Self-assembly peptide prevents blood loss(12)

اخیراً محققان موسسه فناوری ماساچوست و دانشگاه هنگ کنگ پپتید جدیدی کشف کردند که بلافاصله خونریزی را در محل جراحی متوقف کرد. محلول نانو هموستات جریان خون را در کمتر از 10 ثانیه در محل برش مغز، نخاع، شریان فمورال و کبد متوقف می کند. اگرچه مکانیسم عمل واقعی مشخص نیست، اعتقاد بر این است که پپتیدها می توانند خود به خود در یک شبکه داربست نانوالیافی که این ویژگی های قابل توجه را فراهم می کند، جمع شوند.

در موارد نادر، فرآیند کشف می‌تواند نتایج غیرمنتظره‌ای ایجاد کند که ممکن است بیشتر از انتظارات اولیه باشد. اخیراً محققان مؤسسه فناوری ماساچوست و دانشگاه هنگ کنگ چنین تجربه ای را داشته اند. در حین انجام آزمایش‌هایی برای آزمایش یک معرف جدید مبتنی بر پپتید برای بازسازی نورون، آن‌ها از دیدن این که بلافاصله خونریزی در محل جراحی متوقف شد شگفت‌زده شدند.

معرف پپتیدی در ابتدا برای تشکیل یک ماتریکس خارج سلولی برای تسهیل بازسازی عصبی طراحی شده بود. Rutledge Ellis-Behnke و همکارانش برای اولین بار در ماه مارس گذشته در مورد خواص این معرف پپتیدی گزارش دادند، زمانی که آنها متوجه شدند که علاوه بر ترویج رشد مجدد سلول های عصبی در همسترهایی با مناطق بریده شده مغز، از دست دادن خون نیز جلوگیری می کند. در این شماره از نشریه نانوپزشکی: نانوتکنولوژی، زیست شناسی و پزشکی، الیس بهنکه و همکارانش تحقیقات خود را بر روی معرف پپتیدی، که محلول نانوهموستات (NHS) می نامند، بر روی انواع ضایعات در همستر و موش گزارش کردند و یافته اند. که NHS جریان خون را در کمتر از 10 ثانیه متوقف می کند [1]. نویسندگان نشان دادند که محلول خودآرایی 1% NHS اثر بسیار قوی در جلوگیری از از دست دادن خون ناشی از بریدگی در مغز، نخاع، شریان فمورال و کبد دارد. این اولین است زمانی که از فناوری نانو برای توقف خونریزی در یک محیط جراحی استفاده شده است.

اگرچه مکانیسم عمل واقعی مشخص نیست، اعتقاد بر این است که پپتیدها می توانند خود به خود در یک شبکه داربست نانوالیافی که این ویژگی های قابل توجه را فراهم می کند، جمع شوند. همانطور که بسیاری از پزشکان می دانند، هنگامی که خونریزی شدید شروع می شود، اغلب متوقف کردن آن بسیار دشوار است. روش‌های کنونی برای کنترل خونریزی از عوامل هموستاتیک استفاده می‌کنند که شامل مواد شیمیایی منقبض کننده عروق، دستگاه‌های حرارتی برای سوزاندن و روش‌های مکانیکی برای اعمال فشار یا تشکیل لیگاتور می‌شود. اگرچه آزمایشات اضافی قابل توجهی باید بر روی NHS جدید انجام شود، اما بسیار امیدوارکننده به نظر می رسد. افزودن یک فناوری کاملاً جدید مبتنی بر نانو برای کنترل خونریزی مطمئناً مورد استقبال جامعه پزشکی قرار خواهد گرفت.

References

[1] Ellis-Behnke RG, et al. Nanohemostat solution: immediate hemostasis at the nanoscale. Nanomedicine 2006;2:207-15.

[2] Ellis-Behnke RG, et al. Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. Proc Natl Acad Sci USA 2006;103:5054-9.

[Article12](../articles/12.pdf)

Efﬁcacy of a novel self-assembling peptide gel for hemostasis in refractory neoplastic bleeding

کم خونی در آزمایشات آزمایشگاهی در 95 درصد بیماران مبتلا به سرطان متاستاتیک دیده می شود و خونریزی مستقیم از تومورهای پیشرفته در دستگاه گوارش را می توان با آندوسکوپی در موارد غالب سرطان دستگاه گوارش مشاهده کرد. 1 دستیابی به هموستاز با تکنیک های هموستاتیک مکانیکی از طریق آندوسکوپی اغلب برای سرطان پیشرفته دستگاه گوارش دشوار است. بنابراین، خونریزی از تومورهای پیشرفته اغلب فقط با تزریق خون درمان می شود، که اغلب در عمل ما می تواند تهدید کننده زندگی باشد.

ژل پپتیدی خودسازماندهی (PuraStat؛ 3-D Matrix، توکیو، ژاپن) یک عامل هموستاتیک آندوسکوپی برای درمان خونریزی دستگاه گوارش است. ژل پپتیدی خودسازماندهی برای استفاده در خونریزی درون پروسه ای و خونریزی تاخیری در تشریح آندوسکوپی زیر مخاطی (ESD) گزارش شده است. 2-5 هیچ گزارشی در مورد کارایی ژل پپتیدی خودسازماندهی برای هموستاز تسکین دهنده خونریزی تومور ناشی از سرطان پیشرفته وجود ندارد. ما موردی را گزارش می‌کنیم که در آن استفاده از ژل پپتیدی خودسازماندهی برای مدیریت هموستاز سرطان گوارشی متاستاتیک غیرقابل برداشت مؤثر بود.

یک بیمار مرد 60 ساله به دلیل سرطان سطحی مری در بیمارستان ما تحت ESD قرار گرفت و از نظر پاتولوژیکی با برداشتن غیردرمانی تشخیص داده شد (pT1b-SM2؛ 600mm، ly1، v1). بیمار از درمان اضافی امتناع کرد و تحت پیگیری قرار گرفت. یک سال و 2 ماه پس از ESD، عود متاستاتیک در غدد لنفاوی متعدد رخ داد و شیمی درمانی سیستمیک انجام شد. پس از 8 دوره FOLFOX، او از مدفوع سیاه و سفید زیاد شکایت کرد و آزمایشات آزمایشگاهی کم خونی شدید (Hb: 5.0 گرم در دسی لیتر) را نشان داد. یک سی تی اسکن ساده از شکم نشان داد که یک غده لنفاوی بزرگ شده در سمت انحنای کمتر به معده حمله می کند (شکل 1). پس از مشکوک شدن به خونریزی گوارشی، آندوسکوپی اورژانسی انجام شد.

روش

آندوسکوپی دستگاه گوارش فوقانی یک ضایعه اولسراتیو را در انحنای کمتر نشان داد که با محل آن در سی تی اسکن ساده مطابقت داشت و به عنوان تهاجم معده به غدد لنفاوی و خونریزی های متعدد در زخم تشخیص داده شد، اما هموستاز توسط فورسپس هموستاتیک حاصل نشد. . 2). ژل پپتیدی خودسازماندهی به محل خونریزی اعمال شد. ژل پپتیدی خودسازماندهی محدوده را با رساندن قسمت پایین زخم به ساعت 6 تثبیت کرد و با استفاده از گرانش به آرامی و موثر اعمال شد تا از جمع شدن جلوگیری شود، که ممکن است باعث شود ژل به راحتی جابجا شود. ما مراقب بودیم که خون به نوک کاتتر نچسبد تا از گرفتگی ژل ماتریکس پروتئین در کاتتر جلوگیری کنیم. هموستاز تأیید شد (ویدئو 1، در دسترس آنلاین در www.videogie.org).

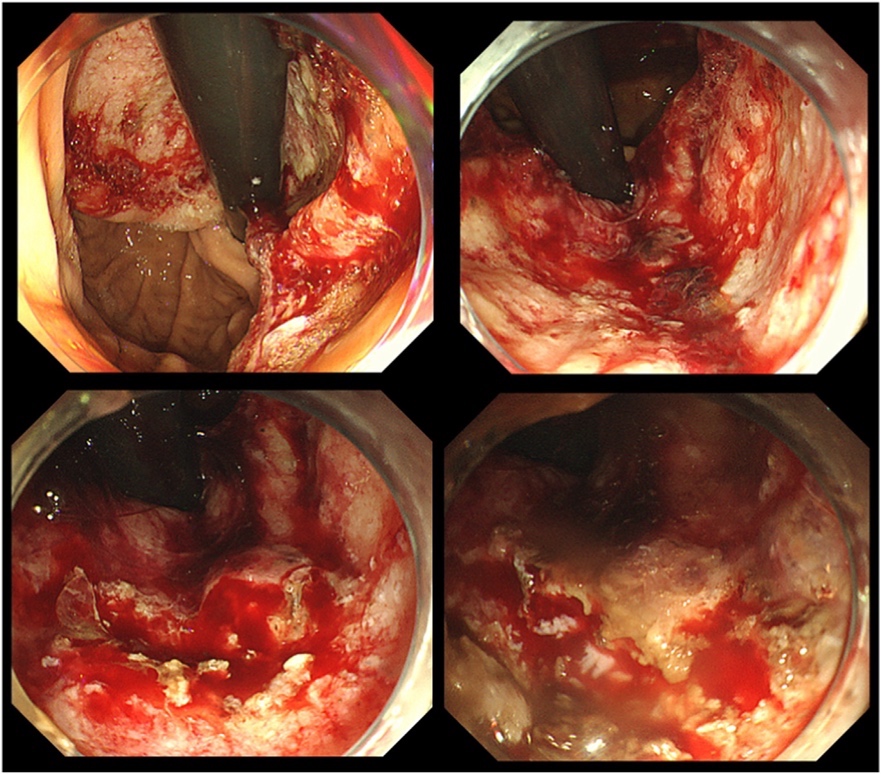
پس از بستری، 4 واحد انتقال خون در روز اول و دوم انجام شد و Hb آنها به 9.0 گرم در دسی لیتر افزایش یافت. یک مهارکننده پمپ پروتون تجویز شد. از آنجایی که هموستاز با ژل پپتیدی خودسازمانده به تنهایی نمی تواند به دلیل پیشرفت بیماری دائمی باشد، تابش تسکین دهنده برای کنترل خونریزی در روز پنجم آغاز شد. سه ماه پس از هموستاز، بیماری پیشرفت کرده بود اما کم خونی پیشرفت نکرده بود، هیچ خونریزی مجدد یا عوارض جانبی مربوط به ژل پپتیدی خودسازمانده وجود نداشت.

بحث

ژل پپتید خودآرایی یک پپتید مصنوعی جدید است که برای استفاده به عنوان هموستات مجوز دارد. ژل هنگامی که توسط تغییر pH که در تماس با خون رخ می دهد، ماتریکس داربست خارج سلولی را تشکیل می دهد و یک سد مکانیکی پایدار بر روی محل خونریزی تشکیل می دهد، در نتیجه هموستاز درون تنی را تسهیل می کند.

گزارش هایی از ژل پپتیدی خودسازماندهی در زمینه آندوسکوپی برای خونریزی پس از ESD، 3،4،6 پروکتیت پرتو، 7 و خونریزی GI وجود دارد. 5،7-9 با این حال، گزارشی مبنی بر استفاده از آن برای هموستاز تسکین دهنده خونریزی نئوپلاستیک وجود ندارد.

مطالعات اولیه بالینی مزایای بیشتری را نشان داده است، از جمله بهبود زخم، 3 و خونریزی مجدد پس از هموستاز برای زخم های خوش خیم پپتیک کمتر از سایر روش های هموستاتیک گزارش شده است. با این حال، در مورد خونریزی نئوپلاستیک،



اثر ترمیم زخم ژل پپتیدی خودسازمانده به تنهایی ممکن است ناکافی باشد و احتمال خونریزی مجدد به دلیل پیشرفت سرطان بدون درمان درمانی بالاست. بنابراین، باید در ترکیب با تابش تسکینی یا سایر درمان های انکولوژیک استفاده شود. مداخله آندوسکوپی با استفاده از ژل پپتیدی خودسازماندهی می تواند یک پل درمانی مفید قبل از تابش تسکینی یا شیمی درمانی سیستمیک در مدیریت انکولوژیک سرطان پیشرفته دستگاه گوارش باشد.

با این حال، استفاده از ژل پپتیدی خودآرایی محدود است، زیرا استفاده از آن در موارد خونریزی فوران شریانی دشوار است، زیرا ژل پپتیدی خودآرایی شده توسط خون شسته می شود. در مورد خونریزی فوران شریانی، لازم است روش های دیگری برای هموستاز در نظر گرفته شود.

1. Nand S, Messmore H. Hemostasis in malignancy. Am J Hematol 1990;35:

45-55.

2. Subramaniam S, Kandiah K, Thayalasekaran S, et al. Haemostasis and prevention of bleeding related to ER: the role of a novel self-assembling peptide. United European Gastroenterol J 2019;7:155-62.

3. Yoshida M, Goto N, Kawaguchi M, et al. Initial clinical trial of a novel hemostat, TDM-621, in the endoscopic treatments of the gastric tumors. J Gastroenterol Hepatol 2014;29(suppl 4):77-9.

4. Uraoka T, Ochiai Y, Fujimoto A, et al. A novel fully synthetic and self-assembled peptide solution for endoscopic submucosal dissectioninduced ulcer in the stomach. Gastrointest Endosc 2016;83:1259-64.

5. Pioche M, Camus M, Rivory J, et al. A self-assembling matrix-forming gel can be easily and safely applied to prevent delayed bleeding after endoscopic resections. Endosc Int Open 2016;4:E415-9.

6. Subramaniam S, Kandiah K, Chedgy F, et al. A novel self-assembling peptide for hemostasis during endoscopic submucosal dissection: a randomized controlled trial. Endoscopy 2021;53:27-35.

7. White K, Henson CC. Endoscopically delivered Purastat for the treatment of severe haemorrhagic radiation proctopathy: a service evaluation of a new endoscopic treatment for a challenging condition. Frontline Gastroenterol 2021;12:608-13.

8. Branchi F, Klingenberg-Noftz R, Friedrich K, et al. PuraStat in gastrointestinal bleeding: results of a prospective multicentre observational pilot study. Surg Endosc 2022;36:2954-61.

9. de Nucci G, Reati R, Arena I, et al. Efficacy of a novel self-assembling peptide hemostatic gel as rescue therapy for refractory acute gastrointestinal bleeding. Endoscopy 2020;52:773-9.

Clotting Mimicry from Robust Hemostatic Bandages Based on Self-Assembling Peptides

چکیده خونریزی کنترل نشده از زخم های تروماتیک عامل اصلی مرگ و میر ناشی از درگیری های نظامی، حوادث، بلایا و جنایت است. نانوالیاف پپتیدی خودآرایی فعالیت هموستاتیک برتری را نشان داده‌اند، و در اینجا، مکانیسم آنها را با تجسم تشکیل لخته‌های مبتنی بر نانوالیاف که اجزای خون را با مورفولوژی مشابه با لخته‌های مبتنی بر فیبرین جمع می‌کنند، روشن می‌کنیم. علاوه بر این، برای افزایش کاربرد مستقیم آن بر روی زخم، پوشش‌های لایه به لایه نازک مونتاژ شده را بر روی مواد رایج مورد استفاده برای پانسمان زخم ایجاد کردیم. گاز و اسفنج ژلاتینی. ما متوجه شدیم که این نانوالیاف پس از هیدراتاسیون تحت شرایط فیزیولوژیکی شسته شده و لخته‌های مبتنی بر نانوالیاف را با خون تولید می‌کنند. پس از قرار گرفتن در معرض طیف وسیعی از شرایط دمایی سخت (80 تا 60 درجه سانتیگراد) به مدت یک هفته و حتی 5 ماه در دمای 60 درجه سانتیگراد، این باندهای هموستاتیک قادر به آزادسازی نانوالیاف فعال باقی می مانند. علاوه بر این، استفاده از این لایه‌های مبتنی بر نانوالیاف از باندهای گازی در مقایسه با گاز ساده، هموستاز را در زخم‌های پوست خوک تسریع می‌کند. استحکام حرارتی، در ترکیب با فعالیت هموستاتیک قوی پپتید خودآرایی، زیست سازگاری، زیست تخریب پذیری و هزینه پایین تولید، این روش را به یک روش امیدوارکننده برای یک بانداژ هموستاتیک ارزان و در عین حال موثر تبدیل می کند.

از دست دادن خون یکی از بزرگترین علل مرگ و میر است، زیرا بیش از 85 درصد از مرگ و میرهای ناشی از زخم های بالقوه قابل زنده ماندن، به دلیل خونریزی در حین نبرد نظامی 1 است که در ترومای غیرنظامی نیز اهمیت دارد. توسعه تسلیحات انفجاری در حدود 150 سال گذشته شاهد گذار از بالستیک (مانند شلیک گلوله) به مواد منفجره (مانند مواد منفجره دست ساز، خمپاره‌ها، نارنجک‌های راکتی و مین‌های زمینی) به عنوان مکانیسم غالب آسیب 3 بوده است. دومی باعث افزایش احتمال زخم های بزرگ تروماتیک در مناطق مختلف می شود. زخم های تروماتیک اغلب می توانند منجر به انعقاد شوند، که در آن لخته شدن به دلیل کاهش سیستمیک جریان خون که منجر به ضد انعقاد و افزایش تخریب فیبرین، یکی از اجزای اصلی لخته ها می شود، مختل می شود. 4 مشخص شد که این در یک چهارم بیماران ترومایی غیرنظامی و بیش از یک سوم تلفات نظامی رخ می دهد، که احتمال آنها با شدت جراحت مرتبط است. 5،6 در نتیجه، انعقاد منجر به مرگ و میر غیرنظامیان 4 برابر بیشتر و مرگ و میر نظامی 6 برابر بیشتر شد. 6 با افزایش شیوع

آسیب تروماتیک بزرگ، ایجاد یک پانسمان هموستاتیک که قادر به تسهیل لخته شدن خون از طریق مکانیسمی مستقل از سیستم انعقادی خود بدن باشد، بسیار مهم است، به طوری که با وجود انعقاد ممکن است هموستاز حاصل شود.

اگرچه چندین هموستات موضعی در گذشته اخیر ساخته شده است، 8 سیستم هموستاتیک قابل حمل و قابل استقرار سریع می توانند نیازهای استفاده در موقعیت های نظامی و مراقبت های اضطراری، به ویژه در کشورهای در حال توسعه را برآورده کنند. ناپایداری، هزینه، زمان آماده‌سازی و/یا حجم بالای هموستات‌های معمولی، قابلیت حمل و استفاده از آن‌ها را در موقعیت‌های چالش‌برانگیز، مانند بلایا و جنگ، محدود می‌کند. برای چنین شرایط کنترل نشده ای، داشتن یک ماده هموستات خشک که علیرغم نگهداری طولانی مدت در دماهای شدید (یعنی بین À10 تا 55 درجه سانتیگراد)، فعال باشد، استفاده از آن ساده، ارزان، و ساخت آسان در مقیاس صنعتی مطلوب است. ، زیست تخریب پذیر است و هیچ عارضه جانبی نامطلوبی (مانند سوختگی یا ترومبوز) ندارد. 9،10 اگرچه برخی از پانسمان‌های هموستاتیک مانند پانسمان‌های مبتنی بر کیتوزان (بانداژهای سلوکس و Hemcon)، اسمکتیت (WoundStat) و کائولین (گاز رزمی) در ایجاد هموستاز بهبود یافته‌اند، اما در تعدادی از معیارهای مورد نظر 11 و چندین مورد ناقص هستند. تجدید نظرها منجر به بهبود قابل توجهی نشده است که نشان می دهد پتانسیل این فناوری ها ممکن است قبلاً به حداکثر رسیده باشد. یک رویکرد جایگزین برای ایجاد هموستاز از طریق استفاده از هیدروژل های متشکل از پپتیدهای خودآرایی زیست تخریب پذیر است. در محلول، این پپتیدها نانوالیافی را تشکیل می‌دهند که می‌توانند به سرعت خون را منعقد کنند، اما حالت هیدراتاسیون آنها مانع استقرار آنها در میدان می‌شود. از آنجایی که اکثریت عظیم جرم از آب تشکیل شده است، این امر باعث ایجاد حجم غیر ضروری و همچنین در معرض تخریب پپتیدها در صورت قرار گرفتن در دمای بالا می شود. از طرف دیگر، لایه‌های این نانوالیاف که روی مواد بانداژ جاذب رسوب می‌کنند، وسیله‌ای سبک وزن، بدون عارضه و بلافاصله کاربردی برای اعمال پپتید در فرم خشک غلیظ فراهم می‌کنند. این امر به غلبه بر برخی چالش‌های ناشی از زخم‌های با خونریزی شدید که می‌توانند مواد را قبل از رسیدن به محل آسیب رقیق کنند، یا شرایط محیطی شدید (مانند باد و بارش) که می‌تواند استفاده از پودرها یا محلول‌ها را چالش‌برانگیز کند، کمک می‌کند.

در اینجا، هدف ما ایجاد یک پانسمان هموستاتیک پیشرفته بر اساس استراتژی انعقاد است که مستقل از مکانیسم‌های انعقادی بدن است و می‌تواند مواد بانداژ رایج را بپوشاند. ما ابتدا عدم قطعیت مربوط به مکانیسم را روشن می کنیم که چگونه پپتیدهای خودآرایی، یعنی RADA16-I، با نشان دادن مورفولوژی سه بعدی نانوالیاف در تماس با خون کامل در حالت هیدراته، خون را به سرعت منعقد می کنند. دوم، ما هیدروژل خود مونتاژ شده را با استفاده از روش مونتاژ لایه به لایه (LbL) به فرمول فیلم خشک تبدیل می کنیم که اجازه می دهد تا از طریق برهمکنش های الکترواستاتیک غیردناتوره شونده، پوشش های منسجم مکانیکی پایداری داشته باشند. این لایه ها از RADA16-I و پلی ساکاریدهای زیست تخریب پذیر تشکیل شده اند که بر روی مواد بانداژ مربوطه گاز و اسفنج های ژلاتین جاذب پوشانده شده اند. ما متوجه شدیم که وقتی RADA16-I در فیلم‌های LbL ترکیب می‌شود، مورفولوژی نانوالیاف خود را حفظ می‌کند و قادر به تشکیل لخته‌های مبتنی بر نانوالیاف باقی می‌ماند. ما همچنین دریافتیم که این نانوالیاف شسته شده از گازهای پوشش دهنده فیلم پس از قرار گرفتن در معرض دماهای شدید (80 تا 60 درجه سانتیگراد) و تا مدت 5 ماه در دمای شدید 60 درجه سانتیگراد فعال باقی می مانند. علاوه بر این، آنها نشان داده شده است که هموستاز را در مدل زخم پوست خوک تسریع می کند.

مکانیسم لخته شدن نانوالیاف توانایی پپتیدهای خودآرایی برای انعقاد سریع خون از طریق درهم تنیدگی‌های نانوالیافی که اجزای خون را به دام می‌اندازند، وجود دارد. 16 ما تصمیم گرفتیم این اثر را با استفاده از RADA16-I بررسی کنیم، که یکی از پپتیدهای خود مونتاژکننده 17À19 است که به خوبی مطالعه شده است و قبلا به عنوان یک هموستات هیدروژل مورد بررسی قرار گرفته است. 20،21 برای روشن شدن این اثر و احتمال آن

مفاهیم RADA16-I برای مونتاژ لایه نازک و کاربردهای زیست پزشکی، ما ویژگی های مورفولوژیکی نانوالیاف فاز محلول را با میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مورد مطالعه قرار دادیم. برای بررسی SEM ساختارهای هیدراته، مواد در محلول با استفاده از گلوتارآلدئید به صورت شیمیایی تثبیت شدند، سپس به صورت سریالی در اتانول آبگیری شدند، و در نقطه بحرانی با CO2 خشک شدند و پس از آن با حدود 8 نانومتر Au/Pd پوشش داده شدند. ما دریافتیم که RADA16-I در PBS، pH 7.4 (شکل 1A) شبکه متراکمی از نانوالیاف بسیار درهم تنیده را تشکیل می دهد که از نظر مورفولوژیکی با مشاهدات قبلی توسط SEM22،23 و میکروسکوپ نیروی اتمی مطابقت دارد. 17 بررسی در بزرگنمایی بالاتر نشان می دهد که نانوالیاف منفرد به شدت با منافذ نانومقیاس نفوذ می کنند (شکل 1A، ورودی) که با تشکیل ماکروسکوپیک هیدروژل سازگار است. 17 توصیف جداگانه خون کامل ضد انعقاد EDTA وجود گلبول های قرمز (RBC) و پلاکت ها را با عدم تشکیل لخته فیبرین نشان می دهد (شکل 1B). برای بررسی مکانیسم‌های هموستاز RADA16-I در یک زخم، ما این سناریو را در شرایط خارج از بدن با ترکیب RADA16-I با خون کامل ضد انعقاد بیان کردیم و دریافتیم که نانوالیاف در هم تنیده شده به‌طور قابل‌توجهی اجزای خون را به دام انداخته‌اند (شکل 1C). جالب توجه است که به نظر می رسد این لخته مبتنی بر نانوالیاف دارای شباهت های مورفولوژیکی با لخته فیبرینی است، که در آن اجزای خون به طور فیزیکی توسط ساقه های فیبرین پلیمریزه شده در طول فرآیند انعقاد طبیعی به دام می افتند (شکل 1D). اگرچه این اثر مکانیسم پیشنهادی هموستاز با بافت شناسی 24 و AFM20 بوده است که شواهدی را ارائه می دهد، این تصاویر SEM مستقیماً درهم تنیدگی فیزیکی اجزای خون با RADA16-I را برای تشکیل یک لخته مبتنی بر نانوالیاف نشان می دهند. از آنجایی که تشکیل این لخته‌های نانوالیاف تحت شرایط ضد انعقاد اتفاق می‌افتد، RADA16-I ممکن است فعالیت هموستاتیک قابل توجهی را حتی در شرایط انعقادی ایجاد کند.

روش‌های موضعی متعدد می‌توانند با فعال کردن یا تقویت مکانیسم‌های انعقادی طبیعی بدن برای تسریع تشکیل لخته فیبرین، هموستاز را تسهیل کنند. از برخی از معایب شامل کارایی محدود، دشواری در استفاده از فرمولاسیون ها (مانند ژل یا پودر چسبناک)، واکنش های گرمازا در تماس با خون، و عدم تجزیه زیستی که نیاز به دبریدمان پس از استفاده دارد، 9 در حالی که هموستاز توسط لخته های نانوالیاف بر اساس خود مونتاژ RADA16-I ایجاد می شود. همچنین نشان داده شده است که پپتید سریع است، 21 و زیست تخریب پذیری، زیست سازگاری، هزینه کم و پایداری حرارتی آن را به یک استراتژی جایگزین جالب تبدیل کرده است. رسیدن این نانوالیاف به طور مستقیم به محل آسیب حیاتی است، که هدف ما این است که با پوشش دادن آنها بر روی مواد بانداژ معمولی در یک فرمول غلیظ مبتنی بر فیلم خشک به آن دست یابیم.

مونتاژ فیلم چند لایه ما یک پوشش لایه نازک با استفاده از رویکرد مونتاژ لایه به لایه (LbL) تمام آبی ایجاد کردیم که تطبیق پذیری پوشش انواع مواد با خواص بارگذاری و رهاسازی قابل تنظیم را نشان داده است. در توسعه یک معماری فیلم دولایه (RADA16-I/polyanion)، پلی آنیون های زیست سازگار و مشتق شده طبیعی مانند اسید هیالورونیک (HA، 2 MDa و 500 کیلو دالتون)، کندرویتین سولفات (CS) و سولفات دکستران (DS) را بررسی کردیم. در شکل 2. این فیلم ها توسط dip-LbL تحت شرایط اسیدی (pH ~ 2) مونتاژ شدند تا برهمکنش های پیوند یونی و هیدروژنی بین پلی ساکاریدها و RADA16-I را تسهیل کنند (شکل 2). در این pH، 15 زنجیره جانبی اسید آسپارتیک و آرژنین دومی به ترتیب خنثی و کاتیونی هستند. در مونتاژ فیلم LbL، تنظیم شرایط بیرونی مانند pH یا قدرت یونی می‌تواند دو جزء را وادار به تشکیل فیلم‌های چندلایه در صورت رسیدن به عملکرد مکمل کند (به عنوان مثال، دهنده کاتیونی/آنیونی یا گیرنده پیوند H/پیوند H). 25 پس از رسوب و کم آبی، شرایط قرار گرفتن در معرض فیزیولوژیک بعدی فیلم (PBS، pH7.4) به طور قابل توجهی ماهیت برهمکنش‌های بین مولکولی حساس به pH را تغییر می‌دهد و افزایش چگالی بار منفی ناشی از پروتون‌زدایی گروه‌های اسیدی، جداسازی فیلم و آزادسازی نانوالیاف را آغاز می‌کند.

ما از طریق این اجزای فیلم پلی آنیونی با استفاده از روش dip-LbL غربالگری کردیم و خواص حاصل از آنها را مقایسه کردیم. از چهار پلی آنیون مورد بررسی، DS و HA (2 MDa) فیلم هایی با بهترین بارگذاری RADA16-I و ضخامت های قابل مقایسه به دست آوردند (شکل S1)، که می تواند ناشی از تعدادی از عوامل از جمله چگالی بار، 26،27 برهمکنش ثانویه، 27À29 باشد. و وزن مولکولی 30 ما تأثیر مرحله خشک کردن دوره ای (یعنی ایستادن برای تبخیر یا خشک کردن متناوب با هوای فشرده) را بر روی فیلم های حاوی RADA16-I بررسی کرده بودیم و متوجه شدیم که این امر ضخامت لایه حاصل را افزایش می دهد (شکل S2). بنابراین، همانطور که در مواد و روش ها توضیح داده شده است، یک مرحله خشک کردن را در مونتاژ فیلم همه فیلم ها گنجانده ایم.

معرفی خشک کردن بر رشد فیلم LbL تأثیر منفی نمی گذارد، و گاهی اوقات می تواند مونتاژ چند لایه را افزایش دهد، در حالی که ممکن است در غیر این صورت مشکل باشد32،33 با افزایش مقدار مواد رسوب شده در هر لایه از طریق سازماندهی مجدد فیلم اجزای آبگریز بیشتر در نزدیکی سطح. 34،35 ما دریافتیم که خشک کردن، همراه با مراحل جوجه کشی 30 دقیقه ای، به طور قابل توجهی مونتاژ فیلم را بهبود می بخشد. با رگرسیون خطی منحنی‌های رشد برای فیلم‌های مبتنی بر DS و HA، دریافتیم که به‌ترتیب 16.9 و 10.9 نانومتر در هر دولایه رسوب داده شده‌اند (شکل 3A)، که مطابق با یک تک لایه تقریبی از نانوالیاف است که قطر آنها 10-5 نانومتر است.

علاوه بر استفاده از dip-LbL، ما مونتاژ sprayLbL را بررسی کردیم که در آن بستر به جای غوطه‌ور شدن در این محلول‌ها، با قرار گرفتن در معرض یک توالی از پیش برنامه‌ریزی‌شده محلول‌های آئروسل پوشیده شده بود. این تکنیک برای پوشش مواد متخلخل و جاذب سازگارتر است و مونتاژ فیلم در کسری از زمانی که معمولاً برای غوطه وری LbL مورد نیاز است، تکمیل می شود. 36،37 بررسی همین معماری‌ها که توسط اسپری-LbL بر روی مواد جامد (اسلایدهای شیشه‌ای) ساخته شده‌اند، لایه‌های بسیار نازک‌تری با 1.09 و 0.56 نانومتر در هر لایه برای لایه‌های مبتنی بر DS و HA به دست آورد (شکل 3B). این رسوب زیر تک لایه نانوالیاف و پلی الکترولیت در هر دولایه احتمالاً به دلیل ترکیبی از غلظت های 10 برابری کمتر RADA16-I و پلی آنیون مورد استفاده در هنگام مونتاژ و زمان رسوب گذاری بسیار کوتاه تر مرتبط با مونتاژ اسپری-LbL است که از جذب جنبشی برای جذب جنبشی استفاده می کند. 37 به جای نزدیک شدن به تعادل همانطور که در مورد مونتاژ dip-LbL است. با آئروسل کردن این مواد در یک توالی از پیش تعریف شده، فیلم‌ها را می‌توان به سرعت در عرض چند ساعت بر روی انواع زیرلایه‌های ممکن با ویژگی‌های قابل تنظیم منحصربه‌فرد مونتاژ کرد و ساخت بالقوه مقیاس‌پذیر آن را برای تولید مداوم با توان بالا دعوت کرد. 38 در هر دو مورد اسپری dipand-LbL، ما رفتار رشد خطی را پیدا کردیم، که معمولاً نشان‌دهنده حداقل انتشار بین در طول مونتاژ فیلم است. با مشخصه‌های رشد کاملاً مشابه، ما به بررسی فیلم‌های اسپری-LbL به دلیل پتانسیل انتقالی بیشتر آن ادامه دادیم. علاوه بر این، ما تصمیم گرفتیم فیلم‌های 200 دولایه را بررسی کنیم، زیرا بارگذاری RADA16-I برای مشخصه‌های اضافی کافی بود و این فیلم‌ها را می‌توان در مدت زمان معقولی (حدود 3 ساعت) ساخت.

ماهیت قابل تنظیم مجموعه فیلم LbL امکان تنظیم برخی عوامل را برای بهینه سازی ویژگی های مطلوب را ممکن می سازد. به عنوان مثال، افزایش بارگذاری RADA16-I در هر منطقه احتمالاً تأثیر مثبتی بر هموستاز دارد، زیرا غلظت های بالاتر پپتید تا حدی زمان کوتاه تری را برای هموستاز نشان می دهد که به صورت ژل استفاده شود. 14 این را می توان با لایه های ضخیم تر، که می توان با محلول های غلیظ تر، زمان های رسوب طولانی تر و افزایش تعداد لایه ها مونتاژ کرد، به دست آورد. افزایش چگالی بارگذاری (به عنوان مثال، کسر جرمی RADA16-I در فیلم) نیز یک گزینه است و ممکن است با انتخاب معقول پلی آنیون یا شرایط آبی (مانند قدرت یونی یا pH محلول) بهبود یابد. گزینه‌های دیگر، مانند استفاده از dip-LbL، می‌تواند منجر به ضخامت‌های مختلف فیلم و کسر جرمی RADA16-I شود، اما به دلیل طولانی‌تر شدن زمان مونتاژ فیلم یا استفاده از مواد متخلخل/جاذب، چالش‌برانگیزتر می‌شود. ویژگی های فیلم فیلم‌های مونتاژ شده با اسپری LbL مورفولوژی‌های سطحی جالبی را نشان دادند که بین پلی آنیون‌های DS و HA متفاوت بود. ما سه بستر را بررسی کردیم، یک اسلاید شیشه ای (شکل 4A)، گاز پنبه ای (شکل 4D)، و یک اسفنج ژلاتینی (شکل 4G). در سطوح مسطح، 200 فیلم (RADA16-I/DS) ظاهر ناهمواری دارند (شکل 4B) با خطوط متمایز نانوالیاف به طور تصادفی همپوشانی دارند که در بزرگنمایی بالاتر به وضوح قابل تشخیص هستند (شکل 4B، داخل). برای (RADA16-I/HA) 200 که به طور مشابه روی شیشه رسوب شده است (شکل 4C)، لایه ها دارای بافتی بسیار صاف تر با بزرگنمایی بالاتر هستند که خطوط اصلی نانوالیاف را نیز نشان می دهد، هر چند کمتر واضح است (شکل 4C، داخل). ساختارهای نانوالیاف کمتر ظاهری ممکن است مشخصه یک لایه HA جذب شده متراکم تر و/یا ضخیم تر باشد که فضای خالی بین نانوالیاف لایه ای را پر می کند.

ساختارهای نانوالیاف کمتر ظاهری ممکن است مشخصه یک لایه HA جذب شده متراکم تر و/یا ضخیم تر باشد که فضای خالی بین نانوالیاف لایه ای را پر می کند. چگالی بار پایین‌تر که ترکیبات زنجیره‌ای لوپیتر و متراکم‌تر را به‌دلیل کاهش دفع بار بین بخش‌های زنجیره ایجاد می‌کند، ممکن است تک‌لایه‌های پرشده‌تری ایجاد کند. هنگام قرار دادن این لایه‌ها روی گاز پنبه‌ای، (شکل 4E,F) و روی اسفنج‌های ژلاتینی در پوشش‌های پل (شکل 4H,I) و منسجم (شکل 4J,K)، مورفولوژی‌های فیلم به وضوح منتقل شدند همانطور که توسط بافت‌های سطحی کاملاً متفاوت مشهود است. در مقایسه با بسترهای ساده (بدون پوشش) (شکل 4A,D,G و شکل S3). ما متوجه شدیم که در طول مونتاژ این لایه‌ها روی اسفنج‌های ژلاتینی، خشک کردن هوا که بعد از هر لایه استفاده می‌کنیم باعث می‌شود که لایه‌ها روی منافذ پل بزنند. ما معتقدیم این ممکن است زمانی اتفاق بیفتد که قطرات آئروسل در ابتدا روی سطح اسفنج‌های ژلاتین جذب می‌شوند و برای مدت کوتاهی منافذ روی سطح را می‌پوشانند. هنگام اعمال یک خشک کردن ملایم هوا، باعث می شود که محلول به سرعت تبخیر شود و برخی از نانوالیاف قبل از اینکه فرصتی برای تعامل مستقیم با سطح ژلاتین داشته باشند، روی منافذ پل زده می شوند. این یک لایه نازک در سراسر منافذ تشکیل می دهد، که لایه های بعدی برای ایجاد این پوشش پل شده روی آن قرار می گیرند (شکل 4H,I). ما دریافتیم که با حذف مرحله خشک کردن در هوا (یعنی در عوض، اجازه دادن به فیلم برای مدت زمان مشابه)، لایه‌های حاصل هندسه پیچیده اسفنج‌های ژلاتین را پوشش می‌دهند (شکل 4J,K). در این مورد، محلول‌های آئروسل‌شده توانستند روی سطح رسوب کرده و جذب باکتری شوند و اجزای فیلم را مستقیماً به سطح اسفنج منتقل کنند. ما یک تنظیم مشابه را در تشک های الکتروریسی مشاهده کرده ایم که در آن خلاء اعمال شده در پشت این مواد غیر جاذب و متخلخل می تواند با کشیدن محلول های ته نشین شده از طریق بستر، پوششی منسجم ایجاد کند، در حالی که عدم وجود خلاء منجر به تشکیل لایه هایی فقط روی سطح می شود.

تحت شرایط pH اسیدی که ما برای تسهیل مونتاژ فیلم استفاده کردیم، نشان داده شده است که نانوالیاف به راحتی جمع می شوند. 15 هنگامی که هدف ایجاد هموستاز سریع در تماس است، ضروری است که فیلم فوراً قادر به تشکیل لخته مبتنی بر نانوالیاف باشد، و بررسی لایه‌های خشک (شکل 4) نشان می‌دهد که RADA16-I واقعاً به شکل رشته‌ای ترکیب شده است. . برای بینش بیشتر در مورد ساختار فوق مولکولی RADA16-I در داخل فیلم، ما مورفولوژی 200 فیلم (RADA16-I/DS) روی گاز را پس از هیدراتاسیون نسبی که با قرار گرفتن در معرض یک مرطوب‌کننده ایجاد شد، مورد مطالعه قرار دادیم، که پس از آن پیوند متقاطع شیمیایی با گلوتار انجام شد. آبگیری سریال و خشک شدن نقطه بحرانی برای حفظ ساختار. بررسی SEM نشان می دهد که این فیلم شکسته و متورم شده است (شکل 5A)، که می توان انتظار داشت که RADA16-I معمولاً یک هیدروژل را در محلول تشکیل می دهد. بزرگنمایی بیشتر داخل فیلم نشان می دهد که از نانوالیاف بسیار در هم تنیده و در هم تنیده تشکیل شده است که به وضوح قابل تشخیص هستند (شکل 5B) که نشان می دهد RADA16-I در واقع به عنوان نانوالیاف در فیلم گنجانده شده است. از آنجا که ساختار فوق مولکولی یک جزء حیاتی برای ایجاد هموستاز است، ادغام فیلم آن به عنوان نانوالیاف از قبل مونتاژ شده به طور بالقوه زمان پاسخ فیلم را بهبود می بخشد.

برای تأیید اینکه مونتاژ LbL با یک پلی آنیون می‌تواند پوشش‌های برتری نسبت به سایر روش‌های رسوب‌گذاری پایه ایجاد کند، ما همچنین مورفولوژی سطح گاز پوشش داده شده با معماری اسپری-LbL (RADA16-I/nothing)200 را بررسی کردیم، جایی که "هیچ چیز" آبی بود. محلول بدون پلی آنیون (شکل S4A,B) و با غوطه وری در محلول 0.1 میلی گرم در میلی لیتر RADA16-I (همان غلظتی که برای اسپری-LbL استفاده می شود) (شکل S4C,D). بررسی سطوح آنها رسوب کمی از RADA16-I را با برخی از مناطق کوچک پوشش داده شده، اما بخش های بزرگی از مناطق خالی نشان داد. کمی سازی RADA16 بارهای نسبتاً کم 5.0 (1.3 و 4.0 (1.0 میکروگرم بر سانتی متر مربع را برای این دو فیلم به ترتیب نشان داد.

انتشار و عملکرد نانوالیاف با توجه به اینکه چگونه این فیلم‌های مبتنی بر پپتید خود مونتاژکننده هموستاتیک به هیدراتاسیون کامل پاسخ می‌دهند، ما رفتار آزادسازی RADA16-I را در شرایط فیزیولوژیکی PBS، pH 7.4 در دمای 37 درجه سانتی‌گراد مطالعه کردیم و بار کلی آن‌ها را در فیلم‌های اسپری-LbL که بر روی آن‌ها رسوب کرده بودند، کمیت کردیم. اسفنج شیشه ای، گاز و ژلاتین. برای 200 فیلم (RADA16-I/DS) (شکل 6A) و (RADA16-I/HA) 200 فیلم (شکل 6B) روی شیشه و گاز، پپتیدها به سرعت در نیمه روز اول با مقادیر قابل توجهی از پپتید بارگیری شده در فیلم (شکل) آزاد می شوند. 6C)؛ پروفایل های رهاسازی مشابه با فیلم های dip-LbL مشاهده شد (شکل S1B). در مقایسه، زمانی که این لایه‌ها روی اسفنج‌های ژلاتینی قرار می‌گیرند، هم فیلم‌های مبتنی بر DS (شکل 6D) و هم فیلم‌های مبتنی بر HA (شکل 6E) انتشار پایدارتری با بارگذاری‌های قابل توجه RADA16-I نشان می‌دهند (شکل 6F). ما مشکوک بودیم که ممکن است برهمکنش ذاتی قوی تری بین لایه ها و بستر ژلاتین از طریق برهمکنش های بین مولکولی اضافی (مانند پیوند هیدروژنی) وجود داشته باشد و هنگامی که با ماهیت جذبی فوم زیست تخریب پذیر ترکیب شود، ممکن است امکان درهم تنیدگی بیشتر و ارتباط ذاتی بیشتر بین فیلم و بستر با مونتاژ این لایه‌ها در شرایط اسیدی (pH ~ 2)، پیوند هیدروژنی حساس به pH و برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی که در طول مونتاژ ایجاد شده‌اند در محلول PBS، pH 7.4 مختل می‌شوند و از این رو عدم تعادل بار جداسازی فیلم را تسهیل می‌کند. در حالت ایده‌آل، رهاسازی فوری خواهد بود، اما مشاهدات ما نشان می‌دهد که برخی عوامل اضافی می‌توانند آزادسازی RADA16-I را کاهش دهند، که ممکن است به دلیل درهم‌تنیدگی بالای نانوالیاف در هنگام خشک شدن در یک لایه و همچنین برخی از بین مولکولی ضعیف باقی‌مانده باشد. فعل و انفعالات. همانطور که با دیگر فیلم‌های پیوند هیدروژنی دریافتیم، غوطه‌ور شدن در خون جداسازی فیلم را تسهیل می‌کند در حالی که PBS این کار را نمی‌کند، که احتمالاً به دلیل جایگزینی پروتئین‌ها برهم‌کنش‌های بین مولکولی فیلم است. 39 با فیلم‌های خودمان از (RADA16-I/DS) 200 (شکل 6D) و (RADA16-I/HA)200 (شکل 6E) که روی اسفنج‌های ژلاتینی رسوب کرده‌اند، به طور مشابه وقتی که سرم جنین گاوی (FBS) به طور قابل توجهی سرعت انتشار یافتیم. بر خلاف PBS استفاده می شود.

اگرچه انتشار پپتید در محلول احتمالاً برای هموستاز مفید است، اما پاسخ آن در هنگام تماس فیزیکی مستقیم با خون در محل آسیب، مهم‌ترین عامل تعیین‌کننده برای موفقیت آن است. برای مثال، یک لخته نانوالیاف نه تنها یک پلاگ مکانیکی برای توقف خونریزی اضافی ایجاد می‌کند، بلکه اجزای خون (مانند پلاکت‌ها و گلبول‌های قرمز) را جمع‌آوری و متمرکز می‌کند تا پاسخ انعقادی را بیشتر کند. 40،41 بنابراین، برای به دست آوردن بینش بیشتر

چگونه این لایه‌های مبتنی بر نانوالیاف به زخم پاسخ می‌دهند، ما مورفولوژی گاز پوشش داده شده با (RADA16-I/DS) 200 فیلم (شکل 7AÀD) و (RADA16-I/HA) 200 فیلم (شکل 7EÀH) را مطالعه کردیم. با خون کامل انسان ضد انعقاد. این فیلم ها نشان دادند که لخته شدن نانوالیاف می تواند هم روی الیاف گاز (شکل 7A,B,E,F) و همچنین در لایه های جدا شده از گاز (شکل 7C,D,G,H) و در هر یک از الیاف گاز رخ دهد. در این موارد، ظاهر مورفولوژیکی شبیه چیزی است که ما برای مخلوط ساده RADA16-I با خون کامل ضد انعقاد مشاهده کردیم (شکل 1C). این مطالعات نشان می دهد که RADA16-I قادر به تشکیل لخته نانوفیبر در خون با نانوالیاف تشکیل یک شبکه درهم تنیده و متقابل است که می تواند اجزای خون را در تماس به دام بیاندازد و جمع کند.

علاوه بر بررسی مورفولوژیکی میکروسکوپی این لایه‌ها با خون، ما از یک آزمایش آزمایشگاهی برای تشکیل نانوالیاف اجزای فیلم آزاد شده در PBS با اتخاذ یک سنجش تعلیق که قبلاً با فعالیت هموستاتیک in vivo مرتبط بود، استفاده کردیم. 16 ما محلول های PBS را با گلبول های قرمز خرگوش مخلوط کردیم

در یک صفحه میکروتیتر 96 چاهی با چاهک های V شکل و اجازه ته نشین شدن گلبول های قرمز را داد. برای محلول‌هایی که حاوی غلظت کافی از نانوالیاف هستند، درهم‌تنیدگی آنها با گلبول‌های قرمز آنها را در حالت تعلیق نگه می‌دارد و بنابراین، نمای زیر قرمز را در کل چاه نشان می‌دهد (شکل 8A). برای غلظت‌های ناکافی، گلبول‌های قرمز در کف چاه‌ها می‌نشینند و وقتی از زیر مشاهده می‌شوند، یک ناحیه قرمز کوچک در مرکز تشکیل می‌دهند (شکل 8B). ما از این رویکرد برای بررسی رقت های سریال RADA16-I به تنهایی، در مخلوط غلظت مساوی با DS یا HA و با DS یا HA به تنهایی استفاده کردیم (شکل 8C). این نتایج نشان می‌دهد که ما واقعاً می‌توانیم بارگذاری نانوالیاف را برای به دام انداختن گلبول‌های قرمز در محلول تیتر کنیم، و اینکه پلی‌آنیون‌ها تأثیر قابل‌توجهی بر این اثر نداشتند، و همچنین پلی‌آنیون‌ها نمی‌توانستند گلبول‌های قرمز را به خودی خود به دام بیندازند. بررسی فعالیت اجزای فیلم آزاد شده در محلول از گاز و بسترهای اسفنجی ژلاتین نشان داد که آنها توانایی حفظ گلبول های قرمز را در حالت تعلیق حفظ می کنند در حالی که بسترهای بدون پوشش هیچ فعالیتی ندارند (شکل 8D). این در واقع مشاهدات ما را برای برهمکنش خون با لایه‌های رسوب‌شده روی گاز پشتیبانی می‌کند (شکل 7) و در رویکردی سریع‌تر، نشان می‌دهد که نانوالیاف آزاد شده به محلول از لایه‌های رسوب‌شده روی اسفنج‌های ژلاتینی در پوشش‌های پل‌شده و منسجم نیز قادر به تشکیل نانو نیستند. لخته های مبتنی بر گلبول های قرمز یکی از ویژگی‌های متمایز استفاده از این نانوالیاف به‌عنوان عوامل هموستاتیک، علاوه بر غیرسمی بودن و متشکل از پپتیدهای زیست تخریب‌پذیر، توانایی آن‌ها در ادامه خودآرایی با وجود قرار گرفتن در معرض شرایط محیطی سخت مانند pH یا دما است که باعث دناتوره شدن و غیرفعال شدن دیگر هموستات‌های بیولوژیک می‌شود. . قرار گرفتن محلول‌های نانوالیاف در دمای بالا تا ۸۰ درجه سانتی‌گراد باعث اختلال در پیوند یونی و هیدروژنی موجود در دانه‌های فوق مولکولی می‌شود، اما نانوالیاف پس از بازگشت به دمای اتاق اصلاح شدند. 18 برای نشان دادن استحکام این لایه‌ها، گاز روکش‌شده (RADA16-I/DS)200 را در دمای À80، À20، 37 و 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 هفته در ماده خشک‌کننده انکوبه کردیم و متوجه شدیم که نانوالیاف آزاد شده در محلول، فعالیت خود را با مخلوط کردن حفظ می‌کنند. با گلبول های قرمز (شکل 9A). علاوه بر این، فیلم‌هایی که در دمای 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 و 5 ماه انکوبه شده‌اند، همچنان نانوالیاف فعال آزاد می‌کنند (شکل 9A) و بررسی دقیق‌تر نشان می‌دهد که پپتید آزاد شده همچنان می‌تواند نانوالیاف در هم تنیده و درهم‌تنیده را تشکیل دهد (شکل 9B,C). با دمای شدید جهان، پایداری این لایه‌ها در دماهای بالا برای دوره‌های طولانی، امکان استفاده از آن‌ها را در بانداژ بدون نیاز به زنجیره سردی که معمولاً برای حفظ فعالیت مواد بیولوژیکی ضروری است، نشان می‌دهد.

تا کنون، ما شواهد قابل توجهی در شرایط آزمایشگاهی از فعالیت هموستاتیک پیدا کرده‌ایم. برای ترجمه بالقوه این فناوری به کاربرد بالینی، درک فعالیت آن در داخل بدن ضروری است. بنابراین، ما این لایه‌ها را روی زخم‌های سوراخ شده پوست خوک اعمال کردیم تا توانایی آن‌ها در تسریع هموستاز را مشخص کنیم. پس از بیوپسی به قطر 8 میلی متر و سه برش چاقوی جراحی برای ایجاد خونریزی قابل توجه، از گاز ساده یا گاز روکش دار (RADA16-I/HA) 200 به مدت 2 دقیقه استفاده کردیم و سپس آن را برداشتیم تا تأثیر آن بر هموستاز مشخص شود (شکل 10A). اگر خونریزی ادامه داشت، یک تکه گاز ساده یا روکش شده تازه به مدت 2 دقیقه دیگر با این فرآیند تا 8 دقیقه (یعنی چهار بار) تکرار می شود. برای ارزیابی شدت خونریزی، صدمات در مقیاس 0 تا 4 نمره‌گذاری شدند (جدول S1). بر اساس این معیار، ما فقط زخم هایی را که بلافاصله پس از آسیب نمره 2 یا بیشتر داشتند، وارد کردیم و هیچ تفاوتی بین گروه کنترل و درمان پیدا نکردیم (به ترتیب 3.0 (0.4 و 2.9 (0.3). در نتیجه استفاده از گاز، ما یک تفاوت معنادار پیدا کردیم. کاهش زمان لازم برای هموستاز (یعنی نمره خونریزی 0) هنگام استفاده از گاز 200 روکش شده (RADA16-I/HA) در مقابل گاز ساده (شکل 10B). فیلم RADA16-I در 2 دقیقه اول هموستاز ایجاد کرد. دوره کمون تقریباً در همه موارد، نشان می دهد که خونریزی ممکن است در کمتر از 2 دقیقه متوقف شده باشد. در مقابل، گاز ساده به 5 دقیقه (دو تا سه کاربرد) برای متوقف کردن خونریزی نیاز دارد (شکل 10B).

ساخت و مونتاژ ما RADA16-I از لایه‌های نازک خشک که روی گاز پشتیبانی می‌شوند، قابلیت حمل آن را بهبود می‌بخشد و کاربرد مستقیم روی زخم را امکان‌پذیر می‌سازد، اما برای فعال‌سازی نیاز به تماس با خون دارد، که باید هنگام مقایسه اثرات آنها بر خونریزی در نظر گرفته شود. درمان با RADA16-I به عنوان یک ژل آبی به طور کلی برای تسریع انعقاد گزارش شده است. هموستاز در 6 ثانیه در آسیب پوست موش در مقایسه با 75 ثانیه برای زخم درمان نشده، 14 ثانیه 10 ثانیه در آسیب کبد موش در مقایسه با 204 ثانیه زمانی که با سالین درمان شد، 14 و 10 ثانیه در آسیب کبدی موش در مقایسه با 90 ثانیه به دست آمد. با PBS در مقایسه، کیتوزان، یک پلیمر مخاط چسبنده با خواص هموستاتیک که به طور مستقل به مکانیسم‌های انعقادی میزبان نیز عمل می‌کند، انعقاد خون را در شرایط آزمایشگاهی از 5 تا 2 دقیقه به‌عنوان ژل تسریع کرد. یک گزارش نشان داد که ژل کیتوزان قادر به کاهش زمان خونریزی در زخم های برش زبان خرگوش از 368 تا 209 ثانیه، 44 بود، در حالی که گزارش دیگری با استفاده از ژل کیتوزان در آسیب ورید فمور موش صحرایی، هموستاز بهبود یافته ای را در مقایسه با سالین نشان نداد. 45 باندهای مبتنی بر کیتوزان گزارش شده است که در داخل بدن مؤثر هستند. 11 برای مثال، هنگامی که در صدمات شدید کبد خوک استفاده شد، پنج حیوان از هشت حیوان در عرض 4 دقیقه به هموستاز رسیدند در مقایسه با هیچ یک از هفت حیوانی که گاز ساده دریافت کردند. با مدل‌ها و معیارهای حیوانی مختلف برای هموستاز گزارش‌شده در ادبیات، در مطالعات آینده مقایسه مستقیم عملکرد این بانداژهای مبتنی بر RADA16-I با سایر مواد هموستاتیک پیشرفته در مدل‌های حیوانی بزرگ تهاجمی مهم خواهد بود.

نتیجه گیری

ایجاد هموستاز سریع از یک دستگاه یا بانداژ سبک، انعطاف‌پذیر و به راحتی برای بهبود بقای زخم‌های ناشی از درگیری‌های مسلحانه، جنایات، تصادفات یا بلایا بسیار مطلوب است. استفاده از یک روش هموستاتیک که مستقل از مکانیسم انعقادی بدن است، نسبت به بانداژهای سنتی که در موارد انعقاد بی اثر هستند، بسیار سودمند خواهد بود. پپتیدهای خود مونتاژ شونده، به ویژه RADA16-I، نشان داده اند که در ایجاد هموستاز در داخل بدن زمانی که به عنوان محلول استفاده می شوند بسیار موثر هستند. بررسی مورفولوژیکی تعامل بین این نانوالیاف و خون کامل ضد انعقاد، تشکیل یک لخته مبتنی بر نانوالیاف را نشان می‌دهد که اجزای خون را به روشی مشابه لخته‌های مبتنی بر فیبرین به دام می‌اندازد. با ادغام در فیلم‌های LbL (RADA16-I/DS) n و (RADA16-I/HA) n، ما توانستیم از مواد معمولی بانداژ و پانسمان زخم استفاده کنیم و دریافتیم که لخته‌های نانوالیافی می‌توانند در تماس با خون ایجاد شوند. این لایه‌ها همچنین از نظر حرارتی در برابر دناتوره‌شدن ناشی از طیف وسیعی از دماها مقاوم بودند و می‌توانستند نانوالیاف فعال را حتی پس از 5 ماه در دمای 60 درجه سانتی‌گراد آزاد کنند. استفاده از گاز پوشش داده شده (RADA16-I/HA) 200 در زخم های پوست خوک نشان داد که این فیلم ها قادر به تسریع هموستاز در داخل بدن هستند و رویکرد امیدوارکننده ای را برای ایجاد یک بانداژ هموستاتیک ارزان، زیست تخریب پذیر، زیست سازگار و قوی نشان می دهند. این فیلم‌های LbL مبتنی بر RADA16-I با معرفی چنین ویژگی‌هایی که بر چالش‌های هزینه و ماندگاری که معمولاً با سایر باندهای هموستاتیک پیشرفته با آن‌ها مواجه می‌شوند غلبه می‌کنند، گامی تشویق‌کننده برای توسعه یک بانداژ مقرون‌به‌صرفه در سطح مصرف‌کننده هستند.

مطالعات اضافی برای توضیح بیشتر در مورد قابلیت ترجمه این باندها حیاتی خواهد بود. در اینجا، ما پتانسیل آنها را نشان می‌دهیم، اما یک مطالعه جنبشی جامع پارامترهای انعقاد بالینی (به عنوان مثال، زمان پروترومبین و زمان ترومبوپلاستین جزئی) در ارتباط با مدل‌های حیوانی بزرگ زخم‌های دارای خونریزی تهاجمی مانند مدل‌های زخم انعقادی نزدیک به مرگ خوک برای تعیین مهم است. امکان سنجی آنها در چنین شرایطی مواد و روش ها

مگر در موارد دیگری که ذکر شده باشد، تمام مواد از سیگما آلدریچ تهیه شده و بدون تصفیه بیشتر مورد استفاده قرار گرفته اند. اسید هیالورونیک (HA، MW = 2 MDa و 500 کیلو دالتون) از Lifecore Biomedical، نمک سدیم کندرویتین سولفات (CS، M W = 85 کیلو دالتون) از TCI International، و نمک سدیم سولفات دکستران (DS، M W = 500 کیلو دالتون) از Calbiochem به دست آمد. . گلوتارآلدئید (درجه I 25%) و کلژناز (نوع I) از سیگما آلدریچ خریداری شد. خون کامل انسان (ضد انعقاد EDTA) از Hemacare به‌دست آمد و 10 درصد گلبول‌های قرمز خرگوش (RBCs) شسته شده و ادغام‌شده از آزمایشگاه بیولوژیکی Lampire به‌دست آمد. محلول های 1٪ (10 میلی گرم در میلی لیتر) RADA16-I یک اهدای سخاوتمندانه از 3DMatrix بود. RADA16-I با برچسب فلورسنت (RADA16-IFAM) توسط 5-کربوکسی فلورسئین در انتهای N از طریق یک پیوند دهنده -Gly-Gly- عاملدار شد و توسط آزمایشگاه بیوپلیمرهای MIT سنتز شد. اسفنج های ژلاتین اهدایی سخاوتمندانه از طرف فروسان بود.

مجمع فیلم LbL. بسترهای ویفرهای سیلیکونی یا اسلایدهای میکروسکوپ شیشه ای قبل از تابش پلاسما (Harrick PDC-32G) به مدت حداقل 1 دقیقه و غوطه ور شدن در محلول RADA16-I (1 میلی گرم در میلی لیتر در 10 میلی مولار HCl برای غوطه وری، با متانول، استون و آب از قبل تمیز شدند. -LbL و 0.1 میلی گرم در میلی لیتر در 10 میلی مولار HCl برای اسپری-LbL) حداقل 15 دقیقه قبل از مونتاژ فیلم اضافی. گاز پنبه ای با 30 ثانیه تابش پلاسما تهیه شد و سپس در 0.1 میلی گرم در میلی لیتر در 10 میلی مولار HCl قبل از مونتاژ اسپری-LbL غوطه ور شد. اسفنج‌های ژلاتینی بدون آماده‌سازی اضافی مورد استفاده قرار گرفتند. پس از هر 10 لایه دولایه، فیلم ها به مدت 60 دقیقه خشک شدند.

لایه های غوطه ور LbL از (RADA16-I/polyanion) n با غوطه وری متوالی در 1 mg/ml RADA16-I در 10 میلی مولار هیدروکلراید (30 دقیقه)، بر روی سیلیکون (تهیه شده همانطور که در بالا توضیح داده شد) مونتاژ شدند، با شستشو در 10 میلی مولار HCl (10، 20 و 30 ثانیه)، غوطه وری در 1 میلی گرم در میلی لیتر پلی آنیون (30 دقیقه)، و شستشو در 10 میلی مولار HCl (10، 20 و 30 ثانیه)، که یک لایه دولایه را تشکیل می داد و برای n-دو لایه ها تکرار شد.

لایه‌های اسپری LbL از (RADA16-I/polyanion) n روی شیشه، گاز پنبه‌ای و ژلاتین مونتاژ شدند (طبق شرح بالا). برای دو مورد اخیر، خلاء خانه در پشت لایه ها اعمال شد تا پوشش های فیلم کامل تر را تسهیل کند. محلول ها در 15 PSI با سرعت جریان 0.25 میلی لیتر بر ثانیه با استفاده از ابزار مونتاژ فیلم خودکار (Svaya) آئروسل شدند. لایه‌های دولایه با پاشش بسترها به ترتیب زیر ساخته شدند: 0.1 میلی‌گرم بر میلی‌لیتر RADA16-I در 10 میلی‌مولار HCl (2 ثانیه)، دوره انتظار (5 ثانیه)، شستشو با 10 میلی‌مولار هیدروکلراید (3 ثانیه)، خشک کردن با هوا (8). s)، 0.1 میلی گرم بر میلی لیتر پلی آنیون در 10 میلی مولار HCl (2 ثانیه)، دوره انتظار (5 ثانیه)، شستشو با 10 میلی مولار HCl (3 ثانیه)، و خشک کردن در هوا (8 ثانیه). این یک دولایه بود و برای n دو لایه تکرار شد. برای اسفنج‌های ژلاتینی، استفاده از خشک‌کردن در هوا یک ترکیب لایه‌ای ایجاد می‌کند، در حالی که جایگزینی آن با یک دوره انتظار باعث ایجاد پوشش‌های منسجم می‌شود.

شخصیت پردازی فیلم ضخامت لایه‌های رسوب‌شده بر روی بسترهای مسطح (سیلیکون یا شیشه) با اندازه‌گیری اختلاف ارتفاع پله بین فیلم و ناحیه تیغ‌دار (Dektak 150 Profilometer) تعیین شد.

نمایه‌های رهاسازی فیلم‌های رسوب‌شده روی سیلیکون، شیشه و گاز با غوطه‌وری در 500 میکرولیتر PBS، pH 7.4 در دمای 37 درجه سانتی‌گراد و جایگزینی دوره‌ای با مقادیر تازه PBS که از قبل تا دمای 37 درجه سانتی‌گراد گرم شده بود، اندازه‌گیری شد. مقدار کمی جمع آوری شده برای محتوای RADA16-I آنها با استفاده از روش بیسینکونیک اسید (BCA) (Thermo Scientiﬁc) مطابق دستورالعمل سازنده با انکوباسیون معرف و نمونه به مدت 30 دقیقه در دمای 60 درجه سانتیگراد برای افزایش حساسیت مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. تحت این شرایط، هیچ سیگنال پس‌زمینه‌ای از پلی آنیون‌های مورد استفاده در این مطالعه مشاهده نکردیم. این سنجش BCA قادر به تشخیص RADA16-I آزاد شده از همه بسترها بود، به جز اسفنج های ژلاتین، که پروتئینی را آزاد می کردند که اندازه گیری را مخفی می کرد. برای تعیین کمیت RADA16-I آزاد شده از این نمونه ها، فیلم ها با محلول RADA16-I حاوی کسر 1:20 از RADA16-IFAM مونتاژ شدند و انتشار پپتید با انکوبه کردن در 1 میلی لیتر PBS یا FBS در دمای 37 درجه سانتی گراد مورد مطالعه قرار گرفت. و به طور دوره ای 300 میکرولیتر برای تجزیه و تحلیل و جایگزینی آن با محلول تازه از قبل گرم شده نمونه برداری می شود. مقدار کمی جمع آوری شده برای فلورسانس اندازه گیری شد (λ ex = 480 نانومتر؛ λ em = 525 نانومتر) و RADA16-I با مقایسه با یک منحنی استاندارد کمی سازی شد.

مجموع بارهای RADA16-I روی شیشه، سیلیکون و گاز با انحلال کامل لایه‌ها در 225 میکرولیتر 0.1 مولار NaOH در دمای 37 درجه سانتی‌گراد به مدت 2 ساعت تعیین شد، پس از آن محلول با 225 میکرولیتر HCl 0.1 مولار خاموش شد. و افزودن 50 میکرولیتر 10 PBS (برای غلظت 1 نهایی) برای تثبیت pH. محتوای RADA16-I با روش BCA، مشابه آنچه قبلاً توضیح داده شد، اندازه‌گیری شد. از آنجایی که اسفنج‌های ژلاتین در شستشوی کامل RADA16-I از لایه‌ها مشکلاتی ایجاد می‌کردند، بستر قبل از کمی‌سازی فلورسانس با استفاده از کلاژناز هضم شد. ase و 50 میلی مولار CaCl 2 در PBS قبل از انکوباسیون در دمای 37 درجه سانتیگراد برای ~4 h و به دنبال آن کمی سازی فلورسانس انجام می شود.

فعالیت نانوالیاف در شرایط آزمایشگاهی توانایی RADA16-I برای تشکیل لخته مبتنی بر نانوالیاف در شرایط آزمایشگاهی با استفاده از روش مشابهی که قبلا توضیح داده شد تعیین شد. 16 محلول 95 میکرولیتری PBS حاوی RADA16-I رقیق شده از ذخایر یا رها شده از فیلم ها به صفحات میکروتیتر 96 چاهی V شکل و سپس 10 میکرولیتر گلبول قرمز 10 درصد خرگوش اضافه شد. چاه ها با یک فیلم چسب نوری شفاف مهر و موم شدند، در حدود 900 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه به هم زدند و سپس در دمای 4 درجه سانتی گراد به مدت حداقل 4 ساعت قبل از بررسی انکوبه شدند.

خصوصیات لخته شدن لخته های فیبرین با افزودن 25 میکرولیتر از 0.2 مولار CaCl2 به 475 میکرولیتر خون کامل ضد انعقاد ایجاد شد و مخلوط به مدت 30 دقیقه به آرامی در دمای اتاق تکان داده شد. برای مطالعه برهمکنش نانوالیاف با خون، 1 میکرولیتر از 1% RADA16-I با 9 میکرولیتر خون کامل ضد انعقاد مخلوط شد و مخلوط به مدت 5 دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. خون کامل ضد انعقاد بدون درمان اضافی و RADA16-I در 0.1٪ در PBS، pH 7.4 مورد مطالعه قرار گرفت. برای بررسی برهمکنش خون با 200 فیلم (RADA16-I/Polyanion)، 5 میکرولیتر خون کامل ضد انعقاد در بالای گاز پوشش داده شده با فیلم قرار داده شد و نمونه در دمای اتاق به مدت 5 دقیقه با قرار گرفتن در معرض یک مرطوب کننده انکوبه شد. جلوگیری از خشک شدن تمام نمونه ها از نظر شیمیایی تثبیت شدند، آبگیری شدند و در نقطه بحرانی خشک شدند.

میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه های بیولوژیکی بر روی فیلتر غشایی پلی (اتر سولفون) 0.03 میکرومتر (Sterlitech) با تثبیت با 2.5٪ گلوتارآلدئید (رقیق شده از 25٪) در PBS به مدت 4 ساعت در دمای اتاق تهیه شد، سپس به صورت سریالی با 10 میلی لیتر H2O آبگیری شد. دو بار)، 25٪ اتانول، 50٪ اتانول، 75٪ اتانول، 80٪ اتانول، 90٪ اتانول، و 100٪ اتانول (دو بار). سپس نمونه‌های موجود در اتانول با استفاده از CO2 (سیستم خشک کردن نقطه بحرانی Sorvall) در نقطه بحرانی خشک شدند. این نمونه‌های بیولوژیکی خشک شده و نمونه‌های دیگر که قبلاً به شکل خشک بودند، قبل از بررسی با استفاده از یک SEM انتشار میدانی (JEOL 6700F) با حدود 8 نانومتر طلا و پالادیم پوشش داده شدند. فیلم‌های LbL خشک در حالت LEI (فاصله کاری 10 کیلوولت و 8 میلی‌متر)، در حالی که نمونه‌های بیولوژیکی در حالت SEI (فاصله کاری 5.0 کیلوولت و ~6 میلی‌متر) مورد مطالعه قرار گرفتند.

آسیب پوست خوک. آسیب پوست خوک در آزمایشگاه الکتروفیزیولوژی تجربی مرکز پزشکی Beth Israel Deaconess انجام شد و با موضع انجمن قلب آمریکا در مورد استفاده از حیوانات تحقیقاتی و همچنین مطابقت داشت.

به بیانیه هلسینکی این مطالعه تحت پروتکل کمیته مراقبت و استفاده از حیوانات سازمانی تایید شده انجام شد. یک خوکی نر یورکشایر با وزن 42 کیلوگرم با تلازول (4.7 میلی گرم بر کیلوگرم IM) از قبل بیهوش شد و سپس در طول عمل با ایزوفلوران استنشاقی بیهوش شد. حیوان انتوبه شد و تهویه بین 10 تا 14 تنفس در دقیقه با حجم جزر و مدی بین 300 تا 500 میلی لیتر حفظ شد. ارزیابی همودینامیک شامل دمای مرکزی بدن، ضربان قلب، اشباع اکسیژن و فشار خون به طور مداوم بررسی شد. ضد انعقاد درمانی با هپارین داخل وریدی حفظ شد و با آزمایش متوالی زمان لخته شدن فعال بین 250 تا 350 ثانیه تایید شد.

زخم با بیوپسی 8 میلی متری در ناحیه میانی ایجاد شد. پس از برداشتن بافت بیوپسی شده، سه برش به عمق 2 سانتی متر با اسکالپل شماره 10 در چرخش 60 درجه ایجاد شد. به زخم اجازه داده شد تا تقریباً 5 ثانیه خونریزی کند، که در طی آن شدت خونریزی از 0 (بدون خونریزی) تا 4 (خونریزی شدید)، همانطور که در جدول S1 توضیح داده شده است. 200 نمونه گاز ساده یا (RADA16-I/HA) روکش شده به ابعاد 5 سانتی‌متر و 2 سانتی‌متر رول شده و سپس داخل زخم قرار داده شد. پس از 2 دقیقه نمونه برداشته شد و شدت خونریزی نمره گذاری شد. برای زخم هایی که به خونریزی ادامه دادند، قطعات گاز تازه به مدت 2 دقیقه قبل از برداشتن و ارزیابی استفاده شد. این کار حداکثر برای چهار برنامه تکرار شد. زخم و استفاده از نمونه ها به صورت کور به نوع گاز (یعنی ساده یا روکش شده) انجام شد. هموستاز زمانی به دست آمد که به خونریزی نمره 0 داده شد. تجزیه و تحلیل آماری با آزمون مجموع رتبه یک طرفه Wilcoxon برای تعیین اهمیت پوشش 200 (RADA16-I/HA) در کاهش زمان هموستاز در مقایسه با گاز ساده انجام شد. .

تضاد منافع: نویسندگان منافع مالی رقیب زیر را اعلام می کنند: M.M. کارمند فناوری پزشکی 3-D Matrix است. S.Z. بنیانگذار و مدیر فناوری پزشکی 3-D Matrix است.

تصدیق. نویسندگان مایلند از W. DiNatale برای کمک در خشک کردن نقاط بحرانی و R. Polak و J. McConville برای بینش خود تشکر کنند. نویسندگان همچنین مایلند قدردانی خود را از مؤسسه نانوتکنولوژی سرباز در MIT، که توسط دفتر تحقیقات ارتش و آزمایشگاه‌های تحقیقات ارتش پشتیبانی می‌شود، که از امکانات و/یا تجهیزات آنها برای انجام تحقیقات گزارش‌شده در این مقاله استفاده شده است، ابراز کنند. علاوه بر این، ما از مرکز بیوتکنولوژی سوانسون موسسه کخ MIT، که توسط موسسه Koch Core Grant P30CA14051 از NCI، برای استفاده از امکانات، و به‌ویژه آزمایشگاه پلیمرهای زیستی پشتیبانی می‌شود، تشکر می‌کنیم. این تحقیق توسط دفتر تحقیقات ارتش ایالات متحده تحت قرارداد W911NF-13-D-0001 و نیروی هوایی تحت قرارداد W911NF-07-D-0004 پشتیبانی شد.

اطلاعات پشتیبانی موجود: اطلاعات پشتیبانی به صورت رایگان در وب سایت انتشارات ACS به آدرس DOI: 10.1021/acsnano.5b02374 در دسترس است.

ضخامت فیلم و بارگذاری RADA16-I از غوطه وری LbL مونتاژ شده (RADA16-I/polyanion) 40 فیلم. اثر خشک کردن متناوب بر ضخامت لایه. تصاویر SEM از سطوح شیشه بدون پوشش، گاز و زیرلایه های ژلاتینی. مورفولوژی سطح گاز پوشش داده شده با روش های غیر LbL. انتشار RADA16-I از فیلم های مونتاژ شده dip-LbL. معیارهای امتیازدهی برای شدت خونریزی (PDF)

1. Kelly, J. F.; Ritenour, A. E.; McLaughlin, D. F.; Bagg, K. A.; Apodaca, A. N.; Mallak, C. T.; Pearse, L.; Lawnick, M. M.; Champion, H. R.; Wade, C. E.; et al. Injury Severity and Causes of Death from Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom: 2003À2004 Versus 2006.

J. Trauma 2008, 64, S21–S26.

2. Evans, J. A.; van Wessem, K. J. P.; McDougall, D.; Lee, K. A.; Lyons, T.; Balogh, Z. J. Epidemiology of Traumatic Deaths: Comprehensive Population-Based Assessment. World J. Surg. 2010, 34, 158–163.

3. Belmont, P. J.; Schoenfeld, A. J.; Goodman, G. Epidemiology of Combat Wounds in Operation Iraqi Freedom and Operation Enduring Freedom: Orthopaedic Burden of Disease.

J. Surg. Orthop. Adv. 2010, 19, 2–7

4. Brohi, K.; Cohen, M. J.; Ganter, M. T.; Schultz, M. J.; Levi, M.; Mackersie, R. C.; Pittet, J. F. Acute Coagulopathy of Trauma: Hypoperfusion Induces Systemic Anticoagulation and Hyperﬁbrinolysis. J. Trauma 2008, 64, 1211–7discussion 1217.

5. Brohi, K.; Singh, J.; Heron, M.; Coats, T. Acute Traumatic Coagulopathy. J. Trauma 2003, 54, 1127–1130.

6. Niles, S. E.; McLaughlin, D. F.; Perkins, J. G.; Wade, C. E.; Li, Y.; Spinella, P. C.; Holcomb, J. B. Increased Mortality Associated with the Early Coagulopathy of Trauma in Combat Casualties. J. Trauma 2008, 64, 1459–63 discussion 1463À5.

7. Kheirabadi, B. Evaluation of Topical Hemostatic Agents for Combat Wound Treatment. U.S. Army Med. Dep. J. 2011, 25–37.

8. Achneck, H. E.; Sileshi, B.; Jamiolkowski, R. M.; Albala, D. M.; Shapiro, M. L.; Lawson, J. H. A Comprehensive Review of Topical Hemostatic Agents: Eﬃcacy and Recommendations for Use. Ann. Surg. 2010, 251, 217–228.

9. Gordy, S. D.; Rhee, P.; Schreiber, M. A. Military Applications of Novel Hemostatic Devices. Expert Rev. Med. Devices 2011, 8, 41–47.

10. Capturing the Full Power of Biomaterials for Military Medicine: Report of a Workshop; The National Academies Press: Washington, D.C., 2004.

11. Bennett, B. L.; Littlejohn, L. F.; Kheirabadi, B. S.; Butler, F. K.; Kotwal,R.S.;Dubick,M.A.;Bailey,J.A.ManagementofExternal Hemorrhage in Tactical Combat Casualty Care: ChitosanBased Hemostatic Gauze Dressings - Tccc Guidelines-Change 13À05. J. Spec. Oper. Med. 2014, 14, 40–57.

12. Rall, J. M.; Cox, J. M.; Songer, A. G.; Cestero, R. F.; Ross, J. D. Comparison of Novel Hemostatic Dressings with Quikclot Combat Gauze in a Standardized Swine Model of Uncontrolled Hemorrhage. J. Trauma Acute Care Surg. 2013, 75, S150–6.

13. Grissom, T. E.; Fang, R. Topical Hemostatic Agents and Dressingsin the PrehospitalSetting. Curr.Opin. Anaesthesiol. 2015, 28, 210–6.

14. Ellis-Behnke, R. At the Nanoscale: Nanohemostat, a New Class of Hemostatic Agent. Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol. 2011, 3, 70–78.

15. Arosio, P.; Owczarz, M.; Wu, H.; Butté, A.; Morbidelli, M.

End-to-EndSelf-AssemblyofRada16-INanoﬁbrilsinAqueous Solutions. Biophys. J. 2012, 102, 1617–1626.

16. Luo, Z.; Wang, S.; Zhang, S. Fabrication of Self-Assembling D-Form Peptide Nanoﬁber Scaﬀold D-Eak16 for Rapid Hemostasis. Biomaterials 2011, 32, 2013–2020..

18. Ye, Z.; Zhang, H.; Luo, H.; Wang, S.; Zhou, Q.; Du, X.; Tang, C.; Chen, L.; Liu, J.; Shi, Y.-K.; et al. Temperature and Ph Eﬀects on Biophysical and Morphological Properties of Self-Assembling Peptide Rada16À1. J. Pept. Sci. 2008, 14, 152–162.

19. Cormier, A. R.; Ruiz-Orta, C.; Alamo, R. G.; Paravastu, A. K.

Solid State Self-Assembly Mechanism of Rada16-I Designer Peptide. Biomacromolecules 2012, 13, 1794–1804.

20. Wang, T.; Zhong, X.; Wang, S.; Lv, F.; Zhao, X. Molecular Mechanisms of Rada16À1 Peptide on Fast Stop Bleeding in Rat Models. Int. J. Mol. Sci. 2012, 13, 15279–15290.

21. Ellis-Behnke, R. G.; Liang, Y.-X.; Tay, D. K. C.; Kau, P. W. F.; Schneider, G. E.; Zhang, S.; Wu, W.; So, K.-F. Nano Hemostat Solution: Immediate Hemostasis at the Nanoscale. Nanomedicine 2006, 2, 207–15.

22. Gelain, F.; Horii, A.; Zhang, S. Designer Self-Assembling Peptide Scaﬀolds for 3-D Tissue Cell Cultures and Regenerative Medicine. Macromol. Biosci. 2007, 7, 544–551.

23. Ho, D.; Fitzgerald, M.; Bartlett, C. A.; Zdyrko, B.; Luzinov, I. A.; Dunlop, S. A.; Iyer, K. S. The Eﬀects of ConcentrationDependent Morphology of Self-Assembling Rada16 Nanoscaﬀolds on Mixed Retinal Cultures. Nanoscale 2011, 3, 907–910.

24. Song, H.; Zhang, L.; Zhao, X. Hemostatic Eﬃcacy of Biological Self-Assembling Peptide Nanoﬁbers in a Rat Kidney Model. Macromol. Biosci. 2010, 10, 33–39.

25. Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. Science 1997, 277, 1232–1237.

26. Shiratori, S. S.; Rubner, M. F. Ph-Dependent Thickness Behavior of Sequentially Adsorbed Layers of Weak Polyelectrolytes. Macromolecules 2000, 33, 4213–4219.

27. Xu, L.; Ankner, J. F.; Sukhishvili, S. A. Steric Eﬀects in Ionic Pairing and Polyelectrolyte Interdiﬀusion within Multilayered Films: A Neutron Reﬂectometry Study. Macromolecules 2011, 44, 6518–6524.

28. Clark, S. L.; Hammond, P. T. The Role of Secondary Interactions in Selective Electrostatic Multilayer Deposition. Langmuir 2000, 16, 10206–10214.

29. Gilbert, J. B.; Rubner, M. F.; Cohen, R. E. Depth-Proﬁling X-Ray Photoelectron Spectroscopy (Xps) Analysis of Interlayer Diﬀusion in Polyelectrolyte Multilayers. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2013, 110, 6651–6656.

30. Sui, Z.; Salloum, D.; Schlenoﬀ, J. B. Eﬀect of Molecular Weight on the Construction of Polyelectrolyte Multilayers: Stripping Versus Sticking. Langmuir 2003, 19, 2491–2495.

31. Halthur, T. J.; Claesson, P. M.; Elofsson, U. M. Stability of Polypeptide Multilayers as Studied by in Situ Ellipsometry: Eﬀects of Drying and Post-Buildup Changes in Temperature and Ph. J. Am. Chem. Soc. 2004, 126, 17009–17015.

32. Raposo, M.; Pontes, R. S.; Mattoso, L. H. C.; Oliveira, O. N.

Kinetics of Adsorption of Poly(O-Methoxyaniline) Self-Assembled Films. Macromolecules 1997, 30, 6095–6101.

33. Wang, L.; Wang, L.; Su, Z. Surface Defects in Polyelectrolyte Multilayers: Eﬀects of Drying and Deposition Cycle. Soft Matter 2011, 7, 4851–4855.

34. Decher, G.; Lvov, Y.; Schmitt, J. Proof of Multilayer Structural Organization in Self-Assembled Polycation Polyanion Molecular Films. Thin Solid Films 1994, 244, 772–777.

35. Lvov, Y.; Ariga, K.; Onda, M.; Ichinose, I.; Kunitake, T. A Careful Examination of the Adsorption Step in the Alternate Layer-by-Layer Assembly of Linear Polyanion and Polycation. Colloids Surf., A 1999, 146, 337–346.

36. Krogman, K. C.; Lowery, J. L.; Zacharia, N. S.; Rutledge, G. C.; Hammond, P. T. Spraying Asymmetry into Functional Membranes Layer-by-Layer. Nat. Mater. 2009, 8, 512–518.

37. Krogman, K. C.; Zacharia, N. S.; Schroeder, S.; Hammond,

P. T. Automated Process for Improved Uniformity and Versatility of Layer-by-Layer Deposition. Langmuir 2007, 23, 3137–3141.

38. Krogman, K. C.; Cohen, R. E.; Hammond, P. T.; Rubner,

M. F.; Wang, B. N. Industrial-Scale Spray Layer-by-Layer Assembly for Production of Biomimetic Photonic Systems. Bioinspiration Biomimetics 2013, 8, 045005.

40. Andrews, D. A.; Low, P. S. Role of Red Blood Cells in Thrombosis. Curr. Opin. Hematol. 1999, 6, 76–82.

41. Monroe, D.; Hoﬀman, M.; Roberts, H. R. Platelets and Thrombin Generation. Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol. 2002, 22, 1381–1389.

42. Cheng, T.-Y.; Wu, H.-C.; Huang, M.-Y.; Chang, W.-H.; Lee, C.-H.; Wang, T.-W. Self-Assembling Functionalized Nanopeptides for Immediate Hemostasis and Accelerative Liver Tissue Regeneration. Nanoscale 2013, 5, 2734–2744.

43. Rao, S. B.; Sharma, C. P. Use of Chitosan as a Biomaterial:

Studies on Its Safety and Hemostatic Potential. J. Biomed. Mater. Res. 1997, 34, 21–28.

44. Klokkevold, P. R.; Fukayama, H.; Sung, E. C.; Bertolami,

C. N. The Eﬀect of Chitosan (Poly-N-Acetyl Glucosamine) on Lingual Hemostasis in Heparinized Rabbits. J. Oral Maxillofac. Surg. 1999, 57, 49–52.

45. Dowling, M. B.;Kumar, R.;Keibler,M.A.;Hess,J.R.;Bochicchio,

G. V.;ﬁedRaghavan,ChitosanS. R.CapableA ofSelf-AssemblingReversibleHemostaticHydrophobicallyAction. Biomaterials 2011, 32, 3351–3357.

46. Pusateri, A. E.; McCarthy, S. J.; Gregory, K. W.; Harris, R. A.; Cardenas, L.; McManus, A. T.; Goodwin, C. W., Jr. Eﬀect of a Chitosan-Based Hemostatic Dressing on Blood Loss and Survival in a Model of Severe Venous Hemorrhage and Hepatic Injury in Swine. J. Trauma 2003, 54, 177–82

Tough, Rapidly Swelling Thermoplastic Elastomer Hydrogels for Hemorrhage Control

U.S. Army Research Laboratory, Aberdeen Proving Ground, Maryland 21005, United States

هيدروژلهاي تزريقي ازجمله مواد مناسب در مهندسي بافتهاي نرم هستند. امروزه يكي از اهداف بيولوژي سنتزي، طراحي و توليد زيست مواد هيدروژل شونده است كه ضمن داشتن ويژگيهاي فيزيكي مناسب قادر به خودآرايي درجا در شرايط درون تني باشند. پپتيدهاي دوگانه دوست گروهي از اين مواد هستند. شبيهسازي هرچه بهتر ماتريكس خارج سلولي بافتهاي نرم با هيدروژلهاي حاصل از خودآرايي پپتيدهاي دوگانهدوست، مستلزم بهينهسازيهاي زيستي، شيميايي و فيزيكي است. در اين تحقيق هدف ساخت هيدروژلهاي سهبعدي نانوكامپوزيتي با خواص زيستي و مكانيكي متفاوت است كه طي فرآيند همآرايي و تنها با تغيير نسبت پپتيد دوگانهدوست و دو مشتق زيست فعال آن، به وجود آمده باشند. براي بهينه نمودن فرآيند همآرايي و بررسي اثرات احتمالي ناشي از وجود تواليهاي مختلف زيست فعال بر ويژگيهاي همآرايههاي نهايي از روشهاي طيفسنجي همچون FTIR و CD در كنار روشهاي ميكروسكوپي مانند TEM و AFM استفادهشده است. نتايج بهدستآمده حاكي از آن است كه نهتنها مقادير هر يك از مولكولها در همآرايي بلكه درصد آبگريزي و آبدوستي بخش زيست فعال آنها نيز بر قدرت و جهتگيري پيوندهاي هيدروژني، ميانكنشهاي بين فيبري و پايداري نهايي هيدروژلها مؤثر است. بنابراين ميتوان بدون تغيير در بخشهاي اصلي تشكيلدهنده مولكولهاي دوگانهدوست و تنها با طراحي همآراييهاي مناسب ميان اين مولكولها و مشتقاتشان به هيدروژلهايي با خواص متفاوت رسيد.

هيدروژلهاي تزريقي ازجمله مواد مناسب در مهندسي بافتهاي نرم هستند. اين مواد ازنظر محتواي آبي شبيه بافتهاي نرم بوده و ضمن محصور كردن )Entrapment( همگن سلولها شرايط مناسبي را براي تبادل مناسب متابوليتها، گازها و مواد مغذي براي آنها فراهم ميكنند. از مزاياي اين مواد ميتوان به توانايي ژل شدن در محل ) In situ(، پر كردن ناحيه صدمهديده و اتصال مناسب با آن بدون نياز به بخيه زدن، زيست سازگاري )Biocompatibility( و زيست تخريبي )Biodegradability( اشاره كرد )14 و 20(. در دهه گذشته مواد و مشتقات طبيعي و مصنوعي متعددي براي توليد هيدروژلهاي قابل تزريق در مهندسي بافتهاي نرم استفادهشدهاند. پليمرهاي طبيعي هرچند زيست سازگار و زيست تخريب بوده و داراي پيامهاي مناسب رشد سلولها هستند ولي استفاده از آنها همواره با محدوديتهايي همچون پاسخهاي ايمني احتمالي و تخريب سريع در شرايط درون تني )In vivo( همراه بوده است. پليمرهاي مصنوعي نيز با وجود آنكه محدوديتهاي پليمرهاي طبيعي را از نظر سرعت تخريب بالا ندارند ولي فاقد هرگونه پيام مناسب براي رشد و تكثير سلولي بوده و امكان بروز پاسخهاي ايمني پس از استفاده از اين هيدروژلهاي مصنوعي وجود دارد )20(. اما امروزه با ايجاد زمينه مطالعاتي ميانرشتهاي جديدي تحت عنوان بيولوژي سنتزي )Synthetic biology(، طراحي و توليد مواد جديدي كه خواص مناسب هر دو نوع پليمرهاي طبيعي و مصنوعي را در خود داشته باشند، رشد فزايندهاي داشته است )4(. به عنوان مثال از اين زيست مواد جديد ميتوان به پپتيدهاي دوگانهدوست ) Peptide amphiphiles( اشاره كرد. پپتيدهاي دوگانهدوست گروهي از بيومواد باقابليت خودآرايي )Self-assembly( هستند كه در حضور محلولهاي آبي آرايههاي فيبري با ابعاد نانومقياس ايجاد ميكنند. به عبارتي همانطور كه از تعريف خودآرايي قابل استنباط است اين مواد با قرار گرفتن در