



WROCLAW UNIVERSITY  
OF ENVIRONMENTAL  
AND LIFE SCIENCES

DOCTORAL SCHOOL  
FACULTY OF VETERINARY MEDICINE  
DEPARTMENT OF REPRODUCTION AND CLINIC FOR FARM ANIMALS

*Meriem Baouche*

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

*Supervisor: dr hab. Małgorzata Ochota*

*Second Supervisor :dr Yann Locatelli*

Wroclaw 2023



WYDZIAŁ MEDYCyny  
WETERYNARYJNEJ

## SUMMARY IN ENGLISH

Wild cats are facing a population decline, making it challenging to obtain germ cells for assisted reproduction techniques (ART). However, domestic cats can serve as a biomedical model for the ART of endangered species due to their biological similarities with other felids. While advancements have been made, success rates for ART in cats are lower than *in vivo* development. Stem cells have been used to improve germ cell development *in vitro*, and contact with MSCs can help obtain *in vitro*-derived embryos with levels of development similar to those derived *in vivo*.

Due to the above, the proposed research project aimed to isolate and characterise mesenchymal stem cells (MSCs) from the different anatomical regions of the feline umbilical cord and determine whether the *in vitro* co-culture of cat oocytes/embryos with feline Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (fWJ- MSCs) will improve the results of the feline embryo *in vitro* culture.

During the initial research phase, the MSCs were derived and cultured from different segments of the feline umbilical cord, vessels, Wharton's jelly, and the whole cord. We evaluated the proliferative capacity of the MSCs by measuring the cumulative population doubling level and doubling time. Additionally, we validated the differentiation potential via chondrogenic, osteogenic, and adipogenic induction under each differentiation condition. The expression of surface markers was examined with flow cytometry, and the pluripotency gene expression was assessed using RT-PCR.

In the second research phase, feline Wharton's jelly-derived MSCs were used as a feeder layer for the oocytes during *in vitro* maturation and embryos during *in vitro* culture. In oocytes, the degree of cumulus expansion and the nuclear maturation were assessed, whereas for embryos, the developmental competence, measured as the cleavage, morula and blastocyst rate, was compared to the groups cultured without Wharton's jelly-derived MSCs addition.

The cells isolated possessed MSCs characteristics, including a typical spindle shape, proliferation capacity and the ability to differentiate into various lineages (chondrogenic, osteogenic, and adipogenic). These cells express mesenchymal (CD44+, CD90+) and pluripotency markers (NANOG, Oct4, SOX2) but not hematopoietic (CD34, MCH I) markers.

The Wharton's jelly-derived MSCs displayed the highest proliferation ability and tremendous differentiation potential compared to those isolated from the whole umbilical cord and from the umbilical cord vessels.

The use of feline Wharton's jelly-derived MSCs in co-culture with oocytes resulted in an increased proportion of cumulus cells and oocytes exhibiting cumulus expansion. Although there were no significant differences in the percentage of matured oocytes (metaphase II) among the groups, embryo development showed a significant improvement. Oocytes matured with MSC co-culture conditions had higher cleavage, morula, and blastocyst rates compared to commercial media alone ( $P < 0.05$ ). Similarly, in the second part of the co-culture experiment, the embryos co-cultured with MSCs displayed higher morula and blastocyst rates ( $P < 0.05$ ).

Based on the results obtained from our study, it has been found that the feline umbilical cord is a highly suitable source of MSCs. In addition, it was observed that co-culturing MSCs during oocyte maturation led to improved embryo development, while the co-culturing of MSCs during embryo culture resulted in a higher number of morula and blastocysts.

It is important to note that further research is needed to gain a complete understanding of how to best utilise MSCs for improving oocyte maturation and embryo *in vitro* conditions in domestic and wild feline species.

## SUMMARY IN POLISH

Liczebność gatunków dzikich kotowatych zmniejsza się gwałtownie, co utrudnia pozyskiwanie ich komórek rozrodczych do badań mających na celu poprawę wyników obecnie stosowanych technik wspomaganego rozrodu prowadzonych w celu ochrony zasobów genetycznych zagrożonych gatunków. Z drugiej strony, stale rosnąca populacja kotów domowych, może służyć, jako model biomedyczny dla rozwoju i optymalizacji biotechnik stosowanych u dzikich kotów. Pomimo badań prowadzonych już od wielu lat, wskaźniki sukcesu biotechnik u kotowatych są nadal znacząco niższe w porównaniu do wyników uzyskiwanych *in vivo*.

Dane literaturowe wskazują, że dodatek komórek macierzystych podczas hodowli gamet *in vitro* sprzyja pozyskiwaniu zarodków, których dynamika rozwoju i jakość są zbliżone do wyników obserwowanych *in vivo*. W związku z powyższym, celem przedstawionego projektu badawczego było wyizolowanie i scharakteryzowanie macierzystych komórek mezenchymalnych (MSC), pochodzących z różnych regionów anatomicznych sznura pępowinowego kota domowego. A następnie sprawdzenie czy dodatek MSCs pochodzących z części sznura pępowinowego zwanej galareta Whartona (fWJ-MSC) podczas dojrzewania oocytów i hodowli zarodków, wpłynie korzystnie na proces dojrzewania i potencjał rozwojowy zarodków kota *in vitro*.

Nieźródnicowane MSCs pozyskiwano z różnych odcinków pępowiny kota: naczyń, galarety Whartona i całej pępowiny podczas początkowej fazy badawczej. W kolejnym etapie oceniano zdolność proliferacyjną pozyskanych MSCs w oparciu o czas podwojenia populacji. Dodatkowo weryfikowano potencjał pozyskanych komórek do wielokierunkowego różnicowania, poprzez indukowanie ich hodowli w kierunku chondrocytów, osteocytów i adipocytów. Ekspresję markerów powierzchniowych badano za pomocą cytometrii przepływowej, a ekspresję genu pluripotencji oceniano za pomocą RT-PCR.

W drugim etapie badań, mezenchymalne komórki macierzyste pochodzące z galarety Whartona sznura pępowinowego kota domowego, były dodawane do pożywek hodowlanych przeznaczonych dla oocytów podczas ich dojrzewania *in vitro* oraz dla zarodków podczas ich hodowli *in vitro*. W przypadku oocytów oceniano stopień rozszerzenia komórek wieńca promienistego i dojrzałość jądrową (metafaza II). Natomiast u zarodków oceniano kompetencję

rozwojową, mierzoną, jako wskaźnik bruzdkowania oraz odsetek morul i blastocyst. Uzyskane wyniki porównywano z grupami hodowanymi bez dodatku mezenchymalnych komórek macierzystych.

Uzyskane wyniki wskazują, że komórki mezenchymalne izolowane ze sznura pępowinowego, posiadały cechy komórek macierzystych, w tym typowy kształt, zdolność proliferacji i zdolność różnicowania się w różne linie komórkowe (chondrogena, osteogenna i adipogenna). Komórki te posiadały również typowe markery mezenchymalne (CD 44+, CD90+) i markery pluripotencji (NANOG, Oct4, SOX2), ale nie posiadały typowych markerów hematopoetycznych (CD34, MCH I). W naszych badaniach, największą liczbę MSCs izolowano z galarety Whartona, ponadto te komórki wykazywały najwyższą zdolność proliferacyjną i najlepszy potencjał do wielokierunkowego różnicowania, w porównaniu z komórkami izolowanymi z całej pępowiny i naczyń pępowinowych.

W drugim etapie badań, MSCs pochodzące z galarety Whartona były dodawane do hodowli in vitro oocytów/zarodków kota domowego. W przypadku oocytów ich dodatek znacząco zwiększał stopień rozszerzenia komórek wieńca promienistego, ale nie wpływał na dojrzałość jądrową (metafaza II). Dodatkow zarodki pochodzące z oocytów dojrzewających z dodatkiem MSCs, wykazywały wyższy odsetek podziałów, morul i blastocyst ( $P < 0,05$ ). Natomiast zarodki, pochodzące z oocytów dojrzewających in vitro w pożywce bez dodatku MSCs, a otrzymujące dodatek MSCs podczas rozwoju zarodkowego in vitro, również wykazywały wyższy odsetek morul i blastocyst ( $P < 0,05$ ).

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że pępowina kota domowego jest odpowiednim źródłem mezenchymalnych komórek macierzystych. Dodatkowo zaobserwowano, że dodatek MSCs podczas dojrzewania oocytów prowadził do poprawy rozwoju zarodkowego, podobnie jak dodatek MSCs podczas hodowli zarodków skutkował wyższą liczbą morul i blastocyst.

Należy zauważyć, że potrzebne są dalsze badania do pełnego zrozumienia tego, jak najlepiej wykorzystać MSCs podczas dojrzewania oocytów i hodowli zarodków kota domowego in vitro w celu optymalizacji technik wspomaganego rozrodu przeznaczonych dla tego gatunku, z nadzieją na możliwość ich przyszłego zastosowania u dzikich kotowatych.