز در برابر گروهی از مهارکننده‌ها، انجام شده است (۴)؛ ولی از آنجاکه امروزه بسیاری از راه‌های درمانی بیماری‌های شناخته‌شده مانند بیماری‌های آلزایمر (۵)، گلوکوم، بیماری هانتینگتون و بیماری میاستنی گراویس را از منشأ تأثیر مهارشوندگی آنزیم استیل کولین استراژی دانند (۶) و فیزیوتیگمین و پروکائین به‌عنوان داروی ضد آریتمی‌های بطنی و فوق بطنی استفاده می‌گردد. لذا این دو دارو برای بررسی مقایسه مهار آنزیم فوق، انتخاب گردیده‌اند (۷). مهار آنزیم منجر به تجمع استیل کولین در قسمت‌های مختلف بدن شده و می‌تواند نتایج وخیمی را دربرداشته باشد؛ زیرا که استیل کولین نقش بسیار مهمی را به‌عنوان یک ماده هدایت‌کننده جریان عصبی در اعصاب کنترل‌کننده عضلات مخطط و صاف و عضله قلب و غده‌ها ایفا می‌نماید (۸،۹). در این راستا، مصرف ترکیبات مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز به‌عنوان دارو، در مواردی رخ می‌دهد که بدن با کاهش فعالیت

تعیین فعالیت آنزیم: میزان فعالیت آنزیم، طبق روش المن اندازه‌گیری شد. فعالیت ویژه آنزیم طبق فرمول زیر نیز محاسبه شد:

$$Rate = \frac{\Delta A \times V}{1.36 \times 10^{-2}} \times \frac{1}{Y} \text{ (nmole/min/ml)}$$

$\Delta A$  تغییرات جذب نوری در یک دقیقه است. C غلظت آنزیم برحسب میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (mg/ml) و Y حجم آنزیم مورد استفاده برحسب میلی‌لیتر، همچنین ضریب خاموشی یا Extinction coefficient برای محلول آنیون رنگی یک مولار برابر است با  $\frac{1.36 \times 10^{-2}}{V}$  که در آن V حجم کووت یا سل (cuvete or cell) می‌باشد. در این آزمایش، مقدار  $Y: 0.2 \text{ ml}$  و  $V: 3 \text{ ml}$  می‌باشد. فعالیت ویژه آنزیم در مراحل مختلف تأثیر مهارکنندگی داروها برحسب میکرومول بر دقیقه برای یک میلی‌گرم پروتئین محاسبه می‌گردد.

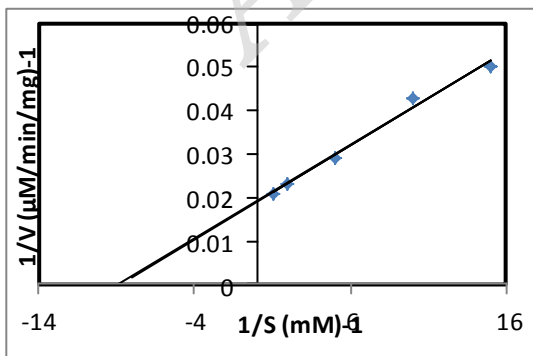
#### نتایج

تعیین ثابت‌های کینیتیکی آنزیم AChE ( $k_m, v_{max}$ ) جهت محاسبه  $v_{max}$  آنزیم  $K_m$  احتیاج به غلظت‌های مختلف سوبسترای استیل تیوکولین AChE می‌باشد. به‌همین دلیل، شش غلظت از سوبسترا انتخاب شد. طبق (نمودار ۱) مقادیر  $K_m$  آنزیم کنترل  $v_{max}$  شامل مقادیر زیر می‌باشند:

$$\frac{1}{v} = \frac{k_m}{v_{max} [s]} + \frac{1}{v_{max}}$$

$$v_{max} = 52/1 (\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg})$$

$$k_m = 0/11 (\text{mM})$$



نمودار ۱. منحنی لینووربرگ: محاسبه سرعت ماکزیمم و ثابت میکائیلیس - منتون آنزیم استیل کولین استراز بدون مهارکننده

سپس بلافاصله سوبسترای استیل کولین را به میزان ۴۰ میکرولیتر با غلظت‌های مختلف (۰/۸، ۰/۲، ۰/۴، ۰/۶، ۱/۰، ۳/۲۰ میلی‌مولار) به آن افزوده و پس از افزودن سوبسترا، تغییرات جذب نوری را برحسب دقیقه در طول موج ماکزیمم ۴۱۲ نانومتر در دستگاه اسپکتوفتومتر قرائت می‌کنیم. مدت زمان جذب نمونه‌ها ۲۰ دقیقه می‌باشد. نمونه شاهد دارای ۲/۹ ml از بافر فسفات و ۰/۱ ml از ماده رنگی DTNB و ۴۰ میکرولیتر از سوبسترا می‌باشد (روش المن) (۱۴).

$$\text{فعالیت مخصوص} = \frac{\text{سرعت واکنش آنزیمی}}{\text{مقدار پروتئین}} \mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$$

جهت اندازه‌گیری  $k_m$  و  $v_{max}$  سایر نمونه‌های آنزیمی پس از رقیق نمودن نمونه، طبق روش المن سرعت هیدرولیز سوبسترا را در غلظت‌های مختلف با رسم نمودار  $\frac{1}{v}$  برحسب  $\frac{1}{s}$  به دست می‌آوریم.

#### تعیین بهترین غلظت مهارکنندگی

باتوجه به خلوص بالای داروها، لازم است غلظتی از دارو را که ماکزیمم مهار آنزیم را انجام می‌دهد انتخاب نمود. برای بررسی درصد مهارشوندگی آنزیم، از فرمول زیر استفاده می‌شود. (زمان مهارکنندگی ۳۰ دقیقه و دما  $37^\circ\text{C}$  و  $\text{pH}=8$ )

$$\text{inhibition}\% = \frac{v_{\text{control}} - v_{\text{inh}}}{v_{\text{control}}} \times 100$$

#### روش کار

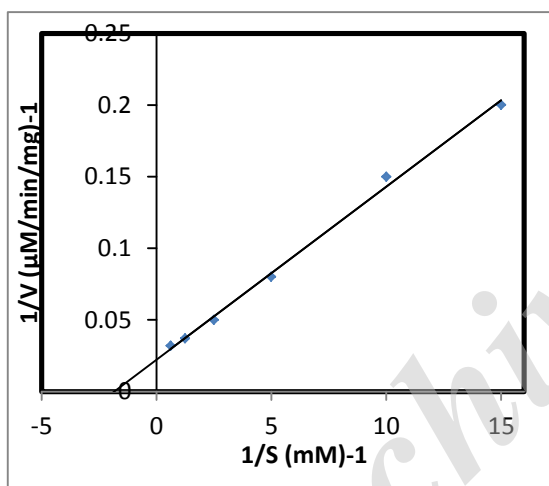
ابتدا غلظت‌های ۰/۰۳، ۰/۰۶، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱/۰ میلی‌مولار از داروی پروکائین و غلظت‌های  $10^{-4}$ ،  $2 \times 10^{-4}$ ،  $1 \times 10^{-5}$ ،  $5 \times 10^{-5}$ ،  $2/5 \times 10^{-5}$  میلی‌مولار از داروی فیزوستیگمین را در بافر تریس  $\text{pH}=7/25$ ، ۴ ml تهیه نموده و ۴۰ میکرولیتر از هر نمونه را به یک میلی‌لیتر از آنزیم رقیق شده اضافه می‌کنیم و اجازه می‌دهیم تا محلول، ۳۰ دقیقه در دمای  $37^\circ\text{C}$  انکوبه شود؛ سپس فعالیت آنزیم را در حضور غلظت‌های مختلف داروها اندازه گرفته و درصد مهارکنندگی داروها را به دست می‌آوریم.

تعیین بهترین غلظت مهارکنندگی داروی هیدروکلراید پروکائین

برای این کار از غلظت‌های مختلف پروکائین شامل ۰/۳ الی ۱ میلی‌مولار استفاده کردیم و مقادیر سرعت هیدرولیز سوپسترا را برای آنزیم محاسبه و درصد مهارکنندگی دارو را به دست آوردیم. غلظت ۰/۵ میلی‌مولار دارو، دارای اثر مهارکنندگی ماکزیم تعیین گردید.

تعیین  $k_i$  و slope پروکائین

این دارو با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار بر روی آنزیم استیل کولین استراز با غلظت‌های مختلف سوپسترا (ATC) اثر داده شد و  $k_i$  و واکنش براساس نمودار و معادلات مربوطه به دست آمد (نمودار ۳).



نمودار ۳. منحنی لاینوربرگ: محاسبه سرعت ماکزیم و ثابت میکائیلیس - منتون استیل کولین استراز در حضور ۵۰۰ میکرومول مهارکننده پروکائین و سوپسترای استیل کولین با غلظت‌های (۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲ میلی‌مولار)

$$\frac{-1}{k_m} = -\frac{1}{k_m(1+\frac{[I]}{k_i})} = -1/61 \text{ [I]} = 0/5 \text{ mM}$$

$$\rightarrow k_i = 0/108 \text{ mM}$$

برای تعیین  $IC_{50}$  داروها از معادلات درصد مهارکنندگی برحسب غلظت‌های مهارکننده استفاده شد که براساس (نمودارهای ۴ و ۵) میزان  $IC_{50}$  دو داروی فیزوستیگمین و پروکائین به ترتیب برابر  $4 \times 10^{-5}$  و  $0/175$  میلی‌مولار تعیین شد (جدول ۱).

بررسی اثر مهارکنندگی داروها بر روی آنزیم AchE در این قسمت، از دو داروی پروکائین و فیزوستیگمین برای بررسی اثرات مهارکنندگی آنزیم استفاده شد. هر کدام از داروها که  $K_m$  را بیشتر افزایش دهند، دارای اثرات مهارکنندگی قوی‌تری است. نتایج نشان می‌دهد این دو دارو جزء مهارکننده‌های رقابتی آنزیم استیل کولین استراز محسوب می‌شوند؛ زیرا دارای  $V_{max}$  یکسان، ولی  $K_m$  متفاوت نسبت به آنزیم در حالت کنترل می‌باشند (جدول ۱). در ضمن، هر چه شیب خط (slope) نیز بزرگ‌تر باشد، خاصیت مهارکنندگی قوی‌تر است.

تعیین بهترین غلظت مهارکنندگی داروی فیزوستیگمین

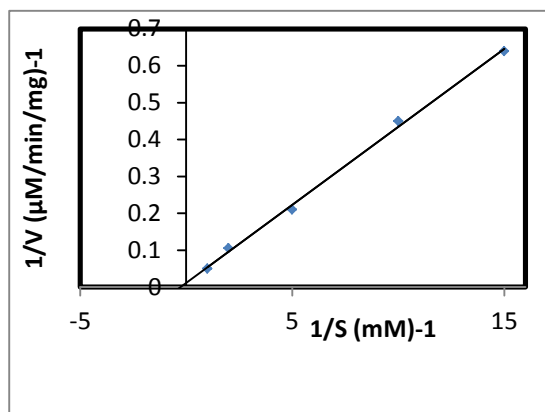
برای این کار از غلظت‌های  $10^{-5} \times (0/62 \text{ الی } 40)$  میلی‌مولار فیزوستیگمین استفاده شد و سرعت هیدرولیز سوپسترا را برای آنزیم محاسبه و درصد مهارکنندگی دارو را به دست آوردیم که غلظت  $20 \times 10^{-5}$  میلی‌مولار با اثر مهاری ۹۰ درصد بهترین غلظت مهارکنندگی فیزوستیگمین تعیین گردید.

تعیین  $k_i$  و slope فیزوستیگمین

داروی فیزوستیگمین با غلظت  $20 \times 10^{-5}$  میلی‌مولار به روی آنزیم استیل کولین استراز با غلظت‌های مختلف سوپسترا (ATC) اثر داده شد و  $k_i$  آن براساس نمودار و معادلات، در زیر به دست آمد (نمودار ۲).

$$-\frac{1}{k_m} = -\frac{1}{k_m(1+\frac{[I]}{k_i})} = -0/45 \text{ [I]} = 20 \times 10^{-5} \text{ mM}$$

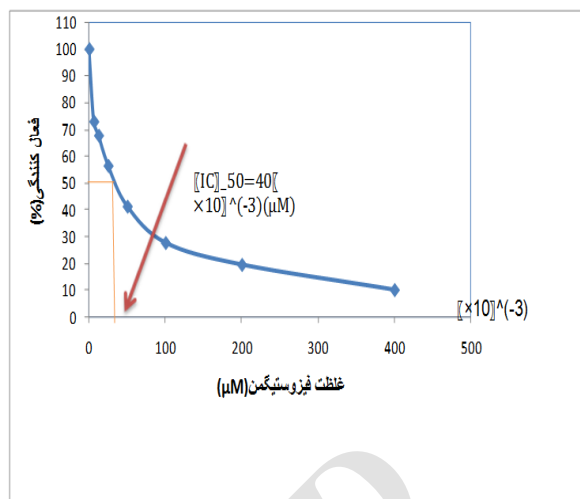
$$\rightarrow k_i = 1/04 \times 10^{-5} \text{ mM}$$



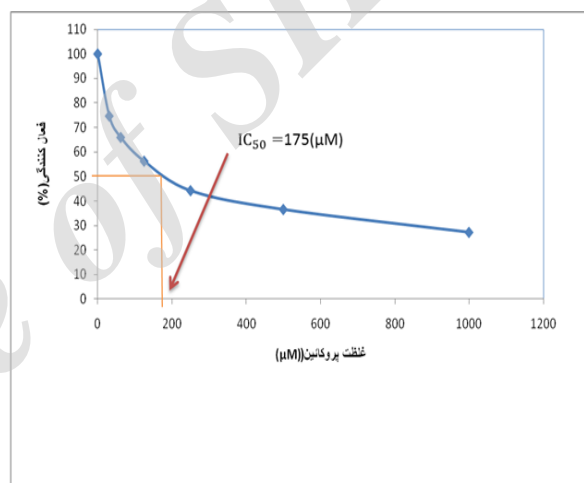
نمودار ۲. منحنی لاینوربرگ: محاسبه سرعت ماکزیم و ثابت میکائیلیس - منتون استیل کولین استراز در حضور ۲۰ میکرومول مهارکننده فیزوستیگمین و سوپسترای استیل کولین با غلظت‌های (۰/۲، ۰/۴، ۰/۸، ۱/۶، ۳/۲ میلی‌مولار)

در مقابل فعالیت کاتالیزوری آنزیم‌ها ایجاد نمایند. بسیاری از ترکیبات مهارکننده به‌عنوان دارو یا سموم حشره‌کش (ارگانوفسفاتها) مورد استفاده قرار می‌گیرند. بعضی از این داروها را برای درمان دسته‌ای از این بیماری‌ها به‌کار می‌برند. در این تحقیق از داروی فیزوستیگمین (ضد آرتیمی بطنی) و پروکائین (یک بی‌حس‌کننده موضعی) استفاده شد. این داروها روی آنزیم AchE مغز گاو اثر داده شده و مشاهده گردید که اثر مهارکنندگی فیزوستیگمین خیلی بیشتر از پروکائین می‌باشد (۷،۸،۹).

نتایج این تحقیق نشان داد،  $k_m$  فیزوستیگمین و پروکائین و نیز در حالت کنترل به‌ترتیب ۰/۱۱/۲، ۰/۶۲/۲۲ میلی‌مولار می‌باشند که نشان‌دهنده قوی‌تر بودن اثر مهار فیزوستیگمین بر روی آنزیم استیل کولین استراز می‌باشد؛ چرا که هر مقدار  $k_m$  آنزیم در حضور مهارکننده‌ها بیشتر افزایش پیدا کند، نشان‌دهنده قوی‌تر بودن قدرت مهارکننده است. ضمناً شیب خط نیز در حضور داروی فیزوستیگمین بیشتر از پروکائین و آن نیز بیشتر از حالت کنترل می‌باشد. در بررسی‌های دیگران که در مورد تأثیر پروکائین بر روی آنزیم استیل کولین استراز اریتروسیت‌ها انجام شده، نشان می‌دهد که  $k_m$  آنزیم در حضور مهارکننده پروکائین برابر ۰/۶۲ میلی‌مولار می‌باشد که حدوداً نزدیک به نتیجه به‌دست آمده این تحقیق می‌باشد. یکی دیگر از راه‌های تشخیص قدرت مهارکنندگی، محاسبه  $k_i$  مهارکننده‌ها می‌باشد که از روی  $k_m$  آنزیم در حضور مهارکننده‌ها به‌راحتی قابل محاسبه است که در این مورد  $k_i$  فیزوستیگمین (۴- $10 \times 10^{-4}$  میلی‌مولار) کمتر از  $k_i$  پروکائین (۸/۱ میلی‌مولار) به‌دست آمد. در این تحقیق،  $IC_{50}$  فیزوستیگمین برابر ۵- $10 \times 5$  میلی‌مولار و برای پروکائین هیدروکلراید برابر با ۰/۱۷۵ میلی‌مولار به‌دست آمد که خیلی نزدیک به نتایج حاصل از کارهای دیگران می‌باشد؛ به‌طوری‌که  $IC_{50}$  فیزوستیگمین خون خوکچه هندی، کورتکس و اریتروسیت مغز موش و اریتروسیت انسان، به‌ترتیب برابر ۰/۶۸، ۰/۰۶۳، ۰/۰۴، ۰/۲۷



نمودار ۴. اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده فیزوستیگمین بر روی آنزیم استیل کولین استراز (محاسبه  $IC_{50}$  مهارکننده).



نمودار ۵. اثر غلظت‌های مختلف مهارکننده پروکائین بر روی آنزیم استیل کولین استراز (محاسبه  $IC_{50}$  مهارکننده).

## بحث

استیل کولین استراز (AchE, EC3.1.1.7) یک آنزیم ضروری در سیستم اعصاب بوده و نقش فیزیولوژیکی مهمی را در سیناپس‌های کولینرژیک از طریق هیدرولیز سریع میانجی استیل کولین برای انتقالات شیمیایی ایفا می‌نماید. مطالعه بر روی آنزیم استیل کولین استراز در مغز گوساله، اولین بار در سال ۱۹۶۶ توسط R.L.Jackson و M.H.Aprison در گروه بیوشیمی دانشگاه هند انجام گرفته است (۱،۲).

برخی از ترکیبات شیمیایی قادرند با عوامل شیمیایی موجود در جایگاه فعال آنزیم یا کوآنزیم و یا یون‌های فعال‌کننده آنزیم ترکیب گردیده و بدین ترتیب، سدی را

## نتیجه گیری

مجموعه نتایج این مطالعه نشان دادند که این دو دارو از نوع مهارکننده‌های رقابتی آنزیم می‌باشند و  $v_{max}$  آنزیم نیز در حضور این دو دارو و حالت کنترل یکسان بوده و برابر با  $52/63 \text{ uM/min/mg}$  می‌باشد. همچنین داروی فیزوستیگمین نسبت به پروکائین دارای قدرت بالای مهارکنندگی می‌باشد.

میکرومولار گزارش شده است. همچنین  $IC_{50}$  پروکائین هیدروکلراید برای آنزیم استیل کولین استراز مغز انسان و مغز خوک به ترتیب برابر  $0/4$  و  $0/38$  میلی‌مولار و برای سم مار کبری  $0/194$  میلی‌مولار گزارش گردیده است (۳،۴).

جدول ۱. فاکتورهای سینتیکی آنزیم آستیل کولین استراز، با و بدون مهارکننده

Km (mM)	Vmax ( $\frac{\text{U mole}}{\text{min/mg}}$ )	Ki (uM)	IC50 (uM)	نوع مهارکننده	غلظت مهارکننده (uM)	نام ترکیب
0/11	52/63	-	-	-	0	نرمال
2/22	52/63	0/0104	0/04	رقابتی	0/2	فیزوستیگمین
0/62	52/63	108	175	رقابتی	500	پروکائین

## منابع

1. Iiao J, Boschetti N, Mortensen V, Jensen SP, Koch C, Norgaard-pedersen B. and Brodbeck U. characterization of salt-soluble forms of acetylcholinesterase from bovine brain. *Journal of Neurochemistry*. 1994;63(4):1446-1453
2. Carrol RT, Grimm JL, Hepburn TW, Emmerling M R. Purification of acetylcholinesterase by tacrine affinity chromatography. *Protein Expression and Purification*. 1995;6:389-393
3. Snaz P, Vincent M C, Diaz D, Repetto M, Repetto J. Red blood cell and Total blood acetylcholinesterase and plasma pseudo cholinesterase in observed variances. *Journal of Clinical Toxicology*. 1991;29(1):81-90
4. Oveysi Y. Pharmacology of neural system drugs, Medical publication of the Year, 1370; 54-66.
5. Tabet N. Acetylcholinesterase inhibitors for Alzheimer's Disease: Anti-inflammatories in acetylcholine clothing. *Age and Ageing*. 2006; 35 (4):336 - 8
6. Johannsen P. Medical treatment of Alzheimer's Disease, *Ugeskrift for Laeger* 2006; 168(40):3424-3429
7. Duhaiman AS, Alhomida AS, Rabbani N, Kamal MA, Aljafari AA Purification and characterization of acetylcholinestrace from desert cobra venom. *Biochime*. 1996;77:46-50
8. Association As. Alzheimer's Disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2010 ; 6(2): 158-94.
9. Hebert L, Scherr P, Bienias J, Bennett D, Evans D. Alzheimer Disease in the US population: prevalence estimates using the 2000 census. *Archives of Neurology*. 2003;60(8):1119-22.
10. Tabet N, Mantle D, Orrel M. Free radicals as mediators of toxicity in Alzheimer's Disease . A review and hypothesis. *Adverse drug reactions and toxicological reviews*. 2000; 19:127-52
11. Glode TE. Disease modifying therapy for AD. *Journal of Neurochemistry* . 2006 ; 99(3) : 689-707
12. Parihar M S, Hemneni T. Alzheimer Disease pathogenesis and therapeutic interventions. *Journal of Clinical Neuroscience*. 2004; 11(5): 456-67.
13. Oveysi Y . CNS Drugs Pharmacology. Tehran: Iran; 1991.
14. Ellman G L, Courthey K D, Andres V, Featherstone A M. A new and rapid Colorimic determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*. 1961;(7):88-95.