Journal of Advanced Materials and Technologies

Journal Homepage: www.jamt.ir

Materials and Energy Research Center

MERC

Review Article - Extended Abstract

An overview of the Application of Eggshell Membrane in the Production of Engineered Wound Dressing: structure, characteristics and modification

Neda Nazari [1], **Rana Imani** [2*], **Tahura Ebrahimi Nozari** [3]

[1] *MSc Student, Department of Biomedical engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran.*
[2] *Assistant Professor, Department of Biomedical engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran.*
[3] *PhD Student, Department of Biomedical engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran.*

*Corresponding Author's Email: r.imani@aut.ac.ir (Rana Imani)

Paper History:
Received: 2023-02-07
Revised: 2023-11-29
Accepted: 2024-03-10

Keywords:
Wound Healing,
Wound Dressing,
Eggshell Membrane,
Tissue Engineering

Abstract: Skin, as the largest body organ, performs several functions namely creating a protective barrier against microorganisms and regulating body temperature. For this reason, maintenance of skin integrity and health is of high importance. This tissue can repair itself in limited damages; however, under some conditions such as severe burns, extensive and deep damage, and chronic wounds, skin loses its ability to completely repair itself. For this reason, the products that help repair the wound are needed. Such skin products are prepared through skin tissue engineering. In this respect, extensive research has been done, and natural and synthetic materials with different potentials were used to prepare wound dressings. One of these materials is the eggshell membrane which is a fibrous structure between the inner layer of the mineral shell and the egg white. This membrane has attracted a number of researchers' attention due to its porous structure, biocompatibility, availability, non-contamination, containing natural proteins and compounds similar to the extracellular matrix, and low cost. It has many applications in medicine, among which is preparation of wound dressings and wound healing products with promising results. In this study, eggshell membrane is introduced as a natural biomaterial. Further, its application in wound healing and preparation of wound dressings are reviewed.

https://doi.org/10.30501/JAMT.2024.376574.1264 URL: https://www.jamt.ir/article_193275.html

1. INTRODUCTION

Skin is a three-layered structure with essential functions, and maintaining its integrity and health is essential (Mescher et al. 2009). Sometimes, in the case of severe wounds and injuries, skin cannot repair itself entirely, necessitating use of products such as wound dressings to help wound healing. Nowadays, natural materials play an important role in the preparation process of wound dressings due to their biocompatibility, appropriate degradability, and ability to integrate with various types of cells and tissues (Faghihi et al. 2019).

One of the natural materials used to prepare wound dressings is Eggshell Membrane (ESM). Owing to ESM's unique properties, it is used in various fields such as cell culture, heavy metal absorption for water pollution control, fabrication of biosensors, nickel oxide capacitors, and solar cells.

The present study aims to introduce ESM as a natural biomaterial with high potential in wound healing. Research studies in this area indicated that combining eggshell membrane with other materials to enhance its properties yielded positive results in wound healing, thus making it suitable for wound dressings (Park et al. 2016).

2. EGGSHELL MEMBRANE

ESM is a fibrous protein-based structure between the eggshell and egg white. Its porous structure, biocompatibility, availability, lack of contamination, presence of natural proteins and active functional groups on its surface, modification capability, and low cost have drawn researchers' attention to using eggshell membrane in various fields. Of note, the eggshell membrane contains components similar to Extracellular Matrix (ECM). Therefore, the porous structure of ESM, resembling the ECM, promotes cellular adhesion and triggers intracellular signaling pathways, hence successful tissue regeneration (Sah et al. 2016).

ESM is a natural bilayer and semi-permeable scaffold composed of an interwoven network of thin fibers in the inner layer and thick fibers in the outer layer. ESM contains 85-80% organic and 20-15% mineral material. In the organic part, 10% contains collagen (Types I, X, and V) while 75-70% includes other elements such as keratin, proteoglycans, and glycoproteins (Sah et al. 2016). Each strand of ESM fibers has a collagen-rich core surrounded by a glycoprotein layer (Sah et al. 2016).

The low toxicity and biocompatibility make ESM a suitable material. Due to its high protein and glycoprotein content, ESM promotes cell behaviors such as adhesion, spreading, and proliferation. Followed by Tavassoli's attempt in 1983 to use ESM in cell culture, many researchers suggested eggshell membrane as a suitable substrate for cell culture (Park et al. 2016).

An analysis of the mechanical properties of the eggshell membrane indicates that its behavior is similar

Please cite this article as:Nazari, N., Imani, R. & Ebrahimi Nozari, T. (2024) An overview of the Application of Eggshell Membrane in the Production of Engineered Wound Dressing: structure, characteristics and modification, *Journal of Advanced Materials and Technologies*, Vol. 13, No. 1, 12-30. https://doi.org/10.30501/JAMT.2024.376574.1264

2783-0829/© 2024 The Author(s). Published by MERC.
This is an open access article under the CC BY license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/legalcode).

to that of other natural polymers in some places. The entropy mechanism of collagen degradation in ESM is the main driving force at low strains. However, at higher strains, the mechanical behavior of the ESM resembles that of fibrous networks and cellular solids (Sah et al. 2016).

The insolubility of the eggshell membrane limits its application. This insolubility results from disulfide bonds within the ESM structure. A soluble form called Soluble Eggshell Membrane Protein (SEP) is prepared in common, non-toxic solvents to overcome this limitation. Therefore, SEP can enhance the application of the ESM as a natural material owing to its significant potential in clinical studies, e.g., wound dressings and tissue engineering scaffolds. Of note, one of the drawbacks of the SEP is its lower antibacterial activity than that of ESM (Park et al. 2016).

3. EGGSHELL MEMBRANE IN WOUND HEALING

One application of ESM in biomedical engineering is skin tissue engineering as a biological covering for burns and skin grafts since ESM has lipid and hydrated protein phases (resembling skin's stratum corneum) and exhibits pH-independent permeability. Moreover, due to its capacity to stimulate epithelial tissue regeneration, it enhances skin tissue repair. Generally, the fibrous and porous structure of ESM, resembling the ECM, and its protein content improve adhesion and proliferation of skin cells, thus accelerating the wound healing process (Aggrawal et al. 2022).

Recent studies have focused on enhancing the ESM properties through combination with other materials and intensifying its impact on wound healing. For instance, Lee et al. (Li et al. 2016) prepared a nanocomposite of the eggshell membrane with copper and bioactive glass to decrease the survival rate of E. coli bacteria from 20% to 10%. Additionally, they improved the adhesion and proliferation of human umbilical vein endothelial cells on nanocomposite samples. Silver nanoparticles (AgNPs) are another type of additives used to enhance the antibacterial properties of ESM, facilitating the transfer of antibiotics deep into the tissue (Li et al. 2019). In this study, silver nanoparticles improved the antibacterial properties of wound dressings by disrupting bacterial membranes and DNA. Furthermore, electrospun fibers of chitosan and polycaprolactone (PCL) on ESM increased the resistance of composite samples against E. coli and S. aureus bacteria compared to ESM (Guharay et al. 2018).

In addition to the antibacterial properties, the mechanical characteristics of ESM were also improved by combining it with other materials. Park et al. (Park et al. 2019) coated the surface of ESM with a layer of grapheme, which in turn improved its tensile strength. The uniform dispersion of graphene on the surface facilitated stress transmission and increased mechanical strength. Modifying ESM using acetic acid and citric acid (Choi et al. 2021) also improved membrane hydrophilicity and mechanical strength more than twice that of natural ESM. In another study, the electrospun nanofibers of ESM and polycaprolactone improved the antibacterial property of the membrane against E. coli bacteria and its mechanical strength (Bello et al. 2022).

SEP is widely used in electrospinning and surface modification of polymer scaffolds to improve their properties and accelerate wound healing (Sah et al. 2016). Electrospun SEP fibers exhibit high potential to be used as skin scaffolds; however, due to its brittle fibers, other biocompatible polymers are combined with SEP for electrospinning (Yi et al. 2004). Moreover, due to the ideal characteristics and protein-based structure of SEP, it has been widely used for modifying the surface of wound dressings to enhance cellular adhesion, cell response, and wound healing (Yi et al. 2004).

4. CONCLUSION

The eggshell membrane is a two-layered fibrous structure between the shell and egg white, possessing favorable characteristics such as a porous structure, biocompatibility, availability, and low cost. These features have made ESM a suitable material in various fields including, skin tissue engineering. ESM has been used in combination with other materials in wound dressing fabrication, yielding promising results and demonstrating considerable potential in wound healing enhancement. Application of this membrane also presents limitations. One of these limitations is the size of the membrane. The eggshell membrane size ranges from 40 to 50 cm^2, restricting its application in extensive injuries. Moreover, caution must be exercised in the clinical use of ESM-based dressings as some individuals are allergic to egg proteins, potentially triggering their immune system. Finally, according to the results of the studies, ESM as a natural biomaterial proves to have a high potential in wound healing and tissue engineering applications, and it is hoped that its utilization will be extended to other biological applications.

REFERENCES

1. Aggarwal, A., & Sah, M. K. (2022). Eggshell membrane in skin tissue engineering and wound healing. *In Natural Polymers in Wound Healing and Repair* (pp. 417-435). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90514-5.00007-9
2. Bello, M., Abdullah, F., Mahmood, W.M.A.W., Malek, N.A.N.N., Jemon, K., Siddiquee, S., Chee, T.Y. & Sathishkumar, P. (2022), Electrospun poly (Ɛ-caprolactone)-eggshell membrane nanofibrous mat as a potential wound dressing material, *Biochemical Engineering*, https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108563
3. Choi, H.J., Kim, Y.M., Suh, J.Y., & Han, J.Y. (2021), Beneficial effect on rapid skin wound healing through carboxylic acid-treated chicken eggshell membrane, *Materials Science and Engineering: C, 128*, 112350. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112350
4. Faghihi, F., Khoraminia, F., & Imani, R. (2019), Immune-Mediated Tissue Regeneration Driven by a Biomaterial Scaffold: An Innovative Regenerative Medicine Strategy, *Pathobiology Research*, 22(3), 159–172. http://mjms.modares.ac.ir/article-30-31312-en.html
5. Guha Ray, P., Pal, P., Srivas, P.K., Basak, P., Roy, S., & Dhara, S. (2018), Surface modification of eggshell membrane with electrospun chitosan/polycaprolactone nanofibers for enhanced dermal wound healing, *ACS Applied Bio Materials, 1(4)*, 985-998. https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00169
6. Li, J. Zhai, D., Lv, F., Yu, Q., Ma, H., Yin, J., Yi, Z., Liu, M., Chang, J. & Wu, C. (2016), Preparation of copper-containing bioactive glass/eggshell membrane nanocomposites for improving angiogenesis, antibacterial activity and wound
7. healing, *Acta Biomaterialia*, *36*, 254–266. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.011
8. Li, X., Cai, Z., Ahn, D.U., & Huang, X. (2019), Development of an antibacterial nanobiomaterial for wound-care based on the absorption of AgNPs on the eggshell membrane, *Colloids and*

Surfaces B: Biointerfaces, 183, 110449. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110449

9. Mescher, A.L. (2009), Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, McGraw-Hill Medical; 12th edition (August 28, 2009). https://www.researchgate.net/publication/259781206
10. Park, S. Choi, K.S., Lee, D., Kim, D., Lim, K.T., Lee, K.H., Seonwoo, H. & Kim, J. (2016), Eggshell membrane: Review and impact on engineering, *Biosystems Engineering, 151,* 446–463. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.10.014
11. Park, S., Kim, T., Gwon, Y., Kim, S., Kim, D., Park, H.H., Lim, K.T., Jeong, H.E., Kim, K. & Kim, J. (2019), Graphene-Layered eggshell membrane as a flexible and functional scaffold for enhanced proliferation and differentiation of stem cells, *ACS Applied Bio Materials, 2(10),* 4242-4248. https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00525
12. Sah, M.K., & Rath, S.N. (2016), Soluble eggshell membrane: a natural protein to improve the properties of biomaterials used for tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C, 67,* 807–821. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.005
13. Yi, F., Guo, Z.X., Zhang, L.X., Yu, J., & Li, Q. (2004), Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility, *Biomaterials, 25(19),* 4591–4599. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.052

فصلنامه مواد و فناوری‌های پیشرفته

Journal Homepage: www.jamt.ir

مقالهٔ مروری

مروری بر کاربرد غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در ساخت زخم پوش‌های مهندسی شده: ساختار، خواص و اصلاح

ندا نظری [۱]، رعنا ایمانی [۲*]، طهورا ابراهیمی نوذری [۳]

[۱] دانشجوی فوق لیسانس، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

[۲] استادیار، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر ، تهران، ایران

[۳] دانشجوی دکتری، دانشکده مهندسی پزشکی، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، تهران، ایران

تاریخچهٔ مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۱/۱۱/۱۸

بازنگری: ۱۴۰۲/۰۹/۰۸

پذیرش قطعی: ۱۴۰۲/۱۲/۲۰

کلیدواژه‌ها:

ترمیم زخم،

زخم‌پوش،

غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ، مهندسی بافت

چکیده پوست به‌عنوان بزرگ‌ترین عضو بدن، وظیفه حفاظت در برابر ریزاندامگان و تنظیم دمای بدن را برعهده دارد؛ به‌همین‌دلیل حفظ یکپارچگی و سلامت پوست از اهمیت بالایی برخوردار است. بااینکه در آسیب‌های محدود، این بافت قادر به ترمیم خود است، اما تحت شرایطی مانند سوختگی‌های شدید، آسیب‌های وسیع و عمیق و زخم‌های مزمن، پوست توانایی ترمیم کامل خود را از دست می‌دهد و به محصولاتی که به ترمیم زخم کمک می‌کنند، نیاز پیدا می‌کند. ساخت این‌گونه محصولات پوستی در حوزهٔ مهندسی بافت پوست قرار می‌گیرد و تحقیقات گسترده‌ای در زمینهٔ ساخت زخم‌پوش از مواد طبیعی و سنتزی با ویژگی‌های مختلف انجام شده است. یکی از این مواد، غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ (Eggshell membrane) است که با بافت لیفی- پروتئینی، بین لایهٔ داخلی پوستهٔ معدنی و سفیدهٔ تخم‌مرغ قرار دارد. این غشاء به‌دلیل ساختار متخلخل، زیست‌سازگاری، در دسترس بودن، نداشتن آلودگی، برخورداری از پروتئین‌های طبیعی و ترکیباتی همانند ماتریس خارج‌سلولی و هزینهٔ کم، توجه محققان را جلب کرده است. یکی از زمینه‌های کاربرد غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در پزشکی، ساخت زخم‌پوش و محصولات ترمیم زخم است که نتایج امیدوارکننده‌ای را از خود نشان داده است. در این مقاله، ابتدا به معرفی غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ به‌عنوان یک زیست‌مادهٔ طبیعی پرداخته و سپس کاربرد آن در حوزهٔ ترمیم زخم و روش‌های ساخت زخم‌پوش برپایهٔ این ترکیب طبیعی بررسی شده است.

https://doi.org/10.30501/JAMT.2024.376574.1264 https://www.jamt.ir/article_193275.html

۱-مقدمه

پوست یک ساختار سه‌لایه است که وظایف مهمی را برعهده دارد (Mescher et al. 2009; Nour et al. 2023; Nour et al. 2022). ازجمله مهم‌ترین وظایف آن، ایجاد سد حفاظتی در برابر عوامل بیماری‌زا و تنظیم دمای بدن از طریق عرق کردن و عروق فشردهٔ سطحی است. بنابراین حفظ یکپارچگی و سلامت پوست از اهمیت بالایی برخوردار است (Behyari et al. 2021; Nour et al. 2021; Mirzababaeiy et al. 2018).

زخم به معنای ایجاد شکاف و گسستگی در بافت پوست است که براساس عوامل مختلف طبقه‌بندی می‌شود (Naderi-Meshkin et al. 2018; Najafloo et al. 2020). در حالت معمول، پوست پس از آسیب، طی فرایند چهارمرحله‌ای: هموستاز، التهاب، مهاجرت و تکثیر سلول و بلوغ بافت به ترمیم خود می‌پردازد (Bowler et al. 2002; Lisovsky et al. 2015; Faghihi et al. 2019). اما گاهی عوامل مختلف مانند کمبود اکسیژن، عفونت، سن، استرس و دیابت می‌توانند ترمیم ناکارآمد زخم را باعث شوند (Dadashzadeh et al. 2020; Imani et al. 2019). دراین‌گونه موارد، پوست توانایی ترمیم کامل خود را از

*عهده دار مکاتبات: رعنا ایمانی

نشانی: ایران، تهران، دانشگاه صنعتی امیرکبیر، دانشکده مهندسی پزشکی. ۰۲۱۶۴۵۴۵۵۷۶

پیام نگار: r.imani@aut.ac.ir

دست می‌دهد و به محصولاتی نیاز دارد که به ترمیم زخم کمک کنند. در حوزهٔ مهندسی بافت پوست که بر طراحی و ساخت جایگزین پوستِ مصنوعی تمرکز دارد، ساخت این‌گونه محصولات پوستی انجام می شود تا باعث ترمیم سریع زخم شوند و از عفونت جلوگیری کنند (Guo et al. 2010; Nour et al. 2019).

از ویژگی‌های زخم‌پوش ایده‌آل می‌توان به ایجاد سد حفاظتی دربرابر تهاجم باکتریایی، تراوایی نسبت به آب و اکسیژن، عدم سمیت، خواص مکانیکی مناسب، کاربرد و تعویض آسان و مقرون‌به‌صرفه بودن آن اشاره کرد (Wagner et al. 2020; Hakam et al. 2016; Nour et al. 2016). زخم‌پوش‌ها را می‌توان براساس عوامل مختلف مانند: نحوهٔ تماس با زخم، فنّاوری به‌کاررفته جهت تولید و مدت‌زمان قرارگیری در محیط زخم طبقه‌بندی کرد (Moura et al. 2013; Hajian et al. 2017; Khorshidi et al. 2020).

برای تهیه زخم‌پوش ایده‌آل از مواد متفاوت طبیعی و سنتزی با پتانسیل‌های مختلف استفاده می‌شود (Faghihi et al. 2019). امروزه مواد طبیعی به‌دلیل زیست‌سازگاری و تخریب‌پذیری مناسب، حساسیت‌زایی کم و قابلیت یکپارچگی با انواع سلول‌ها و بافت‌ها، نقش مهمی را در فرایند ترمیم زخم ایفاء می‌کنند. تاکنون مواد طبیعی بسیاری جهت بهبود فرایند ترمیم زخم استفاده شده است (Faghihi et al. 2019). در جدول (۱) برخی از ترکیب‌های طبیعی مفید، همراه با تأثیر آنها در ترمیم زخم مشاهده می‌شود.

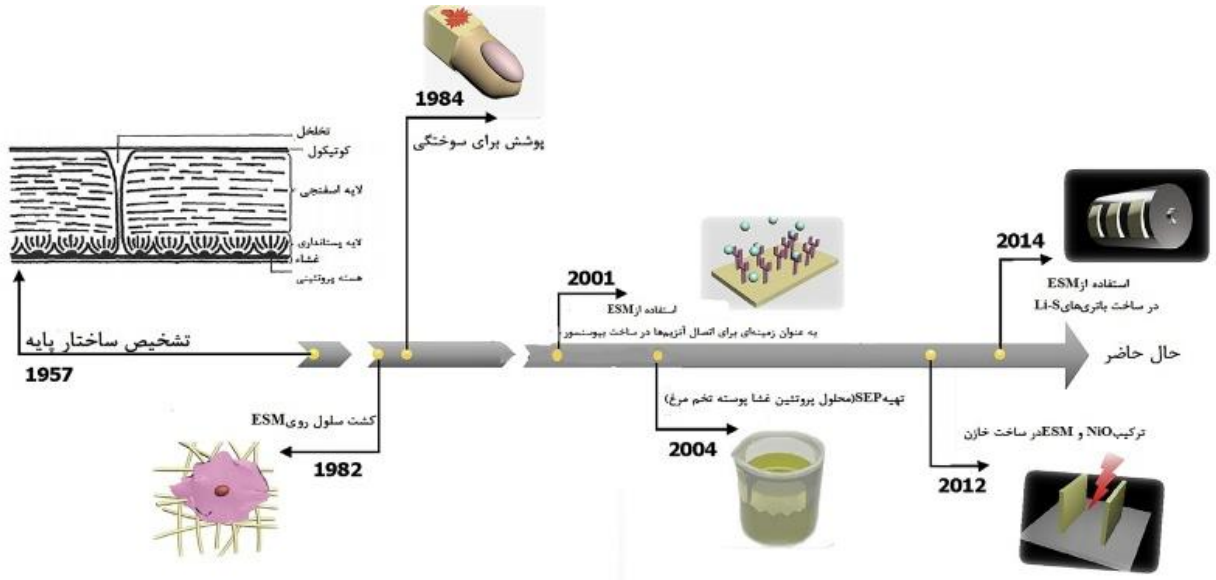
جدول ۱. برخی از ترکیب‌های طبیعی مؤثر در ترمیم زخم (Faghihi et al. 2019)

ماده طبیعی	ترکیب‌های زیست‌فعال موجود	تأثیر در فرایند ترمیم زخم
آلوئه‌ورا	پلی‌ساکارید، ویتامین، آنزیم، آمینواسید	کاهش درد و تورم زخم، افزایش تکثیر فیبروبلاست‌ها، تولید کلاژن نوع I
عسل	قندها، اسیدهای آلی، ترکیبات پلی‌فنول	افزایش تکثیر فیبروبلاست‌ها، افزایش رگ‌زایی و کلاژن‌زایی
آغوز[1]	عامل‌های رشد مانند: TGF[2]، FGF[3]، PDGF[4]، EGF[5]	تسریع بسته شدن زخم، افزایش رگ‌زایی، کلاژن‌زایی و تکثیر فیبروبلاست‌ها
سفیدهٔ تخم‌مرغ	اوالبومین[6]، کرونالبومین[7]، لیزوزیم[8]	خاصیت آنتی‌باکتریال، ضدالتهابی، تحریک رشد سلولی

یکی از موادی طبیعی که در تهیه زخم‌پوش مورد استفاده قرار می‌گیرد، غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ[9] (ESM) است. سالانه ۱۰[12] تخم‌مرغ در صنایع مختلف استفاده می‌شود که محصولات جانبی آن در سال‌های دور به‌عنوان زباله در نظر گرفته می‌شد؛ اما امروزه با مشخص شدن پتانسیل غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ، از آن در زمینه‌های مختلف مهندسی استفادهٔ می‌شود که در این راستا روش‌های مختلفی نیز برای استفادهٔ دوباره از این محصولات جانبی توسعه یافته‌اند (Park et al. 2016). درابتدا، از پوستهٔ تخم‌مرغ و غشاء آن با یکدیگر و بدون جداسازی، استفاده می‌کردند؛ اما با آشکار شدن ویژگی‌های منحصربه‌فرد ESM، از آن به‌تنهائی استفاده شد و توجه‌ها از پوستهٔ تخم‌مرغ به‌سمت غشاء آن جلب شد؛ به‌طوری‌که از آن در کشت سلولی و مهار آلودگی‌های آب با جذب فلزات سنگین استفاده شد (Park et al. 2016). با شناخت بیشترِ خواص مکانیکی و شیمیایی غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ و انجام اصلاحاتی روی آن، این غشاء در وسایلی مانند حسگرهای زیستی، خازن اکسید نیکل[10] (NiO)، باتری لیتیم-گوگرد[11] (Li-S) و سلول‌های خورشیدی نیز به‌کار گرفته شد (Park et al. 2016). تاریخچه‌ای از کاربرد غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در صنایع مختلف، در شکل (۱) نشان داده شده است. در این مقاله، به معرفی غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ به‌عنوان یک زیست‌مادهٔ طبیعی با پتانسیل بسیار عالی در حوزهٔ ترمیم زخم پرداخته شده است. بررسی مطالعات انجام‌شده در این زمینه

[1] Colostrum
[2] Transforming Growth Factor
[3] Fibroblast Growth Factor
[4] Platelet-Derived Growth Factor
[5] Epidermal Growth Factor
[6] Ovalbumin
[7] Conalbumin
[8] Lysozyme
[9] Eggshell Membrane
[10] Nickel Oxide Capacitor
[11] Lithium- Sulfur Battery

نشان می‌دهد که غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در ترکیب با مواد دیگر، جهت بهبود ویژگی‌های آن، نتایج مثبتی را در زمینهٔ ترمیم زخم به‌همراه داشته که آن را به یک گزینهٔ مناسب در تهیهٔ زخم‌پوش‌ها تبدیل کرده است (Park et al. 2016).



شکل ۱. تاریخچهٔ استفاده از غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در کاربردهای مختلف (Park et al. 2016)

۲- غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ (ESM)

در طب باستانی چین از غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ برای درمان زخم‌ها استفاده می‌شد. علاوه‌براین، ESM جزء مهمی از زخم‌پوش سنتی فونیکس[1] است که برای درمان سوختگی، زخم‌های فشاری، زخم بستر، زخم قرنیه و سوراخی پردهٔ صماخ گوش به‌کار می‌رود. در ژاپن، کشتی‌گیران سومو[2] هنوز از غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ به‌عنوان یک داروی طبیعی در آسیب‌های خود استفاده می‌کنند (Sah et al. 2016).

غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ، یک بافت لیفی- پروتئینی در بین پوستهٔ معدنی و سفیدهٔ تخم‌مرغ است که نقش اساسی در معدنی شدن پوستهٔ تخم‌مرغ دارد؛ اما از معدنی شدن سفیدهٔ تخم‌مرغ در داخل جلوگیری می‌کند (Balaz et al. 2014; Pillai et al. 2023). علاوه‌براین، به‌دلیل دارا بودن شبکهٔ لیفی همانند غشاء آمنیوتیک انسانی، از جنین مرغ در برابر تهاجم باکتری محافظت می‌کند. ساختار متخلخل، زیست‌سازگاری، دردسترس بودن، نداشتن آلودگی، دارا بودن پروتئین‌های طبیعی و گروه‌های عاملی روی سطح این ساختار، قابلیت اصلاح شدن و هزینهٔ کم آن، توجه محققان را به سمت استفاده از غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در زمینه‌های مختلف جلب کرده است (Sah et al. 2016).

همچنین غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ حاوی ترکیباتی شبیه ماتریس خارج‌سلولی[3] (ECM) است. ECM حمایت ساختاری را برای آرایش سلولی فراهم، از طریق برهم‌کنش سلول- ماتریکس، رفتار سلولی را مشخص و به‌همراه سلول، معماری و ویژگی‌های خاص بافت و عضو را تعیین می‌کند. بازسازی موفق بافت، با چسبندگی سلول به ماتریسِ خارج‌سلولی از طریق پروتئین‌های موردنظر که سیگنال‌دهی داخل سلولی را فراهم می‌کنند، همراه است. بنابراین ساختار متخلخل ESM که تداعی‌کنندهٔ ECM است، استفادهٔ زیادی در کاربردهای زیستی دارد (Sah et al. 2016).

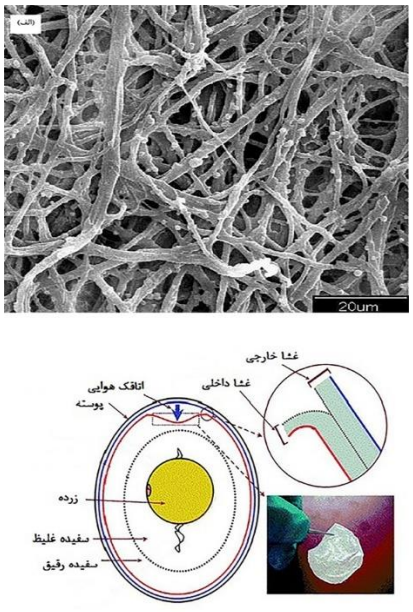
۲-۱- ویژگی‌های غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ

- **ساختار و ترکیبات تشکیل‌دهنده**

همان‌طور که در شکل (۲) مشاهده می‌شود، ESM یک ساختار لیفی‌شکلِ دولایه، متشکل از لایهٔ داخلی و خارجی با ضخامت کلی حدود ۷۰ میکرون است. لایهٔ داخلی ESM با

[1] Phoenix
[2] Sumo نوعی ورزش کشتی در ژاپن است.
[3] ExtraCellular Matrix

ضخامت کلی ۲۶-۱۵ میکرون، دارای الیافی با قطر ۳-۰/۱ میکرون و غیرکلسینه است. لایهٔ خارجی ESM، حاوی الیافی با قطر ۷-۱ میکرون دقیقاً زیر پوستهٔ تخم‌مرغ قرار دارد و در لایهٔ کلسیمی پوستهٔ تخم‌مرغ نفوذ کرده است. ضخامت لایهٔ خارجی غشاء نیز ۷۰-۵۰ میکرون است (Mogosanu et al. 2016). لایهٔ داخلی نسبت به لایهٔ خارجی به‌هم فشرده‌تر، چگال‌تر و نرم‌تر است. به‌طورکلی، الیاف غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در دو لایهٔ موازی با سطح تخم‌مرغ قرار دارند و تغییر در ترکیبات، سایز و جهت‌گیری الیاف، دو لایه را از یکدیگر متمایز می‌کند (Balaz et al. 2014). فضای بین فیبرهای دو لایه، سرشار از تخلخل است که تراوایی آب و گاز را فراهم می‌کند (Park et al. 2016).



(ب)

شکل ۲. (الف) تصویر SEM مربوط به ESM (ب) نمایی از ساختار دولایهٔ غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ (Mogosanu et al. 2016)

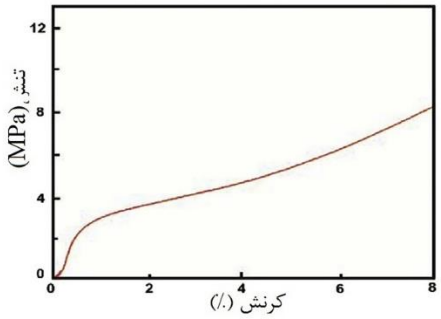
درحقیقت ESM یک داربست طبیعی نیمه‌تراوا، متشکل از شبکهٔ به‌هم‌بافته‌شدهٔ الیاف نازک در داخل و شبکهٔ الیاف ضخیم در خارج است. غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ حاوی ۸۵٪-۸۰ ماتریس آلی و ۲۰٪-۱۵ ماتریس معدنی است. در بخش آلی، ۱۰٪ کلاژن (نوع I، X و V) و حدود ۷۵٪-۷۰ اجزای دیگر شامل: کراتین، پروتئوگلیکان و گلیکوپروتئین‌ها (استئوپونتین و فیبرونکتین) وجود دارد (Balaz et al. 2014). هر رشته الیاف ESM از یک هستهٔ غنی کلاژنی تشکیل شده است که با پوشش گلیکوپروتئینی احاطه می‌شود (Balaz et al. 2014). اجزای تشکیل‌دهندهٔ ESM در جدول (۲) خلاصه شده است.

جدول ۲. اجزای تشکیل‌دهندهٔ غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ (Sah et al. 2016)

اجزای سازنده ESM		ترکیبات
آلی (۸۵٪-۸۰٪)	اولیه (۱۰٪)	کلاژن نوع I
		کلاژن نوع V
		کلاژن نوع X
	ثانویه (۷۵٪-۷۰%)	استئوپونتین
		فیبرونکتین
		گلیکوپروتئین‌های دیگر
		پروتئوگلیکان‌ها
		کراتین
معدنی (۲۰٪-۱۵٪)		کلسیم کربنات

- **ویژگی مکانیکی**

در شکل (۳)، نمودار تنش-کرنش مربوط به غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ نشان داده شده است. در برخی نقاط، رفتار غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ مشابه پلیمرهای طبیعی دیگر است که در نتیجهٔ رفتار آنتالپی و آنتروپی مولکول‌های سازنده‌اش، الاستیسیته غیرخطی از خود نشان می‌دهد. رفتار مکانیکی غشاء در کرنش‌های پایین ناشی از سازوکار آنتروپی تخریبِ مولکول‌های کلاژنِ موجود در ESM است. هنگامی‌که کرنش‌های بالاتر اعمال می‌شود، رفتار مکانیکی غشاء، مشابه شبکه‌های فیبری و جامدات سلولی می‌شود (Balaz et al. 2014).



شکل ۳. نمودار تنش کرنش مربوط به ESM (Balaz et al. 2014)

- **زیست‌سازگاری**

یکی دیگر از ویژگی‌های منحصربه‌فرد غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ، زیست‌سازگاری است. سمیت کم و زیست‌سازگاری ESM، آن را به یک مادهٔ مناسب تبدیل کرده است. ESM به‌دلیل محتوی پروتئینی و گلیکوپروتئینی بالا، در تماس با سلول، روی

رفتارهای سلولی مانند: چسبندگی، پهن شدن و تکثیر آن، آثار مثبتی می‌گذارد. بعد از تلاش توسلی[1] در سال ۱۹۸۳ برای استفاده از ESM در کشت سلولی، محققان بسیاری غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ را به‌عنوان یک زمینهٔ مناسب جهت کشت سلولی پیشنهاد دادند (Park et al. 2016).

در یک مطالعه مشاهده شد که سلول فیبروبلاست انسانی[2] (HDF) توانایی چسبیدن و پهن شدن روی لایهٔ PMBN[3] را ندارد؛ این درحالی‌است که با قرار گرفتن غشاء هیدرولیزشده[4] روی PMBN، سلول به‌خوبی می‌تواند روی سطح بچسبد، پهن شود و ریخت‌شناسی دوکی‌شکل به‌خود بگیرد (Ohta-Fujita et al. 2011).

همچنین کشت HDF روی داربست غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ- پلی‌کاپرولاکتون نشان داد که سلول‌ها نه‌تنها به‌راحتی به سطح نمونه‌ها می‌چسبند، بلکه ریخت‌شناسی دوکی‌شکل خود را حفظ می‌کنند و بعد از سه روز روی داربست، ریخت‌شناسی صفحه‌مانند پیدا می‌کنند که نشان‌دهندهٔ مهاجرت و تکثیر سلولی مناسب است (Guharay et al. 2018). همچنین در یک اختراع، تهیهٔ داربست غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ- پلی‌اتیلن‌گلیکول[5] (PEG)، باعث بهبود زنده‌مانی و تکثیر سلول‌های فیبروبلاستِ جنین موش (NIH_3T_3) شد (Kwnny et al. 2016).

۲-۲- جداسازی غشاء از پوستهٔ تخم‌مرغ

درصورتی‌که بخواهیم از ESM به‌تنهائی استفاده شود، لازم است تا از پوستهٔ تخم‌مرغ جدا شود. این جداسازی یک فرایند کلیدی در استفاده از غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ با کیفیتی مناسب و به‌عنوان یک زیست‌ماده در مقیاس صنعتی است. لایهٔ داخلی ESM به‌راحتی با دست جدا می‌شود، اما لایهٔ خارجی آن به پوستهٔ تخم‌مرغ چسبیده است و جداسازی آن نیازمند افزودن محلول‌های رقیق اسیدی نظیر استیک‌اسید، هیدروکلریک‌اسید یا اتیلن‌دی‌آمین تترااستیک‌اسید است. درواقع، افزودن اسید به پوستهٔ تخم‌مرغ به حل کردن کلسیم کربنات و ضعیف کردن اتصالات بین پوستهٔ سخت تخم‌مرغ و لایهٔ خارجی ESM کمک می‌کند و غشاء می‌تواند به‌صورت دستی خارج شود (Park et al. 2016). همچنین یک روش مکانیکی برای جداسازی ESM از پوستهٔ تخم‌مرغ مطرح شده است که به آن دمیدن هوای حل‌شده[6] (DAF) می‌گویند وقابلیت استخراج ۹۶٪ از ESM و ۹۹٪ از $CaCO_3$ موجود در پوستهٔ تخم‌مرغ را طی ۲ ساعت دارد (Pasarin et al. 2019). در این روش، پوستهٔ تخم‌مرغ در آب قرار داده شده و هوا با فشار وارد آب می‌شود. این کار باعث می‌شود که جزء سبک‌تر (غشاء)، شناور و جزء سنگین‌تر (پوستهٔ تخم‌مرغ)، ته‌نشین شود (Pasarin et al. 2019). همچنین در یک پژوهشِ اخیر، به جداسازی غشاء از پوستهٔ تخم‌مرغ با نرخ بازیابی ۹۵٪-۸۵٪ با استفاده از امواج فراصوت پرداخته شد. در این روش، تفاوت گرانشِ ویژهٔ[7] غشاء و پوستهٔ تخم‌مرغ به جداسازی غشاء کمک می‌کند (Han et al. 2023).

۲-۳- محلول‌سازی پروتئین غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ

غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ یک محصول طبیعی، سرشار از پروتئین و دارای ساختار و ویژگی‌های منحصربه‌فرد است؛ اما استفاده از آن به‌دلیل عدم انحلال‌پذیری و فرایندپذیری، محدود است. دلیل این انحلال‌ناپذیری، اتصالات عرضیِ داخلِ ساختاری آن در اثر تعداد فراوان پیوندهای دی‌سولفیدی است که کنترل شکل و اندازهٔ آن را سخت و کاربردش را محدود می‌کند. برای غلبه بر این محدودیت، فرم محلول آن با نام «محلول پروتئین غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ[8] (SEP)» در حلال‌های غیرسمیِ رایج تهیه می‌شود (Sah et al. 2016).

یکی از روش‌ها برای تهیه SEP به این صورت است که ابتدا باید ESM را در محلول آبی ۳- مرکاپتوپروپیونیک‌اسید[9] در حضور ۱۰٪ استیک‌اسید حل کرد و سپس این محلول را تا pH برابر ۵ به‌وسیله محلول آبی سدیم‌هیدروکسید، خنثی نمود. در طول فرایندِ انحلال با روش گفته‌شده، تورم غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ مشاهده نمی‌شود که این موضوع نشان‌دهندهٔ اتصال

[1] Tavassoli
[2] Human Dermal Fibroblast
[3] 2-Methacry-Loyloxyethyl Phosphorylcholine Polymer
[4] Asesm
[5] Polyethelene Glycol
[6] Dissolved Air Flotation
[7] Specific Gravity
[8] Soluble Eggshell Membrane Protein
[9] 3-Mercaptopropionic Acid

عرضی (کراس‌لینک) بالای ESM است. همچنین کاهش ضخامت غشاء در طول انحلال بیان می‌کند که انحلال از سطح غشاء شروع می‌شود؛ چراکه سطح غشاء در ارتباط نزدیک با ۳- مرکاپتوپروپیونیک‌اسید است که باعث شکسته شدن و کاهش پیوندهای دی‌سولفیدی می‌شود (Yi et al. 2004). روش دیگر، استفاده از عملیات شیمیایی است. برای‌این‌منظور، ESM را به‌مدت یک روز با پرفرمیک‌اسید در دمای ٤ یا ۲۵ درجهٔ سلسیوس اکسید می‌کنند و سپس پپسین را در دمای ۲۵ درجهٔ سلسیوس به آن اضافه می‌کنند. بعد از ۲ تا ۳ روز، محلول را در برابر آب جهت خالص‌سازی دیالیز کرده و درنهایت، روی آن خشکایش انجمادی انجام می‌دهند (Sah et al. 2016).

همان‌طور که اشاره شد، ESM شبکه‌ای از فیبرهای به‌هم بافته‌شده است. این الیاف بعد از انحلال، شکل خود را از دست می‌دهند و تارمانند می‌شوند که نشان می‌دهد کاهش پیوندهای دی‌سولفیدی با تخریب الیاف همراه است. با ادامه یافتن فرایند انحلال، غشاء به‌حدی ضعیف می‌شود که قابلیت خارج شدن از سوسپانسیون را ندارد و به قطعات کوچک‌تر تقسیم و به‌طور کامل حل می‌شود. سپس با فرایند فیلتر کردن، مقدار کم بقایای نامحلول آن حذف می‌شود. درنهایت، محصولی به‌دست می‌آید که توانایی انحلال در محیط‌های آبی با طیف گسترده‌ای از pH را دارد (Yi et al. 2004).

بنابراین به‌طورکلی، SEP می‌تواند کاربرد غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ را به‌عنوان یک مادهٔ طبیعی، بالا ببرد و پتانسیل مناسبی در مطالعات بالینی (به‌عنوان‌مثال زخم‌پوش و داربست‌های مهندسی بافت) دارد؛ اما نکتهٔ منفی در مورد SEP، کاهش فعالیت ضدباکتری آن نسبت به غشاء است؛ زیرا برخلاف غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ، SEP در مقابل باکتری‌هایی مانند اشریشیاکُلی (E.Coli)[1] فعالیت ضدباکتری از خود نشان نمی‌دهد (Park et al. 2016).

۳- غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در مهندسی بافت پوست

یکی از زمینه‌هایی که در مهندسی پزشکی از غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ استفاده می‌کنند، مهندسی بافت پوست است و در تحقیقات متعدد، ESM در ترمیم زخم‌های پوستی به‌کار رفته است.

کاربرد غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در مهندسی بافت پوست نشان می‌دهد که این غشاء به‌عنوان پوشش زیستی برای سوختگی و محل پیوند پوست مناسب می‌باشد؛ چراکه ESM هر دو مرحلهٔ لیپیدی و پروتئینی هیدراته (شبیه به لایهٔ شاخی پوست) و تراوایی مستقل از pH را دارد و مدل مناسبی برای پیوند پوستی و حمایت بافت می‌باشد. علاوه‌براین، ESM به‌دلیل اثر تحریک‌کنندگی در بازسازی بافت اپیتلیال و ارتقاء عامل‌های مشخصی که به بازسازی بافت کمک می‌کنند، بازسازی بافت پوست را بهبود می‌بخشد (Balassa et al. 1971).

بطورکلی، ساختار فیبری و متخلخل ESM که تداعی‌کنندهٔ ماتریس خارج‌سلولی است و نیز محتوی پروتئینی آن ازجمله کلاژن، که در ترمیم و بهبود زخم اهمیت فراوانی دارد، باعث بهبود چسبندگی و تکثیر سلول‌های پوستی و درنتیجه، تسریع فرایند ترمیم زخم می‌شود (Aggrawal et al. 2022).

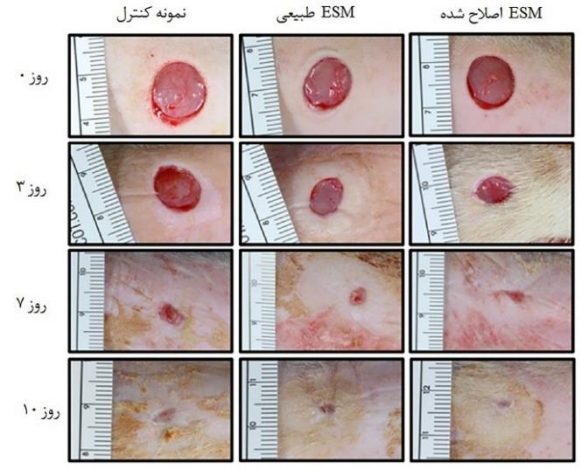
در یک مطالعه، از پوست تخم‌مرغ و پوست تخم‌مرغ به‌همراه غشاء آن برای ترمیم زخمِ ایجادشده در موش استفاده شد و به‌صورت گروه‌های جداگانه موردبررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که نمونه‌های پوستهٔ تخم‌مرغ به‌همراه غشاء آن تأثیر بسزایی در ترمیم زخم داشتند؛ اما شکنندگی و عدم انعطاف‌پذیری پوستهٔ تخم‌مرغ باعث شد که تصمیم به استفاده از غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ، به‌تنهائی گرفته شود (Balassa et al. 1971).

در مطالعهٔ انجام‌شده توسط چویی[2] و همکارانش (Choi et al. 2021) به مقایسه ESM طبیعی و غشاء اصلاح‌شده با استیک‌اسید و سیتریک‌اسید پرداخته شد. کشت سلول‌های فیبروبلاست (HDF) روی نمونه‌ها نشان داد چسبندگی سلولی روی غشاء اصلاح‌شده بهتر از غشاء طبیعی است. همچنین نتایج آزمون MTT نشان داد که تکثیر سلولی نیز روی نمونه‌های اصلاح‌شده بیشتر است. مطابق شکل (٤)، درصد و نرخ بسته شدن زخم در زخم‌های پوشیده‌شده با غشاء اصلاح‌شده به‌طور

[1] Escherichia coli

[2] Choi

قابل‌توجهی بالاتر از زخم‌های پوشیده‌شده با غشاء طبیعی و نمونهٔ کنترل (زخم بدون پوشش) است.



شکل ٤. فرایند ترمیم زخم در زخم‌های پوشیده‌شده با غشاء اصلاح‌شده، غشاء طبیعی و نمونهٔ کنترل در طول ۱۰ روز بعد از جراحی (Choi et al. 2021)

در تحقیق انجام‌شده توسط فرناندو[1] و همکاران (Guarderas et al. 2016)، پتانسیل غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در ترمیم زخم ایجادشده در موش بررسی شد. مطابق شکل (۵)، ترمیم در زخم‌های پوشیده‌شده با ESM به‌طور مشخصی با نرخ بالاتر نسبت به نمونهٔ کنترل (زخم‌هایی که با ESM پوشیده نشده‌اند) رخ می‌دهد و زخم‌های اصلاح‌شده، ۲۱٪ سریع‌تر از زخم‌های کنترل، بهبود می‌یابند. درحقیقت، غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ یک داربست مناسب برای مهاجرت فیبروبلاست‌ها ایجاد می‌کند که باعث تسریع ترمیم زخم می‌شود. به‌علاوه، حضور کلاژن در ساختار ESM نیز در فرایند ترمیم زخم تأثیر به‌سزایی دارد. باتوجه‌به پتانسیلی که ESM در ترمیم زخم از خود نشان می‌دهد، می‌توان از آن در ساخت باندها یا در محلهای اهداکنندهٔ پیوند پوستی استفاده کرد.

شکل ۵. ترمیم در (الف) زخم پوشیده‌شده با ESM و (ب) زخم بدون پوشش، در طی ۱۲ روز (Guarderas et al. 2016)

بطورکلی مطالعات انجام‌شده در کاربرد غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ به‌تنهائی (بدون ترکیب با مواد دیگر) در ترمیم زخم، محدود است و مطالعات اخیر به سمت بهبود ویژگی‌های ESM از طریق ترکیب با مواد دیگر و تأثیر بهتر روی ترمیم زخم جهت‌گیری کرده‌اند که درادامه به‌تفضیل به آنها می‌پردازیم.

٤- بهبود ویژگی‌های غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ

٤-١- بهبود خاصیت ضدباکتری

همان‌طور که در قبل گفته شد، پوست اولین سد دفاعی بدن در برابر ریزاندامگان و تهاجم باکتریایی است. با از دست رفتن یکپارچگی پوست، باکتری‌ها و عوامل بیماری‌زا به‌راحتی می‌توانند به بستر زخم نفوذ کنند و با فعال کردن زنجیره‌ای از اتفاقات زیستی، باعث عفونت زخم شوند و زخم را وارد مرحلهٔ مزمن کنند که ترمیم زخم را به مدت ۸ تا ۱۲ هفته مختل کرده و فرایند بهبود زخم را طولانی‌تر می‌کنند. بنابراین زخم‌پوش‌ها باید پتانسیل مقابله با ریزاندامگان را داشته باشند. به‌همین‌منظور در ساخت زخم‌پوش‌ها یا از بارگذاری زیست‌مولکول‌ها و داروهای ضدباکتری استفاده می‌کنند و یا موادی را در ساخت زخم‌پوش به‌کار می‌برند که به‌ذات خاصیت ضدباکتری و توانایی مقابله با باکتری‌ها را دارند (Sarheed et al. 2016).

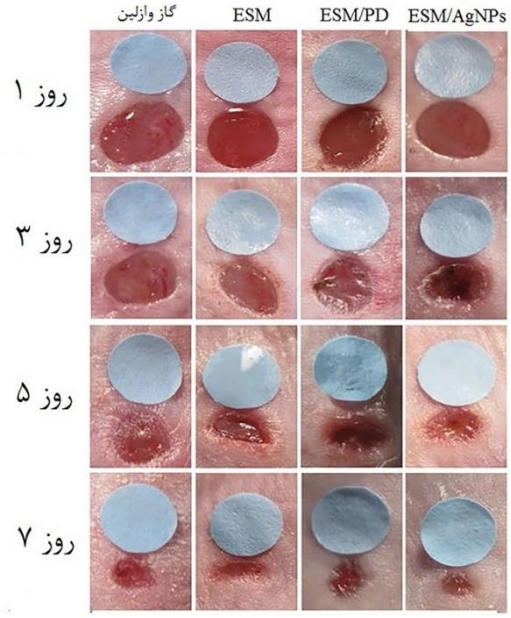
در تحقیق انجام‌شده توسط لی[2] و همکارانش (Li et al. 2016) پتانسیل نانوکامپوزیت پوستهٔ غشاء تخم‌مرغ، مس[3] (Cu) و شیشهٔ زیست‌فعال[4] (BG) در بهبود رگ‌زایی، خاصیت ضدباکتری و ترمیم زخم بررسی شد. مس یکی از موادی است که علاوه‌بر دارا بودن خاصیت ضدباکتری می‌تواند با ایجاد شرایط کم‌اکسیژنی، باعث تولید عامل‌های HIF-1α[5] و VEGF[6] و درنتیجه بهبود رگ‌زایی شود. BG نیز به‌دلیل داشتن فعالیت زیستی مناسب، در نانوکامپوزیت استفاده شد. در این تحقیق باتوجه‌به خواص Cu، BG، ESM تصمیم به ساخت نانوفیلمی از این مواد گرفته شد. فرمول متناظر با هر نمونهٔ به‌دست‌آمده، باتوجه‌به میزان مول مس مصرف‌شده در آن، به‌صورت xCu-BG/ESM بود. نتایج بررسی فعالیت ضدباکتری نمونه‌ها که از طریق شمارش تعداد کولنی باکتری‌ها پس از انکوبه‌کردن فیلم‌ها در سوسپانسیون باکتری E.coli به‌دست آمد، نشان داد که

[1] Fernando
[2] Li
[3] Copper
[4] Bioactive Glass
[5] hypoxia Inducible Factor-1α
[6] Vascular Endothelial Growth Factor

استفاده از ESM به‌تنهائی، زنده‌مانی باکتری‌ها را تا ۸۰٪ کاهش داد که بعد از پوشش با 5Cu-BG/ESM، این مقدار به ۹۰٪ رسید و هرچه میزان Cu به‌کاررفته‌شده بیشتر شد، خاصیت ضدباکتری فیلم نیز بیشتر شد. ارزیابی چسبندگی و تکثیر سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان[1] (HUVEC) روی نمونه‌ها نشان‌دهندهٔ چسبندگی و تکثیر بهتر سلول‌ها روی فیلم xCu-BG/ESM نسبت به ESM بود. همچنین میزان ترشح دو عامل VEGF و HIF-1α به‌وسیلهٔ سلول‌های HUVEC با افزایش میزان Cu، افزایش یافت. برای مطالعات درون‌تنی از موش‌های ماده استفاده شد. در این مطالعه نشان داده شد که بسته شدن زخم در زخم پوشانده‌شده با 5Cu-BG/ESM با سرعت بیشتری نسبت به ESM یا 0Cu-BG/ESM اتفاق افتاد (زخم‌های بدون هیچ درمانی به‌عنوان نمونهٔ کنترل در نظر گرفته شدند). نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوفلوروسنس و هیستوشیمی نشان داد که رگ‌زایی در گروه 5Cu-BG/ESM با سرعت بالاتر انجام شده است و اپی‌درم جدید ایجادشده در زخم‌های پوشیده‌شده با این گروه، یکنواخت‌تر و پیوسته‌ترند (Asato et al. 1971).

مادهٔ دیگری که در مطالعات برای بهبود خاصیت ضدباکتری در ترکیب با ESM استفاده شد، نانوذرات نقره[2] (AgNPs) بود که روی انتقال پادزیست‌ها به عمق بافت تأثیر گذاشت (Li et al. 2019). درمیان نانوذرات فلزی، نانوذرات نقره بهترین ضدباکتری‌اند و نیز باعث رگ‌زایی بهتر می‌شوند. بررسی فعالیت ضدباکتری در تحقیق انجام‌شده توسط لی[3] و همکارانش نشان داد که چگالی نوری (OD)[4] مربوط به کامپوزیت‌ها نسبت به ESM کمتر بود که به معنای زنده‌مانی کمتر باکتری‌ها در نمونه‌های کامپوزیتی و خاصیت ضدباکتری بیشتر آنهاست؛ چرا که نانوذرات نقره توانسته‌اند غشاء و DNA باکتری را تخریب و آن را از بین ببرند.

تحقیق دیگری که در زمینهٔ استفاده از نانوذرات نقره به همراه ESM انجام شد، مربوط به لیو[5] و همکارانش بود (Liu et al. 2017). در این پژوهش با الهام از چسبندگی صدف دریایی، از پلیمراسیون دوپامین[6] (DA) در شرایط قلیایی و ایجاد پلی‌دوپامین[7] (PD)، برای جلوگیری از به‌هم چسبیدن نانوذرات نقره و کنترل غلظت آنها روی ESM استفاده شد. نتایج MTT روی سلول‌های فیبروبلاست موش، زنده‌مانی بهتر آنها را در ESM/AgNPs نسبت به غشاء نشان داد. همچنین نتایج به‌دست‌آمده از آزمون سوسپانسیون باکتری نشان داد که زنده‌مانی باکتری‌ها در نمونه‌های ESM/AgNPs از گروه‌های دیگر، به‌طور مشخصی کمتر بود که بیانگر فعالیت ضدباکتری بهتر در مقابل E.coli و استافیلوکوک اورئوس (S.aureus)[8] است. برای ارزیابی تأثیر ESM/AgNPs در ترمیم زخم از مدل موش استفاده شد و زخم‌های ایجادشده مطابق شکل (٦)، با گاز وازلین، ESM، ESM/PD و ESM/AgNPs پوشانده شد. رنگ‌آمیزی هماتوکسلین و ائوزین[9] (H&E) نشان داد سرعت ترمیم زخم در گروه ESM/AgNPs در مقایسه با گاز وازلین، ESM و ESM/PD بیشتر بود و تشکیل بافت گرانوله را نیز بهبود داد.



شکل ٦. نرخ ترمیم زخم در گاز وازلین، ESM، ESM/PD و ESM/AgNPs در طی ۷ روز (Liu et al. 2017)

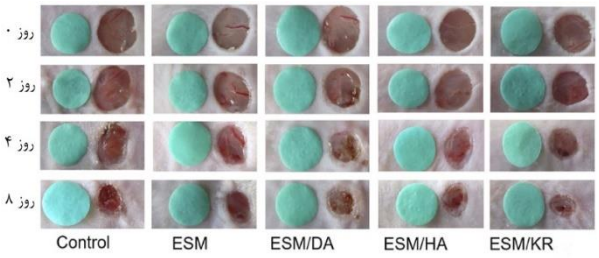
در یک مطالعهٔ دیگر توسط لیو و همکارانش، از نقره در ترکیب با ESM به‌صورت ساختار نانوکامپوزیتی استفاده شد (Liu et al. 2017). برای ساخت آن، ابتدا پس از جداسازی و شستشوی قطعات ESM، آنها را در محلول هیالورونیک‌اسید به‌مدت ۱ تا ٤ روز قرار دادند. سپس به‌مدت ٦ تا ۲۰ ساعت در

[1] Human Umbilical Vein Endothelial Cells
[2] Silver Nanoparticles
[3] Li
[4] Optical Density
[5] Liu
[6] Dopamine
[7] Polydopamine
[8] Staphylococcus Aureus
[9] Hematoxylin and Eosin

محلول دوپامین شستشو و درنهایت در محلول نیترات نقره قرار دادند. کامپوزیت تهیه‌شده خاصیت ضدباکتری داشت و توانست بدون ایجاد سمیت (ناشی از غلظت بالای نقره)، زخمی که هر سه لایهٔ پوست را درگیر کرده بود، بازسازی کند و بهبود دهد. علاوه‌براین، روش ساخت ساده و مقرون‌به‌صرفه‌ای نیز داشت.

یکی دیگر از راه‌های جلوگیری از عفونت باکتریایی استفاده از پپتیدهای ضدمیکروبی[1] (AMPs) است که توجه زیادی را به‌عنوان عامل ضدباکتری به خود جلب کرده‌اند؛ چراکه با پیوند الکترواستاتیک بین آمینواسیدها با بارهای مثبت و منفی سطح باکتری، غشاء باکتری را از بین می‌برند. یکی از این پپتیدها که در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و منفی، خاصیت ضدباکتری از خود نشان می‌دهد، KR-12 است. علاوه‌براین، گزارش شده است که این پپتید میزان التهاب را کنترل و فرایند اپیتلیالیزاسیون را از طریق بهبود تکثیر و مهاجرت کراتینوسایت، افزایش می‌دهد و گزینهٔ مناسبی در کاربرد زخم‌پوش است (Liu et al. 2019).

در تحقیق انجام‌شده توسط لیو[2] (Liu et al. 2019)، ابتدا سطح غشاء به‌وسیله پلی‌دوپامین (ESM/DA) اصلاح شد و سپس با هیالورونیک‌اسید[3] (ESM/HA) و پپتید KR-12 (ESM/KR-12) پوشش داده شد. بررسی‌های فعالیت ضدباکتری نشان داد که ESM/DA، ESM/HA و ESM/KR در مقایسه با ESM فعالیت ضدباکتری بیشتری داشتند و میزان زنده‌مانی باکتری‌ها روی ESM/KR کمتر از ۳٪ و مساحت پوشانده‌شده با باکتری روی آنها کمتر از گروه‌های دیگر بود. نتایج به‌دست‌آمده از کشت سلول‌های اندوتلیال بند ناف انسان (HUVECs) و کراتینوسایت[4] (HaCaT)، نشان‌دهندهٔ زنده‌مانی بیشتر و چسبندگی بهتر سلول‌ها روی گروه‌های ESM/KR و ESM/HA بود. این دو گروه، میزان ترشح VEGF را نیز افزایش دادند که تکثیر HUVECs و رگ‌زایی را بهبود بخشید. این پدیده ممکن است به‌دلیل اتصال HA به گیرنده CD44 روی سطح اندوتلیال باشد. در مطالعات درون‌تنی این تحقیق، زخم موش‌ها با چهار گروه ESM، ESM/DA، ESM/HA و ESM/KR پوشیده شد و زخم‌های پوشیده‌شده با گاز، به‌عنوان نمونهٔ کنترل در نظر گرفته شدند. مطابق شکل (۷)، ESM/KR ترمیم زخم را بهبود بخشید، پاسخ‌های التهابی را در مقایسه با گروه‌های دیگر کاهش و سرعت بسته شدن زخم را افزایش داد.



شکل ۷. نرخ ترمیم زخم در نمونهٔ کنترل، ESM، ESM/DA، ESM/HA و ESM/KR در ۰، ۲، ٤ و ۸ روز پس از جراحی (Liu et al. 2019)

در اختراع ثبت‌شده توسط رابرت[5] و همکارانش (Blaine et al. 2013)، جزء ضدباکتریایی که در ترکیب با ESM در تهیهٔ ژل استفاده شد، بنزالکنیوم‌کلراید[6] بود. هیالورونیک‌اسید نیز در این محصول به‌عنوان عامل بهبوددهندهٔ رشدِ بافت به‌کار رفت. وقتی این ژل روی زخم قرار گرفت، مانند یک سد محافظتی، عوامل لازم را برای ترمیم زخم حفظ کرد و مانع از مهاجرت باکتری‌ها از خارج به داخل زخم شد. استفاده از این ژل در ٥٤ بیمار با زخم دیابتی (با شدت کم) موردبررسی قرار گرفت و پس از سه هفته، اندازهٔ ۲٦ زخم بیش از ۵۰٪ و ۲۳ زخم بیش از ۱۰٪ کاهش یافت و در اندازهٔ ۵ زخم تغییر محسوسی مشاهده نشد. این نتایج نشان داد که این ژل در افزایش ترمیم زخمِ دیابتی با شدت کم، کاملاً ایمن و مؤثر است.

در تحقیق انجام‌شده توسط لی و همکارانش از کیتوسان[7] (CS) که یک مادهٔ ضدباکتری است، در ترکیب با غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ برای بهبود ویژگی‌های غشاء استفاده شد (Li et al. 2019). فیلم CS/ESM، با حل کردن پودر ESM در محلول کیتوسان و سپس افزودن گلیسرول[8] (G) جهت تهیهٔ محلول هموژن، ساخته شد. ارزیابی توانایی ترمیم زخم با بررسی pH میکرومحیطی، توانایی جذب ترشحات زخم و آلبومین سرم گاوی[9] (BSA) انجام شد. بررسی pH نشان داد که فیلم‌های ترکیبی دارای pH اسیدی (بین ۵/۸٦ تا ٦/۵۲) بودند که به pH

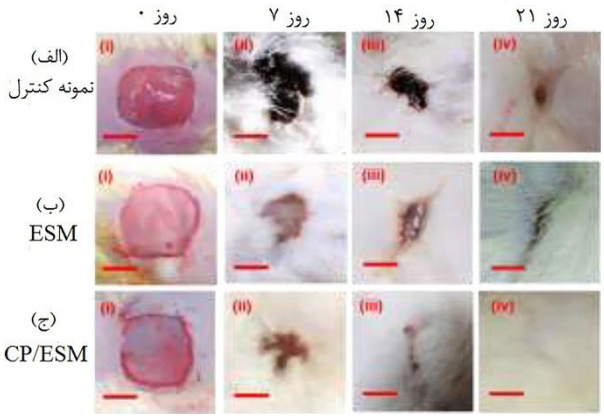
[1] Antimicrobial Peptides
[2] Liu
[3] Hyaluronic Acid
[4] Cultured Human Keratinocyte Cells
[5] Robert
[6] Benzalkonium Chloride
[7] Chitosan
[8] Glycerol
[9] Bovine Serum Albumin

پوست سالم نزدیک بود و توانستند عفونت باکتریایی را کاهش دهند. بررسی توانایی جذب ترشحات زخم با استفاده از ترشحات زخم شبیه‌سازی‌شده[1] (SWF) انجام شد و نشان داد که فیلم‌های ترکیبی در مقایسه با فیلم CS، میزان جذب کمتری داشتند که به‌دلیل آب‌گریزی پودر ESM است؛ اما افزودن گلیسرول باعث افزایش جذب ترشحات زخم شد؛ چراکه دارای گروه‌های آزاد OH است. علاوه‌براین، بررسی میزان جذب BSA نشان داد که فیلم‌های ترکیبی در مقایسه با کیتوسان، BSA بیشتری را جذب کردند که در بهبود ترمیم زخم مؤثر بودند.

در مطالعهٔ انجام‌شده توسط گوها[2] و همکارانش (Guharay et al. 2018) علاوه‌بر کیتوسان از پلی‌کاپرولاکتون[3] (PCL) الکتروریسی‌شده روی ESM و تهیهٔ یک ماتریس کامپوزیتی استفاده شد. پلی‌کاپرولاکتون یک پلی‌استر تخریب‌پذیر، غیرسمی با خواص مکانیکی مناسب است و به‌طور فراوان در آزمایشات درون‌تنی و برون‌تنی استفاده می‌شود.

بررسی فعالیت ضدباکتری نشان داد که مقاومت نمونه‌های کامپوزیتی در مقابل باکتری‌های E.Coli و S.Aures نسبت به غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ افزایش یافت. همچنین نتایج آزمون MTT پس از کشت سلول‌های HDF روی نمونه‌ها نشان داد که میزان زنده‌مانی سلول‌ها در مجاورت نمونه‌های کامپوزیتی نسبت به ESM بیشتر بود.

برای ارزیابی درون‌تنی از موش نر استفاده شد. مطابق شکل (۸) نرخ بسته شدن زخم در نمونه‌های کامپوزیتی به‌طور قابل‌توجهی از نمونه ESM و نمونهٔ کنترل (زخم بدون پوشش) بالاتر بود. علاوه‌براین، رطوبت کافیِ سطح زخمِ پوشیده‌شده با CP-ESM، مانع از تشکیل بافت اسکار شد. نتایج رنگ‌آمیزی ایمونوفلوئورسانس نیز نشان داد که رگ‌زایی در زخم‌های پوشیده‌شده با CP-ESM در مقایسه با زخم‌های پوشیده‌شده با ESM سریع‌تر رخ داد و باعث افزایش فرایند بازسازی بافت شد.



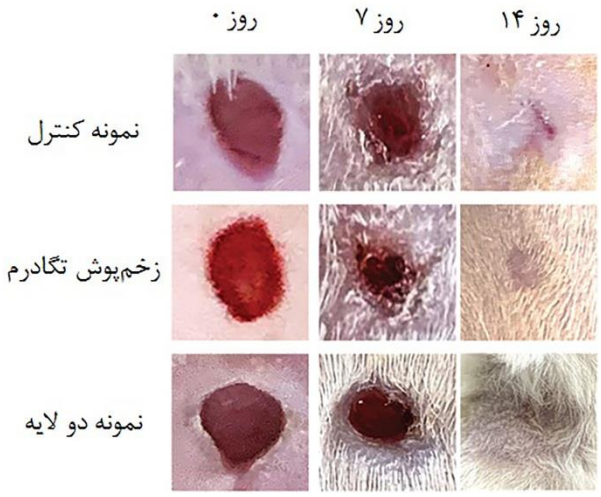
شکل ۸. بازده ترمیم زخم مربوط به (الف) نمونه کنترل (ب)ESM (ج) CP-ESM در طول ۰، ۷ و ۲۱ روز بعد از جراحی (Guharay et al. 2018)

کیتوسان (CS) به‌دلیل خاصیت ضدباکتری خود، در اختراع ثبت‌شده توسط محققان چینی، در ساخت زخم‌پوش نیز مورد استفاده قرار گرفت (Zhang et al. 2020). این زخم‌پوش از سه لایهٔ آب‌گریز، آبدوست و لایهٔ محافظتی تهیه شد. لایهٔ آب‌گریز از فیلم متخلخل PCL/CS بارگذاری‌شده با میکروکره‌ها، لایهٔ آبدوست از هیالورونیک‌اسید و لایهٔ محافظتی از ESM و پلی‌یورتان اصلاح‌شده با کربوکسی‌متیل‌سلولز تهیه شد. برای میکروکره‌ها نیز از سدیم آلژینات، عامل رشد اپیدرم و کیتوسان استفاده شد. همچنین روی سطح ESM، فیلم پلی‌دوپامین قرار گرفت که علاوه‌براین که توانست با غشاء، پیوند کوالانسی برقرار کند، از طریق پیوند شیفت- باز به عامل‌های رشد متصل شد. این پوشش توانست ترشحات زخم را جذب کند و مانع از تجمع آنها شود، رطوبت لازم برای ترمیم زخم را حفظ کند و چسبندگی شدید به پوست ایجاد نکند که در هنگام تعویض، باعث آسیب ثانویه شود. لایهٔ محافظتی، خواص مکانیکی مناسبی داشت و به‌دلیل خاصیت ضدباکتری بالای خود، از عفونت باکتریایی جلوگیری کرد. همچنین میکروذراتِ حاوی عامل رشد و عصاره‌های درمانی و سنتی چینیِ قرارگرفته روی لایهٔ آب‌گریز، توانست از خون‌ریزی جلوگیری کند و درد و تورم زخم را کاهش دهد.

در بررسی دیگر، ساها[4] و همکارانش (Patkar et al. 2021)، یک ساختار دولایه که لایهٔ بالایی، فیلم ژلاتین-کیتوسان و لایهٔ زیرین، کرایوژل[5] ژلاتین-کیتوسانِ

[1] Simulated Wound Fluid
[2] Guha
[3] Polycaprolactone
[4] Saha
[5] Cryogel

کراس‌لینک‌شده با پودر ESM بود، تهیه کردند. حضور کیتوسان در ساختار تهیه‌شده، باعث بهبود خاصیت ضدباکتری نمونه‌ها شد. کشت سلول‌های فیبروبلاست‌درم انسان روی نمونهٔ تهیه‌شده، بیانگر زنده‌مانی مناسب سلول‌ها بود. علاوه‌براین، استفاده از تصاویر هم‌کانون[1]، نفوذ سلول‌ها به داخل ساختار متخلخل کرایوژل را نشان داد. درنهایت، مطابق شکل (۹) بررسی درون‌تنی نشان داد که سرعت ترمیم زخم در زخم‌های پوشیده‌شده با ساختارِ دولایهٔ تهیه‌شده، مشابه زخم‌های پوشیده‌شده با زخم‌پوش تجاری تگادرم[2] و به‌طور قابل‌توجهی بیشتر از سرعت ترمیم در زخم‌های پوشیده‌شده با گاز استریل (نمونهٔ کنترل) بود.



شکل ۹. بازده ترمیم زخم مربوط به نمونهٔ کنترل، زخم‌پوش تگادرم و نمونهٔ دولایهٔ تهیه‌شده در طی ۱۴ روز (Patkar et al. 2021)

۴-۲- بهبود خاصیت مکانیکی

خاصیت مکانیکی از پارامترهای مهم در زخم‌پوش‌هاست. باتوجه‌به بافت ازدست‌رفته در زخم، زخم‌پوش باید توانایی حمایت مکانیکی مناسبِ بستر زخم را داشته باشد. مهم‌ترین عاملی که باید در ویژگی‌های مکانیکی زخم‌پوش در نظر گرفته شود، الاستیسیته و انعطاف‌پذیری آن است. از آنجایی که پوست یک بافت ارتجاعی و انعطاف‌پذیر است، جایگزین پوستی‌ای که به ترمیم زخم کمک می‌کند هم، نباید بسیار سفت و محکم باشد؛ بلکه باید درجات مناسبی از الاستیسیته را داشته باشد تا به‌راحتی روی پوست قرار گیرد و مانع از انجام فعالیت‌های روزمرهٔ بیمار نشود (Park et al. 2019).

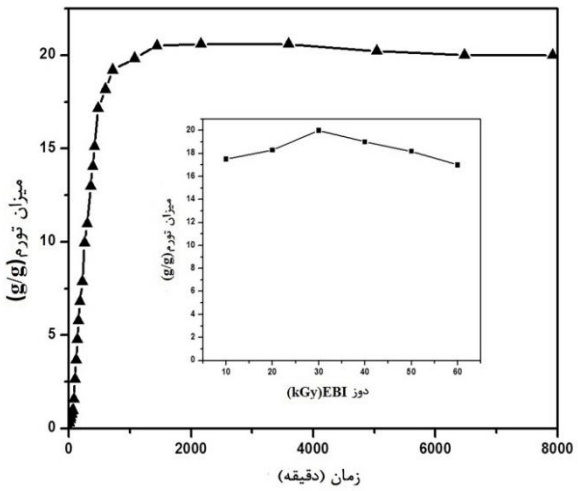
در تحقیق انجام‌شده توسط پارک[3] و همکارانش (Park et al. 2019)، ماده‌ای که برای بهبود خاصیت مکانیکی غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ استفاده شد، گرافن بود. گرافن یک لایهٔ نازک برپایهٔ کربن است که خواص منحصربه‌فردی مانند خواص مکانیکی خوب، سطح تماس بالا و گروه‌های شیمیایی مختلف را داراست. علاوه‌براین، گرافن در دوز متوسط با سلول‌ها سازگار است و سعی شده است که با استفاده از پوشش گرافن روی غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ، در عین حفظ ویژگی‌های مناسب آن، آبدوستی و خواص مکانیکی زخم‌پوش، بهبود یابد. در این مطالعه، سطح ESM با استفاده از یک لایه‌نشان دورانی[4]، با لایه‌ای از گرافن پوشانده شد و گروه‌های عاملیِ سطحِ ESM مانند آمین و کربوکسیل، با گروه هیدروکسیل و کربوکسیل محلول گرافن‌اکسید واکنش دادند و داربست گرافن-غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ[5] (GEM) را ساختند. آزمونهای مکانیکی انجام‌شده روی نمونه‌ها نشان داد که استحکام کششی و کرنش در داربست GEM از ESM بالاتر بود؛ اما رابطهٔ مستقیمی بین غلظت گرافن و استحکام کششی نمونه‌ها وجود نداشت. پراکندگی یکنواخت گرافن با دوز متوسط روی سطح موادِ دیگر توانست انتقال تنش مؤثر را فراهم آورد و باعث افزایش استحکام مکانیکی شود. همچنین آزمون زاویهٔ تماس با آب نشان داد که داربست‌های GEM در مقایسه با ESM، آبدوستی بهتری دارند. درحقیقت گروه هیدروکسیل گرافن باعث بهبود آبدوستی می‌شود و با افزایش غلظت گرافن در داربست، زاویه تماس با آب کاهش می‌یابد. بطورکلی، داربست‌های GEM با بهبود آبدوستی و خواص مکانیکی ESM، آن را به یک زمینهٔ کارآمد در کاربرد مهندسی بافت تبدیل می‌کند.

در یک تحقیق دیگر، بریگز[6] و همکارانش به تهیهٔ داربست غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ-پلی‌ایزوپروپیل اکریل آمید[7] (PNIPAAm) حاوی نانوذرات نقره پرداختند (Briggs et al. 2022). این نوع اصلاحِ انجام‌شده، علاوه‌بر بهبود استحکام کششی ESM، توانایی رهایش نانوذرات را باتوجه‌به حساسیت

[1] Cofocal Images
[2] Tegaderm
[3] Park
[4] Spin Coater
[5] Graphene- Eggshell Membrane
[6] Briggs
[7] Poly(N-isopropylacrylamide)

دمایی PNIPAAm داشت. همچنین کشت سلول‌های HDF روی نمونهٔ تهیه‌شده، بیانگر زیست‌سازگاری این داربست بود.

جاون[1] و همکاران در مطالعهٔ خود (Choi et al. 2017)، به بهبود خواص مکانیکی غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ با استفاده از پلی‌وینیل‌الکل[2] (PVA) پرداختند. PVA خواص مکانیکی خوب و زیست‌سازگاری مناسب دارد و به‌طور گسترده برای بهبود خواص مکانیکی پلیمرهای طبیعی بدون تغییر زیست‌سازگاری آنها استفاده می‌شود. در این پژوهش، برای ساخت داربست هیدروژلی، از روش تابش بیم الکترونی[3] (EBI) استفاده شد. مزیت این روش این است که اتصالات عرضی و استریل شدن به‌طور هم‌زمان رخ می‌دهد. همچنین در تهیهٔ این هیدروژل از پلی‌اتیلن‌ایمین[4] (PEI) نیز استفاده شد که نه‌تنها میزان ژل شدن را افزایش داد، بلکه سرعت فرایند ژل شدن را نیز بهبود داد. پایداری حرارتی هیدروژل با روش TGA بررسی شد و نشان داد که پایداری هیدروژل تهیه‌شده نسبت به ESM بالاتر بود. این افزایشِ پایداری حرارتی به‌دلیل برهم‌کنش مناسب ESM و PVA که در جهت‌گیری زنجیره‌های بسپاری اثر داشت، اتفاق افتاد. هیدروژل بدست‌آمده، درابتدا ظرفیت جذب آب بسیار بالایی داشت؛ اما بعد از حدود ۲۵۰۰ دقیقه، درجهٔ تورم کاهش یافت. همچنین تأثیر دوز EBI روی درجهٔ تورم نیز بررسی شد و مطابق شکل (۱۰)، بیشترین میزان تورم در هیدروژل‌هایی اتفاق افتاد که با دوز 30KGy ساخته شده بودند. این قابلیت تورم بالا، در جذب ترشحات زخم مطلوب است. ویژگی‌های گفته‌شده برای این هیدروژل، آن را برای کاربردهای زیستی ازجمله زخم‌پوش، حامل دارویی، داربست بافتی و ... مناسب کرده است.



شکل ۱۰. نمودار خارجی، مربوط به میزان تورم هیدروژل تهیه‌شده در آب و نمودار داخلی، مربوط به تأثیر دوز EBI در میزان تورم هیدروژل است (Choi et al. 2017).

در مطالعهٔ انجام‌شده توسط قربانزاده وهمکارانش (Ghorbanzadeh et al. 2021)، به تهیهٔ نانوالیاف متخلخل الکتروریسی‌شدهٔ غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ-پلی‌وینیل‌پیرولیدین[5]-گرافن‌اکساید کاهش‌یافته[6] پرداخته شد. خواص مکانیکی الیاف تهیه‌شده، با افزایش غلظت گرافن‌اکساید تا ۱ درصد وزنی، به‌طور قابل‌توجهی بهبود یافت؛ اما از میزان آبدوستی نانوالیاف کاسته شد. همچنین زنده‌مانی بیشتر از ۸۵ ٪ در سلول‌های PC12 کشت‌شده روی این الیاف، بیانگر زیست‌سازگاری داربستِ تهیه‌شده بود.

در یک پژوهش دیگر توسط بلو[7] و همکاران، نانوالیاف الکتروریسی‌شدهٔ غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ و پلی‌کاپرولاکتون تهیه شد (Bello et al. 2022). بررسی خواص مکانیکی، نشان‌دهندهٔ بهبود استحکام مکانیکی در مقایسه با ESM بود. علاوه‌براین، قابلیت جذب آب در داربست ESM-PCL پس از ۳ روز، حدود ۲۰۸٪ بود که مشکل تجمع ترشحات زخم و عفونت باکتریایی را برطرف می‌کند. همچنین استفاده از PCL به‌همراه ESM، باعث بهبود خاصیت آنتی‌باکتریال در برابر باکتری E.coli شد. درنهایت، زنده‌مانی سلول‌های فیبروبلاست L929 روی داربست تهیه‌شده، حدود ۱۲۱/۹۹٪ بود که بیانگر زیست‌سازگاری نانوالیاف ESM-PCL است.

[1] Jawun
[2] Polyvinil Alcohol
[3] Electron Beam Irradiation
[4] Polyethylenimine
[5] Polyvinylpyrrolidone
[6] Reduced Graphene Oxide
[7] Bello

۵- محلول پروتئین غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ در ترمیم زخم

فرم دیگر ESM، محلول پروتئین غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ است که در ترکیب با مواد دیگر، در کاربرد ترمیم زخم استفاده می‌شود. از SEP در الکتروریسی و اصلاح سطح داربست‌های پلیمری جهت ارتقا ویژگی‌های داربست و ترمیم مؤثر زخم به‌طور گسترده استفاده می‌شود (Sah et al. 2016).

الیاف الکتروریسی‌شدهٔ SEP، پتانسیل بالایی برای استفاده به‌عنوان داربست پوستی دارند؛ اما به‌دلیل استفاده از حلال‌های سمی و تردی الیاف حاصله، فرایند با محدودیت همراه است. برای افزایش فرایندپذیری، در ساخت محلول پلیمری برای الکتروریسی از پلیمرهای زیست‌سازگار استفاده می‌شود (Yi et al. 2004).

همچنین ازآنجایی‌که سطح داربست، اولین بخشی است که در تماس با بافت قرار می‌گیرد، در موفقیت زخم‌پوش و برهم‌کنش با محیط زیستی، نقش حیاتی ایفاء می‌کند؛ به‌همین‌جهت، برای افزایش چسبندگی سلولی و پروتئین، بهبود پاسخ سلولی و تسریع ترمیم زخم، محققان به ارتقاء ویژگی‌های سطح زخم‌پوش با استفاده از روش‌ها و مواد مختلف پرداختند. باتوجه‌به ویژگی‌های ایده‌آل و پایه پروتئینی SEP، از آن در اصلاح سطح زخم‌پوش‌ها جهت کمک به ترمیم زخم استفاده شد (Yi et al. 2004).

در جدول (۳) برخی از مطالعات انجام‌شده در زمینهٔ استفاده از محلول پروتئین غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ به‌منظور بهبود فرایند ترمیم زخم، قابل‌ملاحظه است.

٦- نتیجه‌گیری

غشاء پوستهٔ تخم‌مرغ یک ساختار لیفی دولایه بین پوسته و سفیدهٔ تخم‌مرغ است و دارای ویژگی‌های مناسب مانند ساختار متخلخل، زیست‌سازگاری، در دسترس بودن، دارای پروتئین‌های طبیعی و گروه‌های عاملی روی سطح خود، قابلیت اصلاح شدن و هزینهٔ کم است. همچنین به‌دلیل ساختاری که دارد، تداعی‌کنندهٔ ماتریس خارج‌سلولی است. این ویژگی‌ها، ESM را به یک مادهٔ مناسب تبدیل کرده است که در زمینه‌های مختلف به‌کار می‌رود. یکی از این کاربردها مهندسی بافت پوست است، که از ESM در ترکیب با مواد دیگر در ترمیم زخم‌های پوستی و ساخت زخم‌پوش استفاده می‌شود و نتایج مطلوبی را به‌همراه داشته است و پتانسیل مناسبی در بهبود ترمیم زخم دارد. در کنار این مزایا، استفاده از این غشاء محدودیت‌هایی را نیز با خود دارد. یکی از این محدودیت‌ها اندازهٔ غشاء است. اندازهٔ غشاءِ یک تخم‌مرغ، حدود ۵۰-۴۰ سانتی‌متر مربع است که بعد از انجام اصلاحات به ۲۰ سانتی‌متر مربع می‌رسد که این موضوع، کاربرد غشاء را در آسیب‌های گسترده محدود می‌کند. همچنین در استفاده از زخم‌پوش‌ها با پایه ESM در مرحلهٔ بالینی باید احتیاط شود؛ چراکه برخی افراد به تخم‌مرغ حساسیت دارند و ممکن است این نوع زخم‌پوش‌ها باعث تحریک دستگاه ایمنی آنها شوند. علاوه‌براین، تخم‌مرغ‌های تهیه‌شده از مرغ‌های مختلف با شرایط نگهداری و تغذیهٔ متفاوت، غشاهایی با ساختار و ترکیبات پروتئینی متفاوت خواهند داشت. این تفاوت در ساختار، تفاوت در ویژگی‌ها را ناشی می‌شود و زخم‌پوش‌های تهیه‌شده ممکن است ویژگی‌های متفاوت داشته باشند و رفتارهای مختلفی را در تماس با زخم از خود نشان دهند. درنهایت، با در نظر گرفتن نتایج مطالعات می‌توان نتیجه گرفت که ESM به‌عنوان مادهٔ زیستی طبیعی، پتانسیل بالایی در کاربردهای ترمیم زخم و مهندسی بافت دارد و امید است کاربردهای آن در سایر مصارف زیستی توسعه یابد.

جدول ۳. خلاصه‌ای از مطالعات انجام‌شده در ترمیم زخم

نوع ESM مصرفی	افزوده‌ها	اهمیت افزوده‌ها	فرم نهایی محصول	آزمایش‌های invitro	آزمایش‌های invivo	ویژگی‌های خاص محصول	منابع
SEP	پلی‌پروپیلن کربنات	خواص مکانیکی خوب، ویسکوزیته	نانوالیاف	آزمون مکانیکی، کشت سلولی	---	خواص مکانیکی بهتر	(Xiong et al. 2012)
SEP	پلی‌لاکتیک کوگلایکولیک‌اسید	خواص مکانیکی خوب، زیست سازگاری	نانوالیاف	آزمون مکانیکی، زاویهٔ تماس با گلیسرول، کشت سلولی، آزمون MTT	---	آبدوستی مناسب، خواص مکانیکی بهتر، زنده‌مانی سلولی بیشتر، مهاجرت و تکثیر سلولی بهتر	(Jia et al. 2012)
SEP	پلی‌یورتان	استحکام مکانیکی بالا، انعطاف‌پذیری خوب، خون سازگاری مناسب	نانوالیاف	زاویهٔ تماس با آب، آزمون مکانیکی	---	آبدوستی مناسب، استحکام کششی و انعطاف‌پذیری خوب	(Chen et al. 2014)
SEP	پلی‌کاپرولاکتون و فیبروئین ابریشم و ژل آلوئه‌ورا	پلی‌کاپرولاکتون: خواص مکانیکی خوب فیبروئین ابریشم: پاسخ التهابی محدود، زیست سازگاری آلوئه‌ورا: هیدراته کردن زخم، بهبود مهاجرت سلولی	نانوالیاف	آزمون کشش، زاویهٔ تماس با آب، PRC	---	استحکام کششی مناسب، آبدوستی بهتر، زنده‌مانی بیشتر سلول‌ها، تمایز سلول‌ها به کراتینوسایت	(Salehi et al. 2019)
SEP	فیبروئین ابریشم	پاسخ التهابی محدود، زیست سازگاری	داربست فیبری با گرفت SEP	آزمون مکانیکی، کشت سلولی	ایمپلنت زیر پوست موش	استحکام فشاری بالاتر، زنده‌مانی و تکثیر سلولی بیشتر، مهاجرت بیشتر سلول‌ها به داخل داربست در محیط درون‌تنی	(Sah et al. 2014)
SEP	پلی‌کاپرولاکتون	خواص مکانیکی خوب و تخریب‌پذیری	نانوالیاف PCL با گرفت SEP	زاویهٔ تماس با آب، آزمون مکانیکی، کشت سلولی، آزمون MTT	---	آبدوستی مناسب، استحکام مکانیکی بالاتر، زنده‌مانی و تکثیر بهتر سلولی	(Jia et al. 2008)
SEP	پلی‌وینیل الکل	خواص فیزیکی خوب، زیست سازگاری	فیلم	آزمون مکانیکی، کشت سلولی، آزمون MTT	---	خواص مکانیکی مناسب، چسبندگی و تکثیر سلولی بهتر	(Yi et al. 2006)

مراجع

1. *Aggarwal*, A., & Sah, M. K. (2022). Eggshell membrane in skin tissue engineering and wound healing. *In Natural Polymers in Wound Healing and Repair* (pp. 417-435). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-323-90514-5.00007-9
2. Asato, R, Shinya, N., Ishizawa, Y., Harano, S., (1971), *Wound covering material*, U.S. Patent 20,120,177,718, Available at: https://patents.google.com/patent/US20120177718A1/en (Accessed: 12 July 2012).
3. Balassa, L.L., (1971), *Process for using eggshell compositions for promoting wound healing*, U.S. Patent No. 3,558,771, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Available at: https://patents.google.com/patent/US3558771A/en
4. Balaz, M. (2014), Eggshell membrane biomaterial as a platform for applications in materials science, *Acta Biomaterialia, 10(9)*, 3827–3843. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.020
5. Behyari, M., Imani, R., & Keshvari, H. (2021), Evaluation of Silk Fibroin Nanofibrous Dressing Incorporating Niosomal Propolis, for Potential Use in Wound Healing, *Fibers and Polymers, 22(8)*, 2090-2101. https://doi.org/10.1007/s12221-021-0973-2
6. Bello, M., Abdullah, F., Mahmood, W.M.A.W., Malek, N.A.N.N., Jemon, K., Siddiquee, S., Chee, T.Y. & Sathishkumar, P. (2022), Electrospun poly (Ɛ-caprolactone)-eggshell membrane nanofibrous mat as a potential wound dressing material, *Biochemical Engineering, 187*, 108563. https://doi.org/10.1016/j.bej.2022.108563
7. Blaine, R.C., & Ngo, T.D. (2019), *Wound care product with egg shell membrane*, U.S. Patent No. 10,166,260, Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office. Available at: https://patents.google.com/patent/US10166260B2/en (Accessed: 24 May 2013).
8. Bowler, P.G., (2002), Wound pathophysiology, infection and therapeutic options, *Anals of Medicine, 34(6)*, 419-427. https://doi.org/10.1080/078538902321012360
9. Briggs, E., Mensah, R.A., Patel, K.D., Mandakhbayar, N.E., Sharifulden, N.S., Erdogan, Z.K., Silva, L.V.B., Salim, K., Kim, H.W., Nguyen, L.T., & Chau, D.Y. (2022), Therapeutic Application of an Ag-Nanoparticle-PNIPAAm-Modified Eggshell Membrane Construct for Dermal Regeneration and Reconstruction, *Pharmaceutics, 14(10)*, 2162. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14102162
10. Chen, L., Kang, J., & Sukigara, S. (2014), Preparation and characterization of polyurethane/soluble eggshell membrane nanofibers , *Bio-medical materials and engineering, 24(6)*, 1979-1989. https://doi.org/10.3233/BME-141007
11. Choi, H.J., Kim, Y.M., Suh, J.Y., & Han, J.Y. (2021), Beneficial effect on rapid skin wound healing through carboxylic acid-treated chicken eggshell membrane, *Materials Science and Engineering: C, 128*, 112350. https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112350
12. Choi, J., Pant, B., Lee, C., Park, M., Park, S.J., & Kim, H.Y. (2017), Preparation and characterization of eggshell membrane/PVA hydrogel via electron beam irradiation technique *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, *47*, 41-45. https://doi.org/10.1016/j.jiec.2016.11.014
13. Dadashzadeh, A., Imani, R., Moghassemi, S., Omidfar, K., & Abolfathi, N. (2020), Study of hybrid alginate/gelatin hydrogel-incorporated niosomal Aloe vera capable of sustained release of Aloe vera as potential skin wound dressing, *Polymer Bulletin, 77(1)*, 387-403. https://doi.org/10.1007/s00289-019-02753-8
14. Faghihi, F., Khoraminia, F., & Imani, R. (2019), Immune-Mediated Tissue Regeneration Driven by a Biomaterial Scaffold: An Innovative Regenerative Medicine Strategy, *Pathobiology Research*, 22(3), 159–172. http://mjms.modares.ac.ir/article-30-31312-en.html
15. Ghorbanzadeh Sheish, S., Emadi, R., Ahmadian, M., Sadeghzade, S. & Tavangarian, F. (2021), Fabrication and characterization of polyvinylpyrrolidone-eggshell membrane-reduced graphene oxide nanofibers for tissue engineering applications, *Polymers, 13(6)*, 913. https://doi.org/2073-4360/13/6/913
16. Guarderas, F., Leavell, Y., Sengupta, T., Zjukova, M., & Megraw, T.L. (2016), Assessment of chicken-egg membrane as a dressing for wound healing, *Advaces in Skin & Wound Care, 29(3)*, 131-134. https://doi.org/10.1097/01.ASW.0000480359.58866.e9
17. Guha Ray, P., Pal, P., Srivas, P.K., Basak, P., Roy, S., & Dhara, S. (2018), Surface modification of eggshell membrane with electrospun chitosan/polycaprolactone nanofibers for enhanced dermal wound healing, *ACS Applied Bio Materials, 1(4)*, 985-998. https://doi.org/10.1021/acsabm.8b00169
18. Guo, S. A., & Dipietro, L.A. (2010), Factors affecting wound healing, *Journal of Dental Research, 89(3)*, 219–229. https://doi.org/10.1177/0022034509359125
19. Hajian, M., Mahmoodi, M., & Imani, R. (2017), In vitro assessment of poly (vinyl alcohol) film incorporating aloe vera for potential application as a wound dressing, *Journal of Macromolecular Science, Part B, 56(7)*, 435–450. https://doi.org/10.1080/00222348.2017.1330183
20. Hakam, M.S., Imani, R., Abolfathi, N., Fakhrzadeh, H., & Sharifi, A.M. (2016), Evaluation of fibrin-gelatin hydrogel as biopaper for application in skin bioprinting: An in-vitro study, *Bio-Medical Materials and Engineering, 27(6)*, 669–682. Doi: 10.3233/BME-161617
21. Han, Ch., Chen, Y., Shi, L., Chen, H., Li, L., Ning, Z., Zeng, D. & Wang, D. (2023), Advances in eggshell membrane Separation and solubilization technologies, *Frontiers in Veterinary Science, 10*, 1116126. https://doi.org/10.3389/fvets.2023.1116126
22. Imani, R., & Nour, Sh. (2019). *Introduction to engineered wound dressings for skin regeneration: Angiogenic approaches in healing*, Amirkabir university of technology, http://publication.aut.ac.ir/en/book/show/255142
23. Jia, J., Liu, G., Yu, J. & Duan, Y. (2012), Preparation and characterization of soluble eggshell membrane protein/PLGA electrospun nanofibers for guided tissue regeneration membrane, *Journal of Nanomaterials*, 25-25. https://doi.org/10.1155/2012/282736
24. Jia, J., Duan, Y.Y., Yu, J., & Lu, J.W. (2008), Preparation and immobilization of soluble eggshell membrane protein on the electrospun nanofibers to enhance cell adhesion and growth, *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials, 86(2)*, 364-373. https://doi.org/10.1002/jbm.a.31606
25. Khorshidi, S., Mohebbali, M., Imani, R., Mahmoodi, M., & Solouk, A. (2020), Electrospun fibroin/graphene oxide nanocomposite mats: An optimization for potential wound dressing applications, *Fibers and Polymers, 21(3)*, 480–488. https://doi.org/10.1007/s12221-020-9465-z
26. Kwnny, E., Schmidt, R, (2016), Tissue engineering scaffolds comprising particulate egg shell membrane, Google Patent 5,392,873, Available at: https://patents.google.com/patent/GB201511579D0/enl
27. Li, J. Zhai, D., Lv, F., Yu, Q., Ma, H., Yin, J., Yi, Z., Liu, M., Chang, J. & Wu, C. (2016), Preparation of copper-containing bioactive glass/eggshell membrane nanocomposites for improving angiogenesis, antibacterial activity and wound healing, *Acta Biomaterialia, 36*, 254–266. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.03.011
28. Li, X., Cai, Z., Ahn, D.U., & Huang, X. (2019), Development of an antibacterial nanobiomaterial for wound-care based on the absorption of AgNPs on the eggshell membrane, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 183*, 110449. https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.110449
29. Li, X., Ma, M., Ahn, D.U., & Huang, X. (2019), Preparation and characterization of novel eggshell membrane-chitosan blend films for potential wound-care dressing: From waste to medicinal products, *International Journal of Biological Macromolecules, 123*, 477-484. https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.215
30. Lisovsky, A., Chamberlain M.D., Wells, L.A., & Sefton, M.V. (2015), Cell interactions with vascular regenerative MAA-based materials in the context of wound healing, *Advanced Healthcare Materials, 4(16)*, 2375–2387. https://doi.org/10.1002/adhm.201500192
31. Liu, M. Luo, G., Wang, Y., Xu, R., Wang, Y., He, W., Tan, J., Xing, M. & Wu, J. (2017), Nano-silver-decorated microfibrous eggshell membrane: processing, cytotoxicity assessment and optimization, antibacterial activity and wound healing, *Scientific Reports, 7(1)*, 436. https://doi.org/10.1038/s41598-017-00594-x.

32. Liu, M., Luo, G., Wang, Y., & Kianpour Rad, M. (2017), Preparation method and application of egg shell membrane composite nano-silver thin film used for artificial skin, *Scientific Reports*, https://patents.google.com/patent/CN106310385A/en
33. Liu, M., Liu, T., Zhang, X., Jian, Z., Xia, H., Yang, J., Hu, X., Xing, M., Luo, G. & Wu, J. (2019), Fabrication of KR-12 peptide-containing hyaluronic acid immobilized fibrous eggshell membrane effectively kills multi-drug-resistant bacteria, promotes angiogenesis and accelerates re-epithelialization, *International Journal of Nanomedicine, 14*, 3345-3360. https://doi.org/10.2147/IJN.S199618
34. Mescher, A.L. (2009), Junqueira's Basic Histology Text and Atlas, McGraw-Hill Medical; 12th edition (August 28, 2009). https://www.researchgate.net/publication/259781206
35. Mirzababaeiy, S.A., Mahmoodi, M., & Mohebat, R. (2018), Synthesis and Characterization of Hydrogel Loaded Curcumin Encapsulated Chitosan Nanoparticles as Novel Wound Dressing s, *Journal of Advanced Materials and Technologies, 7(1)*, 53-63. https://doi.org/10.30501/jamt.2018.91681
36. Mogosanu, G.D., & Grumezescu, A.M. (2014), Natural and synthetic polymers for wounds and burns dressing, *International Journal of Pharmaceutics, 463(2)*, 127–136. https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.12.015
37. Mohammadzadeh, L., Rahbarghazi, R., Salehi, R., & Mahkam, M. (2019), A novel egg-shell membrane based hybrid nanofibrous scaffold for cutaneous tissue engineering, *Journal of Biological Engineering, 13*, 1-15. https://doi.org/10.1186/s13036-019-0208-x
38. Moura, L. I., Dias, A. M., Carvalho, E., & de Sousa, H. C. (2013), Recent advances on the development of wound dressings for diabetic foot ulcer treatment—A review, *Acta Biomaterialia, 9(7)*, 7093–7114. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.03.033
39. Naderi-Meshkin, j., Amirkhah, R., Heirani-Tabasi, A., & Maqsood, M. I. (2018), Critical issues in successful production of skin substitutes for wound healing, *Journal of Genes and Cells, 4(1)*, 10-32. https://doi.org/10.15562/gnc.63
40. Najafloo, R., Behyari, M., Imani, R., & Nour, S. (2020), A mini-review of Thymol incorporated materials: Applications in antibacterial wound dressing, *Journal of Drug Delivery Science and Technology, 60*, 101904. https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.101904
41. Nour, S., Baheiraei, N., Imani, R., Khodaei, M., Alizadeh, A., Rabiee, N., & Moazzeni, S.M. (2019), A review of accelerated wound healing approaches: biomaterial-assisted tissue remodeling, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine, 30(120)*, 1-15. https://doi.org/10.1007/s10856-019-6319-6
42. Nour, S., Baheiraei, N., Imani, R., Rabiee, N., Khodaei, M., Alizadeh, A., & Moazzeni, S.M. (2019), Bioactive materials: a comprehensive review on interactions with biological microenvironment based on the immune response, *Journal of Bionic Engineering, 16(4)*, 563–581. https://doi.org/10.1007/s42235-019-0046-z
43. Nour, S., Imani, R., & Sharifi, A.M. (2022), Angiogenic Effect of a Nanoniosomal Deferoxamine-Loaded Poly (vinyl alcohol)–Egg White Film as a Promising Wound Dressing, *ACS Biomaterials Science & Engineering, 8(8)*, 3485-3497. https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00046
44. Nour, S., Imani, R., Chaudhry, G.R., & Sharifi, A.M. (2021), Skin wound healing assisted by angiogenic targeted tissue engineering: A comprehensive review of bioengineered approaches, *Journal of Biomedical Materials Research Part A, 109(4)*, 453-478. https://doi.org/10.1002/jbm.a.37105
45. Nour, S., Imani, R., Mehrabani, M., Solouk, A., Iranpour, M., Jalili-Firoozinezhad, S., & Sharifi, A.M. (2023), Biomimetic hybrid scaffold containing niosomal deferoxamine promotes angiogenesis in full-thickness wounds, *Materials Today Chemistry, 27*, 101314. https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2022.101314
46. Ohta-Fujita, E., Konno, T., Shimizu, M., Ishihara, K., Sugitate, T., Miyake, J., Yoshimura, K., Taniwaki, K., Sakurai, T., Hasebe, Y. & Atomi, Y. (2011), Hydrolyzed eggshell membrane immobilized on phosphorylcholine polymer supplies extracellular matrix environment for human dermal fibroblasts, *Cell and Tissue Research, 345(1)*, 177–190. https://doi.org/10.1007/s00441-011-1172-z
47. Park, S. Choi, K.S., Lee, D., Kim, D., Lim, K.T., Lee, K.H., Seonwoo, H. & Kim, J. (2016), Eggshell membrane: Review and impact on engineering, *Biosystems Engineering, 151*, 446–463. https://doi.org/10.1016/j.biosystemseng.2016.10.014
48. Park, S., Kim, T., Gwon, Y., Kim, S., Kim, D., Park, H.H., Lim, K.T., Jeong, H.E., Kim, K. & Kim, J. (2019), Graphene-Layered eggshell membrane as a flexible and functional scaffold for enhanced proliferation and differentiation of stem cells, *ACS Applied Bio Materials, 2(10)*, 4242-4248. https://doi.org/10.1021/acsabm.9b00525
49. Pasarin, D., & Rovinaru, C. (2019), Separation Methods of the Eggshell Membranes from Eggshell, *Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 29(1)*, 122. https://doi.org/10.3390/proceedings2019029122
50. Patkar, S., Maniar, D., Pillai, M. M., Saha, R., & Tayalia, P. (2021), A bilayered skin substitute developed using an eggshell membrane crosslinked gelatin–chitosan cryogel, *Biomaterials Science, 23*, 7921-7933. https://doi.org/10.1039/D1BM01194D
51. Pillai, M. M., Saha, R., & Tayalia, P. (2023), Avian eggshell membrane as a material for tissue engineering: A review, *Materials Science*, 1-22. https://doi.org/ 10.1007/s10853-023-08434-2
52. Sah, M.K., & Pramanik, K. (2014). Soluble-eggshell-membrane-protein-modified porous silk fibroin scaffolds with enhanced cell adhesion and proliferation properties, *Journal of Applied Polymer Science, 131(8)*, https://doi.org/10.1002/app.40138
53. Sah, M.K., & Rath, S.N. (2016), Soluble eggshell membrane: a natural protein to improve the properties of biomaterials used for tissue engineering applications, *Materials Science and Engineering: C, 67*, 807–821. https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.05.005
54. Sarheed, O., Ahmed, A., Shouqair, D., & Boateng, J. (2016), Antimicrobial dressings for improving wound healing, *Wound Healing: Insights into Ancient Challenges*, 373-98. https://dx.doi.org/10.5772/63961
55. Wagner, W.R, Sakiyama-Elbert, S.E, Zhang, G., & Yaszemski, M.J. (2020), *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, Netherlands, Elsevier Science. https://doi.org/10.1016/C2017-0-02323-6
56. Xiong, X., Li, Q., Lu, J.W., Guo, Z.X., Sun, Z.H. & Yu, J. (2012), Fibrous scaffolds made by co-electrospinning soluble eggshell membrane protein with biodegradable synthetic polymers, *Biomaterials Science, Polymer Edition, 23(9)*, 1217-1230. https://doi.org/10.1163/092050611X576981
57. Yi, F., Guo, Z.X., Zhang, L.X., Yu, J., & Li, Q. (2004), Soluble eggshell membrane protein: preparation, characterization and biocompatibility, *Biomaterials, 25(19)*, 4591–4599. https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.11.052
58. Yi, F., Lu, J.W., Guo, Z.X., & Yu, J. (2006), Mechanical properties and biocompatibility of soluble eggshell membrane protein/poly (vinyl alcohol) blend films, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, 17(9)*, 1015-1024. https://doi.org/10.1163/156856206778365997
59. Zhang, Zh., et al., (2020), *Postoperative anti-adhesion medical dressing and preparation method thereof*, C.N. Patent 104,491,915, Available at: https://patents.google.com/patent/CN104491915A/en(Accessed: 5April 2017).