



WARSZAWSKI
UNIwersYTET
MEDYCZNY

KATEDRA I ZAKŁAD BIOLOGII OGÓLNEJ I PARAZYTOLOGII

Warszawa, 27 sierpnia 2025r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Macieja Jakuba Chyba pt. „ Białka
rekombinowane *Toxoplasma gondii* w immunoprofilaktyce i diagnostyce
toksoplazmozy”.**

Rozprawa doktorska mgr Macieja Jakuba Chyba została przygotowana w ramach Szkoły Doktorskiej BioMedChem, zaś jednostką doktoryzującą jest Uniwersytet Łódzki. Opiekę nad doktorantem sprawowała promotor rozprawy dr hab. Justyna Gatkowska, prof. UŁ, oraz dr inż. Bartłomiej Ferra jako promotor pomocniczy.

Rozprawa doktorska mgr Macieja Jakuba Chyba wpisuje się w niezwykle istotny obszar badań nad toksoplazmozą – jedną z najczęściej występujących zoonoz na świecie, wywoływaną przez pasożyta *Toxoplasma gondii*. Choroba ta ma ogromne znaczenie zarówno w medycynie człowieka, jak i w medycynie weterynaryjnej. U osób zdrowych przebieg zarażenia najczęściej pozostaje bezobjawowy, jednak u pacjentów z obniżoną odpornością, a zwłaszcza u płodów, może prowadzić do poważnych konsekwencji klinicznych, takich jak toksoplazmoza wrodzona, zapalenia ośrodkowego układu nerwowego czy ciężkie uszkodzenia narządu wzroku. W hodowli zwierząt gospodarskich, szczególnie owiec i kóz, *T. gondii* odpowiada za poronienia i znaczne straty ekonomiczne, co dodatkowo podkreśla wagę problemu.

Współczesna diagnostyka toksoplazmozy opiera się głównie na testach serologicznych z użyciem natywnych antygenów pasożyta, które obarczone są zmiennością preparatów i trudnością standaryzacji. Równocześnie w immunoprofilaktyce brak jest skutecznej i powszechnie dostępnej szczepionki. Poszukiwania nowych antygenów rekombinowanych, które mogłyby znaleźć zastosowanie w standaryzowanej diagnostyce oraz jako składniki szczepionek, stanowi jeden z kluczowych kierunków badań nad toksoplazmozą.

Na tym tle rozprawa doktorska mgr Macieja Jakuba Chyba ma szczególne znaczenie. Autor skoncentrował się na projektowaniu, wytwarzaniu i ocenie rekombinowanych białek chimerycznych *T. gondii*, zarówno w aspekcie ich użyteczności diagnostycznej, jak i immunoprofilaktyki. Zastosowane podejście, obejmujące zarówno konstrukty triwalentne i diwalentne, jak i próby immunizacji w formie białek oraz szczepionek DNA wspieranych nośnikami liposomalnymi, stanowi przykład innowacyjnego i kompleksowego programu badawczego odpowiadającego na najważniejsze wyzwania współczesnej parazytologii. Problem podjęty przez Doktoranta jest zatem istotny zarówno z poznawczego jak i praktycznego punktu widzenia. Natomiast brak zarejestrowanej szczepionki dla ludzi i ograniczenia preparatów weterynaryjnych w pełni uzasadniają potrzebę poszukiwania nowych skutecznych rozwiązań.

Praca doktorska mgr Macieja Jakuba Chyba została przygotowana na podstawie cyklu 5 prac (3 artykuły opublikowane, 2 przygotowane manuskrypty), uzupełnionego o rozbudowaną część własną i wyniki nieopublikowane, co jest spójne z trybem doktoratu „na podstawie cyklu publikacji”. Zwracam uwagę na solidne zaplecze grantowe (granty NCN SONATA 14 i NCBR LIDER), co potwierdza strategiczny charakter projektu i ciągłość finansowania. Umożliwiło to Doktorantowi zastosować kompleksowe podejście do prowadzonych badań z zastosowaniem szeregu nowoczesnych metod. Potwierdza to opanowanie przez Doktoranta bardzo dużego warsztatu badawczego, pozwalającego na rozwiązywanie kolejnych problemów badawczych.

Publikacje wchodzące w skład cyklu publikacyjnego charakteryzują się wysoką wartością naukową i zostały opublikowane w czasopismach o znacznym jak dla dziedziny parazytologia współczynniku oddziaływania (*impakt faktor*). Dodatkowo wszystkie te czasopisma znajdują się w najwyższym pierwszym kwartylu, co plasuje je w czołówce czasopism naukowych na świecie. Pozwolę sobie na przemilczenie tzw. „punktacji ministerialnej”, która w mojej ocenie jest tak wadliwa, że nie powinna być brana pod uwagę w postępowaniach awansowych.

Cykl publikacji wchodzących w skład rozprawy obejmuje:

- Publikację I (IJMS, 2024) – rozwój i walidacja triwalentnych antygenów chimerycznych w diagnostyce u małych przeżuwaczy (owce, kozy).
- Publikację II (Sci Rep, 2023) – długotrwała odporność i protekcja po immunizacji białkami chimerycznymi; ocena humoralna i komórkowa.

- Publikację III (Front Immunol, 2024) – immunogenność i skuteczność protekcyjna konstrukcji opartych o białka powierzchniowe; porównania tri- vs diwalentnych antygenów.
- Manuskrypty I–II (2025) – poszerzenie diagnostyki na surowice ludzkie (konstrukty SAG1/SAG2) oraz studium nad ROP8 (diagnostyka i immunogenność).

W części nieopublikowanej Doktorant przedstawił kompletny program badań nad: szczepionkami DNA (wektor pcDNA3.1), nośnikami liposomalnymi, transfekcją *in vitro/in vivo*, immunizacją myszy, testami serologicznymi i komórkowymi oraz immunofenotypowaniem (cytometria przepływowa) – z klarownymi rozdziałami metod i wyników (V.1–V.3). Rozprawa zawiera ponadto rozdziały integrujące wyniki, opis badań nieopublikowanych, obszerny wstęp teoretyczny, materiały i metody, a także podsumowanie i wnioski końcowe.

Na marginesie warto dodać, że dorobek Doktoranta wynosi h-index=3 (aktualnie 4), 9 publikacji indeksowanych, 25 cytowań (aktualnie 36), łączny IF 44,49 – wskaźniki te wskazują na wysoką dojrzałość naukową i są imponujące jak na ten etap rozwoju naukowego. Ponadto, doktorant wykazuje się aktywnością organizacyjną i popularyzującą naukę, odbył szereg kursów i szkoleń, brał aktywny udział w konferencjach, odbył staże w tym zagraniczny.

W swojej rozprawie Doktorant oceniał właściwości immunogennych jak i immunoprotekcyjnych rekombinowanych antygenów *T. gondii* oraz określał ich przydatności w serodiagnostyce toksoplazmozy. W tym celu postawił sobie trzy prezentowane w pracy cele badawcze. Choć we wstępie zarysowano szerokie tło (diagnostyka i immunoprofilaktyka), a w publikacjach realizowane są kolejne cele szczegółowe i kroki (projekt – walidacja – immunizacja – ochrona), w mojej ocenie w rozprawie zabrakło łączącej owe cele hipotezy badawczej. Można by ją sformułować przykładowo w następujący sposób: *Czy racjonalnie zaprojektowane wieloepitopowe antygeny chimeryczne T. gondii zapewniają (i) przewagę diagnostyczną, (ii) wysoką immunogenność i (iii) istotną protekcję – oraz czy podobny efekt da się uzyskać w formie szczepionek DNA wspieranych nośnikami liposomalnymi?* W mojej ocenie praca odpowiada twierdząco na (i) i (ii) oraz częściowo na (iii) – w części białkowej tak, w części DNA umiarkowanie.

Zastosowane przez Doktoranta metody są różnorodne i adekwatne, zostały użyte w sposób poprawny i przejrzyste przedstawione. Obejmują one m.in. przebadanie szeregu rekombinowanych konstrukcji chimerycznych złożonych z immunodominujących fragmentów

antygenów i ich możliwość zastosowania w serodiagnostyce toksoplazmozy oceniając ich czułość i swoistości w modelu zwierzęcym (przeżuwacze). Wszystkie *chimery* wykazały 100% swoistości, a czułość rzędu 94,55–100% (owce), z ponownym potwierdzeniem wysokich parametrów w próbach kozich. Są to niewątpliwie doskonałe, bardzo dobrze udokumentowane i przedstawione wyniki.

Dalej badania obejmowały immunizację białkami rekombinowanymi. Zastosowano adiuwant równoważny stosowany u ludzi (bezpieczeństwo/przenośność koncepcji), pomiary IgG, IgG1/IgG2a, stymulację splenocytów (IL-2, IFN- γ , IL-10) i ocenę protekcyjności po zarażeniu szczepem DX. Stwierdzono mieszaną odpowiedź Th1/Th2, szczególnie dla SGR i SGR+SMMG, z długotrwałością odpowiedzi (2 tyg. i 6 mies.).

Przeprowadzono analizę skuteczności zastosowania szczepionki DNA + liposomy (CL2; kompleksy pDNA/liposomy). Część nieopublikowana zawiera szczegółowy opis składu lipidów, przygotowanie liposomów, DLS / zeta, testy MTT, transfekcją, mikroskopia konfokalna, a także immunizacja *in vivo* i pełny panel immunologiczny (humoralna, komórkowa, cytometria; rozbudowane fenotypowanie pamięci).

Otrzymane wyniki zostały poddane analizie statystycznej, w której Doktorant stosuje test ANOVA Browna–Forsythe’a/Welcha z Dunnett T3 (przy niejednorodności wariancji) dla cyst w mózgowiu, jest to właściwy dobór testów i korekt. W cytometrii: ANOVA + LSD Fishera z korekcją FDR (Benjamini–Krieger–Yekutieli) – również poprawnie. Natomiast w niektórych przypadkach liczba przeprowadzonych analiz bywała niewielka, co ogranicza może wskazywać pewien trend jednak ogranicza moc statystyczną. Jest to z pewnością miejsce na wzmocnienie planowanych dalszych projektów.

Wyniki badań przeprowadzonych przez mgr. Macieja Chyba są bardzo bogate i różnorodne ich omówienie w recenzji zajęłoby wiele stron, co mija się z celem. Warto jednak podkreślić ich oryginalny i bardzo wartościowy charakter. Zastąpienie TLA chimerycznymi antygenami o 100% swoistości i do 100% czułości stanowi realny wkład aplikacyjny. Ważne, że u dwóch gatunków (owce, kozy) powtarzały się wysokie wartości obu parametrów. Jest to niewątpliwie krok w stronę testu wdrożeniowego. Warto będzie w przyszłości przeprowadzić pełną walidację wieloośrodkową i porównanie z różnymi komercyjnymi zestawami diagnostycznymi.

Kolejnym ważnym wynikiem jest zaobserwowanie, że białka SGR i SGR+SMMG generują trwałą pamięć komórkową, a ochrona utrzymuje się mimo spadku IgG.

Istotne jest także spostrzeżenie dotyczące umiarkowanej skuteczności ochronnej szczepionek DNA, gdzie najlepszy wariant pcDNA3.1-SGR + CL2 dał średnio 44,39% spadku liczby cyst, podczas gdy pozostałe układy były słabsze (ok. 24% bez liposomów). Dane są rzetelnie zinterpretowane i wskazują niższą efektywność szczepionek DNA w porównaniu do białkowych. Dodam, że Doktorant prezentuje rzeczową dyskusję o znanych trudnościach w zastosowaniu szczepionek DNA (słabsza produkcja swoistych IgG, zależność od drogi podania i ekspresji *in vivo*). Jest to cenny fragment rozprawy, w którym negatywne/umiarkowane wyniki są rzetelnie przedstawione i dokładnie skomentowane.

Jedną z kluczowych obserwacji cyklu prac, jest porównanie zastosowania szczepionki tri- i diwalentnych, gdzie zarówno w diagnostyce, jak i w immunizacji, konstrukty triwalentne wypadają zdecydowanie lepiej. Jest to bardzo wartościowy wniosek mogący mieć duże znaczenie praktyczne.

Z obowiązku recenzenta, jaki i z zainteresowania tematyką rozprawy mam do Doktoranta kilka uwag i pytań, które pozwalam sobie zamieścić poniżej.

Proszę o informację czy były przeprowadzane próby porównania *head-to-head* z komercyjnymi testami diagnostycznymi (ELISA/CLIA), jeśli tak to jak prezentują się wyniki otrzymane przez Doktoranta na ich tle? Przeprowadzenie takich analiz w tych samych warunkach mogłoby być wartościowym uzupełnieniem publikacji.

Zastanawia mnie też możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych np. z *Neospora caninum*, *Sarcocystis* itp. Czy planowane są badania, które taką możliwość zweryfikują? Uwaga ta odnosi się w szczególności do możliwości wykorzystania prezentowanych w doktoracie antygenów do wykrywania reakcji z IgG owiec lub kóz.

W publikacji nr II grupy zwierząt eksperymentalnych wydają się stosunkowo niewielkie. W jaki sposób dobrano wielkość grup eksperymentalnych? Czy zwiększenie liczby zwierząt w grupach mogłoby mieć wpływ na uzyskane wyniki? Z ciekawości zapytam, czy szczepy o innej wirulencji mogłyby spowodować znacząco odmienną odpowiedź długotrwałą i czy planowane są badania w tym kierunku?

Liczenie cyst w celu określenia obciążenia tkanek pasożytem jest znanym i powszechnie stosowanym standardem, niestety obarczonym błędem. Stąd nasuwa mi się pytanie czy zastosowanie qPCR lub ddPCR mogłoby zwiększyć dokładność analiz?

Wnioski zostały przez Doktoranta przedstawione w jasny sposób i nie wykraczają poza uzyskane wyniki. Powstrzymałbym się jednak od stwierdzenia, że rekombinowane białka

chimeryczne są wartościowym narzędziem diagnostycznym toksoplazmozy u ludzi. Tego nie jeszcze nie wiadomo, aby to stwierdzić niezbędna jest znacznie szersza walidacja kliniczna (np. różne grupy ryzyka, pacjenci o różnym statusie immunologicznym itd.), a także porównanie *head-to-head* z dostępnymi komercyjnymi testami (ELISA/CLIA), w tym analiza awidności IgG (być może także analiza scenariuszy IgM/IgA), jak również przeprowadzenie analizy możliwych reakcji krzyżowych.

Na koniec chciałbym zwrócić uwagę, że rozprawa doktorska mgr Macieja Jakuba Chyba została przygotowana w sposób niezwykle staranny, jest obszerna, bogata w wyniki, co odzwierciedla kompleksowe podejście do obranego tematu badań. Opracowanie to jest bardzo wartościowe i może stanowić materiał wyjściowy do prac nad testami diagnostycznymi oraz szczepionkami. W mojej ocenie cykl publikacji mgr Macieja Jakuba Chyba spełnia nie tylko wymagania stawiane rozprawom doktorskim, ale swoim poziomem dorównuje bardzo dobrej habilitacji.

Wniosek Końcowy

Rozprawa doktorska mgr Macieja Jakuba Chyba to spójny i wartościowy cykl publikacji łączący diagnostykę i immunoprofilaktykę toksoplazmozy z wykorzystaniem rekombinowanych antygenów chimerycznych. Najmocniejszym elementem są wyniki diagnostyczne oraz immunizacja białkami prowadząca do trwałej pamięci komórkowej i immunioprotekcji. Część dotycząca szczepionek DNA jest przedstawiona krytycznie i – mimo umiarkowanej skuteczności – dostarcza ważnych wniosków metodologicznych na przyszłość. Wyniki są oryginalne, wartościowe, nowatorskie, a zastosowany warsztat badawczy jest bogaty i obejmujący szereg nowoczesnych metod. Całość bez wątpienia spełnia ustawowe kryteria rozprawy doktorskiej, a wskazane przeze mnie nieliczne uwagi nie wpływają na moją bardzo wysoką ocenę rozprawy.

Wobec powyższego uważam, że przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr Macieja Jakuba Chyba spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim określonym w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024, poz. 1571 z późn. zm.) i wnoszę o dopuszczenie mgr Macieja Jakuba Chyba do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dyscyplinie nauki biologiczne.

Wniosek o wyróżnienie rozprawy doktorskiej

Na podstawie przeprowadzonej oceny rozprawy doktorskiej mgr Macieja Jakuba Chyba mam przyjemność wnieść do Wysokiej Rady o wyróżnienie pracy z uwagi na jej wyjątkowe walory naukowe i aplikacyjne.

Niniejsza rozprawa spełnia w najwyższym stopniu kryteria stawiane pracom doktorskim, a w szczególności cechuje się wyróżniającą jakością badań, w trakcie których Doktorant przeprowadził kompleksowy i wieloaspektowy program badawczy obejmujący projektowanie, wytwarzanie oraz walidację rekombinowanych antygenów chimerycznych *Toxoplasma gondii*. Badania odznaczają się wysokim poziomem metodologicznym, rzetelną analizą statystyczną i szerokim zakresem technik eksperymentalnych, od biologii molekularnej, przez immunologię, po modele zwierzęce.

Ponadto, rozprawa posiada szczególne walory poznawcze i w istotny sposób poszerza wiedzę o mechanizmach immunologicznych towarzyszących odpowiedzi na rekombinowane antygeny pasożyta. Wyniki badań nie tylko potwierdzają przydatność nowych konstruktów w diagnostyce i immunoprofilaktyce toksoplazmozy, ale także pozwalają na lepsze zrozumienie roli poszczególnych epitopów i typów odpowiedzi immunologicznej w kontroli zarażenia.

Niewątpliwie rozprawa mgr Macieja Chyba wykazuje również znaczące walory aplikacyjne. Opracowane antygeny chimeryczne charakteryzują się bardzo wysoką czułością i swoistością w testach ELISA, co stanowi realną podstawę do stworzenia nowoczesnych, standaryzowanych zestawów diagnostycznych. Badania nad szczepionkami dostarczyły z kolei dowodów na potencjał wykorzystania wybranych konstruktów jako elementów szczepionek eksperymentalnych. Doktorant zastosował nowatorskie konstrukty triwalentne, a także porównał różne strategie immunizacji (rekombinowane białka vs. szczepionki DNA z nośnikami liposomalnymi).

Biorąc pod uwagę powyższe argumenty, stwierdzam, że rozprawa mgr Macieja Jakuba Chyba znacznie przewyższa wymagania stawiane pracom doktorskim i w pełni zasługuje na wyróżnienie.

Wnoszę zatem do Komisji UŁ ds. Stopni Naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Macieja Jakuba Chyba.