

سنتز نانو فیلم هیدروژلی بر پایه مواد طبیعی و گیاهی به عنوان زخم پوش منعقد کننده

خون سربازان مجروح

حسن توکلی^۱، میثم نجفلو^۲

چکیده

خونریزی ناشی از صدمات یکی از چالش‌های عمده در مدیریت آسیب‌های جانی در میدان‌های نبرد می‌باشد. با توجه به اهمیت کنترل سریع خونریزی، محققان به دنبال توسعه‌ی مواد منعقد کننده مؤثر خون و زیست‌سازگار هستند. کیتوزان، یک پلیمر طبیعی مشتق شده از منابع دریایی، به دلیل خواص منعقد کننده‌ی خون و زیست‌سازگاری، به عنوان یک گزینه امیدبخش در این زمینه می‌باشد که استفاده از مواد مختلف و مؤثر در اتصال عرضی این پلیمر برای رسیدن به ساختار نهایی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. در این مطالعه، نانو ذرات کربن دات برگرفته از برگ گیاه گشنیز با توجه به داشتن ویژگی‌های منحصربفرد و همچنین امکان ایجاد اتصال‌های عرضی مناسب، مورد استفاده قرار گرفتند. پس از مشخصه‌یابی کامل نانوذرات سنتز شده، این نانو ذرات به ساختار کیتوزان اضافه و فیلم‌های هیدروژلی نهایی تهیه شدند و مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که نانوذرات کربن دات سنتز شده می‌توانند امکان برهمکنش و اتصال عرضی مناسبی را با کیتوزان فراهم کنند. فیلم‌های نهایی بدست آمده دارای سمیت کم، عملکرد بهتر در انعقاد خون، و خاصیت ضدباکتریایی خوبی نشان دادند که به استفاده از مواد کاملاً طبیعی در سنتز آن‌ها نسبت داده می‌شود. این مطالعه نشان داد که استفاده از نانوذرات کربن دات به عنوان اتصال عرضی در فیلم‌های هیدروژلی کیتوزان، علاوه بر کاهش هزینه‌های تولید، می‌تواند بهبود قابل توجهی در ویژگی‌های ضدباکتریایی و انعقاد خون این زخم‌پوش‌ها ایجاد کند که به نوبه‌ی خود از مطالعات نوآورانه در زمینه نانو مواد زیستی در حوزه زخم پوش است.

واژگان کلیدی: فیلم‌های هیدروژلی، کیتوزان، نانو ذرات کربن دات، زخم پوش، نانو ذرات زیست سازگار

۱- (نویسنده مسئول): استادیار گروه شیمی، دانشگاه افسری امام علی (ع) نازجا، تهران، ایران. ایمیل: hs.tavakoli51@gmail.com

۲- نخبه جایگزین خدمت دانشگاه افسری امام علی (ع) نازجا، تهران، ایران.

مقدمه

خونریزی ناشی از زخم در حوادث و تصادفات، یکی از مهمترین دلایل مرگ و میر در سراسر جهان است که در بخش نظامی نیز اصابت گلوله و یا ترکش، از مهمترین علت‌های از دست رفتن جان سربازان در مناطق جنگی است (بی ارسا^۳، ۲۰۱۸؛ خورشیدی، ۱۳۹۴). در صورت بکارگیری به موقع مواد منعقد کننده خون، تلفات نظامیان کاهش چشمگیری می‌یابد که برای این منظور از مواد مختلفی جهت انعقاد خون استفاده شده است (باتلر^۴، ۲۰۱۵؛ ایستریج^۵، ۲۰۱۲). مطالعات متعددی در معرفی مواد جدید در این زمینه انجام گرفته است که مهم‌ترین هدف در این مطالعات کاهش زمان انعقاد خون و جلوگیری از عفونت زخم ایجاد شده است، زیرا عفونت در نتیجه میکروارگانیسم‌هایی مانند باکتری‌ها در بخش آسیب دیده پوست یکی از چالش‌های مهم برای بهبود زخم‌ها است (دیویا^۶، ۲۰۱۵؛ سیموئس^۷، ۲۰۱۸). از دیگر عوامل مدنظر در طراحی زخم پوش‌های منعقد کننده خون، با توجه به اینکه این مواد در ارتباط مستقیم با بافت داخلی و خون بدن هستند، انتخاب موادی با کمترین سمیت است و بنابراین بیشترین تلاش در استفاده از مواد طبیعی به جای مواد شیمیایی می‌باشد (سیموئس، ۲۰۱۸).

از رایج‌ترین مواد استفاده شده در این زمینه، هیدروژل‌ها (شبکه‌های مشبک پلیمری) هستند (کالو^۸، ۲۰۱۵؛ محبی، ۲۰۱۹). در هیدروژل‌ها امکان سنتز از پلیمرهای آزمایشگاهی و طبیعی وجود دارد و در زمینه‌های مختلف پزشکی از جمله زخم بند، دارورسانی، مهندسی بافت و... استفاده می‌شود (ریو^۹، ۲۰۱۵). با توجه به امکان سنتز هیدروژل‌ها از مواد طبیعی، سمیت و هزینه ساخت بسیار پایینی دارند و همچنین می‌توانند بستری برای قرارگیری انواع مواد مختلف دارویی و شیمیایی شوند که این ویژگی در زمینه زخم بند از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (کالو، ۲۰۱۵؛ پلا^{۱۰}، ۲۰۱۸). در این حوزه، طیف متنوعی از بیومواد به کار گرفته شده است که در میان آنها کیتوزان، یک پلیمر کربوهیدرات به دست آمده از منابع دریایی، معمولاً مورد استفاده قرار می‌گیرد (گوا^{۱۱}، ۲۰۲۱؛ اونگ^{۱۲}، ۲۰۰۸). از آنجایی که کیتوزان دارای خواص منحصر به فردی از جمله زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری، اثر ضد میکروبی و غیره است، به طور گسترده در حوزه‌های مختلف مورد مطالعه قرار گرفته است (فی لیو^{۱۳}، ۲۰۰۱؛ موریایا^{۱۴}، ۲۰۰۸).

پلیمرهایی همانند کیتوزان مورد استفاده در هیدروژل‌ها نیازمند اتصال عرضی مناسبی هستند تا به ساختار سه بعدی نهایی برسند و انتخاب اتصال عرضی مورد استفاده از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است؛ زیرا ویژگی‌های کلیدی هیدروژل نهایی اعم از حلالیت، سمیت، عملکرد انعقاد خون، و ضد باکتریایی بسیار وابسته به نوع اتصال عرضی انتخاب شده می‌باشد که برای این منظور از مواد گوناگون شیمیایی و طبیعی به عنوان اتصال عرضی استفاده شده است (بوستامانت تورس^{۱۵}، ۲۰۲۱؛ پرهی^{۱۶}، ۲۰۱۷). از مواد مهم قابل استفاده در این زمینه، نانو ذرات می‌باشند که با توجه به وجود

³ Piersa⁴ Butler⁵ Eastridge⁶ Dhivya⁷ Simões⁸ Caló⁹ Ryu¹⁰ Pellá¹¹ Guo¹² Ong¹³ Fei Liu¹⁴ Mourya¹⁵ Bustamante-Torres¹⁶ Parhi

انواع مختلف گروه‌های عاملی سطحی و سطح فعال فیزیک و شیمیایی خود توانایی تشکیل پیوندهای گوناگون را دارند که این ویژگی، آن‌ها را جز مواد ایده آل برای اتصال عرضی پلیمرهای هیدروژلی کرده است (پروکساوان^{۱۷}, ۲۰۲۳; وانگ^{۱۸}, ۲۰۲۳).

در مطالعات داخلی مرتبط با استفاده از نانو ذرات به عنوان اتصال عرضی پلیمرهای فیلم هیدروژلی، در یک مطالعه‌ای در سال ۱۳۹۷، احمد میرزابابایی و همکارانش، ابتدا نانو کامپوزیت کیتوزان/کورکومین با درصد های مختلف را سنتز کرده و سپس در داخل هیدروژل آلژینات/ کیتوزان کپسوله کردند. مشخصه‌یابی ساختاری و فیزیک و شیمیایی، میزان تورم، میزان رهش داروی کورکومین و در نهایت میزان سمیت آن‌ها بر روی سلول‌های L۹۲۹ ارزیابی شد که نتایج حاکی از عملکرد خوب این سامانه در رهش تدریجی دارو با کمترین سمیت بودند (میرزا بابایی, ۱۳۹۷).

در مطالعات خارجی انجام شده بر روی هیدروژل‌های منعقد کننده خون، در یک مطالعه ای، پریناز فتحی و همکارانش در سال ۲۰۱۸ در آمریکا با استفاده از کیتوزان و آرژینات بستر هیدروژل مورد نظر را سنتز کرده و سپس ژئولیت را در هیدروژل مورد نظر بارگذاری کردند. در این مطالعه خواص ساختاری، میزان رهش مواد ترکیبی ساخته شده، عملکرد آن‌ها در انعقاد خون و در نهایت میزان سمیت مواد سنتز شده مورد بررسی قرار گرفته است که در نتایج بدست آمده این هیدروژل ساخته شده توانایی خوبی در رهش آهسته مواد و عملکرد ضد باکتریایی با سمیت بسیار ناچیزی داشت (فتحی, ۲۰۱۸).

در این میان بر خلاف مطالعات گذشته در استفاده از نانوذرات شیمیایی و فلزی در زخم پوش‌ها، از نانو ذرات ایده آل دیگر، نانو ذرات کربن دات هستند که به دلیل سمیت بسیار ناچیز و روش سنتز بسیار ساده، کوتاه مدت، مقرون به صرفه، و از همه مهم‌تر امکان سنتز از مواد طبیعی و گیاهی، امروزه توجه ویژه‌ای را به خود جلب کرده‌اند. از این نانو ذرات در زمینه‌های مختلفی از جمله ساخت انواع حسگرها، ساخت انواع مواد هادی و نیمه هادی در سلول‌های خورشیدی، ساخت سطوح ضد باکتری، دارورسانی و فوتوترمال تراپی^{۱۹} سرطان و نظایر آن استفاده شده است (د مدیروس^{۲۰}, ۲۰۱۹; نجفلو, ۲۰۲۲; تورهونگ, ۲۰۱۷) ولی با توجه به نوظهور بودن این نانو ذرات، از آن‌ها در زمینه زخم بند به صورت محدود بکار گرفته شده است؛ حال آنکه این نانو ذرات برگرفته از منبع گیاهی با توجه به ویژگی‌های بیان شده، قابلیت استفاده به عنوان متصل کننده بین پلیمرهای هیدروژلی و سایر مواد دیگر را دارا می‌باشد (چهاال^{۲۱}, ۲۰۲۱; انتسابی, ۲۰۲۱).

به طور کلی در این پژوهش، تلاش به دنبال تولید یک فیلم بیوهیدروژل بر پایه مواد طبیعی و گیاهی جدید و موثر برای کنترل خونریزی می‌باشد. برای این منظور، از برگ گیاه گشنیز به عنوان ماده اولیه ساخت نانوذرات کربن دات استفاده شده است. انتخاب گشنیز به عنوان منبع سنتز نانو ذرات کربن دات به دلیل محتوای بالای کلسیم آن است که در انعقاد خون نقش مهمی دارد (کرتون^{۲۲}, ۲۰۰۹; سینگ^{۲۳}, ۲۰۱۹) و همچنین به دلیل خاصیت ضدباکتریایی شناخته شده این گیاه می‌باشد.

¹⁷ Pruksawan

¹⁸ Wang

¹⁹ Photothermal Therapy

²⁰ De Medeiros

²¹ Chahal

²² Kerton

²³ Singh

با استفاده از این نانوذرات، یک فیلم بیوهیدروژل ساخته شده است که علاوه بر خاصیت ضدباکتریایی، توانایی تسریع در انعقاد خون را نیز دارد (کوبو^{۲۴}، ۲۰۰۴؛ پالتا^{۲۵}، ۲۰۱۴). مشخصه‌یابی اندازه نانو ذرات، بار سطحی، موفولوژی، عناصر سطحی، بررسی گروه‌های عاملی، تست انعقاد خون، و سمیت این سامانه سنتز شده بر روی سلول‌های فیبروبلاست انجام گرفته است. وجود نانو ذره کربن دات در هیدروژل با سمیت ناچیز و هزینه‌ی تولید کم، راه را برای تولید انبوه هموار می‌سازد و همچنین با توجه به ویژگی‌های مطرح شده، این سامانه در میدان نبرد می‌تواند تاثیر به سزایی در حفظ جان سربازان زخمی داشته باشد که علاوه بر استفاده به عنوان ماده مکمل در کنار سایر مواد رایج منعقد کننده خون، می‌تواند جایگزینی نیز برای آن‌ها باشد.

مواد و تجهیزات لازم مورد استفاده:

محیط کشت سلولی کامل^{۲۶}، محیط کشت آگار^{۲۷}، تریپسین^{۲۸}، پنی‌سیلین^{۲۹}، استرپتومایسین^{۳۰} و سرم جنین گاوی^{۳۱} از شرکت گیبکو^{۳۲} خریداری شدند. کیسه‌های دیالیز با وزن مولکولی قطع برابر با ۱ کیلو دالتون^{۳۳}، و ماده (۳-۴،۵-دی متیل تiazول-۲-یل)-۲،۵-دی فنیل تترازولیوم برومید^{۳۴} از شرکت سیگما^{۳۵} تهیه شدند. کلرید کلسیم (CaCl₂)، کیتوزان با خلوص ۹۹.۵ درصد و وزن مولکولی متوسط، گلیسرول با خلوص ۹۹.۵ درصد و سایر مواد شیمیایی مورد استفاده از شرکت مرک^{۳۶} تهیه گردیدند و گشنیز تازه از یک فروشگاه معتبر تهیه شد.

روش تحقیق:

در این مطالعه نانو ذرات کربن دات به روش هیدروترمال سنتز گردید. به طور خلاصه، برگ‌های گشنیز را تمیز کرده تا ناخالصی‌ها از بین بروند، سپس به قطعات کوچک برش داده شدند و بعد از اضافه کردن مقدار کافی نیتروژن مایع تا یخ زدگی و خشکیدن کامل قطعات، بلافاصله با استفاده از آسیاب برقی به پودر تبدیل شدند. سپس ۵ گرم از پودر به دست آمده با ۱۰۰ میلی‌لیتر مخلوط آب دیونیزه و الکل (۵۰/۵۰) ترکیب شد تا عصاره الکلی آبی گشنیز بدست آید. بعد از چندین بار عبور عصاره‌ی بدست آمده از صافی، محلول نهایی در دمای بالای ۱۰۰ درجه سانتی گراد و فشار ۱.۵ بار به مدت زمان ۴ ساعت قرار گرفت تا نهایتاً نانو ذرات کربن دات یکنواختی بدست آمد. برای به دست آوردن پودر خالص نانو ذرات کربن، محصول فیلتر، سانتریفیوژ به مدت ۱۵ دقیقه در ۹۰۰۰ دور در دقیقه و دیالیز شد. در نهایت، پودر بدست آمده با خشک کردن انجمادی نمونه نهایی به دست آمد.

24 Kubo

25 Palta

26 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

27 Agar medium

28 Trypsin

29 Penicillin

30 Streptomycin

31 Fetal Bovine Serum (FBS)

32 Gibco (BRL Life Technologies)

33 kilo dalton (Kda)

34 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

35 Sigma

36 Merk

اندازه هیدرودینامیکی نانو ذرات و بار سطحی آن‌ها توسط پراکنش دینامیکی نور^{۳۷} (DLS) مشخصه یابی شدند. مورفولوژی و شکل ظاهری آنها توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی^{۳۸} (SEM) و میکروسکوپ الکترونی عبوری^{۳۹} (TEM) و ویژگی‌های نوری آن‌ها توسط جذب UV-Vis و هم با آنالیز تهییج و نشر صورت گرفت. گروه‌های عاملی توسط طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه^{۴۰} (FTIR) و ویژگی ساختاری نیز توسط پراش اشعه ایکس (XRD)^{۴۱} مورد سنجش قرار گرفتند. برای عناصر سطحی از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشر میدانی^{۴۲} (FE-SEM) و میزان بازده کوانتومی، از روش نسبی ویلیامز^{۴۳} استفاده گردید.

در مرحله‌ی بعد برای تهیه فیلم نانو هیدروژلی مورد نظر، کیتوزان به خوبی در حلال اسیدی (استیک اسید ۰.۱٪) حل گردید تا محلول شفاف بدست آید. نانو ذره کربن دات با غلظت‌های ۱۰، ۲۰، و ۳۰ درصد وزنی کیتوزان به محلول اضافه و به خوبی در ساختار وارد شد. برای نرمی بیشتر فیلم هیدروژلی سنتز شده، مقداری گلیسرین نیز اضافه گردید. در پایان خمیر شفاف و همگن حاصل (۲۵ میلی لیتر) بر روی یک صفحه پلی استایرن به قطر ۱۰ سانتی متر ریخته شد و اجازه داده شد تا به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شود. بعد از خشک شدن فیلم تهیه شده، تست های مربوط ساختاری و میزان عملکرد انعقادی آن مورد بررسی قرار گرفتند.

مطالعه‌ی میزان تورم:

برای مطالعه میزان تورم فیلم هیدروژلی سنتز شده از محلول بافر فسفات، pH= ۷/۴ با دمای فیزیولوژیکی (۳۷ درجه سانتی گراد) استفاده شد. نمونه‌های فیلم هیدروژل در ۲۰ میلی لیتر محلول بافر غوطه‌ور شدند و سپس وزن شدند (Wt). نمونه‌ها در فواصل زمانی مشخصی خارج شدند تا نسبت تورم محاسبه شود. پس از جدا کردن آب سطحی، نمونه‌ها وزن شدند (Wi). نسبت تورم با استفاده از فرمول زیر به دست آمد:

$$\text{میزان تورم} = \frac{W_t - W_i}{W_i}$$

آزمایش میزان سمیت فیلم هیدروژلی سنتز شده:

برای بررسی میزان سمیت، سلول‌های HFF-1 در فلاسک 25 cm^2 کشت و با ۵٪ CO₂ و محیط کشت کامل (۱۰٪ (v/v) سرم جنین گاو و ۱٪ (v/v) پنی سیلین-استرپتومایسین) تا زمانی که حداقل ۷۰٪ فلاسک پر شود، انکوبه شدند.

^{۳۷} Dynamic Light Scattering (DLS)

^{۳۸} Scanning Electron Microscope (SEM)

^{۳۹} Transmission Electron Microscope (TEM)

^{۴۰} Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)

^{۴۱} X-ray Diffraction (XRD)

^{۴۲} Field Emission Scanning Electron Microscope (FE-SEM)

^{۴۳} Williams Percent Range

میزان سمیت فیلم های سنتز شده (فیلم هیدروژلی بدون حضور نانو ذرات کربن و با حضور نانو ذرات) بر روی رده سلولی نام برده بعد از انکوبه کردن فیلم ها با غلظت های مختلف برای بازه ی زمانی ۲۴ ساعت با استفاده از آزمایش تعیین سمیت تثبیت شده MTT^{۴۴} مورد ارزیابی قرار گرفتند.

عملکرد انعقاد خون:

عملکرد تست انعقاد خون توسط روش های گزارش شده (اسمیت^{۴۵}, ۲۰۱۰) نشان داده شد. ابتدا، فیلم بدون حضور نانو ذرات و فیلم حاوی نانو ذرات را به قطر ۱۰ میلی متر برش زده و در پلیت های ۱۲ خانه ای قرار داده و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد در انکوباتور گرم نگه داشته شدند. پس از آن، ۲۰۰ میکرولیتر خون تثبیت شده (از سدیم سیترات به عنوان ضد انعقاد برای تثبیت خون تازه انسان استفاده شد) به تدریج بر روی فیلم ها چکانده شد. در این حالت، کنترل های منفی هیچ نمونه ای دریافت نکردند. سپس، ۴۰ میکرولیتر محلول $CaCl_2$ ۰.۲ M به نمونه های خون اضافه شد تا فرآیند لخته شدن خون آغاز گردد. لخته شدن، گلبول های قرمز خون را پس از انکوبه شدن به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به دام انداخت. سپس، ۶ میلی لیتر آب دیونیزه به هر چاه اضافه شد تا گلبول های قرمز خون همولیز شوند. ۲ میلی لیتر از محیط کشت پس از ۲ دقیقه تکان دادن ملایم برداشته شد و به مدت ۲ دقیقه در ۱۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شد و در نهایت از یک دستگاه ELISA BioTech برای اندازه گیری جذب مایع رویی در آب در ۵۴۰ نانومتر استفاده شد. با استفاده از معادله زیر شاخص لخته شدن خون (BCI) برای نمونه های مختلف استفاده شد.

$$BCI = \frac{\text{میزان جذب نمونه}}{\text{میزان جذب کنترل}}$$

فعالیت ضد باکتریایی:

عملکرد ضد باکتریایی با روش انتشار دیسک^{۴۶} انجام شد (زیدان^{۴۷}, ۲۰۰۵). برای بررسی فعالیت های ضد باکتریایی، فیلم های سنتز شده در برابر پاتوژن های گرم مثبت و گرم منفی آزمایش شدند. سویه های باکتریایی به استاندارد ۰.۵ مک فارلند^{۴۸} تنظیم و سپس در محیط آگار کشت داده شدند. پس از آن، تمام فیلم ها در شرایط استریل با قطر ۸ میلی متر برش داده شده و بر روی صفحات آگار قرار داده شدند و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه گردیدند. پس از ۲۴ ساعت، مناطق مهار شده رشد باکتری اندازه گیری شدند.

یافته ها:

^{۴۴} 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)

^{۴۵} Smith

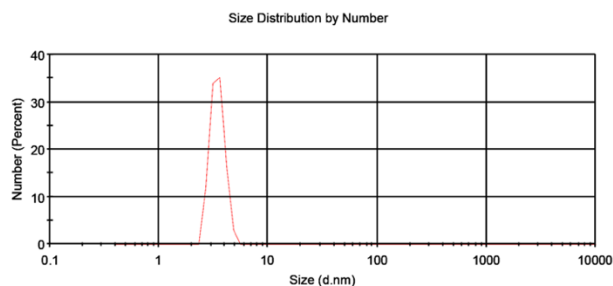
^{۴۶} Disk diffusion assay

^{۴۷} Zaidan

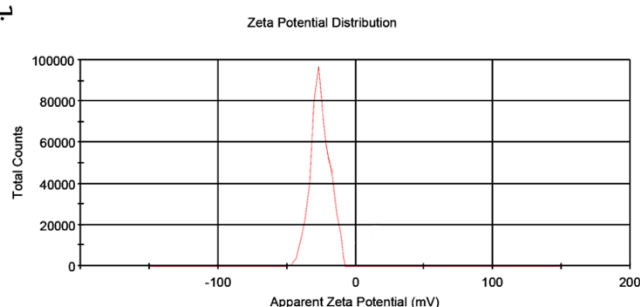
^{۴۸} McFarland

با توجه به نتایج DLS (شکل ۱) از نانو ذرات سنتز شده مشخص شده است که نانو ذرات به صورت یک دست دارای اندازه کمتر از ۱۰ نانومتر هستند و بار سطحی آن‌ها منفی می‌باشد که این بار منفی می‌تواند در برهمکنش الکترواستاتیک با کیتوزان که بالقوه بار مثبت دارد موثر باشد.

الف



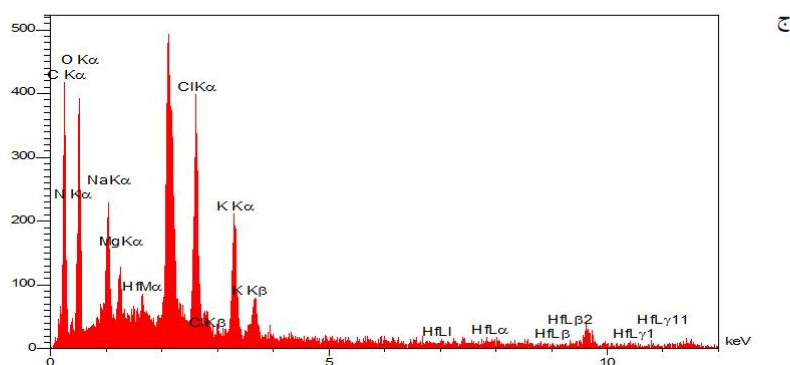
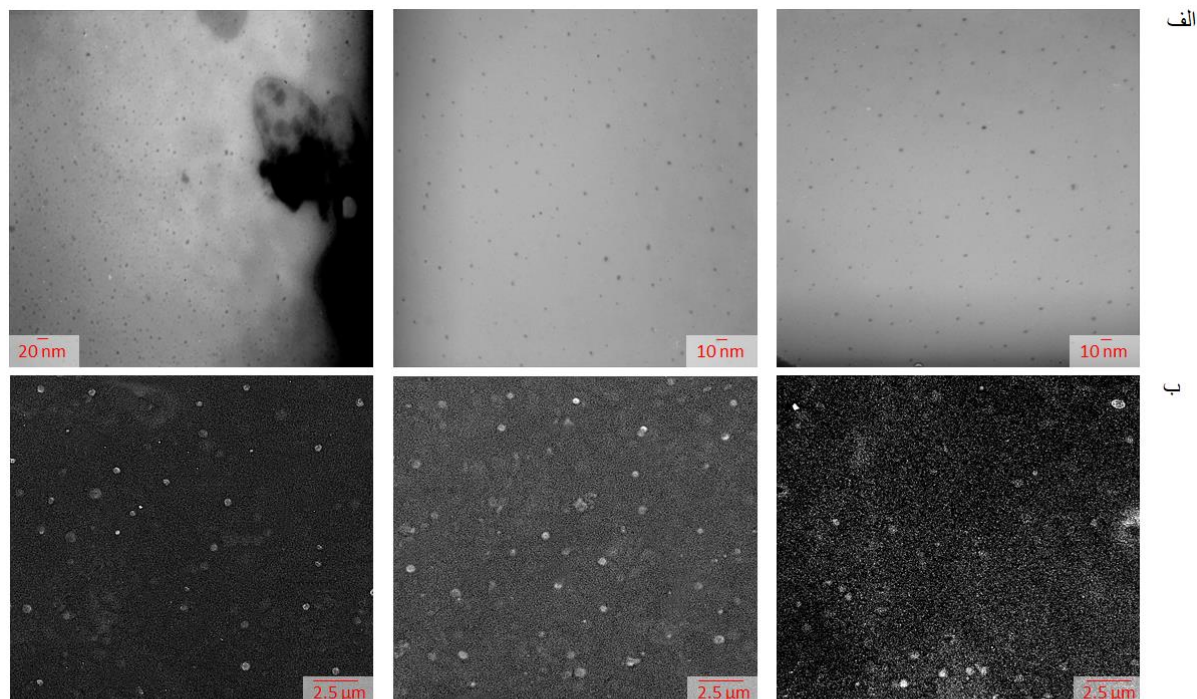
ب



شکل ۱- نتایج DLS و پتانسیل زتای نانو ذرات کربن دات سنتز شده

در نتایج مورفولوژی و شکل ظاهری نانو ذرات سنتز شده (شکل ۲)، طبق نتایج میکروسکوپ الکترونی شکل کروی و نقطه ای آن‌ها به خوبی قابل مشهود است. با توجه به این نتایج تصویر برداری الکترونی، اندازه نانو ذرات با نتایج DLS همخوانی و دلالت بر اندازه کمتر از ۱۰ نانومتر ذرات دارد. علاوه بر این طبق نتایج مشخصه یابی یون‌ها، یون‌های سطحی مهم موجود در هر منبع گیاهی (N, O, Na, C, S, P, Mg, Ca) در نانو ذرات سنتز شده تایید گردید که در این بین حضور یون کلسیم از اهمیت ویژه‌ای در فعال کردن مکانیزم انعقاد خون دارد. این نتایج با نتایج قبلی یافت شده در رابطه با یون‌های موجود در نانو ذرات کربن دات سنتز شده از منبع گیاهی و همچنین حضور یون کلسیم در گیاه گشنیز همخوانی دارد. علاوه بر این، وجود این عناصر بعد از فرآیند سنتز از موفقیت آمیز بودن سنتز نانو ذرات و

انتقال موفق ویژگی‌های اولیه منبع سنتز به نانو ذره سنتز شده را نشان می‌دهد (چahal^{۴۹}، ۲۰۲۱؛ کرتون^{۵۰}، ۲۰۰۹؛ نجفلو، ۲۰۲۲).



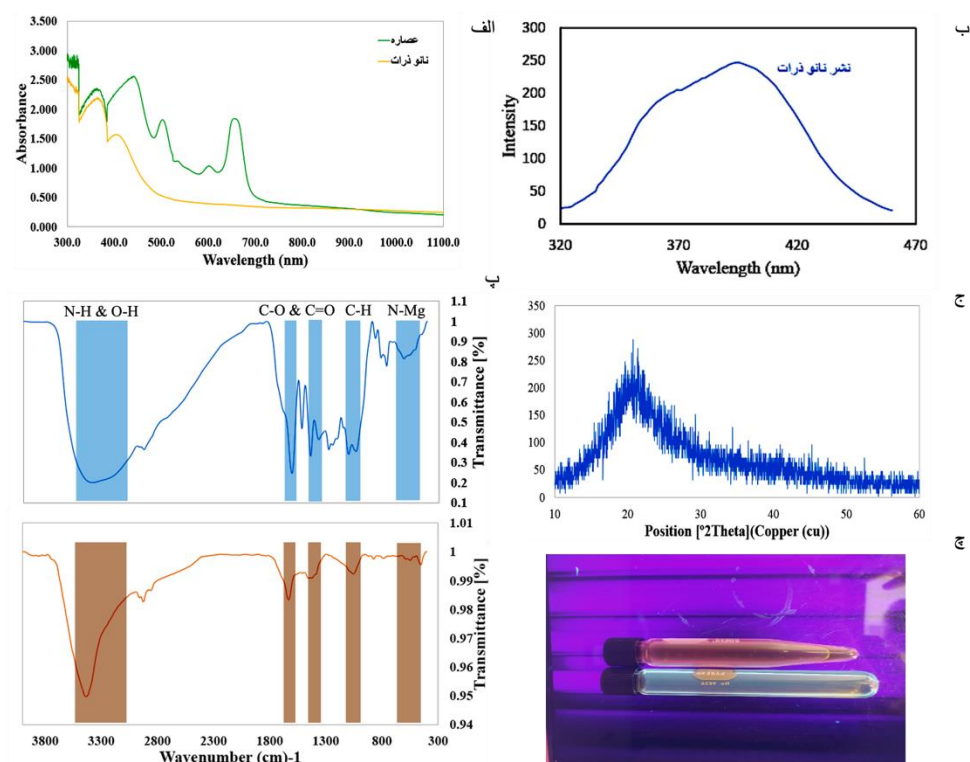
شکل ۲- نتایج (الف) تصویر برداری TEM، (ب) تصویر برداری SEM و (ج) EDS از نانو ذرات سنتز شده.

در نتایج آنالیز نوری نانو ذرات (شکل ۳)، میزان جذب نانو ذرات در بازه بین ۳۰۰ تا ۱۱۰۰ اندازه گیری شده است که طیف جذبی این نانو ذرات در مقایسه با طیف عصاره اولیه دارای تغییراتی در پیک می‌باشد که نشان از تغییر ساختار و تشکیل نانو ذرات هدف را دارد. در نتایج تهییج و نشر (Excitation-Emission)، میزان نشر آن‌ها در محدوده ۴۰۰ nm (طیف رنگ آبی) می‌باشد که این نتایج با مشاهده نانو ذره زیر لامپ UV (شکل ۳) تطابق دارد که نشری در محدوده‌ی نور آبی دارند. عصاره اولیه به دلیل داشتن کلروفیل زیر لامپ UV از خود نور قرمز ساعت می‌کند ولی در مقابل نانو ذرات سنتز شده نور آبی دارند که این نشان از تغییر ساختار درست و سنتز صحیح نانوذرات مورد نظر را دارد. این

^{۴۹} Chahal

^{۵۰} Kerton

نتایج با طیف FTIR همخوانی دارد که برخی از پیوندها تغییر کرده و پیوندهای جدیدی تشکیل شده است و همچنین پیک مربوط به پیوند کلروفیل (Mg-N) در نانو ذرات به کلی تغییر کرده است.



شکل ۳- الف) میزان جذب نوری نانو ذرات و عصاره اولیه در محدوده UV-Vis، ب) میزان نشر نوری نانو ذرات سنتز شده پس از تهییج در بیشترین مقدار جذب، پ) نتایج FTIR برای عصاره و نانو ذرات کربن دات سنتز شده، ج) نتایج XRD نانو ذرات سنتز شده، د) رنگ ساعت شده از عصاره و نانو ذرات کربن دات سنتز شده در زیر لامپ UV

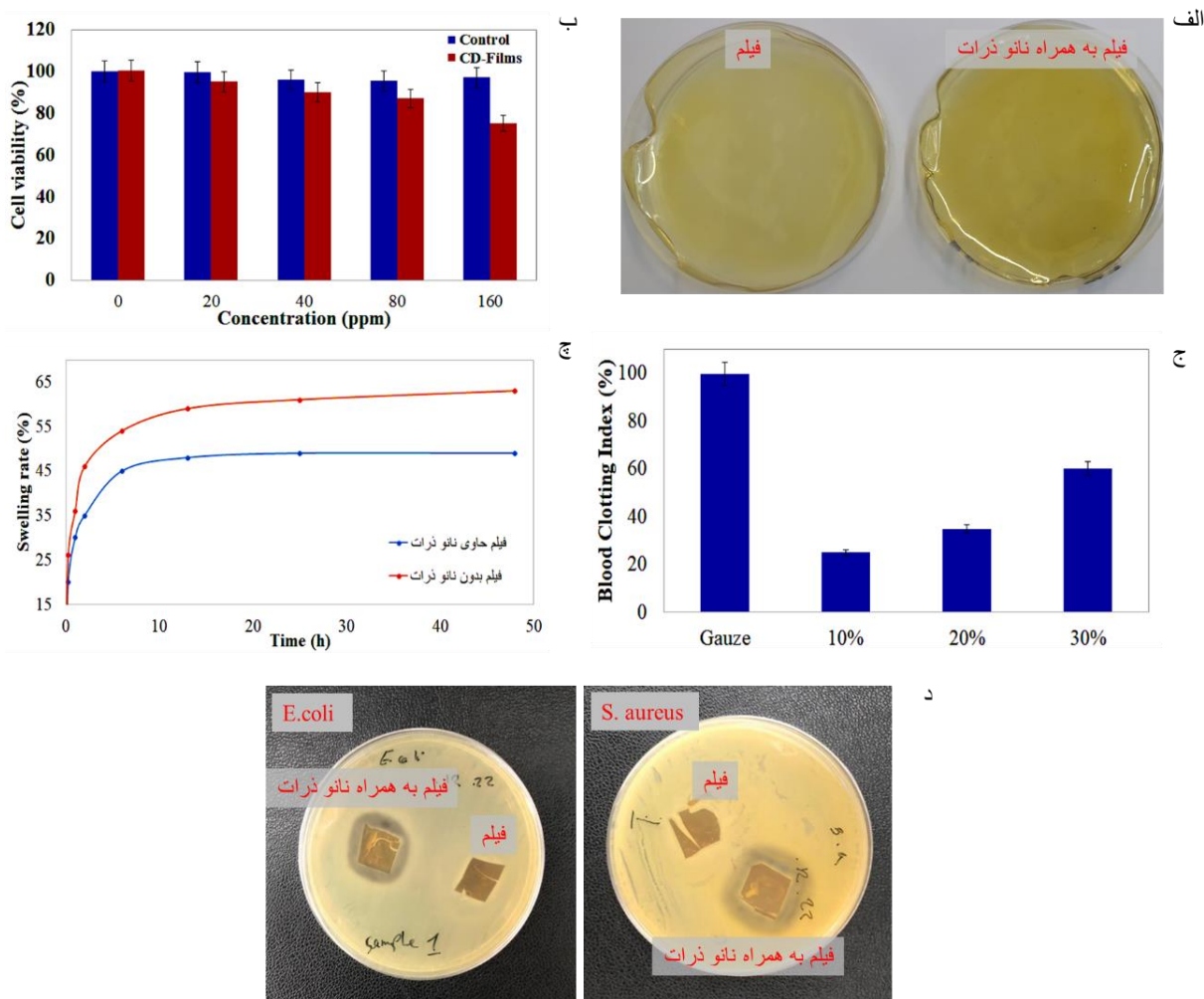
طبق نتایج XRD نانو ذرات (شکل ۳)، الگوی پراش اشعه ایکس (XRD) تشکیل CDs با کریستالی بالا را نشان می دهد (شکل ۳). قابل توجه است که الگوی XRD بدست آمده از CD تقریباً با الگوی پراش استاندارد SAJ ۰۰/۱۶، SAJ ۰۰/۲۴ و O۲۴/۰۰ مطابقت دارد (کد مرجع ۹۶-۲۱۰-۲۳۶۸).

بعد از سنتز کامل فیلم هیدروژنی نهایی (شکل ۴)، با توجه به نتایج FTIR و مشخصه نوری فیلم سنتز شده، ورود موفقیت آمیز نانو ذرات به ساختار را به خوبی نشان می دهد. طبق نتایج FTIR پیکهای قوی در نتایج FTIR عصاره مربوط به گروه های عاملی مانند هیدروکسی (-OH)، کربونیل (C=O)، و سایر گروه های مرتبط با ترکیبات آلی است که به وفور در گیاهان وجود دارد. در مقایسه با طیف کربن دات ممکن است همچنان برخی از این گروه ها را حفظ کرده باشد، اما شدت آن ها کاهش یافته یا مکان پیک ها کمی تغییر کرده باشد، که این به دلیل تغییرات شیمیایی در طی فرآیند سنتز است و نشان از موفقیت آمیز بودن فرآیند سنتز دارد. ناحیه مربوط به ۵۰۰ نانومتر که مربوط به پیوند اختصاصی N-Mg در کلروفیل (فراوان ترین ترکیب در گیاهان) است که این پیوند در نانو ذرات کربن دات سنتز

شده کاملاً حذف گردید است که با نتایج نشر نوری عصاره و نانو ذرات کربن دات زیر لامپ UV همخوانی دارد و رنگ قرمز انحصاری کلروفیل در عصاره به طور کامل بعد از سنتز نانو ذرات کربن دات تغییر کرد.

نتایج مربوط به میزان سمیت فیلم نهایی بر روی سلول‌های فیروپلاست (رده سلولی ۱-HFF) (شکل ۴) نشان می‌دهد که سمیت این فیلم‌ها در غلظت‌های بالاتر نیز به شدت کم بود که این برگرفته از استفاده از مواد طبیعی و گیاهی فیلم‌های سنتز شده می‌باشد.

فیلم‌ها با غلظت‌های مختلف نانوذرات کربن دات جهت انجام تست میزان انعقاد خون سنتز شدند و در مقایسه با گاز استریل، میزان عملکرد انعقاد خون خوبی را از خود نشان دادند که علاوه بر این، نتایج حاصله میزان وابستگی انعقاد کنندگی خون به غلظت پلیمر و نانو ذره به کار رفته را به خوبی نشان می‌دهد.



شکل ۴- الف) شکل ظاهری و رنگ فیلم ساخته شده در حضور و بدون حضور نانو ذرات کربن دات، ب) میزان سمیت فیلم‌های سنتز شده و اتصال عرضی شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات کربن دات بر روی سلول‌های فیروپلاست، ج) نتایج عملکرد انعقاد خون فیلم‌های سنتز شده و اتصال عرضی شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات کربن دات در مقابل گاز استریل، د) میزان تورم فیلم حاوی نانو ذرات کربن دات و فیلم بدون اتصال عرضی با نانو ذرات، د) عملکرد ضد باکتریایی فیلم بدون نانو ذرات و حاوی نانو ذرات کربن دات در مقابل باکتری گرم منفی و گرم مثبت

نمودار رفتار تورم دو فیلم در طول زمان برای فیلم بدون کربن دات و فیلم حاوی کربن دات در شکل ۴ نشان داده شده است که هر دو فیلم در ابتدا (۰ تا ۱۰ ساعت) افزایش سریعی در نرخ تورم نشان می‌دهند. این رفتار به دلیل جذب سریع آب در مراحل اولیه است. پس از حدود ۲۰ ساعت، هر دو فیلم به حالت اشباع می‌رسند، به این معنا که به حداکثر ظرفیت تورم خود دست یافته‌اند. فیلم بدون نقاط کربنی (خط قرمز) نرخ تورم بیشتری (۶۵٪) نسبت به فیلم همراه با نقاط کربنی (۵۰٪) دارد. وجود نقاط کربنی نرخ تورم فیلم را کاهش می‌دهد که این موضوع به دلیل افزایش تراکم اتصالات عرضی فیلم هیدروژلی می‌باشد.

عملکرد ضد باکتریایی با روش انتشار دیسک آگار در مقابل باکتری‌های *E.coli* و *S. aureus* انجام شد که نتایج در شکل ۴ نشان از افزایش چشم گیر خاصیت ضد باکتریایی فیلم‌ها بعد از اتصال عرضی فیلم‌ها با نانو ذرات کربن دات را نشان می‌دهد. این نتایج در کنار سمیت کم این فیلم‌ها در مقابل سلول‌های فیبروبلاست رفتار ایده آل آن‌ها را با توجه به منبع گیاهی و طبیعی نشان می‌دهد.

نتیجه گیری و پیشنهادات:

این مطالعه، استفاده نوآورانه از مواد طبیعی گیاهی را برای توسعه فیلم‌های هیدروژل با خواص تورم و هموستاتیک قابل توجه بررسی می‌کند. این رویکرد نه تنها با تقاضای رو به رشد برای مواد زیست سازگار و پایدار مطابقت دارد، بلکه به چالش‌های حیاتی در مراقبت از زخم و کاربردهای میدان نبرد نیز می‌پردازد. این تحقیق نشان دهنده تلاش پیشگامانه در استفاده از هیدروژل‌های طبیعی تقویت شده با نانو ذرات کربن دات است که دارای خواص فیزیکی و شیمیایی منحصر به فردی هستند. نانو ذرات کربن دات به طور قابل توجهی استحکام مکانیکی را بهبود می‌بخشند و رفتار تورم فیلم‌ها را کنترل می‌کنند و دوام و اثربخشی پایدار را در محیط‌های مختلف تضمین می‌کنند. هیدروژل‌ها به ویژه برای استفاده بالقوه در انعقاد خون قابل توجه هستند و توانایی جذب سریع مایعات و تثبیت لخته‌های خون، این فیلم‌ها را به عنوان گزینه‌های مناسبی برای استفاده در شرایط اضطراری و میدان نبرد، جایی که اقدام سریع حیاتی است، قرار می‌دهد. از طرفی اتکا به اجزای گیاهی سازگاری با بافت‌های بیولوژیکی را نیز تضمین می‌کند. این امر این فیلم‌ها را برای کاربردهای طولانی مدت پزشکی بدون ایجاد واکنش‌های نامطلوب مناسب می‌سازد.

ظرفیت فیلم‌های هیدروژل در کنترل موثر خونریزی، کاربرد آن‌ها در پزشکی نظامی را برجسته می‌کند. طراحی سبک، انعطاف پذیر و اثربخشی آنها در شرایط فیزیولوژیکی مختلف، آن‌ها را برای استقرار میدانی بسیار مفید کرده و علاوه بر این، مطالعه نشان می‌دهد که این مواد می‌توانند برای ایجاد خواص ضد باکتریایی بیشتر اصلاح شوند و عملکرد آن‌ها را برای درمان زخم‌های آلوده افزایش دهند. جهت‌های آینده برای ادامه این مطالعات باید گفت این فیلم‌ها می‌توانند برای انتقال آنتی بیوتیک‌ها یا فاکتورهای رشد مهندسی شوند و ارزش آن‌ها را برای مدیریت پیچیده زخم بیشتر کنند.

منابع:

- Bustamante-Torres, Moises؛ Romero-Fierro, David؛ Arcentales-Vera, Belén؛ Palomino, Kenia؛ Magaña, Héctor و Bucio, Emilio. (2021). Hydrogels classification according to the physical or chemical interactions and as stimuli-sensitive materials. *Gels* ۷، (4)، ۱۸۲،
- Butler, Frank K؛ Smith, David J و Carmona, Richard H. (2015). Implementing and preserving the advances in combat casualty care from Iraq and Afghanistan throughout the US Military. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* ۷۹، (2)، ۳۲۶-۳۲۱،
- Caló, Enrica و Khutoryanskiy, Vitaliy V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European polymer journal* ۶۶، ۲۵۲-۲۶۷،
- Chahal, Shawninder؛ Macairan, Jun-Ray؛ Yousefi, Nariman؛ Tufenkji, Nathalie و Naccache, Rafik. (۲۰۲۱). Green synthesis of carbon dots and their applications. *RSC advances* ۱۱، (41)، ۲۵۳۵۴-۲۵۳۶۳،
- De Medeiros, Tayline V؛ Manioudakis, John؛ Noun, Farah؛ Macairan, Jun-Ray؛ Victoria, Florence و Naccache, Rafik. (2019). Microwave-assisted synthesis of carbon dots and their applications. *Journal of Materials Chemistry C* ۷، (24)، ۷۱۷۵-۷۱۹۵،
- Dhivya, Selvaraj؛ Padma, Viswanadha Vijaya و Santhini, Elango. (2015). Wound dressings—a review. *BioMedicine* ۵، (4)، ۲۲،
- Eastridge, Brian J؛ Mabry, Robert L؛ Seguin, Peter؛ Cantrell, Joyce؛ Tops, Terrill؛ Uribe, Paul؛ Mallett, Olga؛ Zubko, Tamara؛ Oetjen-Gerdes, Lynne و Rasmussen, Todd E. (2012). Death on the battlefield (2001–2011): implications for the future of combat casualty care. *Journal of Trauma and Acute Care Surgery* ۷۳، (6)، S431-S ۴۳۷،
- Ehtesabi, Hamide و Nasri, Reyhaneh. (2021). Carbon dot-based materials for wound healing applications. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology* ۱۲، (2)، ۲۵۰۰۶،
- Fathi, Parinaz؛ Sikorski, Michael؛ Christodoulides, Katerina؛ Langan, Kristen؛ Choi, Yoon Sun؛ Titcomb, Michael؛ Ghodasara, Anjali؛ Wonodi, Omasiri؛ Thaker, Hemi و Vural, Mert. (2018). Zeolite-loaded alginate-chitosan hydrogel beads as a topical hemostat. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* ۱۰۶، (۵)، ۱۶۶۲-۱۶۷۱،
- Fei Liu, Xiao؛ Lin Guan, Yun؛ Zhi Yang, Dong؛ Li, Zhi و De Yao, Kang. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of applied polymer science* ۷۹، (7)، ۱۳۲۴-۱۳۳۵،
- Guo, Baolin؛ Dong, Ruonan؛ Liang, Yongping و Li, Meng. (2021). Haemostatic materials for wound healing applications. *Nature Reviews Chemistry* ۵، (11)، ۷۷۳-۷۹۱،
- Kerton, Matt؛ Newbury, H John؛ Hand, David و Pritchard, Jeremy. (2009). Accumulation of calcium in the centre of leaves of coriander (*Coriandrum sativum* L.) is due to an uncoupling of water and ion transport. *Journal of Experimental Botany* ۶۰، (1)، ۲۲۷-۲۳۵،
- Kubo, Isao؛ Fujita, Ken-Ichi؛ Kubo, Aya؛ Nihei, Ken-Ichi و Ogura, Tetsuya. (2004). Antibacterial activity of coriander volatile compounds against *Salmonella choleraesuis*. *Journal of agricultural and food chemistry* ۵۲، (11)، ۳۳۲۹-۳۳۳۲،
- Mohebbi, Shabnam؛ Nezhad, Mojtaba N؛ Zarrintaj, Payam؛ Jafari, Seyed Hassan؛ Gholizadeh, Saman؛ Seyed؛ Saeb, Mohammad Reza و Mozafari, Masoud. (2019). Chitosan in biomedical engineering: a critical review. *Current stem cell research & therapy* ۱۴، (2)، ۹۳-۱۱۶،
- Mourya, V و Inamdar, Nazma N. (2008). Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. *Reactive and Functional polymers* ۶۸، (6)، ۱۰۱۳-۱۰۵۱،
- Najafloo, Meysam؛ Shahgolzari, Mehdi؛ Bani, Farhad و Khosroushahi, Ahmad Yari. (2022). Green synthesis of near-infrared copper-doped carbon dots from alcea for cancer photothermal therapy. *ACS omega* ۷، (38)، ۲۴۵۷۳-۲۴۵۸۲،
- Ong, Shin-Yeu؛ Wu, Jian؛ Moochhala, Shabbir M؛ Tan, Mui-Hong و Lu, Jia. (2008). Development of a chitosan-based wound dressing with improved hemostatic and antimicrobial properties. *Biomaterials* ۲۹، (۳۲)، ۴۳۲۳-۴۳۳۲،
- Palta, Sanjeev؛ Saroa, Richa و Palta, Anshu. (2014). Overview of the coagulation system. *Indian journal of anaesthesia* ۵۸، (5)، ۵۱۵-۵۲۳،

- Parhi, R. (2017). Cross-Linked Hydrogel for Pharmaceutical Applications: A Review. *Adv Pharm Bull*، ۵۳۰-۵۱۵، (۴)۷. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.064>
- Pellá, Michelly Cg؛ Lima-Tenório, Michele K؛ Tenório-Neto, Ernandes T؛ Guilherme, Marcos R؛ Muniz, Edvani C و Rubira, Adley F. (2018). Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate polymers*، ۲۴۵-۲۳۳، ۱۹۶،
- Piersa, Bruno Monteiro؛ Bortoto, José Benedito و Fraga, Gustavo Pereira. (2018). Topical hemostatic agents in surgery: review and prospects. *Revista do colegio brasileiro de Cirurgioes*، ۴۵،
- Pruksawan, Sirawit؛ Lim, Jeremy Weixiong Reuben؛ Lee, Yock Leng؛ Lin, Zehuang؛ Chee, Heng Li؛ Chong, Yi Ting؛ Chi, Hong و Wang, Fuke. (2023). Enhancing hydrogel toughness by uniform cross-linking using modified polyhedral oligomeric silsesquioxane. *Communications Materials* ۴، (1)۰۷۵، <https://doi.org/10.1038/s43246-023-00402-2>
- Ryu, Ji Hyun؛ Hong, Seonki و Lee, Haeshin. (2015). Bio-inspired adhesive catechol-conjugated chitosan for biomedical applications: A mini review. *Acta biomaterialia*، ۱۱۵-۱۰۱، ۲۷، <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.08.043>
- Seyed Ahamad Mirza Babayi و Mahmudi, Mahbubeh ساخت و مشخصه یابی هیدروژل حاوی کورکومین (۱۳۹۷). بارگذاری شده در نانوذرات کیتوسان به عنوان زخم پوش نوین. مواد و فناوریهای پیشرفته، سال هفتم، ۶۳-۵۳.
- Simões, Déborah؛ Miguel, Sónia P؛ Ribeiro, Maximiano P؛ Coutinho, Paula؛ Mendonça, António G و Correia, Ilídio J. (2018). Recent advances on antimicrobial wound dressing: A review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*، ۱۴۱-۱۳۰، ۱۲۷،
- Singh, Sneha؛ Dodt, Johannes؛ Volkers, Peter؛ Hethershaw, Emma؛ Philippou, Helen؛ Ivaskevicius, Vytautas؛ Imhof, Diana؛ Oldenburg, Johannes و Biswas, Arijit. (2019). Structure functional insights into calcium binding during the activation of coagulation factor XIII A. *Scientific reports* ۹، (1)۰۱۱۳۲۴،
- Smith, Stephanie A؛ Choi, Sharon H؛ Davis-Harrison, Rebecca؛ Huyck, Jillian؛ Boettcher, John؛ Rienstra, Chad M و Morrissey, James H. (2010). Polyphosphate exerts differential effects on blood clotting, depending on polymer size. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology* ۱۱۶، (20)۰۴۳۵۹-۴۳۵۳،
- Tuerhong, Mhetaer؛ Yang, Xu و Xue-Bo, Yin. (2017). Review on carbon dots and their applications. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* ۴۵، (1)۰۱۵۰-۱۳۹،
- Wang, Qinghe؛ Zhang, Yan؛ Ma, Yue؛ Wang, Miao و Pan, Guoqing. (۲۰۲۳). Nano-crosslinked dynamic hydrogels for biomedical applications. *Materials Today Bio*، ۱۰۰۶۴۰، ۲۰، <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100640>
- Zaidan, Mr؛ Noor Rain, A؛ Badrul, Ar؛ Adlin, A؛ Norazah, A و Zakiah, I. (2005). In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop biomed* ۲۲، (2)۰۱۷۰-۱۶۵،
- .(۱۳۹۴). Epidemiological pattern of road traffic injuries among Iranian motorcyclists in 2012. *Safety promotion and injury prevention (Tehran)* ۴، (۱)۰۵۴-۴۷،

Synthesis of natural and plant-based nanohydrogel films as hemostatic wound dressings for injured soldiers

Hassan Tavakoli, Meysam Najafloo

Abstract:

Bleeding caused by trauma is one of the major challenges in managing injuries resulting from accidents and incidents on battlefields. Given the importance of rapid bleeding control, researchers are seeking to develop effective and biocompatible hemostatic agents. Chitosan, a natural biopolymer derived from marine sources, has emerged as a promising candidate in this field due to its hemostatic properties and biocompatibility. The use of various effective cross-linking agents to achieve the final structure of this polymeric material holds particular significance. In this study, carbon dot nanoparticles derived from coriander leaves were employed due to their unique properties and their potential to form suitable cross-links. Following comprehensive characterization of the synthesized nanoparticles, they were incorporated into the chitosan structure, and final hydrogel films were prepared and evaluated. The results demonstrated that the synthesized carbon dot nanoparticles facilitated appropriate interactions with chitosan and could effectively cross-link with this polymer. The resulting films exhibited low toxicity, improved hemostatic performance, and notable antibacterial properties, attributed to the entirely natural and plant-based materials used in their synthesis. This study revealed that using carbon dot nanoparticles as cross-linkers in chitosan hydrogel films not only reduces production costs but also significantly enhances the antibacterial and hemostatic properties of these wound dressings. This innovation represents a pioneering effort in the field of biogenic nanomaterials for wound care applications.

Key Words: Chitosan, hydrogel films, carbon quantum dots, wound dressings, biocompatible nanoparticles