



## Original Research Article-Extended Abstract

# Effect of Oxidation Degree (OD) of oxidized-alginate on the Properties of Self-crosslinkable Oxidized Alginate-Gelatin bioinks in 3D Bioprinting Process

Khadijeh Sanaei  <sup>1</sup>, Ali Zamanian  <sup>2\*</sup>, Shohreh Mashayekhan  <sup>3</sup>, Tayebe Ramezani Farzin  <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Ph. D. Candidate, Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran

<sup>2</sup>Professor, Department of Nanotechnology and Advanced Materials, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran

<sup>3</sup>Associate Professor, Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran

<sup>4</sup>Ph.D, Faculty of biological sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran

\*Corresponding Author's Email: [a-zamanian@merc.ac.ir](mailto:a-zamanian@merc.ac.ir) (A. Zamanian)

### Paper History:

Received: 03 May 2023

Revised :19 June 2023

Scientific Accepted: 29 August 2023

### Keywords:

3D Bioprinting

Bioink

Oxidized Alginate

**Abstract:** Oxidized alginate or alginate dialdehyde (ADA) has recently attracted a great deal of attention in the 3D bioprinting process due to the elimination or reduction of chemical cross-linking agents. In this research, alginate was oxidized with Oxidation Degrees (ODs) of 5, 7.5, and 10%, and its properties before and after the oxidation process were investigated using Fourier Transform Infrared (FTIR), Nuclear Magnetic Resonance (NMR), Gel Permeation Chromatography (GPC) tests and rheological study. Then, the bioinks containing 4% (w/v) oxidized alginate and 6% (w/v) gelatin were prepared and cross-linked according to a two-step crosslinking strategy. Then, the bioink was characterized by the printability and wettability properties. The results demonstrated that alginate oxidation reduced the molecular weight and rheological characteristics of alginate. However, the properties of the bioink (oxidized alginate-gelatin) confirmed that the properties of printability, crosslinking degree and wettability of the samples containing oxidized alginate with the OD of 5% were in the appropriate range for use as an ideal bioink.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.395058.1277>

URL: [https://www.jamt.ir/article\\_178855.html](https://www.jamt.ir/article_178855.html)

## 1. INTRODUCTION

Nowadays, hydrogels are increasingly used as bioinspired 3D scaffolds for regenerative medicine and tissue engineering owing to their similarity to some characteristics of Extracellular Matrix (ECM) ([Ming et al., 2015](#); [Pishavar et al., 2021](#)). In this regard, various types of hydrogels have been meticulously studied for fabrication of the 3D scaffolds such as alginate, hyaluronic acid, chitosan, gelatin, and collagen. Among them, alginate (Alg) is of particular importance due to its low cytotoxicity, good cell viability, and cell differentiation, hence commonly used as bioinks in many cases ([Axpe & Oyen, 2016](#)). However, it cannot provide cell attachment, and its biodegradability rate in the mammalian body is relatively low. On the contrary, compared to conventional Alg, oxidized alginate (OA) not only increases the degradability of Alg inside the body but also reacts with proteins easily due to the reaction between the aldehyde groups formed during the oxidation process and the free amine groups of proteins ([Distler et al.,](#)

[2020](#)). One of the major proteins which is widely used as a biomaterial associated with OA is gelatin (G). It is a biodegradable hydrogel with low immunogenicity that can provide cell adhesion ([Sanz-horta et al., 2022](#)).

In this research, OA with different Degrees of Oxidation (ODs) of 5, 7.5, and 10% was synthesized. Then, OA-G bio-inks were prepared and 3D scaffolds were fabricated through a 3D extrusion-based bioprinting method.

## 2. MATERIALS AND METHODS

To synthesize OA with different Dos of 5, 7.5, and 10%, an aqueous solution of Alg (5% (w/v)) was mixed with an aqueous solution of sodium periodate at room temperature in the dark for 24 h. Then, ethylene glycol was added to the solution. Next, sodium chloride and ethanol were applied to precipitate OA. The precipitated OA was then collected by centrifuge and dried by freeze drying and stored at 4 °C ([Baniasadi et al., 2016](#)).

The OA-G hydrogels were prepared based on the previously mentioned method ([Distler et al., 2020](#)). Briefly, OA and G solutions were prepared separately and mixed at 37 °C. Four

compositions of OA-G hydrogels were prepared with 4% (w/v) OA and 6% (w/v) G, as observed in Table 1.

**Table 1.** Compositions of OA-G hydrogels

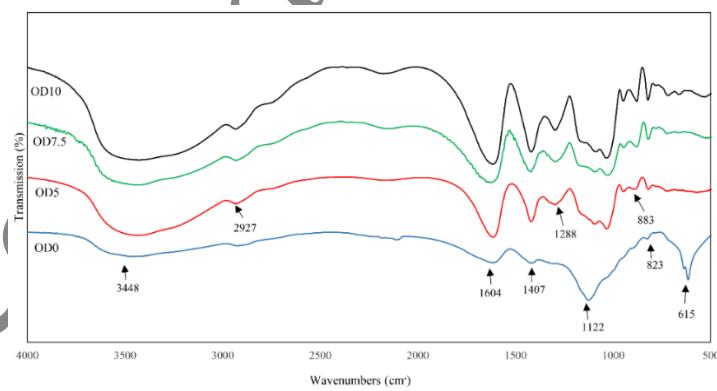
Samples	OD (% w/v)	OA (% w/v)	G (% w/v)
OD0-OA4-G6	0	4	6
OD5-OA4-G6	5	4	6
OD7.5-OA4-G6	7.5	4	6
OD10-OA4-G6	10	4	6

The 3D bioprinting process was carried out using a 3D bioprinter machine (Bioprinter N2, 3DPL Co., IRAN). The OA-G scaffolds were printed through a G18 nozzle (ID: 0.838 mm) at RT. The printing speed and pressure were kept constant at 5 mm/s and 0.9 bars, respectively. Once the printing process was complete, the samples were crosslinked by CaCl<sub>2</sub> (5% w/v) for 30 min.

### 3. RESULTS AND DISCUSSION

Figure 1 illustrates the FTIR spectrums of pure Alg and OA with different oxidation degrees of 5, 7.5, and 10%. In the spectrum of Alg, some peaks were observed at 615 cm<sup>-1</sup> and 3448 cm<sup>-1</sup>, which were attributed to the hydroxyl groups (OH) ([Rastegar Ramsheh et al., 2020](#)).

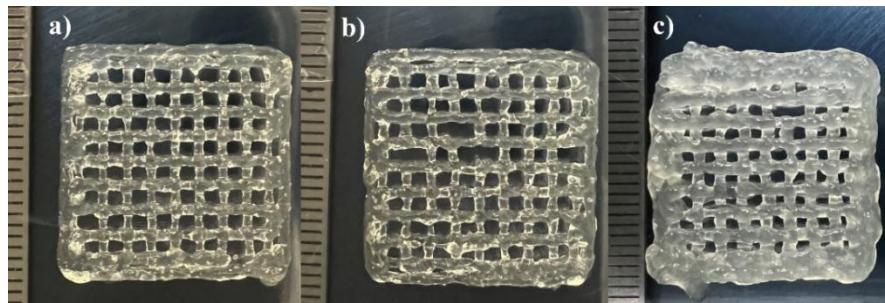
Additionally, two peaks at 1604 cm<sup>-1</sup> and 1407 cm<sup>-1</sup> were related to carboxyl groups (COO) ([Rastegar Ramsheh et al., 2020](#)). As observed in the OA spectrum, the carboxyl peaks are still present, and the peak at about 2927 cm<sup>-1</sup> is attributed to the C-H bond in the aldehyde groups ([Khalighi & Saadatmand, 2021](#)). However, an aldehyde peak cannot be detected in the range of 1725-1751 cm<sup>-1</sup> ([Reakasame & Boccaccini, 2018](#)). Due to the high reactivity of the aldehyde groups, they react with the adjacent hydroxyl groups and consequently form hemiacetals ([Emami et al., 2018](#)). The peak at 883 cm<sup>-1</sup> confirms the formation of hemiacetal groups, which becomes sharper as the percentage of OD increases (Sanz-horta et al., 2022).



**Figure 1.** FTIR spectroscopy spectra of Alg (OD0) and OA (OD5, OD7.5 and OD10)

Figure 2 presents the images of the printed constructs from OD5-OA-G, OD7.5-OA-G, and OD10-OA-G bio-inks. The printing accuracy (%) of the bioinks which contained OA with low OD (5, 7.5 and 10%) were

measured. As observed in this figure, the OD5-OA-G bioink exhibited higher printability (91% ± 2) than the other two ones. According to the observations, as the OD of OA increased, the printability of OA-G bioink decreased.



**Figure 2.** Printed scaffolds: a) OD5-OA-G, b) OD7.5-OA-G, c) OD10-OA-G

#### 4. CONCLUSION

In this study, the OA hydrogels with different oxidation degrees of 5, 7.5, and 10% were successfully synthesized, and OA-based scaffolds were fabricated through a 3D bioprinting process. The results revealed that through the oxidation modification of Alg, the viscosity of OA hydrogel sharply decreased. The OD5-OA-G bioink, compared to other bioinks, proved to have good printability with a higher OD of OA. Therefore, it can be

concluded that the 5OD-OA-G bioinks have great potential in the field of 3D bioprinting technology.

#### 5. ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Biomaterials laboratory at Materials and Energy Research Center (MERC) and Stem Cell Engineering Research laboratory at Sharif University of Technology for their assistance.

#### REFERENCE

- Axpe, E., & Oyen, M. L. (2016). Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1976. <https://doi.org/10.3390/ijms17121976>
- Baniasadi, H., Mashayekhan, S., Fadaoddini, S., & Haghirsharifzamini, Y. (2016). Design, fabrication and characterization of oxidized alginate-gelatin hydrogels for muscle tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(1), 152–161. <https://doi.org/10.1177/085328216634057>.
- Distler, T., Solisito, A. A., Schneidereit, D., Friedrich, C., Detsch, R., & Boccaccini, A. R. (2020). 3D printed oxidized alginate-gelatin bioink provides guidance for C2C12 muscle precursor cell orientation and differentiation via shear stress during bioprinting. *Biofabrication*, 12(4), 45005. DOI 10.1088/1758-5090/ab98e4
- Emami, Z., Ehsani, M., Zandi, M., & Foudazi, R. (2018). Controlling alginate oxidation conditions for making alginate-gelatin hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 198. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.080>.
- Khalighi, S., & Saadatmand, M. (2021). Bioprinting a thick and cell-laden partially oxidized alginate-gelatin scaffold with embedded micro-channels as future soft tissue platform. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2153–2164. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.046>
- Ming, J., Pan, F., & Zuo, B. (2015). Structure and properties of protein-based fibrous hydrogels derived from silk fibroin and sodium alginate. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 74(3), 774–782. <https://doi.org/10.1007/s10971-015-3662-z>.
- Pishavar, E., Luo, H., Naserifar, M., Hashemi, M., Toosi, S., Atala, A., Ramakrishna, S., & Behravan, J. (2021). Advanced Hydrogels as Exosome Delivery Systems for Osteogenic Differentiation of MSCs: Application in Bone Regeneration. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126203>
- Rastegar Ramsheh, M., Behnamghader, A., & khanlarkhani, A. (2020). Preparation and Characterization of Microspheres Based on Gelatin-Sodium Alginate-Genipin by the Formation of Polyelectrolyte Complex. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, 9(3), 63–78. <https://doi.org/10.30501/jamt.2021.214580.1070>
- Reakasame, S., & Boccaccini, A. R. (2018). Oxidized alginate-based hydrogels for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules*, 19(1), 3–21. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01331>.
- Sanz-horta, R., Matesanz, A., Jorcano, L., Velasco, D., Acedo, P., Gallardo, A., Reinecke, H., & Elvira, C. (2022). Preparation and Characterization of Plasma-Derived Fibrin Hydrogels Modified by Alginate di-Aldehyde. <https://doi.org/10.3390/ijms23084296>



## فصلنامه مواد و فناوریهای پیشرفته

Journal Home page: [www.jamt.ir](http://www.jamt.ir)



### مقاله کامل پژوهشی

## تأثیر درجه اکسیداسیون آلزینات بر خواص جوهر زیستی خودبخود ژل شونده آلزینات اکسیدشده-ژلاتین در فرایند چاپ زیستی سه بعدی

خدیجeh سنائی<sup>۱</sup>, علی زمانیان<sup>۲\*</sup>, شهره مشایخان<sup>۳</sup>, طبیه رمضانی فرزین<sup>۴</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، پژوهشگاه فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، البرز، ایران

<sup>۲</sup> استاد پژوهشگاه فناوری نانو و مواد پیشرفته، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج، البرز، ایران

<sup>۳</sup> دانشیار، دانشکده شیمی و نفت، دانشگاه شریف، تهران، تهران، ایران

<sup>۴</sup> دکتری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، تهران، ایران

### تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۳ اردیبهشت ۱۴۰۲

بازنگری: ۲۹ خرداد ۱۴۰۲

پذیرش: ۷ شهریور ۱۴۰۲

### کلیدواژه‌ها:

چاپ زیستی سه بعدی

جوهر زیستی

آلزینات اکسیدشده

**چکیده** استفاده از آلزینات اکسیدشده یا آلزینات دی‌آلدئیدی، بهدلیل حذف یا تقلیل عامل‌های شبکه‌ساز شیمیابی، در حوزه‌های مختلف پژوهیه چاپ زیستی سه بعدی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش آلزینات بهمیزان ۵/۵ و ۱۰ درصد اکسید شد و ترکیب شیمیابی و وزن مولکولی آلزینات و اکسید آن، قبل و بعد از فرایند اصلاح شیمیابی اکسیداسیون به ترتیب با طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون‌قرمز (FTIR)، آزمون رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) و آزمون کروماتوگرافی نفوذ ژل (GPC) بررسی و نیز خواص رئولوژی مطالعه شد. سپس جوهر زیستی با استفاده از آلزینات اکسیدشده (با درجه اکسیداسیون‌های مختلف ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) با غلظت ۴ درصد (وزنی به حجمی) و ژلاتین ۶ درصد (وزنی به حجمی)، تهیه شد و هیدروژل‌ها تحت یک فرایند دومرحله‌ای، اتصال عرضی (cross link) شدند. در ادامه، خواص جوهر زیستی از جمله سیالیت، چاپ‌پذیری و ترشوندگی بررسی شد. نتایج نشان داد که اکسیداسیون آلزینات موجب کاهش جرم مولکولی و کاهش خواص رئولوژی آلزینات می‌شود. با این وجود، بررسی خواص جوهر زیستی (آلزینات اکسیدشده-ژلاتین) نشان داد که در نموده با درجه اکسیداسیون ۵ درصد، خواص چاپ‌پذیری، شبکه‌ای شدن و ترشوندگی در محدوده مناسب قرار دارد و می‌توان از آن به عنوان جوهر زیستی ایده‌آل در چاپ زیستی استفاده کرد.



<https://doi.org/10.30501/jamt.2023.395058.1277>

URL: [https://www.jamt.ir/article\\_178855.html](https://www.jamt.ir/article_178855.html)

### ۱- مقدمه

روبه رشدی دارند ([Ming et al., 2015](#)). هیدروژل‌ها بهدلیل قابلیت تورم با آب در پژوهشی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و نقش مهمی در ترمیم و بازسازی بافت ایفاء می‌کنند. این

هیدروژل‌ها بهدلیل شباهت به برخی ویژگی‌های ماتریکس خارج سلولی<sup>۱</sup>، به عنوان داربست‌های سه بعدی مناسب برای کشت سلولی، در پژوهشی ترمیمی<sup>۲</sup> و مهندسی بافت کاربرد

<sup>1</sup> Extracellular matrix (ECM)

<sup>2</sup> Regenerative medicine

داخل بدن افزایش می‌دهد و همچنین عامل شبکه‌ساز مناسب-تری برای پیوند با پروتئین‌ها به دلیل واکنش گروه‌های آلدئیدی موجود با گروه‌های آمین آزاد موجود در پروتئین بر اساس رابطه شیف<sup>۱۰</sup> به شمار می‌رود ([Distler et al., 2020](#)). یکی از این پروتئین‌هایی که به عنوان بیوماده کاربرد بسیاری دارد، ژلاتین است. ژلاتین هیدروژلی زیست‌تخربی‌پذیر، ایمن‌زایی<sup>۱۱</sup> اندکی دارد که به چسبندگی سلولی کمک می‌کند ([Sanz-horta et al., 2022](#)). همان‌طور که اشاره شد، هم آژینات، قابلیت شبکه‌ای شدن با یون‌های فلزی دوظرفیتی مانند  $Ba^{2+}$  و  $Ca^{2+}$  را دارد و هم آژینات اکسیدشده از طریق پیوند پایه شیف با پروتئین‌هایی مانند ژلاتین، با این وجود، گومز<sup>۱۲</sup> و همکارانش گزارش دادند که تنها آژینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون کمتر از ۱۰ درصد از طریق اتصالات عرضی با یون‌های دوظرفیتی مانند  $Ba^{2+}$  و  $Ca^{2+}$  قادر به تشکیل ژل می‌باشد ([Gomez et al., 2007](#))

در این پژوهش ابتدا اکسیداسیون آژینات با درجه اکسیداسیون کم (۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) انجام شد و با ژلاتین (برای تهیه جوهر زیستی جهت ساخت داربست‌های پوستی به روش چاپ زیستی سمعده‌ی اکستروژنی) ترکیب گردید که در طی یک فرایند دو-مرحله‌ای شبکه‌ای شد. در مرحله اول، گروه آلدئیدی فراهم شده در آژینات اکسیدشده با گروه آمین موجود در پروتئین براساس معامله شیف واکنش داد که منجر به تشکیل ایمید شد. در مرحله دوم، هیدروژل‌های پایه آژیناتی پس از اتمام فرایند چاپ، در معرض یون دوظرفیتی  $Ca^{2+}$  قرار گرفتند و شبکه‌ای شدند. سپس تأثیر درجه اکسیداسیون بر خواص هیدروژل همچون خواص سیالیت، چاپ‌پذیری، زمان ژلی شدن، درجه شبکه‌ای شدن و خاصیت ترشوندگی آنها بررسی شد.

## ۲- روش تحقیق

### ۲-۱- اکسیداسیون آژینات

به منظور اکسیداسیون آژینات با درجه‌های اکسیداسیون متغیر (۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد)، ابتدا، ۶۰ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد (وزنی به حجمی) سدیم آژینات در آب دیونیزه تهیه شد.

هیدروژل‌ها می‌توانند از پلیمرهای طبیعی یا مصنوعی<sup>۱</sup> به دست آیند ([Pishavar et al., 2021](#)). از جمله هیدروژل‌های طبیعی که به عنوان داربست برای بازسازی پوست مورد مطالعه قرار گرفته-اند، می‌توان به سدیم آژینات، هیالورونیک اسید، کیتوسان، ژلاتین و کلاژن اشاره کرد. آژینات خاصیت سمیت سلولی اندک، میزان زنده‌مانی سلولی مناسب و قابلیت تمایز سلول‌ها را دارد و از این‌رو، به عنوان جوهرهای زیستی در چاپ زیستی سلول‌های مختلف کاربرد دارد. آژینات یک پلی‌ساکارید آنیونی و خطی است که در دیواره‌های جلبک خطی یا دریابی یافت می‌شود که از مانوروتات اسید (M) و گلورونیک (G)<sup>۲</sup> تشکیل شده است ([Axpe & Oyen, 2016](#)). این هیدروژل، می‌تواند خود به‌خود شکل بگیرد و جوهرهای زیستی را در pH های کم (پایین‌تر از ۳) تشکیل دهد یا با پیوندهای عرضی یونی با یک کاتیون دوظرفیتی مانند کلسیم ( $Ca^{2+}$ ) و باریم ( $Ba^{2+}$ )، ژل شود ([Mohan et al., 2018](#)). با این وجود، استفاده از آژینات به عنوان یک جوهر زیستی با چالش‌هایی مواجه است. به عنوان مثال، جوهرهای زیستی آژیناتی به طور ذاتی نمی‌توانند اتصال و تکثیر سلولی را پشتیبانی کنند؛ زیرا فاقد بخش‌های تعاملی با سلول‌ها هستند. علاوه بر این، به دلیل عدم وجود آنزیم‌های تجزیه کننده آژینات در پستانداران، نرخ زیست‌تخربی‌پذیری آژینات در محیط درون‌تنی<sup>۳</sup> بسیار کم است. از سوی دیگر، اگرچه ایجاد اتصالات عرضی در نتیجه فرایند شبکه‌ای شدن، زیست‌ساز شیمیایی را بهبود می‌بخشد؛ اما، استفاده از عامل‌های شبکه‌ساز شیمیایی سمی مانند جنبین<sup>۴</sup>، اتیل-۳-۲-۱-اتیل-۱-۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل، کربودی ایمید<sup>۵</sup> (EDC) و ترانس گلوتامیناز<sup>۶</sup> می‌تواند اثرات نامطلوبی مانند آپویتوز برخی از سلول‌ها را داشته باشد و زنده‌مانی سلول‌ها کاهش یابد ([Khalighi & Saadatmand, 2021](#)). از این‌رو، محققان به دنبال رویکردهایی هستند که استفاده از عامل‌های شبکه‌ساز شیمیایی و سمی را کاهش و یا حذف نماید. تحقیقات نشان داده است که آژینات اکسیدشده<sup>۷</sup> و یا آژینات دی-آلدئیدی<sup>۸</sup> نسبت به آژینات معمولی، تجزیه‌پذیری آژینات را در

<sup>7</sup> Transglutaminases

<sup>8</sup> Oxidized Alginate, OA

<sup>9</sup> Alginate dialdehyde (ADA)

<sup>10</sup> Schiff base reaction

<sup>11</sup> Immunogenic

<sup>12</sup> Gomez

<sup>1</sup> Natural or synthesis polymers

<sup>2</sup>  $\beta$ -d-mannuronate acid and  $\alpha$ -l-guluronate acid

<sup>3</sup> Cell-interactive motifs

<sup>4</sup> In vivo

<sup>5</sup> Genipin

<sup>6</sup> 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide

و در یخجال نگهداری شد (Baniasadi et al., 2016).

#### ۲-۲- تهیه جوهر زیستی آژینات اکسیدشده-ژلاتین

ابتدا محلول آژینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون های مختلف (۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) و با غلظت ثابت در دمای محیط<sup>۱</sup> و نیز محلول ژلاتین در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به طور جداگانه در آب دیونیزه<sup>۲</sup> به مدت ۳ ساعت تهیه شدند (Gomez et al., 2007). سپس این دو محلول به یکدیگر اضافه و بر روی همزن به آرامی همزده شدند تا محلول هموژن آژینات اکسیدشده-ژلاتین با غلظت نهایی آژینات اکسیدشده ۴ درصد (وزنی به حجمی) و ژلاتین ۶ درصد (وزنی به حجمی) حاصل شود. براین اساس، ۴ دسته ترکیب هیدروژل حاصل شد که در جدول (۱) مشاهده می شود.

محلول حاصل با محلول آبی پریدات سدیم با غلظت های مختلف در دمای محیط و به مدت ۲۴ ساعت دور از نور، مخلوط شدند. توضیح اینکه، غلظت های مختلف از پریدات سدیم ۰/۲۷، ۰/۴۰ و ۰/۵۴ درصد (وزنی به حجمی) به ترتیب برای درجه اکسیداسیون های ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد اضافه شد. سپس به منظور تکمیل فرایند اکسیداسیون، اتیلن گلیکول به محلول افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط همزده شد. در مرحله بعد، سدیم کلراید (۱ گرم) و اتانول (۴۰ تا ۵۰ میلی لیتر) در حالی که مخلوط بر روی همزن قوار داشت، به آرامی اضافه شدند. پس از ۱۵ دقیقه، رسوب با سانتریفوژ جمع آوری و با آب دیونیزه (۱۰۰ میلی لیتر) دوباره حل شد. سپس مجدد سدیم کلراید و اتانول به مخلوط اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه همزدن، رسوب با سانتریفوژ جمع آوری و با خشک سازی انجام داد، خشک گردید.

جدول ۱- ترکیب هیدروژل های تهیه شده از آژینات اکسیدشده و ژلاتین

شناسه نمونه	درجه اکسیداسیون (OD)	آژینات اکسیدشده (w/v%)	ژلاتین (w/v%)
OD0-OA4-G6	-	۶	۴
OD5-OA4-G6	-	۶	۴
OD7.5-OA4-G6	۷/۵	۶	۴
OD10-OA4-G6	۱۰	۶	۴

(غلظت ۵ درصد وزنی به حجمی) به مدت ۳۰ دقیقه شبکه ای شدند.

#### ۴-۴- مشخصه یابی اکسیداسیون آژینات

به منظور تعیین درجه اکسیداسیون آژینات با استفاده از طیف- سنجی مرئی- فرابینفس<sup>۳</sup>، ابتدا محلول شناساگر<sup>۴</sup> با ترکیب حجم های مساوی از محلول های ۲۰ درصد (حجمی به وزنی) یدات پتاسیم (KI) و ۱ درصد (حجمی به وزنی) نشاسته قابل حل، تهیه شد که خصوصیات بافر به عنوان حلال با pH برابر ۷ مورد استفاده قرار گرفت. قبل از اضافه کردن اتیلن اکساید به محلول اکسیداسیون، ۱ میلی لیتر از محلول، با افزودن آب دیونیزه، تا ۲۵۰

#### ۳-۳- فرایند چاپ زیستی سه بعدی

فرایند چاپ زیستی سه بعدی با استفاده از یک دستگاه چاپگر زیستی سه بعدی اکستروژنی (مدل N2 3DPL bioprinter) ساخته شده توسط شرکت 3DPL انجام شد. این دستگاه دارای دو نازل با نیروی فنوتکنیکی با فشار بین ۰/۲ تا ۷۰۰ کیلوپاسکال و تنظیم کننده دما تا حداقل ۱۷۵ درجه سلسیوس است. سپس داریست های آژینات اکسیدشده-ژلاتین از یک سرنگ با قطر داخلی ۰/۸۳۸ میکرون (G18) چاپ شدند. سرعت چاپ ۵ میلی متر بر ثانیه، فشار ۰/۹ بار (Bar) و چاپ در دمای محیط انجام شد. صحت و دقت رسوب جوهرهای زیستی با چاپ زیستی سه بعدی مدل پوستی مشبک ۴ لایه ای به ابعاد ۲۰×۲۰×۲ میلی متر، بررسی شد. پس از اتمام فرایند چاپ، نمونه ها با CaCl<sub>2</sub>

<sup>3</sup> Ultraviolet and Visible Spectroscopy

<sup>4</sup> Indicator solution

<sup>1</sup> Room Temperature (RT)

<sup>2</sup> Deionized water

استفاده از صافی‌های ۰/۴۵ میکرون فیلتر شدند. سرعت جریان (۱ میلی‌لیتر بر دقیقه) و حجم تزریق ۲۰۰۰۰ میلی‌لیتر بود. استانداردهای Polyethylene glycol/Polyethylene oxide (PEG/PEO) به منظور کالبیراسیون استفاده شد. به منظور بررسی ساختار شیمیایی و فیزیکی قبل و بعد از اصلاح شیمیایی اکسیداسیون، آزمون رزونانس مغناطیسی هسته<sup>۶</sup> (NMR) انجام شد. ابتدا نمونه‌ها در آب سنگین ( $D_2O$ ) با غلاظت ۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر حل شدند. آزمایش‌های NMR با استفاده از یک دستگاه اسپکترومتر مدل VARIAN-INOVA 500MHz در دمای ۶۰ درجه سلسیوس با اسکن‌های ۲۴ و ۵۰۰۰۰ به ترتیب از پروتون و کربن انجام شد. مدت زمان تأخیر ۲۰ ثانیه و جابجایی‌های شیمیایی نسبت داده شده به مرجع خارجی ترا متیل سیلان<sup>۷</sup>، ۴ بود ([Gomez et al., 2007](#)).

به منظور تعیین خواص رئولوژی جهت بهینه‌سازی پارامترهای چاپ سه‌بعدی، آنالیز رفت‌وبرگشتی بسامدی<sup>۸</sup>، آنالیز رفت‌وبرگشتی سرعت برشی<sup>۹</sup> و آزمون بازیابی<sup>۱۰</sup> انجام شد. خواص رئولوژی هیدروژل‌ها با استفاده از یک دستگاه رئومتر مدل MCR 501S (AntonPaar, Austria) در حالت بسامدی با استفاده از یک هندسه مخروط و صفحه<sup>۱۱</sup> با قطر ۵۰ میلی‌متر و زاویه رأس مخروط ۲ درجه، در دمای محیط صورت گرفت. آزمون رفت‌وبرگشت بسامدی در ناحیه خطی (کرنش ۵ درصد) از بازده ۰/۰۱ تا ۰/۰۱ هرتز رسم شد تا مدول ذخیره (G') و مدول اتلاف (G'') به دست آید. برای جلوگیری از تبخیر حلال در طی اندازه‌گیری، روغن سیلیکون در اطراف نمونه به کار برده شد ([Emami et al., 2018](#)). آزمون رفت‌وبرگشتی سرعت برشی از سرعت برشی ۰/۰۱ تا ۱۰۰ رسل شد. آزمون بازیابی به منظور مقایسه قابلیت بازیابی نمونه‌ها، در سه مرحله انجام شد: ۱- سرعت شیاری (S<sup>-1</sup>)/۰ به مدت ۶۰ ثانیه، ۲- سرعت شیاری (S<sup>-1</sup>) ۱۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه و ۳- سرعت شیاری (S<sup>-1</sup>)/۰ به مدت ۶۰ ثانیه ([Kim et al., 2019](#)).

## ۵-۲- مشخصه‌یابی جوهر زیستی (آلزینات اکسیدشده)

میلی‌لیتر رقيق شد. سپس ۳ میلی‌لیتر از محلول رقيق شده با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول شناساگر مخلوط شد و حجم نهایی با افرودن آب دیونیزه به ۵ میلی‌لیتر رسید. جذب کمپلکس تریداین-نشاسته<sup>۱</sup> به سرعت توسط دستگاه طیف‌سنجد مرهی-فرابنفش مدل WPA در ۴۸۶ نانومتر مشاهده شد ([Gomez et al., 2007](#)). بازده اکسیداسیون<sup>۲</sup> مطابق معادله (۱) براساس نسبت مقدار پریدات مصرف شده به میزان پریدات اولیه محاسبه می‌شود.

$$\text{معادله (۱)} \quad \frac{\text{پریدات مصرفی (mol)}}{\text{پریدات کل (mol)}} \times 100 = \text{بازده اکسیداسیون (\%)}$$

درجه اکسیداسیون<sup>۳</sup> آلزینات نیز براساس میزان درصد سدیم پریدات که قبل از تکمیل واکنش اکسیداسیون با اتیلن‌گلیکول مصرف شده است، محاسبه می‌شود و بر اساس معادله (۲) به دست می‌آید.

$$\text{معادله (۲)} \quad \frac{m_w \times n}{m} \times 100 = \text{درجه اکسیداسیون (\%)}$$

دراین رابطه  $m_w$  وزن مولکولی واحد تکرارشونده آلزینات (۱۹۸/۰۱۹۸)،  $n$  میزان سدیم پریدات مصرفی قبل از اضافه نمودن اتیلن‌گلیکول بر حسب مول و  $m$  جرم سدیم آلزینات اولیه است.

طیف‌سنجدی مادون‌قرمز تبدیل فوریه<sup>۴</sup> با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفوتومتر انجام شد. همه طیف‌ها با میانگین ۶۴ اسکن از بازده ۴۰۰ تا (Cm<sup>-1</sup>) ۴۰۰۰ و در دمای محیط اندازه‌گیری شدند ([Khoshnood et al., 2021](#)).

تعیین وزن مولکولی قبل و بعد از فرایند اکسیداسیون با آنالیز کروماتوگرافی نفوذ ژل<sup>۵</sup>، انجام شد. دستگاه GPC مدل Agilent 1100 با آب دیونیزه به عنوان فاز متحرک با غلاظت ۰/۵ درصد مولار، با گاز زدایی تحت خلا و صافی (۰/۲ میکرون) مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های پلیمری، قبل از تزریق، با

<sup>۶</sup> Nuclear magnetic resonance (NMR)

<sup>۷</sup> Tetramethylsilane signal

<sup>۸</sup> Frequency sweep test

<sup>۹</sup> Shear rate sweep test

<sup>۱۰</sup> Recovery

<sup>۱۱</sup> Cone and plate

<sup>۱</sup> Triiodine-starch coplex

<sup>۲</sup> Yield of oxidation (YO)

<sup>۳</sup> Oxidation Degree (OD)

<sup>۴</sup> Fourier transform infrared (FTIR)

<sup>۵</sup> Gel permeation chromatography (GPC)

ژلاتین)

درجه شبکه‌ای شدن با آزمون نین هیدرین<sup>۳</sup> برای مطالعه گروه‌های آمین باقی‌مانده در ترکیب هیدروژل استفاده شد. بدین منظور ابتدا، ۰/۵ گرم از نمونه‌ها با محلول نین هیدرین با غلظت ۲ درصد (وزنی به حجمی) در دمای ۱۰۰ درجه سلسیوس به-مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده شدند. جذب نوری از محلول حاصل شده در طول موج ۵۷۰ نانومتر با دستگاه خوانشگر الایزا<sup>۴</sup> ثبت و درجه شبکه‌ای شدن از معادله (۴) محاسبه شد که  $A_c$  و  $A_u$  به ترتیب جذب داربست‌های شبکه‌ای شده و شبکه‌ای نشده را بیان می‌کند ([Pourmollaabbassi et al., 2022](#)).

معادله (۴)

$$\text{معادله (۴)} = \left( 1 - \left( \frac{A_c}{A_u} \right) \right) \times 100$$

به منظور تعیین زمان ژلی شدن چوهرهای زیستی، ابتدا در یک بشر با قطر ۲۰ میلی‌متر، ۲/۵ میلی‌لیتر آلتینات اکسید شده ۴ درصد وزنی با سرعت ۲۵۰ دور بر دقیقه با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول ژلاتین ۶ درصد وزنی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با استفاده از مغنت مغناطیسی ۱ سانتی‌متری مخلوط شد. سپس از زمان شروع اضافه نمودن محلول‌ها تا توقف کامل مغنت، به عنوان زمان ژل شدن هیدروژل‌ها ثبت شد ([Mo et al., 2000](#)).

داشت، به دست آمد. با قرار دادن  $x$  در معادله خط  $y = ۰/۰۷۹۲x + ۰/۰۷۹۲$  غلظت پریدات مصرف‌نشده حاصل شد. از این‌رو، بازده و درجه اکسیداسیون واقعی از معادلات (۱) و (۲) به دست آمد که در جدول (۲) خلاصه شده است. بازده اکسیداسیون در درجه اکسیداسیون تئوری ۵/۷ و ۱۰ درصد، به ترتیب ۳۷/۹۷، ۳۷/۹۷ و ۴۶/۹۷ درصد و درجه اکسیداسیون واقعی به ترتیب ۶/۸۴ و ۴/۷۱ درصد محاسبه شد.

به منظور چاپ‌پذیری، عکس از نمونه‌های چاپ‌شده با دوربین ۱۲ مگاپیکسل (۱/۴ میکرومتر اندازه پیکسل) گرفته شد و از نرم‌افزار (NIH, USA) ImageJ به منظور بررسی تصاویر آستانه<sup>۱</sup> و اندازه‌گیری ابعاد استفاده شد. مقایسه با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام و از  $p$ -value برای نشان دادن تفاوت معنی‌دار استفاده شد. برای هر آزمون بررسی چاپ‌پذیری، از میانگین نتایج سه نمونه استفاده شد. سپس مساحت ناحیه چاپ‌شده ( $A_i$ ) ( $\text{mm}^2$ ) با مساحت طرح ( $A_0$ ) ( $\text{mm}^2$ ) مقایسه شد تا با استفاده از معادله (۳) درصد چاپ‌پذیری برای هر نمونه به دست آید ([Di Giuseppe et al., 2018](#)).

معادله (۳)

$$p = \left( 1 - \frac{A_0 - A_i}{A_i} \right) \times 100$$

جهت تعیین زاویه تماس به منظور تعیین خاصیت ترشوندگی<sup>۲</sup>، ابتدا آب دیونیزه (۴ میکرولیتر) به آرامی روی سطح نمونه‌ها ریخته شد. برای هر نمونه حداقل ۳ آزمون در نقاط نزدیک به هم انجام شد و زاویه تماس در زمان ۱۰ ثانیه با استفاده از دوربین رنگی صنعتی مدل ۶۱۸U۲۳DFK به کمک یک عدسی ۲X ثبت شد ([Pourmollaabbassi et al., 2022](#)).

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- مشخصه‌یابی آلتینات اکسید شده

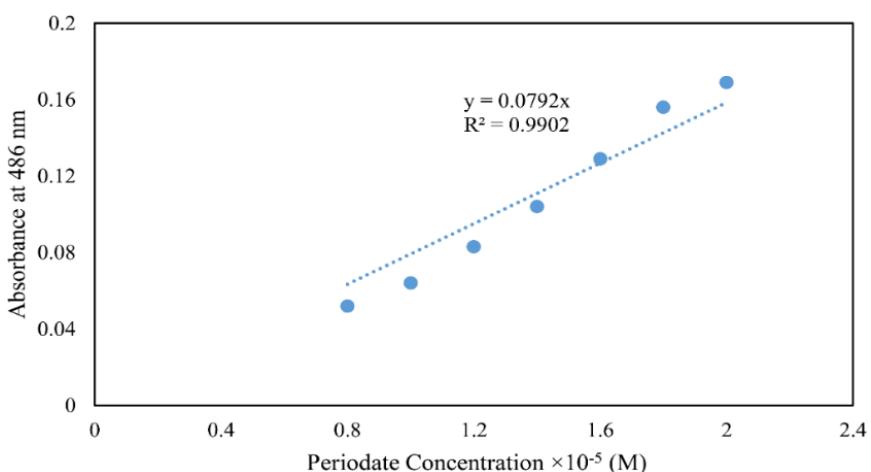
به منظور تعیین درجه اکسیداسیون (OD) و بازده اکسیداسیون (YO)، ابتدا نمودار استاندارد جذب یون پریدات ( $\text{IO}_4^-$ ) از  $۰/۰\text{x} \times 10^{-۵}$  تا  $۲ \times 10^{-۵}$  مولار با استفاده از آنالیز طیف-سنجدی مرئی-فرابنفش رسم شد (شکل ۱). مقدار X براساس این که محلول قبل از اضافه نمودن اتیلن گلیکول چه میزان جذب

<sup>3</sup> Ninhydrin

<sup>4</sup> ELIZA Reader

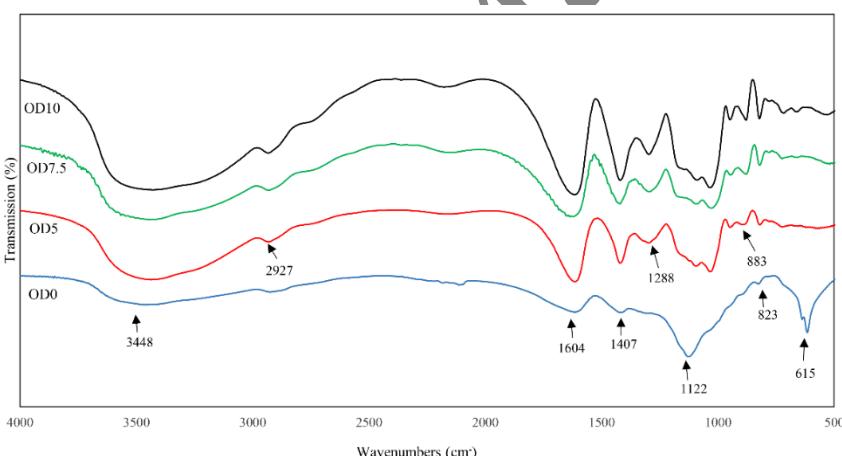
<sup>1</sup> Threshold images

<sup>2</sup> Wettability

شکل ۱- جذب یون پریدات ( $\text{IO}_4^-$ ) در ۴۸۶ نانومتر برای غلظت‌های مختلف

جدول ۲- تعیین بازده اکسیداسیون (درصد) و درجه اکسیداسیون (OD) از آنالیز اسپکتروسکوپی UV-Vis

نمونه	بازده اکسیداسیون (%)	درجه اکسیداسیون (OD)
٪ ۴/۸۶	٪ ۹۷/۳۷	۵
٪ ۷/۴۱	٪ ۹۷/۱۳	۷/۵
٪ ۹/۸۴	٪ ۹۷/۲۰	۱۰



شکل ۲- آنالیز طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه از سدیم آژرینات بدون اکسیداسیون (OD0) و اکسیدشده با سدیم پویلیات (OD7.5, OD5 و OD10)

در شکل (۲) طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه از آژرینات و بعد از اکسیداسیون به میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد، مشاهده می‌شود. در نمودار آژرینات، نوارهای گستردگی در ۶۱۵ و  $3448\text{ cm}^{-1}$  قابل رویت است که به گروه‌های هیدروکسیل مرتبط است (Dahlan et al., 2020)، و دو قله تیز مربوط به گروه کربوکسیل تغییر نخواهند کرد. همچنین شدت حالت کشش گروه کربوکسیل  $\text{OH}-\text{C-O-C}$  (اتر حلقوی) مربوط است، جابجا شده است (Emami et al., 2018). یک نوار

(He et al., 2016; Rastegar Ramsheh et al., 2020) در طیف‌های FTIR آژرینات اکسیدشده، قله‌های مربوط به گروه کربوکسیل تغییر نخواهند کرد. همچنین شدت حالت کشش گروه کربوکسیل  $\text{OH}-\text{C-O-C}$  (اتر حلقوی) مربوط است، جابجا شده است (Emami et al., 2018).

در شکل (۲) طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه از آژرینات و بعد از اکسیداسیون به میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد، مشاهده می‌شود. در نمودار آژرینات، نوارهای گستردگی در ۶۱۵ و  $3448\text{ cm}^{-1}$  قابل رویت است که به گروه‌های هیدروکسیل مرتبط است (Dahlan et al., 2020)، و دو قله تیز در ۱۶۰۴ و  $1407\text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به نوار کششی نامتقارن و متقارن گروه‌های کربوکسیل (COO) است. همچنین دو قله در

که برابر با نسبت انتگرال پروتون‌های گروه متیل ( $\text{CH}_3^3$ ) که در آژینات قبل از واکنش اکسیداسیون وجود داشته‌اند، به پروتون‌های گروه متیل که در حین اصلاح شیمیایی اکسیداسیون آژینات، تشکیل شده‌اند، می‌باشد (Jeon et al., 2012). براین‌اساس، درجه اکسیداسیون واقعی از آنالیز NMR برای آژینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به ترتیب برابر است با ۴/۸۲، ۴/۴۵ و ۹/۶۷. نتایج حاصله از آزمون HNMR نشان داد که درجه اکسیداسیون به دست آمده از این آنالیز در تطابق با درجه اکسیداسیون به دست آمده از آنالیز اسپکتروسکوپی UV-Vis می‌باشد.

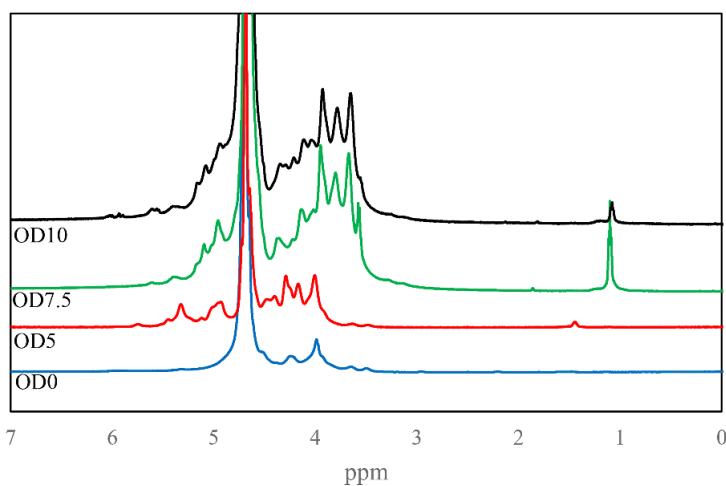
از آنجایی که وزن مولکولی آژینات اکسیدشده، به طور مؤثر بر خواص مکانیکی و تخریب‌پذیری هیدروژل تاثیرگذار است، وزن مولکولی آژینات اکسیدشده به روش کروماتوگرافی نفوذ ژل (GPC) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از این آزمون، میانگین وزنی مولکولی ( $M_w$ )، میانگین عددی مولکولی ( $M_n$ ) و شاخص پراکندگی<sup>۳</sup> (PDI) برای آژینات، قبل و بعد از اکسیداسیون با درجه اکسیداسیون ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به دست آمد که در جدول (۳) گردآوری شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقدار میانگین وزن مولکولی با اکسیداسیون به سرعت کاهش می‌یابد. میانگین وزن مولکولی قبل از فرایند اصلاح شیمیایی اکسیداسیون ۱۶۴۰۰۰ گرم بر مول بود که پس از فرایند اکسیداسیون برای هرچه اکسیداسیون‌های ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به ترتیب به ۵۲۷۲۰، ۳۹۴۰۰ و ۳۱۷۰۰ گرم بر مول (دالتون) کاهش یافت. این کاهش در وزن مولکولی به دلیل شکستن زنجیره اصلی آژینات می‌باشد که در نتیجه اکسیداسیون رخ می‌دهد. از سوی دیگر، این کاهش وزن مولکولی برای کاربردهای بیومواد مطلوب است؛ چرا که آژینات با میانگین وزن مولکولی (Mw) کمتر از ۸۰۰۰۰ گرم بر مول به راحتی از بدن انسان دفع می‌شود (Gomez et al., 2007).

مشخصه جدید که طبق معمول در محدوده  $1751\text{-}725 \text{ cm}^{-1}$  در نمودار آژینات اکسیدشده پدیدار می‌شود، به دلیل تعادل با همی-استال‌ها مشاهده نشد؛ زیرا گروه‌های آلدئیدی تشکیل شده به دلیل واکنش پذیری بالا، می‌توانند با گروه‌های هیدروکسیل مجاور واکنش دهند و همی‌استال‌های درون‌مولکولی و بین‌مولکولی تشکیل دهن (Emami et al., 2018; Reakasame & Boccaccini, 2018) حضور گروه آلدئیدی در آژینات اکسیدشده را می‌توان به طور غیرمستقیم از تأثیر آن بر سایر گروه‌ها که منجر به تغییر در قله‌های آنها می‌شود، تأیید کرد. به عنوان مثال قله‌ها در  $1604\text{ and }288 \text{ cm}^{-1}$  تیزتر شده‌اند. همچنین قله دیگری که در حدود  $2927 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده می‌شود به پیوند C-H در گروه آلدئیدی مربوط است (Khalighi & Saadatmand, 2021) همی‌استال تشکیل شده، نسبت داده می‌شود (Sanz-horta et al., 2022) در طیف FTIR نمونه‌های اکسیدشده، شدت قله  $3448 \text{ cm}^{-1}$  به علت شکافته شدن پیوندهای گلیکوزیدی<sup>۱</sup> و تشکیل گروه‌های هیدروکسیلی مضاعف ( $\text{OH}^1$ )، افزایش پیدا کرده است و هرچه درجه اکسیداسیون افزایش یافته، بر شدت این قله‌ها نیز افزوده شده است (Emami et al., 2018).

در شکل (۳) آنالیز طیف‌سنجدی رزونانس مغناطیسی هسته (HNMR) از آژینات و آژینات اکسیدشده به میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد مشاهده می‌شود. همان‌طور که در نمودار آژینات قبل از اکسیداسیون قابل مشاهده است، نسبت بلوک‌های G/G و G/G به ترتیب  $0/84$  و  $0/131$  است. در نمونه‌های آژینات اکسیدشده، در قله‌های مربوط به بلوک‌های مانورونیک اسید (M) و گلورونیک اسید (G) جابجایی رخ می‌دهد. همچنین دو قله جدید در حوالی  $4/93$  و  $5/32$  پدیدار می‌شود که به پروتون همی‌استال‌های تشکیل شده از گروه‌های آلدئیدی و گروه‌های هیدروکسیل مجاور مربوط می‌شود (Gomez et al., 2007). درجه اکسیداسیون واقعی از آنالیز HNMR نیز به دست می‌آید

<sup>2</sup> Polydispersity

<sup>1</sup> Glycosidic bonds



شکل ۳- آنالیز طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته از آژینات و آژینات اکسیدشده به میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد

جدول ۳- مشخصات آژینات اصلاح شده با سدیم پریدات به میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد با آزمون کروماتوگرافی نفوذ ژل (GPC)

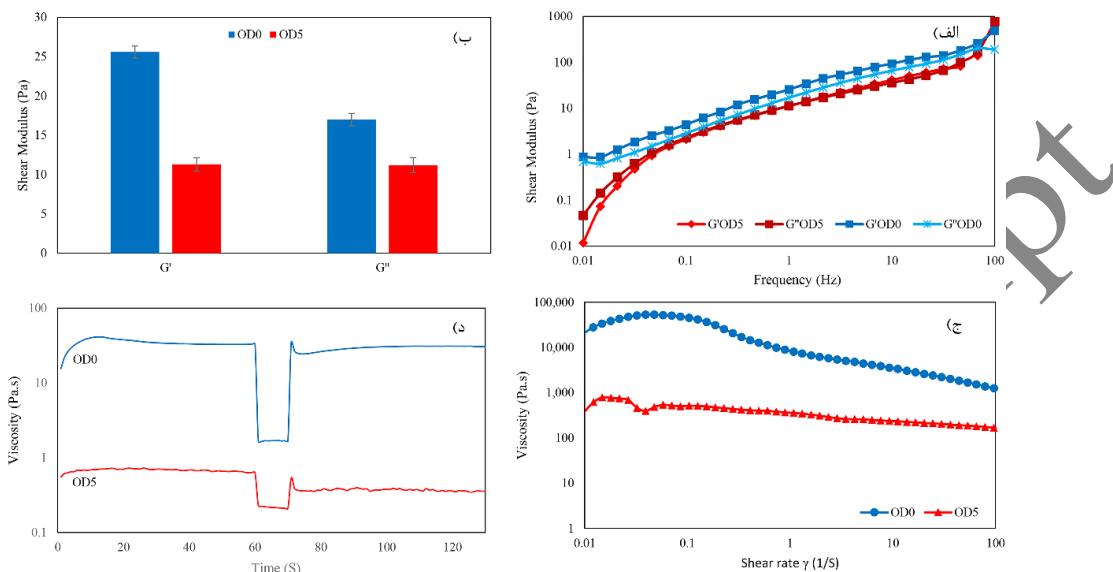
درجه اکسیداسیون (OD) (%)	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	(PDI) Mw/Mn
۰	۱۶۴۰۰	۷۶۶۰۰	۲/۱۴
۵	۵۲۷۴۰	۲۶۹۰۰	۱/۹۶
۷/۵	۳۹۴۹۰	۲۱۲۰۰	۱/۸۵
۱۰	۳۱۷۰۰	۱۷۵۰۰	۱/۸۱

میزان مدول ذخیره ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) ۱۲/۳ و مدول اتلاف ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) ۱۱/۲ است که نشان می‌دهند با اکسیداسیون آژینات، مدول اتلاف و ذخیره هر دو کاهش یافته‌اند ( $p\text{-value} < 0.05$ ). نمودار ویسکوزیته بر حسب سرعت برشی در شکل (۴-ج) مشاهده می‌شود. براین اساس، با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته کاهش یافته است و در همه سرعت‌های برشی، ویسکوزیته آژینات بیشتر از ویسکوزیته آژینات اکسیدشده است. با توجه به این که با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته کاهش یافته است، هیدروژل‌ها، رفتار سیال غیرنیوتی<sup>۳</sup> و شبه پلاسیک‌ها<sup>۴</sup> را از خود به نمایش می‌گذارند. شکل (۴-د) رفتار بازیابی نمونه‌های آژینات و آژینات اکسیدشده را نشان می‌دهد. ویسکوزیته اولیه آژینات ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) ۴۰/۶ بود که با بکارگیری سرعت برشی ( $\text{S}^{-1}$ ) ۱۰۰، به  $1/67$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) کاهش یافت. پس از حذف سرعت برشی، ویسکوزیته در زمان ۱ ثانیه، تا  $34/6$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ ) افزایش یافت که

آزمون بسامدی رفت و برگشتی آژینات و آژینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون ۵ درصد و با غلظت ۴ درصد (وزنی به حجمی) در دمای محیط در شکل (۴-الف) قابل مشاهده است. تصاویر نشان می‌دهد که در هر دو نمودار آژینات قبل و بعد از اکسیداسیون، با افزایش بسامد، مدول ذخیره ( $G'$ ) و مدول اتلاف ( $G''$ ) هر دو افزایش می‌یابند. همچنین از این نمودار، مدول ذخیره و مدول اتلاف در بسامد (rad/s)<sup>1</sup> به دست آمد (Kim et al., 2019)، که به صورت نمودار ستونی در شکل (۴-ب) رسم شد. براین اساس، مدول ذخیره ( $G'$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ )) ۲۵ و مدول اتلاف ( $G''$  ( $\text{Pa}\cdot\text{s}$ )) ۱۷ است، که نشان می‌دهد آژینات در حالت ژلی شدن قرار دارد. نسبت مدول اتلاف به مدول ذخیره که به تانژانت اتلاف<sup>۱</sup> ( $\tan \delta$ ) معروف است، اگر کمتر از ۱ باشد، هیدروژل در حالت مایع قرار ندارد (Gao et al., 2018). همچنین در آژینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون ۵ درصد،

<sup>3</sup> Pseudoplastic<sup>1</sup> Loss tangent<sup>2</sup> Non-Newtonian

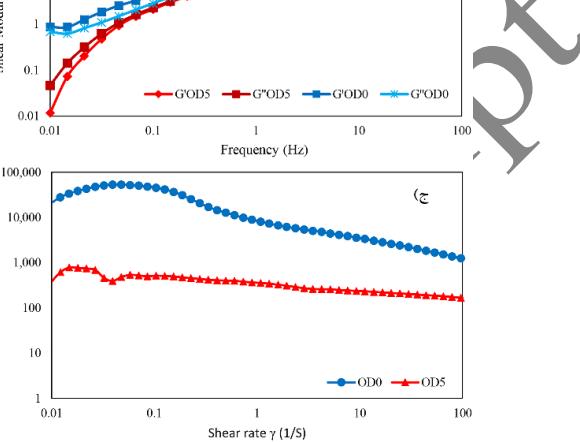
به (Pa·s) ۰/۳۸۹ افزایش یافت که نشان می‌دهد ۵۷ درصد ویسکوزیته اولیه بازیابی شده است. این نتایج نشان می‌دهند هم آژینات و هم اکسید آن، رفتار بازیابی مناسبی از خود نشان می‌دهند؛ اگرچه بازیابی آژینات از اکسید آن بسیار بهتر است.



شکل ۴- خواص رئولوژی آژینات و آژینات اکسیدشده با غلظت (w/v)% ۴ در دمای محیط در بسامد زاویه‌ای (rad/s) ۱، (الف) مدول‌های ذخیره و اتلاف، (ب) نمودار ستونی مدول‌های ذخیره و اتلاف، (ج) ویسکوزیته با تغییرات سرعت شیاری (S⁻¹) ۱۰۰ تا ۰/۱، (د) رفتار بازیابی با سرعت شیاری (S⁻¹) ۱۰۰ در زمان ۰ تا ۶۰ ثانیه و ۷۰ تا ۱۳۰ ثانیه، سرعت شیاری (S⁻¹) ۱۰۰ در بازه زمانی ۶۰ الی ۷۰ ثانیه.

اکسیداسیون آژینات در جوهر زیستی، چاپ پذیری کاهش یافته است. خاصیت ترشوندگی با بررسی زاویه تماس قطره آب دیونیزه (۴ میکرومتر) در لحظه ۱۱ ثانیه بدست آمد. زاویه تماس یکی از پارامترهای مهم برای تعیین قابلیت ترشوندگی سطح ماده است. زاویه تماس، زاویه بین سطح جامد و یک قطره از مایع بر روی سطح است. ترشوندگی سطح بیومتریال به شیمی و زبری سطح بستگی دارد. زاویه تماس در سطوح آبدوست کمتر از ۹۰ درجه است؛ در حالی که بالاتر از این مقدار، ماده آب‌گریز محسوب می‌شود (Yyas et al., 2021). همان‌طور که در شکل (۷) مشاهده می‌شود، میزان زاویه تماس در زمان ۱۰ ثانیه در سه نمونه-OD5، OD7.5-OA-G و OD10-OA-G به ترتیب ۵۱/۳۹، ۴۸/۲۱ و ۴۱/۲۱ درجه است؛ ازین‌رو، زاویه تماس در همه نمونه‌ها در محدوده سطح آبدوست (کمتر از ۹۰ درجه) قرار دارد. با افزایش درجه اکسیداسیون آژینات، آبدوستی جوهر

بیانگر بازیابی ویسکوزیته اولیه تا میزان ۷۴ درصد است. در نمونه آژینات اکسیدشده، ویسکوزیته اولیه (Pa·s) ۰/۷ بود که با به کارگیری سرعت برشی (S⁻¹) ۱۰۰، به ۰/۲۱۶ (Pa·s) کاهش یافت. پس از حذف سرعت برشی، در مدت ۱ ثانیه، ویسکوزیته



### ۲-۳- مشخصه‌یابی جوهر زیستی آژینات-ژلاتین

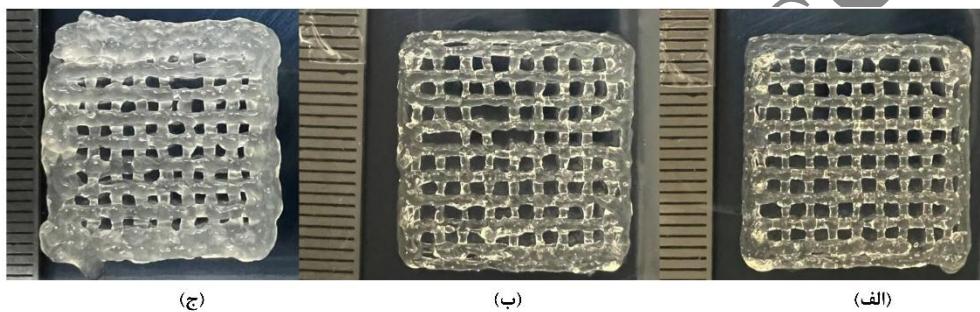
تصویر سیالیت‌پذیری (شکل ۵) هر سه جوهر زیستی آژینات اکسیدشده-ژلاتین (به نام‌های OD5-4OA-6G، OD5-4OA-6G و OD10-4OA-6G)، نشان‌دهنده رفتار ژل مانند در دمای فرایند (۲۰ درجه سلسیوس) پس از ۶۰ دقیقه از شروع زمان اضافه شدن محلول ژلاتین به محلول آژینات اکسیدشده است. به منظور تعیین کمیت‌های چاپ‌پذیری، ابتدا جوهرهای زیستی تهیه شدند و پس از فرایند چاپ سه‌بعدی، چاپ‌پذیری با استفاده از نرم‌افزار Zjege و با حداقل ۳ بار تکرار محاسبه شد. تصاویر طرح‌های مشبك چاپ شده از جوهرهای زیستی OD5-OA-G، OD5-OA-G و OD10-OA-G در شکل (۶) قابل مشاهده است. صحت چاپ جوهر زیستی با درصد اکسیداسیون ۵/۷ و ۱۰ درصد به ترتیب ۸۱، ۹۱ و ۴۳ درصد است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، نمونه OD5-OA-G چاپ‌پذیری بالاتری را نسبت به دو نمونه دیگر از خود نشان می‌دهد و با افزایش درصد

فراهم می‌کند. همچنین در محیط فیزیولوژیکی، برهمکنش‌های برگشت‌پذیر دینامیکی مانند پیوند کوالانتسی پایه شیف دوباره فعال می‌گردد ([Yuan et al., 2020](#)).

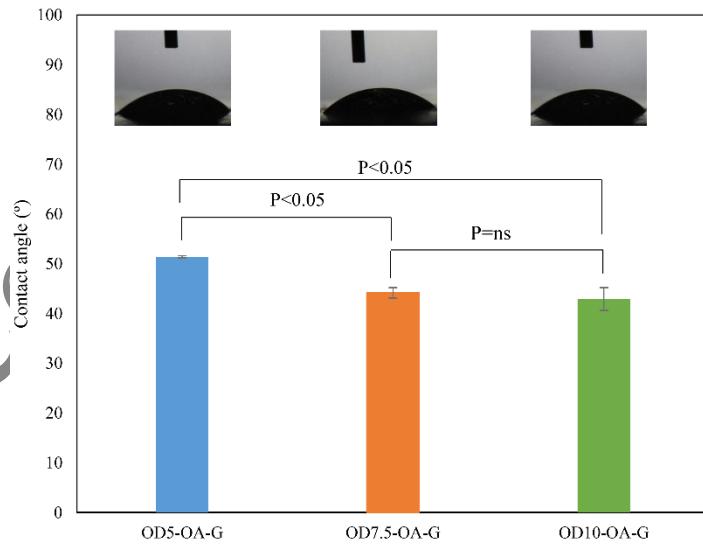
زیستی آژینات-ژلاتین افزایش یافته است. آب علاوه‌بر متورم کردن قسمت‌های آسیب‌دیده، سیالیت خاصی را به بخش‌های آسیب‌دیده داربست می‌دهد. هنگامی که سطح ماده در تماس با آب است، سیالیت خاصی را برای بخش‌های آسیب‌دیده نمونه



شکل ۵- تصویر سیالیت‌پذیری هیدروژل‌ها ۶۰ دققه پس از تهیه هیدروژل



شکل ۶- داربست چاپ شده، (الف) OD5-OA-G، (ب) OD7.5-OA-G و (ج) OD10-OA-G



شکل ۷- اندازه‌گیری زاویه تماس جوهرهای زیستی آژینات اکسیداسیون‌های متغیر ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد

۴۶ و ۳۷ دقیقه است که همه این زمان‌ها به منظور کاربردهای بالینی مناسبند ([Sanz-horta et al., 2022](#)). همچنین این نتایج نشان می‌دهد که درجه اکسیداسیون بیشتر منجر به واکنش سریع آژینات اکسیدشده و کوتاه‌تر شدن زمان ژلی شدن هیدروژل‌های

میزان درجه شبکه‌ای شدن داربست‌های آژینات اکسیدشده-ژلاتین و زمان تشکیل ژل در جدول (۴) فهرست شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود زمان ژلی شدن برای نمونه‌های OD10-OA-G، OD7.5-OA-G و OD5-OA-G به ترتیب ۷۴،

وزنی آژینات اکسیدشده و طول زنجیره پلیمری بر درجه شبکه-ای شدن داربست‌های آژینات اکسیدشده-ژلاتین مؤثرند (Hajiabbas et al., 2020). باراکریشان<sup>۲</sup> و همکارانش نشان دادند که با افزایش درجه اکسیداسیون آژینات از ۲۷ به ۸۷ درصد، زمان ژلی شدن کاهش و درجه شبکه‌ای شدن افزایش یافته است (Balakrishnan & Jayakrishnan, 2005). همچنین حاجی عباس<sup>۳</sup> و همکارانش نشان دادند که با افزایش درصد اکسیداسیون زمان ژلی شدن کاهش داشته؛ اما روند مشخصی در درجه شبکه‌ای شدن مشاهده نشده است (Hajiabbas et al., 2020).

ADA-G می‌شود. همچنین میزان درجه شبکه‌ای شدن به-دست‌آمده از آزمون نین هیدرین برای هیدروژل‌های (آژینات-ژلاتین) با درجه اکسیداسیون ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به ترتیب ۴۵/۴۱، ۴۳/۴۰ و ۴۶/۰۱ درصد است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش درجه اکسیداسیون آژینات در جوهرهای زیستی آژینات اکسیدشده-ژلاتین، روند افزایشی یا کاهشی مشخصی در درجه شبکه‌ای شدن مشاهده نمی‌شود. عوامل مختلفی بر درجه شبکه‌ای شدن تأثیرگذارند، مانند: درجه اکسیداسیون آژینات (OD) و غلظت ژلاتین (G). همچنین، عوامل پیچیده دیگری همچون تغییر شکل<sup>۱</sup> پلیمرهای مورداستفاده، میانگین

جدول ۴- درجه شبکه‌ای شدن و زمان ژلی شدن هیدروژل‌های پایه آژیناتی

نمونه‌ها	OD5-OA-G	OD7.5-OA-G	OD10-OA-G
درجه اکسیداسیون (درصد)	۵	۷/۵	۱۰
زمان ژلی	۷۴	۴۶	۳۷
ای شدن (دقیقه) (درصد)	٪ ۴۵/۴۱	٪ ۴۳/۴۰	٪ ۴۶/۰۱

اکسیدشده-ژلاتین) با درجه اکسیداسیون ۵ درصد، چاپ‌پذیری مناسبی تسبیت به جوهرهای زیستی با درجه اکسیداسیون‌های آژینات ۷/۵ و ۱۰ درصد از خود نشان داده است. نتایج درجه شبکه‌ای شدن و زمان ژلی شدن برای این داربست نشان داد که برای کاربردهای پالیسی مناسب است. به علاوه بررسی زاویه تماس به منظور مطالعه قابلیت ترشوندگی نشان داد که جوهرهای زیستی پایه آژیناتی، زاویه تماس کمتر از ۹۰ درجه دارند که بیانگر آبدوست بودن سطوح آنها و توانایی آنها در جذب پروتئین‌ها و سلول‌های است.

## ۵- سپاسگزاری

این مقاله در راستای پژوهه دکتری مهندسی پزشکی (گرایش بیومتریال) در پژوهشگاه مواد و انرژی انجام شده است. با سپاس از کلیه اساتید محترم که در غنای عملی مطالب حاضر،

## ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش اکسیداسیون آژینات با درجه اکسیداسیون‌های مختلف (۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) انجام شد و جوهرهای زیستی آژینات اکسیدشده-ژلاتین (۴ درصد وزنی به حجمی آژینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون‌های مختلف ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) به همراه ۶ درصد (وزنی به حجمی) ژلاتین) تهیه شدند که در طی یک فرایند دو مرحله‌ای (قبل و بعد از فرایند چاپ سه‌بعدی) شبکه‌ای شدند. سپس جوهرهای زیستی پایه آژیناتی تهیه شده، از طریق فرایند چاپ زیستی سه‌بعدی اکستروژنی، چاپ شدند. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش درجه اکسیداسیون آژینات از ۵ به ۱۰ درصد، میانگین وزنی ( $M_w$ ) آژینات کاهش می‌یابد؛ از سوی دیگر، این کاهش وزن به صورتی انجام شده است که آژینات و مشتقهای آن بتوانند به راحتی از بدن انسان و از طریق کلیه دفع شوند. همچنین جوهر زیستی (آژینات

<sup>۳</sup> Maryam Hajiabbas

<sup>۱</sup> Deformation

<sup>۲</sup> Biji Balakrishnan

Khalighi, S., & Saadatmand, M. (2021). Bioprinting a thick and cell-laden partially oxidized alginate-gelatin scaffold with embedded micro-channels as future soft tissue platform. *International Journal of Biological Macromolecules*, 193, 2153–2164.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.046>

Khoshnood, N., Zamani, A., & Abbasi, M. (2021). The potential impact of polyethylenimine on biological behavior of 3D-printed alginate scaffolds. *International Journal of Biological Macromolecules*, 178, 19–28.

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.02.152>.

Kim, M. H., Lee, Y., Jung, W.-K., Oh, J., & Nam, S. Y. (2019). Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion-based bioprinting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 98, 187–194. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.06.014>

Ming, J., Pan, F., & Zuo, B. (2015). Structure and properties of protein-based fibrous hydrogels derived from silk fibroin and sodium alginate. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 74(3), 774–782. <https://doi.org/10.1007/s10971-015-3662-z>

Mo, X., Iwata, H., Matsuda, S., & Ikada, Y. (2000). Soft tissue adhesive composed of modified gelatin and polysaccharides. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 11(4), 341–351. <https://doi.org/10.1163/156856200743742>.

Mohan, T., Maver, T., Tiglic, A. D., Stana-Kleinschek, K., & Kargl, R. (2018). 3D bioprinting of polysaccharides and their derivatives: From characterization to application. In *Fundamental Biomaterials: Polymers* (pp. 105–141). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102194-1.00006-2>.

Pishavar, E., Luo, H., Naserifar, M., Hashemi, M., Toosi, S., Atala, A., Ramakrishna, S., & Behravan, J. (2021). Advanced Hydrogels as Exosome Delivery Systems for Osteogenic Differentiation of MSCs: Application in Bone Regeneration. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 12). <https://doi.org/10.3390/ijms22126203>.

Pourmollaabbassi, B., Mahdavi, H., Shojaei, S., Salehi Rozveh, H., & Valiani, A. (2022). E-Design and Fabrication of 3D-Printed Polycaprolactone/Poly Lactic-co-Glycolic Acid Hybrid Scaffold Containing Alginate Nanoparticles for Cartilage Tissue Engineering Applications. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, 11(3), 57–74. <https://doi.org/10.30501/jamt.2023.321697.1206>.

Rastegar Ramsheh, M., Behnamghader, A., & Khanlarkhani, A. (2020). Preparation and Characterization of Microspheres Based on Gelatin-Sodium Alginate-Gemipin by the Formation of Polyelectrolyte Complex. *Journal of Advanced Materials and Technologies*, 9(3), 63–78. <https://doi.org/10.30501/jamt.2021.214580.1070>.

Reakasame, S., & Boccaccini, A. R. (2018). Oxidized alginate-based hydrogels for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules*, 19(1), 3–21. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.7b01331>.

Sanz-horta, R., Matesanz, A., Jorcano, L., Velasco, D., Acedo, P., Gallardo, A., Reinecke, H., & Elvira, C. (2022). Preparation and Characterization of Plasma-Derived Fibrin Hydrogels Modified by Alginate di-Aldehyde. <https://doi.org/10.3390/ijms23084296>.

Vyas, C., Zhang, J., Øvrebo, Ø., Huang, B., Roberts, I., Setty, M., Allardyce, B., Haugen, H., Rajkhowa, R., & Bartolo, P. (2021). 3D printing of silk microparticle reinforced polycaprolactone scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*, 118, 111433. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111433>

Yuan, R., Luo, C., Yang, Y., He, C., Lu, Z., & Ge, L. (2020). Self-Healing, High Adherent, and Antioxidative LbL Multilayered Film for Enhanced Cell Adhesion. *Advanced Materials Interfaces*, 7(11), 1901873. <https://doi.org/10.1002/admi.201901873>.

راهنمای بنده بودند و همچنین مدیریت محترم آزمایشگاه بیومواد پژوهشگاه مواد و انرژی و آزمایشگاه سولهای بنیادی مرکز بیوشیمی دانشگاه شریف که در پیشبرد این پژوهش از هیچ همکاری دریغ نکردند.

## منابع

- Axpe, E., & Oyen, M. L. (2016). Applications of alginate-based bioinks in 3D bioprinting. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(12), 1976. <https://doi.org/10.3390/ijms17121976>.
- Balakrishnan, B., & Jayakrishnan, A. (2005). Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials*, 26(18), 3941–3951. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.005>.
- Baniasadi, H., Mashayekhan, S., Fadaoddini, S., & Haghsharifzamini, Y. (2016). Design, fabrication and characterization of oxidized alginate-gelatin hydrogels for muscle tissue engineering applications. *Journal of Biomaterials Applications*, 31(1), 152–161. <https://doi.org/10.1177/0885328216634057>.
- Dahlan, K., Asra, D. Y., & Sari, Y. W. (2020). FTIR, SEM and Micro-CT Scan results of biocomposite scaffold characteristics. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 858(1), 12013. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/858/1/012013>.
- Di Giuseppe, M., Law, N., Webb, B., Macrae, R. A., Liew, L. J., Sercombe, T. B., Dilley, R. J., & Doyle, B. J. (2018). Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 79, 150–157. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.12.018>.
- Distler, T., Solisito, A. A., Schneidereit, D., Friedrich, O., Detsch, R., & Boccaccini, A. R. (2020). 3D printed oxidized alginate-gelatin bioink provides guidance for C2C12 muscle precursor cell orientation and differentiation via shear stress during bioprinting. *Biofabrication*, 12(4), 45005. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab98e4>.
- Emami, Z., Ehsani, M., Zandi, M., & Foudazi, R. (2018). Controlling alginate oxidation conditions for making alginate-gelatin hydrogels. *Carbohydrate Polymers*, 198. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.080>.
- Gao, T., Gillispie, G. J., Copus, J. S., Kumar, A. P. R., Seol, Y. J., Atala, A., Yoo, J. J., & Lee, S. J. (2018). Optimization of gelatin-alginate composite bioink printability using rheological parameters: A systematic approach. *Biofabrication*, 10(3). <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aacd77>.
- Gomez, C. G., Rinaudo, M., & Villar, M. A. (2007). Oxidation of sodium alginate and characterization of the oxidized derivatives. *Carbohydrate Polymers*, 67(3), 296–304. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2006.05.025>.
- Hajiabbas, M., Alemzadeh, I., & Vossoughi, M. (2020). A porous hydrogel-electrospun composite scaffold made of oxidized alginate/gelatin/silk fibroin for tissue engineering application. *Carbohydrate Polymers*, 245(May), 116465. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116465>.
- He, Y., Yang, F., Zhao, H., Gao, Q., Xia, B., & Fu, J. (2016). Research on the printability of hydrogels in 3D bioprinting. *Scientific Reports*, 6(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/srep29977>.
- Jeon, O., Alt, D., Ahmed, S., & Alsborg, E. (2012). The Effect of Oxidation on the Degradation of Photocrosslinkable Alginate Hydrogels. *Biomaterials*, 33, 3503–3514. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.01.041>