

هیدروژل آلژینات با یومیمتیک: بستری نوین برای نگهداری بافت تخمدان

انکپسوله شده در مدل حیوانی

کیوان سبحانی^۱، دکتر امجد فرزین پور^{۲*}، دکتر کریستیانی آندراده آموریم^۳، دکتر فردین عمیدی^۴

۱. دکتری تخصصی، گروه فیزیولوژی، آزمایشگاه فیزیولوژی تولید مثل، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۲. دانشیار گروه فیزیولوژی، آزمایشگاه فیزیولوژی تولید مثل، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران.
۳. استاد مؤسسه مطالعات تجربی و بالینی، آزمایشگاه تحقیقاتی فیزیوپاتولوژی تولید مثل، دانشگاه یو سی لوون، بروکسل، بلژیک.
۴. استاد گروه آناتومی پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۷/۰۳ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۱۰/۰۸

خلاصه

مقدمه: فرآیند انجماد- ذوب بافت تخمدان، با وجود اهمیت آن در حفظ باروری، معمولاً باعث آسیب‌های ساختاری و کاهش بقای فولیکول‌ها می‌شود. این آسیب‌ها عمدتاً ناشی از استرس‌های اسمزی و مکانیکی و تغییرات ریزمحیط بافت هستند. هیدروژل آلژینات به دلیل زیست‌سازگاری و قابلیت تنظیم خواص مکانیکی، به عنوان یک سیستم حفاظتی بالقوه برای انکپسوله‌سازی بافت تخمدان مطرح است. مطالعه حاضر با هدف بررسی اثر انکپسوله‌سازی بافت تخمدان در هیدروژل آلژینات روی کاهش آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد- ذوب انجام شد.

روش کار: هیدروژل آلژینات با ترکیب آلژینات، کلسیم کربنات (CaCO_3) و گلوکونو دلتا لاکتون ($\text{Glucono-}\delta$ -lactone; GDL) و با استفاده از روش طراحی سطح پاسخ (RSM) برای دستیابی به مدول ذخیره و زمان ژل شدن مشابه بافت طبیعی طراحی شد. قطعات کورتکس تخمدان در سه گروه آزمایشی: بافت تازه، بافت منجمد شده به روش آهسته، و بافت منجمد شده و انکپسوله شده در آلژینات قرار گرفتند. پس از ذوب، قطعات به مدت ۲۴ ساعت کشت داده شدند و ارزیابی‌های بافتی شامل شمارش فولیکول‌های آغازین و اولیه و بررسی سلول‌های استرومایی و ماتریکس خارج سلولی انجام شد. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۹) و آزمون آنووا با تعقیبی توکی انجام شد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: تراکم فولیکول‌های آغازین و اولیه در گروه انکپسوله شده به‌طور معنی‌داری بالاتر از گروه منجمد بود ($p < 0/05$). سلامت سلول‌های استرومایی و ساختار ماتریکس در گروه هیدروژل بهتر حفظ شد ($p < 0/001$). مدول ذخیره هیدروژل حدود ۱۷۵۰ پاسکال و زمان ژل شدن تقریباً ۳۰ دقیقه بود که خواص مکانیکی مشابه بافت طبیعی را شبیه‌سازی می‌کند.

نتیجه‌گیری: انکپسوله‌سازی بافت تخمدان در هیدروژل آلژینات باعث کاهش آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد- ذوب و بهبود بقای فولیکول‌ها و ساختار استرومای تخمدان می‌شود. این روش، راهکاری نوین برای حفظ باروری ارائه می‌دهد.

کلمات کلیدی: آلژینات، انجماد بافت، انکپسولاسیون، بقای فولیکول، تخمدان

* نویسنده مسئول مکاتبات: دکتر امجد فرزین پور؛ آزمایشگاه فیزیولوژی تولید مثل، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران. تلفن: ۰۸۷-۳۳۷۱۹۴۷۹؛ پست الکترونیک: Amjadfarzinpour@uok.ac.ir

مقدمه

بافت تخمدان پستانداران شامل ذخیره‌ای محدود از فولیکول‌های آغازین است که ظرفیت باروری را تعیین کرده و به مرور زمان در اثر افزایش سن و یا عوامل محیطی کاهش پیدا می‌کند (۱). حفظ این ذخیره فولیکولی به‌ویژه در بیماران در معرض درمان‌هایی مانند شیمی‌درمانی و پرتودرمانی و همچنین در برنامه‌های حفظ تنوع زیستی گونه‌های در خطر انقراض، به یکی از چالش‌های مهم پزشکی و دامپزشکی تبدیل شده است (۲، ۳). در این میان، انجماد بافت تخمدان به‌عنوان یک روش نوین و غیروابسته به تحریک هورمونی یا حضور همسر/اهداءکننده، امکان ذخیره‌سازی هزاران فولیکول نابالغ را فراهم کرده و در عین حال از تأخیر در شروع درمان‌های ضروری جلوگیری می‌کند (۴).

روش سنتی انجماد آهسته همچنان به‌عنوان روش انتخابی برای حفظ ساختار و عملکرد انواع مختلف فولیکول‌ها در بافت تخمدان شناخته می‌شود (۵). با این‌حال، فرآیندهای انجماد و ذوب می‌توانند منجر به تشکیل کریستال‌های یخ، آسیب‌های غشایی، القای نکروز و آپوپتوز و تخریب شبکه‌های استرومایی شوند (۶). این آسیب‌ها در نهایت موجب کاهش زنده‌مانی فولیکول‌ها، تخریب ماتریکس خارج‌سلولی و افت عملکردی بافت پس از پیوند یا کشت داخل آزمایشگاهی می‌شوند (۷، ۸). در سال‌های اخیر، با پیشرفت فناوری‌های مهندسی بافت، استفاده از داربست‌های زیستی و هیدروژل‌ها برای افزایش مقاومت بافت تخمدان در برابر تنش‌های انجمادی و بهبود نتایج پس از ذوب مورد توجه گسترده قرار گرفته است (۹، ۱۰).

در این راستا، هیدروژل‌های پلی‌ساکاریدی از جمله آلژینات، هیالورونیک اسید و کیتوزان به‌دلیل زیست‌سازگاری بالا، سهولت در ژل شدن و توانایی شبیه‌سازی محیط طبیعی بافت، در مهندسی بافت تولیدمثلی کاربرد فزاینده‌ای یافته‌اند (۱۱). آلژینات، به‌عنوان یکی از پرکاربردترین این مواد، پس از پیوند با یون‌های دوظرفیتی مانند کلسیم، شبکه‌ای سه‌بعدی ایجاد می‌کند که از سلول‌ها و فولیکول‌ها در برابر آسیب‌های فیزیکی محافظت کرده و امکان تبادل گاز و

مواد مغذی را فراهم می‌سازد (۱۲). افزون بر این، آلژینات در قالب‌های مختلفی از جمله میکروذرات، هیدروژل‌های تزریقی، داربست‌های سه‌بعدی و بیوانک‌ها، پلتفرمی مناسب برای کپسوله‌سازی سلول‌ها و حمایت از بقای آن‌ها در پزشکی بازساختی محسوب می‌شود (۱۳).

یکی از روش‌های پیشرفته‌تر برای تشکیل ژل آلژینات، استفاده از سیستم ژله شدن داخلی بر پایه گلوکونو دلتا لاکتون (GDL) و کلسیم کربنات (CaCO_3) است. در این فرآیند، GDL به‌تدریج به اسید گلوکونیک تبدیل شده و با کاهش کنترل شده pH، یون‌های Ca^{2+} را از CaCO_3 آزاد می‌کند. این آزادسازی تدریجی از شوک یونی جلوگیری کرده و ژل‌هایی یکنواخت‌تر با استحکام مکانیکی بالاتر ایجاد می‌کند (۱۴). با وجود این، بهینه‌سازی دقیق نسبت مولی GDL به CaCO_3 و بررسی اثرات آن بر ویژگی‌های رئولوژیکی هیدروژل در مقایسه با خواص مکانیکی بافت تخمدان هنوز به‌طور کامل مورد مطالعه قرار نگرفته است (۱۵).

در مطالعات اخیر، ترکیب آلژینات با سایر بیوپلیمرها، موجب بهبود عملکرد زیستی هیدروژل‌ها شده است؛ به‌عنوان مثال، هیدروژل هیالورونیک اسید - آلژینات در مقایسه با آلژینات و فیبرین - آلژینات، سبب افزایش تشکیل فولیکول‌های آنترال، بیان ژن‌های رشد و ترشح استرادیول شده و هم‌کشت با سلول‌های تخمدانی رشد و بقای فولیکول را بهبود داده است (۱۶). همچنین استفاده از ترکیبات ضدیخ بدون دی‌متیل سولفوکساید (DMSO) همراه با انکیپسوله‌سازی در هیدروژل، از جمله ۱۲٪ اتیلن گلیکول، ۱۲٪ پروپیلن گلیکول، ۵/۰ مولار ساکارز و ۷۵ میکرومولار اپی‌گالوکاتچین گالات، منجر به کاهش آسیب‌های اکسیداتیو، فیبروز و آپوپتوز و بهبود کیفیت بافت تخمدان پس از انجماد شده است (۱۷). علاوه بر این، کپسوله‌سازی بافت تخمدان در هیدروژل آلژینات ۱٪ پیش از انجماد شیشه‌ای، آسیب‌های انجمادی را کاهش داده و بیان ژن‌های

¹ Glucono- δ -lactone

² Calcium carbonate

³ Dimethyl sulfoxide

مرتبط با آپوپتوز و شاخص‌های استرس اکسیداتیو را پایین آورده است (۱۸). از لحاظ کاربردی‌تر، اصلاحات شیمیایی در آلژینات، امکان آزادسازی هدفمند و کنترل شده داروها را فراهم کرده و در فناوری‌های نانوذرات و چاپ زیستی نیز مورد استفاده قرار گرفته است، هرچند چالش‌هایی همچون مقیاس‌پذیری و پایداری زیستی هنوز باقی‌مانده است (۱۹).

در نهایت، در حالی که آسیب‌های ایسکمی - بازجریان و استرس اکسیداتیو از عوامل اصلی کاهش فولیکول‌ها پس از پیوند هستند، توسعه راهکارهای نوین مانند استفاده از داربست‌های آنژیوژنیک، ضدیخ‌های مهندسی‌شده و مهار مسیر mTOR^۱ در حال گسترش است (۲۰). بر این اساس، در پژوهش حاضر با استفاده از روش طراحی سطح پاسخ (RSM)^۲، ترکیب بهینه‌ای از آلژینات، CaCO₃ و GDL برای تولید یک هیدروژل با ویژگی‌های رئولوژیکی مشابه بافت طبیعی تخمدان طراحی و بررسی شد. سپس با استفاده از این داربست بهینه شده، انکپسوله‌سازی بافت تخمدان انجام و ارزیابی‌های دقیق بافتی شامل تراکم فولیکول‌ها و سلامت استرومایی پس از فرآیند انجماد - ذوب صورت گرفت. مطالعه حاضر با هدف ارتقای کیفی روش‌های انجماد بافت تخمدان، افق‌های جدیدی در زمینه حفظ باروری انسان، دامپزشکی و حفاظت از گونه‌های در خطر انقراض ارائه می‌دهد.

روش کار

تمامی مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه از شرکت Sigma-Aldrich آلمان / ایالات متحده تهیه شد. این مواد شامل آلژینات سدیم، CaCO₃، GDL و سایر معرف‌های مرتبط برای تهیه هیدروژل و محیط کشت بودند.

برای بهینه‌سازی فرمولاسیون هیدروژل آلژینات مناسب جهت انکپسوله‌سازی بافت تخمدان، از روش RSM با طراحی Box-Behnken استفاده شد. سه متغیر مستقل شامل غلظت سدیم آلژینات (۰/۵، ۱/۲۵ و

۲٪)، غلظت CaCO₃ (۲۰، ۵۰ و ۸۰ میلی مولار) و غلظت گلوکونو- دلتا- لاکتون (GDL)؛ در سطوح ۴۰، ۱۰۰ و ۱۶۰ میلی مولار بررسی شد. GDL با ایجاد محیط اسیدی، باعث آزادسازی تدریجی یون‌های کلسیم از CaCO₃ شده و فرآیند ژله شدن را به‌صورت کنترل شده فعال می‌کند. هر ترکیب شامل سه مرحله آماده‌سازی بود: ابتدا آلژینات در آب مقطر حل شد، سپس سوسپانسیون CaCO₃ اضافه و مخلوط شد و در نهایت محلول تازه GDL افزوده شد. نمونه‌ها بلافاصله جهت آزمون رئولوژیکی منتقل شدند (۲۱).

ویژگی‌های ویسکوالاستیک هیدروژل‌ها با استفاده از رئومتر (Anton Paar MCR 302, Austria) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. برای هر فرمول، آزمون دامنه فرکانس (۱۰-۰/۱ Hz) با کرنش ثابت ۰/۱٪ انجام شد و مقادیر مدول ذخیره (G') و فاکتور میرایی (Tan δ) در فرکانس مرجع ۱ هرتز ثبت گردید. همچنین آزمون دامنه کرنش (۱۰۰۰-۰/۱) در فرکانس ۱ هرتز جهت تعیین محدوده ویسکوالاستیک خطی (LVR)^۳ و ارزیابی پایداری مکانیکی ژل‌ها انجام شد.

بر اساس تحلیل داده‌ها، افزایش غلظت آلژینات منجر به افزایش قابل توجه G' شد. به‌عنوان مثال، در فرمول‌هایی با ۲٪ آلژینات، G' به بیش از ۵۰۰۰ پاسکال رسید که بیانگر ساختار ژلی مستحکم است. در مقابل، فرمول‌های دارای ۰/۵٪ آلژینات، مدول‌های پایین‌تر و رفتار ژلی نرم‌تری داشتند. مقدار Tan δ، به‌عنوان شاخص رفتار الاستیک- ویسکوز، در بیشتر فرمولاسیون‌های موفق در بازه ۰/۲۵-۰/۱۵ قرار گرفت؛ این مقادیر نشان‌دهنده غالب بودن خاصیت الاستیک و مناسب بودن ژل برای شبیه‌سازی رفتار مکانیکی بافت تخمدان هستند. همچنین مشاهده شد که غلظت GDL نقش مهمی در تعیین زمان ژل شدن دارد. در حالی که GDL پایین (۴۰ میلی مولار) منجر به زمان‌های ژل شدن طولانی (تا ۹۰ دقیقه) شد و GDL بالا (۱۶۰ میلی مولار) فرآیند ژل شدن را به حدود ۱۵ دقیقه کاهش داد. بنابراین

¹ Mammalian target of rapamycin

² Response surface method

³ Linear viscoelastic region

نسبت GDL به CaCO_3 ، پارامتر بحرانی برای کنترل سرعت و یکنواختی شبکه ژل محسوب می‌شود. در این پژوهش، تنها قطعات تخمدان سالم و فاقد هرگونه ضایعه ماکروسکوپی یا تغییرات نکروتیک از بره‌های نابالغ (سن تقریباً ۶-۵ ماه؛ ۴ رأس) که در شرایط بهداشتی و تغذیه‌ای مشابه نگهداری می‌شدند، استفاده شد. تمامی نمونه‌ها پس از ذبح مطابق با دستورالعمل‌های بهداشتی و اخلاقی جمع‌آوری شدند. نمونه‌ها بلافاصله پس از برداشت، در شرایط استریل و در محلول PBS حاوی پنی‌سیلین - استرپتومایسین پیش‌سرد شده، به آزمایشگاه منتقل شدند. پس از جداسازی نواحی کورتکس تخمدان، ۶ قطعه به ازای هر حیوان با ابعاد یکنواخت تقریباً $4 \times 4 \times 1$ میلی‌متر تهیه شدند. این قطعات بسته به گروه آزمایشی در یکی از سه دسته قرار گرفتند: بافت تازه (شاهد)، بافت منجمد شده به روش آهسته، و بافت منجمد شده و انکپسوله شده در آلژینات. در گروه سوم، انکپسوله‌سازی در هیدروژل آلژینات بهینه شده انجام و فرآیند ژل شدن در دمای اتاق به مدت ۱۵ تا ۳۰ دقیقه تکمیل شد. این فرمولاسیون نهایی بر اساس بهترین ویژگی‌های مکانیکی و ویسکوالاستیک انتخاب شده بود. تمام قطعات بافتی به‌عنوان نمونه‌های مستقل در نظر گرفته شدند. نمونه‌هایی که دارای هرگونه آسیب فیزیکی، تغییر رنگ غیرطبیعی، آلودگی میکروبی یا تأخیر بیش از دو ساعت در انتقال به آزمایشگاه بودند، از مطالعه حذف شدند. همچنین، بافت‌هایی که پس از برش دارای ضخامت یا یکنواختی نامناسب برای انکپسوله‌سازی بودند، در مراحل بعدی مورد استفاده قرار نگرفتند.

پس از فرآیند انجماد به روش آهسته و متعاقب آن ذوب، قطعات بافت تخمدان به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استریل، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، و $5\% \text{CO}_2$ و رطوبت اشباع، کشت داده شدند (۲۲). محیط کشت مورد استفاده شامل $\alpha\text{-MEM}^1$ مکمل شده با ۲ میلی‌مولار گلوتامین، ۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی، ۳ میلی‌مولار پیروات، ۱٪ مکمل ITS (حاوی ۱۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر انسولین،

۶/۲۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر ترانسفرین و ۶/۲۵ نانوگرم/ میلی‌لیتر سلنیوم) و ۱٪ پنی‌سیلین - استرپتومایسین بود. قطعات انکپسوله شده بعد از برداشتن هیدروژل، مستقیماً در چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه‌ای حاوی محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از دوره کشت، نمونه‌های بافتی در پارافرمالدئید ۴٪ تثبیت شده و از آن‌ها مقاطع بافتی گرفته شد.

از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین - ائوزین (H&E) برای بررسی مورفولوژی فولیکول‌ها و ساختار کلی بافت استفاده شد. فولیکول‌ها به سه دسته آغازین، اولیه در حال رشد و ثانویه طبقه‌بندی شدند. فولیکول‌ها بر اساس یکپارچگی غشای پایه، یکنواختی اووسیت، حضور هسته‌های پیکنوتیک و تراکم سلول‌های گرانولوزا به‌عنوان سالم یا آترتیک در نظر گرفته شدند. تراکم فولیکولی به‌صورت تعداد فولیکول سالم در هر ۱۰۰ میکرومتر مربع گزارش شد. در تصاویر رنگ‌آمیزی شده با H&E، تعداد سلول‌های استرومایی بر اساس شمارش هسته‌های رنگ شده در ناحیه کورتکس در ۱۰ میدان دید تصادفی (بزرگ‌نمایی $40 \times$) و با استفاده از تصاویر اسکن شده دیجیتال محاسبه شد. میانگین تراکم سلولی بر اساس تعداد سلول در هر ۱۰۰ میکرومتر مربع گزارش شد. تمام داده‌های کمی از جمله تراکم فولیکولی، تراکم سلول‌های استرومایی و نسبت فولیکول‌های سالم به آترتیک به‌صورت میانگین \pm انحراف معیار گزارش شدند. تحلیل آماری با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism (نسخه ۹) انجام گرفت. برای مقایسه بین گروه‌ها، از آزمون آنالیز واریانس یک‌طرفه همراه با آزمون تعقیبی توکی جهت بررسی تفاوت‌های معنادار استفاده شد. پیش از انجام آن‌ووا، نرمال بودن توزیع داده‌ها با استفاده از آزمون شاپیرو-ویلک بررسی شد. از آنجایی که بافت‌ها از حیواناتی با شرایط سنی و فیزیولوژیکی مشابه تهیه شده بودند و قطعات به‌طور تصادفی بین گروه‌ها توزیع شدند، اثر بره به‌عنوان عامل مستقل در تحلیل آماری در نظر گرفته نشد. میزان p کمتر از ۰/۰۵ به‌عنوان سطح معنی‌دار در نظر گرفته شد.

پس از فرآیند انجماد به روش آهسته و متعاقب آن ذوب، قطعات بافت تخمدان به مدت ۲۴ ساعت در شرایط استریل، در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، و $5\% \text{CO}_2$ و رطوبت اشباع، کشت داده شدند (۲۲). محیط کشت مورد استفاده شامل $\alpha\text{-MEM}^1$ مکمل شده با ۲ میلی‌مولار گلوتامین، ۳ میلی‌گرم/ میلی‌لیتر آلبومین سرم گاوی، ۳ میلی‌مولار پیروات، ۱٪ مکمل ITS (حاوی ۱۰ میکروگرم/ میلی‌لیتر انسولین،

۶/۲۵ میکروگرم/ میلی‌لیتر ترانسفرین و ۶/۲۵ نانوگرم/ میلی‌لیتر سلنیوم) و ۱٪ پنی‌سیلین - استرپتومایسین بود. قطعات انکپسوله شده بعد از برداشتن هیدروژل، مستقیماً در چاهک‌های پلیت ۱۲ خانه‌ای حاوی محیط کشت به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند. بعد از دوره کشت، نمونه‌های بافتی در پارافرمالدئید ۴٪ تثبیت شده و از آن‌ها مقاطع بافتی گرفته شد.

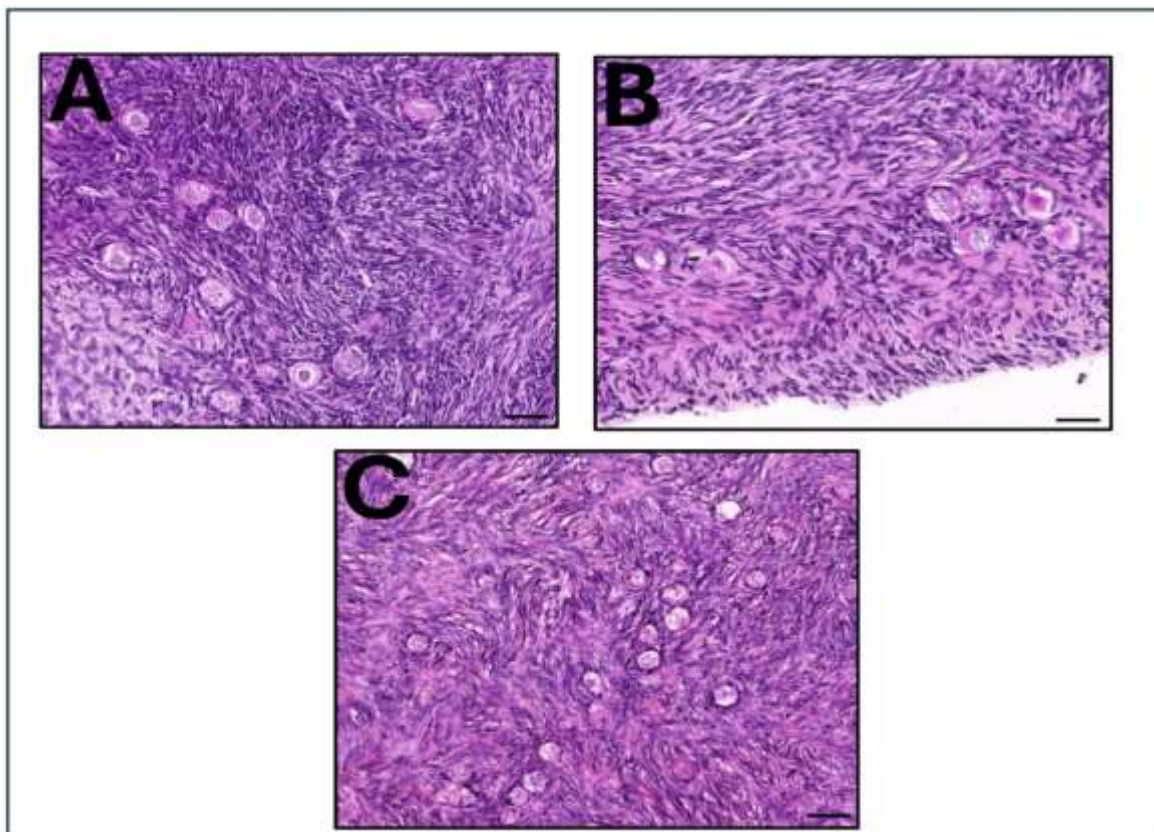
¹ Minimum Essential Medium alpha

یافته‌ها

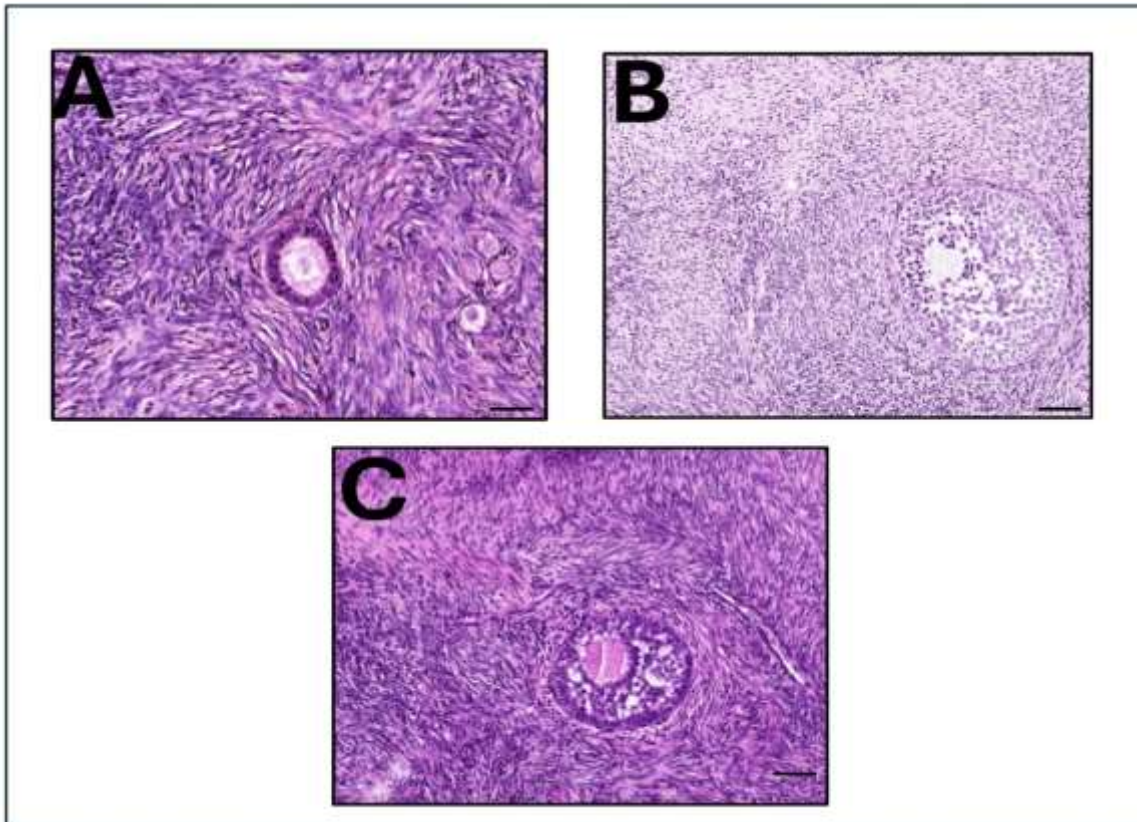
در این مطالعه، با استفاده از روش RSM، فرمولاسیون بهینه‌ای از هیدروژل آلژینات شامل ۰/۹۷٪ آلژینات، ۵۲/۲۱ میلی‌مول CaCO_3 و ۱۰۶/۸۴ میلی‌مول GDL به دست آمد. این ترکیب از نظر رئولوژیکی زمان ژل شدن مناسب (۳۰ دقیقه) و مدول ذخیره‌سازی بالا (۱۷۵۸/۷۸ پاسکال) را نشان داد. اختلاف بین مقادیر واقعی و پیش‌بینی شده کمتر از ۵٪ بود که دقت مدل را تأیید می‌کند. در آزمون فرکانسی، رفتار ویسکوالاستیک ژل بهینه شده در فرکانس ۱ هرتز مشابه بافت طبیعی تخمدان بود؛ به طوری که تفاوت معناداری در مدول‌های G' ، G'' و تان دلتا ($\text{Tan } \delta$) مشاهده نشد ($p > 0/05$). با این حال، بر اساس نتایج آزمون دامنه‌ای، بافت طبیعی در برابر تنش بالا (تا ۳۰٪

کرنش) مقاومت بیشتری نسبت به ژل داشت و دیرتر وارد فاز ویسکوز شد. این نتایج نشان می‌دهد که هیدروژل طراحی شده می‌تواند خواص مکانیکی بافت تخمدان را در شرایط عادی تا حد زیادی تقلید کند، هرچند در برابر فشارها یا تغییر شکل‌های شدید، استحکام آن محدودتر است.

در راستای بررسی اثر محافظتی هیدروژل آلژینات بهینه‌سازی شده بر بقای ساختاری فولیکول‌های تخمدانی، تراکم فولیکول‌ها در سه مرحله رشدی شامل فولیکول‌های آغازین (شکل ۱)، اولیه و ثانویه (شکل ۲) پس از ۲۴ ساعت کشت داخل آزمایشگاهی، در سه گروه مختلف: گروه بافت تازه، گروه منجمد، و گروه منجمد شده پس از انکپسولاسیون در هیدروژل مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱- تراکم فولیکول‌های آغازین در مقاطع بافتی گروه‌های مختلف. (A) بافت تازه: تراکم فولیکول‌ها بالاتر بوده و ساختار بافت طبیعی حفظ شده است. (B) منجمد: تراکم فولیکول‌ها کاهش یافته و بخشی از فولیکول‌ها آسیب دیده‌اند. (C) منجمد شده پس از انکپسولاسیون در هیدروژل: تراکم فولیکول‌ها نسبت به گروه منجمد بدون هیدروژل بهبود یافته است، هرچند هنوز به سطح گروه تازه نرسیده است.



شکل ۲- تراکم فولیکول‌های در حال رشد (اولیه و ثانویه) در مقاطع بافتی گروه‌های مختلف (A) بافت تازه (B) منجمد (C) منجمد شده پس از انکپسولاسیون در هیدروژل.

فولیکول‌های اولیه نشان داد. تراکم فولیکول‌های اولیه در گروه انکپسوله شده اندکی بالاتر از گروه منجمد بود، اگرچه این افزایش از نظر آماری معنی‌دار نبود (شکل ۳). این نتایج نشان می‌دهد که هیدروژل آلژینات ممکن است با ایجاد یک ریزساختار ملایم و شبه‌بافت و کاهش تنش‌های مکانیکی حین انجماد، تا حدی از فولیکول‌های در حال رشد محافظت کند.

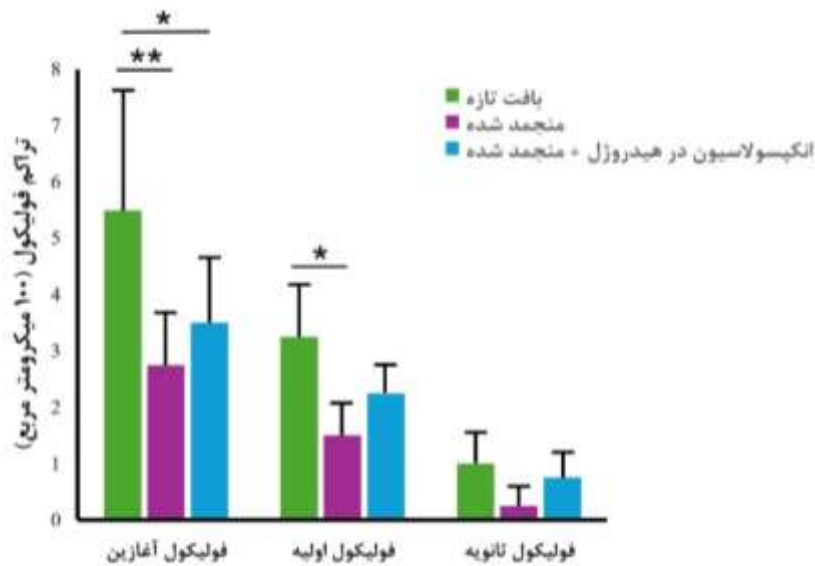
در میان فولیکول‌های ثانویه، اگرچه الگوی تراکم به‌طور نسبی مشابه بود (بالاتر بودن در گروه تازه و کاهش در دو گروه انجمادی)، اما تفاوت آماری معنی‌داری میان گروه‌ها مشاهده نشد ($p > 0.05$; شکل ۳). این امر ممکن است به دلیل تعداد محدود فولیکول‌های ثانویه در بافت تخمدان نابالغ مورد استفاده، یا آسیب ذاتی بالای این فولیکول‌های در حال رشد طی فرآیند انجماد-ذوب باشد که محافظت توسط هیدروژل نتوانسته به‌طور قابل‌توجهی آن را جبران کند. در مجموع، داده‌های به‌دست آمده از تحلیل تراکم

تراکم فولیکول‌های آغازین در گروه بافت تازه بیشترین مقدار را نشان داد که نمایانگر وضعیت طبیعی ذخیره فولیکولی در بافت دست‌نخورده است. در گروه منجمد، این تراکم) در مقایسه با گروه بافت تازه به‌طور چشمگیری کاهش یافت که نشان‌دهنده آسیب شدید ناشی از انجماد و ذوب بدون حفاظت ساختاری است ($p < 0.01$; شکل ۳). جالب توجه آنکه در گروه انکپسوله شده، تراکم فولیکول‌های آغازین نسبت به گروه منجمد به‌طور معنی‌داری بالاتر بود ($p < 0.05$; شکل ۳). این یافته‌ها نشان می‌دهد که انکپسولاسیون در هیدروژل می‌تواند به‌طور نسبی ساختار فولیکولی را در برابر آسیب‌های انجماد محافظت نماید؛ به‌ویژه در سطح فولیکول‌های نابالغ‌تر که حساسیت بالایی به تنش‌های اسمزی و مکانیکی دارند.

در این مرحله رشدی نیز الگوی مشابهی مشاهده شد. گروه تازه همچنان تراکم نسبتاً بالاتری از فولیکول‌ها را حفظ کرد، در حالی که گروه منجمد تراکم کمتری از

به کار رود. این نتایج همچنین تأکید می‌کنند که بررسی‌های بیشتر در خصوص بهینه‌سازی ساختار، پایداری و زیست‌سازگاری هیدروژل‌ها برای کاربرد در حفظ باروری، به‌ویژه در زمینه پزشکی تولیدمثل و حفاظت از گونه‌های جانوری، ضروری است.

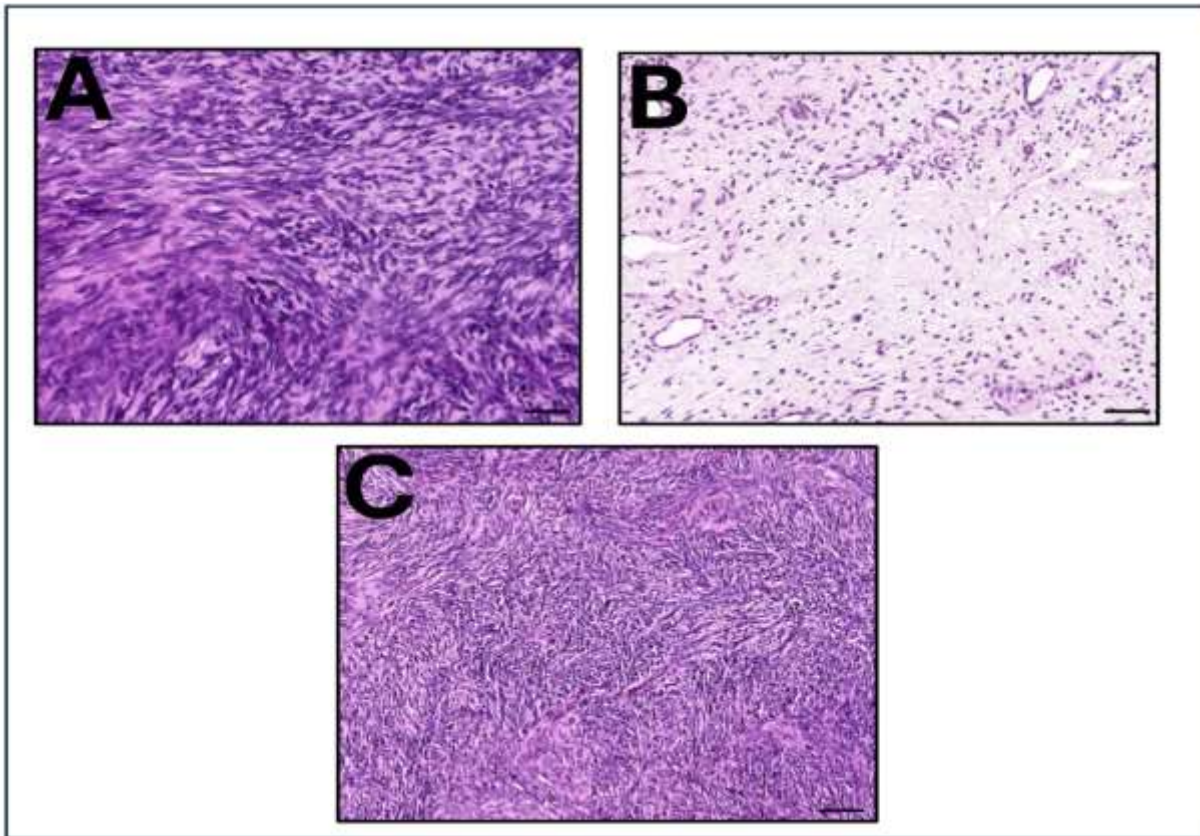
فولیکولی نشان می‌دهند که انکپسولاسیون بافت تخمدان در هیدروژل آلژینات بهینه شده، تأثیر مثبتی بر حفظ فولیکول‌های نابالغ (به‌ویژه فولیکول‌های آغازین و اولیه) دارد و می‌تواند به‌عنوان یک رویکرد زیستی مؤثر برای کاهش آسیب‌های ساختاری ناشی از انجماد



شکل ۳- تراکم فولیکول‌های آغازین، اولیه و ثانویه در گروه‌های آزمایشی مختلف. بافت تازه (ستون سبز) بالاترین تراکم را در تمام مراحل فولیکولی نشان می‌دهد. در گروه منجمد (ستون بنفش) تراکم فولیکول‌ها به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است. در گروه منجمد و انکپسوله شده در هیدروژل (ستون آبی)، تراکم فولیکول‌ها (به‌خصوص در مرحله آغازین) نسبت به گروه منجمد شده، بهبود یافته است. ستاره‌ها نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه تازه و گروه منجمد هستند ($P < 0.05$).

افزایش فضاها بین سلولی و نشانه‌هایی از آسیب بافتی از جمله پیکنوز و تراکم کم هسته‌ها قابل مشاهده بود. در مقابل، در گروهی که بافت تخمدانی پیش از انجماد در هیدروژل آلژینات بهینه شده انکپسوله شده بود، حفظ نسبی ساختار طبیعی استروما و تراکم سلولی قابل قبولی مشاهده گردید (شکل ۴).

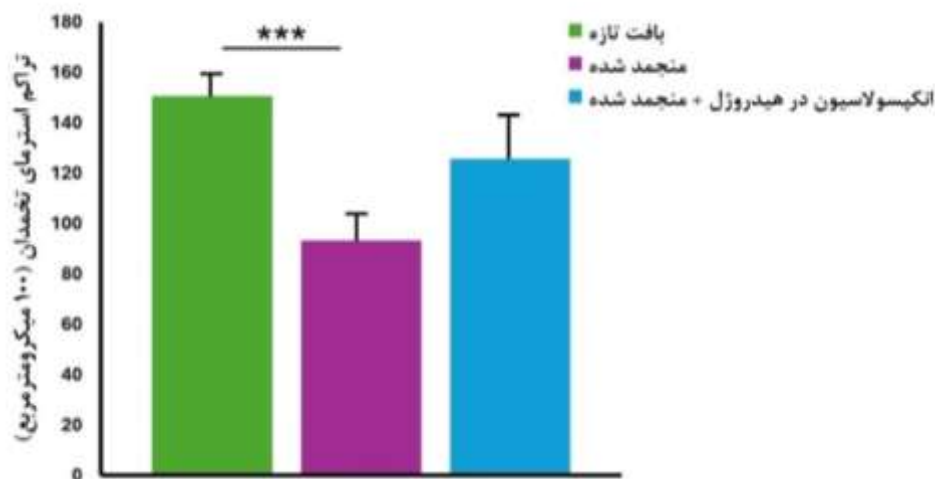
بررسی‌های هیستولوژیکی با استفاده از رنگ‌آمیزی H&E نشان داد که فرآیند انجماد بدون استفاده از سامانه حفاظتی موجب بروز تغییرات بافتی قابل توجهی در ناحیه استرومای تخمدان می‌گردد. در گروه کنترل (بافت تازه)، استرومای متراکم و همگن با تعداد بالایی از سلول‌های هسته‌دار مشاهده شد، در حالی که در گروه منجمد، کاهش چشمگیری در تراکم سلولی، همراه با



شکل ۴- تراکم سلول‌های استرومای تخمدان در مقاطع بافتی گروه‌های مختلف. (A) بافت تازه. تراکم سلولی بالاتر مشاهده می‌شود؛ (B) منجمد. تراکم سلولی به‌طور قابل توجهی کاهش یافته است؛ (C) منجمد شده پس از انکپسولاسیون در هیدروژل: تراکم سلولی نسبت به گروه منجمد بدون هیدروژل بهبود یافته است.

نشان می‌دهد که انکپسولاسیون بافت تخمدانی در هیدروژل آلژینات پیش از انجماد می‌تواند آسیب‌های ناشی از فرآیند انجماد-ذوب را کاهش داده و به حفظ بهتر ساختار و تراکم سلولی استرومای تخمدانی کمک کند (شکل ۵). از آنجایی که استروما، نقش مهمی در حفظ عملکرد میکرو محیط فولیکولی و پشتیبانی سلولی دارد، این نتایج تأکیدی بر اهمیت استفاده از سامانه‌های زیست‌مواد در بهبود اثربخشی پروتکل‌های انجماد بافت تخمدان است.

آنالیز کمی تراکم استروما نیز نتایج بافت‌شناسی را تأیید نمود. همان‌طور که در شکل ۵ نشان داده شده است، گروه بافت تازه بالاترین میانگین تراکم استرومای تخمدانی را نشان داد. در مقابل، این مقدار در گروه منجمد به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.001$). استفاده از هیدروژل به‌عنوان داربست حفاظتی در گروه انکپسوله شده منجر به افزایش قابل توجه تراکم سلولی نسبت به گروه منجمد شد، اگرچه این مقدار هنوز کمی پایین‌تر از گروه کنترل باقی ماند. این یافته‌ها به‌وضوح



شکل ۵- تراکم سلول‌های استرومای تخمدان در مقاطع بافتی گروه‌های مختلف. تراکم سلول‌های استرومایی در گروه‌های مختلف بافت تخمدان. بافت تازه (ستون سبز) بالاترین تراکم سلولی را نشان می‌دهد. در گروه منجمد (ستون بنفش) تراکم سلول‌های استرومایی به طور قابل توجهی کاهش یافته است. بافت منجمد و انکپسوله شده در هیدروژل آلژینات (ستون آبی) تراکم سلول‌های استرومایی نسبت به گروه منجمد بهبود یافته است. ستاره‌ها نشان‌دهنده تفاوت آماری معنی‌دار بین گروه تازه و گروه منجمد هستند ($p < 0.001$).

بحث

حفظ باروری در بیماران مبتلا به سرطان که تحت درمان‌های شیمی‌درمانی و پرتودرمانی قرار دارند، به‌عنوان یک حوزه حیاتی در پزشکی تولیدمثل مطرح است. درمان‌های این چنینی ممکن است باعث آسیب به بافت‌های تخمدانی شده و در نتیجه ذخیره فولیکولی کاهش یابد که در نهایت منجر به از دست دادن ظرفیت باروری می‌شود (۱). در این راستا، انجماد بافت تخمدان به‌عنوان یک روش نوین و مؤثر برای ذخیره‌سازی فولیکول‌ها و جلوگیری از تأخیر در شروع درمان‌های ضروری معرفی شده است (۴). با این حال، فرآیندهای انجماد و ذوب با چالش‌های عمده‌ای روبه‌رو هستند، از جمله آسیب‌های سلولی ناشی از تشکیل کریستال‌های یخ و تغییرات شدید اسمزی که موجب تخریب ساختار بافت و کاهش زنده‌مانی فولیکول‌ها می‌شود (۶، ۲۳).

در پاسخ به این چالش‌ها، استفاده از هیدروژل‌های آلژینات به‌عنوان یک داربست زیست‌تقلید می‌تواند محافظت بهتری از بافت‌های تخمدان در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد فراهم کند. هیدروژل آلژینات به‌دلیل قابلیت ژل شدن سریع و شبیه‌سازی ماتریکس خارج سلولی طبیعی بافت تخمدان، پتانسیل

بالایی در حفظ فولیکول‌ها و بهبود نتایج پس از فرآیند انجماد و ذوب دارد (۱۲، ۱۳).

در این مطالعه، ترکیب بهینه آلژینات، GDL و $CaCO_3$ برای تولید هیدروژل به منظور شبیه‌سازی بهتر ویژگی‌های بافت تخمدان مورد بررسی قرار گرفت. نتایج تحلیل‌های رئولوژیکی نشان داد که این ترکیب بهینه با حفظ زمان ژل شدن مناسب (حدود ۳۰ دقیقه) و مدول ذخیره‌سازی بالا (۱۷۵۸ پاسکال)، عملکرد مکانیکی مطلوبی را از خود نشان می‌دهد که برای حفظ یکپارچگی ساختاری در طول فرآیند انجماد و ذوب حیاتی است. این نتایج تأثیرگذار تأکید بر این نکته دارند که خواص مکانیکی هیدروژل می‌تواند به‌طور مؤثری به بهبود عملکرد بافت تخمدان کمک کند (۱۹، ۲۴).

در آزمون‌های بیومکانیکی، مشاهده شد که هیدروژل در فرکانس‌های پایین مانند ۱ هرتز، رفتار ویسکو الاستیک مشابه بافت طبیعی تخمدان از خود نشان می‌دهد که این ویژگی به هیدروژل این امکان را می‌دهد که محیطی مشابه با بافت طبیعی برای فولیکول‌ها و سلول‌ها فراهم کند. با این حال، آزمون دامنه‌ای نشان داد که هیدروژل در کرنش‌های بالا وارد فاز ویسکوز می‌شود که به معنای ناتوانی هیدروژل در تحمل

رگ‌های خونی و فاکتورهای رشد است، برای بقاء و عملکرد فولیکول‌ها حیاتی است. بنابراین، حفظ این ریزمحیط می‌تواند به بهبود فرآیند بازیابی بافت پس از ذوب کمک کند (۲۷). تحلیل‌های کمی نیز این مشاهدات را با نشان دادن افزایش تراکم سلولی استروما در گروه انکپسوله شده تأیید کردند.

این مطالعه چندین نقطه قوت کلیدی دارد. اول، طراحی هیدروژل آلژینات با استفاده از روش RSM باعث شد خواص رئولوژیکی و زمان ژل شدن آن بهینه شده و نزدیک به رفتار مکانیکی بافت طبیعی تخمدان باشد، که امکان حفظ ساختار و عملکرد فولیکول‌ها و استروما را فراهم می‌کند. دوم، انکپسولاسیون بافت تخمدان در هیدروژل تا حدی آسیب‌های ناشی از انجماد - ذوب را کاهش داد و محیطی بیومکانیکی و زیست تقلید برای سلول‌ها و فولیکول‌ها ایجاد کرد. همچنین، حفظ تراکم فولیکولی و یکپارچگی استرومایی، نشان‌دهنده اثر حفاظتی مؤثر هیدروژل است. از سوی دیگر، محدودیت‌هایی نیز وجود دارد: هیدروژل در کرنش‌های بالا وارد فاز ویسکوز می‌شود و توانایی تحمل تنش‌های شدید را مانند بافت طبیعی ندارد؛ تفاوت معنی‌داری در فولیکول‌های ثانویه مشاهده نشد که احتمالاً به ساختار پیچیده‌تر آن‌ها مربوط است؛ و چالش‌های عمومی هیدروژل‌های آلژینات مانند پایداری زیستی طولانی‌مدت، قابلیت مقیاس‌پذیری و کنترل آزادسازی مواد مغذی یا داروها همچنان باقی است. بنابراین، بهینه‌سازی‌های بیشتر برای افزایش مقاومت مکانیکی، سازگاری بیومکانیکی تحت فشار بالا و کاربردهای بالینی آینده ضروری است.

نتیجه‌گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که هیدروژل آلژینات بهینه شده می‌تواند به‌عنوان یک داربست محافظ در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد عمل کند و تا حدی از ساختار فولیکول‌ها و بافت استرومایی محافظت نماید. به‌نظر می‌رسد این اثر به توانایی هیدروژل در ایجاد محیطی با ویژگی‌های مکانیکی نزدیک به بافت طبیعی و کاهش تنش‌های فیزیکی در طول فرآیند انجماد مربوط باشد. با این حال، نتایج آزمون‌های رئولوژیکی

تنش‌های شدید مشابه بافت طبیعی تخمدان است. این مسئله نیاز به بهینه‌سازی بیشتر، از جمله افزودن پلیمرهای دیگر برای بهبود سازگاری بیومکانیکی در شرایط پرفشار را آشکار می‌کند (۲۵، ۲۶).

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که انکپسولاسیون بافت تخمدان در هیدروژل آلژینات باعث کاهش قابل توجهی در آسیب‌های ناشی از فرآیندهای انجماد و ذوب می‌شود. این هیدروژل از دو روش اصلی برای محافظت از بافت استفاده می‌کند: اول، کاهش تشکیل کریستال‌های یخ، که باعث حفظ یکپارچگی ساختاری فولیکول‌ها و سلول‌ها می‌شود و دوم، تعدیل تنش‌های اسمزی، که از پدیده‌های آسیب‌زا مانند تورم سلولی و دهیدراسیون جلوگیری می‌کند (۲۳). این یافته‌ها مشابه با گزارش‌های قبلی است که نشان می‌دهند هیدروژل‌ها به‌عنوان یک محیط محافظ، می‌توانند از بافت‌های بیولوژیکی در برابر آسیب‌های ناشی از انجماد و ذوب محافظت کنند (۲۶).

در بررسی‌های انجام شده بر روی تراکم فولیکول‌ها، استفاده از هیدروژل آلژینات در گروه انکپسوله شده نتایج مثبتی داشت. اگرچه تفاوت‌های آماری معناداری در تراکم فولیکول‌های آغازین و اولیه بین گروه‌های انکپسوله شده و گروه‌های منجمد مشاهده نشد، روند افزایشی در گروه انکپسوله شده، نشان‌دهنده اثرات حفاظتی هیدروژل در کاهش آسیب‌های انجمادی و حفظ فولیکول‌ها بود. به‌طور خاص، در فولیکول‌های ثانویه، هیچ تفاوت آماری معناداری میان گروه‌ها مشاهده نشد که احتمالاً به‌دلیل اندازه بزرگ‌تر و آسیب‌پذیری بیشتر این فولیکول‌ها در برابر استرس‌های انجماد و ذوب است. این یافته‌ها بر لزوم بهینه‌سازی بیشتر شرایط انجماد و استفاده از هیدروژل‌های ترکیبی برای حفظ فولیکول‌های ثانویه تأکید دارند (۱۲، ۲۵).

یکی از یافته‌های مهم در این مطالعه، نقش هیدروژل آلژینات در محافظت از یکپارچگی استرومای تخمدان بود. تحلیل‌های بافت‌شناسی نشان داد که در گروه انکپسوله شده، تراکم سلولی و ساختار ماتریکس خارج‌سلولی به‌طور قابل توجهی بهتر از گروه‌های منجمد حفظ شده‌اند. استروما که شامل سلول‌ها،

ملاحظات اخلاقی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری تخصصی بوده و پس از کسب موافقت کمیته اخلاق دانشگاه UCLouvain انجام شده است. شایان ذکر است که آزمایش‌ها روی نمونه‌های بافتی حاصل از حیواناتی انجام شد که در کشتارگاه و با رعایت اصول اخلاقی و رفاهی ذبح شده بودند.

حمایت مالی

این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه UCLouvain و اسکولارشیپ اعطایی به آقای کیوان سبحانی از سوی وزارت علوم، تحقیقات و فناوری ایران انجام شد.

مشارکت نویسندگان

تمام نویسندگان در تأیید گردآوری داده‌ها و نگارش مقاله مشارکت داشتند.

نشان داد که هنوز امکان بهبود خواص مکانیکی و پایداری هیدروژل وجود دارد. در مطالعات آینده، بهینه‌سازی بیشتر ترکیب هیدروژل برای افزایش تحمل کرنش و حفظ پایداری آن می‌تواند مفید باشد. همچنین، انجام ارزیابی‌های تکمیلی در شرایط برون‌تنی و درون‌تنی، به‌ویژه در ارتباط با رشد و بقای فولیکول‌ها پس از ذوب، برای تأیید اثربخشی این سامانه در کاربردهای بالینی ضروری به‌نظر می‌رسد.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از کارشناس گروه پاتوفیزیولوژی تولیدمثل دانشگاه UCLouvain که ما را در انجام این مطالعه یاری کردند، تشکر و قدردانی می‌گردد.

تضاد منافع

در این مطالعه هیچ‌گونه تعارض منافی بین نویسندگان وجود نداشت.

منابع

1. Kerr JB, Myers M, Anderson RA. The dynamics of the primordial follicle reserve. *Reproduction* 2013; 146(6):R205-15.
2. Dittrich R, Maltaris T, Hoffmann I, Oppelt PG, Beckmann MW, Mueller A. Fertility preservation in cancer patients. *Minerva ginecologica* 2010; 62(1):63-80.
3. Picton HM. Preservation of female fertility in humans and animal species. *Animal reproduction* 2018; 15(3):301.
4. Fathi R, Rezazadeh Valojerdi M, Salehnia M, Ebrahimi B, SalmanYazdi R. Ovarian tissue transplantation: advantages, disadvantages and upcoming challenges (A review article). *Journal of Mazandaran University of Medical Sciences* 2014; 24(113):253-65.
5. Rezaie M, Fathi F, Seyyedoshohadaie F, Rah Hagh R. Comparison of cryopreservation of bovine ovarian tissue: slow and rapid cryopreservation. *The Iranian Journal of Obstetrics, Gynecology and Infertility* 2012; 15(2):1-6.
6. Rivas Leonel EC, Lucci CM, Amorim CA. Cryopreservation of human ovarian tissue: a review. *Transfusion medicine and hemotherapy* 2019; 46(3):173-81.
7. Jones AS, Shikanov A. Ovarian tissue cryopreservation and novel bioengineering approaches for fertility preservation. *Current breast cancer reports* 2020; 12(4):351-60.
8. Sahoo DR, Biswal T. Alginate and its application to tissue engineering. *SN Applied Sciences* 2021; 3(1):30.
9. Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 2014; 1840(8):2506-19.
10. Ghahremani-Nasab M, Babaie S, Bazdar S, Paiva-Santos AC, Del Bakhshayesh MR, Akbari-Gharalari N, et al. Infertility treatment using polysaccharides-based hydrogels: new strategies in tissue engineering and regenerative medicine. *Journal of Nanobiotechnology* 2025; 23(1):162.
11. Asgari F, Valojerdi MR, Ebrahimi B, Fatehi R. Three dimensional in vitro culture of preantral follicles following slow-freezing and vitrification of mouse ovarian tissue. *Cryobiology* 2015; 71(3):529-36.
12. Sadeghnia S, Akhondi MM, Hossein G, Mobini S, Hosseini L, Naderi MM, et al. Development of sheep primordial follicles encapsulated in alginate or in ovarian tissue in fresh and vitrified samples. *Cryobiology* 2016; 72(2):100-5.
13. Kavand A, Noverraz F, Gerber-Lemaire S. Recent advances in alginate-based hydrogels for cell transplantation applications. *Pharmaceutics* 2024; 16(4):469.

14. Huang H, Choi JK, Rao W, Zhao S, Agarwal P, Zhao G, et al. Alginate hydrogel microencapsulation inhibits devitrification and enables large-volume low-CPA cell vitrification. *Advanced functional materials* 2015; 25(44):6839-50.
15. Mohanty S, Wu Y, Chakraborty N, Mohanty P, Ghosh G. Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage, and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts. *Materials Science and Engineering: C* 2016; 65:269-77.
16. Jamalzaei P, Valojerdi MR, Montazeri L, Baharvand H. Applicability of hyaluronic acid-alginate hydrogel and ovarian cells for in vitro development of mouse preantral follicles. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2020 Sep 8; 22(Suppl 1):49.
17. Feng Q, Wang J, Yi D, Li S, Cheng Y, Chen Z, et al. Epigallocatechin Gallate Cooperated with Hydrogel Encapsulation Enable High-performance Cryopreservation of Mouse Ovaries. *Materials Today Bio* 2025: 101883.
18. Aminian S, Mazoochi T, Hosseini ES, Jamalzaei P, Taheri MA. Protective Effect of Bio-Scaffold Against Vitrification Damage in Mouse Ovarian Tissue. *Reproductive Sciences* 2024; 31(11):3512-20.
19. Shahrababak SM, Jalali SM, Fathabadi MF, Tayebi-Khorrami V, Amirinejad M, Forootan S, et al. Modified alginates for precision drug delivery: Advances in controlled-release and targeting systems. *International Journal of Pharmaceutics: X* 2025: 100381.
20. Chu Y, Zhang J, Wang L, Xie J, Chen J, Hu X, et al. The mechanism and protective strategies of follicle injury after ovarian tissue cryopreservation and thawed transplantation: a review. *Journal of Ovarian Research* 2025; 18(1):217.
21. Kuo CK, Ma PX. Ionically crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties. *Biomaterials* 2001; 22(6):511-21.
22. Lierman S, Bus A, Andries S, Trias E, Bols PE, Tilleman K. Passive slow freezing is an efficacious and cost-effective alternative to controlled slow freezing for ovarian tissue cryopreservation. *Cryobiology* 2021; 100:164-72.
23. Vermeulen M, Poels J, De Michele F, Des Rieux A, Wyns C. Restoring fertility with cryopreserved prepubertal testicular tissue: perspectives with hydrogel encapsulation, nanotechnology, and bioengineered scaffolds. *Annals of biomedical engineering* 2017; 45(7):1770-81.
24. Fathiraja P, Gopalrajan S, Karunanithi M, Nagarajan M, Obaiah MC, Durairaj S, et al. Response surface methodology model to optimize concentration of agar, alginate and carrageenan for the improved properties of biopolymer film. *Polymer Bulletin* 2022; 79(8):6211-37.
25. Bartnikowski M, Bartnikowski NJ, Woodruff MA, Schrobback K, Klein TJ. Protective effects of reactive functional groups on chondrocytes in photocrosslinkable hydrogel systems. *Acta biomaterialia* 2015; 27:66-76.
26. Li L, Wang S, Chen Y, Dong S, Zhang C, Liao L, et al. Hydrogels mimicking the viscoelasticity of extracellular matrix for regenerative medicine: Design, application, and molecular mechanism. *Chemical Engineering Journal* 2024; 498:155206.
27. Li Z, Song P, Li G, Han Y, Ren X, Bai L, et al. AI energized hydrogel design, optimization and application in biomedicine. *Materials Today Bio* 2024; 25:101014.

Alginate Biomimetic Hydrogel: A Novel Matrix for the Preservation of Encapsulated Ovarian Tissue in an Animal Model

Keyvan Sobhani¹, Amjad Farzinpour^{2*}, Christiane Andrade Amorim³, Fardin Amidi⁴

1. Ph.D. of Physiology, Reproductive Physiology Laboratory, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
2. Associate Professor, Department of Physiology, Reproductive Physiology Laboratory, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.
3. Professor, Institute of Experimental and Clinical Research, Laboratory of Physiopathology and Reproduction Research, UC Louvain, Brussels, Belgium.
4. Professor, Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

Abstract

Received: Sep 25, 2025 **Accepted:** Dec 29, 2025

Introduction: Ovarian tissue cryopreservation, despite its importance in fertility preservation, often causes structural damage and reduces follicle survival. These damages are mainly attributed to osmotic and mechanical stresses as well as changes in the tissue microenvironment. Alginate hydrogel, due to its biocompatibility and tunable mechanical properties, has emerged as a potential protective system for ovarian tissue encapsulation. The present study was conducted with aim to investigate the effect of encapsulating ovarian tissue in alginate hydrogel on mitigating damage induced by the freeze-thaw process.

Methods: Alginate hydrogel composed of alginate, calcium carbonate (CaCO₃), and glucono-δ-lactone (GDL) was designed using a response surface methodology (RSM) to achieve a storage modulus and gelation time similar to those of native tissue. Ovarian tissue from prepubertal sheep was encapsulated, subjected to slow freezing, and cultured for 24 hours post-thaw. Histological evaluations included counting the density of primordial and primary follicles, as well as assessing stromal cells and the extracellular matrix. Data were analyzed using GraphPad Prism (version 9) and analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post-hoc tests. P<0.05 was considered statistically significant.

Results: The density of primordial and primary follicles in the encapsulated group was significantly higher than in the frozen group (p<0.05). Stromal cell health and extracellular matrix integrity were better preserved in the hydrogel group (p<0.001). The hydrogel exhibited a storage modulus of approximately 1,750 Pa and a gelation time of around 30 minutes, simulating the mechanical properties of native tissue.

Conclusion: Encapsulation of ovarian tissue in alginate hydrogel reduces freeze-thaw-induced damage and improves follicle survival and stromal structure. This approach offers a novel strategy for fertility preservation.

Keywords: Alginate, Encapsulation, Follicle survival, Ovary, Tissue freezing

► Please cite this article as:

Sobhani K, Farzinpour A, Andrade Amorim Ch, Amidi F. Alginate Biomimetic Hydrogel: A Novel Matrix for the Preservation of Encapsulated Ovarian Tissue in an Animal Model. *Iran J Obstet Gynecol Infertil* 2025; 28(10):36-48. DOI: 10.22038/ijogi.2025.89724.6496