

WNIOSEK PROJEKTU DOKTORSKIEGO
Szkoła Doktorska Nauk Medycznych i Nauk o Zdrowiu

IMIĘ I NAZWISKO AUTORA PROJEKTU	prof. dr hab. Alina Woźniak
AFILIACJA AUTORA PROJEKTU (jednostka organizacyjna, telefon kontaktowy, adres e-mail)	Katedra Biologii i Biochemii Medycznej CM UMK, tel.: 585 3737, 585 3740, kom. 607081177 e-mail: al1103@cm.umk.pl
DYSCYPLINA NAUKOWA, W RAMACH KTÓREJ PROJEKT BĘDZIE REALIZOWANY (zaznaczyć właściwą)	• NAUKI FARMACEUTYCZNE • <u>NAUKI MEDYCZNE</u> • NAUKI O ZDROWIU

CZĘŚĆ A:
OPIS PROJEKTU

1. TEMAT PROJEKTU:
Ocena zależności między parametrami andrologicznymi a statusem oksydoredukcyjnym nasienia ludzkiego poddanego konserwacji niskotemperaturowej.
2. STRESZCZENIE PROJEKTU (max. 1000 znaków ze spacjami):
Celem projektu jest kompleksowa ocena wpływu procedur konserwacji niskotemperaturowej na status oksydoredukcyjny oraz profil immunologiczny nasienia ludzkiego. Badanie zostanie przeprowadzone na zanonimizowanym materiale biologicznym. Projekt zakłada określenie wpływu parametrów fizycznych procesów zamrażania i rozmrażania oraz czasu przechowywania w niskiej temperaturze na integralność struktur komórkowych plemników i stabilność biochemiczną plazmy nasiennej. Analizie poddane zostaną kluczowe markery stresu oksydacyjnego, aktywność bariery antyoksydacyjnej oraz wybrane regulatory procesów zapalnych. Istotnym elementem pracy będzie analiza dynamiki badanych wskaźników w kontekście wyjściowych cech andrologicznych dawców, co pozwoli określić ich podatność na zmiany wywołane procesami kriokonserwacji. Uzyskane wyniki pozwolą na optymalizację laboratoryjnych protokołów bankowania komórek rozrodczych i lepszą predykcję ich jakości po rozmrożeniu.

3. CEL NAUKOWY PROJEKTU I ZNACZENIE PODJĘTEGO PROBLEMU BADAWCZEGO (max. 3000 znaków ze spacjami):

Głównym celem naukowym projektu jest określenie zależności między wyjściowym profilem kliniczno-andrologicznym pacjentów a intensywnością zmian w statusie oksydoredukcyjnym oraz profilu immunologicznym nasienia ludzkiego, indukowanych procedurami konserwacji niskotemperaturowej. Projekt zmierza do zweryfikowania hipotezy, czy podstawowe parametry bioprofilu nasienia świeżego (takie jak koncentracja, ruchliwość, budowa morfologiczna oraz obecność reakcji leukocytarnej) mogą stanowić niezależne czynniki predykcyjne określające stopień podatności komórek rozrodczych na subletalne uszkodzenia biochemiczne i molekularne zachodzące podczas mrożenia.

Współczesna diagnostyka andrologiczna w procedurach wspomaganego rozrodu opiera się w znacznej mierze na subiektywnej ocenie mikroskopowej materiału po rozmrożeniu. Metody te pozwalają na określenie podstawowych cech fizycznych plemników, nie odzwierciedlają jednak ukrytych zniszczeń struktur wewnątrzkomórkowych oraz integralności materiału genetycznego. Istnieje istotna nisza badawcza dotycząca wpływu fizycznych aspektów samej technologii laboratoryjnej – w tym tempa obniżania temperatury oraz strategii ogrzewania próbki, a także czasu przechowywania – na stabilność biologiczną nasienia.

Znaczenie podjętego problemu badawczego opiera się na próbie wyjaśnienia mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za spadek potencjału zredukowanego nasienia pod wpływem szoku termicznego. Poprzez celowe odizolowanie markerów czystego stresu oksydacyjnego od mediatorów procesów zapalnych, projekt pozwoli na dogłębne zrozumienie, w jaki sposób utajone stany zapalne lub zaawansowany wiek dawców predysponują komórki do przedwczesnej degradacji w środowisku niskotemperaturowym. Dodatkowo, wdrożenie sparowanego modelu badawczego (porównanie materiału świeżego i rozmrożonego od tego samego pacjenta) umożliwi precyzyjne prześledzenie dynamiki tych zmian w czasie.

Wymiar aplikacyjny projektu polega na możliwości wypracowania nowych, zoptymalizowanych standardów kontroli jakości w laboratoriach andrologicznych. Zrozumienie biochemicznego podłoża kriouszkodzeń pozwoli na odejście od uniwersalnych protokołów bankowania na rzecz personalizacji procedur laboratoryjnych, dopasowanych do indywidualnego profilu pacjenta, co ma kluczowe znaczenie dla zwiększenia efektywności procedur biotechnologicznych w medycynie.

4. KONCEPCJA I PLAN BADAŃ Z UWZGLĘDNIENIEM METODYKI (max. 4000 znaków ze spacjami):

Materiał badawczy i aspekty etyczne

Badania zostaną przeprowadzone na zanonimizowanym, nadmiarowym materiale biologicznym (ludzkie nasienie) od ok. 100 osób, o charakterze materiału odpadowego, pozyskanym w toku rutynowej diagnostyki laboratoryjnej, który po wykonaniu procedur medycznych uległby utylizacji. Przed rozpoczęciem analiz próbki oraz powiązane z nimi dane fenotypowe zostaną poddane całkowitej, nieodwracalnej anonimizacji, co wyklucza możliwość identyfikacji pacjentów. Projekt zostanie przedłożony Komisji Bioetycznej.

Koncepcja eksperymentu i podział na grupy

Założeniem projektu jest wielokierunkowa ocena stabilności biochemicznej materiału w zależności od modyfikacji fizycznych parametrów procedury niskotemperaturowej oraz od czasu mrożenia. Próbki zostaną podzielone na grupy badawcze w oparciu o dwa niezależne kryteria:

- kryterium kliniczno-andrologiczne: podział w oparciu o wyjściową koncentrację, ogólną ruchliwość, budowę morfologiczną plemników, obecność odczynu leukocyтарnego w materiale świeżym.

- kryterium technologiczne: podział materiału od tego samego dawcy na sparowane podpróbki (aliquoty) poddawane odmiennym procedurom fizycznym.

Próbę kontrolną będzie stanowił materiał świeży, niepoddany mrożeniu.

Plan i etapy badań laboratoryjnych

Etap I (Ocena wyjściowa i zabezpieczenie próby): Po wykonaniu rutynowej diagnostyki andrologicznej, nadmiarowa objętość świeżego nasienia zostanie zanalizowana pod kątem obecności ostrego odczynu zapalnego. Następnie materiał zostanie podzielony na porcje badawcze.

Etap II (Procedura mrożenia): Porceje badawcze zostaną poddane zróżnicowanym protokołom obniżania temperatur w warunkach zamrażania mechanicznego: protokołowi mrożenia szybkiego (bezpośrednia ekspozycja na docelową temperaturę niską) oraz protokołowi mrożenia etapowego (kontrolowane, stopniowe schładzanie próbki). Materiał będzie przechowywany w stanie zamrożonym do momentu weryfikacji.

Etap III (Procedura rozmrażania): Zamrożone próbki zostaną przywrócone do stanu płynnego przy użyciu dwóch odmiennych strategii: rozmrażania szokowego (gwałtowne ogrzanie w temperaturze optymalnej dla komórek) oraz rozmrażania powolnego (w temperaturze pokojowej).

Próbki będą się również różniły czasem mrożenia.

Metody analityczne

Materiał zostanie rozdzielony metodą wirowania na dwie frakcje: plazmę nasienną (naddatek) oraz osad komórkowy (plemniki), który zostanie poddany procedurze lizy chemicznej lub termicznej w celu uwolnienia struktur wewnątrzkomórkowych. W obu frakcjach oznaczona zostanie dynamika zmian biochemicznych za pomocą następujących technik:

- Metody immunoenzymatyczne (testy ELISA): wykorzystane do precyzyjnego ilościowego oznaczenia stężeń specyficznych mediatorów procesów zapalnych (cytokin) oraz molekularnych markerów oksydacyjnego uszkodzenia materiału genetycznego. (DNA) plemników. Walidacja testów opierać się będzie na fabrycznych standardach referencyjnych oraz sparowanych próbach świeżej plazmy zapalnej.
- Metody spektrofotometryczne: zastosowane do oceny intensywności procesu peroksydacji lipidów błon komórkowych, pomiaru aktywności bariery antyoksydacyjnej, w tym kluczowych enzymów wchodzących w skład komórkowych barier antyoksydacyjnych oraz wyznaczenia całkowitego statusu antyoksydacyjnego (TAS) próbki.

Analiza statystyczna

Wyniki zostaną poddane analizie statystycznej z wykorzystaniem testów parametrycznych lub nieparametrycznych (w zależności od rozkładu danych) dla prób niezależnych (porównania między grupami andrologicznymi) oraz prób zależnych (porównanie efektów różnych technik mrożenia i rozmrażania oraz czasu mrożenia w obrębie materiału od tego samego dawcy). Za poziom istotności zostanie przyjęte $p < 0,05$.

5. SPODZIEWANE ZNACZENIE WYNIKÓW BADAŃ Z OKREŚLENIEM WPLYWU NA ROZWÓJ DYSCYPLINY (max. 1500 znaków ze spacjami):

Realizacja projektu przyniesie istotne rezultaty zarówno o charakterze poznawczym, jak i aplikacyjnym, wywierając bezpośredni wpływ na rozwój nauk medycznych i nauk o zdrowiu w dyscyplinie nauki medyczne. Wymiar poznawczy opiera się na precyzyjnym opisanu kinetyki zmian immunologicznych i oksydoredukcyjnych zachodzących w komórkach rozrodczych pod wpływem stresu termicznego. Wykazanie korelacji między obecnością utajonych procesów zapalnych a powtórным załamaniem enzymatycznych barier obronnych po rozmrożeniu pozwoli na głębsze zrozumienie molekularnego podłoża kriousszkodzeń, co stanowi istotny wkład w teorię biologii komórki.

W wymiarze praktycznym (aplikacyjnym) uzyskane wyniki dostarczą laboratoriom andrologicznym oraz bankom komórek rozrodczych gotowych wytycznych metodologicznych. Określenie, które parametry fizyczne procedur (tempo zamrażania oraz strategię rozmrażania) minimalizują subletalne zniszczenia struktur komórkowych i materiału genetycznego, umożliwi

modyfikację i standaryzację rutynowych protokołów laboratoryjnych. Dodatkowo, potencjalne udowodnienie zależności między wiekiem dawcy a stabilnością biochemiczną próbki może otworzyć drogę do personalizacji procedur bankowania (np. poprzez celowaną modyfikację mediów osłonowych), co przełoży się na realne zwiększenie bezpieczeństwa i efektywności procedur wspomaganego rozrodu.

6. PLANOWANA FORMA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

- MANUSKRYPT – tradycyjna forma rozprawy nieopublikowanej
- CYKL PUBLIKACJI – spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów
- TRYB HYBRYDOWY – spójny tematycznie zbiór opublikowanych artykułów i nieopublikowanych manuskryptów