

Research Paper

Preparation and characterization of gelatin/sodium alginate hydrogel with a focus on improving rheological behavior and 3D printability

Rasoul Esmaeely Neisiany^{1,2*}, Ali Ashtariyan³, Fereshte Hassanzadeh Afruzi⁴, Ali Khoshshima⁵

1- Assistant Professor, Department of Polymer Engineering, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

2- Researcher, Biotechnology Centre, Silesian University of Technology, Gliwice, Poland

3- PhD Student, Department of Materials Engineering, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

4- Postdoctoral Researcher, Department of Polymer Engineering, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

5- Associate Professor, Department of Petroleum Engineering, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran

Received: 2024/07/23

Revised: 2024/08/26

Accepted: 2024/08/27

Use your device to scan and read the article online



DOI:

10.30495/jnm.2024.33667.2049

Keywords:

Hydrogel, Gelatin, Sodium Alginate, 3D printing

Abstract

Introduction: Among a wide range of natural and synthetic polymers, gelatin and sodium alginate have received much attention for the preparation of hydrogels. In addition, 3D printing is of great interest with the ability to fabricate precise and porous structures for tissue engineering, as the printing of hydrogels showed many problems due to the change in rheological behavior.

Methods: In this research, gelatin and sodium alginate hydrogels were prepared in different percentage compositions. The chemical structure of the prepared hydrogels was investigated by FTIR tests. Moreover, the swelling rate and degradation rate of hydrogels were evaluated. The viscosity of hydrogels was evaluated at different shear rates. Based on the result of the rheological test, the printability of the sample was investigated.

Findings: The FTIR results showed that the simultaneous presence of these two polymers in the hydrogel structure causes physical interactions. The results of the swelling and degradation test indicated that increasing the amount of gelatin in the hydrogel structure increased water absorption (up to 215%) and the degradation rate of the hydrogel. Additionally, the viscosity measurement results showed the pure gelatin and alginate hydrogels have low shear thinning behavior, while the combination of these two hydrogels resulted in a series of reversible interactions and changes in free volume in the hydrogel structure, which caused shear thinning behavior with 10-fold decrease in the viscosity of the hydrogel.

Citation: Rasoul Esmaeely Neisiany, Ali Ashtariyan, Fereshte Hassanzadeh Afruzi, Ali Khoshshima, Preparation and characterization of gelatin/sodium alginate hydrogel with a focus on improving rheological behavior and 3D printability, Quarterly Journal of New Materials. 2024; 14 (54): 59-70.

***Corresponding author:** Rasoul Esmaeely Neisiany

Address: Department of Polymer Engineering, Hakim Sabzevari University, Sabzevar, Iran.

Tell: +985144012860

Email: r.esmaeely@hsu.ac.ir

Extended Abstract

Introduction

Hydrogels, as three-dimensional hydrophilic polymer networks, can absorb large amounts of water without dissolving. Owing to their similarity to the natural extracellular matrix (ECM) along with their tunable chemical, physical, and biological properties, they have been widely investigated for medical applications, tissue engineering, drug delivery, wound healing, and biosensors. Among the different types of hydrogels, gelatin-based hydrogels have attracted considerable attention due to their excellent biocompatibility, biodegradability, low cost, and availability. Gelatin is a natural protein obtained from the partial hydrolysis of collagen, which is the most abundant natural extracellular component in animal tissues. Gelatin contains various functional groups such as amino, carboxyl, and hydroxyl groups that can interact with cells and biological molecules. However, gelatin-based hydrogels show limitations such as poor mechanical strength, low thermal stability, and fast degradation rate. To overcome these disadvantages, various strategies have been developed to modify gelatin or combine it with other polymers to form hybrid hydrogels with improved properties. One of the most common polymers used for gelatin hybridization is sodium alginate, which is a natural polysaccharide extracted from brown algae. Alginate is composed of linear chains of β -D-mannuronic acid (M) and α -L-guluronic acid (G) residues that can form ionic cross-links with divalent cations, such as calcium. Hybrid hydrogels based on alginate/gelatin can combine the advantages of both polymers, such as the biocompatibility and bioactivity of gelatin and the cross-linking and easy injection of alginate.

Three-dimensional (3D) printing, also known as additive manufacturing, is a technology that can be used to create complex and customized structures by placing materials layer by layer

according to a digital model. Due to its advantages in accuracy, flexibility and high efficiency, 3D printing has been widely considered in various fields such as engineering, architecture, art and medicine as a new method in shaping materials. Among the various 3D printing methods, 3D bioprinting is a classification that focuses on making biological structures such as tissues and organs using bioinks containing living cells and biological materials. 3D bioprinting has great potential for the advancement of biomedical research and applications such as drug screening, disease modeling, tissue engineering, and organ transplantation. However, 3D bioprinting faces many challenges such as selecting appropriate bioinks, optimizing printing parameters, maintaining cell viability and function, and vascularization and integration of printed structures. Bio-based inks are key components of 3D bioprinting, as they control the printability, mechanical stability, biological activity, and degradation rate of printed structures. Among the different types of bioinks, hydrogels are the most commonly used due to their high-water content, biocompatibility, and similarity to the natural extracellular matrix. One of the most widely used bioinks for 3D bioprinting is the alginate/gelatin-based hydrogel. In addition, alginate/gelatin-based hydrogels can be tuned by changing the alginate-gelatin ratio to have different mechanical properties, degradation rates, and cellular responses.

In this research, gelatin-alginate hydrogels with different weight percentages were prepared and characterized in order to introduce a hydrogel with 3D printing capability and suitable biodegradability. The reason for choosing sodium alginate is the possibility of creating crosslinks in the combined hydrogel, which will affect the physical, and rheological properties and degradation of the combined hydrogel without having a negative effect on the biological properties of gelatin. Afterward, the

porous structure was printed using the 3D extrusion printing method to prove the printability of the resulting hydrogels.

Findings and Discussion

The results of the infrared spectroscopy test showed that the simultaneous presence of these two polymers in the hydrogel structure caused physical interactions. The results of the swelling and degradation test showed that increasing the amount of gelatin in the hydrogel structure increased water absorption and the degradation rate of the hydrogel. Additionally, the viscosity measurement results showed that pure gelatin and alginate hydrogels have very low shear thinning behavior, while the combination of these two hydrogels caused a series of reversible interactions and changes in free volume in the hydrogel structure, which resulted in shear thinning behavior in the combined hydrogel. This shear thinning behavior is significantly required in the printing process because it reduces the pressure in the printing process, which in turn causes more dimensional stability of the hydrogel after printing and provides the creation of precise and porous structures.

Conclusion

The hydrogel prepared from the combination of gelatin and sodium alginate can be used as a

biological ink in the 3D printing process for tissue engineering, wound dressing, and drug delivery applications due to its proper water absorption, degradation rate, and rheological behavior.

Ethical Considerations compliance with ethical guidelines

The cooperation of the participants in the present study was voluntary and accompanied by their consent.

Funding

This work is based upon research funded by the Iran National Science Foundation (INSF) under project No.4026014.

Authors' contributions

Design experiments and perform: Rasoul Esmaeely Neisiany, Ali Ashtariyan;
Interpretation of results: Rasoul Esmaeely Neisiany, Ali Ashtariyan, Fereshte Hassanzadeh Afruzi, Ali Khoshsima
Writing and reviewing: Rasoul Esmaeely Neisiany, Ali Ashtariyan, Fereshte Hassanzadeh Afruzi, Ali Khoshsima

Conflicts of interest

The authors declared no conflict of interest.

مقاله علمی پژوهشی

تهیه و مشخصه یابی هیدروژل ژلاتین-سدیم آلژینات با تمرکز بر بهبود رفتار رئولوژی و قابلیت چاپ سه بعدی

رسول اسمعیلی نیسیانی^{۱*}، علی اشتریان^۲، فرشته حسن زاده افروزی^۳، علی خوش سیمای^۴

۱- استادیار، گروه مهندسی پلیمر، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

۲- محقق، مرکز بیوتکنولوژی، دانشگاه صنعتی سیلین، گلیوتسه، لهستان

۳- دانشجو دوره دکتری، گروه مهندسی مواد، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

۴- محقق پسا دکتری، گروه مهندسی پلیمر، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

۵- دانشیار، گروه مهندسی نفت، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران

چکیده

مقدمه: از میان دسته وسیعی از پلیمرهای طبیعی و سنتزی، ژلاتین و سدیم آلژینات برای تهیه هیدروژل ها مورد توجه بسیار قرار گرفته اند. همچنین چاپ سه بعدی به عنوان یک روش افزایشی تولید با ساختارهای دقیق و متخلخل در مهندسی بافت بسیار مورد توجه است که چاپ هیدروژل ها به دلیل تغییر رفتار رئولوژیکی دارای مشکلات فراوانی بوده است.

روش: در این پژوهش هیدروژل های ژلاتین و آلژینات در ترکیب درصد متفاوت تهیه شد. ساختار شیمیایی هیدروژل ها، میزان تورم و نرخ تخریب و ویسکوزیته آنها در نرخ برش متفاوت اندازه گیری شد. بر اساس نتیجه آزمون رئولوژیکی، چاپ پذیری نمونه مورد ارزیابی قرار گرفت.

یافته ها: نتایج آزمون طیف سنجی مادون قرمز نشان داد که حضور همزمان این دو پلیمر در ساختار هیدروژل باعث ایجاد برهمکنش های فیزیکی می شود. نتایج آزمون تورم و تخریب نشان داد، افزایش میزان ژلاتین در ساختار هیدروژل باعث افزایش جذب آب (۲۱۵٪) و افزایش نرخ تخریب هیدروژل می گردد. همچنین نتایج اندازه گیری ویسکوزیته نشان داد هیدروژل های خالص ژلاتین و آلژینات دارای رفتار برشی بسیار ناچیز رقیق شونده هستند در حالی که ترکیب این دو هیدروژل باعث ایجاد یک سری برهمکنش های برگشت پذیر و تغییر در حجم آزاد در ساختار هیدروژل شده که باعث ایجاد رفتار برشی رقیق شونده و کاهش ۱۰ برابری ویسکوزیته در هیدروژل می شود.

نتیجه گیری: هیدروژل تهیه شده از ترکیب ژلاتین و سدیم آلژینات با توجه به قابلیت مناسب جذب آب، نرخ تخریب و رفتار رئولوژیکی می تواند به عنوان یک جوهر زیستی در فرآیند چاپ سه بعدی برای کاربردهای مهندسی بافت مورد استفاده قرار گیرد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۰۵/۰۲

تاریخ داوری: ۱۴۰۳/۰۶/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۰۶/۰۶

از دستگاه خود برای اسکن و خواندن مقاله به صورت آنلاین استفاده کنید



DOI:

10.30495/jnm.2024.33667.2049

واژه های کلیدی:

هیدروژل، ژلاتین، سدیم آلژینات، چاپ سه بعدی

* نویسنده مسئول: رسول اسمعیلی نیسیانی

نشانی: گروه مهندسی پلیمر، دانشگاه حکیم سبزواری، سبزوار، ایران.

تلفن: ۰۵۱۴۴۰۱۲۸۶۰

پست الکترونیکی: r.esmaeely@hsu.ac.ir

مقدمه

هیدروژل‌ها شبکه های سه بعدی پلیمری آب دوست هستند که می‌توانند مقادیر زیادی آب را بدون حل شدن در آن جذب کنند. به دلیل شباهت آنها به ماتریس خارج سلولی طبیعی^۱ (ECM) و به خاطر خواص شیمیایی، فیزیکی و زیستی قابل تنظیم به طور گسترده برای کاربردهای پزشکی، مهندسی بافت، تحویل دارو، ترمیم زخم و حسگرهای زیستی مورد بررسی قرار گرفته‌اند (۱-۳). در میان انواع مختلف هیدروژل ها، هیدروژل های مبتنی بر ژلاتین به دلیل زیست سازگاری عالی، زیست تخریب پذیری، هزینه کم و در دسترس بودن، توجه زیادی را به خود جلب کرده اند (۴). ژلاتین یک پروتئین طبیعی است که از هیدرولیز جزئی کلاژن به دست می آید که فراوان ترین جزء خارج سلولی طبیعی در بافت های حیوانی است. ژلاتین حاوی گروه های عاملی مختلفی مانند گروه-های آمینو، کربوکسیل و هیدروکسیل است که می‌توانند با سلول ها و مولکول های زیستی تعامل داشته باشند (۴-۶). با این حال، هیدروژل های مبتنی بر ژلاتین دارای محدودیت هایی مانند استحکام مکانیکی ضعیف، پایداری حرارتی پایین و سرعت تخریب سریع هستند. برای غلبه بر این معایب، رویکردهای مختلفی برای اصلاح ژلاتین (۷) یا ترکیب آن با سایر پلیمرها برای تشکیل هیدروژل‌های هیبریدی با خواص بهبود یافته توسعه یافته‌اند (۸). یکی از رایج ترین پلیمرهایی که برای هیبریداسیون ژلاتین استفاده می شود، سدیم آلژینات است که یک پلی ساکارید طبیعی است که از جلبک های قهوه ای استخراج می شود. آلژینات از زنجیره های خطی بقایای اسید β -D-مانورونیک (M) و اسید- α -L-گولورونیک (G) تشکیل شده است که می تواند با کاتیون های دو ظرفیتی، مانند کلسیم، اتصالات عرضی یونی ایجاد کند (۹، ۱۰). همچنین ترکیب ژلاتین-آلژینات-هیالورونیک اسید، هیدروژل هیبریدی با خواص زیست سازگاری بهبود یافته برای کاربردهای پزشکی را نشان داده است (۱۱). هیدروژل های هیبریدی مبتنی بر آلژینات/ژلاتین می توانند مزایای هر دو پلیمر مانند زیست سازگاری و زیست فعالی ژلاتین و اتصال عرضی و تزریق آسان آلژینات را با هم ترکیب کنند. (۱۲، ۱۳)

چاپ سه بعدی که به عنوان روش تولید افزایشی نیز شناخته می شود، فناوری است که می تواند ساختارهای پیچیده و سفارشی سازی شده را با قرار دادن مواد طبق یک مدل دیجیتالی لایه به لایه ایجاد کند. چاپ سه بعدی به دلیل مزایایی که در دقت، انعطاف پذیری و کارایی بالا دارد، به طور گسترده در زمینه های مختلف مانند مهندسی، معماری، هنر و پزشکی به عنوان روشی نوین در شکل دهی مواد مورد توجه قرار گرفته است (۱۴). در میان روش های مختلف چاپ سه بعدی، چاپ زیستی سه بعدی شاخه ای است که بر ساخت ساختارهای بیولوژیکی مانند بافت ها و اندام ها با استفاده از جوهرهای زیستی حاوی سلول های زنده و مواد زیستی تمرکز دارد. چاپ زیستی سه بعدی پتانسیل زیادی برای پیشرفت تحقیقات و کاربردهای زیست پزشکی مانند غربالگری دارو، مدل سازی بیماری، مهندسی بافت و پیوند اعضا دارد. (۱۵)

با این حال، چاپ زیستی سه بعدی با چالش های زیادی مانند انتخاب جوهرهای زیستی مناسب، بهینه سازی پارامترهای چاپ، حفظ قابلیت حیات و عملکرد سلول، و عروقی سازی و ادغام ساختارهای چاپی رو به رو است (۱۴). جوهرهای زیستی اجزای کلیدی چاپ زیستی سه بعدی هستند، زیرا قابلیت چاپ، پایداری مکانیکی، فعالیت بیولوژیکی و میزان تخریب ساختارهای چاپی را تعیین می کنند. در میان انواع مختلف جوهرهای زیستی، هیدروژل ها به دلیل محتوای آب بالا، زیست سازگاری و شباهت به ماتریکس خارج سلولی طبیعی متداول ترین موارد مورد استفاده هستند. یکی از پرکاربردترین هیدروژل ها برای چاپ زیستی سه بعدی، هیدروژل مبتنی بر آلژینات/ژلاتین است. علاوه بر این، هیدروژل مبتنی بر آلژینات/ژلاتین را می توان با تغییر نسبت آلژینات به ژلاتین به گونه ای تنظیم کرد که خواص مکانیکی، سرعت تخریب و پاسخ های سلولی متفاوتی داشته باشد (۴).

ترکیب ژلاتین و انیدرید متاکریلیک به دلیل سازگاری زیستی عالی، زیست تخریب پذیری برای تولید زخم پوش استفاده شده است. هیدروژل ژلاتین متاکریلویل^۲ (GelMA) به دلیل ویژگی های منحصر به فرد و آماده سازی ساده و عملکرد برتر پتانسیل امیدوارکننده ای را در طیف وسیعی از کاربردهای زیست پزشکی نشان می دهد. ژلاتین-متاکریلات به صورت تک جزئی با ویسکوزیته بسیار پایین در غلظت های کم قابلیت چاپ سه بعدی ندارد و قطعات چاپ شده آن نیز به سرعت تخریب می شوند (۱۶).

پیولا و همکاران از ترکیب ژلاتین و صمغ زانتان برای تولید یک نوع زخم پوش استفاده کردند. هدف از این پژوهش توسعه یک هیدروژل با قابلیت چاپ سه بعدی مبتنی بر پلیمرهای زیست سازگار، ژلاتین و صمغ زانتان با درصدهای مختلف به عنوان پانسمان زخم بود. دو نوع هیدروژل قابل چاپ با تخلخل، تورم و زمان تخریب متفاوت به دست آمد. نتایج نشان داد که نمونه با ۳ درصد ژلاتین خواص بهتری دارد. نتیجه آن زیست سازگاری خوب و مقاومت در برابر تورم و تخریب سریع بود (۱۷).

در زمینه استفاده از هیدروژل های ژلاتین-آلژینات و استفاده از آن در کاربردهای پزشکی در سال ۲۰۲۱ مقاله مروری توسط وابوسکا و همکاران منتشر شده است. در این مرور بر پژوهش های گذشته، دو پلیمر ژلاتین و آلژینات و ساختار آنها و نحوه ایجاد اتصالات عرضی به همراه اثر مواد و ترکیب درصد بر خواص مکانیکی مرور شده است. همچنین در این مرور بر پژوهش های گذشته مشخص شده که چاپ پذیری این دو هیدروژل دارای مشکلات فراوانی بوده که برای رفع آن و اصلاح خواص رئولوژیکی، به عنوان عامل موثر بر چاپ پذیری، از درصد مختلف مواد افزودنی و یا تغییرات دما استفاده شده است. استفاده از مواد افزودنی و تغییر دما می تواند در زنده مانی سلول در حین فرآیند چاپ زیستی اثر منفی قابل توجهی داشته باشد (۱۸). بنابراین در این پژوهش هیدروژلهای ژلاتین-آلژینات با درصدهای وزنی مختلف این دو پلیمر طبیعی آماده شد و مورد مشخصه یابی قرار گرفت تا بتوان هیدروژلی با قابلیت چاپ سه بعدی و زیست تخریب پذیری مناسب معرفی کرد. علت انتخاب سدیم آلژینات امکان ایجاد شبکه اتصالات

²- Gelatin methacryloyl

¹- Natural extracellular matrix (ECM)

به منظور فرآیند چاپ، سرنگ لوئرلاک حاوی هیدروژل در محل نازل چاپگر زیستی مدل 3DPL قرار گرفت و چاپ ساختار طراحی شده توسط چاپگر انجام شد. پس از اتمام فرآیند چاپ، ساختار سه بعدی حاصل شده، در محلول کلسیم کلراید با غلظت 0.1Mol به مدت ۱۰ دقیقه غوطه ور شد. در این مرحله اتصالات عرضی در ساختارهای چاپ شده ژلاتین-آلژینات با قرار گیری یون های کلسیم ایجاد شدند که سبب ایجاد تثبیت ساختار هیدروژلی چاپ شده می‌گردد.

بررسی ساختار شیمیایی هیدروژل های تهیه شده

طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه^۲ (FTIR) برای بررسی پیوندها و گروه های عاملی و ارزیابی برهم‌کنش‌های بین آلژینات و ژلاتین در ترکیب هیدروژل های تهیه شده توسط دستگاه Nicolet iS50 ساخت شرکت Thermo ScientificTM در محدوده $4000 - \text{cm}^{-1}$ انجام شد.

بررسی جذب آب و نرخ تخریب

برای تعیین فعل و انفعالات بیشتر ساختار چاپ شده، ظرفیت تورم و میزان تخریب ساختارهای چاپ شده پس از غوطه وری در محلول نمک فسفات بافر^۳ (PBS) مطابق استاندارد ASTM F2150 مورد بررسی قرار گرفت. نمونه ها در دمای اتاق خشک شدند و وزن خشک نمونه ها ثبت شد. سپس نمونه ها در سه میلی لیتر محلول نمک فسفات بافر در دمای 37°C غوطه ور شدند تا به تورم تعادلی رسیده و متعاقب آن تجزیه شوند. تغییرات وزن در فواصل زمانی تعیین شده تا ۷ روز ثبت شد. ظرفیت تورم ساختارهای چاپ شده و سرعت تخریب هیدروژل‌های تهیه شده به ترتیب با استفاده از روابط ۱ و ۲ محاسبه شدند (۱۹-۲۲).

$$\% \text{Swelling capacity} = \frac{W_{\text{max}} - W_d}{W_d} \times 100 \quad (1)$$

$$\text{Degradation rate (mg/min)} = \frac{W_d - W_{\text{week}}}{7 \times 24 \times 60} \quad (2)$$

عرضی در هیدروژل ترکیبی است که بر خواص فیزیکی، رئولوژیکی و تخریب هیدروژل ترکیبی اثر گذار خواهد بود بدون آنکه تاثیر منفی بر خواص زیستی ژلاتین داشته باشد. در ادامه با استفاده از روش چاپ سه بعدی اکستروژن ساختار متخلخل چاپ شد تا چاپ پذیری هیدروژل های حاصله به اثبات برسد.

مواد و روش‌ها

سدیم آلژینات با وزن مولکولی 180.16 g/gmol از شرکت سیگما آلدریچ و پودر ژلاتین با وزن مولکولی 216.12 g/gmol از شرکت مرک آلمان تهیه شد. کلسیم کلراید نیز به منظور ایجاد اتصالات عرضی در سدیم آلژینات از شرکت گیوان شیمی تهیه شد. در کلیه مراحل تولید هیدروژل از آب مقطر استفاده شد.

تهیه هیدروژل های آلژینات-ژلاتین

جهت ساخت ترکیب‌های مختلف هیدروژل مقدار معینی از ژلاتین و سدیم آلژینات مطابق جدول ۱ در ۲۰ میلی لیتر آب مقطر حل شد. به منظور همگن سازی کامل محلول‌های حاصله، نمونه ها به مدت یک ساعت در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد ورطوبت محیط) روی همزن مغناطیسی قرار گرفت تا محلول کاملاً شفاف و یکنواخت تهیه شود.

آماده سازی جوهر چاپ سه بعدی

هر کدام از محلول‌های همگن شده در مرحله قبل درون یک سرنگ لوئرلاک ۱۰ میلی لیتری ریخته شد و به منظور خارج کردن حباب ها به مدت یک دقیقه با سرعت 1000 rpm محلول ها درون دستگاه سانتیفریوژ قرار گرفتند.

طراحی ساختار برای چاپ سه بعدی

با استفاده از نرم افزار سالیدورک^۱ نسخه 2022 DS SolidWorks با SP5.0، مکعبی با ابعاد $20 \times 20 \times 6.8 \text{ mm}$ طراحی شد. این طرح توسط نرم افزار Simplify 3D به G-Code مناسب برای دستگاه چاپ سه بعدی تبدیل شد.

چاپ سه بعدی هیدروژل های ژلاتین-آلژینات به روش اکستروژن

جدول ۱- ترکیب هیدروژل‌های تهیه شده به همراه کد آنها

آب مقطر (ml)	سدیم آلژینات (mg)	ژلاتین (mg)	کد نمونه
20	0	800	100G-0A
20	200	600	75G-25A
20	400	400	50G-50A
20	600	200	25G-75A
20	800	0	0G-100A

³-Phosphate buffered saline

¹-Solidworks

²-Fourier-transform infrared spectroscopy

۱۳۳۵ به ترتیب مربوط به آمید نوع دوم (Amide II)، سوم (Amide III) است (۴). در طیف های هیدروژل آلزینات-ژلاتین مربوط به گروه های کربوکسیلات آلزینات کمی به عدد موجی کمتر جابه جا شد که می تواند به دلیل همپوشانی پیک های آمید نوع اول و قله های آمید نوع دوم و پیوند های هیدروژنی ناشی از جذب آب در این منطقه باشد. این موضوع در تحقیق کانگ و همکاران نیز اشاره شده است که ترکیب هیدروژل ژلاتین و آلزینات برای کاربرد مهندسی بافت مو مورد ارزیابی قرار دادند (۲۴). تشکیل پیوندهای هیدروژنی بین مولکولی بین گروه های عاملی مختلف در ژلاتین و آلزینات باعث ایجاد درهم تنیدگی مطلوب برای بهبود خواص مکانیکی رئولوژیکی و مکانیکی خواهد بود.

۲- بررسی جذب و نرخ تخریب هیدروژل ها

شکل ۲ نتایج آزمون جذب آب و تورم نمونه ها را در محلول نمک فسفات بافر در بازه هفت روز را نشان می دهد. همانطور که در شکل مشخص است همه نمونه ها جذب آب را در اوایل ۲۴ ساعت نشان دادند، در حالی که برای نمونه های حاوی ژلاتین بیشتر مقدار تورم نسبتاً زیادتر است. تورم بالاتر این نمونه می تواند به نفوذپذیری بیشتر آب به زنجیره های ژلاتینی مربوط باشد که با وزن مولکولی کم و پیوندهای شیمیایی ضعیف در ساختار ژلاتین مرتبط است. پس از اتصال عرضی، پیوندهای شیمیایی قوی تری در زنجیره های آلزینات با مبادله یون های سدیم با یون های کلسیم ایجاد می شود. افزایش مقدار آلزینات و در نتیجه چگالی اتصالات عرضی باعث کاهش نسبی جذب آب مولکول های آب و در نتیجه تورم کمتر در زنجیره آلزینات همراه است. بر اساس همین منطق، سرعت تخریب نمونه های با محتوای ژلاتین بالاتر به طور قابل توجهی سریعتر از زنجیره آلزینات است (۲۵).

در روابط بالا، W_d وزن خشک اولیه، W_{max} حداکثر وزن ساختار چاپ شده پس از غوطه وری و W_{week} وزن پس از یک هفته غوطه وری در محلول PBS است.

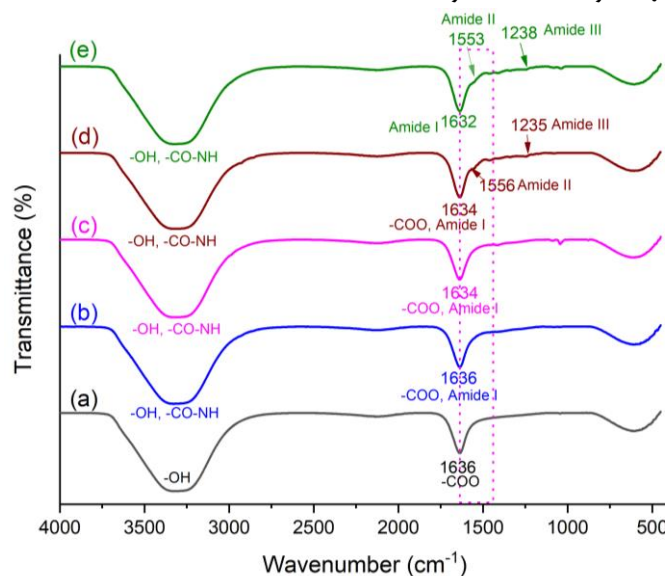
رئولوژی و بررسی ویسکوزیته

رئولوژی هیدروژل ها قبل از ایجاد اتصال عرضی توسط دستگاه رئومتر Anton paar model: MCR-302 ساخت شرکت Thermo Fisher Scientific با صفحات موازی به قطر ۳۰ میلی متر و فاصله صفحات یک میلی متر در دمای اتاق در مدت ۳۰۰ ثانیه انجام شد.

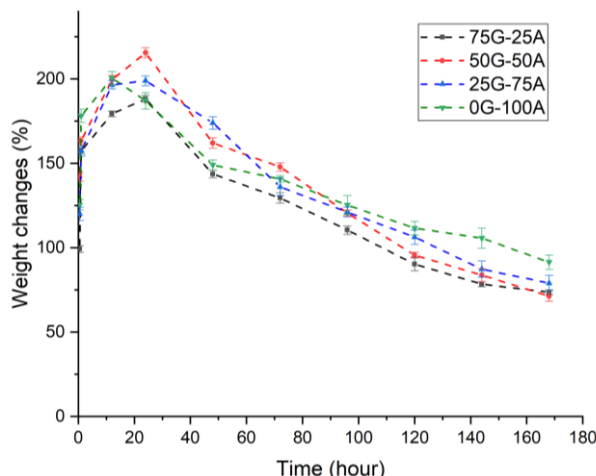
نتایج و بحث

۱- بررسی ساختار شیمیایی

به منظور ارزیابی ساختار شیمیایی برهم کنش های بین آلزینات و ژلاتین در ترکیب هیدروژل طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه برای نمونه های تهیه شده استفاده شد و نتایج آن در شکل ۱ نشان داده شده است. آلزینات و ژلاتین دارای گروه های کربوکسیلات (-COOH) و گروه های هیدروکسیل (-OH) بوده که پیک های آنها با یکدیگر همپوشانی خواهد داشت. به طور مثال پیک گسترده در محدوده $3200-3500\text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه های هیدروکسیل در هر دو پلیمر است. پیوندهای آمیدی (-CO-NH) با افزایش غلظت ژلاتین افزایش می یابد، در حالی که در همان زمان، گروه های کربوکسیلات با کاهش غلظت آلزینات کاهش می یابد که با افزایش محتوای ژلاتین جبران می شود. به طور خاص، طیف سدیم آلزینات دارای پیک ساختاری در محدوده 1636 cm^{-1} که مربوط به کششی نامتقارن گروه های کربوکسیلات در آلزینات اختصاص داده می شوند (۲۳). طیف مادون قرمز تبدیل فوریه ژلاتین دارای پیک های مشخصه در محدوده 1632 cm^{-1} بوده که مربوط به آمید نوع اول (Amide I) و همچنین پیک ها در محدوده 1553 cm^{-1} و 1238 cm^{-1} (Amide II و Amide III) است.



شکل ۱- طیف های مادون قرمز تبدیل فوریه هیدروژل های تهیه شده، (a) هیدروژل 0G-100A، (b) هیدروژل 25G-75A، (c) هیدروژل 50G-50A، (d) هیدروژل 75G-25A، (e) هیدروژل 100G-0A



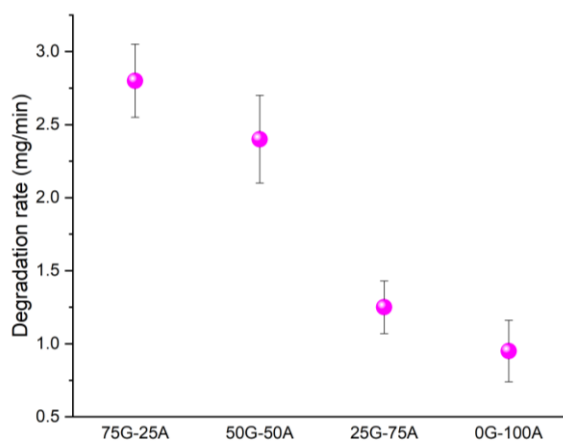
شکل ۲- نتایج آزمون تورم هیدروژل‌های تهیه شده در محدوده زمانی یک هفته

همینطور 50G-50A نیز رفتار برشی رقیق شونده را طیف وسیعی از نرخ برش از خود نشان می‌دهند در حالی که در نرخ برش بسیار کم این رفتار در هیدروژل‌ها دیده نمی‌شود که می‌تواند ناشی از ایجاد یک سری برهمکنش‌های برگشت پذیر در شبکه هیدروژلی در اثر نرخ برشی کم باشد در حالی که نرخ برشی به اندازه ای نیست که بتواند باعث شکسته شدن این برهمکنش‌ها و یا باز شدن گره خوردگی‌ها^۲ شده که در باعث کاهش ویسکوزیته می‌شوند. از طرف دیگر دو هیدروژل خالص آلژینات و ژلاتین کمترین رفتار برشی رقیق شونده را از خود نشان می‌دهند در حالی که در نرخ برش بسیار کم، ویسکوزیته هیدروژل خاص آلژینات به مقدار کمی افزایش پیدا کرده است که می‌تواند ناشی از ایجاد یک سری برهمکنش درون شبکه این هیدروژل بوده که در ادامه با افزایش نرخ برش این برهمکنش‌ها شکسته می‌شوند. نتایج شکل ۴ تایید می‌کند که ترکیب هیدروژل به دلیل افزایش تعامل الکترواستاتیکی بین زنجیره‌های ژلاتین و آلژینات و کاهش حجم آزاد، رفتار برشی رقیق شونده بالاتری را ایجاد می‌کند (۲۶، ۲۷).

شکل ۳ نتایج نرخ تخریب نمونه‌ها پس از چاپ، ایجاد اتصالات عرضی و یک هفته غوطه‌وری در محلول نمک فسفات بافر را نشان می‌دهد. همانطور که از این شکل مشخص است افزایش میزان سدیم آلژینات در هیدروژل‌های چاپ شده باعث افزایش میزان اتصالات عرضی در آنها پس از غوطه‌وری نمونه‌ها در محلول کلسیم کلراید شده است. همانطور که گفته شد افزایش اتصالات عرضی از یک طرف باعث کاهش جذب آب شده از طرف دیگر به دلیل ایجاد برهمکنش‌های قوی‌تر در هیدروژل باعث کاهش تخریب می‌گردد (۲۵).

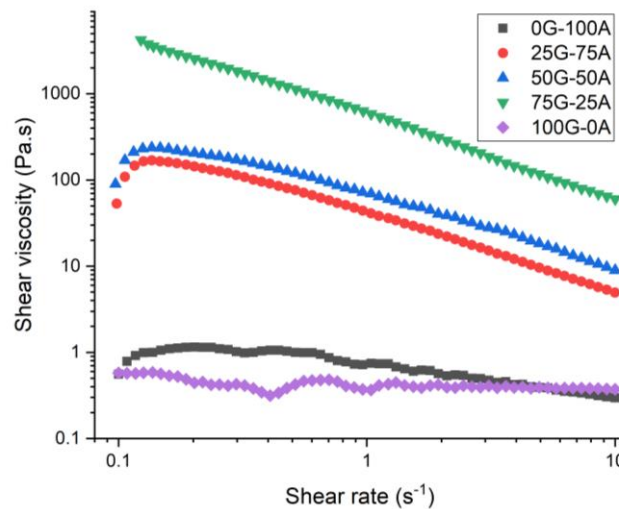
۳- بررسی رئولوژی و ویسکوزیته

شکل ۴ نتایج ویسکوزیته هیدروژل‌های تولید شده بر حسب نرخ برش را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است رفتار برشی رقیق شونده^۱ در همه هیدروژل‌ها دیده می‌شود. همچنین از نتایج مشخص است که هیدروژل 75G-25A بیشترین مقدار رفتار برشی رقیق شونده را از خود نشان می‌دهد. همچنین دو هیدروژل دیگر 25G-75A و



شکل ۳- نرخ تخریب نمونه‌های چاپ شده پس از ایجاد اتصالات عرضی در یک هفته غوطه‌وری در محلول نمک فسفات بافر

- 1- Shear thinning
- 2- Entanglements



شکل ۴- نتایج ویسکوزیته هیدروژل‌های تهیه شده با تغییرات نرخ برش

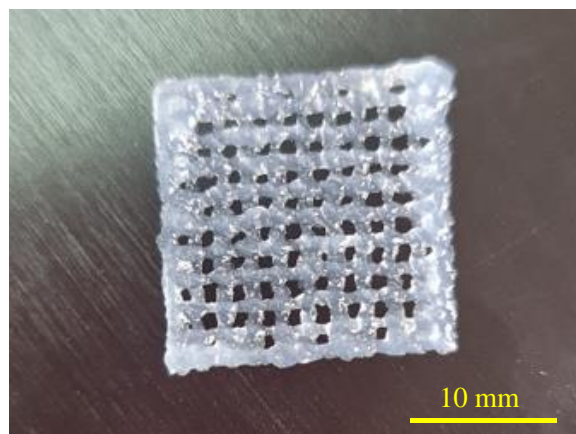
در این تحقیق هیدروژل‌های آلژینات-ژلاتین در درصدهای مختلف تهیه شد و سپس ساختار شیمیایی و رفتار تورم و تخریب آنها به همراه ویسکوزیته مورد بررسی قرار گرفت. نتایج آزمون طیف سنجی مادون قرمز نشان داد که حضور همزمان این دو پلیمر در ساختار هیدروژل باعث ایجاد برهمکنش‌های فیزیکی می‌شود که این نتیجه در اندازه گیری‌های ویسکوزیته نیز به اثبات رسید. نتایج آزمون تورم و تخریب نشان داد، افزایش میزان ژلاتین در ساختار هیدروژل باعث افزایش جذب آب و افزایش نرخ تخریب هیدروژل می‌گردد. همچنین نتایج اندازه گیری ویسکوزیته نشان داد هیدروژل‌های خالص ژلاتین و آلژینات دارای رفتار بسیار کم برشی رقیق شونده هستند در حالی که ترکیب این دو هیدروژل باعث ایجاد یک سری برهمکنش‌های برگشت پذیر و تغییر در حجم آزاد در ساختار هیدروژل شده که باعث ایجاد رفتار برشی رقیق شونده در هیدروژل می‌شود. این رفتار به شدت در فرآیند چاپ هیدروژل‌ها الزامی است چرا که باعث کاهش فشار در فرآیند چاپ شده که این مطلب به نوبه خود باعث پایداری ابعادی بیشتر هیدروژل پس از چاپ شده و همچنین ایجاد ساختارهای دقیق و متخلخل را فراهم می‌نماید.

بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که هیدروژل‌های 75G-25A و سپس 50G-50A و 25G-75A بهترین نمونه‌ها برای چاپ سه بعدی می‌باشند. این موضوع به دلیل آن است که هیدروژل‌های خالص آلژینات و ژلاتین به دلیل عدم رفتار برشی رقیق شونده نیاز به فشار بالاتر در فرآیند چاپ دارند که این مطلب سبب کاهش دقت فرآیند چاپ خواهد شد (۲۸).

بررسی چاپ پذیری هیدروژل‌های ژلاتین-آلژینات به روش اکستروژن

همانطور که گفته شد ایجاد ساختارهای سه بعدی طراحی شده برای هیدروژل‌های در کاربردهای پزشکی و شخصی سازی آنها بسیار مورد توجه است. شکل ۵، تصویر هیدروژل 50G-50A چاپ شده پس از غوطه وری در محلول کلسیم کلراید و ایجاد شبکه اتصالات عرضی را نشان می‌دهد. همانطور که مشخص است این ساختار هیدروژلی دارای پایداری ابعادی بوده و ساختار متخلخل پس از فرآیند چاپ حفظ شده است.

نتیجه گیری



شکل ۵- تصویر نمونه چاپ شده هیدروژل 75G-25A پس از چاپ و غوطه وری در محلول کلسیم کلراید

مشارکت نویسندگان

انجام آزمایش‌ها: رسول اسمعیلی نیسیانی، علی اشتریان؛
تحلیل داده‌ها و نتایج: رسول اسمعیلی نیسیانی، علی اشتریان، فرشته
حسن زاده افروزی، علی خوش سیما،
نگارش نهایی: رسول اسمعیلی نیسیانی، علی اشتریان، فرشته حسن
زاده افروزی، علی خوش سیما،

تعارض منافع

بنابر اظهار نویسندگان، مقاله حاضر فاقد هرگونه تعارض منافع بوده
است.

ملاحظات اخلاقی پیروی از اصول اخلاق پژوهش

همکاری مشارکت‌کنندگان در تحقیق حاضر به صورت داوطلبانه و با
رضایت آنان بوده است.

حامی مالی

این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران
کشور (INSF) برگرفته شده از طرح شماره ۴۰۲۶۰۱۴ انجام شده
است.

References

1. Rayati Shavazi MR, Mahmoodi M, Nasirizadeh N. Synthesis and Characterization of Temperature-Sensitive Hydrogel Copolymer Based on N-isopropylacrylamide for Medical Applications. *Journal of New Materials*. 2017;7(27):15-26.
2. Hafezi M, Khorasani SN, Khalili S, Neisiany RE. Self-healing interpenetrating network hydrogel based on GelMA/alginate/nano-clay. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023;242:124962.
3. Enayati M, Liu W, Madry H, Neisiany RE, Cucchiari M. Functionalized hydrogels as smart gene delivery systems to treat musculoskeletal disorders. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2024;331:103232.
4. Andrezza R, Morales A, Pieniz S, Labidi J. Gelatin-Based Hydrogels: Potential Biomaterials for Remediation. *Polymers*. 2023; 15(4):1026.
5. Mhd Sarbon N, Badii F, Howell NK. Preparation and characterisation of chicken skin gelatin as an alternative to mammalian gelatin. *Food Hydrocolloids*. 2013;30(1):143-51.
6. Günter EA, Melekhin AK, Belozarov VS, Martinson EA, Litvinets SG. Preparation, physicochemical characterization and swelling properties of composite hydrogel microparticles based on gelatin and pectins with different structure. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2024;258:128935.
7. Jiang S, Deng J, Jin Y, Qian B, Lv W, Zhou Q, et al. Breathable, antifreezing, mechanically skin-like hydrogel textile wound dressings with dual antibacterial mechanisms. *Bioactive Materials*. 2023;21:313-23.
8. یزدانی آ، نوربخش ا. " تولید داربست هیدروکسی آباتیت - اسید هیالورونیک به روش تبخیر حلال " فصلنامه علمی - پژوهشی مواد نوین، دوره ۱۰، شماره ۳۶، ۱۳۹۸، ۱۳۳-۱۴۰.
9. Murab S, Gupta A, Włodarczyk-Biegun MK, Kumar A, van Rijn P, Whitlock P, et al. Alginate based hydrogel inks for 3D bioprinting of engineered orthopedic tissues. *Carbohydrate Polymers*. 2022;296:119964.
10. Wierzbicka A, Bartniak M, Waśko J, Kolesińska B, Grabarczyk J, Bociaga D. The Impact of Gelatin and Fish Collagen on Alginate Hydrogel Properties: A Comparative Study. *Gels*. 2024; 10(8): 491.
11. Bertuola M, Aráoz B, Gilabert U, Gonzalez-Wusener A, Pérez-Recalde M, Arregui CO, et al. Gelatin–alginate–hyaluronic acid inks for 3D printing: effects of bioglass addition on printability, rheology and scaffold tensile modulus. *Journal of Materials Science*. 2021;56(27):15327-43.
12. Giuseppe MD, Law N, Webb B, A. Macrae R, Liew LJ, Sercombe TB, et al. Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 2018;79:150-7.
13. Ren P, Wei D, Liang M, Xu L, Zhang T, Zhang Q. Alginate/gelatin-based hybrid hydrogels with function of injecting and encapsulating cells in situ. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2022;212:67-84.
14. Ashtariyan A, Khorsand H, Bavarsiha F. 3D printed Sr-HA/PCL scaffolds: Fabrication via liquid solvent technique. *Polymers for Advanced Technologies*. 2023;34(7):2355-68.
15. Alruwaili M, Lopez JA, McCarthy K, Reynaud EG, Rodriguez BJ. Liquid-phase 3D

[bioprinting of gelatin alginate hydrogels: influence of printing parameters on hydrogel line width and layer height. Bio-Design and Manufacturing. 2019;2\(3\):172-80.](#)

16. Piao Y, You H, Xu T, Bei H-P, Piwko IZ, Kwan YY, et al. Biomedical applications of gelatin methacryloyl hydrogels. *Engineered Regeneration*. 2021;2:47-56.

17. Piola B, Sabbatini M, Gino S, Invernizzi M, Renò F. 3D Bioprinting of Gelatin–Xanthan Gum Composite Hydrogels for Growth of Human Skin Cells. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(1):539.

18. Łabowska MB, Cierluk K, Jankowska AM, Kulbacka J, Detyna J, Michalak I. A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting. *Materials*. 2021; 14(4): 858.

19. Krishnamoorthy S, Zhang Z, Xu C. Biofabrication of three-dimensional cellular structures based on gelatin methacrylate–alginate interpenetrating network hydrogel. *Journal of Biomaterials Applications*. 2019;33(8):1105-17.

20. Ma C, Choi J-B, Jang Y-S, Kim S-Y, Bae T-S, Kim Y-K, et al. Mammalian and Fish Gelatin Methacryloyl–Alginate Interpenetrating Polymer Network Hydrogels for Tissue Engineering. *ACS Omega*. 2021;6(27):17433-41.

21. Aldana AA, Valente F, Dilley R, Doyle B. Development of 3D bioprinted GelMA-alginate hydrogels with tunable mechanical properties. *Bioprinting*. 2021;21:e00105.

۲۲. شاه نظری ز، کوپائی ن. "ساخت و مشخصه یابی داربست شبکه ای مهندسی بافت بر پایه پلی کاپرولکتون دی ال / پلی اتیلن گالیکول دی آکریلات / هیدروکسی آپاتیت" فصلنامه علمی - پژوهشی مواد نوین، دوره ۱۰ ف شماره ۳۷، ۱۳۹۸، ۳۳-۴۶.

23. Dalal SR, Hussein MH, El-Naggar NE-A, Mostafa SI, Shaaban-Dessuuki SA.

[Characterization of alginate extracted from Sargassum latifolium and its use in Chlorella vulgaris growth promotion and riboflavin drug delivery. Scientific Reports. 2021;11\(1\):16741.](#)

24. Kang D, Liu Z, Qian C, Huang J, Zhou Y, Mao X, et al. 3D bioprinting of a gelatin-alginate hydrogel for tissue-engineered hair follicle regeneration. *Acta Biomaterialia*. 2023;165:19-30.

25. Kulig D, Zimoch-Korzycka A, Jarmoluk A, Marycz K. Study on Alginate–Chitosan Complex Formed with Different Polymers Ratio. *Polymers*. 2016; 8(5): 167.

26. Abedi K, Keshvari H, Solati-Hashjin M. Extrusion-based bioprinting: considerations toward gelatin-alginate bioink. *Rapid Prototyping Journal*. 2024;30(6):1094-104.

27. Bäther S, Seibt JH, Hundschell CS, Bonilla JC, Clausen MP, Wagemans AM. Phase behaviour and structure formation of alginate-gelatin composite gels. *Food Hydrocolloids*. 2024;149:109538.

28. Palma JH, Bertuola M, Hermida ÉB. Modeling calcium diffusion and crosslinking dynamics in a thermogelling Alginate-Gelatin-Hyaluronic acid ink: 3D bioprinting applications. *Bioprinting*. 2024;38:e00329.