

Łódź, 12.09.2025

Prof. dr hab. Maciej Cedzyński,
Instytut Biologii Medycznej PAN,
Pracownia Immunobiologii Zakażeń,
ul. Lodowa 106
93-232 Łódź
e-mail: mcedzynski@cbm.pan.pl

Ocena rozprawy doktorskiej Mgr Macieja Jakuba Chyba

pt. „Białka rekombinowane *Toxoplasma gondii* w immunoprofilaktyce i diagnostyce toksoplazmozy”.

Toxoplasma gondii jest kosmopolitycznym pasożytem zwierząt i ludzi. Toksoplazmoza u człowieka może przebiegać bezobjawowo, jednak niekiedy powoduje poważne objawy, nieodwracalne zmiany, a nawet kończy się fatalnie. Jest szczególnym zagrożeniem dla osób, u których występują zaburzenia odporności, u których może rozwinąć się postać mózgowa lub uogólniona choroby, a także, ze względu na możliwość transmisji wertykalnej, dla kobiet ciężarnych. Jest czynnikiem ryzyka poronień i wad rozwojowych płodu. Do zarażenia najczęściej dochodzi drogą pokarmową, a w rzadkich przypadkach podczas transfuzji preparatów krwiopochodnych lub przeszczepiania narządów. Dotychczas nie wprowadzono do użytku szczepionki przeznaczonej dla człowieka, a rutynowa immunodiagnostyka wykorzystuje preparaty antygenów *T. gondii* pochodzenia naturalnego. Konieczne jest więc opracowanie skutecznej i bezpiecznej szczepionki oraz testu serologicznego umożliwiającego uniknięcie uzyskania wyników niejednoznacznych, fałszywie dodatnich lub fałszywie ujemnych, umożliwiającego rozpoznanie choroby i określenie jej stadium. Problemy te były podstawą badań, których wyniki zostały przedstawione i omówione w ocenianej rozprawie doktorskiej Mgr Macieja Jakuba Chyba. Funkcję promotora pełniła Dr hab. Justyna Gatkowska z Katedry Mikrobiologii Molekularnej Uniwersytetu Łódzkiego, a promotora pomocniczego – Dr inż. Bartłomiej Ferra z Zakładu Parazytologii Tropikalnej Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego.

Rozprawa ma charakter mieszany: obejmuje zbiór trzech artykułów oryginalnych i wyniki niepublikowane, w postaci dwóch manuskryptów przeznaczonych do



publikacji oraz części opisowej. Zawiera opis źródeł finansowania, wykaz publikacji i manuskryptów będących jej podstawą, wymagane streszczenia, wykaz skrótów, wprowadzenie, opis założeń i celów pracy, kopie publikacji i manuskryptów wchodzących w skład pracy i ich podsumowanie, opis wyników niepublikowanych (wraz z omówieniem metod i dyskusją), podsumowanie z wnioskami końcowymi, wykaz literatury, a także opis dorobku naukowego Doktoranta, uwzględniający wykazy publikacji wraz z danymi bibliometrycznymi, projektów badawczych i komercyjnych, w których realizacji uczestniczył, ważniejszych konferencji, szkoleń kursów, innych aktywności związanych z działalnością naukową oraz nagród i wyróżnień. Rozprawę uzupełniają oświadczenia Współautorów o udziale w publikacjach i manuskryptach, wymagane w przypadku, kiedy praca stanowi wyodrębnioną część pracy zbiorowej. Artykuły oryginalne zostały opublikowane w czasopismach ujętych w Journal Citation Reports: *International Journal of Molecular Sciences* (Publikacja I), *Scientific Reports* (Publikacja II) i *Frontiers in Immunology* (Publikacja III). Należy zauważyć, że w czerwcu 2025 r., już po złożeniu pracy, w *Int. J. Mol. Sci.*, opublikowany został Manuskrypt I.

Mgr Maciej J. Chyb jest pierwszym autorem dwóch z opublikowanych prac oryginalnych i jednego manuskryptu oraz drugim autorem pozostałych pozycji. Jego znaczący udział w opracowaniu koncepcji badań, ich przeprowadzeniu, analizie i interpretacji wyników oraz opracowaniu publikacji/manuskryptów potwierdzają zamieszczone w nich informacje „Author contributions” oraz stosowne oświadczenia Współautorów. Niektóre wyniki, Doktorant prezentował na konferencjach krajowych i międzynarodowych. Lista pozostałych publikacji obejmuje 7 pozycji, a ich zbiorczy IF, wraz z artykułami włączonymi do rozprawy, lecz bez Manuskryptu I, wynosi 44,49. Jest także współautorem dwóch zgłoszeń patentowych dotyczących potencjalnych leków przeciwko toksoplazmozie. Był beneficjentem grantu studenckiego UŁ a jako wykonawca lub stypendysta uczestniczył w realizacji dziewięciu projektów o charakterze badawczym, komercyjnym lub bioinformatycznym. Mgr Maciej J. Chyb odbył też trzy krótkotrwałe staże badawcze. Opisane osiągnięcia świadczą o aktywności naukowej, umiejętności współpracy i dbałości o własność intelektualną.

W rozdziale „Wprowadzenie”, Autor rzeczowo opisał kluczowe zagadnienia związane z tematyką rozprawy, między innymi szczegółową charakterystykę *T. gondii* i jej wybranych antygenów, epidemiologię toksoplazmozy, przebieg choroby, drogi transmisji, diagnostykę (przede wszystkim serologiczną) czy profilaktykę. Mgr Maciej J. Chyb zwrócił szczególną uwagę na brak szczepionki, która mogłaby być stosowana

u ludzi i wady szczepionki weterynaryjnej oraz ograniczenia niektórych z dostępnych metod diagnostycznych. **Przedstawione fakty dobrze uzasadniają tematykę badawczą podjętą przez Doktoranta. Ponieważ rozważania dotyczące potwierdzenia zarażenia pasożytem dotyczą przede wszystkim immunodiagnostyki, proszę o krótkie omówienie wad i zalet metody PCR w czasie rzeczywistym, w porównaniu z proponowanymi w rozprawie badaniami serologicznymi z użyciem antygenów chimerycznych.** We fragmencie dotyczącym postaci choroby brakuje opisu szczególnie niebezpiecznej, uogólnionej toksoplazmozy. Choć rozwija się ona rzadko, przede wszystkim u osób o zaburzonej odporności, może być przyczyną śmierci. Autor wprowadził wspomnianą np. o zagrożeniu pacjentów chorujących na AIDS lecz nie rozwinął tego wątku. Pewne zastrzeżenia może budzić warstwa językowa i redakcyjna opisu (uwaga ta dotyczy całości materiałów niepublikowanych), np. użycie sformułowań „toksoplazmoza u zdrowych osób” czy „rozwinięcie podejścia szczepionkowego”.

Ambitne założenia i cele pracy są prawidłowo sformułowane, dobrze uzasadnione i nie budzą wątpliwości dotyczących planu badań. Doktorant sformułował trzy cele szczegółowe i wskazał części rozprawy dokumentujące ich realizację.

Kolejne części rozprawy Mgr Macieja J. Chyba stanowią publikacje oraz manuskrypty i opis innych danych niepublikowanych. Lekturę opublikowanych artykułów utrudnia skala ich kopii, a w związku z tym zbyt mały rozmiar czcionek, co zmusza czytelnika do korzystania z wersji elektronicznej. Punktem wyjścia prowadzonych przez Doktoranta i współpracowników, wielostronnych badań służących realizacji pierwszego celu było otrzymanie osiemnastu rekombinowanych, triwalentnych antygenów, których wspólnym fragmentem był układ białek SAG-1-SAG-2 (SS), natomiast trzeci fragment każdego z nich wybrano na podstawie literatury oraz reaktywności z próbami surowicy owiec i kóz, zarażonych *Toxoplasma gondii* i zdrowych. Następnie porównano reaktywność tak otrzymanych preparatów z używanym w rutynowej diagnostyce lizatem antygenowym TLA oraz wyjściowym, diwalentnym antygenem SS. Niektóre z otrzymanych układów chimerycznych wykazywały czułość i swoistość w pełni porównywalną z TLA, co wykazano testując próby surowicy zarażonych doświadczalnie myszy, zarażonych naturalnie hodowlanych parzystokopytnych (wraz z odpowiednimi próbami kontrolnymi) (Publikacja I, Ferra B.T. i wsp., *Int. J. Mol. Sci.*, 2024, doi: 10.3390/ijms25084384) oraz osób, u których rozpoznano ostrą lub przewlekłą toksoplazmozę i seronegatywnych w kierunku *T. gondii* (Manuskrypt I, Ferra B.T. i wsp., praca opublikowana po złożeniu rozprawy). Za prowadzeniem



dalszych badań w kierunku dalszej charakterystyki wybranych preparatów jako potencjalnie użytecznych w diagnostyce toksoplazmozy przemawia oczekiwana identyczność produktów i stosunkowo niski koszt ich otrzymywania, w porównaniu z lizatem pochodzenia naturalnego. Problematyka zastosowania rekombinowanych, alternatywnych dla TLA antygenów w diagnostyce serologicznej toksoplazmozy została podjęta także w doświadczeniach opisanych w Manuskrypcie II (Chyb M. i wsp.). Badania z wykorzystaniem myszy oraz materiału klinicznego wykazały 100% czułość i swoistość monowalentnego antygenu ROP8. W związku z powyższym, **proszę Doktoranta o opinię, czy uzasadnione jest stosowanie w diagnostyce preparatów triwalentnych, skoro antygen monowalentny daje tak obiecujące wyniki i przedstawienie stosownych argumentów.**

Manuskrypt II zawiera także dane związane z realizacją drugiego celu pracy – oceny przydatności rekombinowanych antygenów *T. gondii* jako kandydatów na szczepionki przeciwko toksoplazmozie, stanowiąc w ten sposób cenne uzupełnienie Publikacji II i Publikacji III. Przedmiotami badań, których wyniki przedstawiono w Publikacji II (Chyb M. i wsp., 2023, doi: 10.1038/s41598-023-40147-z) były triwalentny antygen SGR i tetrawalentny SMMG, a Mgr Maciej J. Chyb i współpracownicy testowali ich immunogenność i działanie protekcyjne u myszy. Co ważne, zaobserwowano nie tylko stymulację powstawania swoistych przeciwciał lecz także długotrwały efekt ochronny (mniejsza liczba cyst u zwierząt szczepionych, w porównaniu z nieszczepionymi). **Proszę o komentarz dotyczący przyczyn różnic pod względem typu wzbudzonej odpowiedzi w zależności od zastosowanego antygenu (z przewagą typu Th2 lub nie). Czy badane antygeny działają antagonistycznie i jakie mogą być tego przyczyny? Dlaczego antygen triwalentny okazał się skuteczniejszy niż tetrawalentny, co dodatkowo wykazano w badaniach aktywacji ludzkich monocytów?** W Publikacji III (Chyb M. i wsp., 2024, doi: 10.3389/fimmu.2024.1480349) przedstawione i omówione zostały wyniki dotyczące kilku antygenów wybranych na podstawie danych uzyskanych podczas realizacji pierwszego celu rozprawy. Badania rozszerzono, w porównaniu z Publikacją II, między innymi o ocenę zdolności inicjowania aktywacji dopełniacza przez indukowane szczepieniem przeciwciała i zależnego od tego systemu działania cytotoksycznego (CDCC). Trzy z czterech badanych preparatów triwalentnych wykazywały znaczący efekt ochronny oceniony także na podstawie porównania liczby cyst w mózgowiu i eliminacji tachyzoitów przez pobudzone makrofagi ludzkie. **Czy obok CDCC można również zaobserwować zjawisko ADCC?** Wyniki badań *in vitro* przedstawione we wspomnianym wyżej Manuskrypcie II sugerują także przydatność rekombinowanego antygenu ROP8 w immunoprofilaktyce



93-232 Łódź
ul. Lodowa 106

tel.: 042 2723633
fax.: 042 2723630

NIP: 982-03-52-085
REGON: 100492431

Zaopatrzenie
tel.: 042 2723600

toksoplazmozy. Mgr Maciej J. Chyb i współpracownicy wnioskują, że byłby on dobrym kandydatem na składnik preparatów chimerycznych. **Czy otrzymanie preparatu tri- lub tertrawalentnego skutkowałoby uzyskaniem lepszych efektów? Proszę Doktoranta o opinię w tej kwestii.**

Włączone do rozprawy publikacje i manuskrypty stanowią spójną całość, świadczącą o konsekwentnym realizowaniu przyjętego planu badawczego. Cennym elementem jest wyjaśnienie mechanizmów odpowiedzi komórek/organizmów na badane antygeny – identyfikacja dróg przekazywania sygnału czy wykazanie zmian ekspresji odpowiednich genów. Tę część pracy kończy rzeczowe podsumowanie, w którym Autor skrótowo omawia najważniejsze osiągnięcia przedstawione szczegółowo w artykułach i maszynopisach.

Część rozprawy określona jako wyniki nieopublikowane dotyczy badań prowadzonych przez Doktoranta, służących realizacji trzeciego, bardzo ambitnego celu pracy – zastosowania plazmidów kodujących antygeny chimeryczne w profilaktyce toksoplazmozy, co mogłoby skutkować opracowaniem szczepionki wykorzystującej DNA. Należy podkreślić dokładny opis stosowanych metod, który może być wykorzystany w kontynuacji badań czy też do celów dydaktycznych. Chociaż badania te nie zakończyły się pełnym sukcesem (uzyskano stosunkowo słabą odpowiedź poszczepienną i niezbyt skuteczny efekt ochronny), ich wyniki mogą być punktem wyjścia do dalszych prac. Na uwagę zasługuje próba zastosowania liposomów i dobrze uzasadniony wybór kompleksu CL2 C4,5 do badań *in vivo* oraz szeroki zakres przeprowadzonych eksperymentów. Pewien problem stanowi niska liczebność grup szczepionych myszy i wynikający z niej silny efekt różnic osobniczych odpowiedzi, należy jednak uwzględnić ograniczenia natury finansowej i etycznej, które mogły wpłynąć na przyjęty schemat doświadczeń. W niektórych analizach porównane zostały dane otrzymane dla PBS (jako negatywnej kontroli) z tymi dla plazmidu pustego i plazmidów niosących DNA kodujący antygen lecz brakuje porównania pustego plazmidu *versus* plazmid kodujący. **W związku z tym, chciałbym zapytać Doktoranta, czy takie porównania były wykonane, a jeśli nie – co było tego przyczyną. Czy rozważano szczepienie myszy z użyciem wyłącznie CL2 C4,5 dla oceny stymulacji układu odpornościowego?** W tej części rozprawy zdarzają się również drobne potknięcia natury językowej i edytorskiej (np. odwołanie się w podrozdziałach V.1.6 i V.1.10 do fragmentów o identycznych oznaczeniach). Autor używa też zamiennie terminów „waga” i „masa”, co jest powszechne w języku potocznym, lecz nieprawidłowe w tekstach o charakterze naukowym. Wspomniane wyżej

niepowodzenia czy niewielkie błędy nie wpływają na wysoką ocenę omawianego rozdziału. Należy uwzględnić wielokierunkowość badań i związany z nią szeroki zakres prac doświadczalnych.

W rozdziale „Dyskusja”, Mgr Maciej J. Chyb zwraca uwagę na zalety szczepionek DNA i ich wady, omawia uzyskane wyniki na tle danych opisanych w publikacjach i manuskryptach włączonych do rozprawy oraz danych literaturowych. Rozważa także możliwość modyfikacji szczepionek poprzez użycie adiuwantów. **Czy planowane są badania w tym zakresie?** Zaletą dyskusji jest wyważona interpretacja uzyskanych wyników. Podobnie, syntetyczny i rzeczowy charakter ma rozdział „Podsumowanie i wnioski końcowe”.

Wykaz literatury cytowanej w części materiałów niepublikowanych obejmuje 122 pozycje, zarówno z ostatnich lat, jak i nieco starszych, jednak istotnych dla treści ocenianej rozprawy. Należy jednak zwrócić uwagę na niepotrzebne i często błędne podawanie dat ukazania się poszczególnych artykułów (np. „1 listopad 2018”).

Rozprawa doktorska Mgr Macieja Jakuba Chyba, zatytułowana „**Białka rekombinowane *Toxoplasma gondii* w immunoprofilaktyce i diagnostyce toksoplazmozy**” stanowi **oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i świadczy o umiejętności samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Dokumentuje także wiedzę teoretyczną Doktoranta w dyscyplinie nauki biologiczne. Jako wyodrębniona część pracy zbiorowej spełnia warunki określone w ustawie Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce z 20 lipca 2018 roku z późniejszymi zmianami.** W związku z tym, zwracam się do Wysokiej Komisji Uniwersytetu Łódzkiego do spraw stopni naukowych w dyscyplinie nauki biologiczne o dopuszczenie Pana mgr Macieja Jakuba Chyba do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora.

Z uwagi na wysoką wartość naukową pracy, potwierdzoną trzema publikacjami znajdującymi się na liście JCR o wysokiej punktacji MNiSW (oraz czwartą, opublikowaną po złożeniu rozprawy, odpowiadającą Manuskryptowi I) i jej potencjałem aplikacyjnym, wnioskuję także o wyróżnienie rozprawy. Mgr Macieja J. Chyba.



Prof. dr hab. Maciej Cedzyński