

اسفنج آلژینات/ژلاتین بسیار متخلخل برای هموستاز خونریزی شدید فمورال موش بزرگ صحرایی

علی رضایی^۱، احمد مهدی پور^۲، سالار سلمانی پور^۳، نسترن علیپور^۴، رؤیا صالحی^{۵*}

تاریخ دریافت ۱۴۰۲/۰۱/۱۸ تاریخ پذیرش ۱۴۰۲/۰۲/۰۹

چکیده

پیش زمینه و هدف: کنترل خونریزی گسترده ناشی از تصادفات یا میدان های جنگ یکی از مهم ترین چالش های موجود در آسیب های اضطراری است. پژوهش جاری باهدف بررسی عملکرد بندآورندگی ابرجاذب های آلژینات، ژلاتین و آلژینات-ژلاتین به منظور رفع چالش های فوق الذکر طراحی گردید. **مواد و روش کار:** در این مطالعه تجربی، ابرجاذب ها به کمک کراس لینک شدن با کلسیم کلرید و سپس خشک شدن انجمادی تهیه شدند. خواص فیزیکی ابرجاذب های سنتز شده به ترتیب با استفاده از آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی و تست های درصد تخلخل و نسبت تورم مورد بررسی قرار گرفت. سازگاری سلولی ابرجاذب ها با استفاده از تست MTT ارزیابی گردید. عملکرد بندآورندگی برون تنی ابرجاذب ها با استفاده از تست های همولیز، شاخص انعقاد خون، چسبندگی گلبول های قرمز و پلاکت بررسی شد. سپس تست درون تنی جراحی رگ فمورال موش های صحرایی باهدف بررسی بازده بندآورندگی انجام گرفت. **یافته ها:** نتایج تست های عملکرد بندآورندگی برون تنی نشان داد که اسفنج های سنتز شده بندآورندگی بهتری نسبت به نمونه های تجاری دارند. نتایج تست سمیت سلولی نشان داد که ابرجاذب های آلژینات، ژلاتین و آلژینات-ژلاتین کاملاً غیر سمی بوده و به دلیل دارا بودن درصد زندهمانی بزرگ تر از ۸۹ درصد، سازگاری سلولی قابل توجهی دارند. در نهایت پس از انجام تست بندآورندگی درون تنی مشخص شد که ابرجاذب های سنتز شده عملکرد بهتری در کنترل خونریزی و کاهش زمان انعقاد نسبت به نمونه های تجاری دارند، به طوری که مقدار خون ازدست رفته و زمان انعقاد برای ابرجاذب بهینه آلژینات-ژلاتین ۱/۷۱ و ۱/۹۶ برابر نسبت به کیتوسل ۱/۳۷ و ۱/۵۵ برابر نسبت به ژلیتا کاهش یافت.

بحث و نتیجه گیری: با توجه به نتایج پژوهش جاری می توان نتیجه گیری کرد که ابرجاذب بهینه آلژینات-ژلاتین عملکرد بندآورندگی برون تنی و درون تنی قابل توجهی دارد. این نتایج نشان دهنده پتانسیل بالقوه این ابرجاذب برای ورود به مرحله مطالعات بالینی است.

کلیدواژه ها: آلژینات، خونریزی، خشک کردن انجمادی، ژلاتین، هموستاز، ابرجاذب

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و سوم، شماره دوازدهم، ص ۸۵۶-۸۳۹، اسفند ۱۴۰۱

آدرس مکاتبه: تبریز، گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تلفن: ۰۴۱۳۳۳۵۵۷۸۹

Email: roya.salehi@gmail.com

مقدمه

آسیب پذیرتر می کند (۴). اگرچه پروسه انعقاد طبیعی بدن انسان در پاسخ به خونریزی فعال می شود، اما در شرایط خونریزی گسترده ناتوان بوده و نیاز به یک عامل بندآورنده خارجی احساس می شود. یک عامل بندآورنده ایدئال علاوه بر توانایی کنترل سریع خونریزی، باید زیست سازگار، سبک، پایدار و ارزان باشد (۵، ۶).

در سال های اخیر، مواد متعددی به عنوان عامل بندآورنده خونریزی مورد استفاده قرار گرفته اند. به طور کلی، مواد بندآورنده

خونریزی حجیم و غیر قابل کنترل ناشی از جراحات و زخم ها در میدان جنگ، تصادفات و جراحی ها به یک مشکل سلامت جهانی مبدل شده است (۱، ۲). گزارش شده است که نصف تلفات نیروهای نظامی و یک سوم مرگومیر ناشی از جراحات در دنیا مربوط به عدم توانایی در کنترل خونریزی است (۳). ائتلاف خون در اثر خونریزی گسترده، قربانیان را در برابر سرمازدگی، عفونت و نارسایی اندام

^۱ کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

^۲ استادیار گروه مهندسی بافت، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ کارشناسی ارشد، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه تهران، تهران، ایران

^۴ دکتری، گروه شیمی آلی، دانشکده شیمی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

^{۵*} دانشیار گروه نانو تکنولوژی پزشکی، دانشکده علوم نوین پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسئول)

خون به دودسته آلی و غیر آلی تقسیم می‌شوند. ژئولیت، کائولین و سیلیکات‌ها از جمله بندآورنده‌های غیر آلی هستند. بندآورنده‌های غیر آلی دارای معایبی هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به سمیت، زیست تخریب ناپذیری، التهاب و سوختگی موضع زخم در اثر آزاد شدن گرما اشاره کرد (۷-۱۰). در طرف مقابل، بندآورنده‌های بر پایه مواد آلی قرار دارند که ریسک آلرژی‌زایی و آسیب عصبی به دلیل تورم بیش‌ازحد را دارند. به‌طور عمومی، مواد مورد استفاده به‌عنوان بندآورنده خون در کنار مزایایی که ارائه می‌دهند، دارای معایبی در موارد خاص از جمله: خونریزی‌های شدید و زخم‌های عمیق و بدون شکل می‌باشند. بنابراین، چالش موجود در این مرحله، انتخاب مؤثرترین ماده با کمترین معایب به‌عنوان عامل بندآورنده خون می‌باشد (۱۱-۱۳).

ژلاتین یک پلیمر آلی است که از پروتئین کلاژن مشتق شده و کاربردهای متعددی در صنایع غذایی، داروسازی و مهندسی دارد. خواص منحصر به فرد ژلاتین از جمله: زیست‌تخریب‌پذیری، زیست سازگاری، غیر سمی بودن، قیمت پایین و فراوانی در طبیعت، آن را به یکی از مواد بالقوه در کاربردهای زیست پزشکی تبدیل کرده است (۱۴، ۱۵). از لحاظ ساختاری، ژلاتین از توالی‌های تکراری گلايسین-پرولین-هیدروکسی پرولین تشکیل شده است. این توالی‌ها منجر به ایجاد ساختار سه‌گانه مارپیچی ژلاتین شده و خاصیت ژل شدن آن را ارتقا می‌دهد (۱۶، ۱۷). بسیاری از مطالعات نشان داده است که ژلاتین به دلیل توانایی بالا در جذب سیال و به تبع آن، تغلیظ گلبول‌های قرمز و فعال‌سازی پلاکت در موضع زخم، از خاصیت بندآورندگی قابل توجهی برخوردار می‌باشد (۱۸). با وجود مزایای متعدد ارائه‌شده، پایداری مکانیکی هیدروژل ژلاتین پایین می‌باشد. این امر، ضرورت ترکیب ژلاتین با یک پلیمر دیگر باهدف افزایش پایداری مکانیکی برای کاربرد بندآورندگی را می‌طلبد (۱۹، ۲۰).

آلزینات یک پلی ساکارید طبیعی آنیونی است که معمولاً از دیواره سلولی جلبک دریایی قهوه‌ای به دست می‌آید (۲۱). بار منفی آلزینات به گروه‌های کربوکسیلی و هیدروکسیلی موجود در ساختار آن نسبت داده می‌شود (۲۲). آلزینات و مشتقات آن شباهت‌های ساختاری زیادی با ماتریکس خارج سلولی بافت‌های زنده دارند. بنابراین می‌توان از آن برای انتقال عوامل زیست فعال مانند دارو، پروتئین و سلول‌های زنده استفاده کرد که کاربرد گسترده‌ای در بندآورندگی دارد (۲۳-۲۵).

از مزایای دیگر آلزینات می‌توان به ظرفیت جذب بالای آب، چسبندگی بافتی و ارتقای پایداری مکانیکی هیدروژل اشاره کرد. آلزینات از طریق واکنش کراس لینک شدن با یون‌های کلسیم و تبادل یونی با سیالات موجود در بدن، باعث تقویت پروسه

بندآورندگی خون می‌گردد (۲۸-۲۶). از طرفی، بار سطحی منفی موجود در ساختار آلزینات از طریق فعال‌سازی فاکتور XII انعقادی باعث تقویت خاصیت بندآورندگی می‌گردد (۲۹).

مواد بندآورنده با توجه به موضع خونریزی می‌توانند به شکل‌های مختلفی همچون: اسپری، پودر، ژل، محلول، رگ‌بند و ابرجاذب طراحی شوند (۳۵-۳۰). ابرجاذب‌ها شبکه‌های پلیمری سه‌بعدی هستند که توانایی جذب مقدار زیادی آب یا سیالات بیولوژیکی را دارند. این مواد به دلیل ظرفیت جذب آب بالا، انعطاف‌پذیری، زیست سازگاری و تشابه بالا با بافت‌های زنده، کاربرد گسترده‌ای در زمینه‌های پزشکی دارند (۳۸-۳۶). خشک‌کردن انجمادی، یکی از پرکاربردترین روش‌های مورد استفاده برای تهیه ابرجاذب می‌باشد (۳۹).

پروژه جاری باهدف طراحی بندآورنده‌های متخلخل با ظرفیت جذب خون بالا، زیست سازگار و بدون سمیت سلولی برای استفاده در کنترل خونریزی‌های گسترده طراحی شده است. پس از سنتز موفقیت‌آمیز ابرجاذب‌ها، بازده بندآورندگی برون تنی و درون تنی آن‌ها نیز مورد بررسی قرار می‌گیرد.

مواد و روش کار

مواد شیمیایی:

مواد مورد استفاده در این پژوهش شامل پلیمرهای سدیم آلزینات و ژلاتین، سورفکتانت‌های پلورونیک و تربیتون، نمک کلسیم کلرید و داروهای بیهوشی کتامین و زایلازین می‌باشد. سدیم آلزینات، ژلاتین و سورفکتانت غیر یونی (Pluronic F-68) از شرکت مواد شیمیایی سیگما-آلد ریچ خریداری شد. نمک کلسیم کلرید خشک و سورفکتانت (Triton X-100) از شرکت مرک تأمین گردید. کیت آزمایش LDH از بیمارستان رازی تبریز تهیه شد. داروهای بیهوشی کتامین و زایلازین از شرکت آلفاسان هلند تأمین شد. بندآورنده‌های تجاری ژلیتا و کیتوسل از داروخانه خریداری گردید.

سنتز ابرجاذب:

برای تهیه ابرجاذب پلیمری مطابق پژوهش‌های پیشین (۴۰)، ابتدا آلزینات (AI) و ژلاتین (Gel) با نسبت برابر و غلظت ۶ درصد جرمی محلول، به ۵ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه‌شده و برای حصول اطمینان از ایجاد یک محلول یکنواخت، به مدت ۲۴ ساعت روی همزن مغناطیسی در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد هم زده شد. سپس سورفکتانت Pluronic F-68 باهدف افزایش انعطاف و نرمی ابرجاذب و به مقدار ۱۰ درصد وزنی پلیمرها به محلول اضافه گردید. محلول حاصل‌شده به مدت ۲ ساعت در فریزر با دمای ۲۰- درجه

ارزیابی نسبت تورم:

برای حصول اطمینان از کامل شدن واکنش کراس لینک و همچنین تشکیل ساختار ژل، میزان تورم ابرجاذبها مورد بررسی قرار گرفت. برای انجام این کار، مقدار مشخصی از ابرجاذب خشک توزین شده و سپس در زمانهای مختلف درون محلول بافر فسفات سالین (PBS, pH=7/4) قرار گرفت. سپس ابرجاذب متورم از محلول PBS خارج شده و به وسیله ترازو وزن شد. شایان ذکر است که قبل از توزین، هیدروژل متورم طی مدت زمان مشخصی و در دمای محیط روی کاغذ صافی قرار داده شد تا مقدار آب اضافی آن جدا شود (۴۲). برای اطمینان از صحت داده‌های به دست آمده، این آزمایش سه بار انجام شده و در نهایت میزان تورم طبق رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{Swelling percentage (\%)} = \frac{W_w - W_d}{W_d} * 100$$

در این رابطه W_w و W_d به ترتیب بیانگر وزن ابرجاذب خشک و متورم بر حسب گرم می‌باشد.

تست برون تنی همولیز:

در این قسمت ۳ میلی گرم از ابرجاذبهای سنتز شده به میکروتیوب ۲/۵ میلی لیتری اضافه گردید. سپس ۲۰۰ میکرو لیتر خون تازه انسانی حاوی ماده ضد انعقاد به همراه ۸۰۰ میکرو لیتر محلول PBS اضافه گردید. محلول حاوی خون کامل و آب مقطر به عنوان گروه کنترلی مثبت و خون کامل به همراه محلول PBS به عنوان گروه کنترلی منفی در این تست مورد استفاده قرار گرفتند. همه نمونه‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور قرار گرفته و سپس با سرعت ۱۵۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفتند (۴۳). این آزمایش جهت اطمینان از دقت داده‌های به دست آمده، سه بار تکرار شد. در نهایت نرخ جذب محلول رویی با استفاده از دستگاه طیف سنج UV-Vis در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شده و نرخ همولیز با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$\text{Hemolysis (\%)} = \frac{\text{Sample ABS} - \text{Negative ABS}}{\text{Positive ABS} - \text{Negative ABS}} * 100$$

تست برون تنی انعقاد خون:

۵ میلی گرم از ابرجاذب درون پلیت‌های شیشه‌ای قرار داده شده و داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و به مدت ۱۵ دقیقه

سانتی گراد قرار گرفته و سپس به مدت ۲۴ ساعت در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد نگهداری شد تا از صلب بودن محلول اطمینان حاصل شود. در مرحله بعدی، محلول فریز شده به مدت ۱۵ دقیقه داخل محلول ۰/۲ مولار کلسیم کلرید نگهداری شد تا تحت واکنش کراس لینک شدن فیزیکی قرار گیرد. این کار با هدف ارتقای خاصیت بندآورندگی و همچنین تقویت مقاومت مکانیکی صورت گرفت. سپس محلول کراس لینک شده به منظور حذف کلسیم کلرید اضافی، پنج بار با آب مقطر شستشو داده شد. در نهایت، محلول فریز شده به منظور خشک شدن و ایجاد ساختار متخلخل، به مدت ۲۴ ساعت درون دستگاه خشک کن انجمادی قرار گرفت. برای انجام این کار، محلول کراس لینک شده ابتدا به مدت ۲۴ ساعت در فریزر با دمای ۸۰- درجه سانتی گراد قرار گرفته و سپس وارد دستگاه خشک کن انجمادی شدند. محصول به دست آمده با روش فوق، ابرجاذب پلیمری نامیده می‌شود. شایان ذکر است که ابرجاذبهای تکی آلزینات و ژلاتین نیز با روش توضیح داده شده سنتز می‌شوند، با این تفاوت که به جای مخلوط آلزینات و ژلاتین، هر کدام به صورت تکی و با غلظت ۶ درصد جرمی محلول داخل آب مقطر حل شدند.

روش‌های مشخصه یابی:

مورفولوژی سطحی ابرجاذبها و همچنین نحوه برهم کنش آن‌ها با سلول‌های خونی، با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FE-SEM) ساخت شرکت TESCAN کشور جمهوری چک صورت گرفت. برای افزایش رسانایی نمونه‌ها قبل از تصویربرداری، از پوشش طلا در حد چند نانومتر استفاده شد.

ارزیابی درصد تخلخل:

بدین منظور، ابتدا وزن ابرجاذبهای خشک اندازه گیری شده و سپس درون محلول اتانول در دمای اتاق و به مدت ۲۴ ساعت غوطه ور شدند. در مرحله بعدی وزن ابرجاذب اشباع از الکل به دست آمد. برای انجام این کار، الکل اضافی موجود در ساختار ابرجاذب به وسیله قرار دادن آن روی کاغذ صافی خارج گردید (۴۱). این آزمایش جهت اطمینان از دقت داده‌های به دست آمده، سه بار تکرار شده و مقدار تخلخل با استفاده از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\text{Porosity (\%)} = \frac{W - W_0}{\rho_0 V_0} * 100$$

در این رابطه W ، ρ_0 و V_0 به ترتیب بیانگر وزن ابرجاذب خشک، و وزن ابرجاذب اشباع از الکل بر حسب گرم، حجم ابرجاذب خشک و دانسیته اتانول می‌باشد.

گرم شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر خون انسانی تازه حاوی ماده ضد انعقاد روی ابرجاذبها ریخته شده و به مدت ۵ دقیقه دیگر داخل انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. سپس ۱۰ میلیلیتر آب مقطر به آرامی درون لولهها ریخته شد. ابرجاذبهای ژلیتا و کیتوسل به عنوان نمونههای تجاری مورد استفاده قرار گرفتند. شایان ذکر است که محلول حاوی ۱۰۰ میکرولیتر خون و ۱۰ میلیلیتر آب مقطر به عنوان نمونه مرجع مورد استفاده قرار گرفت (۴۴). این آزمایش جهت اطمینان از دقت دادههای به دست آمده، سه بار تکرار شد. در نهایت نرخ جذب محلول موجود در پلیتهای شیشه‌ای با استفاده از دستگاه طیف‌سنج UV-Vis در طول موج ۵۴۰ نانومتر خوانده شده و شاخص انعقاد خون، با استفاده از رابطه زیر به دست آمد:

$$BCI(\%) = \frac{\text{Sample ABS}}{\text{Reference ABS}} * 100$$

تست برون تنی چسبندگی گلبولهای قرمز:

برای بررسی میزان چسبندگی گلبولهای قرمز، ابتدا ۱۰ میلی گرم از ابرجاذب درون لوله شیشه‌ای قرار گرفت. سپس ۲۰۰ میکرولیتر از گلبولهای قرمز جدا شده به وسیله سانتریفیوژ کردن خون تازه حاوی ماده ضد انعقاد، روی هر کدام از ابرجاذبها ریخته شده و به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار گرفت. به منظور حذف گلبولهای قرمز نچسبیده، هر کدام از جاذبها سه بار با محلول PBS شسته شدند. برای همولیز گلبولهای قرمز چسبیده به ابرجاذب، ۵ میلیلیتر آب مقطر به لولههای شیشه‌ای افزوده شده و به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور قرار گرفتند. شایان ذکر است که محلول حاوی ۲۰۰ میکرولیتر خون و ۵ میلیلیتر آب مقطر به عنوان نمونه کنترل مثبت مورد استفاده قرار گرفت (۴۵). این آزمایش جهت اطمینان از دقت دادههای به دست آمده، سه بار تکرار شد. ابرجاذبهای ژلیتا و کیتوسل به عنوان نمونههای تجاری مورد استفاده قرار گرفتند. در نهایت نرخ جذب محلول رویی با استفاده از دستگاه طیف‌سنج UV-Vis خوانده شده و درصد گلبولهای قرمز چسبیده، با استفاده از رابطه زیر محاسبه گردید:

$$RBC \text{ attachment } (\%) = \frac{\text{Sample ABS}}{\text{Reference ABS}} * 100$$

تست برون تنی چسبندگی پلاکت:

برای بررسی میزان چسبندگی پلاکت روی ابرجاذبها، آنالیز لاکتات دهیدروژناز (LDH) مورد استفاده قرار گرفت. برای این

منظور، محلول پلاسما غنی از پلاکت، با سانتریفیوژ کردن خون انسانی تازه حاوی ماده ضد انعقاد به دست آمد. ابرجاذبها داخل میکروتیوب قرار داده شده و ۱۰۰ میکرولیتر محلول حاوی پلاکت روی هر کدام ریخته شده و به مدت ۱ ساعت درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد. برای لیز دادن پلاکتها، ابرجاذبها با محلول حاوی PBS و سورفکتانت Triton X-100 (۱ درصد جرمی) شستشو داده شده و به مدت ۱ ساعت دیگر درون انکوباتور قرار داده شد. در نهایت تعداد پلاکت‌های چسبیده روی سطح ابرجاذبها، با استفاده از کیت آزمایش LDH تعیین گردید. در این آزمایش، میکروتیوب حاوی ۱۰۰ میکرولیتر محلول غنی از پلاکت به عنوان نمونه کنترلی مثبت مورد استفاده قرار گرفت (۴۶). این آزمایش جهت اطمینان از دقت دادههای به دست آمده، سه بار تکرار شد.

بررسی مورفولوژی برهم کنش ابرجاذب با سلولهای خونی:

بدین منظور، ۱۰۰ میکرولیتر محلول پلاسما غنی از پلاکت روی ۵ میلی گرم از ابرجاذبها ریخته شده و درون انکوباتور در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد به مدت ۱ ساعت قرار گرفته و سپس با محلول PBS شستشو داده شد. در مرحله بعدی نمونهها پس از فیکس شدن به وسیله گلو تار آلدهید ۲/۵ درصد درون انکوباتور قرار گرفته و پس از خشک شدن، تحت عکسبرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی قرار گرفتند (۴۰).

تست برون تنی بررسی سمیت سلولی

مرحله کشت سلولی:

پس از تأمین ردههای سلولی فیبروبلاست (HFF2) از دانشگاه تبریز، محیط کشت آماده گردید. بدین صورت که محیط کشت کامل حاوی محلول DMEM، ده درصد حجمی سرم جنین گاوی (FBS) و ۱ درصد حجمی آنتی بیوتیک می باشد. سلولها پس از یخزدایی و افزودن محیط کشت کامل به تی فلاسک منتقل شده و به مدت ۴۸ ساعت درون انکوباتور با مشخصات: دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، جریان ۵ درصد کربن دی اکسید و رطوبت قرار گرفتند.

مرحله بررسی سمیت سلولی به روش MTT:

در این قسمت تعداد سلولهای فیبروبلاست زنده با استفاده از آنالیز MTT مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، سلولها داخل پلیت ۹۶ خانه کشت داده شده (۱۰۰۰۰ سلول به ازای هر چاهک) و سپس با هدف چسبیدن به کف چاهکها، به انکوباتور منتقل شدند. سپس ابرجاذبها درون محیط کشت جدید آماده شده و پس از

تخلیه محیط قبلی، به چاهک‌ها افزوده شدند. وزن ابرجاذب در هر چاهک ۱ میلی گرم می‌باشد. پلیت‌ها به انکوباتور منتقل شده و در زمان‌های ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت و ۷۲ ساعت مورد بررسی قرار گرفتند. در هر مرحله ۵۰ میکرولیتر محلول از هر چاهک حذف شده و محلول MTT درون هر چاهک قرار تزریق شده و به مدت ۳ ساعت درون انکوباتور قرار داده شد. سپس محتویات هر چاهک تخلیه شده و ۱۰۰ میلی لیتر حلال دی متیل سولفوکسید (DMSO) افزوده شده و کریستال‌های فرمازان درون آن با شیکر آزمایشگاهی حل شدند (۲۰). در نهایت تعداد سلول‌های زنده با استفاده از دستگاه الایزا تعیین گردید. این آزمایش جهت اطمینان از دقت داده‌های به دست آمده، سه بار تکرار شد. معادله زیر برای محاسبه درصد زنده‌مانی سلول‌های زنده در حضور ابرجاذب‌های سنتز شده مورد استفاده قرار گرفت:

$$\text{Cell viability}(\%) = \frac{\text{Sample ABS}}{\text{Control ABS}} * 100$$

تست درون تنی بررسی عملکرد بندآورندگی ابرجاذب

مرحله پیش جراحی:

این مطالعه با کد اخلاقی IR-TBZMED-VCR-REC.1401.245 در دانشگاه علوم پزشکی تبریز به تصویب رسیده است. این تست باهدف بررسی میزان بندآورندگی خونریزی ابرجاذب‌ها در اثر برش ایجاد شده در ناحیه رگ فمورال (رگ موجود در کشاله ران) انجام شد. برای انجام این کار، ۱۸ عدد موش صحرایی ماده سالم از نژاد ویستار در بازه وزنی ۲۵۰-۳۰۰ گرم از مزرعه پرورش حیوانات جوندگان شاد تهیه گردید. موش‌ها در قفس‌های جداگانه و در شرایط استاندارد از لحاظ دما، نور و رطوبت نگهداری شدند. خاکاره و پنبه به عنوان بستر موش‌ها مورد استفاده قرار گرفت. همچنین موش‌ها دسترسی کافی به غذا و آب داشتند. از کتامین و زایلازین با نسبت ۵ به ۱ به عنوان داروی بیهوشی موش‌ها بهره گرفته شد. رعایت اخلاق رفتار با حیوانات بر اساس مصوبات کمیته اخلاق کار با حیوانات آزمایشگاهی صورت گرفته است.

مرحله جراحی:

پس از حصول اطمینان از بیهوشی کامل، موش‌ها را به پشت خوابانده و موهای موجود در ناحیه رگ فمورال تراشیده شده و با استفاده از بتادین و گاز استریل ضد عفونی گردید. سپس با برداشتن پوست ناحیه جراحی و ماهیچه‌های پوشاننده، رگ فمورال در معرض

دید قرار گرفت. به منظور ایجاد خونریزی با فشارقوی، رگ ناحیه فمورال بریده شد. بلافاصله ۲۰۰ میلی گرم از ابرجاذب‌های ژلاتین، آلژینات، آلژینات-ژلاتین، نمونه‌های تجاری ژلینا و کیتوسل روی محل آسیب قرار داده شد تا از بروز خونریزی جلوگیری کنند (۴۰). ذکر این نکته ضروری است که در گروه کنترلی، هیچ مداخله‌ای صورت نپذیرفت و جریان خونریزی ایجاد شده به صورت طبیعی قطع شد. در نهایت میزان اتلاف خون و زمان قطع خونریزی (از زمان قرار دادن ابرجاذب روی موضع آسیب تا قطع کامل خونریزی) تحت عنوان پارامترهای بندآورندگی، ثبت و گزارش گردید. این آزمایش جهت اطمینان از دقت داده‌های به دست آمده، سه بار تکرار گردید.

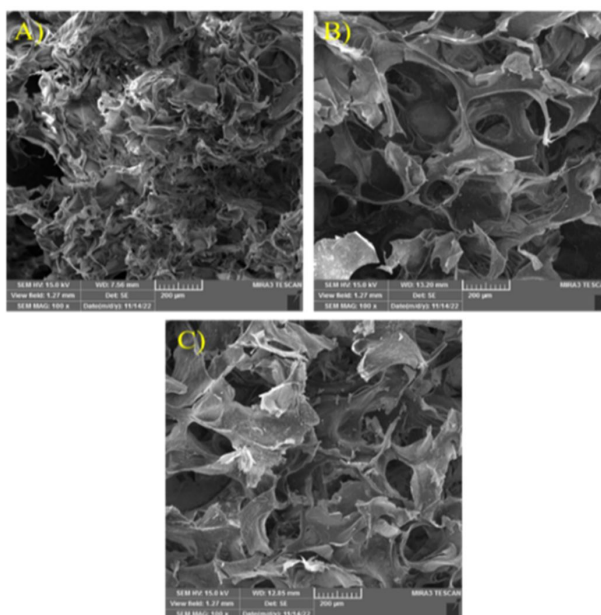
آنالیز آماری:

آنالیز آماری داده‌ها در مطالعه جاری با استفاده از نرم افزار origin pro نسخه ۹/۹ انجام گرفت. برای اطمینان از صحت داده‌ها، هر کدام از تست‌ها سه بار انجام شده و داده‌های کمی به صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار (S.D.) نمایش داده شدند. مقدار اختلاف معنی‌دار بین گروه‌ها، توسط آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA) و سپس به وسیله آزمون Tukey به دست آمد. از طرفی $P < 0.05$ value تحت عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته می‌شود.

یافته‌ها

مشخصه یابی مواد:

در شکل ۱، تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی ابرجاذب‌های سنتز شده نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، ابرجاذب‌های سنتز شده آلژینات، ژلاتین و آلژینات-ژلاتین دارای ساختار متخلخل بوده و از حفره‌های به هم پیوسته و بی‌نظم با اندازه بین ۱۰۰ الی ۳۰۰ میکرومتر تشکیل شده‌اند. دلیل گستردگی اندازه حفرات، به تفاوت نرخ انتقال حرارت عبوری از ساختار سه بعدی ابرجاذب حین روش خشک کردن انجمادی نسبت داده می‌شود. به طور کلی، تعداد هسته‌های کریستالی تشکیل شده در دماهای بالاتر نسبت به دماهای پایین‌تر کمتر می‌باشد که افزایش اندازه حفرات را در پی دارد (۴۷). تعداد بالای حفرات و همچنین به هم پیوستگی آن‌ها در نمونه‌های سنتز شده، تأثیر بسزایی در پارامترهای فیزیکی همچون: درصد تخلخل، سطح تماس و ظرفیت جذب سیال دارد که همه این موارد منجر به ارتقای خاصیت بندآورندگی ابرجاذب می‌گردد.

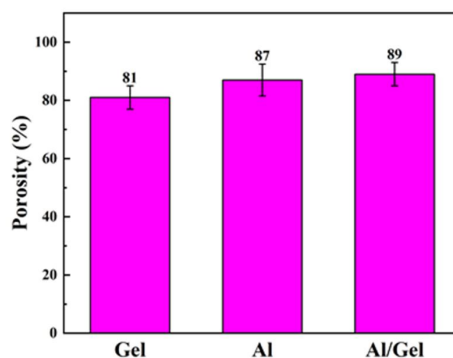


شکل (۱): تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی ابرجاذب‌های سنتز شده (A) ژلاتین (B) آلزینات (C) آلزینات-ژلاتین

درصد تخلخل:

نتایج حاصل از اندازه‌گیری درصد تخلخل (شکل ۲)، نشان‌دهنده تخلخل بالای ابرجاذب‌های آلزینات (۸۷ درصد)، ژلاتین (۸۱ درصد) و آلزینات-ژلاتین (۸۹ درصد) بوده و در تطابق با تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی می‌باشد. درصد تخلخل

ساختار ابرجاذب رابطه مستقیمی با عملکرد بندآورندگی دارد. بدین شکل که هر چه تخلخل موجود در ساختار بیشتر باشد، اجزای تشکیل‌دهنده خون بهتر و بیشتر تغلیظ شده و پروسه انعقاد خون سرعت بیشتری به خود می‌گیرد که ماحصل همه این موارد ارتقای بازده بندآورندگی می‌باشد (۴۸).



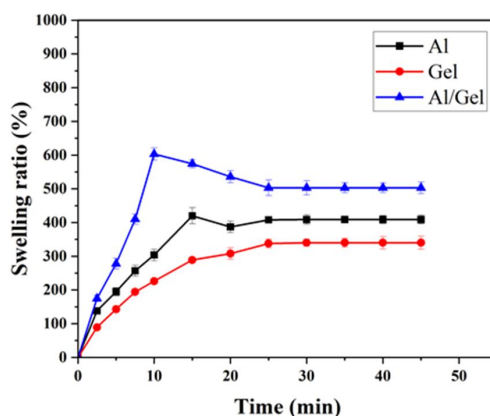
شکل (۲): درصد تخلخل ابرجاذب‌های سنتز شده. اختلاف معنی‌داری بین گروه‌های مورد مطالعه و گروه کنترل مشاهده نشد.

نسبت تورم:

آسان‌ترین و ارزان‌ترین راه برای ارزیابی ظرفیت جذب سیال توسط یک بندآورنده، بررسی میزان تورم آن ماده می‌باشد. ظرفیت جذب بالای سیال توسط یک ماده، منجر به تغلیظ بیشتر اجزای تشکیل‌دهنده خون در موضع زخم شده و فرایند انعقاد خون را

تقویت می‌کند (۴۹). در این قسمت، محلول PBS برای بررسی ظرفیت جذب سیال مورد استفاده قرار گرفت. در شکل ۳ نسبت تورم ابرجاذب‌های سنتز شده نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، نسبت تورم برای ابرجاذب‌های ژلاتین، آلزینات و آلزینات-ژلاتین بعد از ۴۵ دقیقه به ترتیب

نتایج به دست آمده از بررسی درصد تخلخل منطبق است. 19 ± 340 ، 13 ± 409 و 17 ± 503 درصد می باشد که با

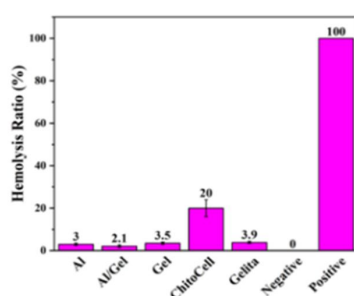
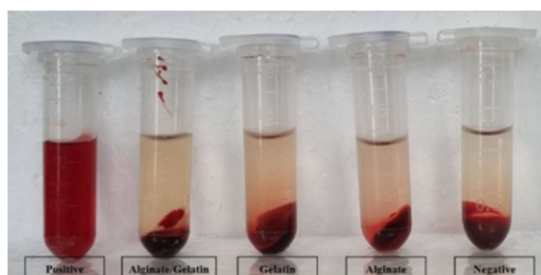


شکل (۳): درصد تورم ابرجاذب‌های سنتز شده بر حسب زمان

۳، ۵/۳ و ۱/۲ درصد است که کمتر از حد استاندارد جهانی می باشد. دلیل مقدار کم نسبت همولیز برای ابرجاذب‌ها را می توان به منشأ طبیعی پلی ساکاریدهای تشکیل دهنده آن ها نسبت داد. همچنین مقدار نسبت همولیز برای نمونه های تجاری ژلیتا و کیتوسل به ترتیب ۹/۳ و ۲۰ درصد می باشد که نشان از زیست سازگاری نامناسب کیتوسل دارد. به طور کلی، نتایج این آزمایش مشخص کرد که ابرجاذب‌های سنتز شده، سازگاری مناسبی با خون دارند.

تست های برون تنی خونی

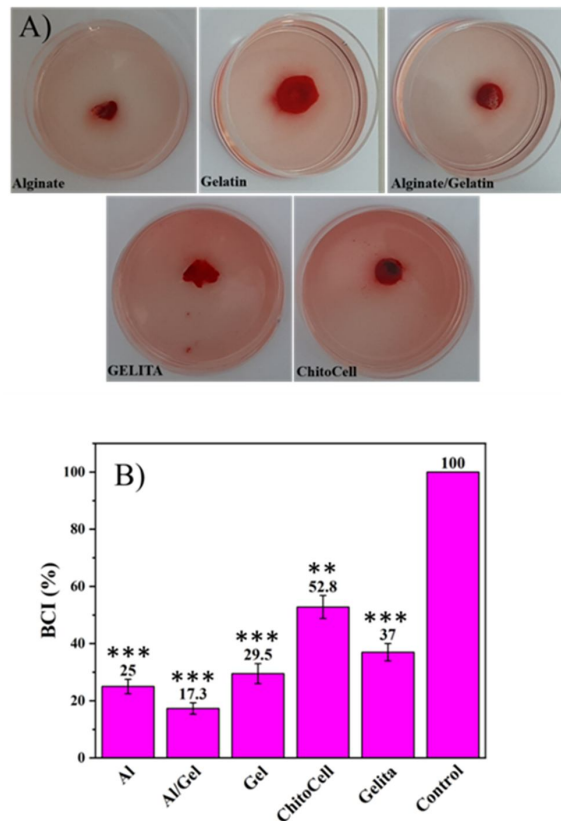
تست همولیز: بهترین روش برای بررسی میزان زیست سازگاری ابرجاذب‌های سنتز شده با خون، محاسبه نسبت همولیز می باشد (۵۰). بر اساس استانداردهای جهانی، ابرجاذب سازگار با خون، دارای نسبت همولیز کمتر از ۵ درصد می باشند (۵۱، ۵۲). همان طور که در شکل ۴ مشخص است، نسبت همولیز برای ابرجاذب‌های سنتز شده آلژینات، ژلاتین و آلژینات-ژلاتین به ترتیب



شکل (۴): نسبت همولیز گروه های حاوی ابرجاذب های مختلف. خون کامل و آب مقطر به عنوان گروه کنترلی مثبت و خون کامل به همراه محلول PBS به عنوان گروه کنترلی منفی انتخاب شدند. اختلاف بین همه گروه های درمان و گروه کنترل مثبت معنادار با $P\text{-value} < 0.001$ می باشد همچنین تفاوت درصد همولیز همه گروه ها با نمونه تجاری ChitoCell معنی دار با $P\text{-value} < 0.001$ می باشد.

تست شاخص انعقاد خون (BCI): یکی از مصادیق بندآورندگی مناسب، کیفیت انعقاد خون توسط زیست مواد می باشد که توسط تست BCI کمی می شود. این تست معیاری از تشکیل لخته سریع و پایدار توسط زیست ماده در موضع خونریزی می باشد. به طور کلی هر چه شاخص BCI کمتر باشد، توانایی ماده بندآورنده در انعقاد خون بالاتر است (۵۳، ۵۴). مقادیر نشان داده شده برای شاخص BCI در شکل ۵، حاکی از توانایی بالاتر انعقاد خون توسط ابرجاذب های سنتز شده نسبت به نمونه های تجاری می باشد. دلیل

این امر، تخلخل بیشتر ابرجاذب های سنتز شده نسبت به نمونه های تجاری می باشد. در بین ابرجاذب های سنتز شده نیز بهترین شاخص انعقاد خون متعلق به نمونه آلژینات-ژلاتین با ۱۷/۳ درصد است. به طور کلی، وقتی خون در تماس نمونه های متخلخل قرار می گیرد، حفرات موجود در سطح، خون را به سمت داخل ماده هدایت می کند. با جریان یافتن خون در داخل ماده، آب موجود در خون جذب میکرو حفره ها شده و غلظت دیگر مواد تشکیل دهنده خون افزایش می یابد. نتیجه همه این موارد، انعقاد بهتر خون می باشد.



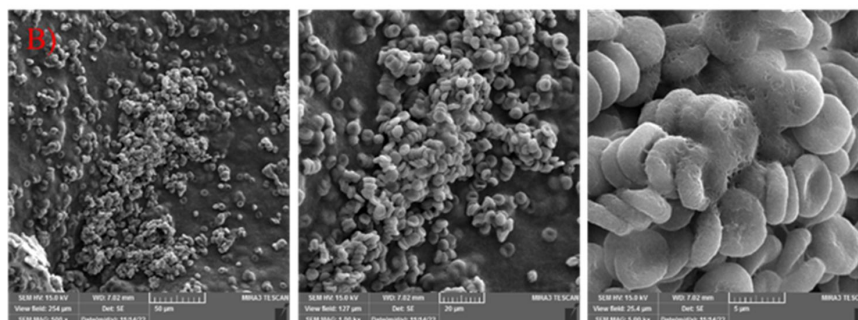
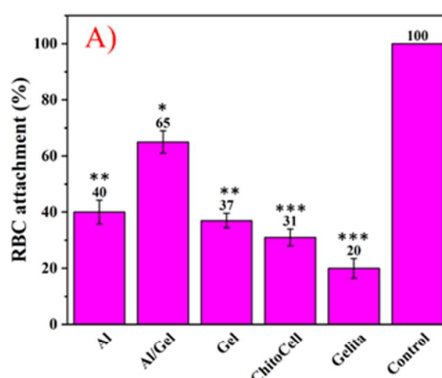
شکل (۵): شکل لخته خون بعد از لیز شدن در حضور ابرجاذب های سنتز شده مختلف (B) درصد شاخص انعقاد خون برای ابرجاذب های سنتز شده مختلف. نمونه مرجع محلول حاوی ۱۰۰ میکرو لیتر خون و ۱۰ میلی لیتر آب مقطر می باشد. علامت * نشان دهنده $P\text{-value} < 0.05$ ، ** نشان دهنده $P\text{-value} < 0.01$ و *** نشان دهنده $P\text{-value} < 0.001$ می باشد. همه این موارد بیانگر وجود اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترلی می باشد.

تست چسبندگی گلبول های قرمز: در این قسمت، توانایی جذب گلبول های قرمز توسط ابرجاذب های سنتز شده با استفاده از تست میزان چسبندگی RBC بررسی گردید. بدین منظور و باهدف کم کردن تأثیر پروتئین های فعال کننده پروسه انعقاد و پلاکت ها، صرفاً

گلبول های قرمز جدا شده مورد استفاده قرار گرفت (۴۰). نتایج حاصل از جذب گلبول های قرمز توسط ابرجاذب ها و نمونه های تجاری در شکل 6.A نشان داده شده است. مقادیر به دست آمده جذب گلبول های قرمز توسط ابرجاذب های آلژینات، ژلاتین،

آلژینات-ژلاتین و نمونه‌های تجاری ژلیتا و کیتوسل به ترتیب برابر ۴۰، ۳۷، ۶۵، ۲۰ و ۳۱ درصد می‌باشد. نتایج حاصل شده، حاکی از عملکرد بهتر ابرجاذب‌های سنتز شده نسبت به نمونه‌های تجاری در جذب گلبول‌های قرمز می‌باشد. دلیل این مورد را می‌توان به تخلخل بالاتر نمونه‌های سنتز شده نسبت داد که به تبع آن، سطح تماس و ظرفیت جذب گلبول‌های قرمز توسط ابرجاذب افزایش می‌یابد. در بین ابرجاذب‌های سنتز شده نیز بهترین عملکرد متعلق به نمونه

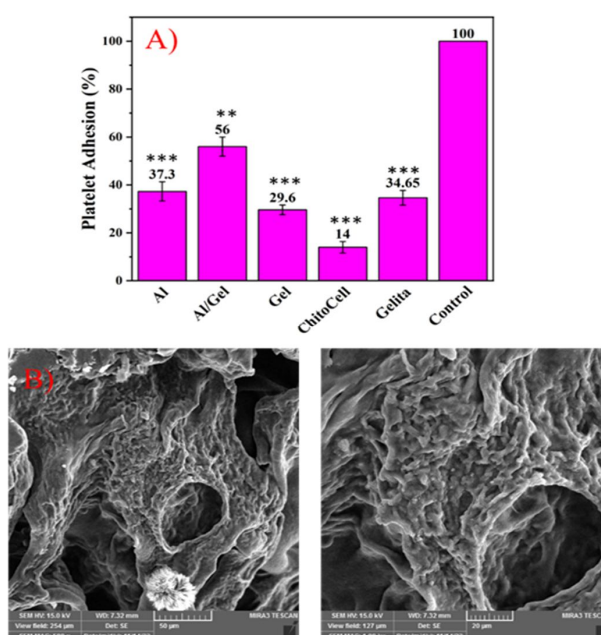
آلژینات ژلاتین با ۶۵ درصد چسبندگی گلبول‌های قرمز می‌باشد. همچنین چسبندگی گلبول‌های قرمز در نمونه بهینه آلژینات-ژلاتین به صورت کیفی نشان داده شده است. هملنطور که در تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی موجود در شکل 6.B مشخص است، گلبول‌های قرمز به طور قابل توجهی روی سطح ابرجاذب آلژینات-ژلاتین قرار گرفته‌اند.



شکل (۶): (A) درصد چسبندگی گلبول‌های قرمز برای ابرجاذب‌های مختلف (B) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی گرفته شده از تجمع و چسبندگی گلبول‌های قرمز روی ابرجاذب بهینه آلژینات-ژلاتین. علامت * نشان‌دهنده $P\text{-value} < 0.05$ ، ** نشان‌دهنده $P\text{-value} < 0.01$ و *** نشان‌دهنده $P\text{-value} < 0.001$ می‌باشد. همه این موارد بیانگر وجود اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترلی می‌باشد.

تست چسبندگی پلاکت: به‌طور کلی، چسبندگی و فعال‌سازی پلاکت‌ها منجر به شروع واکنش‌های آنزیمی و تسهیل ایجاد ترومبین شده و در نهایت ارتقای خاصیت بندآورندگی را در پی دارد (۲۰، ۵۵). در این قسمت عملکرد ابرجاذب‌های سنتز شده در چسبندگی و فعال‌سازی پلاکت‌ها به هر دو صورت کمی و کیفی تعیین گردید. در قسمت اول، تعداد پلاکت‌های چسبیده به ابرجاذب به‌طور کمی و با استفاده از تست LDH تعیین گردید. مشخصاً مقدار LDH بیشتر، نشان‌دهنده تعداد پلاکت‌های فعال شده بیشتر می‌باشد. نتایج ارائه شده در شکل 7.A، بیانگر عملکرد مناسب ابرجاذب آلژینات-ژلاتین (۵۶ درصد) نسبت به ابرجاذب‌های سنتز شده

آلژینات (۳۷/۳ درصد)، ژلاتین (۲۹/۶ درصد) و نمونه تجاری کیتوسل (۱۴ درصد) و ژلیتا (۳۴/۶۵ درصد) در جذب پلاکت می‌باشد. در قسمت دوم، چسبندگی و فعال‌سازی پلاکت در ابرجاذب بهینه آلژینات-ژلاتین با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی و به صورت کیفی نشان داده شده است. در شکل 7.B، تعداد زیادی از پلاکت‌های فعال شده روی سطح ابرجاذب آلژینات-ژلاتین قابل مشاهده می‌باشد. تخلخل بالای ارائه شده توسط ابرجاذب آلژینات ژلاتین، باعث جذب، فعال‌سازی و تجمع پلاکت‌ها می‌گردد.

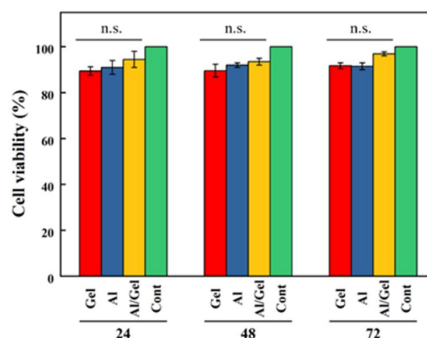


شکل (۷): (A) درصد چسبندگی پلاکت در حضور ابرجاذب‌های مختلف (B) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی گرفته شده از تجمع و چسبندگی گلبول‌های قرمز روی ابرجاذب بهینه آلژینات-ژلاتین. علامت * نشان‌دهنده $P\text{-value} < 0.05$, ** نشان‌دهنده $P < 0.01$ و *** نشان‌دهنده $P\text{-value} < 0.001$ می‌باشد. همه این موارد بیانگر وجود اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترلی می‌باشد.

تست سمیت سلولی:

فیبروبلاست در حضور ابرجاذب‌های سنتز شده و در روزهای اول و دوم و سوم، بالاتر از ۸۹ درصد است که نشان از غیرسمی بودن ابرجاذب‌های سنتز شده آلژینات، ژلاتین و آلژینات ژلاتین دارد. نتایج این تست در تطابق با یافته‌های به دست آمده از پژوهش‌های پیشین مبنی بر غیرسمی بودن پلیمرهای طبیعی آلژینات و ژلاتین می‌باشد (۲۰، ۲۵، ۵۹). از طرفی آنالیز آماری، نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف معنادار بین گروه کنترلی و گروه‌های حاوی ابرجاذب‌های سنتز شده می‌باشد.

مهم‌ترین پارامترهای یک زیست ماده ایدئال، می‌توان به غیرسمی بودن یا حداقل سمیت ایجاد شده توسط آن در بدن اشاره کرد. برای بررسی این پارامتر، تست سمیت سلولی مورد استفاده قرار می‌گیرد که اساس آن، محاسبه درصد زنده‌مانی سلول‌های زنده با استفاده از روش رنگ سنجی و بر مبنای کاهش واکنش‌دهنده MTT می‌باشد (۵۶، ۵۷، ۵۸). نتایج حاصل از تست سمیت سلولی برای ابرجاذب‌های سنتز شده در شکل ۸ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل نیز مشخص است، نسبت زنده‌مانی سلول‌های

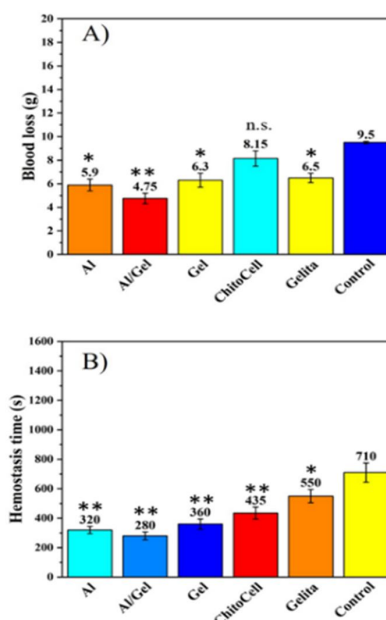


شکل (۸): درصد زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست در حضور ابرجاذب‌های مختلف در روزهای اول و دوم و سوم. n.s. بیانگر عدم وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترلی می‌باشد.

تست درون تنی حیوانی:

برای ارزیابی بازده بندآوری ابرجاذب‌های سنتز شده به صورت درون تنی، رگ فمورال موش‌های ماده به عنوان حیوان مدل قطع شده و مقدار اتلاف خون به همراه زمان بندآوری به عنوان دو پارامتر اساسی گزارش شدند. دلیل قطع ناحیه فمورال، بالا بودن نرخ مرگومیر حاصل از آن به دلیل ایجاد جریان خونریزی پرفشار و پیوسته می‌باشد. نتایج به دست آمده در شکل ۹ نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، زمان بندآوری و اتلاف خون برای گروه کنترلی به ترتیب ۷۱۰ ثانیه و ۹/۵ گرم می‌باشد. با قرار دادن ابرجاذب‌های سنتز شده و نمونه تجاری ژلیتا هر دو پارامتر بندآوری به طور قابل توجهی کاهش یافتند. در این

بین بهترین عملکرد متعلق به ابرجاذب آلژینات ژلاتین است که به ترتیب دارای زمان بندآوری ۲۸۰ ثانیه و میزان اتلاف خون ۴/۷۵ گرم می‌باشند. از طرفی ضعیف‌ترین عملکرد متعلق به نمونه تجاری کیتوسل می‌باشد. نتایج به دست آمده نشانگر عملکرد بهتر ابرجاذب‌های سنتز شده نسبت به نمونه‌های تجاری می‌باشد. دلیل این مورد را می‌توان به تخلخل بالاتر، سطح تماس بیشتر و ظرفیت جذب سیال بالاتر ابرجاذب‌های سنتز شده نسبت داد که حاصل همه این موارد، تغلیظ فاکتورهای انعقادی و تجمع پلاکت‌ها و گلبول‌های قرمز در موضع زخم و نتیجتاً عملکرد بندآوری بهتر آن‌ها نسبت به نمونه‌های تجاری می‌باشد (۶۰، ۶۱).



شکل (۹): پارامترهای بندآوری ابرجاذب‌های مختلف (A) مقدار اتلاف خون در حضور ابرجاذب‌های مختلف (B) زمان بندآوری خونریزی در حضور ابرجاذب‌های مختلف. علامت * نشان‌دهنده $P\text{-value} < 0.05$ ، ** نشان‌دهنده $P\text{-value} < 0.01$ و *** نشان‌دهنده $P\text{-value} < 0.001$ می‌باشد. همه این موارد بیانگر وجود اختلاف معنادار در مقایسه با گروه کنترلی می‌باشد. n.s. بیانگر عدم وجود اختلاف معنادار نسبت به گروه کنترلی است.

بحث

در طی سال‌های اخیر، مواد بندآورنده با مکانیسم‌های بندآوری مختلف توسعه داده شده‌اند. بندآورنده‌های رایج مثل ژنولیت یا اسفنج‌های سه‌بعدی با استفاده از خاصیت جذب بالای خون، به پروسه انعقاد خون کمک می‌کنند. در طرف مقابل، بندآورنده‌های بر پایه آلژینات و کیتوسان از طریق بار سطحی‌شان باعث انعقاد خون می‌شوند. بندآورنده‌های تجاری موجود در بازار مثل

ژلیتا یا کیتوسل علی‌رغم تأثیری که در پروسه بندآوری دارند، در کنترل خونریزی‌های گسترده ناشی از زخم‌های عمیق و بی‌شکل ناکارآمد هستند. به‌طور کلی از جمله خواص یک بندآورنده ایده‌آل می‌توان به قدرت بندآوری بالا در خونریزی‌های ناشی از رگ‌های حجیم، روش سنتز ساده، پایدار و ارزان بودن اشاره کرد. همه این موارد ضرورت توسعه مواد بندآورنده با خصوصیات فوق‌الذکر جهت استفاده در خونریزی‌های گسترده را می‌طلبد (۶۲).

با جراحی جزئی رگ (سوراخ کردن) و اعمال فشار موردبررسی قرار گرفته است که ماحصل هر دوی این موارد کاهش فشار خونریزی می‌باشد. در این پژوهش، رگ فمورال به‌طور کامل قطع شده و همچنین هیچ فشاری روی رگ اعمال نگردید.

ژانگ و همکاران اسفنج‌هایی از جنس کیتوسان آلکیل‌دار و گرافن اکساید تهیه کردند. سپس بازده بندآوری اسفنج‌های سنتز شده را در مقایسه با نمونه تجاری سلوکس به‌عنوان گروه کنترلی موردبررسی قرار دادند. زمان بندآوری و مقدار اتلاف خون برای نمونه بهینه ACGS20 بعد از قرار دادن آن روی موضع خونریزی، ۱/۲۲ و ۲/۸ (۱۳۴/۶۴) ثانیه و ۳/۱۷ گرم برابر نسبت به نمونه تجاری سلوکس (۱۶۴/۵۲) ثانیه و ۸/۸۴ گرم) کاهش یافت. شایان‌ذکر است که جراحی رگ فمورال در این پژوهش به شکل جزئی و با ایجاد برش طولی انجام شد و در طول آزمایش حیوانی، فشار ثابتی روی موضع خونریزی اعمال گردید. بدیهی است که هر دوی این موارد منجر به کاهش خونریزی می‌گردند. اما در پروژه جاری، رگ فمورال به‌طور کامل قطع شده و هیچ فشاری روی موضع خونریزی اعمال نگردید (۶۵).

ژیاو و همکاران اسفنج حاوی کیتوسان و سلولز آلدهیددار را سنتز کرده و عملکرد بندآوری آن را با قطع دم موش مورد ارزیابی قرار دادند. نتیجه تست حیوانی بیانگر کاهش قابل‌توجه زمان بند آوردگی و میزان اتلاف خون برای نمونه بهینه کیتوسان-سلولز آلدهیددار نسبت به نمونه‌های کنترلی سلوکس و گاز پانسمانی می‌باشد. به‌طوری‌که زمان بندآوری نمونه بهینه ۱۶۳/۳ ثانیه و مقدار اتلاف خون ۵۰ میلی‌گرم می‌باشد. نکته‌ای که باید بدان توجه نمود این است که بررسی عملکرد بندآوری در پژوهش ژیاو و همکاران با عمل جراحی دم موش انجام شده است که دارای خونریزی بسیار جزئی می‌باشد. از طرفی جراحی روی موش‌های به وزن ۳۵ گرم انجام شده است. بدیهی است که خونریزی حاصله در صورت عدم استفاده از بندآورنده نیز بسیار پایین خواهد بود. زمان بندآوری و میزان اتلاف خون برای گروه کنترلی (بدون استفاده از بندآورنده) به ترتیب ۸۰۰ ثانیه و ۴۰۰ میلی‌گرم گزارش شده است که خود گواهی بر این مدعا است. اما بررسی بازده بندآوری در پژوهش ما، با قطع کامل رگ فمورال در موش‌های صحرایی به وزن ۲۰۰-۲۵۰ گرم صورت گرفته است (۶۶).

گوانگجیان و همکاران، از ترکیب ژلاتین و کیتوسان برای سنتز اسفنج با خاصیت بندآوری استفاده کردند. برای بررسی تأثیر این ماده روی بازده بندآوری، کبد خرگوش را سوراخ کرده و اسفنج سنتز شده را روی موضع خونریزی قرار دادند. همچنین در طول آزمایش حیوانی، یک وزنه ۲۰۰ گرمی را باهدف اعمال فشار روی بندآورنده در موضع خونریزی گذاشتند. زمان بندآوری و مقدار

در این پژوهش، ابرجاذب‌های پلیمری آلژینات، ژلاتین و آلژینات-ژلاتین پس از کراس لینک شدن با کلسیم کلرید و قرار گرفتن داخل دستگاه خشک‌کن انجمادی تهیه شده و به‌عنوان مواد بندآورنده خونریزی مورد استفاده قرار گرفتند. وجود هم‌زمان پلیمرهای آلژینات و ژلاتین در موجب تلفیق خواص هر کدام در ابرجاذب آلژینات-ژلاتین می‌شود که ارتقای خاصیت بندآوری را در پی دارد. کراس لینک شدن با کلسیم کلرید و قرار گرفتن داخل دستگاه خشک‌کن انجمادی منجر به ارتقای پایداری و افزایش تخلخل ابرجاذب‌ها شده و به‌تبع آن، توانایی جذب سیال توسط ابرجاذب‌ها را افزایش می‌دهد (۲۰). همچنین تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی و نتایج حاصل از تست‌های درصد تخلخل و نسبت تورم حاکی از تخلخل بالای ابرجاذب‌های سنتز شده می‌باشد.

تست‌های برون تنی خونی همولیز و شاخص انعقاد خون نشان از خون سازگاری و قدرت انعقاد بالای خون توسط ابرجاذب‌های پلیمری دارد. از تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی و تست‌های چسبندگی گلبول‌های قرمز و پلاکت مشخص است که پلاکت‌های فعال شده و گلبول‌های قرمز به‌طور قابل‌توجهی به سطح آن چسبیده‌اند. همچنین سازگاری سلولی ابرجاذب‌های سنتز شده با استفاده از تست MTT اثبات گردید. درنهایت، نتایج تست درون تنی جراحی رگ فمورال در تطابق با تست‌های قبلی بوده و نشان‌دهنده قدرت بندآوری ابرجاذب‌های سنتز شده علی‌الخصوص آلژینات-ژلاتین می‌باشد.

می‌توان نتیجه گرفت که ابرجاذب‌های سنتز شده با استفاده از دو مکانیزم قدرت جذب بالا و تحریک بار سطحی منجر به ارتقای عملکرد بندآوری می‌شوند. ظرفیت جذب سریع و بالای خون توسط ابرجاذب‌ها منجر به تجمع و تغلیظ سلول‌های خونی در موضع زخم شده و به انعقاد خون کمک می‌کند. از طرفی فاکتور XII از طریق برهم کنش با بار سطحی منفی ناشی از حضور آلژینات، تغییر شکل داده و به فاکتور XIIa تبدیل می‌شود. فاکتور XIIa منجر به فعال‌سازی پروسه طبیعی انعقاد خون می‌گردد (۶۳، ۶۴).

برای ارزیابی و مقایسه عملکرد ابرجاذب‌های سنتز شده با کارهای قبلی، دو مورد باید لحاظ شود. مورد اول محل جراحی و مورد دوم روش جراحی می‌باشد. هر دوی این موارد مقدار خونریزی و زمان بندآوری را تحت تأثیر قرار می‌دهد. بازده بندآوری در پروژه جراحی، با قطع کامل رگ فمورال و به‌تبع آن ایجاد جریان خونریزی پرفشار و پیوسته انجام شده است. در حالیکه در برخی از پروژه‌ها که در ادامه بدان اشاره خواهد شد، ارگان‌هایی از بدن مورد جراحی قرار گرفته‌اند که خونریزی بسیار کمتری نسبت به رگ فمورال ایجاد می‌کنند. همچنین در برخی موارد، بازده بندآوری

ژلاتین دارای بارده بندآورندگی قابل توجهی می باشد که دلیل این امر، تخلخل بالای آن و همچنین اثر هم افزایی پلیمرهای آلژینات و ژلاتین می باشد. همچنین نتایج تست MTT مشخص کرد که ابرجاذب های سنتز شده برای سلول های فیبروبلاست کاملاً غیرسمی بوده و بالاترین درصد زنده مانی سلولی در بین نمونه های مورد بررسی متعلق به ابرجاذب بهینه آلژینات-ژلاتین می باشد. همچنین در تمامی تست های انجام شده در این پژوهش، ابرجاذب های سنتز شده برتری قابل توجهی نسبت به نمونه های تجاری کیتوسل و ژلیتین نشان دادند. پیشنهادات برای انجام پژوهش های آتی به شرح زیر ارائه می گردد: استفاده از نانوذرات در ماده بندآورنده، افزودن مواد دارای خاصیت آنتی باکتریایی به بندآورنده و بررسی سایر روش های سنتز جهت افزایش تخلخل ماده. همچنین مشکلات و موانع اصلی در انجام طرح پژوهشی فوق تهیه نمونه تجاری وارداتی بود که به دلیل تحریم دسترسی محدود بود و همچنین در تهیه داروی بیپوشی کتامین و زایلازین محدودیت داشتیم.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مطالعه از حمایت مستمر دانشکده علوم نوین پزشکی و معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز از این پژوهش کمال تشکر را دارند.

اتلاف خون برای نمونه کیتوسان-ژلاتین به ترتیب ۳۹/۳ ثانیه و ۴/۷ گرم می باشد که بیانگر کاهش قابل توجه در مقدار این دو پارامتر نسبت به نمونه های کنترلی می باشد. مشخصاً در این پژوهش نیز انتخاب کبد به عنوان عضو جراحی و سوراخ کردن آن و همچنین اعمال فشار روی موضع خونریزی، تماماً منجر به کاهش فشار خونریزی شده اند. حال آنکه در پژوهش ما، بررسی عملکرد بندآورندگی در قطع کامل فمورال و بدون هیچگونه مداخله در شدت خونریزی انجام شده است (۲۰).

با مقایسه قدرت بندآورندگی درون تنی ابرجاذب های سنتز شده در پژوهش جاری و بندآورنده های تهیه شده در پژوهش های پیشین، می توان نتیجه یافت که ابرجاذب بهینه آلژینات-ژلاتین عملکرد بهتری در کنترل خونریزی های شدید دارا می باشد.

نتیجه گیری

در این مطالعه، ابرجاذب های آلژینات، ژلاتین و آلژینات-ژلاتین پس از کراس لینک شدن با کلسیم کلرید و قرار گرفتن تحت واکنش خشک کردن انجام دادی، به عنوان مواد بندآورنده مورد بررسی قرار گرفتند. تست های مشخصه یابی فیزیکی ساختار متخلخل ابرجاذب های سنتز شده را اثبات کرد. پس از انجام تست های برون تنی خونی و درون تنی حیوانی مشخص گردید که ابرجاذب آلژینات-

References

1. Yang X, Liu W, Li N, Wang M, Liang B, Ullah I, et al. Design and development of polysaccharide hemostatic materials and their hemostatic mechanism. *Biomater Sci* 2017;5(12):2357-68.
2. Zhao X, Guo B, Wu H, Liang Y, Ma PX. Injectable antibacterial conductive nanocomposite cryogels with rapid shape recovery for noncompressible hemorrhage and wound healing. *Nat Commun* 2018;9(1):2784.
3. Leonhardt EE, Kang N, Hamad MA, Wooley KL, Elsayahy M. Absorbable hemostatic hydrogels comprising composites of sacrificial templates and honeycomb-like nanofibrous mats of chitosan. *Nat Commun* 2019;10(1):1-9.
4. Chen S, Carlson MA, Zhang YS, Hu Y, Xie J. Fabrication of injectable and superelastic nanofiber rectangle matrices ("peanuts") and their potential applications in hemostasis. *Biomater* 2018;179:46-59.
5. Chan LW, Wang X, Wei H, Pozzo LD, White NJ, Pun SH. A synthetic fibrin cross-linking polymer for modulating clot properties and inducing hemostasis. *Sci Transl Med* 2015;7(277):277ra29-29.
6. Laali KK, Greves WJ, Correa-Smits SJ, Zwarycz AT, Bunge SD, Borosky GL, et al. Novel fluorinated curcuminoids and their pyrazole and isoxazole derivatives: Synthesis, structural studies, Computational/Docking and in-vitro bioassay. *J Fluor Chem* 2018;206:82-98.
7. Hou Y, Xia Y, Pan Y, Tang S, Sun X, Xie Y, et al. Influences of mesoporous zinc-calcium silicate on water absorption, degradability, antibacterial efficacy, hemostatic performances and cell viability to microporous starch based hemostat. *Mater Sci Eng C* 2017;76:340-9.
8. Streifel BC, Lundin JG, Sanders AM, Gold KA,

- Wilems TS, Williams SJ, et al. Hemostatic and absorbent PolyHIPE-kaolin composites for 3D printable wound dressing materials. *Macromol Biosci* 2018;18(5):1700414.
9. Taaca KLM, Vasquez Jr MR. Hemocompatibility and cytocompatibility of pristine and plasma-treated silver-zeolite-chitosan composites. *Appl Surf Sci* 2018;432:324-31.
 10. Yu L, Shang X, Chen H, Xiao L, Zhu Y, Fan J. A tightly-bonded and flexible mesoporous zeolite-cotton hybrid hemostat. *Nat Commun* 2019;10(1):1932.
 11. Maia J, Evangelista MB, Gil H, Ferreira L. Dextran-based materials for biomedical applications. *Res Signpost* 2014;37661:31-53.
 12. Liao N, Unnithan AR, Joshi MK, Tiwari AP, Hong ST, Park C-H, et al. Electrospun bioactive poly (ϵ -caprolactone)-cellulose acetate-dextran antibacterial composite mats for wound dressing applications. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* 2015;469:194-201.
 13. Lih E, Lee JS, Park KM, Park KD. Rapidly curable chitosan-PEG hydrogels as tissue adhesives for hemostasis and wound healing. *Acta Biomater* 2012;8(9):3261-9.
 14. Li L, Du Y, Yin Z, Li L, Peng H, Zheng H, et al. Preparation and the hemostatic property study of porous gelatin microspheres both in vitro and in vivo. *Colloids Surf B* 2020;187:110641.
 15. Zhou J, Wang C, Cunningham AJ, Hu Z, Xiang H, Sun B, et al. Synthesis and characterization of size-controlled nano-Cu₂O deposited on alpha-zirconium phosphate with excellent antibacterial property. *Mater Sci Eng C* 2019;101:499-504.
 16. Ghorbani FM, Kaffashi B, Shokrollahi P, Seyedjafari E, Ardeshirylajimi A. PCL/chitosan/Zn-doped nHA electrospun nanocomposite scaffold promotes adipose derived stem cells adhesion and proliferation. *Carbohydr Polym* 2015;118:133-42.
 17. Luo JW, Liu C, Wu JH, Zhao DH, Lin LX, Fan HM, et al. In situ forming gelatin/hyaluronic acid hydrogel for tissue sealing and hemostasis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2020;108(3):790-7.
 18. Xie X, Li D, Chen Y, Shen Y, Yu F, Wang W, et al. Conjugate electrospun 3D gelatin nanofiber sponge for rapid hemostasis. *Adv Healthc Mater* 2021;10(20):2100918.
 19. Li G, Che M-T, Zhang K, Qin L-N, Zhang Y-T, Chen R-Q, et al. Graft of the NT-3 persistent delivery gelatin sponge scaffold promotes axon regeneration, attenuates inflammation, and induces cell migration in rat and canine with spinal cord injury. *Biomater* 2016;83:233-48.
 20. Lan G, Lu B, Wang T, Wang L, Chen J, Yu K, et al. Chitosan/gelatin composite sponge is an absorbable surgical hemostatic agent. *Colloids Surf B* 2015;136:1026-34.
 21. Wang C, Luo W, Li P, Li S, Yang Z, Hu Z, et al. Preparation and evaluation of chitosan/alginate porous microspheres/Bletilla striata polysaccharide composite hemostatic sponges. *Carbohydr Polym* 2017;174:432-42.
 22. Xu G, Cheng L, Zhang Q, Sun Y, Chen C, Xu H, et al. In situ thiolated alginate hydrogel: instant formation and its application in hemostasis. *J Biomater Appl* 2016;31(5):721-9.
 23. Jin J, Ji Z, Xu M, Liu C, Ye X, Zhang W, et al. Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate, and collagen as a hemostatic agent in vivo. *ACS Biomater Sci Eng* 2018;4(7):2541-51.
 24. Vueva Y, Connell LS, Chayanun S, Wang D, McPhail DS, Romer F, et al. Silica/alginate hybrid biomaterials and assessment of their covalent coupling. *Appl Mater Today* 2018;11:1-12.
 25. Shi X, Fang Q, Ding M, Wu J, Ye F, Lv Z, et al. Microspheres of carboxymethyl chitosan, sodium alginate and collagen for a novel hemostatic in vitro study. *J. Biomater Appl* 2016;30(7):1092-102.

26. Rong J-j, Liang M, Xuan F-q, Sun J-y, Zhao L-j, Zheng H-z, et al. Thrombin-loaded alginate-calcium microspheres: A novel hemostatic embolic material for transcatheter arterial embolization. *Int J Biol Macromol* 2017;104:1302-12.
27. Jeon O, Alt DS, Ahmed SM, Alsberg E. The effect of oxidation on the degradation of photocrosslinkable alginate hydrogels. *Biomater* 2012;33(13):3503-14.
28. Fathi P, Sikorski M, Christodoulides K, Langan K, Choi YS, Titcomb M, et al. Zeolite - loaded alginate - chitosan hydrogel beads as a topical hemostat. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2018;106(5):1662-71.
29. Björse K, Faxälv L, Montan C, Wildt-Persson K, Fyhr P, Holst J, et al. In vitro and in vivo evaluation of chemically modified degradable starch microspheres for topical haemostasis. *Acta Biomater* 2011;7(6):2558-65.
30. Sinha R, Lockman KA, Church NI, Plevris JN, Hayes PC. The use of hemostatic spray as an adjunct to conventional hemostatic measures in high-risk nonvariceal upper GI bleeding (with video). *Gastrointest Endosc* 2016;84(6):900-6. e3.
31. Holster IL, van Beusekom HM, Kuipers EJ, Leebeek FW, de Maat MP, Tjwa ET. Effects of a hemostatic powder hemospray on coagulation and clot formation. *Endoscopy* 2015;47(07):638-45.
32. Chen Z, Han L, Liu C, Du Y, Hu X, Du G, et al. A rapid hemostatic sponge based on large, mesoporous silica nanoparticles and N-alkylated chitosan. *Nanoscale* 2018;10(43):20234-45.
33. de Nucci G, Reati R, Arena I, Bezzio C, Devani M, Della Corte C, et al. Efficacy of a novel self-assembling peptide hemostatic gel as rescue therapy for refractory acute gastrointestinal bleeding. *Endoscopy* 2020;52(09):773-9.
34. Ellis-Behnke RG, Liang Y-X, Tay DK, Kau PW, Schneider GE, Zhang S, et al. Nano hemostat solution: immediate hemostasis at the nanoscale. *Nanomed Nanotechnol Biol Med* 2006;2(4):207-15.
35. Zietlow JM, Zietlow SP, Morris DS, Berns KS, Jenkins DH. Prehospital use of hemostatic bandages and tourniquets: translation from military experience to implementation in civilian trauma care. *J Spec Oper Med* 2015;15(2):48-53.
36. Yang X, Wang C, Liu Y, Niu H, Zhao W, Wang J, et al. Inherent antibacterial and instant swelling ε-poly-lysine/poly (ethylene glycol) diglycidyl ether superabsorbent for rapid hemostasis and bacterially infected wound healing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2021;13(31):36709-21.
37. Mirzakhani Z, Faghihi K, Barati A, Momeni HR. Synthesis and characterization of fast-swelling porous superabsorbent hydrogel based on starch as a hemostatic agent. *J Biomater Sci Polym Ed* 2015;26(18):1439-51.
38. Chen Y, Zhang Y, Wang F, Meng W, Yang X, Li P, et al. Preparation of porous carboxymethyl chitosan grafted poly (acrylic acid) superabsorbent by solvent precipitation and its application as a hemostatic wound dressing. *Mater Sci Eng C* 2016;63:18-29.
39. Shefa AA, Taz M, Hossain M, Kim YS, Lee SY, Lee B-T. Investigation of efficiency of a novel, zinc oxide loaded TEMPO-oxidized cellulose nanofiber based hemostat for topical bleeding. *Int J Biol Macromol* 2019;126:786-95.
40. Mahmoodzadeh A, Moghaddas J, Jarolmasjed S, Kalan AE, Edalati M, Salehi R. Biodegradable cellulose-based superabsorbent as potent hemostatic agent. *J Chem Eng* 2021;418:129252.
41. Fan X, Chen K, He X, Li N, Huang J, Tang K, et al. Nano-TiO₂/collagen-chitosan porous scaffold for wound repairing. *Int J Biol Macromol* 2016;91:15-22.
42. Demitri C, Del Sole R, Scalera F, Sannino A, Vasapollo G, Maffezzoli A, et al. Novel superabsorbent cellulose - based hydrogels

- crosslinked with citric acid. *J Appl Polym Sci* 2008;110(4):2453-60.
43. Xi G, Liu W, Chen M, Li Q, Hao X, Wang M, et al. Polysaccharide-based lotus seedpod surface-like porous microsphere with precise and controllable micromorphology for ultrarapid hemostasis. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11(50):46558-71.
 44. Li P, Cao L, Sang F, Zhang B, Meng Z, Pan L, et al. Polyvinyl alcohol/sodium alginate composite sponge with 3D ordered/disordered porous structure for rapidly controlling noncompressible hemorrhage. *Biomater Adv* 2022;134:112698.
 45. Wang C, Niu H, Ma X, Hong H, Yuan Y, Liu C. Bioinspired, injectable, quaternized hydroxyethyl cellulose composite hydrogel coordinated by mesocellular silica foam for rapid, noncompressible hemostasis and wound healing. *ACS Appl Mater Interfaces* 2019;11(38):34595-608.
 46. Dhurat R, Sukesh M. Principles and methods of preparation of platelet-rich plasma: a review and author's perspective. *J Cutan Aesthet Surg* 2014;7(4):189.
 47. Kabiri M, Emami SH, Rafinia M, Tahriri M. Preparation and characterization of absorbable hemostat crosslinked gelatin sponges for surgical applications. *Curr Appl Phys* 2011;11(3):457-61.
 48. Zheng C, Zeng Q, Pimpi S, Wu W, Han K, Dong K, et al. Research status and development potential of composite hemostatic materials. *J Mater Chem B* 2020;8(25):5395-410.
 49. Wu B, Du F, Wenjing A, Liu F, Liu Y, Zheng W, et al. Graphene-ophicalcite heterogeneous composite sponge for rapid hemostasis. *Colloids Surf B* 2022;216:112596.
 50. Zhao Y, Li J, Leng F, Lv S, Huang W, Sun W, et al. Degradable porous carboxymethyl chitin hemostatic microspheres. *J Biomater Sci Polym Ed* 2020;31(11):1369-84.
 51. Liu J-Y, Li Y, Hu Y, Cheng G, Ye E, Shen C, et al. Hemostatic porous sponges of cross-linked hyaluronic acid/cationized dextran by one self-foaming process. *Mater Sci Eng C* 2018;83:160-8.
 52. Wang L, Pan K, Zhang L, Zhou C, Li Y, Zhu B, et al. Tentative identification of key factors determining the hemostatic efficiency of diatom frustule. *Biomater Sci* 2021;9(6):2162-73.
 53. Yang X, Zhou J, Huo T, Lv Y, Pan J, Chen L, et al. Metabolic insights into the enhanced nitrogen removal of anammox by montmorillonite at reduced temperature. *Chem Eng J* 2021;410:128290.
 54. Li N, Yang X, Liu W, Xi G, Wang M, Liang B, et al. Tannic acid cross - linked polysaccharide - based multifunctional hemostatic microparticles for the regulation of rapid wound healing. *Macromol Biosci* 2018;18(11):1800209.
 55. De Candia E. Mechanisms of platelet activation by thrombin: a short history. *Thromb Res* 2012;129(3):250-6.
 56. Liu Z, Li N, Gao W, Man S, Yin S, Liu C. Comparative study on hemostatic, cytotoxic and hemolytic activities of different species of Paris L. *J Ethnopharmacol* 2012;142(3):789-94.
 57. Biazar E, Keshel SH, Niazi V, Shiran NV, Saljooghi R, Jarrahi M, et al. Morphological, cytotoxicity, and coagulation assessments of perlite as a new hemostatic. *RSC Adv* 2023;13(9):6171-80.
 58. Yao X-p, Jing M-l, Guan J. Hemostatic property and cytotoxicity of the guanidine modified chitosan. *Chin J Tissue Eng Res* 2017;21(6):906.
 59. Narvaez-Flores JJ, Vilar-Pineda G, Acosta-Torres LS, Garcia-Contreras R. Cytotoxic and anti-inflammatory effects of chitosan and hemostatic gelatin in oral cell culture. *Acta Odontol Latinoam* 2021;99:98-103.
 60. Wang L, Zhong Y, Qian C, Yang D, Nie J, Ma G. A natural polymer-based porous sponge with capillary-mimicking microchannels for rapid

- hemostasis. *Acta Biomater* 2020;114:193-205.
61. Li J, Sun X, Zhang K, Yang G, Mu Y, Su C, et al. Chitosan/Diatom - Biosilica Aerogel with Controlled Porous Structure for Rapid Hemostasis. *Adv Healthcare Mater* 2020;9(21):2000951.
62. Wang Y, Wang C, Qiao L, Feng J, Zheng Y, Chao Y, et al. Shape-adaptive composite foams with high expansion and absorption used for massive hemorrhage control and irregular wound treatment. *Appl Mater Today* 2018;13:228-41.
63. Barrientos-Velázquez AL, Arteaga S, Dixon JB, Deng Y. The effects of pH, pepsin, exchange cation, and vitamins on aflatoxin adsorption on smectite in simulated gastric fluids. *Appl Clay Sci* 2016;120:17-23.
64. Behrens AM, Sikorski MJ, Kofinas P. Hemostatic strategies for traumatic and surgical bleeding. *J Biomed Mater Res Part A* 2014;102(11):4182-94.
65. Zhang Y, Guan J, Wu J, Ding S, Yang J, Zhang J, et al. N-alkylated chitosan/graphene oxide porous sponge for rapid and effective hemostasis in emergency situations. *Carbohydr Polym* 2019;219:405-13.
66. Wei X, Ding S, Liu S, Yang K, Cai J, Li F, et al. Polysaccharides-modified chitosan as improved and rapid hemostasis foam sponges. *Carbohydr Polym* 2021;264:118028.

HIGHLY POROUS ALGINATE/GELATIN SPONGE FOR HEMOSTASIS OF SEVERE FEMORAL BLEEDING IN RATS

Ali Rezaie¹, Ahmad Mehdipour², Salar Salmanipour³, Nastaran Alipour⁴, Roya Salehi^{5*}

Received: 07 April, 2023; Accepted: 29 April, 2023

Abstract

Background & Aims: Controlling significant bleeding caused by accidents or battlefields is one of the main issues with emergency injuries. The current research was designed with the aim of investigating the binding performance of alginate, gelatin and alginate-gelatin superabsorbents in order to solve the aforementioned challenges.

Materials & Methods: In this experimental study, superabsorbents were prepared through crosslinking with calcium chloride and then freeze-drying. Physical properties of the synthesized superabsorbents were evaluated using FE-SEM analysis as well as porosity percentage and swelling ratio tests. Cell compatibility of superabsorbents was assessed using the MTT assay. Hemolysis, Blood Coagulation Index (BCI), RBC attachment, and platelet adhesion tests were utilized to evaluate the in vitro hemolytic activity of superabsorbents. Further, in vivo femoral artery surgery studies on rats were performed to investigate the hemostatic efficiency of the synthesized superabsorbents.

Results: In vitro hemostatic ability results verified that synthetic sponges have better hemostatic properties than commercial ones. The results of cytotoxicity test revealed that alginate, gelatin, and alginate-gelatin superabsorbents are fully non-toxic, and due to having a survival percentage more than 89%, they have significant cellular compatibility. Finally, in vivo hemostatic tests showed that the synthesized superabsorbents performed better than commercial samples in terms of bleeding control and decreasing coagulation time, as the amount of blood loss and coagulation time for optimum alginate-gelatin superabsorbent decreased respectively by 1.71 and 1.96 times compared to ChitoCell and 1.37 and 1.55 times compared to Gelita.

Conclusion: According to the results of the current study, the optimum alginate-gelatin superabsorbent has substantial in vitro and in vivo hemostatic efficacy. These results show the potential of this superabsorbent to enter the stage of clinical studies.

Keywords: Alginate, Bleeding, Freeze-Drying, Gelatin, Hemostasis, Superabsorbent

Address: Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Medical Science, Tabriz University of Medical Science, Tabriz, Iran

Tel: +984133355789

Email: roya.salehi@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2023; 33(12): 856 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2023 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹Master of Science, School of Process Engineering, Department of Chemical Engineering, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

² Assistant Professor, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Tissue Engineering, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Master of Science, School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran

⁴ Ph.D., Faculty of Chemistry, Department of Organic Chemistry, University of Tabriz, Tabriz, Iran

⁵ Associate Professor, Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Medical Sciences, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)