

Wczesna ciąża u ssaków łożyskowych (w tym świni domowej) jest krytycznym okresem charakteryzującym się wysoką śmiertelnością zarodków. Do 35% ciąż nie rozwija się poza etap implantacji zarodka. Jedną z przyczyn utraty wczesnej ciąży jest zaburzona funkcja endometrium. Udowodniono, że niedotlenienie (hipoksja), stan charakteryzujący się obniżonym poziomem tlenu, jest ważnym czynnikiem regulującym procesy fizjologiczne zachodzące w błonie śluzowej macicy (endometrium). Proces ten wpływa, między innymi, na przebudowę tkanek, tworzenie się nowych naczyń krwionośnych, implantację i rozwój zarodka, a także modulację odpowiedzi immunologicznej. Nasze wstępne wyniki wskazują, że w odpowiedzi na ciążę oraz główny sygnał zarodkowy (estradiol), zmiany w ekspresji (aktywności) genów (w transkryptomie) w tkance endometrium świni są istotnie związane z odpowiedzią na hipoksję. Modele hodowli *in vitro* endometrium są niezbędnymi narzędziami do badania jego złożonej biologii i patologii. Tradycyjne dwuwymiarowe (2D) hodowle komórkowe są szeroko stosowane ze względu na swoją prostotę i niskie koszty, jednak nie odzwierciedlają strukturalnej i funkcjonalnej złożoności endometrium *in vivo*. Trójwymiarowe (3D) hodowle komórkowe *in vitro* zaczęły ostatnio wypełniać tę lukę między hodowlami 2D a całym organizmem. W naszym wstępnym badaniu opracowaliśmy model *in vitro*, wykorzystując rusztowania umożliwiające długoterminową hodowlę oraz odwzorowujące architekturę tkanki endometrium złożonej z komórek nabłonkowych i zrębu (stromy). Planujemy rozszerzyć to badanie oraz udoskonalić i zwalidować ten model.

W przedstawionym projekcie zbadamy, czy trofoblasty świń i ich sygnał (estradiol), a także warunki hipoksji, mogą indukować zmiany w transkryptomie różnych komórek endometrium oraz w składzie białek wydzielanych przez komórki endometrium i trofoblastu (sekretem). Dodatkowo szczegółowo zwalidujemy model 3D endometrium świni oparty na rusztowaniach. Dzięki temu podejściu będziemy mogli odtworzyć złożoną architekturę tkanki endometrium, zbudowanej z komórek nabłonkowych, zrębowych i immunologicznych. Tak kompleksowe podejście umożliwi odkrycie tajemnic procesu implantacji zarodka i poznanie kluczowych mechanizmów początkowych etapów życia dzięki modelom *in vitro* 3D.

Celem projektu jest scharakteryzowanie i walidacja modelu *in vitro* 3D endometrium świni przy użyciu zaawansowanych technik obrazowania, takich jak mikroskopia konfokalna, przyżyciowe obrazowanie komórek oraz analiza histologiczna, w celu wizualizacji hodowli 3D. Podczas wczesnej ciąży bardzo ważna jest również odpowiedź immunologiczna matki na rozwijający się zarodek. Kokultura nowego modelu 3D *in vitro* endometrium z komórkami immunologicznymi pozwoli lepiej odwzorować środowisko *in vivo* oraz umożliwi badanie interakcji między komórkami immunologicznymi a endometrium. Badanie procesu implantacji zarodka *in vivo* jest skomplikowane, dlatego stworzenie modelu implantacji 3D umożliwi lepsze zrozumienie tego procesu. W tym celu do modelu endometrium 3D wprowadzimy sferoidy wytworzone z komórek trofoblastu. Aby wyjaśnić rolę hipoksji w mechanizmach interakcji zarodek-endometrium w nowym modelu implantacji zarodka 3D, zastosujemy sekwencjonowanie RNA na poziomie pojedynczej komórki (single-cell RNA sequencing). Ta nowoczesna technika pozwoli nam określić zmiany w transkryptomie (ekspresji genów) różnych typów komórek endometrium i trofoblastu. Ponadto zbadamy wpływ hipoksji na sekretom komórek trofoblastu i endometrium, wykorzystując spektrometrię mas.

Co istotne, wyniki uzyskane w trakcie realizacji projektu zostaną porównane z wynikami badań na całych organizmach (modelach *in vivo*). Nasze badania będą prowadzone w nowoczesnych i dobrze wyposażonych laboratoriach (laboratorium biologii molekularnej oraz laboratorium analizy i obrazowania komórek i tkanek) Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN oraz we współpracy z wiodącymi międzynarodowymi ośrodkami badawczymi.

Planowane badania wpisują się w najnowsze trendy redukcji wykorzystania zwierząt w badaniach naukowych, zgodnie z obowiązującymi zasadami 3R (Replacement, Reduction, Refinement). Dzięki rozwiązaniu obecnych ograniczeń modeli endometrium 2D oraz innych modeli 3D *in vitro*, projekt ten dostarczy bardziej fizjologicznie odpowiedniej platformy do badań kluczowych procesów we wczesnej ciąży. Pozwoli to odkryć fundamentalne procesy, które mogą znacząco poprawić metody leczenia niepłodności i zwiększyć sukces reprodukcyjny u zwierząt gospodarskich.