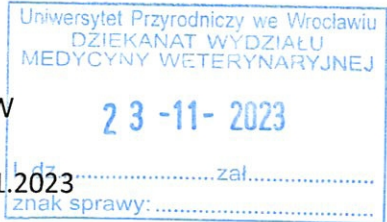


Dr hab. Andrzej Max, emer. prof. of The Warsaw University of Life Sciences - SGGW



Warszawa, 23.11.2023

Review report of Ms. Meriem Baouche's doctoral dissertation entitled
"Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cats: biology and clinical application for embryo culture *in vitro*"

The basis for preparing the review is the resolution of the Scientific Discipline Council for Veterinary Science of the Wrocław University of Environmental and Life Sciences of October 10, 2023. The evaluation of doctoral thesis was carried out in accordance with the guidelines of the Act of 20 July 2018, The Law on Higher Education and Science (Journal of Laws of 2023, item 742), hereinafter referred to as the Act.

1. Formal aspects

The dissertation was performed under the supervision of Ms dr. hab. Małgorzata Ochota, prof. of the University and the second supervisor Mr. Yann Locatelli from France. The work was carried out in the frame of the Doctoral School of the Wrocław University of Environmental and Life Sciences - Faculty of Veterinary Medicine, performed at the Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals headed by prof. dr. hab. Wojciech Niżański.

The dissertation submitted for review consists of 102 pages. It is based on three papers published in 2023 in the following journals: *Animals*, *Theriogenology* and *Frontiers in Veterinary Science* with a total IF = 9,625. The mentioned publications are authored by 5 (two papers) and 8 (one paper) persons, with the PhD candidate being the first author in all of them. The papers constitute a collection of thematically related scientific articles in accordance with Art. 187. 3 of the Act.

The dissertation is provided with summaries in English and Polish, thus meeting the requirement of Art. 187. 4 of the Act. It contains the following chapters according to the classic layout as General introduction, Aims of the thesis, Material and Methods, and then describes the issues presented in individual basic publications, and namely:

1. Baouche M, Ochota M, Locatelli Y, Mermillod P, Niżański W. Mesenchymal Stem Cells: Generalities and Clinical Significance in Feline and Canine Medicine. *Animals* (Basel). 2023, 13, doi: 10.3390/ani13121903.
2. Baouche M, Krawczanko A, Paprocka M, Klimczak A, Mermillod P, Locatelli Y, Ochota M, Niżański W. Feline umbilical cord mesenchymal stem cells: Isolation and *in vitro* characterization from distinct parts of the umbilical cord. *Theriogenology*. 2023, 201, 116-125.
3. Baouche M, Ochota M, Mermillod P, Locatelli Y and Niżański W. Feline Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a feeder layer for oocytes maturation and embryos culture *in vitro*. *Front. Vet. Sci.* 2023, 10, doi: 10.3389/fvets.2023.1252484.

2. Overall evaluation

At the beginning of the submitted work exist Acknowledgments addressed to several persons. They have no scientific value, but since they are part of the material sent for review, I would like to comment on one statement, namely "...introducing me to the captivating world of reproduction...". The expressed phrase is close to the reviewer's feelings and indicates the PhD candidate's positive emotional involvement in the practiced scientific discipline, what can be very helpful in achieving the appropriate level of substantial engagement.

Research on the effectiveness of ART (Assisted Reproductive Technologies) procedures and reproductive biotechnology of various animal species often ends with bringing the embryos to the morula/blastocyst stage, which can be achieved using *in vitro* methods, at individual phases: IVM (In

Two handwritten signatures in blue ink are visible at the bottom of the page. The signature on the left is more legible and appears to be 'A. Max'. The signature on the right is a large, stylized loop.

Vitro Maturation), IVF (In Vitro Fertilization) and IVC (In Vitro Culture), sometimes collectively called IVP (In Vitro Production). It is difficult to fully evaluate the techniques used without checking further stages of prenatal development, which would only be possible after transferring the embryos to synchronized recipients and following the fate of the embryos/fetuses until the end of pregnancy.

In some animal species, e.g. cattle, IVP methods are standardized and commercially used in the practice together with other procedures referred to as MOET (Multiple Ovulation Embryo Transfer), leading to pregnancy and delivery, what, apart from economic considerations, makes it possible to verify individual factors over the entire period of intrauterine development. In other species, including domestic cats and other felids, further pre- and post-implantation stages of embryonic and fetal development, which generally take place *in vivo*, are often not studied because the obtained embryos are not transferred to recipients due to biological barriers and numerous organizational difficulties, technical and legal problems. To some extent, this limits the possibility of a comprehensive assessment of the impact of *in vitro* techniques used on the final result, which is ultimately the achieving of offspring. It should be noted that although early embryonic development is very important, its duration of several days constitutes only a small percentage of the total prenatal period.

Moreover, because the domestic cat reproduces effectively on natural way, the only purpose of using this species in large-scale research in the field of reproductive biology and ART is to treat it as a model animal to prevent the extinction of wild felids, as the PhD candidate points out. However, due to the species variability of reproductive physiology (which is still unknown in some species), we can not expect a direct and quick translation of the results of research on domestic cats to endangered species. Therefore we have to be aware that there is a long way from laboratory-level experiments in domestic cats to a real improvement in the situation of endangered species, with numerous obstacles and in a shortening time.

These comments do not in any way discredit the assessed work, in which the research standards commonly utilize in this area were used. The presented remarks can only become an impulse to undertake more demanding projects in this captivating field of animal reproduction, especially with the intention of preserving endangered species. The research presented in the dissertation stay in line with current global trends aimed at protecting biodiversity and constitutes a consequent contribution to one of research directions carried out at the Department of Reproduction and Clinic of Farm Animals of the Faculty of Veterinary Medicine in Wrocław.

3. Detailed evaluation

The detailed assessment aims to settle whether the doctoral thesis meets the requirements of the Art. 187. 1 and 2 of the Act.

3a. Assessment in the light of Art. 187. 1 of the Act, stating that: "The doctoral dissertation demonstrates the candidate's general theoretical knowledge in a discipline (or disciplines) and the ability to conduct research or artistic work independently."

In the dissertation 99 publications from 1972-2023 are cited. Chapter I presents the state of knowledge regarding the area of research undertaken. The problem of endangering of most felid species is outlined in a logical sequence, and then on this background, the possibilities of using ART with their current achievements and research directions are presented. Then, moving on to issues more closely related to own research, various variants of impact on IVM/IVC procedures in cats used to improve their efficiency are described. In particular, the focus was on the use of support using co-culture with somatic cells, including stem cells. The characteristics of mesenchymal stem cells, their biological functions, proliferative and regenerative abilities and pluripotency/multipotency were also described. Subsequently their use in human and veterinary medicine was presented in order to introduce the goals of the own research. Detailed information are included in review publication No. 1, based on 141 references.

On this basis, I conclude that PhD candidate demonstrates theoretical knowledge in the discipline of

Animal Reproduction in the area of her doctoral thesis.

3b. Assessment in the light of Art. 187. 2 of the Act, stating that: "The subject matter of the doctoral dissertation shall be an original solution to a scientific problem or in terms of the application of results of own scientific research in the economic or social sphere, or an original artistic achievement."

The scientific problem was clearly expressed as the research aims, which were:

- 1) isolation and characterization of mesenchymal stem cells (MSCs) obtaining from various anatomical regions of the domestic cat umbilical cord,
- 2) checking whether the use of the mentioned cells derived from Wharton's jelly during oocyte maturation and embryo culture will affect the quality of gametes and embryos up to the morula/blastocyst stage.

The use of stem cells to improve the results of IVM and IVC is fully justified due to their known antioxidant and biostimulating properties. They are used in various areas of medicine and biotechnology. As original should be considered the obtaining of stem cells from various structures of the umbilical cord, and namely entire umbilical cord, umbilical blood vessels and Wharton's jelly and comparing their features. For this purpose, modern research tools using molecular biology techniques were used. This part of the research was presented in publication No. 2. It was found that MSCs were effectively isolated from all three structures, and their most efficient source turned out to be Wharton's jelly. I would like to emphasize the use of author's modification of the cell isolation process in order to improve their quality and quantity. The isolated cells were characterized by proliferation properties typical of stem cells and the ability to differentiate into chondrogenic, osteogenic and adipogenic lines with the expression of typical markers. It was shown that MSCs derived from Wharton's jelly had the strongest proliferation and differentiation abilities. With these findings, the first research goal was achieved.

The next stage of the research is described in publication No. 3. Oocytes, or more precisely COC (Cumulus-Oocyte Complex), collected from the ovaries of ovariectomized cats were used. The effect of the addition of MSCs to the IVM and IVC media was examined and it was shown that these cells, isolated from Wharton's jelly, stimulate the expansion of cumulus cells without affecting the oocyte nuclear maturation. Moreover, it was observed that the use of MSCs as feeder cells in co-culture system increases percentage of embryos in morula/blastocyst stage compared to the culture in the absence of these cells. These results fulfill the second research goal and, together with the first one, constitute an original solution to a scientific problem.

Based on the reviewed material, it is difficult to estimate the scope of the PhD candidate's personal contribution to the research conducted by a team of several persons. This is not clearly specified in the statements on pages 100-102. In particular, I would like to know what activities the Author performed practically, e.g. in the field of material collection, performing laboratory tests, photographic documentation, preparing diagrams, etc. Since the PhD candidate is the first author in all publications, I have to assume that her participation was significant, what along with the ranges of the research and cooperation with an excellent team leads to the conclusion that Ms. Meriem Baouche acquired the ability to conduct research work independently (Art 187. 1 of the Act).

4. Comments, doubts and questions

They concern publication no. 3.

1. The quality of oocytes obtained from the ovaries and their suitability for ART procedures depends, among other things, on the donor's age and health. The dissertation methodology only states that the ovaries came from sexually mature female cats. Their age has not been determined more precisely, but it is known that the quality of gametes coming from old females is essentially lower. The donors' health status was also unknown, especially regarding the reproductive organs, while their diseases are often the reason for ovariectomy and may also affect the quality and developmental competence of oocytes. In the assessment of COC, including cats, several-grade

scales are used to precisely characterize them in terms of the quality of the cumulus, ooplasm and zona pellucida. The publication only states that the criterion for selecting gametes for further procedures was uniformly dark ooplasm and the presence of several layers of cumulus cells. This indicates a selection of good quality COCs, but it could have been more precisely presented.

2. Experiment 1 concerns oocyte maturation. The methodology states that 45 oocytes were used for the experiment in each of the four tested groups. Therefore, for each group, 45 oocytes constitute 100% of those subjected to the IVM procedure. In the results numbers of oocytes are not presented as the evidence of IVM effectiveness. Presented diagrams indicate only the percentages of each assessed category, in particular in diagram 4A listing mature, immature and degenerated oocytes. The summary of percentage values of individual bars in groups does not indicate that the assessment applies to 100% of oocytes. Were not all oocytes out of the 45 in each group assessed for nuclear maturation? Maybe some oocytes could not be classified into any of the three categories? After all, each result should cover 100% of the objects examined.

3. In the research methodology, I could not find information on which way presumptive zygotes were selected after IVM. According to what criteria were they intended for IVC and distinguished from unfertilized oocytes?

4. What number of oocytes were actually used in experiment 2? Study design gives a total number of 565 oocytes, while their sum in groups in Table 1 amounts 445. Please explain this difference, because all experimental objects used should be included in the results.

5. The connection between the text and figures is unclear. In the chapter "Results" it is clear, but in the chapter "Study design" it is not so obvious. In particular, in Experiment 1: "Assessment of cumulus cells expansion" there is a reference to Figure 1, which in fact presents study design of the experiments 2 and 3, while the expansion of cumulus cells after IVM is illustrated by Figure 2. In turn, in "Assessment of nuclear maturation" there is a reference to Figure 2, while the appropriate illustration would be Figure 4B.

6. The aim of the study was to check the effect of the addition of MSC on the course of IVF and IVC. When forming experimental groups, those related to oocyte maturation and embryo culture were formed separately. A logical consequence would be to program the experimental group in which MSC would be added to both IVM and IVC media. Why was such a self-imposing complement abandoned? Such a comprehensive use of MCS could enhance the desired effect, although there is also a risk that it could (for some reasons that are difficult to predict) limit or eliminate it. Has such an attempt been made?

7. When assessing embryos after IVF/IVC, in addition to their developmental stage, their quality is taken into account, e.g. using a three-grade scale, including the presence of morphological defects, what is not mentioned in the publication. Yet the main goal of this series of experiments is to optimize the conditions of procedures leading to obtaining embryos suitable for transfer. It is a pity that the assessment of oocytes and embryos did not take into account the zona pellucida, because its condition plays an important role in implantation and further embryonic development, also in cats, especially since this opinion comes from the publication cited by the PhD candidate (Pope, C.E. 2014). Establishing the features of embryos of greatest chance of their implantation and further development (transferable embryos) would have a practical value in ART in cats and allow to compare their effectiveness.

The comments presented above do not question the research results and conclusions resulting from them, they are of an organizing nature and contribute to a more complete look at the issue, which in individual research projects, is an autonomous choice of the authors in accordance with their knowledge and scientific concept.

5. Final conclusion

I declare that the doctoral dissertation submitted for review by Ms. Meriem Baouche entitled: "Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cats: biology and clinical application for embryo culture

in vitro" meets the formal requirements contained in the Act - Law on Higher Education and Science of July 20, 2018 with modifications (Journal of Laws of 2023, item 742) and I recommend the High Discipline Council of Veterinary Medicine of the Wrocław University of Environmental and Life Sciences to admit Ms. Meriem Baouche to further stages of the procedure for awarding the doctoral degree.



10-11-2023

Warszawa, dnia 07.11.2023 r.

I. dz.

Recenzja

znak sprawy:

pracy doktorskiej pani Meriem Baouche, MSc p.t.:

"Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cats: biology and clinical application for embryo culture *in vitro*"

Podstawę do sporządzenia recenzji stanowi uchwała Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu z dnia 10 października 2023 r. Ocenę pracy przeprowadzono zgodnie z wytycznymi Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. Poz. 1668), zwanej dalej Ustawą.

1. Charakterystyka pracy

Promotorem rozprawy doktorskiej jest pani dr hab. Małgorzata Ochota, prof. UPWr, a promotorem pomocniczym pan Yann Locatelli z Francji. Praca została wykonana w ramach Szkoły doktorskiej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu – Wydziału Medycyny Weterynaryjnej, zrealizowana w Katedrze Rozrodu Zwierząt z Kliniką Zwierząt Gospodarskich kierowanej przez prof. dr hab. Wojciecha Niżańskiego.

Przedstawiona do recenzji dysertacja liczy łącznie 102 strony. Bazuje ona na trzech pracach opublikowanych w 2023 roku w następujących czasopismach: *Animals*, *Theriogenology* oraz *Frontiers in Veterinary Science* o łącznym IF=9,625. Wspomniane prace są autorstwa 5 (dwie prace) i 8 (jedna praca) osób, przy czym Doktorantka jest we wszystkich pierwszym autorem. Stanowią one zbiór powiązanych tematycznie artykułów naukowych w myśl art. 187, p. 3 Ustawy.

Opracowanie jest zaopatrzone w streszczenia w języku angielskim i polskim, wypełniając tym samym wymóg art. 187, p. 4 Ustawy. Zawiera następujące rozdziały według klasycznego układu: Ogólne wprowadzenie, Cel pracy, Materiał i metody, a następnie przedstawia zagadnienia zaprezentowane w poszczególnych publikacjach bazowych, a mianowicie:

1. Baouche M, Ochota M, Locatelli Y, Mermillod P, Niżański W. Mesenchymal Stem Cells: Generalities and Clinical Significance in Feline and Canine Medicine. *Animals* (Basel). 2023, 13, doi: 10.3390/ani13121903.
2. Baouche M, Krawczenko A, Paprocka M, Klimczak A, Mermillod P, Locatelli Y, Ochota M, Niżański W. Feline umbilical cord mesenchymal stem cells: Isolation and *in vitro* characterization from distinct parts of the umbilical cord. *Theriogenology*. 2023, 201, 116-125.
3. Baouche M, Ochota M, Mermillod P, Locatelli Y and Niżański W. Feline Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a feeder layer for oocytes maturation and embryos culture *in vitro*. *Front. Vet. Sci.* 2023, 10, doi: 10.3389/fvets.2023.1252484.

2. Ocena ogólna pracy

Na początku pracy znajdują się Podziękowania, kierowane do kilku osób. Nie posiadają one waloru naukowego, ale ponieważ stanowią część materiału przesłanego do recenzji, chciałbym odnieść się do jednego stwierdzenia, a mianowicie: „...introducing me to the captivating world of reproduction...”. Wyrażone sformułowanie jest bliskie odczuciom recenzenta i wskazuje na pozytywne emocjonalne zaangażowanie Doktorantki wobec uprawianej dyscypliny naukowej, co bywa bardzo pomocne w osiągnięciu odpowiedniego poziomu zaangażowania merytorycznego.

Badania w zakresie skuteczności procedur ART (Assisted Reproductive Technologies) i biotechnologii rozrodu różnych gatunków zwierząt nierzadko kończą się na doprowadzeniu zarodków do stadium moruli/ blastocysty, co jest możliwe do osiągnięcia metodami *in vitro*, na poszczególnych etapach: IVM (In Vitro Maturation), IVF (In Vitro Fertilization) i IVC (In Vitro Culture), obejmowanych czasem terminem łącznym IVP (In Vitro Production). Trudno jest przy tym o pełną ocenę zastosowanych technik bez przeprowadzenia kontroli dalszych etapów rozwoju prenatalnego, co byłoby możliwe dopiero po przeniesieniu zarodków zsynchronizowanym biorczyniom i śledzeniu losów zarodków/płodów aż do zakończenia ciąży. U niektórych gatunków zwierząt użytkowych (np. bydło) metody IVP są wystandaryzowane i komercyjnie wykorzystywane w praktyce wraz z innymi procedurami określanymi jako MOET (Multiple Ovulation Embryo Transfer), prowadząc do ciąży i porodu, co poza względami ekonomicznymi daje możliwość weryfikacji poszczególnych czynników na przestrzeni całego okresu rozwoju wewnątrzmacicznego. U innych gatunków, w tym kotów domowych i innych kotowatych dalsze, przed- i poimplantacyjne etapy rozwoju zarodkowego i płodowego, które z zasady przebiegają *in vivo* często nie są badane, gdyż pozyskanych zarodków nie przenosi się biorczyniom z uwagi na bariery biologiczne, liczne trudności organizacyjne, techniczne i prawne. W pewnym stopniu ogranicza to możliwość całościowej oceny wpływu zastosowanych technik *in vitro* na efekt końcowy, którym ma być ostatecznie uzyskanie potomstwa. Należy zauważyć, że chociaż wczesny rozwój zarodkowy jest bardzo ważny, to jednak jego wymiar czasowy wynoszący kilka dni stanowi zaledwie niewielki procent całkowitego okresu prenatalnego.

Poza tym, ponieważ kot domowy mnoży się skutecznie w sposób naturalny, to jedynym celem wykorzystania tego gatunku w szeroko zakrojonych badaniach w zakresie biologii rozrodu i ART jest traktowanie go jako zwierzęcia modelowego w celu zapobiegania ekstynkcji dzikich kotowatych, co zresztą wskazuje Doktorantka. Jednak z uwagi na gatunkową zmienność fizjologii rozrodu (która zresztą u części gatunków jest ciągle nieznaną) nie można liczyć na bezpośrednie i szybkie przełożenie wyników badań na kotach domowych na gatunki zagrożone. Trzeba mieć zatem świadomość, że od doświadczeń na poziomie laboratoryjnym u kota domowego do realnej poprawy sytuacji gatunków ginących i zagrożonych wyginięciem prowadzi daleka droga z licznymi przeszkodami i w skracającym się czasie.

Powyższe stwierdzenia w żadnym stopniu nie dyskredytują ocenianej pracy, w której zastosowano przyjęte w tym zakresie kryteria badawcze. Przedstawione uwagi mogą stać się jedynie impulsem do podejmowania bardziej wymagających przedsięwzięć w tej urzekającej dziedzinie jaką jest rozród zwierząt, szczególnie w zamierzeniu zachowania ginących gatunków.

Przedstawione w dysertacji badania wpisują się w aktualne światowe kierunki zmierzające do ochrony bioróżnorodności i stanowią konsekwentny wkład w jeden z kierunków badawczych realizowanych w Katedrze Rozrodu Zwierząt z Kliniką Zwierząt Gospodarskich UP we Wrocławiu.

3. Ocena szczegółowa pracy

Ocena szczegółowa mierza w kierunku ustalenia czy praca doktorska spełnia wymagania Ustawy zawarte w jej art. 187, p. 1 i 2.

3a. Ocena w świetle art. 187, p. 1 Ustawy, mówiącego, że: „Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie albo dyscyplinach oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej lub artystycznej.”

W dysertacji zacytowano 99 publikacji pochodzących z lat 1972-2023. Rozdział I przedstawia stan wiedzy dotyczący obszaru założonych badań. W logicznej kolejności zarysowano problem zagrożenia większości gatunków kotowatych, by następnie na tym tle

przedstawić możliwości wykorzystania ART z ich dotychczasowymi osiągnięciami i kierunkami badań. Następnie, przechodząc do zagadnień ściślej powiązanych z badaniami własnymi, opisano różne warianty oddziaływania na procedury IVM/IVC u kotów stosowane w celu poprawy ich wydajności. W szczególności skoncentrowano się na zastosowaniu wspomaganie z wykorzystaniem kokultury z komórkami somatycznymi, w tym macierzystymi. Opisano więc cechy mezenchymalnych komórek macierzystych, ich biologiczne funkcje, zdolności proliferacyjne, regeneracyjne i pluripotencję/multipotencję oraz zastosowanie w medycynie i weterynarii, by na tym tle zaprezentować cele badań własnych. Szczegółowe informacje są zawarte w przeglądowej publikacji nr 1, bazującej na 141 pozycjach piśmiennictwa.

Na tej podstawie stwierdzam, że kandydatka do stopnia doktora prezentuje wiedzę teoretyczną w dyscyplinie Rozród Zwierząt w zakresie objętym tematyką pracy.

3b. Ocena w świetle art. 187, p. 2 Ustawy, mówiącego, że: „Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne.”

Problem naukowy został jasno sformułowany jako cele badań, którymi było:

- 1) wyizolowanie i scharakteryzowanie macierzystych komórek mezenchymalnych (MSC) pochodzących z różnych regionów anatomicznych sznura pępowinowego kota domowego,
- 2) sprawdzenie czy użycie wspomnianych komórek pochodzących z galarety Whartona podczas dojrzewania oocytów i hodowli zarodków będzie miało wpływ na jakość gamet i zarodków do stadium moruli/blastocysty.

Użycie komórek macierzystych w celu poprawy wyników procedur IVM oraz IVC jest w pełni zasadne z uwagi na ich znane właściwości antyoksydacyjne i biostymulacyjne. Są one od dawna stosowane w różnych działach medycyny i biotechnologii. Za oryginalne należy uznać pozyskiwanie tych komórek z różnych struktur pępowiny i porównanie właściwości tych pochodzących z całego sznura pępowinowego, pępowinowych naczyń krwionośnych i galarety Whartona. W tym celu zastosowano nowoczesne narzędzia badawcze wykorzystujące techniki biologii molekularnej. Ten etap badań został przedstawiony w publikacji nr 2. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że MSC izolowano skutecznie z wszystkich trzech struktur, a najbardziej wydajnym ich źródłem okazała się galareta Whartona. Na podkreślenie zasługuje zastosowanie własnej modyfikacji procesu izolacji komórek w celu poprawy ich jakości i ilości. Wyizolowane komórki cechowały się typowymi dla komórek macierzystych właściwościami proliferacyjnymi i zdolnościami różnicowania się w linię chondrogenną, osteogenną i adipogenną z ekspresją typowych markerów. Wykazano, że MSC pochodzące z galarety Whartona miały najsilniej wyrażone zdolności proliferacji i różnicowania się. Tymi ustaleniami został zrealizowany pierwszy z celów badawczych.

Kolejny etap badań jest opisany w publikacji nr 3. Wykorzystano oocyty, a dokładniej COC (Cumulus-Oocyt Complex) pobrane z jajników kotek po owarietomii. Zbadano wpływ dodatku MSC na proces IVM oraz IVC i wykazano, że komórki te, izolowane z galarety Whartona, nie wpływając na dojrzewanie jądrowe oocytów, stymulują rozproszenie komórek wzgórka jajonośnego. Ponadto zaobserwowano, że zastosowanie kokultury z MSC podczas hodowli zarodków podnosi ich odsetek w stadium moruli/blastocysty w porównaniu do hodowanych w środowisku bez tych komórek. Wyniki te są wypełnieniem drugiego celu i łącznie z pierwszym stanowią oryginalne rozwiązanie problemu naukowego.

Na podstawie materiału przedłożonego do recenzji trudno jest ustalić zakres osobistego wkładu Doktorantki w badania prowadzone przez kilkusobowy zespół. Nie precyzują tego też oświadczenia zamieszczone na str. 100-102. W szczególności chętnie bym się dowiedział jakie czynności wykonywała praktycznie Autorka np. w zakresie pozyskiwania

materiału, wykonywania testów laboratoryjnych, dokumentacji fotograficznej, sporządzania diagramów itd. Ponieważ Doktorantka jest pierwszym autorem we wszystkich publikacjach przyjmuję, że jej udział był znaczny, co wraz z zakresem badań i współpracą ze znakomitym zespołem daje podstawę do stwierdzenia, że pani Meriem Baouche posiadała umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej (art. 187, p. 1 Ustawy).

4. Uwagi, wątpliwości i pytania

Dotyczą publikacji nr 3.

1. Jakość oocytów pozyskanych z jajników i ich przydatność do procedur ART zależy między innymi od wieku i stanu zdrowia dawczyń. W metodyce badań podano tylko, że jajniki pochodziły od kotek dojrzałych płciowo. Nie określono dokładniej ich wieku, a wiadomo, że u samic starych jakość gamet bywa gorsza. Nie znany był także stan zdrowia, w szczególności narządów rozrodczych, których choroby bywają często powodem owariohisterektomii, a mogą także wpływać na jakość i kompetencję rozwojową oocytów. W ocenie COC, w tym także kocich, bywają stosowane kilkustopniowe skale mające na celu ich dokładną charakterystykę, zarówno odnośnie jakości wzgórka jajonośnego jak i ooplazmy oraz osłonki przejrzystej. W publikacji podano tylko, że kryterium wyboru gamet do dalszych procedur była jednolicie ciemna ooplazma i obecność kilku warstw komórek wzgórka. Wskazuje to na selekcję COC dobrej jakości, ale można to było określić precyzyjniej.

2. Eksperyment 1 dotyczy dojrzewania oocytów. W metodyce podano, że do doświadczenia wykorzystano po 45 oocytów w każdej z 4 badanych grup. Zatem dla każdej grupy 45 oocytów stanowi 100% poddanych procedurze IVM.

W wynikach nie ujawniono źródłowych wartości liczbowych skuteczności IVM, a posłużono się diagramami wskazującymi procentowe udziały poszczególnych ocenianych kategorii, w szczególności w diagramie 4A, w którym wyszczególniono oocyty dojrzałe, niedojrzałe i zdegenerowane. Z podsumowania wartości procentowych poszczególnych słupków w grupach nie wynika, żeby ocena dotyczyła 100% oocytów. Czy nie wszystkie oocyty spośród 45 w każdej grupie poddano ocenie w kierunku dojrzewania jądrowego, czy może były takie, których nie udało się zakwalifikować do żadnej z wymienionych trzech grup? Wszakże każdy wynik powinien obejmować 100% obiektów poddanych badaniu.

3. W metodyce badań nie mogłem znaleźć informacji w jaki sposób po IVM selekcjonowano domniemane zygoty (presumptive zygotes), według jakich kryteriów odróżniano je od niezapłodnionych oocytów i przeznaczano do IVC.

4. Jaką faktycznie liczbę oocytów wykorzystano w eksperymencie 2? W Study design podano liczbę łączną 565 oocytów, zaś ich suma w grupach w tabeli 1 wynosi 445. Proszę o wyjaśnienie tej różnicy, gdyż wszystkie użyte obiekty doświadczalne powinny być rozliczone w wynikach.

5. Niejasne jest powiązanie tekstu i rycin (figures), W rozdziale Results nie przedstawia to wątpliwości, jednak w rozdziale Study design nie jest to tak oczywiste. W szczególności w Experiment 1 Assessment of cumulus cells expansion znajduje się odniesienie do Figure 1, która przecież przedstawia schematy Experiment 2 oraz Experiment 3. Natomiast rozproszenie komórek wzgórka ilustruje Figure 2. Z kolei w Assessment of nuclear maturation znajduje się odniesienie do Figure 2, podczas gdy właściwą ilustracją byłaby Figure 4B.

6. Celem badań było sprawdzenie wpływu dodatku MSC na przebieg IVF i IVC. Przy formowaniu grup badawczych wytypowano osobno te odnoszące się do dojrzewania oocytów oraz hodowli zarodków. Logiczną konsekwencją byłoby zaprogramowanie grupy badanej, w której by użyto MSC zarówno w procesie IVM jak i IVC. Dlaczego zrezygnowano z tak samonarzucającego się dopełnienia? Takie kompleksowe użycie MCS mogłoby wzmocnić pożądaną efekt, chociaż istnieje też ryzyko, że mogłoby go (z jakichś trudnych do przewidzenia przyczyn) ograniczyć lub zniwelować. Czy podjęto taką próbę?

7. W ocenie zarodków po IVF/IVC oprócz stadium rozwojowego uwzględnia się ich jakość według np. trzystopniowej skali, w tym występowanie wad morfologicznych, o czym nie wspomniano w publikacji. A przecież głównym celem tego cyklu badań jest optymalizacja warunków procedur prowadzących do otrzymania zarodków przydatnych do przenoszenia. Szkoda, że w ocenie oocytów i zarodków nie uwzględniono osłonki przejrzystej, której stan odgrywa istotną rolę w implantacji i dalszym rozwoju embrionalnym, także u kotów, zwłaszcza że opinia ta pochodzi z publikacji cytowanej przez Doktorantkę (Pope, C.E. 2014; poz. 34 piśmiennictwa). Ustalenie tych cech zarodków, które dają największą szansę ich implantacji i dalszego rozwoju (transferable embryos) miałyby praktyczny wymiar w ART u kotów i porównywaniu ich skuteczności.

Przedstawione wyżej uwagi nie podważają wyników badań i płynących z nich wniosków, mają charakter porządkujący i są przyczynkiem do pełniejszego spojrzenia na zagadnienia, które w poszczególnych, z konieczności wycinkowych, pracach badawczych stanowią autonomiczny wybór autorów zgodny z ich wiedzą i założeniami naukowymi.

5. Wniosek końcowy

Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska pani Meriem Baouche p.t.: „Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cats: biology and clinical application for embryo culture *in vitro*” spełnia wymogi formalne zawarte w ustawie – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. ze zm. (Dz. U. 2023 poz. 742) i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie pani Meriem Baouche do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Andrzej Max