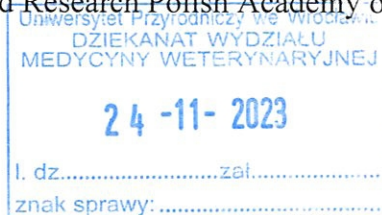


Professor Marta Siemieniuch DVM, PhD, DSc.

Popielno, 8.11.2023.

Research Station of Institute of Animals Reproduction and Food Research Polish Academy of Sciences in Olsztyn

Popielno 25, 12-220 Ruciane-Nida



Review

doctoral thesis of Master of Science in biological sciences (MSc. in Biology)

Meriem Baouche,

entitled: "Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cats: biology and clinical application for embryo culture in vitro" performed under the supervision of the main supervisor, Małgorzata Ochota DVM, PhD, DSc, associated professors Department Veterinary Medicine, Wrocław University of Life Sciences and auxiliary supervisor Yann Locatelli, PhD, DSc, INRAE, CNRS, University of Tours, Nouzilly, and Museum National d'Histoire Naturelle, Obterre, France

General characteristics of the doctoral dissertation

The basis for applying for a doctoral degree is a series of three thematically similar scientific articles listed below. Two of the three are original articles and one review article, all published in journals from the JCR list with a total IF of 9.625 and a total score according to the currently applicable guidelines of the Ministry of Education and Science of 310. In each of the works, the PhD student is the first author.

List of publications included in the doctoral thesis:

1. Mesenchymal Stem Cells: Generalities and Clinical Significance in Feline and Canine Medicine. Baouche M, Ochota M, Locatelli Y, Mermillod P, Nizański W. *Animals* 2023 13(12):1903. doi: 10.3390/ani13121903.
2. Feline umbilical cord mesenchymal stem cells: Isolation and in vitro characterization from distinct parts of the umbilical cord. Baouche M, Krawczenko A, Paprocka M, Klimczak A, Mermillod P, Locatelli Y, Ochota M, Nizański W. *Theriogenology*. 2023 201:116-125. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.049
3. Feline Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a feeder layer for oocytes maturation and embryos culture *in vitro*. Baouche M, Ochota M, Mermillod P, Locatelli Y, Nizanski W. *Front Vet Sci*. 2023 10:1252484. doi: 10.3389/fvets.2023.125248

1



Introduction

According to the International Convention for the Conservation of Endangered Species (2020), the vast majority of species in the world belonging to the *Felidae* family are declining in numbers and are at risk of extinction. This situation is caused, among others, by: limitation of natural resources and decline of wild felid ecosystems. Successive reduction of population size, geographical isolation and the related impoverishment of genetic diversity cause a drastic deterioration of reproduction rates among wild felids and minimize the chances of survival of these species in nature.

The negative features of pure-breed breeding, resulting from a reduction in the animal population, can also be observed among many breeds of domesticated cats. Mastering the techniques of reproductive biology related to the acquisition and maturation of oocytes *in vitro*, the cultivation of embryos *in vitro* and the transfer of embryos for representatives of many species of felids is becoming a necessity. The domestic cat is an excellent research model for many felid species. For this reason, mastering reproductive biology techniques in the case of a domestic cat is of both scientific, practical and economic importance. Despite research in this field conducted for many years, the success rates of bioreproductive techniques in felids are much lower than the results obtained *in vivo*. Therefore, improving the conditions for the maturation and cultivation of oocytes and embryos obtained from domestic cats deserves interest and brings tangible benefits both in the field of scientific research and clinical activities. Recent years have brought a great increase in interest in the use of stem cells, primarily used in the treatment of injuries in regenerative medicine, as well as many general organ diseases. In this doctoral thesis, the PhD student isolates and characterizes stem cells obtained from the umbilical cord, and then uses them as a source of growth factors and cytokines during *in vitro* culture of oocytes and embryos.

Research hypotheses and objectives of the work

The Author, based on the results of previous scientific research on the positive effect of stem cells on *in vitro* gamete cultivation and embryo development, puts forward a hypothesis about the probable beneficial effect of mesenchymal stem cells obtained from the umbilical cord of a domestic cat on the maturation of oocytes and further on the developmental potential of cat embryos *in vitro*. In the dissertation submitted for evaluation, the author distinguishes three main research goals. The first is to collect and present current knowledge regarding the biology and use of mesenchymal stem cells (MSCs) in the therapy

of dogs and cats. The second aim of the study was to obtain and characterize mesenchymal stem cells originating from various regions of the umbilical cord, i.e. from Wharton's jelly and the cord's blood vessels. The third aim of the study was to determine whether the addition of mesenchymal stem cells would have a positive effect on the process of oocyte maturation and *in vitro* breeding of domestic cat embryos. Individual research goals are developed in subsequent publications that are part of the doctoral dissertation.

Material and methods

In order to isolate mesenchymal stem cells, umbilical cords obtained during natural births or during cesarean section were used from domestic cats of various breeds, aged 1.5 to 5 years, who were patients of the Department of Reproduction and Farm Animals Clinic of the University of Life Sciences in Wrocław. In order to isolate oocytes, ovaries obtained during ovariectomy or ovariectomy performed in female cats who were patients of the Department of Reproduction and Farm Animal Clinic of the University of Life Sciences in Wrocław and local veterinary clinics were used. A total of 180 oocytes were used for research. The research material in the dissertation submitted for evaluation is uniform, individual research procedures were carried out in identical conditions, which allowed obtaining results that, from a statistical point of view, allowed for drawing reliable conclusions.

The doctoral student also demonstrated a very good knowledge of the scientific literature on the topic of her research, which enabled her to prepare a reliable review of the literature included in work no. 1, as well as to conduct discussions in the series of works included in the doctoral dissertation. It is worth emphasizing the good selection of research methods used by the PhD student to solve the proposed issue, as well as the accuracy of the conclusions drawn. Also noteworthy is the excellent graphic documentation - both photos, as well as charts and tables, reflect the obtained results very well and allow the recipient to quickly become familiar with the topic.

Paper No. 2 describes in great detail the methodology of obtaining stem cells from particular regions of the umbilical cord, as well as the cell culture methods, passages, individual cell substrates and media used to differentiate stem cells *in vitro*. The results are confirmed by extensive photographic documentation. Very precise descriptions make it possible to repeat the research conducted by the author and obtain similar results. It is worth

emphasizing the reliability of the research carried out by the PhD student and her very good knowledge of the literature.

In work No. 3, the PhD student examined the influence of stem cells isolated from the umbilical cord in the area of Wharton's jelly on the maturation of female cats' oocytes, as well as on the development of embryos *in vitro*. The methodology of individual experiments is described very thoroughly, making it possible to conduct a similar experiment. Two types of commercial media for maturation of horse and bovine oocytes were used for *in vitro* maturation of oocytes. Mesenchymal cells obtained from passage 2 or 3 were seeded in 4-well plates at 1×10^4 cells in 1 ml of DMEM-LG medium containing 10% fetal bovine serum and 1% penicillin-streptomycin until co-culture with oocytes or embryos was started.

Results

Paper No. 1 presents a comprehensive characterization of mesenchymal stem cells, starting from the possibility of using these cells in various therapeutic procedures, through their immunomodulatory and anti-inflammatory properties, as well as supporting proliferative and angiogenic activity thanks to the production of various growth factors and cytokines. Then, the PhD student broadly discussed examples of the use of MSCs in therapeutic procedures in dogs suffering from osteoarthritis, osteochondritis and in regenerative medicine, after tendon injuries, as well as in cats during bronchial asthma, chronic renal failure, chronic periodontitis, and inflammatory intestinal problems. The author emphasized the role of stem cells in regenerative medicine, but also drew attention to the need to carefully examine the long-term effects of these cells in order to ensure the safety of patients receiving them.

The results published in paper No. 2 indicate that mesenchymal cells obtained from the umbilical cord had the characteristics of stem cells, such as: typical shape, proliferation ability and the ability to differentiate into cells of the chondrogenic, osteogenic and adipogenic lines. They also had typical mesenchymal markers CD44+ and CD90+, pluripotency markers NANOG, Oct4, SOX2 and no hematopoietic markers CD34, MHC II. Cells isolated from the area of Wharton's jelly were selected for further co-culture studies because they showed higher proliferation ability and better potential for multidirectional differentiation, compared to cells obtained from the entire umbilical cord and blood vessels only.

Based on the results of the experiments conducted in thesis no. 3, the PhD student concluded that the addition of stem cells did not affect the *in vitro* oocyte maturation process,

which amounted to 45-55% in all tested groups. However, co-culture resulted in an increased degree of dilation of the coronary artery cells, and embryos derived from oocytes cultured with stem cells showed a higher percentage of divisions, morulas and blastocysts. Similarly, embryos that came from oocytes matured without the addition of MSCs, but cultured in coculture with stem cells, showed a higher percentage of morulas and blastocysts. The obtained results allow us to expect an improvement in the results of embryo culture *in vitro*.

Observations on the doctoral thesis

The doctoral thesis presented for review in the form of a series of three publications is coherent and very well presented scientific material. Scientific publications were reviewed by at least two independent reviewers, which largely limits further discussion. In her research, the doctoral student uses biological material remaining after ovariectomy/ovariohysterectomy or after natural childbirth or cesarean section. This is worth emphasizing because it does not raise any controversy or ethical dilemmas. In my opinion, the topic of the work deserves appreciation, because the results of these experiments will have a chance to be implemented into the reproductive biology of wild felines and perhaps contribute to increasing the population of endangered species.

The comments or questions I have for the PhD student are as follows:

1. In paper no. 2, you use the methodology of isolating mesenchymal stem cells based on the methodology used by Yang et al. (2019) (out of my duty as a reviewer, I must point out that in your publication you refer to the name and not the surname of the first author), for the purpose of isolating progenitor cells from a horse's hoof, with your own modifications. These modifications include, for example, the use of a 0.02% type I collagenase solution for tissue digestion, instead of a 0.1% concentration with 10% bovine albumin added (Yang et al., 2019). The modifications result from, among others: of the type of tissues included in the organ undergoing digestion, hoof vs. umbilical cord. What was the reason for choosing this particular methodology, instead of one closer to the species or organ you were working on?
2. Regarding work no. 3, from how many cats was the research material obtained to obtain a pool of 180 oocytes used in the research?
3. In paper No. 3, you use a commercial oocyte maturation medium intended for horses or cattle for oocyte maturation and embryo culture. What was the reason for choosing these

particular media and not, for example, the TMC199 media with additives usually used for IVM and breeding cat embryos?

4. Have you tried to transfer in vitro cultured embryos in co-culture with MSCs or do you have further scientific plans for this type of research?

Summary

To sum up, the conducted research required great organizational commitment, good planning and organizational skills from the PhD student. The assistance of people who are co-authors of the publications does not in any way diminish the achievements of the PhD student. The research methodology and the results obtained are presented in a clear and reliable way. The obtained results not only enrich basic knowledge, but also have a strong impact on clinical practice. Taking into account the above, I am appealing to the Veterinary Discipline Council to recognize Ms. Meriem Baouche's doctoral thesis with an appropriate award.

Final conclusion

In my opinion, the doctoral thesis of Meriem Baouche MSc entitled "Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cats: biology and clinical application for embryo culture *in vitro*" fully meets the requirements specified in Art. 187 of the Act of July 20, 2018, Law on Higher Education and Science (Journal of Laws of 2023, item 742, as amended) for candidates applying for a doctoral degree. Therefore, I am submitting an application to the High Scientific Council of the Veterinary Discipline of the University of Environmental and Life Sciences in Wrocław to admit Meriem Baouche MSc to further stages of the procedure for awarding a doctoral degree.

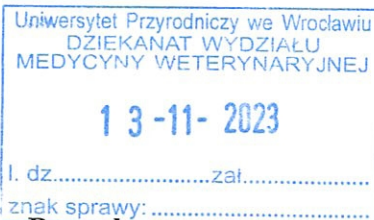


Professor Marta Siemieniuch DVM, PhD, DSc.

Prof. dr hab. n. wet. Marta Siemieniuch,

Popielno, dnia 8.11.2023.

Stacja Badawcza Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN,
Popielno 25, 12-220 Ruciane-Nida



Recenzja

pracy doktorskiej mgr nauk biologicznych (MSc. in Biology) Meriem Baouche,
pt.: „Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cats: biology and clinical application
for embryo culture *in vitro*” wykonanej pod kierunkiem promotora głównego dr hab.
Małgorzaty Ochoty, Wydz. Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Przyrodniczego we
Wrocławiu i promotora pomocniczego dr Yann Locatelli, INRAE, CNRS, University of
Tours, Nouzilly, i Museum National d’Histoire Naturelle, Obterre, France

Ogólna charakterystyka rozprawy doktorskiej

Podstawą do ubiegania się o stopień naukowy doktora jest cykl wykazanych poniżej trzech zbieżnych tematycznie artykułów naukowych. Dwa z trzech to artykuły oryginalne oraz jeden artykuł przeglądowy, wszystkie opublikowane w czasopiśmie z listy JCR o łącznym IF 9,625 i sumarycznej punktacji wg aktualnie obowiązujących wytycznych Ministerstwa Edukacji i Nauki wynoszącej 310. W każdej z prac Doktorantka jest pierwszym autorem.

Wykaz publikacji wchodzących w skład pracy doktorskiej:

1. Mesenchymal Stem Cells: Generalities and Clinical Significance in Feline and Canine Medicine. Baouche M, Ochota M, Locatelli Y, Mermillod P, Nizański W. *Animals* 2023 13(12):1903. doi: 10.3390/ani13121903.
2. Feline umbilical cord mesenchymal stem cells: Isolation and *in vitro* characterization from distinct parts of the umbilical cord. Baouche M, Krawczenko A, Paprocka M, Klimczak A, Mermillod P, Locatelli Y, Ochota M, Nizański W. *Theriogenology*. 2023 201:116-125. doi: 10.1016/j.theriogenology.2022.11.049
3. Feline Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells as a feeder layer for oocytes maturation and embryos culture *in vitro*. Baouche M, Ochota M, Mermillod P, Locatelli Y, Nizanski W. *Front Vet Sci*. 2023 10:1252484. doi: 10.3389/fvets.2023.125248

Wstęp

Zgodnie z danymi Międzynarodowej Konwencji Ochrony Zagrożonych Gatunków (2020), przeważająca większość żyjących na świecie gatunków należących do rodziny kotowatych, odnotowuje spadek liczebności i jest zagrożona wyginięciem. Sytuacja taka spowodowana jest m.in. ograniczeniem zasobów naturalnych i zmniejszaniem się ekosystemów dzikich kotowatych. Sukcesywne ograniczanie liczebności populacji, izolacja geograficzna i związane z tym zubożenie różnorodności genetycznej powodują drastyczne pogarszanie się wskaźników rozrodu wśród dzikich kotowatych oraz minimalizują szanse przeżycia tych gatunków w naturze. Negatywne cechy hodowli w czystości rasy, wynikające ze zmniejszenia populacji zwierząt, można zaobserwować również wśród wielu ras kotów udomowionych. Opanowanie technik biologii rozrodu, związanych pozyskiwaniem i dojrzewaniem oocytów *in vitro*, hodowlą zarodków *in vitro* i transferem zarodków odnośnie do przedstawicieli wielu gatunków kotowatych staje się koniecznością. Kot domowy jest doskonałym modelem badawczym dla wielu gatunków kotowatych. Z tego względu opanowanie technik biologii rozrodu w przypadku kota domowego ma zarówno naukowe, jak i praktyczne oraz ekonomiczne znaczenie. Mimo badań w tym zakresie prowadzonych od wielu lat, wskaźniki sukcesu biotechnik rozrodu u kotowatych są znacznie niższe niż wyniki uzyskiwane *in vivo*. Dlatego poprawa warunków dojrzewania i hodowli oocytów oraz zarodków pozyskanych od kota domowego zasługuje na zainteresowanie i przynosi wymierne korzyści zarówno w dziedzinie badań naukowych, jak również działań klinicznych. Ostatnie lata przynoszą duży wzrost zainteresowania zastosowaniem komórek macierzystych, przede wszystkim stosowanych w leczeniu urazów w medycynie regeneracyjnej, jak również wielu chorób ogólnonarządowych. W niniejszej rozprawie doktorskiej Doktorantka izoluje i charakteryzuje komórki macierzyste pozyskane ze sznura pępowinowego, a następnie stosuje je jako źródło czynników wzrostowych i cytokin podczas w hodowli oocytów i zarodków *in vitro*.

Hipotezy badawcze i cele pracy

Autorka, opierając się na wynikach wcześniejszych badań naukowych, dotyczących pozytywnego wpływu komórek macierzystych na hodowlę gamet *in vitro* i rozwój zarodków, stawia hipotezę o prawdopodobnym korzystnym wpływie mezenchymalnych komórek macierzystych, pozyskanych ze sznura pępowinowego kota domowego na dojrzewanie oocytów i dalej na potencjał rozwojowy zarodków kota *in vitro*. W przedstawionej do oceny rozprawie Autorka wyróżnia trzy główne cele badawcze. Pierwszym z nich jest zebranie i

przedstawienie aktualnej wiedzy dotyczącej biologii i wykorzystania mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs) w terapii psów i kotów. Drugim celem badań było pozyskanie i scharakteryzowanie macierzystych komórek mezenchymalnych pochodzących z różnych regionów sznura pępowinowego, to jest z obrębu galarety Whartona oraz naczyń krwionośnych sznura. Natomiast celem trzecim badań było określenie czy dodatek macierzystych komórek mezenchymalnych wpłynie pozytywnie na proces dojrzewania oocytów i hodowli zarodków kota domowego *in vitro*. Poszczególne cele badawcze znajdują rozwinięcie w kolejnych publikacjach, wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Material i metody

W celu izolacji macierzystych komórek mezenchymalnych użyto sznurów pępowinowych pozyskanych podczas naturalnych porodów lub podczas cesarskiego cięcia od kotek domowych różnych ras w wieku od 1,5 do 5 lat, które były pacjentkami Katedry Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich UP we Wrocławiu. Natomiast w celu izolacji oocytów posłużono się jajnikami uzyskanymi podczas owariohisterektomii bądź ovariectomii przeprowadzonych u kotek będących pacjentkami Katedry Rozrodu z Kliniką Zwierząt Gospodarskich UP we Wrocławiu oraz lokalnych klinik weterynaryjnych. W sumie do badań użyto 180 oocytów. Materiał badawczy w przedstawionej do oceny rozprawie jest jednolity, poszczególne procedury badawcze prowadzone były w identycznych warunkach, co pozwoliło uzyskać wyniki, które ze statystycznego punktu widzenia pozwoliły na wyciągnięcie wiarygodnych wniosków. Doktorantka wykazała się również bardzo dobrą znajomością literatury naukowej w temacie swoich badań, która umożliwiła jej przygotowanie rzetelnego przeglądu piśmiennictwa, zawartego w pracy nr 1, jak również przeprowadzenie dyskusji w cyklu prac zaliczanych do rozprawy doktorskiej. Na podkreślenie zasługuje dobry dobór metod badawczych, którymi posłużyła się Doktorantka w celu rozwiązania zaproponowanego zagadnienia, jak również trafność wyciąganych wniosków. Na uwagę zasługuje również świetna dokumentacja graficzna, zarówno zdjęcia, jak również wykresy i tabele bardzo dobrze odzwierciedlają uzyskane wyniki i pozwalają odbiorcy na szybkie zaznajomienie się z tematem.

W pracy nr 2 bardzo dokładnie opisana jest metodyka pozyskania komórek macierzystych z poszczególnych rejonów sznura pępowinowego, jak również metody hodowli komórkowej, pasaży, poszczególne podłoża komórkowe i media stosowane do różnicowania komórek macierzystych *in vitro*. Wyniki potwierdzone są bogatą dokumentacją fotograficzną. Bardzo precyzyjne opisy dają możliwość powtórzenia badań

przeprowadzonych przez Autorkę i uzyskania zbliżonych wyników. Na podkreślenie zasługuje rzetelność badań wykonanych przez Doktorantkę oraz bardzo dobra znajomość piśmiennictwa.

W pracy nr 3 Doktorantka zbadła wpływ komórek macierzystych wyizolowanych ze sznura pępowinowego z obszaru galarety Whartona na dojrzewanie oocytów kotki, jak również na rozwój zarodków *in vitro*. Metodyka poszczególnych doświadczeń jest bardzo dokładnie opisana, dając możliwość przeprowadzenia podobnego doświadczenia. Do dojrzewania oocytów *in vitro* zastosowano dwa rodzaje komercyjnych podłoży do dojrzewania oocytów końskich i bydłych. Komórki mezenchymalne uzyskane z pasażu 2 lub 3 były siane na płytki 4-dołkowe w ilości 1×10^4 komórek w 1 ml medium DMEM-LG zawierającym 10% płodowej surowicy bydłej i 1% penicyliny ze streptomycyną do momentu rozpoczęcia wspólnej hodowli z oocytami lub zarodkami.

Wyniki

W pracy nr 1 przedstawiona została zwięzła charakterystyka mezenchymalnych komórek macierzystych, począwszy od możliwości zastosowania tych komórek w różnych procedurach terapeutycznych, poprzez ich właściwości immunomodulujące i przeciwzapalne, jak również wspomaganie aktywności proliferacyjnej, angiogenicznej dzięki produkcji różnorodnych czynników wzrostu i cytokin. Następnie Doktorantka szeroko omówiła przykłady użycia MSCs w procedurach terapeutycznych u psów dotkniętych osteoarthritis, osteochondritis oraz w medycynie regeneracyjnej, po urazach ścięgien, jak również u kotów podczas astmy oskrzelowej, przewlekłej niewydolności nerek, przewlekłym zapaleniu przyzębia, problemach jelitowych tła zapalnego. Autorka podkreśliła rolę komórek macierzystych w medycynie regeneracyjnej ale również zwróciła uwagę na konieczność dokładnego zbadania długoterminowych efektów działania tych komórek, w celu zapewnienia bezpieczeństwa otrzymującym je pacjentom.

Wyniki badań opublikowane w pracy nr 2 wskazują, że komórki mezenchymalne pozyskane ze sznura pępowinowego, posiadały cechy komórek macierzystych, takie jak: typowy kształt, zdolność proliferacji oraz zdolność różnicowania się w komórki linii chondrogennej, osteogennej i adipogennej. Posiadały również typowe markery mezenchymalne CD44+ i CD90+, markery pluripotencji NANOG, Oct4, SOX2 i brak markerów hematopoetycznych CD34, MHC II. Do dalszych badań w hodowli w kokulturze wybrane zostały komórki wyizolowane z obszaru galarety Whartona, ponieważ wykazywały

wyższą zdolność proliferacji oraz lepszy potencjał do wielokierunkowego różnicowania, w porównaniu do komórek uzyskanych z całego sznura pępowinowego i samych naczyń krwionośnych.

Na podstawie wyników z doświadczeń przeprowadzonych w pracy nr 3 Doktorantka stwierdziła, że dodatek komórek macierzystych nie wpłynął na proces dojrzewania oocytów *in vitro*, który wyniósł 45-55 % we wszystkich badanych grupach. Niemniej jednak hodowla w kokulturze spowodowała zwiększenie stopnia rozszerzenia komórek wieńca promienistego, jak również zarodki pochodzące z oocytów hodowanych w kulturach w komórkami macierzystymi, wykazywały wyższy odsetek podziałów, morul i blastocyst. Podobnie zarodki, które pochodziły z oocytów dojrzewających bez dodania MSCs, ale hodowane w kokulturze z komórkami macierzystymi wykazywały wyższy odsetek morul i blastocyst. Uzyskane wyniki pozwalają oczekiwać na poprawę wyników hodowli zarodków w warunkach *in vitro*.

Spostrzeżenia dotyczące pracy doktorskiej

Przedstawiona do recenzji praca doktorska w postaci cyklu trzech publikacji jest spójnym i bardzo dobrze przedstawionym materiałem naukowym. Publikacje naukowe były recenzowane przez co najmniej dwóch niezależnych recenzentów, co w znacznej mierze ogranicza dalszą dyskusję. Doktorantka w badaniach posługuje się materiałem biologicznym pozostałym po zabiegu owariotomii/owariohisterektomii bądź po naturalnym porodzie lub cięciu cesarskim. Jest to warte podkreślenia, ponieważ nie wzbudza żadnych kontrowersji czy dylematów etycznych. Tematyka pracy, w mojej ocenie, zasługuje na docenienie, ponieważ wyniki tych doświadczeń będą miały szansę zostać zaimplementowane do biologii rozrodu dzikich kotowatych i być może przyczynić się do zwiększenia populacji zagrożonych gatunków.

Uwagi, bądź zapytania, które mam do Doktorantki są następujące:

1. W pracy nr 2 stosuje Pani metodykę izolacji mezenchymalnych komórek macierzystych w oparciu o metodykę zastosowaną przez Yang i in. (2019) (z recenzenckiego obowiązku muszę zaznaczyć, że w publikacji powołuje się Pani na imię a nie nazwisko pierwszego autora), w celu izolacji komórek progenitorowych z kopyta konia, z modyfikacjami własnymi. Te modyfikacje to np. użycie do trawienia tkanki roztworu 0,02% kolagenazy typu I, zamiast stężenia 0,1% z 10% dodatkiem albuminy bydlęcej (Yang i in., 2019). Modyfikacje wynikają m.in. z rodzaju tkanek wchodzących w skład narządu poddawanemu trawieniu, kopyto vs.

sznur pępowinowy. Czym powodowany był wybór akurat tej metodyki, zamiast nieco bliższej gatunkowi bądź narządowi, nad którymi Pani pracowała?

2. Odnośnie pracy nr 3, od ilu krotek został pozyskany materiał do badań, aby uzyskać pulę 180 oocytów wykorzystanych w badaniach?

3. W pracy nr 3 do dojrzewania oocytów i hodowli zarodków używa Pani komercyjnego podłoża do dojrzewania oocytów dedykowanego dla koni lub bydła. Czym podyktowany był wybór akurat tych podłoży, a nie np. zwykle stosowanego do IVM i hodowli zarodków kocich podłoża TMC199 z dodatkami?

4. Czy próbowała Pani wykonywać transfer hodowanych *in vitro* zarodków w ko kulturze z MSCs albo ma Pani dalsze plany naukowe na tego typu badania?

Podsumowanie

Reasumując, przeprowadzone badania wymagały od Doktorantki dużego zaangażowania organizacyjnego, dobrego planowania oraz umiejętności organizatorskich. Pomoc osób, które są współautorami w publikacjach, w żaden sposób nie umniejsza osiągnięć Doktorantki. Metodyka badań oraz uzyskane wyniki przedstawione są w czytelny i rzetelny sposób. Uzyskane wyniki nie tylko wzbogacają wiedzę podstawową, ale mają silne przełożenie na praktykę kliniczną. Mając na uwadze powyższe wnoszę do Rady Dyscypliny Weterynaria, o wyróżnienie pracy doktorskiej pani mgr Meriem Baouche stosowną nagrodą.

Wniosek końcowy

Praca doktorska pani mgr Meriem Baouche pt.: „Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Cats: biology and clinical application for embryo culture *in vitro*” w mojej ocenie w pełni odpowiada wymogom określonym w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.) stawianym kandydatom ubiegającym się o nadanie stopnia naukowego doktora. Dlatego też przedkładam wniosek do Wysokiej Rady Naukowej Dyscypliny Weterynaria Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu o dopuszczenie mgr Meriem Baouche do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.



Prof. dr hab. n. wet. Marta Siemieniuch