

## 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: 2023-05-03

Revised: 2023-06-19

Accepted: 2023-08-29

## 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 bio-inks 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 (Sanzhorta 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.

Please cite this article as: Sanaei, Kh., Zamanian, A., Mashayekhan, Sh. & Ramezani Farzin, T. (2024) Effect of Oxidation Degree (OD) of oxidized-alginate on the Properties of Self-crosslinkable Oxidized Alginate-Gelatin bioinks in 3D Bioprinting Process, *Journal of Advanced Materials and Technologies*, Vol. 13, No. 1, 31-45. <https://doi.org/10.30501/jamt.2023.395058.1277>.

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>)



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

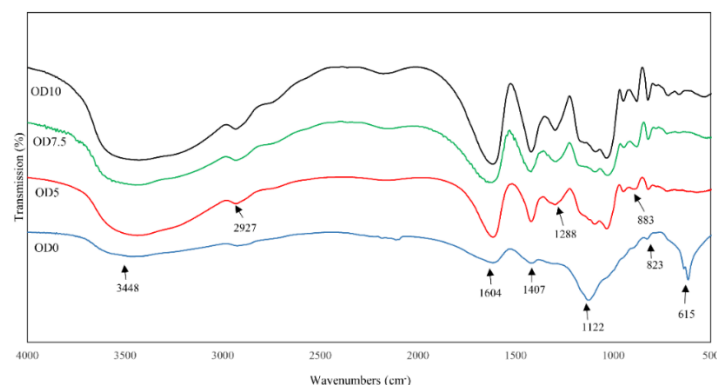
Samples	OD (% w/v)	OA (% w/v)	G (% w/v)
OD0-OA4-G6	0	4	6
OD5-OA4-G6	5	4	6
OD7.5-OA4-G6	7.5	4	6
OD10-OA4-G6	10	4	6

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 spectra 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

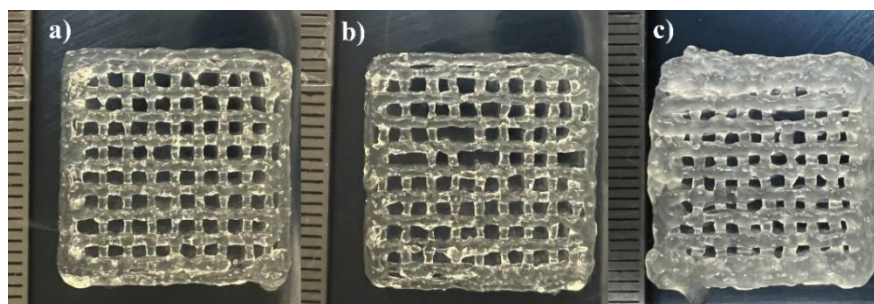
hydroxyl groups (OH) (Rastegar Ramsheh et al., 2020). Additionally, two peaks at 1604 cm<sup>-1</sup> and 1407 cm<sup>-1</sup> were related to carboxyl groups (COO) (Rastegar Ramsheh et al., 2020). As observed in the OA spectrum, the carboxyl peaks are still present, and the peak at about 2927 cm<sup>-1</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

1. 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>
2. Baniasadi, H., Mashayekhan, S., Fadaodini, S., & Haghsharifzamani, 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>.
3. 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. DOI [10.1088/1758-5090/ab98e4](https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab98e4)
4. 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>.
5. 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>
6. 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>.
7. 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>
8. 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>
9. 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>.
10. 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>



مقاله کامل پژوهشی

## تأثیر درجه اکسیداسیون آلزینات بر خواص جوهر زیستی خودبخود ژل‌شونده آلزینات اکسیدشده-ژلاتین در فرایند چاپ زیستی سه‌بعدی

خدیدجه سنائی<sup>۱</sup>، علی زمانیان<sup>۲\*</sup>، شهره مشایخان<sup>۳</sup>، طیبه رضائی فرزین<sup>۴</sup>

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

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

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

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

### تاریخچه مقاله:

ثبت اولیه: ۱۴۰۲/۰۲/۱۳

بازنگری: ۱۴۰۲/۰۳/۲۹

پذیرش قطعی: ۱۴۰۲/۰۶/۰۷

### کلیدواژه‌ها:

چاپ زیستی سه‌بعدی،

جوهر زیستی

آلزینات اکسیدشده

**چکیده** استفاده از آلزینات اکسیدشده یا آلزینات دی‌آلدئیدی، به دلیل حذف یا تقلیل عامل‌های شبکه‌ساز شیمیایی، در حوزه‌های مختلف به‌ویژه چاپ زیستی سه‌بعدی مورد توجه قرار گرفته است. در این پژوهش آلزینات به میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد اکسید شد و ترکیب شیمیایی و وزن مولکولی آلزینات و اکسید آن، قبل و بعد از فرایند اصلاح شیمیایی 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 دومارحله‌ای، 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. باین وجود، بررسی خواص جوهر زیستی (آلزینات اکسیدشده-ژلاتین) نشان داد که در نمونه با درجه اکسیداسیون ۵ درصد، خواص چاپ‌پذیری، شبکه‌ای شدن و ترشوندگی در محدوده مناسب قرار دارد و می‌توان از آن به‌عنوان 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

هیدروژل‌ها می‌توانند از پلیمرهای طبیعی یا مصنوعی<sup>۳</sup> به دست آیند (Pishavar et al., 2021). از جمله هیدروژل‌های طبیعی که به‌عنوان داربست برای بازسازی پوست مورد مطالعه قرار گرفته‌اند، می‌توان به سدیم آلزینات، هیالورونیک اسید، کیتوسان، ژلاتین و کلاژن اشاره کرد. آلزینات خاصیت سمیت سلولی اندک، میزان زنده‌مانی سلولی مناسب و قابلیت تمایز سلول‌ها را

هیدروژل‌ها به دلیل شباهت به برخی ویژگی‌های ماتریکس خارج سلولی<sup>۱</sup>، به‌عنوان داربست‌های سه‌بعدی مناسب برای کشت سلولی، در پزشکی ترمیمی<sup>۲</sup> و مهندسی بافت کاربرد روبه‌رشدی دارند (Ming et al., 2015). هیدروژل‌ها به دلیل قابلیت تورم با آب در پزشکی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند و نقش مهمی در ترمیم و بازسازی بافت ایفاء می‌کنند. این

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

<sup>2</sup> Regenerative medicine

<sup>3</sup> Natural or synthesis polymers

شبکه‌ای شدن با یون‌های فلزی دوظرفیتی مانند  $\text{Ca}^{2+}$  و  $\text{Ba}^{2+}$  را دارد و هم آلزینات اکسیدشده از طریق پیوند پایه شیف با پروتئین‌هایی مانند ژلاتین. با این وجود، گومز<sup>۱۱</sup> و همکارانش گزارش دادند که تنها آلزینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون کمتر از ۱۰ درصد از طریق اتصالات عرضی با یون‌های دوظرفیتی مانند  $\text{Ca}^{2+}$  و  $\text{Ba}^{2+}$  قادر به تشکیل ژل می‌باشد (Gomez et al., 2007).

در این پژوهش ابتدا اکسیداسیون آلزینات 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 سه‌بعدی اکستروژنی) ترکیب گردید که در طی یک فرایند دومرحله‌ای شبکه‌ای شد. در مرحله اول، گروه آلدئیدی فراهم‌شده در آلزینات اکسیدشده با گروه آمین موجود در پروتئین براساس معادله شیف واکنش داد که منجر به تشکیل ایمید شد. در مرحله دوم، هیدروژل‌های پایه آلزیناتی پس از اتمام فرایند چاپ، در معرض یون دوظرفیتی  $\text{Ca}^{2+}$  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 آلزینات

به منظور اکسیداسیون آلزینات با درجه‌های اکسیداسیون متغیر (۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد)، ابتدا، ۶۰ میلی‌لیتر محلول ۵ درصد (وزنی به حجمی) سدیم آلزینات در آب دیونیزه تهیه شد. محلول حاصل با محلول آبی پریدات سدیم با غلظت‌های مختلف در دمای محیط و به مدت ۲۴ ساعت دور از نور، مخلوط شدند. توضیح اینکه، غلظت‌های مختلف از پریدات سدیم ۰/۲۷، ۰/۴۰۵ و ۰/۵۴۰ درصد (وزنی به حجمی) به ترتیب برای درجه اکسیداسیون‌های ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد اضافه شد. سپس به منظور تکمیل فرایند اکسیداسیون، اتیلن‌گلیکول 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 میلی‌لیتر) درحالی‌که مخلوط

دارد و از این‌رو، به‌عنوان جوهرهای زیستی در چاپ زیستی سلول‌های مختلف کاربرد دارد. آلزینات یک پلی‌ساکارید آنیونی و خطی است که در دیواره‌های جلبک خطی یا دریایی یافت می‌شود که از مانورونات اسید (M) و گلورونیک (G)<sup>۱</sup> تشکیل شده است (Axpe & Oyen, 2016). این هیدروژل، می‌تواند خودبه‌خود 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 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) و باریم ( $\text{Ba}^{2+}$ )، ژل شود (Mohan et al., 2018). با این وجود، استفاده از آلزینات به‌عنوان یک جوهر زیستی با چالش‌هایی مواجه است. به‌عنوان مثال، جوهرهای زیستی آلزیناتی به‌طور ذاتی نمی‌توانند اتصال و تکثیر سلولی را پشتیبانی کنند؛ زیرا فاقد بخش‌های تعاملی با سلول<sup>۲</sup> هستند. علاوه بر این، به دلیل عدم وجود آنزیم‌های تجزیه‌کننده آلزینات در پستانداران، نرخ زیست‌تخریب‌پذیری آلزینات در محیط درون‌تنی<sup>۳</sup> بسیار کم است. از سوی دیگر، اگرچه ایجاد اتصالات عرضی در نتیجه فرایند شبکه‌ای شدن، زیست‌سازگاری را بهبود می‌بخشد؛ اما، استفاده از عامل‌های شبکه‌ساز شیمیایی سمی مانند جنیپین<sup>۴</sup>، اتیل-۳-دی‌متیل‌آمینوپروپیل)، کربودی‌ایمید<sup>۵</sup> (EDC) و ترانس گلوتامیناز<sup>۶</sup> می‌تواند اثرات نامطلوبی مانند آپوپتوز 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 آلزینات اکسیدشده<sup>۷</sup> و یا آلزینات دی‌آلدئیدی<sup>۸</sup> نسبت به آلزینات معمولی، تجزیه‌پذیری آلزینات را در داخل بدن افزایش می‌دهد و همچنین عامل شبکه‌ساز مناسب‌تری برای پیوند با پروتئین‌ها به دلیل واکنش گروه‌های آلدئیدی موجود با گروه‌های آمین آزاد موجود در پروتئین بر اساس رابطه شیف<sup>۹</sup> به‌شمار می‌رود (Distler et al., 2020). یکی از این پروتئین‌هایی که به‌عنوان بیوماده کاربرد بسیاری دارد، ژلاتین است. ژلاتین هیدروژلی زیست‌تخریب‌پذیر، ایمن‌زایی<sup>۱۰</sup> اندکی دارد که به چسبندگی سلولی کمک می‌کند (Sanz-horta et al., 2022). همان‌طور که اشاره شد، هم آلزینات، قابلیت

<sup>1</sup>  $\beta$ -d-mannuronate acid and  $\alpha$ -l-guluronate acid

<sup>2</sup> Cell-interactive motifs

<sup>3</sup> In vivo

<sup>4</sup> Genipin

<sup>5</sup> 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide

<sup>6</sup> Transglutaminases

<sup>7</sup> Oxidized Alginate, OA

<sup>8</sup> Alginate dialdehyde (ADA)

<sup>9</sup> Schiff base reaction

<sup>10</sup> Immunogenic

<sup>11</sup> Gomez

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 به‌طور 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 هموزن آلژینات اکسید شده-ژلاتین با غلظت نهایی آلژینات اکسید شده 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 می‌شود.

بر روی همزن قرار داشت، به آرامی اضافه شدند. پس از ۱۵ دقیقه، رسوب با سانتریفوژ جمع‌آوری و با آب دیونیزه (۱۰۰ میلی‌لیتر) دوباره حل شد. سپس مجدداً سدیم کلراید و اتانول به مخلوط اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه همزدن، رسوب با سانتریفوژ جمع‌آوری و با خشک‌سازی انجام‌دادی، خشک گردید و در یخچال نگهداری شد ([Baniasadi et al., 2016](#)).

## ۲-۲- تهیه جوهر زیستی آلژینات اکسید شده-ژلاتین

ابتدا محلول آلژینات اکسید شده با درجه اکسیداسیون‌های

جدول ۱- ترکیب هیدروژل‌های تهیه شده از آلژینات اکسید شده و ژلاتین

شناسه نمونه	درجه اکسیداسیون (OD)	آلژینات اکسید شده (w/v/.)	ژلاتین (w/v/.)
OD0-OA4-G6	۰	۴	۶
OD5-OA4-G6	۵	۴	۶
OD7.5-OA4-G6	۷/۵	۴	۶
OD10-OA4-G6	۱۰	۴	۶

## ۲-۳- فرایند چاپ زیستی سه‌بعدی

فرایند چاپ زیستی سه‌بعدی با استفاده از یک دستگاه چاپگر زیستی سه‌بعدی اکستروژنی (مدل 3DPL bioprinter N2 ساخته شده توسط شرکت 3DPL) انجام شد. این دستگاه دارای دو نازل با نیروی فنوماتیکی با فشار بین ۰/۲ تا ۷۰۰ کیلوپاسکال و تنظیم‌کننده دما تا حداکثر ۱۷۵ درجه سلسیوس است. سپس داربست‌های آلژینات اکسید شده-ژلاتین از یک سرنگ با قطر داخلی ۰/۸۳۸ میکرون (G18) چاپ شدند. سرعت چاپ ۵ (میلی‌متر بر ثانیه)، فشار ۰/۹ بار (Bar) و چاپ در دمای محیط انجام شد. صحت و دقت رسوب جوهرهای زیستی با چاپ زیستی سه‌بعدی مدل پوستی مشبک ۴ لایه‌ای به ابعاد ۲۰×۲۰×۲ میلی‌متر، بررسی شد. پس از اتمام فرایند چاپ، نمونه‌ها با CaCl<sub>2</sub> (غلظت ۵ درصد وزنی به حجمی) به مدت ۳۰ دقیقه شبکه‌ای شدند.

## ۲-۴- مشخصه‌یابی اکسیداسیون آلژینات

به منظور تعیین درجه اکسیداسیون آلژینات با استفاده از طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش<sup>۳</sup>، ابتدا محلول شناساگر<sup>۴</sup> با ترکیب حجم‌های مساوی از محلول‌های ۲۰ درصد (حجمی به وزنی) یدات پتاسیم (KI) و ۱ درصد (حجمی به وزنی) نشاسته قابل‌حل، تهیه شد که فسفات بافر به‌عنوان حلال با pH برابر ۷ مورد استفاده قرار گرفت. قبل از اضافه کردن اتیلن‌اکساید به محلول اکسیداسیون، ۱ میلی‌لیتر از محلول، با افزودن آب دیونیزه، تا ۲۵۰ میلی‌لیتر رقیق شد. سپس ۳ میلی‌لیتر از محلول رقیق شده با ۱/۵ میلی‌لیتر از محلول شناساگر مخلوط شد و حجم نهایی با افزودن آب دیونیزه به ۵ میلی‌لیتر رسید. جذب کمپلکس تری‌داین-نشاسته<sup>۵</sup> به سرعت توسط دستگاه طیف‌سنج مرئی-فرابنفش مدل WPA در ۴۸۶ نانومتر مشاهده شد ([Gomez et al., 2007](#)). بازده اکسیداسیون<sup>۶</sup> مطابق معادله (۱) براساس نسبت مقدار پریدات مصرف شده به میزان پریدات اولیه محاسبه می‌شود.

<sup>4</sup> Indicator solution

<sup>5</sup> Triiodine-starch complex

<sup>6</sup> Yield of oxidation (YO)

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

<sup>2</sup> Deionized water

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

به‌منظور تعیین خواص رئولوژی جهت بهینه‌سازی پارامترهای چاپ سه‌بعدی، آنالیز رفت و برگشتی بسامدی<sup>۶</sup>، آنالیز رفت و برگشتی سرعت برشی<sup>۷</sup> و آزمون بازیابی<sup>۸</sup> انجام شد. خواص رئولوژی هیدروژل‌ها با استفاده از یک دستگاه رئومتر مدل AntonPaar, Austria) MCR 501S در حالت بسامدی با استفاده از یک هندسه مخروط و صفحه<sup>۹</sup> با قطر ۵۰ میلی‌متر و زاویه رأس مخروط ۲ درجه، در دمای محیط صورت گرفت. آزمون رفت و برگشت بسامدی در ناحیه خطی (کرنش ۵ درصد) از بازده ۰/۱ تا ۱۰۰ هرتر 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 رفت و برگشتی سرعت برشی از سرعت برشی ۰/۱ تا ۱۰۰ رسم شد. آزمون بازیابی به‌منظور مقایسه قابلیت بازیابی نمونه‌ها، در سه مرحله انجام شد: ۱- سرعت شیاری (S<sup>-1</sup>) ۰/۱ به مدت ۶۰ ثانیه، ۲- سرعت شیاری (S<sup>-1</sup>) ۱۰۰ به مدت ۱۰ ثانیه و ۳- سرعت شیاری (S<sup>-1</sup>) ۰/۱ به مدت ۶۰ ثانیه (Kim et al., 2019).

#### ۵-۲- مشخصه‌یابی جوهر زیستی (آلژینات اکسیدشده-ژلاتین)

به‌منظور چاپ‌پذیری، عکس از نمونه‌های چاپ‌شده با دوربین ۱۲ مگاپیکسل (۱/۴ میکرومتر اندازه پیکسل) گرفته شد و از نرم‌افزار ImageJ (NIH, USA) به‌منظور بررسی تصاویر آستانه<sup>۱۰</sup> و اندازه‌گیری ابعاد استفاده شد. مقایسه با استفاده از تجزیه و تحلیل واریانس یک‌طرفه (ANOVA) انجام و از  $p\text{-value} < 0.05$  برای نشان دادن تفاوت معنی‌دار استفاده شد. برای هر آزمون بررسی چاپ‌پذیری، از میانگین نتایج سه نمونه استفاده شد. سپس مساحت ناحیه چاپ‌شده (A<sub>i</sub> (mm<sup>2</sup>)) با مساحت طرح (A<sub>0</sub> (mm<sup>2</sup>)) مقایسه شد تا با استفاده از معادله (۳) درصد چاپ‌پذیری برای هر نمونه به دست آید (Di Giuseppe et al., 2018).

$$p = \left(1 - \frac{A_0 - A_i}{A_i}\right) \times 100 \quad \text{معادله (۳)}$$

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

درجه اکسیداسیون<sup>۱</sup> آلژینات نیز براساس میزان درصد سدیم پریدات که قبل از تکمیل واکنش اکسیداسیون با اتیلن-گلیکول مصرف شده است، محاسبه می‌شود و بر اساس معادله (۲) به دست می‌آید.

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

در این رابطه  $m_w$ ، وزن مولکولی واحد تکرار شونده آلژینات (۱۹۸/۰۱۹۸)،  $n$  میزان سدیم پریدات مصرفی قبل از اضافه نمودن اتیلن‌گلیکول برحسب مول و  $m$  جرم سدیم آلژینات اولیه است.

طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه<sup>۲</sup> با استفاده از یک دستگاه اسپکتروفتومتر انجام شد. همه طیف‌ها با میانگین ۶۴ اسکن از بازده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ (Cm<sup>-1</sup>) 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>۳</sup>، انجام شد. دستگاه GPC مدل 1100 Agilent با آب دیونیزه به‌عنوان فاز متحرک با غلظت ۰/۵ درصد مولار، با گاززدائی تحت خلأ و صافی (۰/۲ میکرون) مورد استفاده قرار گرفت. محلول‌های پلیمری، قبل از تزریق، با 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) به‌منظور کالیبراسیون استفاده شد.

به‌منظور بررسی ساختار شیمیایی و فیزیکی قبل و بعد از اصلاح شیمیایی اکسیداسیون، آزمون رزونانس مغناطیسی هسته<sup>۴</sup> (NMR) انجام شد. ابتدا نمونه‌ها در آب سنگین (D<sub>2</sub>O) با غلظت 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. مدت‌زمان تأخیر ۲۰ ثانیه و جابجایی‌های شیمیایی نسبت داده‌شده به مرجع خارجی تترامیل سیلان<sup>۵</sup>، ۴ بود (Gomez et al., 2007).

<sup>1</sup> Oxidation Degree (OD)

<sup>2</sup> Fourier transform infrared (FTIR)

<sup>3</sup> Gel permeation chromatography (GPC)

<sup>4</sup> Nuclear magnetic resonance (NMR)

<sup>5</sup> Tetramethylsilane signal

<sup>6</sup> Frequency sweep test

<sup>7</sup> Shear rate sweep test

<sup>8</sup> Recovery

<sup>9</sup> Cone and plate

<sup>10</sup> Threshold images

<sup>4</sup> Indicator s

<sup>5</sup> Triiodine-s

<sup>6</sup> Yield of o

ژلاتین ۶ درصد وزنی در دمای ۳۷ درجه سلسیوس با استفاده از مگنت مغناطیسی ۱ سانتی متری مخلوط شد. سپس از زمان شروع اضافه نمودن محلول‌ها تا توقف کامل مگنت، به‌عنوان زمان ژل شدن هیدروژل‌ها ثبت شد (Mo et al., 2000).

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- مشخصه‌یابی آلزینات اکسیدشده

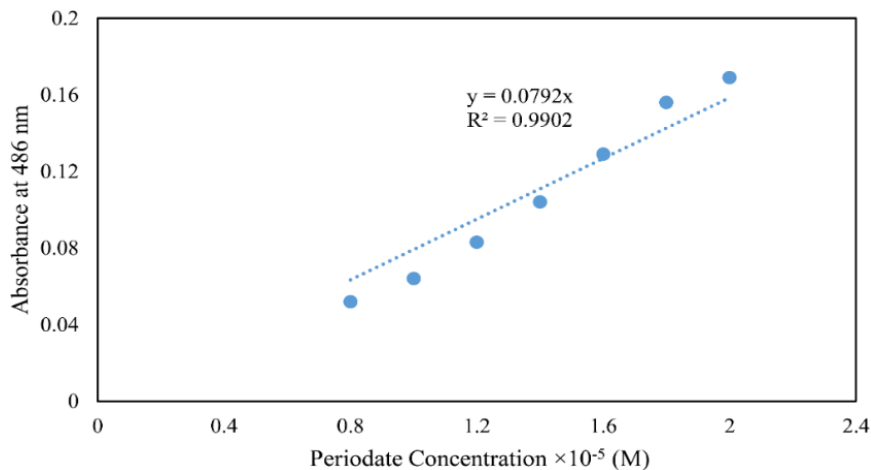
به‌منظور تعیین درجه اکسیداسیون (OD) و بازده اکسیداسیون (YO)، ابتدا نمودار استاندارد جذب یون پریدات ( $\text{IO}_4^-$ ) از  $0.8 \times 10^{-5}$  تا  $2 \times 10^{-5}$  مولار با استفاده از آنالیز طیف-سنجی مرئی-فرابنفش رسم شد (شکل ۱). مقدار X براساس این‌که محلول قبل از اضافه نمودن اتیلن گلیکول چه میزان جذب داشت، به‌دست آمد. با قرار دادن X در معادله خط  $y = 0.0792x$  غلظت پریدات مصرف‌نشده حاصل شد. از این‌رو، بازده و درجه اکسیداسیون واقعی از معادلات (۱) و (۲) به‌دست آمد که در جدول (۲) خلاصه شده است. بازده اکسیداسیون در درجه اکسیداسیون تئوری ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد، به‌ترتیب ۹۷/۱۳، ۹۷/۳۷ و ۹۷/۴۵ درصد و درجه اکسیداسیون واقعی به‌ترتیب ۴/۸۶، ۷/۴۱ و ۹/۸۴ درصد محاسبه شد.

جهت تعیین زاویه تماس به‌منظور تعیین خاصیت ترشوندگی، ابتدا آب دیونیزه (۴ میکرولیتر) به‌آرامی 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 به‌کمک یک عدسی ۲X ثبت شد (Pournollaabbassi et al., 2022).

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

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

به‌منظور تعیین زمان ژلی شدن جوهرهای زیستی، ابتدا در یک بشر با قطر ۲۰ میلی‌متر، ۲/۵ میلی‌لیتر آلزینات اکسیدشده ۴ درصد وزنی با سرعت ۲۵۰ دور بر دقیقه با ۲/۵ میلی‌لیتر محلول



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

<sup>1</sup> Wettability

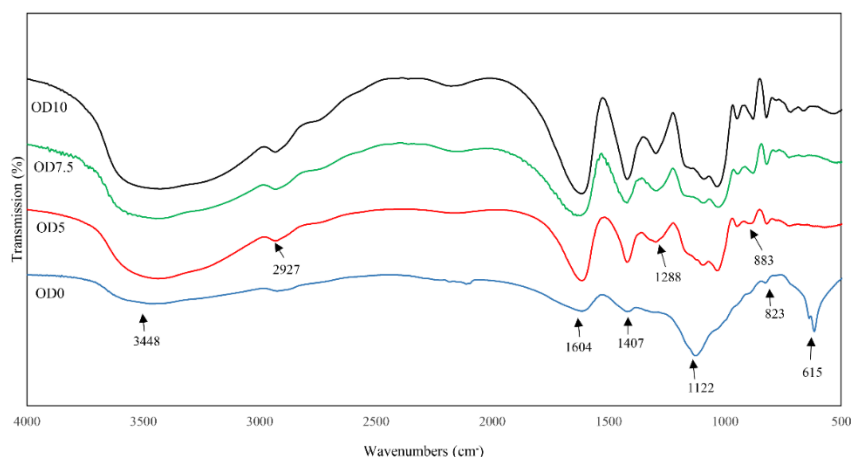
<sup>2</sup> Ninhydrin

<sup>3</sup> ELIZA Reader



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

نمونه	بازده اکسیداسیون (%)	درجه اکسیداسیون (%)
۵	٪ ۹۷/۳۷	٪ ۴/۸۶
۷/۵	٪ ۹۷/۱۳	٪ ۷/۴۱
۱۰	٪ ۹۷/۴۵	٪ ۹/۸۴



شکل ۲- آنالیز طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه از سدیم‌آلژینات بدون اکسیداسیون (OD0) و اکسیدشده با سدیم پریدات (OD5، OD7.5 و OD10)

واکنش دهند و همی‌استال‌های درون‌مولکولی و بین‌مولکولی تشکیل دهند (Reakasame & Boccaccini, 2018). حضور گروه آلدئیدی در آلژینات اکسیدشده را می‌توان به‌طور غیرمستقیم از تأثیر آن بر سایر گروه‌ها که منجر به تغییر در قله‌های آن‌ها می‌شود، تأیید کرد. به‌عنوان مثال قله‌ها در ۱۶۰۴ و  $1288 \text{ cm}^{-1}$  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). به‌علاوه، قله در  $883 \text{ cm}^{-1}$  به گروه‌های همی‌استال تشکیل‌شده، نسبت داده می‌شود (Sanz-horta et al., 2022). در طیف FTIR نمونه‌های اکسیدشده، شدت قله  $3448 \text{ cm}^{-1}$  به‌علت 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 طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته (HNMR) از آلژینات و آلژینات اکسیدشده به میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد مشاهده می‌شود. همان‌طور که در نمودار آلژینات قبل

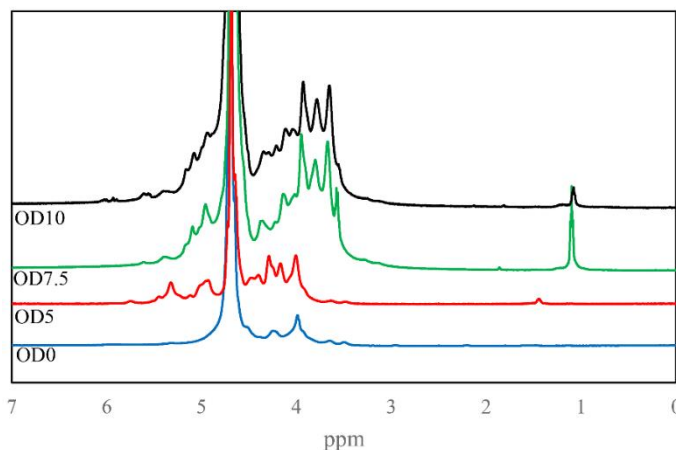
در شکل (۲) طیف‌سنجی مادون‌قرمز تبدیل فوریه (FTIR) از آلژینات و بعد از اکسیداسیون به میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد، مشاهده می‌شود. در نمودار آلژینات، نوارهای گسترده‌ای در  $3448 \text{ cm}^{-1}$  و  $615 \text{ cm}^{-1}$  قابل‌رویت است که به گروه‌های هیدروکسیل مرتبط است (Dahlan et al., 2020)، و دو قله تیز در  $1604 \text{ cm}^{-1}$  و  $1288 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به نوار کششی نامتقارن و متقارن گروه‌های کربوکسیل (COO) است. همچنین دو قله در  $1122 \text{ cm}^{-1}$  و  $823 \text{ cm}^{-1}$  به ترتیب به پیوند کششی نامتقارن و متقارن گروه استال مرتبط است (He et al., 2016; Rastegar Ramsheh et al., 2020). در طیف‌های FTIR آلژینات اکسیدشده، قله‌های مربوط به گروه کربوکسیل تغییر نخواهند کرد. همچنین شدت حالت کشش گروه کربوکسیل OH- کاهش می‌یابد و نوار در  $823 \text{ cm}^{-1}$  که به کشش متقارن C-O-C (اتر حلقوی) مربوط است، جابجا شده است (Emami et al., 2018). یک نوار مشخصه جدید که طبق معمول در محدوده  $1750-1700 \text{ cm}^{-1}$  در نمودار آلژینات اکسیدشده پدیدار می‌شود، به‌دلیل تعادل با همی-استال‌ها مشاهده نشد؛ زیرا گروه‌های آلدئیدی تشکیل‌شده به‌دلیل واکنش‌پذیری بالا، می‌توانند با گروه‌های هیدروکسیل مجاور

<sup>1</sup> Glycosidic bonds

بر خواص مکانیکی و تخریب‌پذیری هیدروژل تأثیرگذار است، وزن مولکولی آلزینات اکسیدشده به‌روش کروماتوگرافی نفوذ ژل (GPC) مورد بررسی قرار گرفت. با استفاده از این آزمون، میانگین وزنی مولکولی (Mw)، میانگین عددی مولکولی (Mn) و شاخص پراکندگی<sup>۱</sup> (PDI) برای آلزینات، قبل و بعد از اکسیداسیون با درجه اکسیداسیون ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به‌دست آمد که در جدول (۳) گردآوری شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، مقدار میانگین وزن مولکولی با اکسیداسیون به‌سرعت کاهش می‌یابد. میانگین وزن مولکولی قبل از فرایند اصلاح شیمیایی اکسیداسیون ۱۶۴۰۰۰ گرم بر مول بود که پس از فرایند اکسیداسیون برای درجه اکسیداسیون‌های ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به‌ترتیب به ۵۲۷۴۰، ۳۹۴۰۰ و ۳۱۷۰۰ گرم بر مول (دالتون) کاهش یافت. این کاهش در وزن مولکولی به‌دلیل شکستن زنجیره اصلی آلزینات می‌باشد که در نتیجه اکسیداسیون رخ می‌دهد. ازسوی دیگر، این کاهش وزن مولکولی برای کاربردهای بیومواد مطلوب است؛ چرا که آلزینات با میانگین وزن مولکولی (Mw) کمتر از ۸۰۰۰۰۰ گرم بر مول به‌راحتی از بدن انسان دفع می‌شود (Gomez et al., 2007).

از اکسیداسیون قابل مشاهده است، نسبت بلوک‌های M/G و G/G به‌ترتیب ۰/۸۴ و ۰/۱۳۱ است. در نمونه‌های آلزینات اکسیدشده، در قله‌های مربوط به بلوک‌های مانورونیک اسید (M) و گلورونیک اسید (G) جابجایی رخ می‌دهد. همچنین دو قله جدید در حوالی ۴/۹۳ و ۵/۳۲ پدیدار می‌شود که به پروتون همی‌استال‌های تشکیل‌شده از گروه‌های آلدئیدی و گروه‌های هیدروکسیل مجاور مربوط می‌شود (Gomez et al., 2007). درجه اکسیداسیون واقعی از آنالیز HNMR نیز به‌دست می‌آید که برابر با نسبت انتگرال پروتون‌های گروه متیل (-CH<sub>3</sub>) که در آلزینات قبل از واکنش اکسیداسیون وجود داشته‌اند، به پروتون‌های گروه متیل که در حین اصلاح شیمیایی اکسیداسیون آلزینات، تشکیل شده‌اند، می‌باشد (Jeon et al., 2012). براین‌اساس، درجه اکسیداسیون واقعی از آنالیز NMR برای آلزینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به‌ترتیب برابر است با ۴/۸۲، ۷/۴۵ و ۹/۶۷. نتایج حاصله از آزمون HNMR نشان داد که درجه اکسیداسیون به‌دست‌آمده از این آنالیز در تطابق با درجه اکسیداسیون به‌دست‌آمده از آنالیز اسپکتروسکوپی UV-Vis می‌باشد.

از آنجایی که وزن مولکولی آلزینات اکسیدشده، به‌طور مؤثر



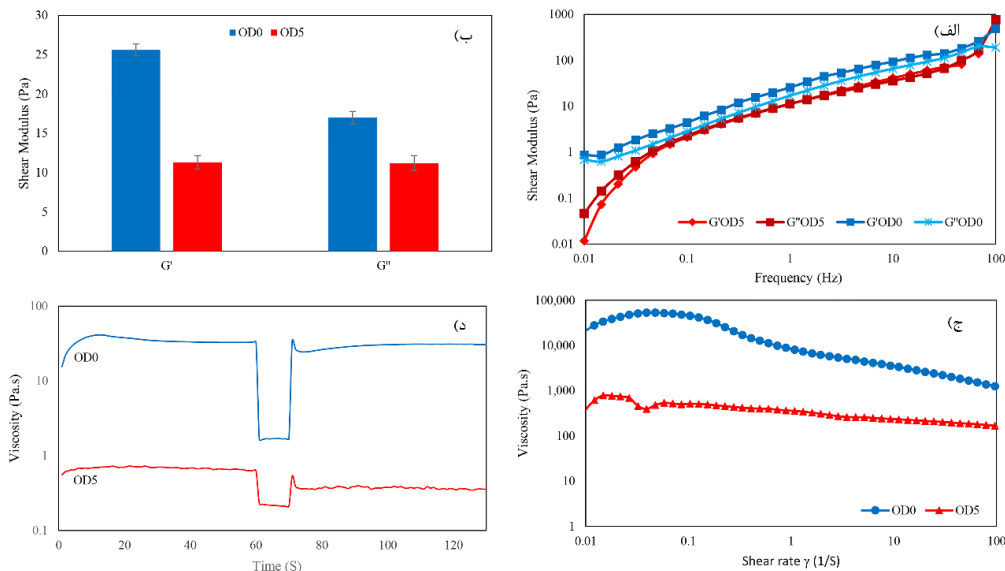
شکل ۳- آنالیز طیف‌سنجی رزونانس مغناطیسی هسته از آلزینات و آلزینات اکسیدشده به‌میزان ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد

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

(PDI) Mw/Mn	Mn (g/mol)	Mw (g/mol)	درجه اکسیداسیون (OD) (%)
۲/۱۴	۷۶۶۰۰	۱۶۴۰۰۰	۰
۱/۹۶	۲۶۹۰۰	۵۲۷۴۰	۵
۱/۸۵	۲۱۲۰۰	۳۹۴۰۰	۷/۵
۱/۸۱	۱۷۵۰۰	۳۱۷۰۰	۱۰

<sup>۱</sup> Polydispersity

می‌شود. براین اساس، با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته کاهش یافته است و در همه سرعت‌های برشی، ویسکوزیته آلزینات بیشتر از ویسکوزیته آلزینات اکسیدشده است. با توجه به این‌که با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته کاهش یافته است، هیدروژل‌ها، رفتار سیال غیرنیوتنی<sup>۲</sup> و شبه‌پلاستیک‌ها<sup>۳</sup> را از خود به نمایش می‌گذارند. شکل (۴-د) رفتار بازیابی نمونه‌های آلزینات و آلزینات اکسیدشده را نشان می‌دهد. ویسکوزیته اولیه آلزینات (Pa·s)  $40/6$  بود که با بکارگیری سرعت برشی ( $S^{-1}$ )  $100$ ، به  $1/67$  (Pa·s) کاهش یافت. پس از حذف سرعت برشی، ویسکوزیته در زمان ۱ ثانیه، تا  $34/6$  (Pa·s) افزایش یافت که بیانگر بازیابی ویسکوزیته اولیه تا میزان ۷۴ درصد است. در نمونه آلزینات اکسیدشده، ویسکوزیته اولیه  $0/7$  (Pa·s) بود که با بکارگیری سرعت برشی ( $S^{-1}$ )  $100$ ، به  $0/216$  (Pa·s) کاهش یافت. پس از حذف سرعت برشی، در مدت ۱ ثانیه، ویسکوزیته به  $0/389$  (Pa·s) افزایش یافت که نشان می‌دهد ۵۷ درصد ویسکوزیته اولیه بازیابی شده است. این نتایج نشان می‌دهند هم آلزینات و هم اکسید آن، رفتار بازیابی مناسبی از خود نشان می‌دهند؛ اگرچه بازیابی آلزینات از اکسید آن بسیار بهتر است.



**شکل ۴-** خواص رئولوژی آلزینات و آلزینات اکسیدشده با غلظت ۴ (w/v) % در دمای محیط در بسامد زاویه‌ای ( $1 \text{ rad/s}$ )، الف) مدول‌های ذخیره و اتلاف، ب) نمودار ستونی مدول‌های ذخیره و اتلاف، ج) ویسکوزیته با تغییرات سرعت شیباری ( $0/1$  تا  $100 \text{ S}^{-1}$ )، د) رفتار بازیابی با سرعت شیباری ( $1 \text{ S}^{-1}$ ) در زمان ۰ تا ۶۰ ثانیه و ۷۰ تا ۱۳۰ ثانیه، سرعت شیباری ( $100 \text{ S}^{-1}$ ) در بازه زمانی ۶۰ الی ۷۰ ثانیه.

آزمون بسامدی رفت‌وبرگشتی آلزینات و آلزینات 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 آلزینات 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  $1 \text{ rad/s}$  به دست آمد (Kim et al., 2019)، که به صورت نمودار ستونی در شکل (۴-ب) رسم شد. براین اساس، مدول ذخیره ( $G'$ )  $25 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  و مدول اتلاف ( $G''$ )  $17 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  است، که نشان می‌دهد آلزینات 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 آلزینات اکسیدشده با درجه اکسیداسیون ۵ درصد، میزان مدول ذخیره  $12/3 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  و مدول اتلاف  $11/2 \text{ Pa}\cdot\text{s}$  است که نشان می‌دهند با اکسیداسیون آلزینات، مدول اتلاف و ذخیره هر دو کاهش یافته‌اند ( $p\text{-value} < 0.05$ ). نمودار ویسکوزیته برحسب سرعت برشی در شکل (۴-ج) مشاهده

<sup>1</sup> Loss tangent

<sup>2</sup> Non-Newtonian

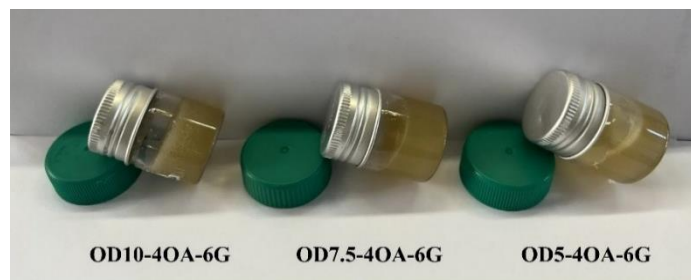
<sup>3</sup> Pseudoplastic

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

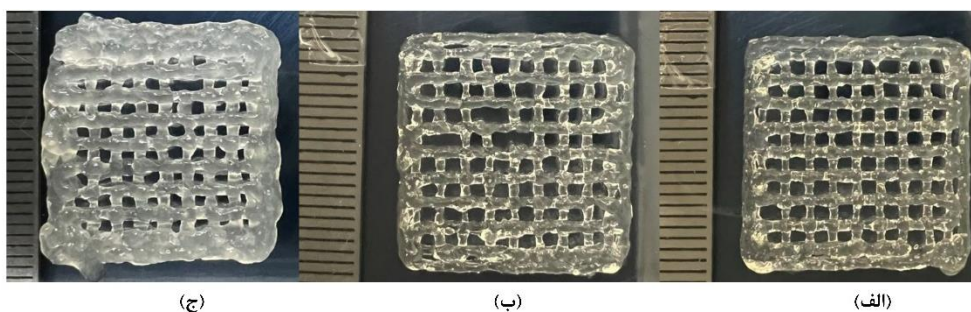
سطح ماده است. زاویه تماس، زاویه بین سطح جامد و یک قطره از مایع بر روی سطح است. ترشوندگی سطح بیومتریال به شیمی و زبری سطح بستگی دارد. زاویه تماس در سطوح آبدوست کمتر از ۹۰ درجه است؛ درحالی‌که بالاتر از این مقدار، ماده آب‌گریز محسوب می‌شود (Vyas et al., 2021). همان‌طور که در شکل (۷) مشاهده می‌شود، میزان زاویه تماس در زمان ۱۰ ثانیه در سه نمونه OD10-OA-G، OD7.5-OA-G و OD5-OA-G به ترتیب ۵۱/۳۹، ۴۸/۲۱ و ۴۱/۲۱ درجه است؛ از این رو، زاویه تماس در همه نمونه‌ها در محدوده سطح آبدوست (کمتر از ۹۰ درجه) قرار دارد. با افزایش درجه اکسیداسیون آلژینات، آبدوستی جوهر زیستی آلژینات-ژلاتین افزایش یافته است. آب علاوه بر 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 فراهم می‌کند. همچنین در محیط فیزیولوژیکی، برهم‌کنش‌های برگشت‌پذیر دینامیکی مانند پیوند کووالانسی پایه شیف دوباره فعال می‌گردد (Yuan et al., 2020).

تصویر سیالیت‌پذیری (شکل ۵) هر سه جوهر زیستی آلژینات اکسیدشده-ژلاتین (به نام‌های OD7.5-OD5-4OA-6G و OD10-4OA-6G)، نشان‌دهنده رفتار ژل‌مانند در دمای فرایند (۲۰ درجه سلسیوس) پس از ۶۰ دقیقه از شروع زمان اضافه شدن محلول ژلاتین به محلول آلژینات اکسیدشده است. به‌منظور تعیین کمیت‌های چاپ‌پذیری، ابتدا جوهرهای زیستی تهیه شدند و پس از فرایند چاپ سه‌بعدی، چاپ‌پذیری با استفاده از نرم‌افزار imagej و با حداقل ۳ بار تکرار محاسبه شد. تصاویر طرح‌های مشبک چاپ‌شده از جوهرهای زیستی OD10-OA-G، OD7.5-OA-G، OD5-OA-G در شکل (۶) قابل مشاهده است. صحت چاپ جوهر زیستی با درصد اکسیداسیون ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به ترتیب ۹۱، ۸۱ 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 اکسیداسیون آلژینات در جوهر زیستی، چاپ‌پذیری کاهش یافته است.

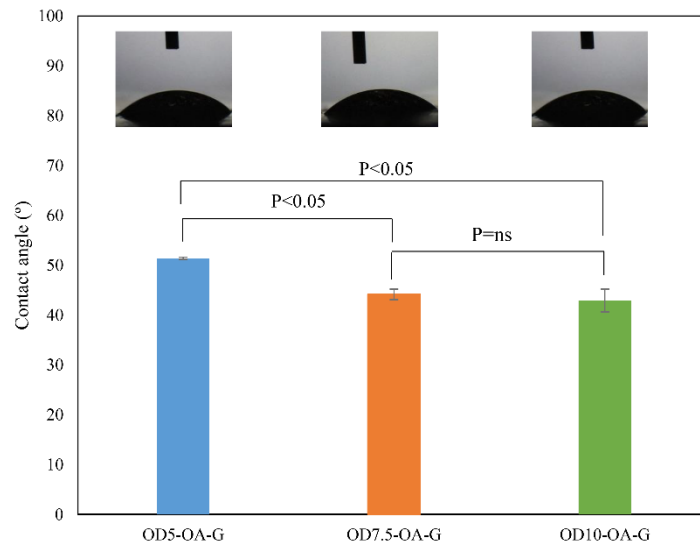
خاصیت ترشوندگی با بررسی زاویه تماس قطره آب دیونیزه (۴ میکرولیتر) در لحظه ۱۰ ثانیه به دست آمد. زاویه تماس یکی از پارامترهای مهم برای تعیین قابلیت ترشوندگی



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



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



شکل ۷- اندازه‌گیری زاویه تماس جوهرهای زیستی آلژینات اکسیدشده-ژلاتین با درجه اکسیداسیون‌های متغیر ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد

میزان درجه شبکه‌ای شدن داربست‌های آلژینات اکسیدشده-ژلاتین و زمان تشکیل ژل در جدول (۴) فهرست شده‌اند. همان‌طور که مشاهده می‌شود زمان ژلی شدن برای نمونه‌های OD10-OA-G و OD7.5-OA-G، OD5-OA-G به- ترتیب ۷۴، ۶۶ و ۳۷ دقیقه است که همه این زمان‌ها به‌منظور کاربردهای بالینی مناسبند (Sanz-horta et al., 2022). همچنین این نتایج نشان می‌دهد که درجه اکسیداسیون بیشتر منجر به واکنش سریع آلژینات اکسیدشده و کوتاه‌تر شدن زمان ژلی شدن هیدروژل‌های ADA-G می‌شود. همچنین میزان درجه شبکه‌ای شدن به‌دست‌آمده از آزمون نین هیدرین برای هیدروژل‌های (آلژینات-ژلاتین) با درجه اکسیداسیون ۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد به‌ترتیب ۴۵/۴۱، ۴۳/۴۰ و ۴۶/۰۱ درصد است. این نتایج نشان می‌دهد که با افزایش درجه اکسیداسیون آلژینات در جوهرهای زیستی آلژینات اکسیدشده-ژلاتین، روند افزایشی یا کاهش

مشخصی در درجه شبکه‌ای شدن مشاهده نمی‌شود. عوامل مختلفی بر درجه شبکه‌ای شدن تأثیرگذارند، مانند: درجه اکسیداسیون آلژینات (OD) و غلظت ژلاتین (G). همچنین، عوامل پیچیده دیگری همچون تغییر شکل<sup>۱</sup> پلیمرهای مورد- استفاده، میانگین وزنی آلژینات اکسیدشده و طول زنجیره پلیمری بر درجه شبکه‌ای شدن داربست‌های آلژینات اکسیدشده-ژلاتین مؤثرند (Hajiabbas et al., 2020). باراکریشان<sup>۲</sup> و همکارانش نشان دادند که با افزایش درجه اکسیداسیون آلژینات 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).

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

نمونه‌ها	درجه اکسیداسیون (درصد)	زمان ژلی (دقیقه)	درجه شبکه‌ای شدن (درصد)
OD5-OA-G	۵	۷۴	۴۵/۴۱٪
OD7.5-OA-G	۷/۵	۶۶	۴۳/۴۰٪
OD10-OA-G	۱۰	۳۷	۴۶/۰۱٪

<sup>1</sup> Deformation

<sup>2</sup> Biji Balakrishnan

<sup>3</sup> Maryam Hajiabbas

#### ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش اکسیداسیون آلژینات با درجه اکسیداسیون‌های مختلف (۵، ۷/۵ و ۱۰ درصد) انجام شد و جوهرهای زیستی آلژینات اکسیدشده-ژلاتین (۴ درصد وزنی به حجمی آلژینات 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 دومرحله‌ای (قبل و بعد از فرایند چاپ سه‌بعدی) شبکه‌ای شدند. سپس جوهرهای زیستی پایه آلژیناتی تهیه‌شده، از طریق فرایند چاپ زیستی سه‌بعدی اکستروژنی، چاپ شدند. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش درجه اکسیداسیون آلژینات از ۵ به ۱۰ درصد، میانگین وزنی ( $M_w$ ) آلژینات کاهش می‌یابد؛ ازسوی دیگر، این کاهش وزن به‌صورتی انجام شده است که آلژینات و مشتقات آن بتوانند به‌راحتی از بدن انسان و از طریق کلیه دفع شوند. همچنین جوهر زیستی (آلژینات اکسیدشده-ژلاتین) با درجه اکسیداسیون ۵ درصد، چاپ‌پذیری مناسبی نسبت به جوهرهای زیستی با درجه اکسیداسیون‌های آلژینات 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 بالینی مناسب است. به‌علاوه بررسی زاویه تماس به‌منظور مطالعه قابلیت ترشوندگی نشان داد که جوهرهای زیستی پایه آلژیناتی، زاویه تماس کمتر از ۹۰ درجه دارند که بیانگر آبدوست بودن سطوح آن‌ها و توانایی آن‌ها در جذب پروتئین‌ها و سلول‌هاست.

#### ۵- سپاسگزاری

این مقاله در راستای پروژه 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، راهنمای بنده بودند و همچنین مدیریت محترم آزمایشگاه بیومواد پژوهشگاه مواد و انرژی و آزمایشگاه سول-های بنیادی مرکز بیوشیمی دانشگاه شریف که در پیشبرد این پژوهش از هیچ همکاری دریغ نکردند.

#### مراجع

- scaffolds. *Biomaterials*, 26(18), 3941-3951. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.005>.
- Baniasadi, H., Mashayekhan, S., Fadaodini, S., & Haghsharifzamani, 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, [doi:10.1088/1757-899X/858/1/012013](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., Dille, 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/aacdc7>.
- 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., & Alsberg, 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>.
- 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/10.1016/j.ijbiomac.2021.11.046>.
- Khoshnood, N., Zamanian, 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>.
- 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

19. 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>.
20. Pourmollaabbassi, B., Mahdavi, H., Shojaee, 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>.
21. 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>.
22. 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>.
23. 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>.
24. Vyas, C., Zhang, J., Øvrebø, 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>
25. 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>.