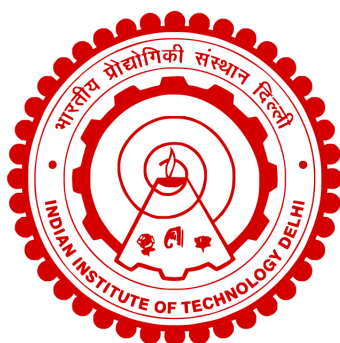


**DEVELOPMENT OF NOVEL NANO AND NANO-POROUS  
MATERIALS BASED THERAPEUTIC STRATEGY FOR EFFECTIVE  
MANAGEMENT OF HEMOSTASIS**

**CHANDAN BHOGENDRA JHA**



DEPARTMENT OF CHEMISTRY  
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

July 2024

© INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI (IITD), NEW DELHI, 2024

**DEVELOPMENT OF NOVEL NANO AND NANO-POROUS  
MATERIALS BASED THERAPEUTIC STRATEGY FOR EFFECTIVE  
MANAGEMENT OF HEMOSTASIS**

*by*

**CHANDAN BHOGENDRA JHA**

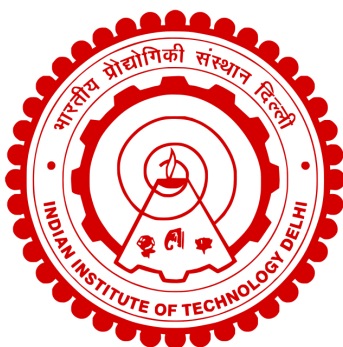
**Department of Chemistry**

*Submitted*

*In fulfillment of the requirements of the degree of*

**Doctor of Philosophy**

*to the*



**INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI**

**July 2024**

***DEDICATED TO MY PARENTS***

*(Maa)*

## Certificate

This is to certify that the thesis entitled “**Development of Novel Nano and Nano-Porous Materials Based Therapeutic Strategy for Effective Management of Hemostasis**” being submitted by Chandan Bhogendra Jha (Entry No.: 2019CYZ8114) to Indian Institute of Technology Delhi for the award of the degree of Doctor of Philosophy, is a record of bonafide research work carried out by him. Chandan Bhogendra Jha has worked under our supervision. He has fulfilled all the requirements for submitting his PhD thesis, which, to our knowledge, has reached the requisite standard and is worthy of consideration for the award of the Ph.D. degree. The work embodied in this thesis has not been submitted, in part or whole, to any other University or Institute for the award of any degree or diploma.

*Date: 22-07-2024*

*Place: New Delhi*

*Thesis Supervisor's*

Prof. Kuntal Manna  
Department of Chemistry  
Indian Institute of Technology Delhi  
Hauz Khas, New Delhi-110016, India

Dr. Rashi Mathur  
Institute of Nuclear Medicines & Allied Sciences  
Defence Research & Development Organisation  
Timarpur, New Delhi-110054, India

## Acknowledgment

*I want to express my deep and sincere gratitude to my research supervisors, **Dr. Rash Mathur**, Senior Scientist, Division of Radiological, Nuclear & Imaging Sciences, Institute of Nuclear Medicines & Allied Sciences, DRDO, Delhi, India and **Prof. Kuntal Manna**, Department of Chemistry, Indian Institute of Technology Delhi, India for allowing me to do research and providing invaluable guidance throughout the journey of my research. Their dynamism, vision, sincerity, and motivation have deeply inspired me. Working and studying under their guidance was a great privilege and honor.*

*I would also like to thank my SRC members, Prof. Shashank Deep, Prof. Tanmay Dutta, and Prof. Deepak Joshi, for their encouragement, insightful comments, and hard questions.*

*I want to express my gratitude to the current and previous heads of the Department of Chemistry for providing all the necessary resources that enabled me to conduct my research.*

*I want to express my gratitude to Dr. Sweta Singh, INMAS, DRDO, Delhi, India, for her invaluable assistance with the cell studies included in this thesis and Dr. Parag Patil, Department of Laboratory Medicines, AIIMS Delhi, India, for coagulation studies.*

*I would also like to thank the Experimental Animal Facility, INMAS, DRDO for providing all the necessary resources.*

*I want to express my sincere gratitude to the instrumentation lab staff, Mr. Narugopal Kuly, Mrs. Shubra Gupta, and Mr. Sandeep, for their invaluable assistance with the instrument techniques. I also thank the chemistry department*

*office staff, Mrs. Dimple Hindwani, Mr. Ashish, and Mr. Shiv, for supporting my official activities. Additionally, I am thankful to the Central Research Facility of IIT Delhi for providing the necessary instrument facilities.*

*I want to express my heartfelt gratitude and affection for my lab mates, Ms. Chitragda Singh, Dr. Naved Akhtar, and Ms. Wahida Begum, who have been a source of constant support, strong friendship, and fruitful scientific interactions. I thank all the past and present Master's trainees in our lab at INMAS, Mr. Priyam Mangal and Mr. Ayush Kumar, for their support. I am also grateful to my colleagues from IITD, Mr. Prabuddha Kant Mishra and Mr. Haribrahma Singh, for their constant motivation and assistance.*

*I acknowledge the Ministry of Defense Research and Development Organization for financial assistance.*

*My deepest love and gratitude go to my family, who have sacrificed their needs to support my education. I am eternally grateful to my father, **Mr. Bhogendra Jha**, for his blessings and to my mother, **Mrs. Ranju Jha**, for her unwavering support and encouragement. I owe my success to their instilled values, which have shaped my educational and social growth. Thanks to my elder brother, Mr. Pankaj Kumar Jha, for his constant strength and support. Special thanks go to my friend Mr. Rajat Singh for his keen interest in completing this thesis.*

*I am grateful to the countless atoms, molecules, and bonds that have tirelessly supported my research throughout this journey. Your steadfast cooperation in forming the intricate structures of MOFs and nanoparticles has been remarkable to the spectrometers, microscopes, and other instruments that have revealed the hidden world of nanomaterials.*

*I would like to acknowledge the present and previous Directors of IIT  
Delhi and INMAS, DRDO.*

*I would like to thank God for giving me wisdom and good health.*

## Abstract

This thesis entitled "Development of Novel Nano and Nano-porous Materials Based Therapeutic Strategy for Effective Management of Hemostasis" presents the synthesis, characterization, and applications of nano and nano-porous materials in hemostasis. The research focuses on developing and using these materials to accelerate hemostatic performance as an alternative to currently available agents.

**Chapter 1:** This chapter provides a comprehensive overview of the bleeding, its causes, and the critical need for effective hemostatic agents. Bleeding, a common yet potentially life-threatening, can arise from various conditions, including military and civilian trauma and surgical procedures. This chapter discusses the natural hemostasis process of the body and the mechanisms involved in controlling bleeding. Furthermore, it reviews the discoveries of hemostatic materials, highlighting traditional methods and the importance of advanced materials designed to enhance hemostasis. Historically and in recent medical practice, a significant focus has been placed on various materials to control bleeding. These materials range from conventional bandages and surgical sutures to more sophisticated solutions such as synthetic polymers, biopolymers, and nano-based materials. The chapter discusses these materials' properties, advantages, and limitations, emphasizing the ongoing challenges in achieving optimal hemostasis. This chapter sets the background for the subsequent exploration of novel nano and nano-porous materials, including Metal-organic frameworks (MOFs) and metal nanoparticles. This chapter establishes the foundation for the research presented in this thesis, which aims to develop innovative strategies for effective hemostasis management.

**Chapter 2:** This chapter presents the experimental methods and characterization techniques used in the thesis, focusing on the synthesis and characterization of nano and nano-porous materials. This includes a detailed description of the various analytical techniques used to evaluate synthesized material. It details the sample preparation and the measurement protocols that were used for the characterization tools like Powder X-ray Diffraction (XRD), BET Analysis, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR), Thermogravimetric Analysis (TGA), Dynamic Light Scattering and Zeta Potential (DLS & Zeta), UV-Visible Spectroscopy, Fluorescence Spectroscopy, Transmission Electron Microscopy (TEM), and Scanning Electron Microscopy (SEM). In addition to this, the chapter highlights the procedures that have been used for the common biological experiments conducted in this thesis. The experiments that were specific to the chapters have been detailed there. The biological studies described here

are the protein-material interaction studies, cellular toxicity studies, hemolysis studies, ex-vivo hemostatic studies in static and dynamic conditions. In-vivo studies and non-invasive in-vivo imaging techniques supported these biological experiments. Non-invasive imaging includes radiolabelling, serum stability, blood kinetics, and bio-distribution, supported by SPECT imaging.

**Chapter 3:** Haemorrhage remains a significant challenge in many medical emergencies. The coagulation cascade involves a complex series of reactions in the body to form blood clots, preventing excessive bleeding. Adequate and rapid hemostasis is critical to avoid excessive blood loss and improve patient outcomes. Various hemostatic agents are used in clinics to enhance the innate hemostatic capability of the body; however, the effort to find better agents continues. The main component of the coagulation cascade involves the participation of certain metals ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ) and amino acids (Glycine, Lysine, and L-glutamic acid), which play a significant role in tightly controlling it. In this hypothesis, we propose to prepare amino acid-based bio-compatible metal-organic frameworks (AA-Bio-MOFs), where we intend to combine the endogenous amino acid as organic linkers and the biocompatible metal as nodes, creating a well-defined structure. We expect these Bio-MOFs to be better hemostatic agents than traditional hemostatic materials due to their synergistic effect on the coagulation cascade and the significant reduction in their toxicity. Therefore, integrating amino acids and metal ions within a bio-compatible metal-organic framework (BioMOF) could potentially add a new paradigm to the field of hemostasis.

**Chapter 4:** Building upon the hypothesis presented in Chapter 3, this chapter focuses on the experimental testing and validation of our proposed concepts. Hemostatic agents must play a key role in managing severe bleeding conditions during trauma or on the battlefield. We can design materials that enhance the innate hemostatic capability using natural ligands and bioactive metals. This work entails the synthesis of amino acid-based MOF using L-Aspartic acid as an organic ligand and calcium as a metal node, and parametric optimization was performed using the Box-Behnken experimental design. Out of the total experimental runs obtained, the one with the highest reaction yield was evaluated. It was observed that despite the low porosity and surface area, the impact of the synthesized Ca-MOF on the hemostatic property was very high. A hemolysis ratio  $< 1.55\%$  induces erythrocyte absorption and aggregation activates the intrinsic coagulation pathway, and accelerates blood coagulation as assessed using TEG. The evaluated Ca-MOF shows the shortest clotting time ( $39 \pm 0.2$  s) and

lowest blood loss ( $0.14 \pm 0.2$  g) in the rat-tail amputation model compared to the control and commercially available hemostatic drug tranexamic acid. The *in-vivo* toxicity studies in blood over a 30-day period suggest no significant changes in the animal groups that received synthesized MOFs compared to the control group. With the enhanced coagulation capacity and associated biocompatibility, the developed calcium-aspartate bio-MOF could act as a safe and effective hemostatic agent and provide a unique concept of using synthetic porous materials to manage excessive bleeding.

**Chapter 5:** In Chapter 4, we observed that the material tested, despite possessing lower surface area, pore size, and pore volume, demonstrated superior hemostatic performance. We concluded that this effect may be attributed to the physical properties of the metal-organic frameworks (MOFs) and the individual components, including the metal and ligands known to impact hemostasis. Considering this, we decided to investigate using MOFs with higher surface area, pore size, and pore volume to assess their potential impact on hemostatic performance. Therefore, in Chapter 5, we explore using highly porous MOFs for managing bleeding. Metal-organic frameworks are increasingly recognized for their potential in drug delivery due to their unique properties, such as high surface area, tunable pore size, and biocompatibility. This study uses cobalt-metal organic frameworks (Co-MOFs) to load Tranexamic acid, a well-established hemostatic drug, in clinics. The highly porous Co-MOFs were synthesized under optimized conditions using design expert software and characterized using various physicochemical characterization techniques. The loading of Tranexamic acid into the Co-MOFs was achieved via the diffusion method. Drug loading was validated under ideal conditions by using the software Material Studio. Biocompatibility and interaction studies with different clotting proteins present in blood were conducted using *in-vitro* clotting assays and an *in-vivo* animal model. Results revealed high surface properties in the synthesized Co-MOFs, with a well-defined crystalline structure. The Co-MOFs exhibited a loading capacity of 43% (w/w) for Tranexamic acid, with a mixed-order kinetics drug release profile over 24 h. *In-vitro* clotting assays demonstrated that Co-MOF@Tranexamic acid significantly improved clotting compared to native Tranexamic acid alone and control groups. *In-vivo* studies using a rat tail amputation model showed Co-MOF@Tranexamic acid achieving hemostasis within 8 seconds, outperforming Tranexamic acid alone. Additionally, *in-vivo* toxicity testing in blood for 30 days showed no change in animal groups that received Co-MOFs compared to the control group. This work highlights the potential of Co-MOFs as carriers for hemostatic drugs, offering

enhanced efficacy in achieving rapid and controlled haemostasis, which is particularly valuable in trauma settings.

**Chapter 6:** This chapter presents the proposal for using surface-modified gold nanoparticles as an injectable hemostat. External hemostatic agents are crucial in stabilizing an impaired process during pathological conditions. The idea is to stabilize the in vivo system as soon as possible. This study uses a class I hemostatic drug, tranexamic acid, as a reducing and capping agent for synthesizing the gold nanoparticles (Tr-AuNPs). Being the synthetic analog of lysine and a biologically inspired alkylamine molecule, the chemistry can be fine-tuned for stable material, simultaneously targeting the intrinsic and extrinsic hemostatic pathway, making it promising for hemostatic applications. The Tr-AuNPs of hydrodynamic diameter  $\sim 46\text{nm}$  were synthesized and evaluated physio-chemically using various analytical techniques wherein they showed hemocompatibility and increased thrombus weight compared to the native drug. The decrease in prothrombin time (PT) and International normalized ratio (INR) supported by the dynamic thromboelastography (TEG) study indicates the prepared nanoconjugates potential in reducing time for attaining hemostasis as compared to the native tranexamic acid drug. At a  $9\mu\text{g/ml}$  concentration, Tr-AuNPs had a procoagulant effect, shown by decreased reaction time (R) and coagulation time (K) with improved  $\alpha$  angle and MA. There was a significant increase in the rate of coagulation in-vivo by Tr-AuNPs, i.e., (52 sec) compared to the native tranexamic acid (360 sec). Radiolabelling studies ascertained the in vivo biocompatibility (non-invasive distribution, residence, clearance, and stability) of the Tr-AuNPs. The short-term toxicity studies were conducted to establish a proof of concept for the biomedical application of the material. The results highlighted the use of biologically alkyl amine molecules as capping reducing agents for the synthesis of nanoparticles, which have shown a synergistic effect on the coagulation cascade while holding the potential for also acting as potential theranostic agents.

**Chapter 7:** This chapter presents the conclusions drawn from the comprehensive studies conducted in chapters 4 to 6, along with outlining the future scope of the work. This research has explored the use of different nano and nano-porous materials for managing hemostasis, focusing on their synthesis, characterization, and efficacy in preclinical studies. The findings from chapters 4 to 6 collectively demonstrate the potential of these materials in promoting hemostasis. These results underscore the significance of nano and nano-porous materials in improving hemostatic interventions in trauma settings. Moving forward, further research

should concentrate on transitioning from preclinical studies to clinical trials, which is a critical next step for adopting these materials in trauma. This transition will require addressing several key considerations, including regulatory requirements, which involve ensuring compliance with regulatory standards for medical devices and pharmaceuticals. Scalability of production is essential to meet the demand for these materials in clinical settings, requiring optimization of synthesis methods and production processes, and cost-effectiveness is crucial for the widespread adoption of these materials, necessitating efficient production methods and competitive pricing strategies.

## सार

"हेमोस्टेसिस के प्रभावी प्रबंधन के लिए नोवेल नैनो और नैनो-पोरस सामग्री आधारित चिकित्सीय रणनीति का विकास" नामक यह थीसिस हेमोस्टेसिस में नैनो और नैनो-पोरस सामग्री के संश्लेषण, लक्षण वर्णन और अनुप्रयोगों को प्रस्तुत करता है। शोध वर्तमान में उपलब्ध हेमोस्टैटिक एजेंटों के विकल्प के रूप में हेमोस्टैटिक प्रदर्शन को तेज करने में इन सामग्रियों के विकास और उपयोग पर केंद्रित है।

**अध्याय 1:** यह अध्याय रक्तस्राव और उसके कारणों और प्रभावी हेमोस्टैटिक एजेंटों की महत्वपूर्ण आवश्यकता का एक व्यापक अवलोकन प्रदान करता है। रक्तस्राव, एक सामान्य लेकिन संभावित रूप से जीवन के लिए खतरा, सैन्य और नागरिक आघात और सर्जिकल प्रक्रियाओं सहित विभिन्न स्थितियों से उत्पन्न हो सकता है। इस अध्याय में शरीर की प्राकृतिक हेमोस्टेसिस प्रक्रिया और रक्तस्राव को नियंत्रित करने में शामिल तंत्रों पर चर्चा की गई है। इसके अलावा, यह हेमोस्टैटिक सामग्री की खोजों की भी समीक्षा करता है, पारंपरिक तरीकों और हेमोस्टैसिस को बढ़ाने के लिए डिज़ाइन की गई उन्नत सामग्री के महत्व पर प्रकाश डालता है। रक्तस्राव को नियंत्रित करने के लिए ऐतिहासिक रूप से और हाल के चिकित्सा अभ्यास में उपयोग की जाने वाली विभिन्न सामग्रियों पर महत्वपूर्ण ध्यान दिया जाता है। इन सामग्रियों में पारंपरिक पट्टियों और सर्जिकल टांके से लेकर सिंथेटिक पॉलिमर, बायोपॉलिमर और नैनो-आधारित सामग्री जैसे अधिक परिष्कृत समाधान शामिल हैं। अध्याय इन सामग्रियों के गुणों, लाभों और सीमाओं पर चर्चा करता है, इष्टतम हेमोस्टेसिस प्राप्त करने में चल रही चुनौतियों पर जोर देता है। यह अध्याय मेटल-ऑर्गेनिक फ्रेमवर्क (एमओएफ) और मेटल नैनोपार्टिकल्स सहित नए नैनो और नैनो-पोरस सामग्रियों के बाद के अन्वेषण के लिए पृष्ठभूमि निर्धारित करता है। यह अध्याय इस थीसिस में प्रस्तुत शोध की नींव स्थापित करता है, जिसका उद्देश्य प्रभावी हेमोस्टेसिस प्रबंधन के लिए नवीन रणनीतियों को विकसित करना है।

**अध्याय 2:** यह अध्याय नैनो और नैनो-छिद्र सामग्री के संश्लेषण और लक्षण वर्णन पर ध्यान केंद्रित करते हुए, थीसिस में उपयोग की जाने वाली प्रयोगात्मक विधियों और लक्षण वर्णन तकनीकों को प्रस्तुत करता है। नैनो और नैनो-छिद्रयुक्त पदार्थों के संश्लेषण के लिए प्रयुक्त प्रयोगात्मक विधियों पर भी इस खंड में चर्चा की गई है। इसमें उपयोग किए जाने वाले रसायनों और उपकरणों सहित संश्लेषण प्रक्रिया का विस्तृत विवरण शामिल है। संश्लेषित सामग्रियों के लक्षण वर्णन के लिए पाउडर एक्स-रे विवर्तन (एक्सआरडी) बीईटी विश्लेषण, फूरियर ट्रांसफॉर्म इन्फ्रारेड स्पेक्ट्रोस्कोपी (एफटीआईआर) थर्मोग्रैविमेट्रिक विश्लेषण (टीजीए) डायनेमिक लाइट स्कैटरिंग और जीटा पोटेंशियल (डीएलएस और जीटा) यूवी-विजिबल

स्पेक्ट्रोस्कोपी, फ्लोरोसेंस स्पेक्ट्रोस्कोपी, ट्रांसमिशन इलेक्ट्रॉन माइक्रोस्कोपी (टीईएम) और स्कैनिंग इलेक्ट्रॉन माइक्रोस्कोपी सहित विभिन्न उपकरणों का उपयोग किया गया (SEM). जबकि जैविक प्रयोगात्मक खंड थीसिस के हिस्से के रूप में किए गए जैविक प्रयोगों पर चर्चा करता है, जिसमें प्रोटीन-सामग्री अंतःक्रिया अध्ययन, सेलुलर विषाक्तता अध्ययन, हेमोलिसिस अध्ययन, स्थिर और गतिशील स्थितियों में एक्स-विवो हेमोस्टैटिक अध्ययन शामिल हैं। इन जैविक प्रयोगों को इन-विवो अध्ययनों और गैर-इनवेसिव इन-विवो इमेजिंग तकनीकों द्वारा समर्थित किया गया था।

**अध्याय 3:** कई चिकित्सा आपात स्थितियों में रक्तस्राव एक महत्वपूर्ण चुनौती बनी हुई है। जमावट कैस्केड में रक्त के थक्के बनाने के लिए शरीर में प्रतिक्रियाओं की एक जटिल श्रृंखला शामिल होती है, जो अत्यधिक रक्तस्राव को रोकती है। अत्यधिक रक्त हानि से बचने और रोगी के परिणामों में सुधार करने के लिए पर्याप्त और तेजी से हेमोस्टेसिस महत्वपूर्ण है। विभिन्न हेमोस्टैटिक एजेंटों का उपयोग क्लिनिकों में किया जाता है जो शरीर की जन्मजात हेमोस्टैटिक क्षमता को बढ़ाने के लिए जाने जाते हैं, हालांकि, बेहतर एजेंटों को खोजने का प्रयास जारी है। जमावट कैस्केड के मुख्य घटक में कुछ धातुओं (Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) और अमीनो एसिड (ग्लाइसिन, लाइसिन और एल-ग्लूटामिक एसिड) की भागीदारी शामिल है जो इसे कसकर नियंत्रित करने में महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं। इस परिकल्पना में, हम अमीनो एसिड-आधारित जैव-संगत धातु-कार्बनिक ढांचे (एए-बायो-एमओएफ) तैयार करने का प्रस्ताव करते हैं, जहां हम अंतर्जात अमीनो एसिड को कार्बनिक लिंक्स के रूप में और जैव-संगत धातु को एक अच्छी तरह से परिभाषित संरचना बनाने वाले नोड्स के रूप में संयोजित करने का इरादा रखते हैं। हम उम्मीद करते हैं कि ये बायोएमओएफ जमावट कैस्केड पर उनके सहक्रियात्मक प्रभाव और उनकी विषाक्तता में महत्वपूर्ण कमी के कारण पारंपरिक हीमोस्टैटिक सामग्री की तुलना में बेहतर हीमोस्टैटिक एजेंट होंगे। इसलिए, एक जैव-संगत धातु-कार्बनिक ढांचे (बायोएमओएफ) के भीतर अमीनो एसिड और धातु आयनों को एकीकृत करने से संभवतः हेमोस्टेसिस के क्षेत्र में एक नया प्रतिमान जुड़ सकता है।

**अध्याय 4:** अध्याय 3 में प्रस्तुत परिकल्पना के आधार पर, यह अध्याय हमारी प्रस्तावित अवधारणाओं के प्रयोगात्मक परीक्षण और सत्यापन पर केंद्रित है। यह जरूरी है कि हीमोस्टैटिक एजेंट आघात या युद्ध के मैदान के दौरान गंभीर रक्तस्राव की स्थिति के प्रबंधन में महत्वपूर्ण भूमिका निभा सकते हैं। प्राकृतिक लिगेंड और जैव सक्रिय धातुओं का उपयोग करके हम ऐसी सामग्री तैयार कर सकते हैं जो जन्मजात हीमोस्टैटिक क्षमता को बढ़ा सकती है। इस कार्य में कार्बनिक लिगेंड के रूप में एल-एस्पार्टिक एसिड और धातु नोड के रूप में कैल्शियम का उपयोग करके एमिनो एसिड-आधारित एमओएफ का संश्लेषण

शामिल है, जहां बॉक्स-बेहनकेन प्रयोगात्मक डिजाइन का उपयोग करके पैरामीट्रिक अनुकूलन किया गया है। प्राप्त कुल प्रायोगिक रन में से, उच्चतम प्रतिक्रिया उपज वाले रन का मूल्यांकन किया गया था। यह देखा गया कि कम सरंधता और सतह क्षेत्र के बावजूद हिमोस्टैटिक गुण पर संश्लेषित Ca-MOF का प्रभाव बहुत अधिक था। हीमोलिसिस अनुपात  $<1.55\%$ , एरिथ्रोसाइट अवशोषण और एकत्रीकरण को प्रेरित करता है, आंतरिक जमावट मार्ग को सक्रिय करता है और टीईजी का उपयोग करके मूल्यांकन के रूप में रक्त जमावट को तेज करता है। मूल्यांकन किया गया Ca-MOF नियंत्रण और व्यावसायिक रूप से उपलब्ध हीमोस्टैटिक ड्रग ट्रांक्सैमिक एसिड की तुलना में चूहे-पूछ विच्छेदन मॉडल में सबसे कम थक्के का समय ( $39 \pm 0.2$  s) और सबसे कम रक्त हानि ( $0.14 \pm 0.2$  g) दिखाता है। रक्त में इन-विवो विषाक्तता अध्ययनों ने 30 दिनों की अवधि में प्रदर्शन किया, जो नियंत्रण समूह की तुलना में संश्लेषित एमओएफ के रूप में प्राप्त पशु समूहों में कोई महत्वपूर्ण परिवर्तन नहीं दर्शाता है। बढ़ी हुई जमावट क्षमता और संबंधित जैव-संगतता के साथ, विकसित कैल्शियम-एस्पार्टेट बायो-एमओएफ एक सुरक्षित और प्रभावी हीमोस्टैटिक एजेंट के रूप में कार्य कर सकता है और अत्यधिक रक्तस्राव के प्रबंधन के लिए सिंथेटिक झरझरा सामग्री का उपयोग करने की एक अनूठी अवधारणा प्रदान कर सकता है।

**अध्याय 5:** अध्याय 4 में, हमने देखा कि कम सतह क्षेत्र, छिद्र आकार और छिद्र मात्रा होने के बावजूद, परीक्षण की गई सामग्री ने बेहतर हेमोस्टैटिक प्रदर्शन का प्रदर्शन किया। हमने निष्कर्ष निकाला कि इस प्रभाव को धातु-कार्बनिक ढांचे (एमओएफ) के भौतिक गुणों के साथ-साथ धातु और लिगेंड सहित व्यक्तिगत घटकों के लिए जिम्मेदार ठहराया जा सकता है, जो हेमोस्टेसिस पर प्रभाव डालने के लिए जाने जाते हैं। इसे ध्यान में रखते हुए, हमने हेमोस्टैटिक प्रदर्शन पर उनके संभावित प्रभाव का आकलन करने के लिए उच्च सतह क्षेत्र, छिद्र आकार और छिद्र मात्रा के साथ एमओएफ के उपयोग की जांच करने का निर्णय लिया। इसलिए, अध्याय 5 में, हम रक्तस्राव के प्रबंधन के लिए अत्यधिक छिद्रपूर्ण एमओएफ के उपयोग का पता लगाते हैं। धातु-कार्बनिक ढांचे को उनके अद्वितीय गुणों जैसे उच्च सतह क्षेत्र, ट्यूनेबल छिद्र आकार और जैव-संगतता के कारण दवा वितरण में उनकी क्षमता के लिए तेजी से पहचाना जाता है। यह अध्ययन क्लीनिकों में एक अच्छी तरह से स्थापित हीमोस्टैटिक दवा, ट्रेनेक्सैमिक एसिड को लोड करने के लिए कोबाल्ट-मेटल ऑर्गेनिक फ्रेमवर्क (को-एमओएफ) का उपयोग करने पर केंद्रित है। अत्यधिक झरझरा सह-एमओएफ को डिजाइन विशेषज्ञ सॉफ्टवेयर का उपयोग करके अनुकूलित परिस्थितियों में संश्लेषित किया गया था और विभिन्न भौतिक रासायनिक लक्षण वर्णन तकनीकों का उपयोग करके विशेषता दी गई थी। को-एम. ओ. एफ. में ट्रेनेक्सैमिक एसिड की लोडिंग एक सरल प्रसार विधि के माध्यम से प्राप्त की गई थी। दवा लोडिंग को भी सामग्री स्टूडियो का उपयोग करके आदर्श

परिस्थितियों में मान्य किया गया था। इन-विट्रो थक्के परख और एक इन-विवो पशु मॉडल का उपयोग करके रक्त में मौजूद विभिन्न थक्के प्रोटीन के साथ जैव-संगतता और अंतःक्रिया अध्ययन आयोजित किए गए थे। परिणामों से एक अच्छी तरह से परिभाषित क्रिस्टलीय संरचना के साथ संश्लेषित को-एम. ओ. एफ. में एक उच्च सतह गुणों का पता चला। को-एमओएफ ने ट्रेनेक्सामिक एसिड के लिए 43% (डब्ल्यू/डब्ल्यू) की लोडिंग क्षमता का प्रदर्शन किया, जिसमें 24 घंटे से अधिक मिश्रित-ऑर्डर कैनेटीक्स ड्रग रिलीज प्रोफाइल था। इन-विट्रो थक्के परीक्षणों ने प्रदर्शित किया कि Co-MOF@Tranexamic एसिड ने अकेले देशी Tranexamic एसिड और नियंत्रण समूहों की तुलना में थक्के में काफी सुधार किया। रैट टेल एंप्पूटेशन मॉडल का उपयोग करते हुए इन-विवो अध्ययनों से पता चला कि Co-MOF@Tranexamic एसिड 3 मिनट के भीतर हीमोस्टेसिस प्राप्त कर रहा है, जो अकेले ट्रेनेक्सामिक एसिड से बेहतर प्रदर्शन कर रहा है। इसके अतिरिक्त, 30 दिनों के लिए रक्त में इन-विवो विषाक्तता परीक्षण ने नियंत्रण समूह की तुलना में को-एमओएफ प्राप्त करने वाले पशु समूहों में कोई बदलाव नहीं दिखाया। यह कार्य हीमोस्टैटिक दवाओं के वाहक के रूप में को-एमओएफ की क्षमता पर प्रकाश डालता है, जो तेजी से और नियंत्रित हीमोस्टैसिस प्राप्त करने में बढ़ी हुई प्रभावकारिता प्रदान करता है, विशेष रूप से आघात सेटिंग्स में मूल्यवान है।

**अध्याय 6:** यह अध्याय सतह संशोधित सोने के नैनोकणों के उपयोग के लिए एक इंजेक्शन योग्य हेमोस्टेट के रूप में उपन्यास प्रस्ताव प्रस्तुत करता है, जो हेमोस्टेसिस के क्षेत्र में इस तरह के प्रस्ताव का पहला उदाहरण है। पैथोलॉजिकल स्थितियों के दौरान एक बिगड़ी हुई प्रक्रिया को स्थिर करने में बाहरी हेमोस्टैटिक एजेंट महत्वपूर्ण भूमिका निभाते हैं। विचार यह है कि इन विवो प्रणाली को जल्द से जल्द स्थिर किया जाए। यह अध्ययन सोने के नैनोकणों को संश्लेषित करने के लिए एक रिड्यूसिंग और कैपिंग एजेंट के रूप में एक क्लास I हेमोस्टैटिक ड्रग ट्रांसेक्सामिक एसिड का उपयोग करता है। (Tr-AuNPs). लाइसिन का सिंथेटिक एनालॉग और जैविक रूप से प्रेरित एल्किलामाइन अणु होने के कारण, रसायन विज्ञान को स्थिर सामग्री के लिए ठीक-ठीक किया जा सकता है जो एक साथ आंतरिक और बाहरी हेमोस्टैटिक मार्ग को लक्षित कर सकता है, जिससे यह हेमोस्टैटिक अनुप्रयोगों के लिए आशाजनक हो जाता है। हाइड्रोडायनामिक व्यास ~ 46nm के Tr-AUNPs को संश्लेषित किया गया और विभिन्न विश्लेषणात्मक तकनीकों का उपयोग करके भौतिक-रासायनिक रूप से मूल्यांकन किया गया, जिसमें उन्होंने मूल दवा की तुलना में हीमोकॉम्पैटिबिलिटी और थ्रोम्बस वजन में वृद्धि दिखाई। डायनेमिक थ्रोम्बोइलास्टोग्राफी (टीईजी) अध्ययन द्वारा समर्थित प्रोथ्रोम्बिन समय (पीटी) और अंतर्राष्ट्रीय सामान्यीकृत अनुपात (आईएनआर) में कमी देशी ट्रांसेक्सामिक एसिड दवा की तुलना में हेमोस्टेसिस प्राप्त करने के लिए

समय को कम करने में तैयार नैनो-संयुग्म की क्षमता को इंगित करती है। 9 $\mu$ g/ml सांद्रता पर, Tr-AUNPs का एक प्रोकोगुलेंट प्रभाव था, जो बेहतर  $\alpha$  कोण और MA के साथ प्रतिक्रिया समय (R) और जमावट समय (K) में कमी से दिखाया गया था। मूल transexamic एसिड की तुलना में Tr-AUNPs, i.e., (52 सेकंड) द्वारा इन-विवो में जमावट की दर में उल्लेखनीय वृद्धि हुई थी। (360 sec). रेडियोलाबेलिंग अध्ययनों ने टीआर-एयूएनपी की इन विवो जैव-संगतता (गैर-इनवेसिव वितरण, निवास, निकासी और स्थिरता) का पता लगाया। अल्पकालिक विषाक्तता अध्ययन सामग्री के जैव चिकित्सा अनुप्रयोग के लिए अवधारणा का प्रमाण स्थापित करने के लिए आयोजित किए गए थे। परिणामों ने नैनोकणों के संश्लेषण के लिए कैपिंग रिड्यूसिंग एजेंटों के रूप में जैविक रूप से एल्किल एमाइन अणुओं के उपयोग पर प्रकाश डाला, जिन्होंने संभावित थेरानोस्टिक एजेंटों के रूप में कार्य करने की क्षमता रखते हुए जमावट कैस्केड पर एक सहक्रियात्मक प्रभाव दिखाया है।

**अध्याय 7:** यह अध्याय अध्याय 4 से 6 में किए गए व्यापक अध्ययनों से लिए गए निष्कर्षों को प्रस्तुत करता है, साथ ही कार्य के भविष्य के दायरे को रेखांकित करता है। शोध ने हेमोस्टेसिस के प्रबंधन के लिए विभिन्न नैनो और नैनो-छिद्रयुक्त सामग्रियों के उपयोग का पता लगाया है, जिसमें पूर्व नैदानिक अध्ययनों में उनके संश्लेषण, लक्षण वर्णन और प्रभावकारिता पर विशेष ध्यान दिया गया है। अध्याय 3 से 6 तक के निष्कर्ष सामूहिक रूप से हेमोस्टेसिस को बढ़ावा देने में इन सामग्रियों की क्षमता को प्रदर्शित करते हैं। ये परिणाम आघात सेटिंग्स में हेमोस्टैटिक हस्तक्षेप में सुधार में नैनो और नैनो-छिद्रयुक्त सामग्री के महत्व को रेखांकित करते हैं। आगे बढ़ते हुए, आगे के शोध को प्रीक्लिनिकल अध्ययनों से नैदानिक परीक्षणों में संक्रमण पर ध्यान केंद्रित करना चाहिए जो आघात में इन सामग्रियों को अपनाने के लिए एक महत्वपूर्ण अगला कदम है। इस परिवर्तन के लिए नियामक आवश्यकताओं सहित कई प्रमुख विचारों को संबोधित करने की आवश्यकता होगी, जिसमें चिकित्सा उपकरणों और फार्मास्यूटिकल्स के लिए नियामक मानकों का अनुपालन सुनिश्चित करना शामिल है, नैदानिक सेटिंग्स में इन सामग्रियों की मांग को पूरा करने के लिए उत्पादन की मापनीयता आवश्यक है, संश्लेषण विधियों और उत्पादन प्रक्रियाओं के अनुकूलन की आवश्यकता है, और लागत-प्रभावशीलता इन सामग्रियों को व्यापक रूप से अपनाने के लिए महत्वपूर्ण है, कुशल उत्पादन विधियों और प्रतिस्पर्धी मूल्य निर्धारण रणनीतियों की आवश्यकता है।

## Table of Contents

Certificate.....	i
Acknowledgment .....	ii
Abstract.....	v
Abstract Hindi .....	x
List of Figures .....	xx
List of Tables.....	xxiv
<b>CHAPTER 1 Introduction and Literature Review .....</b>	<b>1</b>
1.1 Introduction.....	2
1.1.1. Vascular Spasm:.....	4
1.1.2. Platelet Plug Formation.....	4
1.1.3. Coagulation .....	5
1.2. Role of Hemostatic Agents .....	5
1.3. Literature Review.....	6
1.3.1. Inorganic Materials .....	7
1.3.2. Organic Materials.....	7
1.3.3. Intravenously administered hemostats .....	8
1.4. Concept of Nanotechnology in Hemostasis .....	10
1.4.1. Inorganic Nanomaterials .....	10
1.4.2. Mesoporous silica nanomaterials .....	10
1.4.3. Nano-Cellulose .....	11
1.4.4. Nanoporous scaffolds.....	11
1.5. Concept of the metal-organic framework as a nanoporous material.....	11
1.6. Key take away.....	12
1.7. Aim of this thesis .....	12
1.7.1. Circle 1 .....	12
1.7.2. Circle 2-4 .....	12
References.....	14
<b>CHAPTER 2 Methodology &amp; Characterization Techniques .....</b>	<b>18</b>
2.1. Design Expert Software (DoE) .....	19
2.2. Chemicals & Reagents.....	20
2.3. Analytical Characterization.....	20
2.3.1. Powder X-ray Diffraction (PXRD) Analysis .....	20
2.3.2. Scanning Electron Microscopy (SEM) Analysis .....	20
2.3.3. Atomic Force Microscopy (AFM) Analysis .....	21
2.3.4. Transmission electron microscopy (TEM) Analysis.....	21
2.3.5. Atomic absorption spectrometer (AAS) analysis.....	21

2.3.6. Thermogravimetric (TGA) analysis .....	21
2.3.7. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy .....	21
2.3.8. Brunauer-Emmett-Teller (BET) analysis.....	22
2.3.9. Dynamic Light Scattering and Zeta Potential Measurements.....	22
2.3.10. Fluorescence Spectroscopy .....	22
2.4 The methods used for protein interaction in Chapter 6 is discussed below .....	23
2.5. Biocompatibility studies .....	23
2.5.1. Evaluation of Blood Cells Integrity .....	23
2.5.2. Haemolysis Analysis.....	24
2.5.2.1. According to ASTM F756-00, 2000 standard.....	24
2.5.2.2. According to ASTM F756-13 standard.....	24
2.5.3. Cell Viability Assay .....	25
2.6. Ex-vivo studies (Static & Dynamic Conditions).....	25
Static .....	25
2.6.1. Assessment of whole blood clotting time (CT).....	25
2.6.2. Plasma Recalcification Time (PRT).....	26
2.6.3. Platelet Adhesion .....	26
2.6.4. Thrombus Weight .....	26
2.6.5. Assessment of plasma coagulation.....	27
Dynamic.....	27
2.6.6. Thromboelastographic (TEG) Studies .....	27
2.7. In vivo animal studies .....	28
2.8. In-vivo hemostatic studies .....	28
2.9. Radiolabeling .....	28
2.10. Scintigraphy study for non-invasively seeing the bio-distribution .....	28
2.11. Blood kinetics and bio-distribution for quantitative analysis of the nano-conjugate.....	29
2.12. In-vivo toxicity assessments for one month.....	29
2.13. Statistical analysis.....	29
2.14. Disclosures.....	30
2.14.1. Human subjects .....	30
2.14.2. Animal Studies.....	30
References.....	30
CHAPTER 3 Hypothesis “Novel amino-acid based metal-organic frameworks (Bio-MOFs) as hemostatic agents: unveiling promising frontiers in hemostasis” .....	32
3.1. Introduction.....	33
3.2. Hypothesis.....	35
3.3. Testing of hypothesis .....	36

3.4. Discussion .....	37
Reference .....	40
CHAPTER 4 Testing of Hypothesis “Development of novel aspartic acid-based calcium bio-MOF designed for management of severe bleeding” .....	43
4.1. Introduction.....	43
4.2. Results and Discussion .....	46
4.2.1. Design expert software (Box Behnken Design).....	46
4.2.2. Hydrothermal synthesis of Ca-MOFs .....	49
4.3. Physicochemical analysis of synthesized Ca-MOFs.....	49
4.3.1. X-ray diffraction analysis.....	49
4.3.2. Fourier transforms infrared spectroscopy .....	50
4.3.3. Dynamic light scattering and zeta potential analysis .....	51
4.3.4. Microscopic Analysis (Scanning Electron Microscopy (SEM), Atomic Force Microscopy (AFM), and Transmission Electron Microscopy (TEM)) .....	52
4.3.5. BET (N <sub>2</sub> adsorption-desorption) analysis .....	54
4.3.6. Thermal Stability Analysis.....	54
4.4. Biocompatibility Studies.....	55
4.5. Cell Viability Assay .....	56
4.6. In-vitro protein Interaction studies.....	57
4.7. Ex-vivo studies.....	60
4.7.1. Hemostatic performance of Ca-MOF.....	60
4.8. In-vivo studies.....	63
4.9. In-vivo toxicity assessments of Ca-MOF in blood .....	64
4.10. Conclusion and Co-relative Analysis.....	65
References.....	67
CHAPTER 5 Using a Quality-by-Design Approach to Synthesize Tranexamic Acid-Loaded Cobalt Metal-Organic Frameworks for Effective Management of Severe Bleeding in Trauma Cases.....	70
5.1. Introduction.....	70
5.2. Design expert software (Box Behnken Design).....	71
5.3. Room temperature synthesis of Co-MOFs.....	73
5.4. Drug Loading & release Studies .....	73
5.5. Computational study .....	74
5.6. Molecular models.....	74
5.7. Computational simulation of tranexamic acid adsorption and diffusion .....	74
5.8. Results & Discussion .....	75
5.8.1. Quality by design approach (Box Behnken Design).....	75
5.8.2. Synthesis of Co-MOFs using room temperature method.....	79
5.8.3. Physicochemical analysis of synthesized Co-MOF .....	79

5.8.3.1. X-ray diffraction analysis.....	79
5.8.3.2. Fourier transforms infrared spectroscopy .....	80
5.8.3.3. Thermal Stability Analysis.....	81
5.8.3.4. BET (N <sub>2</sub> adsorption-desorption) analysis .....	82
5.8.3.5. Dynamic light scattering and zeta potential analysis .....	83
5.8.3.6. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis .....	84
5.8.3.7. Transmission Electron Microscopy (TEM) analysis.....	85
5.8.3.8. Drug Loading .....	85
5.8.3.9. Drug release and its kinetics .....	86
5.9. Computational study and adsorption isotherm analysis.....	87
5.10. Biocompatibility (Haemolysis & Giemsa staining) studies .....	90
5.11. Cytotoxicity studies .....	91
5.12. In-vitro protein Interaction studies.....	92
5.13. Ex-vivo hemostatic studies (Static & Dynamic Condition).....	94
5.13.1. Hemostatic performance of Co-MOF & Co-MOF@Tranexamic acid .....	94
5.14. In-vivo studies.....	97
5.15. In-vivo toxicity assessments of Co-MOF in blood .....	98
5.16. Co-relative analysis.....	100
5.17. Conclusion .....	101
References.....	102
<b>CHAPTER 6 Tranexamic acid (Class I drug) reduced and capped Gold nanoparticles as a potential Hemostatic agent with enhanced performance .....</b>	<b>104</b>
6.1. Introduction.....	104
6.2. Method for synthesis of tranexamic acid reduced and capped gold nanoparticles (Tr-AuNPs) .....	107
6.3. Result and Discussion .....	108
6.3.1. Mechanism of formation of tranexamic acid reduced and capped gold.....	108
6.3.2. Dynamic Light Scattering and Zeta Potential .....	108
6.3.3. Transmission Electron Microscopy (TEM) Analysis .....	109
6.3.4. Fourier Transform Infrared Spectroscopy.....	110
6.3.5. UV-Visible Spectroscopy and Thermo-gravimetric Analysis .....	111
6.4. Biocompatibility Studies.....	112
6.4.1. Haemolysis Studies .....	112
6.4.2. Protein Interaction Studies .....	113
6.4.3. Cytotoxicity Studies.....	115
6.5. Ex-vivo coagulation studies .....	116
6.5.1. Coagulation Time.....	116

6.5.2. Thrombus Weight .....	<b>116</b>
6.5.3. Assessment of plasmatic coagulation: Prothrombin time (PT), Activated Partial thromboplastin time (aPTT), and international normalized ratio (INR) .....	<b>117</b>
6.5.4. Thromboelastography (TEG) Studies .....	<b>118</b>
6.6. In vivo homeostasis studies .....	<b>120</b>
6.7. Radiolabelling and Blood Kinetics .....	<b>120</b>
6.8. Scintigraphy and Bio-distribution Studies .....	<b>121</b>
6.9. In-vivo toxicity assessments of Tr-AuNPs in the liver, kidney, and blood .....	<b>122</b>
6.10. Conclusion .....	<b>125</b>
References.....	<b>126</b>
<b>CHAPTER 7 Conclusion &amp; Future Perspective .....</b>	<b>130</b>
7.1. Conclusion and Future Perspectives .....	<b>130</b>
7.1.1. Regulatory Requirements.....	<b>131</b>
7.1.2. Scalability of production.....	<b>131</b>
7.1.3. Cost-effectiveness .....	<b>131</b>
Author's Profile .....	<b>132</b>

### List of Figures

Figure Caption	Page No
<b>Figure 1.1:</b> Illustration highlighting the role of hemostasis in pre-hospital care	2
<b>Figure 1.2:</b> Cause of death distribution in the trauma activation protocol database, which includes injured adults (age $\geq$ 18 years) meeting criteria for the highest	3
<b>Figure 1.3:</b> An overview of coagulation physiology	4
<b>Figure 1.4:</b> An overview of the steps involved in hemostasis	5
<b>Figure 1.5:</b> The current methods of hemostasis used for external and internal bleeding management.	7
<b>Figure 1.6:</b> Evolution of hemostatic agents from ancient medical practices to modern innovations	9
<b>Figure 1.7:</b> Current state of the art in nanotechnology for hemostasis management	10
<b>Figure 1.8:</b> The four circles of influence	12
<b>Figure 2.1:</b> Schematic representation for utilizing Design expert software for optimization of reaction conditions	19
<b>Figure 3.1:</b> Illustration of the synergistic effect of the AA-Bio-MOFs on the intrinsic and the extrinsic pathway in hemostasis	35
<b>Figure 3.2:</b> Anticipated Amino Acid-Metal Based Bio-MOF Structure	36
<b>Figure 3.3:</b> Schematic representation of the proposed mechanism of AA-Bio-MOFs in hemostasis	38
<b>Figure 4.1:</b> Visualization of the role of Ca-MOF in managing hemostasis	44
<b>Figure 4.2:</b> Independent factors and their levels used in the Box-Behnken Design	45
<b>Figure 4.3:</b> a) Contour plot b) 3D surface plot of product yield as a function of temperature, time, and their mutual interaction over product yield at fixed metal: ligand molar ratio.	48
<b>Figure 4.4:</b> a) PXRD spectra of Ca-MOF, L-Aspartic Acid and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	49
<b>Figure 4.5:</b> FTIR Spectra of Ca-MOF	50
<b>Figure 4.6:</b> a) Zeta potential distribution of Ca-MOF b) size distribution by intensity	50
<b>Figure 4.7:</b> SEM images of Ca-MOF (a & b) at different magnifications of $5\mu\text{m}$ & $20\mu\text{m}$	51
<b>Figure 4.8:</b> AFM Images of Ca-MOF a) Topography b) Amplitude c) Phase	51

<b>Figure 4.9:</b> AFM Images of Ca-MOF a) 3D Topography & Profile b) Height Profile	52
<b>Figure 4.10:</b> a) TEM Image of Ca-MOF b) Diffraction Pattern (Inset of Figure 4.7a) c) EDS spectra of Ca-MOF	52
<b>Figure 4.11:</b> Adsorption-Desorption isotherm of Ca-MOF	53
<b>Figure 4.12:</b> TGA plot of Ca-MOF	54
<b>Figure 4.13:</b> Light microscopy images by Giemsa Staining Method a) Control b) Treated with Ca-MOF	55
<b>Figure 4.14:</b> a) Cell viability assay of Ca-MOF in A549 after 24 h & 48 h b) Cell viability assay of Ca-MOF in L929 after 24 h & 48 h	56
<b>Figure 4.15:</b> Fluorescence emission spectra of a) HSA, b) Fibrinogen, c) Plasminogen, d) Gamma globulin	57
<b>Figure 4.16:</b> The Stern-Volmer plot of different proteins with an increasing concentration of Ca-MOF.	58
<b>Figure 4.17:</b> The plot of $\log \left[ \frac{F_0-F}{F} \right]$ Vs $\log [\text{MOFs}]$ for proteins conjugate with Ca-MOF	58
<b>Figure 4.18:</b> a) Whole blood clotting time of Ca-MOF b) SEM image of Ca-MOF in contact with human whole blood.	60
<b>Figure 4.19:</b> a) Plasma Recalcification Time of Ca-MOF b) Plasma adhesion onto the surface of Ca-MOF.	61
<b>Figure 4.20:</b> Thermoelastogram of a) Control (Native blood) b) 1000 $\mu\text{g/ml}$ of Ca-MOF c) 500 $\mu\text{g/ml}$ of Ca-MOF d) 250 $\mu\text{g/ml}$ of Ca-MOF	62
<b>Figure 4.21:</b> a) Hemostatic time of Ca-MOF b) Tail bleeding image of Control c) Tail bleeding image of Ca-MOF d) Tail bleeding image of Standard (Tranexamic acid)	63
<b>Figure 4.22:</b> Proposed interaction of the Ca-MOF within the coagulation cascade	65
<b>Figure 5.1:</b> 3D-Atomistic model of (a) Pure Tranexamic acid molecule (b) Water molecule (c) Crystal structure of Co-MOF Framework. Color code: Cobalt ( <b>green</b> ), Nitrogen ( <b>blue</b> ), Oxygen ( <b>red</b> ), Carbon ( <b>grey</b> ), Hydrogen ( <b>white</b> )	73
<b>Figure 5.2:</b> a) 3D surface plot of surface area b) 3D surface plot of pore volume c) 3D surface plot of pore diameter d) Contour plot of surface area e) Contour plot of pore volume f) Contour plot of pore diameter as a function of metal: ligand molar ratio, stirring speed, and their mutual interaction over a surface area, pore size, and pore volume at a fixed stirring time	77
<b>Figure 5.3:</b> Schematically representation for the synthesis of Co-MOF	78
<b>Figure 5.4:</b> PXRD pattern of Co-MOFs, Co-MOF@Tranexamic acid, and Native Tranexamic Acid	79

<b>Figure 5.5:</b> FTIR spectra of Co-MOFs, Co-MOF@Tranexamic acid, and Native Tranexamic Acid	80
<b>Figure 5.6:</b> Thermo-gram of Co-MOF, Co-MOF@Tranexamic acid, and Native Tranexamic Acid	81
<b>Figure 5.7:</b> a) Adsorption-desorption isotherm b) Pore size distribution of Co-MOF c) Pore size distribution of Co-MOF@Tranexamic acid	82
<b>Figure 5.8:</b> a) Hydrodynamic diameter b) Zeta potential distribution of Co-MOF c) Zeta potential distribution of Co-MOF@Tranexamic acid	83
<b>Figure 5.9:</b> SEM images of a) Co-MOFs b) Co-MOF@Tranexamic acid	83
<b>Figure 5.10:</b> Elemental mapping a) Co-MOFs b) Co-MOF@Tranexamic acid	84
<b>Figure 5.11:</b> TEM images of a) Co-MOFs b) Co-MOF@Tranexamic acid	84
<b>Figure 5.12:</b> UV-Visible spectra of Co-MOFs & Co-MOF@Tranexamic acid	85
<b>Figure 5.13:</b> % Cumulative drug (TXA) release from Co-MOFs at pH 7.4	86
<b>Figure 5.14:</b> Simulated Adsorption isotherm for selected Co-MOF models with (a) drug-loaded Co-MOF framework with density distribution snapshot (b) drug solution loaded Co-MOF (in the presence of solvent) with density distribution snapshot	87
<b>Figure 5.15:</b> Mean square displacement graph (a) Tranexamic acid MSD curve (b) Water MSD curve (red line) and Tranexamic acid MSD curve in the presence of water (blue line)	89
<b>Figure 5.16:</b> Light microscopy images by using Giemsa staining method a) Control b) Treated with Co-MOFs	90
<b>Figure 5.17:</b> Cell viability assay of Co-MOFs after 24 h & 48 h in L929 Cells	91
<b>Figure 5.18:</b> a) The Stern-Volmer plot of different proteins with an increasing concentration of Co-MOFs b) The plot of $\log \left[ \frac{F_0-F}{F} \right]$ Vs $\log[\text{MOFs}]$ for proteins conjugate with Co-MOFs	93
<b>Figure 5.19:</b> a) Whole blood clotting time b) Plasma recalcification time c) SEM image of blood with Co-MOF d) SEM image (Plasma adhesion)	95
<b>Figure 5.20:</b> Thromboelastogram of a) Control b) Co-MOFs c) Co-MOF@Tranexamic acid	96
<b>Figure 5.21:</b> Hemostatic time in rat tail amputation model	97
<b>Figure 5.22:</b> Proposed interaction of the Co-MOFs@Tranexamic acid within the coagulation cascade	100
<b>Figure 6.1:</b> Schematic representation of the presence of tranexamic acid on the surface of the synthesized gold nanoparticle as per the Marcus electron transfer theory b)	106

General mechanism of formation of gold nanoparticle synthesis using tranexamic acid as a reducing and capping agent (represented by NR <sub>3</sub> )	
<b>Figure 6.2:</b> a) The particle size distribution b) The charge present on the surface of Tr-AuNPs	108
<b>Figure 6.3:</b> TEM images of Tr-AuNPs (a) & (b) magnification of 50 nm	109
<b>Figure 6.4:</b> FT-IR spectra bands for native tranexamic acid and Tr-AuNPs show similar peaks in the fingerprint region (1500cm <sup>-1</sup> - 500cm <sup>-1</sup> ), showing retention of the structure of the tranexamic acid	110
<b>Figure 6.5:</b> a) UV-visible spectra of Tr-AuNPs b) UV-visible of the native tranexamic acid c) Calibration curve of the tranexamic acid complex with ninhydrin for the quantitative estimation.	111
<b>Figure 6.6:</b> Analysis of surface organic capping of tranexamic acid via TGA curve of Tr-AuNP	112
<b>Figure 6.7:</b> Hemolysis Studies of Tr-AuNP at different concentrations at 24 h and 48 h, respectively. Inset is a blowup of the individual concentrations at different time points (***) Significance ≤ 0.05)	113
<b>Figure 6.8:</b> a) Particle's size of BSA b) Particle size of BSA-Tr-AuNPs c) Image of gel with BSA & BSA-Tr-AuNPs d) Fluorescence intensity of native BSA & BSA: Tr-AuNPs (varied concentration) (***) Significance ≤ 0.05)	114
<b>Figure 6.9:</b> Cellular viability assay of native tranexamic acid, AuNPs, and Tr-AuNPs in MSC cell line at different concentrations	115
<b>Figure 6.10:</b> Comparative thrombus weight of Tr-AuNPs to native tranexamic acid and control (***) Significance ≤ 0.05)	116
<b>Figure 6.11:</b> Comparative Activated Partial Thromboplastin time (APTT), Prothrombin time (PT), and International Normalized Ratio (INR) of Tr-AuNPs compared to native tranexamic acid and Buffer (Base Line) (***) Significance ≤ 0.05)	117
<b>Figure 6.12:</b> TEG plot of a) Control b) Native tranexamic acid c) Tr-AuNPs	119
<b>Figure 6.13:</b> Bleeding time in SD rats treated with native tranexamic acid, Tr-AuNPs, control (without treatment)	120
<b>Figure 6.14:</b> a) Percentage Radiolabelling Efficiency b) Serum Stability Tr-AuNPs	120
<b>Figure 6.15:</b> Blood clearance kinetics of Tr-AuNPs	121
<b>Figure 6.16:</b> a) SPECT Image of Tr-AuNPs at 4 h b) Organ bio-distribution of Tr-AuNPs	122
<b>Figure 6.17:</b> Schematic representation for Tr-AuNPs in management of rapid hemostasis	126

### List of Table

Table Caption	Page No
<b>Table 1.1:</b> Classification of hemostatic agents currently used in the clinic	6
<b>Table 4.1:</b> Design matrix of Box-Behnken design for Ca-MOF synthesis	46
<b>Table 4.2:</b> Predicted and observed Values for the Optimized Ca-MOF	47
<b>Table 4.3:</b> Textural properties of synthesized Ca-MOF through BET analysis	53
<b>Table 4.4:</b> % Haemolysis Studies of Ca-MOF	55
<b>Table 4.5:</b> Binding characteristics of Ca-MOF: Protein interaction, as studied in PBS, pH 7.4	57
<b>Table 4.6:</b> The coagulation performance of the Ca-MOF by Thromboelastography	61
<b>Table 4.7:</b> In-vivo toxicity assessment of Ca-MOFs over 30 days in SD Rat	63-64
<b>Table 5.1:</b> Variables in Box Behnken design (BBD) for the synthesis of Cobalt MOFs	71-72
<b>Table 5.2:</b> Results for Regression Analysis for Responses (Surface Area, Pore Size & Pore Volume)	76
<b>Table 5.3:</b> Predicted and observed Values for the Optimized Co-MOFs	76
<b>Table 5.4:</b> Synthetic parameters and experimental surface responses of cobalt MOFs	77
<b>Table 5.5:</b> Textural properties of synthesized Co-MOFs through BET analysis	82
<b>Table 5.6:</b> Textural properties of selected CO-MOF model. The simulated uptake data is collected at 298 K and 100 kPa, with and without solvent effects.	87-88
<b>Table 5.7:</b> % Haemolysis of Co-MOFs	90
<b>Table 5.8:</b> Binding characteristics of Co-MOF: Protein interaction, as studied in PBS, pH 7.4	92
<b>Table 5.9:</b> The coagulation performance of Co-MOF@Tranexamic acid in comparison with bare Co-MOF and Control by Thromboelastography	94
<b>Table 5.10:</b> In-vivo toxicity assessment of Co-MOFs over 30 days in SD Rat	98
<b>Table 6.1:</b> Average coagulation time of native tranexamic acid & Tr-AuNPs	116
<b>Table 6.2:</b> The coagulation performance of the Tr-AuNPs by Thromboelastography	118
<b>Table 6.3:</b> In-vivo toxicity assessment of Tr-AuNPs in SD Rats for 30	123-124