

Design, Synthesis and Characterization of Superparamagnetic Nanoparticles Conjugated with 2-Pyridinium Aldoxime as Potential Antidotes of Nerve Agents

Sajjad Jamshidi¹, Mohammad Hadi Baghersad^{1*}

¹ Applied Biotechnology Research Center, Baqiyatallah University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received: 10 June 2024 Accepted: 6 August 2024

Abstract

Background and Aim: Organophosphate compounds, including nerve agents, pesticides, chemical agent analogs, and Novichok, pose a serious health hazard to humans. Their use against humans was banned by 192 countries in 1993 under the Chemical Weapons Convention. The toxic effects of these compounds involve the phosphorylation and subsequent inhibition of the enzyme acetylcholinesterase, leading to the accumulation of acetylcholine in the synapses of the central and peripheral nervous systems, resulting in neurotoxic poisoning symptoms. The drugs used to treat this poisoning are compounds that can cross the blood-brain barrier by a maximum of 10% and therefore do not effectively detoxify the central nervous system. This research aims to design and synthesize a superparamagnetic nano-reactivator to activate the inhibited enzyme in the central nervous system.

Methods: In this study, iron oxide nanoparticles conjugated with 2-pyridinium aldoxime were designed and synthesized in four steps. The characteristics of the nanoparticles were determined by infrared spectroscopy, energy-dispersive X-ray spectroscopy (EDS), elemental analysis, dynamic light scattering (DLS), and electron microscopy (SEM). Their activation effect was compared with pralidoxime, a commercially available drug, using the Ellman method *in vitro*.

Results: The results of the Ellman method showed that the percentage of activation of the paraoxon-inhibited enzyme by pralidoxime as a commercially available antidote and the synthesized nanoparticles at a concentration of 5 mM over 30 minutes was 88.6% and 39.3%, respectively.

Conclusion: This study demonstrated that the designed iron oxide nanoparticles conjugated with 2-pyridinium aldoxime can be synthesized and activate acetylcholinesterase inhibited by paraoxon. Therefore, future studies should investigate the effect of other groups such as 4-pyridinium aldoxime, 2,4-pyridinium aldoxime, etc., on the enzyme activation performance and the ability of these nanoparticles to cross the blood-brain barrier.

Keywords: Antidotes, Nerve Agents, Blood-Brain Barrier, Cholinesterase Reactivators, Organophosphate Poisoning, Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles.

*Corresponding author: Mohammad Hadi Baghersad, Email: hadibaghersad@bmsu.ac.ir

طراحی، سنتز و تعیین مشخصات نانوذرات آبر پارامغناطیسی کانجوگه شده با ۲-پیریدینیوم آلدوکسیم به عنوان آنتی دوت های بالقوه عوامل عصبی

سجاد جمشیدی^۱، محمد هادی باقرصاد^{۱*}

^۱ مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی کاربردی، دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله (عج)، تهران، ایران

چکیده

زمینه و هدف: ترکیبات آلی فسفر یا ارگانوفسفره شامل عوامل عصبی، آفت کش ها، معادل های عوامل شیمیایی و نوویکوک یک مخاطره جدی برای سلامتی انسان هستند که استفاده از آن ها بر ضد انسان ها طی کنوانسیون منع سلاح های شیمیایی به وسیله ۱۹۲ کشور در سال ۱۹۹۳، ممنوع شده است. اثرات سمی این ترکیبات شامل فسفریله شدن و در نتیجه مهار آنزیم استیل کولین استراز است که باعث تجمع استیل کولین در سیناپس های سیستم اعصاب مرکزی و محیطی و بروز علائم مسمومیت نورتوتوکسیک می شود. داروهای مورد استفاده برای درمان این مسمومیت ترکیباتی هستند که حداکثر ۱۰ درصد می توانند از سد خونی مغزی عبور کنند و بنابراین قابلیت سم زدایی در سیستم اعصاب مرکزی را به طور مؤثر ندارند. هدف از این تحقیق طراحی و سنتز یک نانوفعال کننده با خاصیت پارامغناطیسی به منظور فعال سازی آنزیم مهار شده در سیستم اعصاب مرکزی است.

روش ها: در این پژوهش نانوذرات اکسید آهن کانجوگه شده با ۲-پیریدینیوم آلدوکسیم طراحی و طی چهار مرحله سنتز شد. مشخصات نانوذرات توسط روش های طیف سنجی مادون قرمز، طیف سنجی تفرق انرژی پرتو ایکس (EDS)، آنالیز عنصری، پراکندگی نور دینامیکی (DLS) و میکروسکوپ الکترونی (SEM) تعیین شد و اثر فعال سازی آن ها در مقایسه با پرالیدوکسیم به عنوان داروی در دسترس تجاری، با استفاده از روش المن به صورت برون تنی مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج حاصل از روش المن نشان داد که درصد فعال سازی آنزیم مهار شده با پاراکسون به عنوان یک عامل ارگانوفسفره، توسط پرالیدوکسیم به عنوان آنتی دوت تجاری در دسترس و نانوذرات سنتز شده در غلظت ۵ میلی مولار و طی ۳۰ دقیقه، به ترتیب ۸۸/۶ و ۳۹/۳ درصد است.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که نانوذرات اکسید آهن کانجوگه شده با ۲-پیریدینیوم آلدوکسیم طراحی شده به خوبی قابل سنتز و دارای قابلیت فعال سازی آنزیم استیل کولین استراز مهار شده با پاراکسون هستند. بنابراین در مطالعات آینده باید اثر گروه های دیگر مانند ۴-پیریدینیوم آلدوکسیم، ۲ و ۴-پیریدینیوم آلدوکسیم و ... در قدرت فعال سازی آنزیم و همچنین قابلیت عبور این نانوذرات از سد خونی-مغزی مورد بررسی قرار گیرد.

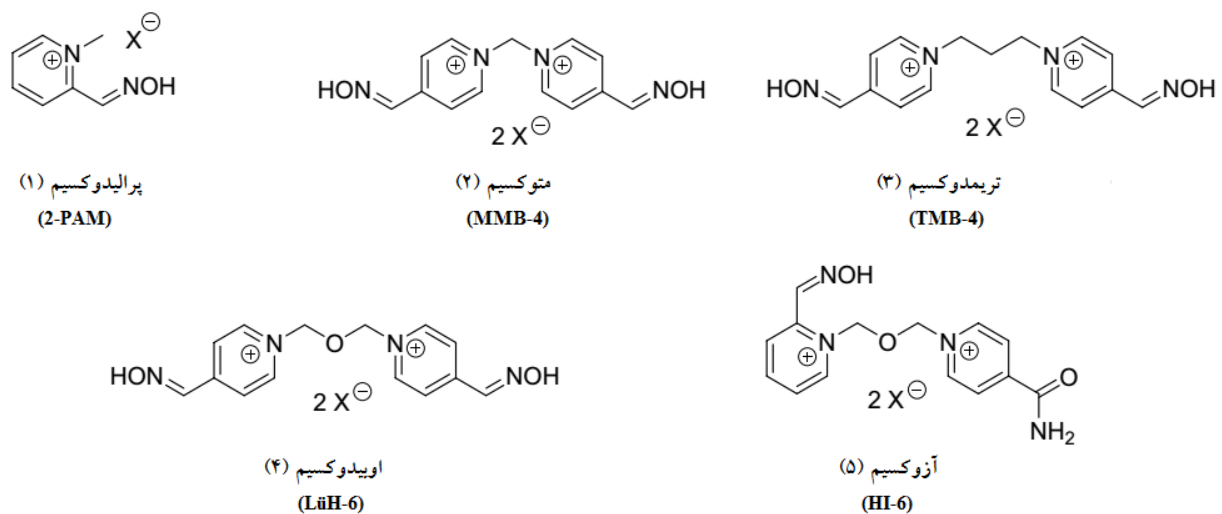
کلیدواژه ها: آنتی دوت ها، عوامل عصبی، سد خونی-مغزی، فعال کننده های کولین استراز، مسمومیت با ارگانوفسفره، نانوذرات اکسید آهن ابرپارامغناطیسی.

مقدمه

اکسیمی با برخی نواقص همراه است (۷۸). وسیع‌الطیف نبودن، عبور محدود از سد خونی- مغزی و پدیده مهار مجدد آنزیم توسط اکسیم فسفریله شده، می‌تواند به عنوان اصلی‌ترین نقاط ضعف این آنتی‌دوت‌ها در نظر گرفته شود. در نتیجه، این آنتی‌دوت‌ها از طرفی نمی‌توانند از سیستم عصبی مرکزی به طور مؤثر سم‌زدایی کنند و از طرف دیگر، از هر ترکیب اکسیمی نمی‌توان به‌عنوان آنتی‌دوت استفاده نمود زیرا اکسیم فسفریله می‌تواند به‌عنوان یک ارگانوفسفره جدید، در نقش مهارکننده عمل کند (۹). محدودیت دیگر این ترکیبات این است که همه آنتی‌دوت‌های اکسیمی ذکر شده، از جمله پرایدوکسیم ترکیبات باردار (یونی) هستند (شکل ۱) و قابلیت بسیار اندکی در عبور از سد خونی- مغزی دارند که منجر به فراهمی زیستی کم آن‌ها در سیستم اعصاب مرکزی و ناتوانی آن‌ها در فعال‌سازی آنزیم موجود در این سیستم می‌شود. فعال‌کننده‌های دارای یک حلقه پیریدینیوم مانند پرایدوکسیم (ترکیب ۱، شکل ۱) تقریباً ۱۰ درصد می‌توانند از سد خونی مغزی عبور کنند (۱۰) درحالی‌که فعال‌کننده‌های دو حلقه‌ای مانند اوبیدوکسیم (ترکیب ۴، شکل ۱)، تنها ۱ الی ۳ درصد می‌توانند عبور کنند (۱۱).

روش‌هایی که تاکنون برای فائق آمدن بر نفوذپذیری کم آنتی‌دوت‌های عوامل عصبی در سیستم اعصاب مرکزی بررسی شده‌اند عبارتند از: تغییر در خاصیت آبگریزی فعال‌کننده‌های اکسیمی، کاندوگاسیون اکسیم‌ها به مولکول‌های دارای قابلیت عبور از سد خونی مغزی مانند ساکاریدها، دور زدن سد خونی مغزی با استفاده از فرمولاسیون‌های استنشاقی، مهار گلیکوپروتئین‌های P و کپسوله کردن آنتی‌دوت‌های اکسیمی در نانوذرات می‌باشد. نانوذرات متنوعی شامل نانوذرات سیلیکای متخلخل (مزوپور)، چارچوب‌های آلی- فلزی (MOFs)، نانوذرات پلی (لاکتیک-کو- گلیکولیک اسید)، نانوذرات آلبومین سرم انسانی، نانو ذرات لیپوزومی، نانوذرات لیپیدی جامد و کوکوریبتوریل‌ها (CBS) به‌عنوان سامانه‌های

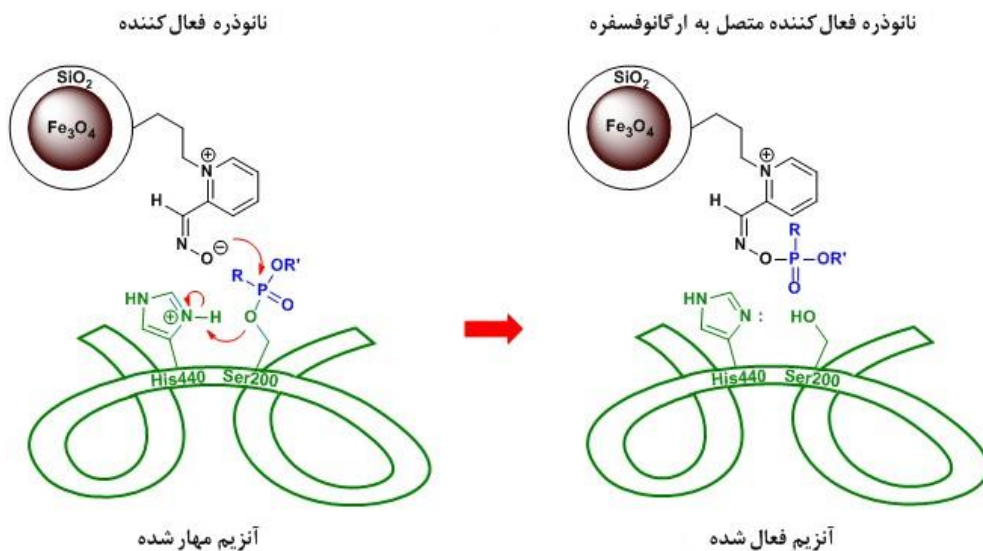
استرهای ارگانوفسفات، فسفونات و فسفینات (عوامل ارگانوفسفره) سه گروه اصلی ترکیبات آلی پنج ظرفیتی فسفر هستند که به طور گسترده‌ای به‌عنوان آفت‌کش‌ها، علف‌کش‌ها، عوامل ضد اشتعال، نرم‌کننده‌ها و غیره استفاده می‌شوند (۱). با این حال، بیشتر این ترکیبات می‌توانند به دلیل اثر مهارکنندگی خود بر روی آنزیم استیل‌کولین‌استراز، سمیت شدیدی در انسان‌ها ایجاد کنند. ارگانو- فسفره‌ها موثرترین عوامل جنگ شیمیایی عصبی (عوامل عصبی) نیز هستند که استفاده از آن‌ها طی کنوانسیون منع سلاح‌های شیمیایی که به‌وسیله ۱۹۲ کشور در سال ۱۹۹۳ امضاء شده است (۲). آنزیم استیل‌کولین‌استراز مسئول کاتالیز واکنش تجزیه ناقل عصبی استیل‌کولین به یون استات و کولین در سیناپس‌های عصبی و اتصالات عضلانی- عصبی است. این فرآیند توسط حمله هسته‌دوستی گروه هیدروکسیل آمینواسید سرین در جایگاه فعال آنزیم به استیل‌کولین و سپس هیدرولیز ترکیب استیل- سرین به استات و آنزیم آزاد انجام می‌شود (۳). رویداد مشابهی می‌تواند برای عوامل ارگانوفسفره رخ دهد با این تفاوت که هیدرولیز کمپلکس آنزیم ارگانوفسفره بسیار کند است. بنابراین، آنزیم مهار یا غیرفعال می‌شود و تحریک بیش از حد گیرنده‌های کولینرژیک رخ می‌دهد که طی آن، علائم حاد بروز می‌کنند (۴). در حال حاضر، درمان استاندارد مسمومیت با ارگانوفسفره، استفاده از فعال‌کننده‌های کولین‌استراز است که می‌توانند فرآیند هیدرولیز را با استفاده از حمله هسته‌دوستی به اتم فسفر کمپلکس فسفریل- آنزیم تسهیل کنند (۵). امروزه، فعال‌کننده‌های اکسیمی مانند پرایدوکسیم، متوکسیم، تریمدوکسیم، اوبیدوکسیم و آزوکسیم (HI-6) (ترکیب‌های ۱ تا ۵، شکل ۱)، تنها آنتی‌دوت‌ها علیه مسمومیت ناشی از ارگانوفسفره هستند که از بین این موارد، فقط پرایدوکسیم دارای مجوز غذا و دارو می‌باشد (۶). درمان مسمومیت ناشی از ارگانوفسفره با استفاده از آنتی‌دوت‌های



شکل-۱. ساختارهای فعال‌کننده‌های اکسیمی تجاری مورد استفاده برای فعال‌سازی آنزیم مهار شده با عوامل ارگانوفسفره

کنندگی آنزیم مهار شده با عوامل ارگانوفسفره را به ما نمایان می‌کند. بنابراین، در ادامه پژوهش‌های اخیر ما در زمینه سنتز و کاربرد نانوسامانه‌ها به منظور دارورسانی هدمند (۱۷-۲۰) و همچنین سنتز آنتی‌دوت‌های جدید با پتانسیل عبور از سد خونی مغزی (۲۱)، در این پژوهش ما نانوذرات ابر پارامغناطیسی اکسید آهن متصل به پیریدینیوم آلدوکسیم را به عنوان نامزد جدید برای فعال کردن آنزیم مهار شده طراحی و سنتز و پس از شناسایی، ویژگی‌های آن را از لحاظ خاصیت مغناطیسی و توانایی فعال سازی آنزیم مهار شده با ارگانوفسفره مورد بررسی قرار دادیم. مکانیسم فعال سازی آنزیم مهار شده توسط نانوذرات سنتز شده در شمای ۱ مشاهده می‌شود. با توجه به اینکه پس از فعال سازی، نانوذره همچنان به عامل ارگانوفسفره متصل می‌ماند، پیش بینی می‌شود که با همان مکانیسمی که نانوذرات از سد خونی- مغزی عبور می‌کنند، پس از فعال سازی آنزیم بتوان عامل ارگانوفسفره متصل به نانوذره را از بافت مغزی خارج نمود.

دارورسانی برای حمل برخی اکسیم‌ها مانند آزوکسیم، اوبیدوکسیم و پرایدوکسیم به سیستم اعصاب مرکزی بررسی شده‌اند (۱۲). نانوذرات مغناطیسی، سامانه‌های قابل هدایتی برای تحویل داروها به مقصد نهایی با استفاده از یک میدان مغناطیسی خارجی هستند که تاکنون برای این منظور مورد استفاده قرار نگرفته‌اند. نانوذرات اکسید آهن ابر پارامغناطیسی، زیرمجموعه‌ای از نانوذرات مغناطیسی هستند که در حال حاضر به علت سمیت اندک، در کاربردهای مختلف پزشکی استفاده می‌شود (۱۳). با این حال، از آنجا که این نانوذرات نمی‌توانند از سد خونی- مغزی عبور کنند، برخی استراتژی‌ها در حال توسعه هستند تا آن‌ها را برای این منظور قدرتمند کنند. این استراتژی‌ها شامل اصلاح سطح نانوذره با پپتیدهای نفوذکننده یا لیگاندهای عملکردی گیرنده‌های سلول‌های مغزی (۱۴، ۱۵)، و اعمال میدان‌های مغناطیسی خارجی و یا امواج رادیویی تنظیم شده هستند (۱۶). توسعه این استراتژی‌ها افق امیدوار کننده‌ای برای طراحی و سنتز نانوذرات ابر پارامغناطیسی دارای خاصیت فعال



شمای-۱. مکانیسم فعال سازی آنزیم مهار شده توسط ارگانوفسفره با استفاده از نانوذره فعال کننده

بررسی شد. خاصیت مغناطیسی نانوذرات با استفاده از دستگاه مغناطیس سنج مدل MEGHNATIS KAVIR اندازه‌گیری شد. جذب پرتو فرابنفش در ناحیه ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر ماوراءبنفش مدل Biochrom™ WPA Biowave II اندازه‌گیری شد.

سنتز نانوذرات اکسید آهن

۲۰ میلی‌لیتر محلول آمونیاک ۲۰ درصد به آرامی به ۲۰۰ میلی‌لیتر محلول آبی شامل ۳۸/۱۱ گرم کلرید آهن (II) و ۳/۴ گرم کلرید آهن (III)، تحت اتمسفر نیتروژن اضافه و به شدت هم زده شده تا pH به ۱۰ رسید. سپس عمل همزدن به مدت ۴ ساعت ادامه یافت. رسوب سیاه حاصل با استفاده از آهنربا جدا، با اتانول

روش‌ها

مواد و ابزارها

مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت سیگما تهیه شدند. از یک دستگاه اسپکتروفوتومتر مادون قرمز تبدیل فوریه (مدل Perkin Spectrum RXI) برای شناسایی گروه‌های عاملی استفاده شد. قطر هیدرودینامیکی و بار سطحی نانوذرات با استفاده از دستگاه زتاسایزر نسخه ۶۰۱ در دمای ثابت (۲۵ درجه سانتیگراد) برای ۱ میلی‌لیتر نمونه در آب مقطر بررسی شد. مورفولوژی و ترکیب عنصری نانوذرات با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی جفت شده با دستگاه طیف سنج تفرق انرژی پرتو ایکس (SEM-EDS) مدل TESCAN Vega پس از پوشش نمونه‌ها با یک فیلم طلا

شسته و مایع رویی دور ریخته شد.

سنتز نانوذرات اکسید آهن سیلانه شده

یک گرم از نانوذرات اکسید آهن سنتز شده، در مخلوطی شامل ۱۰۰ میلی لیتر محلول گلیسرول/آب (به نسبت حجمی ۶۰/۴۰)، یک میلی لیتر ترکیب تترااتیل ارتوسیلیکات و ۱/۶ میلی لیتر محلول آمونیاک غلیظ ریخته شد و به طور کامل با همزدن پراکنده گردید. این مخلوط تحت اتمسفر نیتروژن در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد به مدت ۵ ساعت همزده شد. نانوذرات حاصل بوسیله آهنربا جدا، با اتانول و سپس آب مقطر شسته و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ساعت در گرمکن الکتریکی خشک شد.

عامل دار کردن نانوذرات اکسید آهن سیلانه شده

یک میلی لیتر ترکیب (۳-کلروپروپیل) تریمتوکسی سیلان به نانوذرات اکسید آهن سیلانه شده که در تولوئن (۱ گرم/۱۰۰ میلی لیتر) پراکنده شده بودند، اضافه شد و سپس مخلوط در دمای ۱۱۰ درجه سانتی گراد تحت اتمسفر نیتروژن به مدت ۲۴ ساعت همزده شد. نانوذرات حاصل بوسیله آهنربا جدا، با متانول و آب مقطر شسته و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ ساعت خشک شد.

سنتز ۲-پیریدین آلدوکسیم

در یک بالن شیشه‌ای ۱۰۰ میلی لیتری، مخلوطی از اتانول مطلق (۹ میلی لیتر)، هیدروکسید سدیم (۰/۹ گرم) و هیدروکسیل-آمین هیدروکلراید (۱/۶ گرم) به آب مقطر (۴۴ میلی لیتر) در دمای صفر درجه سانتی گراد اضافه شد. محلول ۲-پیریدین کربالدهید (۲/۱۴ گرم) در اتانول مطلق (۲/۵ میلی لیتر) به آرامی به مخلوط اضافه شد. مخلوط در دمای صفر درجه سانتی گراد به مدت ۳ ساعت و سپس در دمای اتاق به مدت یک ساعت به طور مداوم همزده شد. در نهایت، اتانول با استفاده از تقطیر در فشار کم خارج گردید و مخلوط واکنش برای تبلور مجدد محصول مربوطه در یک حمام یخ قرار گرفت. بدون خالص سازی بیشتر، پیریدین آلدوکسیم به طور مستقیم برای کانونگاسیون با نانوذرات سنتز شده در مرحله قبل استفاده گردید.

سنتز نانوذرات فعال کننده

۲-پیریدین آلدوکسیم ۲-پیریدین سنتز شده (۱ گرم) به نانوذرات مغناطیسی (۱۰۰ میلی گرم نانوذره در ۸ میلی لیتر دی متیل فراماید) اضافه شد و در دمای ۱۰۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲ ساعت همزده شد. نانوذرات حاصل با آهنربا جدا، با متانول و آب مقطر شسته و در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۲ ساعت خشک شد.

مهار آنزیم استیل کولین استراز (برون تنی)

در یک حمام یخ، مغز رت تازه خارج شده، توزین و به صورت مخلوط ۱۰ درصد در آب مقطر، هموژنیزه شد. هموژنات سانتریفوژ شد (۶۰۰ دور در دقیقه، ۲۰ دقیقه) نمونه‌هایی از مایع رویی برداشته شد و محلول‌های ۲ درصد وزنی از آن‌ها با استفاده از بافر

برایتون-رابینسون تهیه گردید و در دمای ۲۴- درجه سانتی گراد تا انجام آزمایش‌ها بعدی نگهداری شد. یک سری از محلول‌های مهارکننده حاوی پاراکسون با غلظت‌های مختلف (از 1×10^{-4} تا 1×10^{-8} مولار در اتانول با استفاده از محلول استوک اتانولی (۱ میلی گرم/میلی لیتر) تهیه شد. محلول مهارکننده (۵۰ میکرولیتر) به هموژنات مغز (۲ درصد، ۴۵۰ میکرولیتر) اضافه شد؛ مخلوط‌ها ورتکس شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. نمونه‌ها تا انجام آزمایش بعدی در حمام یخ نگهداری شدند. نمونه هموژنات مغزی حاوی اتانول به جای محلول مهارکننده به عنوان نمونه کنترل تهیه شد. اثر مهارکنندگی پاراکسون با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

$$100 \times \left(\frac{\text{فعالیت آنزیمی حضور پاراکسون}}{\text{فعالیت آنزیمی نمونه کنترل}} - 1 \right) = \text{درصد مهارکنندگی}$$

غلظت پاراکسون که باعث مهار ۹۵ درصدی فعالیت آنزیم شد، در آزمایش‌های فعال کنندگی استفاده شد.

بررسی اثر فعال سازی نانوذرات فعال کننده

محلول پرابیدوکسیم به عنوان فعال کننده استاندارد و مخلوط نانوفعال کننده سنتز شده در بافر برایتون-رابینسون با $\text{pH} = 7$ (۸/۳ میلی گرم/میلی لیتر)، آماده شد. به طور جداگانه این محلول‌ها (۵۰ میکرولیتر) به هموژنات مغز موش مهار شده (۴۵۰ میکرولیتر)، با غلظت نهایی نسبت به فعال کننده ۵ میلی مولار اضافه و ورتکس شدند و در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ دقیقه نگهداری شدند. و سپس تا موقع اندازه‌گیری‌های قدرت فعال سازی آنزیمی، در حمام یخ نگهداری شدند. نمونه‌های حاوی بافر به جای محلول فعال کننده به عنوان کنترل (EC) استفاده شدند. درصد فعال سازی با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

درصد فعال سازی

$$100 \times \left(\frac{\text{فعالیت آنزیمی نمونه کنترل منفی} - \text{فعالیت آنزیم مهار شده پس از فعال سازی با فعال کننده}}{\text{فعالیت آنزیمی نمونه کنترل منفی} - \text{فعالیت آنزیمی نمونه کنترل مثبت}} \right) =$$

فعالیت استیل کولین استراز با استفاده از روش المن با برخی تغییرات جزئی اندازه‌گیری شد. به طور خلاصه، نمونه‌های حاوی استیل کولین استراز مهار شده یا فعال شده (۲۵ میکرولیتر) به مخلوط حاوی بافر برایتون-رابینسون با $\text{pH} = 7$ ، ۳ میلی لیتر، استیل کولین یداید ($7/5 \times 10^{-3}$ مولار، ۲۵ میکرولیتر) و دی-تیونیتروبنزوئیک اسید (1×10^{-2} مولار، ۵۰ میکرولیتر) اضافه شدند. تیوکولین تولید شده با دی تیونیتروبنزوئیک اسید واکنش داده و محصول زردی تولید می‌کند که جذب آن در ۴۱۲ نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر ماوراءبنفش اندازه‌گیری و به عنوان فعالیت آنزیم ثبت شد. نمونه کنترل مثبت حاوی آنزیم مهار نشده بود. برای جلوگیری از خطای حاصل از اکسیمولیز استیل کولین یداید (واکنش

فعال کننده با استیل کولین دیدید که منجر به خطا می گردد) به نمونه کنترل مثبت، فعال کننده نیز اضافه شد. نمونه کنترل منفی شامل آنزیم مهار شده بود و به جای فعال کننده، به آن اتانول اضافه گردید. محلول حاوی بافر به جای نمونه حاوی آنزیم به عنوان شاهد استفاده گردید.

نتایج

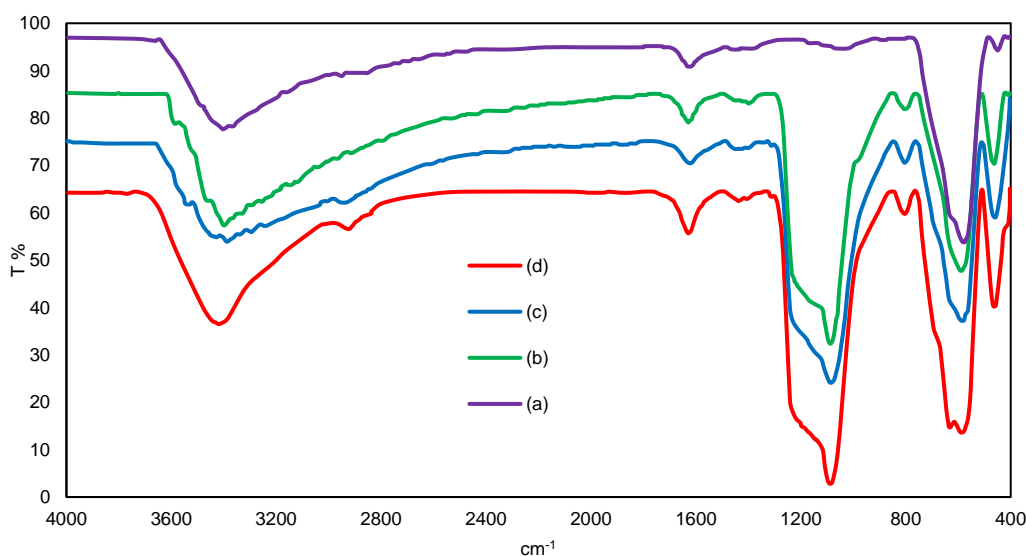
سنتر و تعیین مشخصات نانوذرات

مشخصات همه نانوذرات سنتر شده به وسیله طیف سنجی مادون قرمز (FT-IR)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) و آنالیز عنصری (CHN) تعیین گردید. طیف مادون قرمز نانوذرات سنتر شده در هر مرحله گرفته و منحنی های مربوطه در شکل ۲ جمع آوری شد. در طیف مادون قرمز نانوذرات اکسید آهن

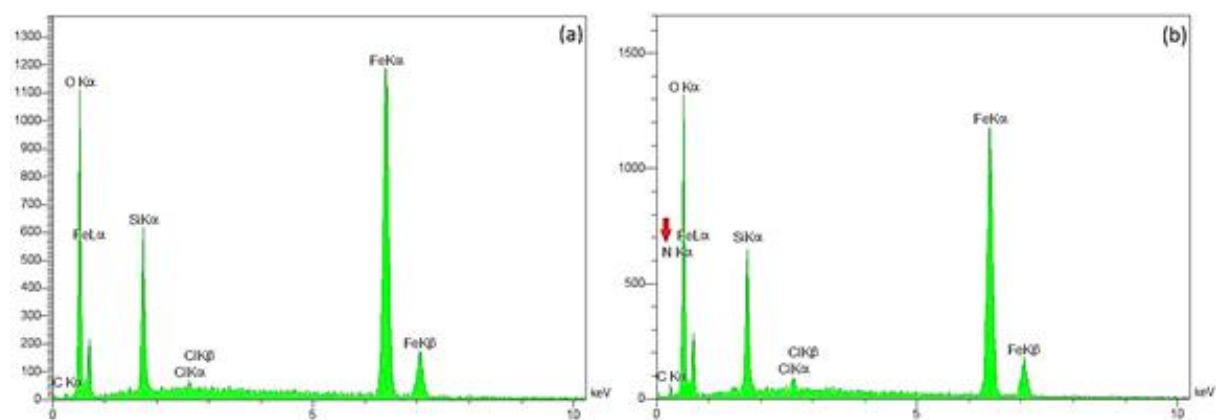
فعال کننده با استیل کولین دیدید که منجر به خطا می گردد) به نمونه کنترل مثبت، فعال کننده نیز اضافه شد. نمونه کنترل منفی شامل آنزیم مهار شده بود و به جای فعال کننده، به آن اتانول اضافه گردید. محلول حاوی بافر به جای نمونه حاوی آنزیم به عنوان شاهد استفاده گردید.

اکسیژن (Fe_3O_4)، حضور باند جذبی در 580 cm^{-1} به پیوندهای آهن-اکسیژن (Fe-O) مربوط است (شکل ۲، a). تشکیل نانوذرات اکسید آهن سیلانه شده (اکسید آهن با پوشش سیلیسی) به وسیله ظهور باند جذبی در 1088 cm^{-1} که مربوط به پیوندهای سیلیسیم-اکسیژن-سیلیسیم (Si-O-Si) می باشد، تایید شد (شکل ۲، b). اتصال کووالانسی ترکیب (۳-کلرو پروپیل) سیلان به نانوذرات اکسید آهن سیلانه شده، به وسیله مشاهده باند جذبی در ناحیه $3000 - 2800\text{ cm}^{-1}$ که مربوط به پیوندهای کربن-هیدروژن (C-H) اشباع یا آلیفاتیک می باشد، مشخص گردید (شکل ۲، c). ظهور سیگنال مربوط به اتم نیتروژن در مقایسه بین طیف های EDS نانوذرات سنتر شده در مرحله (ج) و (د) که با فلش قرمز رنگ در شکل ۳ نشان داده شده است، حضور حلقه پیریدینی در نانوذرات سنتر شده طی مرحله (د) را تایید نمود.

مادون قرمز (FT-IR)، طیف سنجی پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) و آنالیز عنصری (CHN) تعیین گردید. طیف مادون قرمز نانوذرات سنتر شده در هر مرحله گرفته و منحنی های مربوطه در شکل ۲ جمع آوری شد. در طیف مادون قرمز نانوذرات اکسید آهن



شکل ۲. طیف مادون قرمز نانوذرات سنتر شده، (a) نانوذرات اکسید آهن، (b) نانوذرات اکسید آهن سیلانه شده، (c) نانوذرات عامل دار شده، (d) نانوذرات کانجوگه شده با پیریدین آلدوکسیم (نانوذرات فعال کننده)



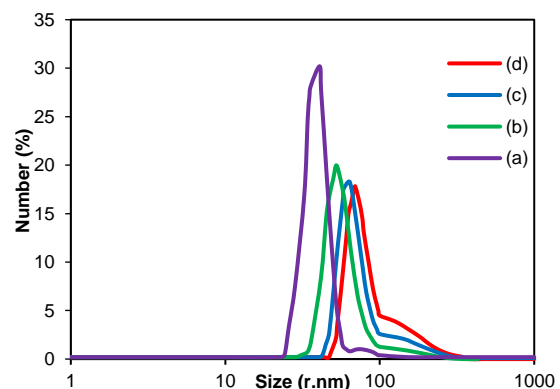
شکل ۳. طیف پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) نانوذرات سنتر شده در مرحله ج و د، (a) نانوذرات عامل دار شده، (b) نانوذرات کانجوگه شده با ۲-پیریدین آلدوکسیم (نانوذرات فعال کننده)

بار سطحی نانوذرات به وسیله آزمایش پتانسیل زتا ارزیابی شد. پتانسیل زتای نانوذرات سنتز شده در مرحله (ج) (عاملدار کردن نانوذرات) و مرحله (د) (سنتز نانوذرات فعال کننده) به ترتیب $-۳۶/۹$ و $-۳۰/۷$ میلی ولت اندازه گیری شد.

بررسی اثر فعال سازی آنزیم توسط نانوذرات (برون تنی)

اثر فعال سازی آنزیم استیل کولین استراز مهار شده با عوامل ارگانوفسفره، با استفاده از روش المن ارزیابی شد (۲۲). در این روش از داروی تجاری پرالیدوکسیم بعنوان فعال کننده استاندارد و پاراکسون به عنوان عامل ارگانوفسفره و از هموزنات مغز رت، به عنوان منبع آنزیم استیل کولین استراز استفاده شد. ابتدا غلظتی از پاراکسون که باعث مهارشدگی حداکثری آنزیم نسبت به نمونه کنترل می شد، با استفاده از سنجش فعالیت آنزیمی در حضور غلظت های مختلفی از پاراکسون (از $۰/۰۱$ تا ۱۰۰ میکرومولار)، به دست آمد. سپس اثر فعال سازی نانوذرات سنتز شده در مقایسه با پرالیدوکسیم روی آنزیم مهار شده با این غلظت از پاراکسون بررسی شد. نتایج نشان داد که درصد فعال سازی آنزیم توسط پرالیدوکسیم و نانوذرات سنتز شده در غلظت ۵ میلی مولار و طی ۳۰ دقیقه، به ترتیب $۸۸/۶$ و $۳۹/۳$ درصد است. جرمی از نانوذرات که معادل با غلظت ۵ میلی مولار بود با استفاده از نتایج آنالیز عنصری محاسبه گردید. طبق نتایج آنالیز عنصری، نانوذرات فعال کننده سنتز شده دارای $۳/۲۹$ درصد کربن، $۰/۳$ درصد هیدروژن و $۰/۹۲$ درصد نیتروژن بودند. با استفاده از درصد کربن نمونه و جرم مولی اتم کربن، تعداد مول کربن در ۱۰۰ گرم نمونه برابر است با $۰/۲۷$. از آنجایی که باقیمانده های آلی در سطح نانوذرات سنتز شده، هر کدام دارای ۹ اتم کربن می باشند، بنابراین ۱۰۰ میلی گرم نانوذره معادل $۰/۰۳$ مول فعال کننده است. در نتیجه، برای دستیابی به غلظت ۵ میلی مولار از فعال کننده، مخلوطی با غلظت $۸/۳$ میلی گرم بر میلی لیتر از نانوذرات سنتز شده تهیه و استفاده شد.

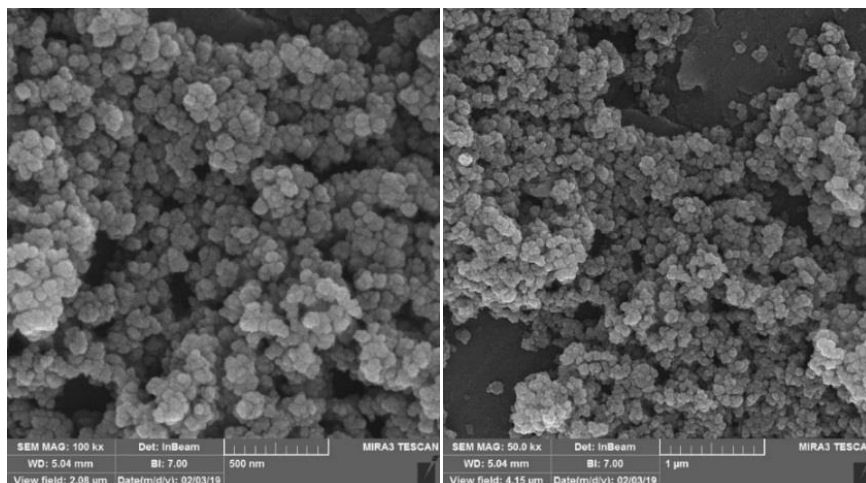
منحنی های حاصل از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) نشان داد که اندازه (قطر هیدرودینامیکی) نانوذرات از $۲۱/۸۶$ نانومتر برای نانوذرات اکسید آهن (مرحله الف) تا در نهایت $۶۰/۰۶$ نانومتر برای نانوذرات فعال کننده (مرحله د) افزایش یافته است (شکل ۴). قطر هیدرودینامیکی و شاخص پراکندگی چندگانه (PDI) برای نانوذرات سنتز شده، در جدول ۱، جمع آوری شده است. نانوذرات سنتز شده دارای PDI در دامنه $۰/۲$ تا $۰/۴$ بودند. بر اساس تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM)، نانوذرات فعال کننده دارای شکل کروی و یکنواخت و اندازه آن ها بین ۲۰ تا ۴۰ نانومتر بود (شکل ۵).

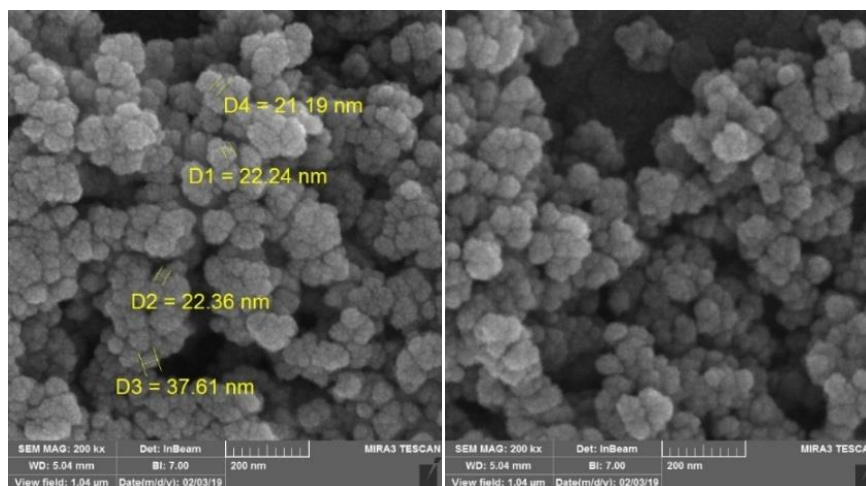


شکل ۴- منحنی های DLS نانوذرات سنتز شده، (a) نانوذرات اکسید آهن، (b) نانوذرات اکسید آهن سیلانه شده، (c) نانوذرات عامل دار شده، (d) نانوذرات کانبوگه شده با پیریدین آلدوکسیم (نانوذرات فعال کننده)

جدول ۱- قطر هیدرودینامیکی و PDI نانوذرات سنتز شده

نانوذرات	قطر هیدرودینامیکی (نانومتر)	PDI
اکسید آهن	۲۱/۸۶	۰/۲۵۹
اکسید آهن سیلانه شده	۳۹/۲۲	۰/۲۷۱
اکسید آهن عامل دار شده	۵۱/۲۱	۰/۴۰۸
نانوذرات فعال کننده	۶۰/۰۶	۰/۲۱۰



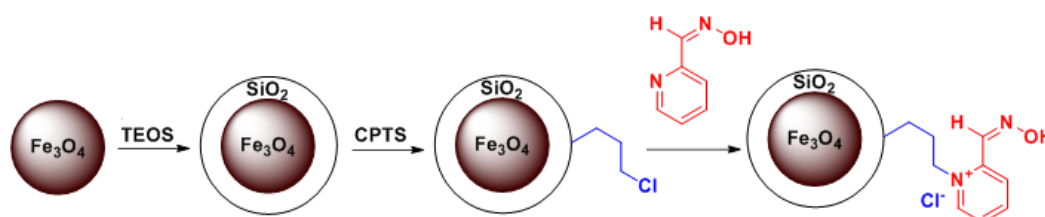


شکل-۵. تصاویر SEM نانوذرات فعال کننده سنتز شده

از واکنشگر تترااتیل اورتوسیلیکات (TEOS)، ج) عامل دار نمودن نانوذرات به دست آمده در مرحله (ب) با استفاده از واکنشگر (۳- کلرو پروپیل) تری متوکسی سیلان (CPTS)، د) کانجوگاسیون ترکیب ۲- پیریدین آلدوکسیم به نانوذرات از طریق جانشینی اتم کلر (شما ۲).

بحث

نانوذرات فعال کننده ابر پارامغناطیسی، طی یک فرآیند چهار مرحله‌ای سنتز شدند: الف) سنتز نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) به روش هم‌رسوبی (۲۳)، ب) سیلان نمودن نانوذرات اکسید آهن با استفاده



شما ۲- فرآیند سنتز نانوذرات ابر پارامغناطیسی فعال کننده آنزیم استیل کولین استراز

نسبت به نانوذرات عامل دار شده، حضور نیتروژن در نانوذرات فعال کننده تأیید می‌شود. حضور نیتروژن بدون حذف سیگنال مربوط به اتم کلر، نشان‌دهنده جایگزینی کلر با حلقه پیریدینی دارای نیتروژن، و باقی ماندن یون کلر با بار منفی کنار حلقه پیریدینیوم دارای بار مثبت و کانجوگاسیون موفق است.

بررسی پروفایل توزیع اندازه و شاخص پراکندگی چندگانه (PDI) نانوذرات سنتز شده به وسیله روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) در پایان هر مرحله از سنتز، نشان‌دهنده موفقیت آمیز بودن یا نبودن فرآیندهای سیلان، عامل دار کردن و کانجوگاسیون است. شاخص پراکندگی چندگانه (PDI) برای توضیح ناهمگونی و یا یکنواختی اندازه ذرات استفاده می‌شود. مقادیر PDI به طور معمول بین صفر (برای یک نمونه کاملاً یکنواخت) تا ۰/۷ (یک نمونه غیریکنواخت یا ناهمگون) قرار می‌گیرد. با توجه به نتایج DLS، نانوذرات اکسید آهن (Fe_3O_4) دارای اندازه کوچکی هستند و PDI آن‌ها نشان‌دهنده یکنواختی نسبی در اندازه ذرات است. پس از سیلان کردن نانوذرات Fe_3O_4 ، اندازه نانوذرات به طور قابل

در واقع، اتصال ۲- پیریدین آلدوکسیم (شما ۲، ترکیب قرمز رنگ) به نانوذرات، قسمت‌هایی نظیر پرایدوکسیم (ترکیب ۱، شکل ۱) در سطح آن‌ها ایجاد می‌کند که مسئول فعال سازی آنزیم هستند. طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR) و پراش انرژی پرتو ایکس (EDS) دو روش مناسب برای تأیید مراحل مختلف سنتز و عامل دار کردن نانوذرات هستند. در طیف سنجی مادون قرمز، روند تغییر در گروه‌های عاملی قابل تعقیب و بررسی است. در روش پراش اشعه ایکس، نوع و مقدار نسبی اتم‌های یک ترکیب قابل تشخیص است. طی فرآیند سنتز، جایگزینی گروه کلر، در قسمت ۳- کلرو پروپیلی نانوذرات با ترکیب ۲- پیریدین آلدوکسیم، به خوبی با استفاده از طیف قابل تشخیص نیست (شکل ۲، d)، زیرا باندهای جذبی مربوط به ارتعاش کششی آروماتیک حلقه پیریدینی (پیوندهای کربن- هیدروژن غیراشباع) در ناحیه حدود 3100 cm^{-1} توسط باندهای جذبی مربوط به گروه‌های هیدروکسیل ($-OH$) پوشانده شده است، بنابراین از روش EDS برای تأیید انجام این مرحله می‌توان استفاده کرد. با بررسی طیف EDS نانوذرات فعال کننده

یابد. استفاده از نانوذرات برای عبور فعال‌کننده‌ها از سد خونی-مغزی و انتقال آن‌ها به سیستم اعصاب مرکزی اخیراً در کارهای مشابهی گزارش شده است.

به‌عنوان مثال، نانوذرات سیلیکای متخلخل برای تحویل داخل مغزی آزوکسیم استفاده شده‌اند (۲۴). ساختار متخلخل این نانوذرات، ظرفیت بارگذاری بالا و رهاسازی سریع دارو را امکان پذیر می‌کند. نانوذرات بارگذاری شده با آزوکسیم برای فعال کردن آنزیم استیل کولین استراز موش‌های مسموم شده با سومان استفاده شد. نتایج نشان داد که نسبت درمانی این سامانه (۱/۷۳) بهتر از آزوکسیم به تنهایی (۱/۳۷) بود.

اخیراً چارچوب‌های آل-فلزی (MOFs) که ساختارهای بسیار متخلخل، کریستالی، آل-معدنی هستند نیز به‌عنوان سامانه دارورسانی حامل پرایدوکسیم برای درمان مسمومیت ناشی از ارگانوفسفره استفاده شده‌اند (۲۵). اندازه نانوذرات (۱۰۰ نانومتر) برای نفوذ به سد خونی-مغزی مناسب بود. با این حال، رهاسازی پرایدوکسیم از این نانوذرات بسیار کند بود، که استفاده از آن در درمان مسمومیت با ارگانوفسفره که نیازمند تسریع در روند درمان است را محدود می‌کند.

نانوذرات آلبومین سرم انسانی (HSA) نیز به‌عنوان نانوحامل بالقوه در مطالعات متعدد با تمرکز بر تحویل اکسیم مورد مطالعه قرار گرفتند (۲۶). نانوذرات HSA بارگذاری شده با آزوکسیم، مقدار فعال‌کننده جذب شده را تقریباً سه برابر در مقایسه با آکسیم آزاد، تحت شرایط آزمایشگاهی افزایش داد. با این حال، نانوذرات HSA بارگذاری شده باهم مثل بسیاری از موارد، هنوز در یک مدل مناسب درون‌تنی ارزیابی نشده‌اند.

لیپوزوم‌ها، نانوذرات دیگری هستند که می‌توان از آن‌ها برای محصور کردن مولکول‌های آبدوستی استفاده کرد که به سختی می‌توانند از سد خونی-مغزی عبور کنند. اخیراً لیپوزوم‌های اصلاح شده و بارگذاری شده با پرایدوکسیم برای تحویل داخل بینی با هدف دور زدن سد خونی-مغزی استفاده شد (۲۷). لیپوزوم‌های بارگذاری شده با پرایدوکسیم تا ۱۲ درصد از آنزیم استیل کولین استراز مهار شده مغزی با پاراکسون را در موش‌ها فعال کردند. با این حال نانوذرات لیپوزومی دارای چندین محدودیت هستند: حلالیت کم در محلول‌های آبی، نیمه عمر کوتاه، نشت داروهای کپسوله شده از نانوذرات، یا امتزاج داروها با فسفولیپیدها. بنابراین، استفاده از نانوذرات لیپوزومی بارگذاری شده با فعال‌کننده‌های اکسیمی برای تجویز از طریق مسیرهایی غیر از مسیر داخل بینی، مورد سوال است.

نانوذرات دیگری که اخیراً برای بارگذاری پرایدوکسیم استفاده شده‌اند، نانوذرات لیپیدی جامد (SLN) هستند. SLN‌های بارگذاری شده با پرایدوکسیم و یک فعال‌کننده دیگر، برای درمان موش‌های مسموم شده با پاراکسون استفاده شد و ۳۵ درصد از آنزیم استیل کولین استراز مهار شده مغزی در ۵ ساعت دوباره فعال شد (۲۸).

توجهی افزایش یافته است. این افزایش اندازه به دلیل پوشش سیلیسی است که به نانوذرات اضافه شده است. طی این مرحله، PDI کمی افزایش یافته است، اما همچنان نشان‌دهنده یکنواختی مناسب است. با عامل‌دار کردن نانوذرات اکسید آهن سیلانه شده، اندازه نانوذرات و PDI باز هم افزایش یافته است که نشان‌دهنده افزایش ناهمگونی در اندازه ذرات است. این افزایش ناهمگونی ممکن است به دلیل تغییرات سطحی و تشکیل گروه‌های کلرو پروپیل باشد. در نهایت، با کاندوگاسیون ۲- پیریدین آلدوکسیم به نانوذرات، اندازه نانوذرات به مقدار نهایی ۶۰/۰۶ نانومتر رسیده است اما PDI کاهش یافته و به ۰/۲۱۰ رسیده است که نشان‌دهنده یکنواختی بهتر نانوذرات فعال‌کننده است. این کاهش PDI ممکن است به دلیل تشکیل پیوندهای کووالانسی پایدار و یکنواخت در سطح نانوذرات باشد. اندازه نانوذرات در هر مرحله از سنتز افزایش یافته است که نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن فرآیندهای سیلانه، عامل‌دار کردن و کاندوگاسیون است. PDI نانوذرات نیز نشان‌دهنده یکنواختی مناسب آن‌ها در مراحل مختلف است، هرچند که در مرحله عامل‌دار کردن، ناهمگونی بیشتری مشاهده می‌شود، در نهایت نتایج نشان داد که نانوذرات فعال‌کننده با اندازه و یکنواختی مناسب سنتز شده‌اند.

تصاویر میکروسکوپ الکترونی (SEM) نیز این یکنواختی را تایید می‌کند. اختلاف اندازه ذرات در آزمایش DLS و تصاویر SEM به دلیل آبیوشی نانوذرات در شرایط آزمایش DLS است. پتانسیل زتا یک معیار مهم برای بررسی پایداری کلئیدی نانوذرات است. مقادیر پتانسیل زتای به‌دست آمده برای نانوذرات فعال‌کننده، نشان‌دهنده بار منفی قابل توجهی بر روی سطح نانوذرات است. پتانسیل زتای بالا (بیشتر از ± 30 میلی‌ولت) نشان‌دهنده پایداری کلئیدی مناسب نانوذرات است، زیرا بارهای سطحی بالا به دلیل ایجاد دافعه بیشتر، از تجمع نانوذرات جلوگیری می‌کنند. کاهش جزئی در پتانسیل زتا از $-36/9$ میلی‌ولت به $-30/7$ میلی‌ولت پس از کاندوگاسیون ۲- پیریدین آلدوکسیم نشان‌دهنده تغییرات سطحی نانوذرات است. این تغییرات به دلیل جایگزینی کلر در گروه‌های کلرو پروپیل با گروه‌های پیریدینی است که منجر به کاهش جزئی بار سطحی می‌شود.

نتایج آزمایشات برون‌تنی نشان داد که نانوذرات سنتز شده حاوی گروه‌های فعال‌کننده اکسیمی در سطح خود هستند که توانایی فعال‌سازی آنزیم استیل کولین استراز مهار شده با عوامل ارگانوفسفره را دارند، هرچند که درصد فعال‌سازی آن‌ها نسبت به پرایدوکسیم کمتر است. به نظر می‌رسد علت کاهش درصد فعال‌سازی نسبت به داروی تجاری پرایدوکسیم، مربوط به اندازه بسیار بزرگتر نانوذرات فعال‌کننده نسبت به مولکول بسیار کوچکتر پرایدوکسیم است. این نتایج نشان‌دهنده پتانسیل مناسب نانوذرات سنتز شده به عنوان فعال‌کننده‌های قابل هدایت آنزیم استیل کولین استراز مهار شده با عوامل ارگانوفسفره است که می‌تواند در تحقیقات بیشتر بهبود

پرایدوکسیم (۸۸/۶ درصد طی ۳۰ دقیقه) کمتر بود که به دلیل اندازه بزرگتر نانوذرات نسبت به مولکول پرایدوکسیم است. با این حال، این نانوذرات پتانسیل مناسبی به عنوان فعال‌کننده‌های قابل هدایت آنزیم استیل‌کولین استراز مهار شده با عوامل ارگانوفسفره دارند و می‌توانند طی تحقیقات بعدی، بهبود یابند. استفاده از نانوذرات برای عبور فعال‌کننده‌ها از سد خونی- مغزی و انتقال آن‌ها به سیستم اعصاب مرکزی نیز در کارهای مشابهی گزارش شده است که نشان‌دهنده پتانسیل بالای این نانوذرات در کاربردهای درمانی است.

نکات بالینی کاربردی برای جوامع نظامی

- از لحاظ نظامی عمده‌ترین و مشهودترین سوءاستفاده از عوامل عصبی در جنگ ایران و عراق (۱۹۸۰-۱۹۸۸) گزارش شده است. ارتش عراق از تابون و سارین علیه نیروهای نظامی و مردم ایران در جزیره مجنون و حلبچه استفاده کرد (۲۹). همچنین اخباری مبنی بر استفاده از این عوامل، در سوریه توسط داعش وجود دارد (۳۰). اخیراً امکان استفاده رژیم اشغالگر قدس از گازهای اعصاب در تونل‌های غزه توسط خبرگزاری‌ها مطرح شد (۳۱). بنابراین با توجه به اینکه هنوز خطر استفاده گسترده از این عوامل در درگیری‌های نظامی وجود دارد و با توجه به اینکه هنوز سامانه دارورسانی موثری برای انتقال آنتی‌دوت‌های عوامل عصبی به سیستم اعصاب مرکزی به صورت تجاری تاییدیه نگرفته است و مشکل عدم سمیت زدایی موثر از سیستم اعصاب مرکزی توسط آنتی‌دوت‌های موجود حل نشده است، نتایج این پژوهش می‌تواند به‌عنوان راه حلی برای دارورسانی هدفمند این ترکیبات مورد استفاده قرار گیرد.

تضاد منافع: نویسندگان تصریح می‌کنند که هیچ‌گونه تضاد منافی در مطالعه حاضر وجود ندارد.

منابع

1. Svava T, Gombac M, Vrecl M, Juntos P, Kostanjsek R, Pogacnik A, et al. Enzootic nasal adenocarcinoma of sheep in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine Series A*. 2006;53(1):26-9. doi:10.1111/j.1439-0442.2006.00784.x
2. Costanzi S, Machado JH, Mitchell M. Nerve agents: what they are, how they work, how to counter them. *ACS Chemical Neuroscience*. 2018;9(5):873-85. doi:10.1021/acschemneuro.8b00148
3. Quinn DM. Acetylcholinesterase: enzyme structure, reaction dynamics, and virtual transition

سرعت فعال‌سازی مجدد توسط اکسیم‌های بارگذاری‌شده در نانوذرات SLN بالاتر از آنچه در مطالعات قبلی گزارش شده بود، به‌دست آمد.

در مقایسه با کارهای مشابه ذکر شده، مانند استفاده از نانوذرات سیلیکای متخلخل و چارچوب‌های آلی-فلزی (MOFs)، نانوذرات سنتز شده در این مطالعه به علت اندازه کوچک و قابلیت هدایت پذیری، پتانسیل مناسبی برای انتقال، تجمع، عبور از سد خونی-مغزی و فعال‌سازی آنزیم استیل‌کولین استراز هستند. با این حال، نانوذرات سیلیکای متخلخل به دلیل ساختار متخلخل خود، ظرفیت بارگذاری بالاتر و رهاسازی سریع‌تری دارند. همچنین، نانوذرات MOFs به دلیل اندازه مناسب و ساختار متخلخل خود، برای نفوذ به سد خونی-مغزی مناسب هستند، اما رهاسازی کند پرایدوکسیم از این نانوذرات، محدودیت‌هایی را ایجاد می‌کند. نانوذرات لیپوزومی و لیپیدی جامد نیز به عنوان نانوحامل‌های بالقوه مورد بررسی قرار گرفته‌اند، اما محدودیت‌هایی مانند حلالیت کم و نیمه عمر کوتاه دارند. در مجموع، نانوذرات فعال‌کننده سنتز شده در این مطالعه، با توجه به نتایج به دست آمده، پتانسیل مناسبی برای استفاده در تحقیقات بیشتر و بهبود عملکرد دارند. بنابراین، در مطالعات آتی، لازم است قابلیت این نانوذرات در فعال‌سازی آنزیم استیل‌کولین استراز انسانی برای عوامل ارگانوفسفره مختلف بررسی شود. همچنین سمیت سلولی و قابلیت عبور آن‌ها از سد خونی-مغزی ارزیابی گردد.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نانوذرات فعال‌کننده ابر پارامغناطیسی با موفقیت طی یک فرآیند چهار مرحله‌ای سنتز شدند و توانستند گروه‌های فعال‌کننده اکسیمی را به سطح خود متصل کنند. این نانوذرات با اندازه و یکنواختی مناسب (۶۰ نانومتر، $PDI = 0.210$)، پایداری کلوتیدی خوبی نشان دادند که با مقادیر بالای پتانسیل زتا (-30.7 میلی‌ولت) تأیید شد. نتایج آزمایشات برون‌تنی نشان داد که این نانوذرات توانایی فعال‌سازی آنزیم استیل‌کولین استراز مهار شده با پاراکسون (۹۵ درصد مهارشدگی) را به میزان $39/3$ درصد طی ۳۰ دقیقه دارند. کارایی فعال‌سازی این نانوذرات نسبت به

- states. *Chemical Reviews*. 1987;87(5):955-79. doi:10.1021/cr00081a005
4. Chao CK, Balasubramanian N, Gerdes JM, Thompson CM. The inhibition, reactivation and mechanism of VX-, sarin-, fluoro-VX and fluoro-sarin surrogates following their interaction with HuAChE and HuBuChE. *Chemico-Biological Interactions*. 2018;291:220-7. doi:10.1016/j.cbi.2018.06.019
 5. Eddleston M, Buckley NA, Eyer P, Dawson AH. Management of acute organophosphorus pesticide poisoning. *Lancet*. 2008;371(9612):597-607.

doi:10.1016/S0140-6736(07)61202-1

6. Newmark J. Therapy for acute nerve agent poisoning: An update. *Neurology: Clinical Practice*. 2019;9(4):337-42. doi:10.1212/cpj.0000000000000641
7. Korabecny J, Soukup O, Dolezal R, Spilovska K, Nepovimova E, Andrs M, et al. From pyridinium-based to centrally active acetylcholinesterase reactivators. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry*. 2014;14(3):215-21. doi:10.2174/1389557514666140219103138
8. Mercey G, Verdelet T, Renou J, Kliachyna M, Baati R, Nachon F, et al. Reactivators of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus nerve agents. *Accounts of Chemical Research*. 2012;45(5):756-66. doi:10.1021/ar2002864
9. Maxwell DM, Brecht KM, Sweeney RE. A common mechanism for resistance to oxime reactivation of acetylcholinesterase inhibited by organophosphorus compounds. *Chemico-biological Interactions*. 2013;203(1):72-6. doi:10.1016/j.cbi.2012.08.024
10. Sakurada K, Matsubara K, Shimizu K, Shiono H, Seto Y, Tsuge K, et al. Pralidoxime iodide (2-PAM) penetrates across the blood-brain barrier. *Neurochemical Research*. 2003;28:1401-7. doi:10.1023/A:1024960819430
11. Karasova JZ, Zemek F, Bajgar J, Vasatova M, Prochazka P, Novotny L, et al. Partition of bispyridinium oximes (trimedoxime and K074) administered in therapeutic doses into different parts of the rat brain. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011;54(5):1082-7. doi:10.1016/j.jpba.2010.11.024
12. Prchalova E, Kohoutova Z, Knittelova K, Malinak D, Musilek K. Strategies for enhanced bioavailability of oxime reactivators in the central nervous system. *Archives of Toxicology*. 2023;97(11):2839-60. doi:10.1007/s00204-023-03587-0
13. Ansari S, Ficiara E, Ruffinatti FA, Stura I, Argenziano M, Abollino O, et al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Functionalization for Biomedical Applications in the Central Nervous System. *Materials (Basel)*. 2019;12(3). doi:10.3390/ma12030465
14. Israel LL, Galstyan A, Holler E, Ljubimova JY. Magnetic iron oxide nanoparticles for imaging, targeting and treatment of primary and metastatic tumors of the brain. *Journal of Controlled Release*. 2020;320:45-62. doi:10.1016/j.jconrel.2020.01.009
15. Busquets MA, Espargaró A, Sabaté R, Estelrich J. Magnetic Nanoparticles Cross the Blood-Brain Barrier: When Physics Rises to a Challenge. *Nanomaterials (Basel)*. 2015;5(4):2231-48. doi:10.3390/nano5042231
16. Singh D, McMillan JM, Kabanov AV, Sokolsky-Papkov M, Gendelman HE. Bench-to-bedside translation of magnetic nanoparticles. *Nanomedicine*. 2014;9(4):501-16. doi:10.2217/nmm.14.5
17. Elahi N, Kamali M, Baghersad MH. Recent biomedical applications of gold nanoparticles: A review. *Talanta*. 2018;184:537-56. doi:10.1016/j.talanta.2018.02.088
18. Elahi N, Baghersad MH, Kamali M. Precise, direct, and rapid detection of *Shigella* Spa gene by a novel unmodified AuNPs-based optical genosensing system. *Journal of Microbiological Methods*. 2019;162:42-9. doi:10.1016/j.mimet.2019.05.007
19. Baghersad MH, Jamshidi S, Habibi A, Salimi A. Synthesis, Characterization, and *In Vitro* Evaluation of Super Paramagnetic Nanoparticles Grafted with PAMPS for Controlled Delivery of Cationic Drugs. *ChemistrySelect*. 2019;4(3):810-5. doi:10.1002/slct.201803066
20. Elahi N, Kamali M, Baghersad MH, Amini B. A fluorescence Nano-biosensors immobilization on Iron (MNPs) and gold (AuNPs) nanoparticles for detection of *Shigella* spp. *Materials Science and Engineering: C*. 2019;105:110113. doi:10.1016/j.msec.2019.110113
21. Baghersad MH, Habibi A, Dehdashti nejad A. Novel uncharged triazole salicylaldehyde derivatives as potential acetylcholinesterase reactivators: comprehensive computational study, synthesis and *in vitro* evaluation. *RSC Advances*. 2023;13(41):28527-41. doi:10.1039/D3RA05658A
22. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1959;82(1):70-7. doi:10.1016/0003-9861(59)90090-6
23. Mashhadizadeh MH, Karami Z. Solid phase extraction of trace amounts of Ag, Cd, Cu, and Zn in environmental samples using magnetic nanoparticles coated by 3-(trimethoxysilyl)-1-propanthiol and modified with 2-amino-5-mercapto-1,3,4-thiadiazole and their determination by ICP-OES. *Journal of Hazardous Materials*. 2011;190(1):1023-9. doi:10.1016/j.jhazmat.2011.04.051
24. Yang J, Fan L, Wang F, Luo Y, Sui X, Li W, et al. Rapid-releasing of HI-6 via brain-targeted mesoporous silica nanoparticles for nerve agent detoxification. *Nanoscale*. 2016;8(18):9537-47. doi:10.1039/C5NR06658A
25. Zhao D, Liu J, Zhou Y, Zhang L, Zhong Y, Yang Y, et al. Penetrating the Blood-Brain Barrier for Targeted Treatment of Neurotoxicant Poisoning by Nanosustained-Released 2-PAM@VB1-MIL-101-NH₂(Fe). *ACS Applied Materials & Interfaces*. 2023;15(10):12631-42. doi:10.1021/acsami.2c18929
26. Dadparvar M, Wagner S, Wien S, Worek F, von Briesen H, Kreuter J. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014;88(2):510-7. doi:10.1016/j.ejpb.2014.06.008
27. Pashirova TN, Zueva IV, Petrov KA, Lukashenko SS, Nizameev IR, Kulik NV, et al. Mixed cationic liposomes for brain delivery of drugs by the intranasal route: The acetylcholinesterase reactivator 2-PAM as encapsulated drug model. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2018;171:358-67. doi:10.1016/j.colsurfb.2018.07.049
28. Pashirova TN, Braiki A, Zueva IV, Petrov KA, Babaev VM, Buriłova EA, et al. Combination delivery of two oxime-loaded lipid nanoparticles: Time-dependent additive action for prolonged rat

brain protection. *Journal of Controlled Release*. 2018;290:102-11. doi:10.1016/j.jconrel.2018.10.010

29. Iraq's Chemical Warfare Program. Available from: https://web.archive.org/web/20070613050736/https://www.cia.gov/library/reports/general-reports-1/iraq_wmd_2004/chap5.html

30. Timeline of Syrian Chemical Weapons Activity, 2012-2019. Updated March 2019. Available from:

<https://web.archive.org/web/20191019101949/https://www.armscontrol.org/factsheets/Timeline-of-Syrian-Chemical-Weapons-Activity>

31. Israel-Palestine war: Israel plans to flood Hamas tunnels with nerve gas, source says. Available from: <https://www.middleeasteye.net/news/israel-palestine-war-exclusive-israel-will-flood-hamas-tunnels-nerve-gas-under-delta-force-supervision>